

明 細 書

発明の名称：育毛剤

技術分野

[0001] 本発明は、育毛剤に関する。さらに詳しくは、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー５ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを含む育毛剤に関する。

背景技術

[0002] 毛髪の成長は、成長期、退行期、休止期からなるヘアサイクル（毛周期）に従って成長及び脱落を繰り返している。男性型脱毛症の症状は、何らかの原因によってヘアサイクルのバランスが失われ、成長期の期間が短縮して休止期毛の比率が増加し、毛髪が軟毛（うぶ毛）化するというものである。組織学的には、成長期毛包のサイズは健常頭皮のそれと比べて小さく、毛乳頭の発達も悪く、毛包をとりまく毛細血管網も減少するとの報告がある（非特許文献１）。

[0003] そこで、ヒトを始めとする哺乳動物において、育毛効果および毛種・毛質を改善する育毛剤などの外用剤の需要が伸びている。育毛効果および毛種・毛質を改善のため、毛のライフサイクルである毛周期を調節することに寄与する有効成分が提案され、育毛剤として上市されつつある。

[0004] 血管内皮増殖因子（VEGF）は、下垂体 *folliculo-stellate*（星状濾胞）細胞の培養液より単離された血管内皮細胞に特異的に作用する増殖因子で、血管内皮細胞の増殖を始めとした血管新生過程の促進、血管透過性の亢進作用があることが知られているところ、アデノシンは、ヒト毛乳頭細胞に作用させると、血管内皮増殖因子（VEGF）の発現が促進されることが明らかになっている（非特許文献２を参照）。

[0005] たとえば、育毛剤の有効成分としてミノキシジルの利用が提案され（特許文献１～３などを参照。）、ヒト臨床試験を経て、ミノキシジルを有効成分

とする育毛剤が上市されている。ミノキシジルは、毛乳頭細胞に作用させると血管内皮増殖因子（VEGF）の発現が促進されることが明らかになっている（非特許文献3を参照）。しかしながら、その医薬用途は本邦においては男性の壮年性脱毛症に限られるなど、育毛効果および毛種・毛質改善効果を所望する幅広い消費者の要望を十分に叶えるものとはなっていない。また、アデノシンは、ヒト臨床試験においても大きな副作用の報告はなく、薄毛改善機構は性ホルモンの調節とは直接関連しないことから、アデノシンは男女問わず安全に使用できる育毛剤の有効成分としての利用が提案され、上市されている（非特許文献4）。しかし、その改善効果に顕著な個人差があるため、育毛効果および毛種・毛質改善効果を所望する幅広い消費者の要望を十分に叶えるものとはなっておらず、改善が求められている。

[0006] そこで、発明者らは鋭意研究を進め、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニンおよびパルミトイルジペプチド-5ジアミノヒドロキシ酪酸が、毛幹伸長速度および最大毛幹長に有意に増大させ、毛乳頭細胞における血管内皮増殖因子（VEGF）の発現を促進させるなどの優れた育毛効果を有し、育毛剤やスカルプケア剤の有効成分として有用であることを見出している（特許文献4参照。）。

[0007] フィトスフィンゴシンは、化粧品原材料の成分として知られている（特許文献5参照。）。しかしながら、フィトスフィンゴシンの育毛効果に関する報告はない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：米国特許第4 1 3 9 6 1 9号明細書

特許文献2：特開昭63-150211号公報

特許文献3：特開昭63-145217号公報

特許文献4：国際公開第2021/075219号

特許文献5：特許第3220434号公報

非特許文献1：横山大三郎，油化学，1995，44巻，4号，p

. 266-273

非特許文献2: KYUNG-A HWANGら, Int J Mol Med, 2012, Feb; 29 (2): 195-201

非特許文献3: Lachgar S, Charveron M, Gall Y and Bonafe JL: Br J Dermatol 138, 407-411 (1998)

非特許文献4: 江浜律子ら, J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., 2011, Vol. 45, No. 1: 35-40.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の目的は、優れた育毛作用を有する育毛剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、フィトスフィンゴシンを有効成分とすることで育毛活性を発揮させることができ、さらにパルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンおよびパルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分とすることで、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンおよびパルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸またはフィトスフィンゴシンを用いるよりも強い育毛活性を発揮させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 上記の課題を解決するための本発明の第1の手段は、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤である。

[0012] 上記の課題を解決するための本発明の第2の手段は、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸を有効成分として含有することを特徴とする、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤である。

- [0013] 上記の課題を解決するための本発明の第3の手段は、フィトスフィンゴシンを有効成分として含有することを特徴とする、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤である。
- [0014] 上記の課題を解決するための本発明の第4の手段は、毛幹成長促進または発毛に用いるための、本発明の第1～第3の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0015] 上記の課題を解決するための本発明の第5の手段は、毛幹伸長速度を向上させるために使用する、本発明の第1～第4の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0016] 上記の課題を解決するための本発明の第6の手段は、毛幹最大長を向上させるために使用する、本発明の第1～第4の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0017] 上記の課題を解決するための本発明の第7の手段は、毛幹径を増大させるために使用する、本発明の第1～第4の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0018] 上記の課題を解決するための本発明の第8の手段は、毛数を増加させるために使用する、本発明の第1～第4の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0019] 上記の課題を解決するための本発明の第9の手段は、溶液である、本発明の第1～第8の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0020] 上記の課題を解決するための本発明の第10の手段は、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用の、本発明の第1～第9の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤である。
- [0021] 上記の課題を解決するための本発明の第11の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを、有効成分として製剤に含有させる工程を有することを特徴とする、育毛剤の製造方法

である。

- [0022] 上記の課題を解決するための本発明の第12の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を有効成分として製剤に含有させる工程を有することを特徴とする、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤の製造方法である。
- [0023] 上記の課題を解決するための本発明の第13の手段は、フィトスフィンゴシンを有効成分として製剤に含有させる工程を有することを特徴とする、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤の製造方法である。
- [0024] 上記の課題を解決するための本発明の第14の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を含有する製剤と、フィトスフィンゴシンを含有する製剤とを含む、育毛剤のキットである。
- [0025] 上記の課題を解決するための本発明の第15の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を含有する製剤を含む、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤のキットである。
- [0026] 上記の課題を解決するための本発明の第16の手段は、フィトスフィンゴシンを含有する製剤を含む、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤のキットである。
- [0027] 上記の課題を解決するための本発明の第17の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分として投与することを特徴とする、育毛方法である。
- [0028] 上記の課題を解決するための本発明の第18の手段は、本発明の第1～第

10の手段のいずれか1の手段に記載の育毛剤を対象に投与することを含む育毛方法である。

[0029] 上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分として含むスカルプケア剤である。

[0030] さらに、上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分として含むスカルプケア剤を対象に投与することを含む頭皮症状改善方法である。

[0031] さらに、上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを有効成分として含む毛乳頭細胞のVEGF産生促進剤である。

発明の効果

[0032] 本発明の手段により、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸とフィトスフィンゴシンを外用剤である育毛剤の有効成分として含有または併用するものとする事で、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛などの毛における毛幹成長促進、毛幹伸長速度の向上、毛幹最大長の向上、毛幹径の増大の効果並びにスカルプケア効果が奏される優れた育毛剤およびスカルプケア剤が提供されることとなる。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]図1は、ヒト毛乳頭細胞におけるパルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシン、及び、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジ

アミノヒドロキシ酪酸およびフィトスフィンゴシン 7 2 時間刺激による V E G F 遺伝子発現量の変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0034] 本発明を実施するための形態について、以下に説明する。なお、本発明はこれらの例示にのみに限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内において種々の変更を加え得ることは勿論である。
- [0035] 本発明に係る育毛剤およびスカルプケア剤の有効成分は、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸とフィトスフィンゴシンとを共に含有するもの、または、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸と、アデノシンとを併用するものからなる。
- [0036] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤における有効成分であるパルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシンの濃度は、育毛剤およびスカルプケア剤の全体に対し、0.001～20重量%である。より具体的には、0.005～10重量%である。
- [0037] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、医薬品、医薬部外品、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用化粧品および頭皮用化粧品を含む化粧品などとし、軟膏、パップ、リニメント、ローション、外用液剤、散布剤、クリーム、ジェル、乳液、ヘアトニック、ヘアスプレー、マイクロニードルなどといった外用剤としての様々な態様の剤形を有する製剤として使用することができるが、これらに限定されるものではない。
- [0038] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシンを有効成分として含有させる工程を経ることにより製造することができる。また、本発明の、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジ

ペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤およびスカルプケア剤は、フィトスフィンゴシンを有効成分として含有させる工程を経ることにより、また、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤およびスカルプケア剤は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を有効成分として含有させる工程を経ることにより、製造することができる。さらに、上記各工程にくわえ、所望により、製剤化のための添加物を含有させる工程を加えたものとしてもよい。

[0039] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤において、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシルスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシンが別々の製剤に含有され提供される場合には、それら製剤の剤形は、同じ剤形であっても異なる剤形を組み合わせたものであってもよく、それら剤形の製剤を提供するためのキットとして提供することもできる。

[0040] また、さらに、本発明の育毛効果およびスカルプケア効果を妨げない程度において、医薬品、医薬部外品、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用化粧品および頭皮用化粧品を含む化粧品などにおいて通常含有することが許容される添加物等の成分を、配合したものとしてもよい。この添加物等の成分としては、例えば賦形剤、安定剤、矯臭剤、基剤、分散剤、希釈剤、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性重合体、非イオン性重合体、エチレンオキシド・プロピレンオキシドブロック共重合体、アルコール類、乳化剤、経皮吸収促進剤、pH調整剤、保存剤、着色剤、油脂、鉱物油などの油分、保湿剤、増粘剤、ポリマー、皮膜形成剤、紫外線吸収剤、細胞賦活剤、保湿剤、無機塩、機能性ビーズ・カプセル類、シリコーン類、金属キレート剤、酸化防止剤、防腐剤、清涼剤、消臭剤、顔料、染料、香料、糖類、アミノ酸類、ビタミン類、有機酸、有機アミン、植物抽出物、粘土鉱物や各種ポリマーなどの粘度調整剤などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

- [0041] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、発毛、育毛、養毛などの効果を有する公知の成分をさらに含有するものとしてもよい。
- [0042] 本発明の手段における育毛剤およびスカルプケア剤の1投与あたりの有効成分の投与量は、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の効果が奏されるように調節することができる。そして、その投与量は、例えば0.005～200mg、具体的には0.05～100mg、より具体的には0.5～10mgとすることができる。
- [0043] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の投与回数は、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の効果が奏されるよう、1回もしくは複数回とすることができる。そして、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の投与回数は、例えば1日あたり1～6回とすることができる。そして、具体的には1日あたり1～3回、より具体的には1日あたり1～2回とすることができる。
- [0044] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、毛幹成長促進、発毛および脱毛防止に関するものであり、好ましくは毛幹成長促進および発毛に関するものである。
- [0045] 本明細書において、「毛幹成長促進」との用語は、毛幹伸長速度を向上させること、毛幹最大長を向上させること、および／または毛幹径を増大させることを意味する。
- [0046] 本明細書において、「発毛」との用語は、毛が生えていない（表皮から外に毛幹が出ていない）または毛数の少ない部位において発毛が停止した、または発毛能力が低下した毛穴から新しい毛が生えることを促進して毛数を増加させることを意味し、詳細には、毛周期における休止期を短縮すること、および／または停止した毛周期を再開させることを意味する。
- [0047] 本明細書において、「毛幹成長促進効果を有する」とは毛幹成長促進に有利に作用することを意味し、毛幹成長促進効果を示す特質を「毛幹成長促進活性」と称する。また、「発毛効果を有する」とは発毛に有利に作用することを意味し、発毛効果を示す特質を「発毛促進活性」と称する。
- [0048] 本明細書において、「脱毛」との用語は毛穴から毛幹が脱落する現象を意

味し、詳細には、細胞増殖を阻害する抑制性サイトカイン等の増加および、それらの細胞死を意味する。脱毛防止効果を示す特質を「脱毛防止活性」と称する。また、「脱毛防止効果を有する」とは、抑制サイトカインの阻害もしくは減少、および細胞死の抑制を介して、毛穴からの毛幹の脱落数が減少することを意味し、毛幹成長促進、発毛効果を示す特質とは異なる生理現象である。

[0049] 本明細書において、「頭皮症状」とは、ふけ、頭皮の肌荒れ、頭皮のかさつき、紅斑、かゆみ、吹き出物などの症状を意味する。そして、本明細書において「頭皮症状改善」とは、ふけ、頭皮の肌荒れ、頭皮のかさつき、紅斑、かゆみ、吹き出物などの抑制又は改善を意味する。

[0050] 本発明の育毛剤は、毛幹伸長速度または毛幹最大長を向上させるために使用することができる。そして、毛幹伸長速度については、毛周期の標準データにおける毛幹伸長速度と比較して、例えば最大110%程度向上させることができ、具体的には25～110%程度向上させることができ、より具体的には33～110%程度向上させることができる。また、毛幹最大長については、毛周期の標準データにおける毛幹最大長と比較して、例えば最大49%程度向上させることができ、具体的には1～49%程度向上させることができ、より具体的には2～49%程度向上させることができる。

[0051] 本発明の育毛剤は、毛幹径を増大させるために使用することができる。

[0052] 本発明の育毛剤は、毛が生えていない（表皮から外に毛幹が出ていない）または毛数の少ない部位において発毛が停止した、または発毛能力が低下した毛穴から新しい毛が生えることを促進して毛数を増加させるために使用することができる、詳細には毛周期における休止期を短縮する、および／または停止した毛周期を再開させるために使用することができる。

[0053] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、ヒトの他、家畜や愛玩動物などの動物用に使用することもできる。本発明の1つの側面において、フィスフィンゴシンと、アデノシンとを含む外用剤をヒト及び家畜や愛玩動物などの非ヒト動物を含む対象に投与することを含む、育毛方法および頭皮症状改

善方法が提供される。

実施例

[0054] <試験例 1 : ヒト毛乳頭細胞における V E G F 遺伝子発現の評価>

[0055] V E G F 遺伝子は、毛乳頭細胞において発現し、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛における毛幹成長促進、毛幹伸長速度の向上、毛幹最大長の向上、毛幹径の増大などの効果発現に寄与するとされている。そこで、ヒト毛乳頭細胞を用い、各成分における V E G F 遺伝子の発現亢進について評価を行った。

[0056] 1. 材料と方法

(1) ヒト毛乳頭細胞及び培地について

ヒト毛乳頭細胞（カタログ番号：C A 6 0 2 0 5 a、白色人種、29 歳男性由来、東洋紡株式会社（日本））を購入し、プロトコールに記載されるようにして細胞を維持・培養して試験評価を行った。

[0057] (2) 薬剤

試験用薬剤として、以下の各濃度（終濃度）の薬剤溶液を調製し、使用した。

比較例 1 : パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物 0.1 % 溶液

比較例 2 : パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物 3 % 溶液

実施例 1 : フィトスフィンゴシン 0.3125 μ M

実施例 2 : フィトスフィンゴシン 1.25 μ M

実施例 3 : フィトスフィンゴシン 1.25 μ M およびパルミトイルジペプチドー 5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー 5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物 0.1 % 溶液

実施例 4 : フィトスフィンゴシン 1.25 μ M およびパルミトイルジペプ

チドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチ
ドー５ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物 ３％溶液

[0058] (3) 試験方法

ヒト毛乳頭細胞を 6×10^3 個／ウェルとなるように、２４ウェルプレートに播種した。CO₂インキュベーター（５％CO₂、３７℃）内で、１日間培養後、各試験用薬剤を含む培地に置換した。その後、細胞プレートをCO₂インキュベーターに戻し、さらに７２時間培養した。培養後、各ウェルより、全RNAを抽出、回収して、それをcDNAに逆転写した。調製したcDNAを用いて、リアルタイムPCR法にてVEGF遺伝子の発現をそれぞれ測定した。内部標準としてGAPDH遺伝子を用い、陰性対照群との相対値としてVEGF遺伝子の発現量を算出した。

[0059] 細胞からの全RNAの回収にはFastGene RNA Basic Kit（カタログ番号：FG-80250、日本ジェネティクス株式会社（日本））を使用した。

[0060] ウェルあたり300μLの溶解バッファーRLを添加し、ピペッティングにて細胞を溶解した。細胞溶解液に70％エタノールを300μL添加し、ピペッティングにて混合した。サンプル溶液をFastGene RNA binding columnに添加し、10000rpmで1分間、室温で遠心した。カラムを通過したろ液をコレクションチューブから廃棄し、FastGene RNA binding columnを元のコレクションチューブに戻した後、600μLの洗浄バッファーRW1をFastGene RNA binding columnに加え、10000rpmで1分間、室温で遠心した。FastGene RNA binding columnを新しいコレクションチューブに移してセットし、700μLの洗浄バッファーRW2をFastGene RNA binding columnに加え、10000rpmで1分間、室温で遠心した。FastGene RNA binding columnを新しいコレクションチューブに移してセットし、15000rpmで1分間、室温で遠心した。FastGen

e RNA binding columnを新しいコレクションチューブに移してセットし、50 μ Lの溶出バッファー RE をFastGene RNA binding columnのメンブレンの中央に添加し、10000 rpmで1分間、室温で遠心し、精製したRNAを回収した。回収したRNAの濃度をNanoDrop Lite（カタログ番号：ND-LITE、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）にて測定し、-80℃にて次のcDNA化作業まで保存した。

[0061] cDNAの合成にはFastGene scriptase II cDNA synthesis 5X Ready Mix（カタログ番号：NELS64、日本ジェネティクス株式会社（日本））を使用した。新しいチューブに生成した全RNAの濃度が20 ng/mLになるように、RNase Free Waterで希釈し、このサンプル溶液16 μ LにFastGene scriptase II cDNA synthesis 5X Ready Mixを4 μ L添加し、ボルテックスにて攪拌した。Mini Ampサーマルサイクラー（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を用い、25℃で10分間、42℃で60分間、85℃で5分間インキュベートし、cDNAを合成した。

[0062] 上記の方法にて合成したcDNAをリアルタイムPCRに用いた。96ウェルプレートの所定のウェルに、各cDNA template 希釈液を添加し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（カタログ番号：QPS-201、東洋紡株式会社（日本））とプライマーを添加して混合し、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System（カタログ番号：4485693、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）にて遺伝子発現を解析した。PCR反応として、95℃5秒間、60℃30秒間、及び72℃30秒間を40サイクル行った。

[0063] 試験に使用したVEGF遺伝子に特異的なプライマー及び内部標準としたGAPDH遺伝子に特異的なプライマーを以下に示す。

V E G F 遺伝子発現検出用プライマー

順方向 : aggccagcacataggagaga (配列番号 1)

逆方向 : acgcgagtcctgtgtttttgc (配列番号 2)

G A P D H 遺伝子発現検出用プライマー

順方向 : catccctgcctctactggcgctgcc (配列番号 3)

逆方向 : ccaggatgcccttgagggggccctc (配列番号 4)

[0064] 以下のようにして各遺伝子の相対発現量を算出した。

各遺伝子の増幅曲線と閾値線との交点より、C t 値 (P C R サイクル数) を算出した。目的遺伝子の C t 値より内部標準 G A P D H 遺伝子の C t 値で除した値が相対発現量となる。

[0065] 2. 結果

ヒト毛乳頭細胞にパルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物、フィトスフィンゴシン、およびパルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物とフィトスフィンゴシンを 7 2 時間作用させた後の V E G F 遺伝子の発現量の変化を測定し、その結果を図 1 に示した。

[0066] 図 1 に示すように、ヒト毛乳頭細胞に対してフィトスフィンゴシンを 7 2 時間作用させると、無添加対照群に比して V E G F 遺伝子発現量が用量依存にて上昇することが確認された (実施例 1 ~ 2)。そして、フィトスフィンゴシンの添加量が増えると、V E G F 遺伝子発現量はアデノシンを作用させた場合 (比較例 1) よりも有意に大きくなることが確認された。そしてさらに、ヒト毛乳頭細胞に対してパルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物とフィトスフィンゴシンとの混合溶液を 7 2 時間作用させると、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物もしくはフィトスフィンゴシンのみを作用させた場合よりも有意に、V E G F 遺伝子発現

量が、より顕著に増大することが確認された（実施例3及び4）。

[0067] このように、フィトスフィンゴシンは、毛乳頭細胞におけるVEGF遺伝子の発現を亢進し、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛などの毛における毛幹成長促進、毛幹伸長速度の向上、毛幹最大長の向上、毛幹径を増大する効果を奏する育毛剤およびスカルプケア剤の有効成分として有用であることが確認された。

さらに、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシルレオニン、パルミトイルジペプチド-5ジアミノヒドロキシ酪酸の混合物とフィトスフィンゴシンとを併用するものは、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシルレオニン、パルミトイルジペプチド-5ジアミノヒドロキシ酪酸、もしくはフィトスフィンゴシンをそれぞれ単独で有効成分として用いる場合に比して、毛乳頭細胞におけるVEGF遺伝子の発現をより顕著に亢進して育毛作用をさらに増強し、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛などの毛における毛幹成長促進、毛幹伸長速度の向上、毛幹最大長の向上、毛幹径をより増大する効果を奏する育毛剤およびスカルプケア剤の有効成分として有用であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明の手段により、育毛剤の有効成分として、フィトスフィンゴシンおよびアデノシンを共に含有するもの、または、フィトスフィンゴシンおよびアデノシンを併用するものとすることで、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛などの毛における毛幹の成長促進効果、毛幹伸長速度の向上効果および毛幹最大長の向上効果並びにスカルプケア効果を奏するとともに毛乳頭細胞におけるVEGF遺伝子発現量がより顕著に増大する、新たな育毛剤およびスカルプケア剤を提供することが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシンを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。
- [請求項2] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を有効成分として含有することを特徴とする、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤。
- [請求項3] フィトスフィンゴシンを有効成分として含有することを特徴とする、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤。
- [請求項4] 毛幹成長促進または発毛に用いるための、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項5] 毛幹伸長速度を向上させるために使用する、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項6] 毛幹最大長を向上させるために使用する、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項7] 毛幹径を増大させるために使用する、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項8] 毛数を増加させるために使用する、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項9] 溶液である、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項10] 頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用の、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤。
- [請求項11] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と、フィトスフィンゴシンとを、有効成分として製剤に含有させる工程を有す

ることを特徴とする、育毛剤の製造方法。

[請求項12] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を有効成分として製剤に含有させる工程を有することを特徴とする、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤の製造方法。

[請求項13] フィトスフィンゴシンを有効成分として製剤に含有させる工程を有することを特徴とする、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤の製造方法。

[請求項14] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を含有する製剤と、フィトスフィンゴシンを含有する製剤とを含む、育毛剤のキット。

[請求項15] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸を含有する製剤を含む、フィトスフィンゴシンと併用するための育毛剤のキット。

[請求項16] フィトスフィンゴシンを含有する製剤を含む、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸と併用するための育毛剤のキット。

[請求項17] パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン、パルミトイルジペプチドー5ジアミノヒドロキシ酪酸、フィトスフィンゴシンを有効成分として投与することを特徴とする、育毛方法。

[請求項18] 請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の育毛剤を対象に投与することを含む育毛方法。