

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2002 - 267663**

(P2002 - 267663A)

(43)公開日 平成14年9月18日 (2002.9.18)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト* ( 参考 )
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
38/22		A 6 1 P 43/00	107 4 B 0 6 4
45/00		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	107	G 0 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L ( 全 11数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 63749(P2001 - 63749)

(22)出願日 平成13年3月7日 (2001.3.7)

(71)出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72)発明者 天野 聡

神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 12 - 1 株式会社資生堂リサーチセンター(金沢八景)内

(72)発明者 曾根原 信子

神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 12 - 1 株式会社資生堂リサーチセンター(金沢八景)内

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 基底膜ケア薬剤

(57)【要約】

【課題】 本発明は、VII 型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法、かかるスクリーニング方法によりスクリーニングされたVII 型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子、更にはかかるVII 型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子を含有するVII 型及び/又はIV型コラーゲン産生制御剤、特に基底膜ケア剤の提供を課題とする。

【解決手段】 VII 型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子は、VII 型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVI I 型/又はIV型コラーゲンを定量することによりスクリーニングすることができた。かかるコラーゲン産生制御因子のうち、VII 型及び/又はIV型コラーゲン産生を促進する因子は基底膜のダメージの修復に利用する基底膜ケア剤に利用できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 VII型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法であって、VII型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVII型コラーゲンを定量することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項2】 前記VII型コラーゲン産生細胞がケラチノサイト又は線維芽細胞である、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項3】 前記VII型コラーゲンの定量を、VII型コラーゲンに特異的な2種類のモノクローナル抗体を使用し、前記細胞から産生されたVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法により実施する、請求項1又は2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 前記モノクローナル抗体として抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32を利用することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のスクリーニング方法。

【請求項5】 前記VII型コラーゲン産生制御因子がVI型コラーゲン産生促進因子である、請求項1～4のいずれか1項記載のスクリーニング方法。

【請求項6】 請求項1～4のいずれか1項記載の方法によりスクリーニングされ得るVII型コラーゲン産生制御因子。

【請求項7】 前記VII型コラーゲン産生制御因子がVI型コラーゲン産生促進因子である、請求項6記載のVI型コラーゲン産生制御因子。

【請求項8】 請求項6記載のVII型コラーゲンの産生制御因子を含有するVII型コラーゲン産生制御剤。

【請求項9】 請求項7記載のVII型コラーゲン産生促進因子を含有する基底膜ケア剤。

【請求項10】 抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32を利用することを特徴とする、VII型コラーゲンを定量するための免疫測定方法。

【請求項11】 IV型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法であって、IV型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するIV型コラーゲンを抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199及び抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-C L I Vの組み合わせを利用してサンドイッチする免疫測定方法により定量することを特徴とする、スクリーニング方法。

【請求項12】 前記IV型コラーゲン産生細胞がケラチノサイト又は線維芽細胞ある、請求項11記載のスクリーニング方法。

【請求項13】 前記IV型コラーゲン産生制御因子がIV型コラーゲン産生促進因子である、請求項11又は12項記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 請求項11又は12記載の方法により\*

\*スクリーニングされ得るIV型コラーゲン産生制御因子。

【請求項15】 前記IV型コラーゲン産生制御因子がIV型コラーゲン産生促進因子である、請求項14記載のIV型コラーゲン産生制御因子。

【請求項16】 請求項14記載のIV型コラーゲン産生制御因子を含有するVII型コラーゲン産生制御剤。

【請求項17】 請求項15記載のIV型コラーゲン産生促進因子を含有する基底膜ケア剤。

【請求項18】 トランスフォーミング成長因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1及び血小板由来増殖因子から成る群から選択された1又は2種以上のIV型コラーゲン産生促進因子を含有する、請求項17記載の基底膜ケア剤。

【請求項19】 基底膜ケア因子をスクリーニングする方法であって、VII型コラーゲン産生細胞及びIV型コラーゲン産生細胞を各々被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVII型コラーゲン及びIV型コラーゲンを各々定量することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項20】 前記VII型コラーゲン産生細胞及びIV型コラーゲン産生細胞が各々ケラチノサイト又は線維芽細胞ある、請求項19記載のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項19又は20記載の方法によりスクリーニングされ得る基底膜ケア因子。

【請求項22】 請求項21記載の基底膜ケア因子を含有する基底膜ケア剤。

【請求項23】 トランスフォーミング成長因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1及び血小板由来増殖因子から成る群から選択された1又は2種以上の基底膜ケア因子を含有する、請求項22記載の基底膜ケア剤。

【請求項24】 基底膜をダメージから保護するための、又は基底膜のダメージを修復するための方法であって、請求項9、17、18、22又は23記載の基底膜ケア剤を皮膚に塗布することを含んで成る方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法、かかるスクリーニング方法によりスクリーニングされたVII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子、更にはかかるVII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子を含有するVII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御剤、特に基底膜ケア剤を提供する。

【0002】

【従来の技術】皮膚の構造は、大きく分けて角層、表皮、基底膜、真皮から成る。IV、VII型コラーゲンは表皮と真皮とを結合させる働きを担う表皮基底膜成分である。特に、VII型コラーゲンは基底膜と真皮とを結合させるアンカリング線維の主成分である。電子顕微鏡によ

る観察では、アンカリング線維の一端は表皮基底膜のラミナデンサから発し、真皮中に存在する I 型、III 型、V 型コラーゲンから構成されるコラーゲン線維と相互作用し、再度基底膜のラミナデンサに結合している。この巨大なネットワーク構造を形成することによって、基底膜と真皮とは強く結合している。(Keene et al., *J. Cell Biol.*, 104:611-621 (1987)、Shimizu et al., *Lab Invest.* 1997 Jun.; 76(6): 753-63)。

【0003】IV型コラーゲンは分子量約185kDaの糖蛋白質であり、1(IV)、2(IV)、3(IV)、4(IV)、5(IV)、6(IV)と表記されているポリペプチド鎖をコードする6種類の遺伝子が同定されている。IV型コラーゲン分子においては、[1(IV)]<sub>2</sub>、2(IV)、3(IV)、4(IV)、5(IV)及び5(IV)、6(IV)ポリペプチドが3本鎖を形成して存在し、皮膚では1(IV)、2(IV)、5(IV)及び6(IV)が存在していることが知られている。そして、5(IV)を欠損するX-連鎖アルポート症候群(X-linked Alport syndrome)では皮膚基底膜の構造異常が発生しないことから、皮膚基底膜における[1(IV)]<sub>2</sub>、2(IV)ポリペプチドの重要性が示唆されていた。皮膚老化との関連では、皮膚基底膜中のIV型コラーゲンが加齢と共に低下することが観察されている(Vazquez F et al., *Maturitas* 1996, 25:209-15)。従って、表皮基底膜中のIV型コラーゲンは皮膚老化の防止において重要な役割を担うものと考えられている。しかしながら、生体内でIV型コラーゲンの産生がどのようにして制御されているかは未だ十分には解明されていない。

【0004】一方、VII型コラーゲン分子は分子量約300kDaの1鎖の3本鎖から成り、分子同士がS-S結合により2量体をつくり、これらが更に会合して線維を形成している。ケラチノサイトと線維芽細胞は共にVII型コラーゲンを産生することで知られている。しかしながら、生体内でVII型コラーゲンの産生がどのように制御されているかはよくわかっていない。

【0005】皮膚におけるアンカリング線維の役割は、VII型コラーゲン遺伝子の変異を原因とする先天性表皮水泡症に基づき解明されている。この疾患では、VII型コラーゲン遺伝子上の変異のためにVII型コラーゲン分子構造が変化し、正常なアンカリング線維が形成されず、表皮層と真皮との結合力が弱まり、その結果皮膚に力がかわると、皮膚はその構造を維持することができなくなってしまう(Christiano, *Nature Genet.*, 4:62-66, 1993)。

【0006】正常皮膚においては、生理的老化及び光老化に伴いアンカリング線維の数が減少することが報告されている(辻卓夫、*日皮会誌* 105:963-975, 1995, Tidman et al., *J. Invest Dermatol.*, 83:448-453, 1984)。高齢者の皮膚由来の線維芽細胞において、若いヒト

皮膚由来の線維芽細胞と比較して、VII型コラーゲン産生能が蛋白質レベル及びmRNAレベルで共に低下していることも報告されている(Chen et al., *J. Invest. Dermatol.*, 102:205-209, 1994)。従って、VII型コラーゲンの存否が皮膚の老化症状の発現に関与している可能性が考えられる。

【0007】レチノイン酸塗布によりしわ等の老徴現象が改善されることはよく知られている。アンカリング線維に関しては、UV障害皮膚にレチノイン酸を連続塗布することによりアンカリング線維の数が有意に増加することが報告されており、アンカリング線維数の回復がしわの改善に関与している可能性が示唆されている(Woodley, *JAMA*, 263:3057-3059, 1990)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上述の通り、IV及びVII型コラーゲンは共に表皮基底膜中に存在し、皮膚の若さの保持を担う重要な成分であるが、共に生体内において如何なるメカニズムによりその産生が制御されているか十分に解明されておらず、またそれらの産生を促進、抑制する物質に関する検討は十分に行われていない。本発明者は、IV及びVII型コラーゲンの表皮基底膜における重要性に鑑み、その産生を促進する物質の存在を検討した。その結果、本発明者は所定の物質がIV及びVII型コラーゲンの産生を促進することを見出すと共に、IV及びVII型コラーゲン産生制御因子を簡易にスクリーニングする方法の開発に至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、第一の観点において、VII型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法であって、VII型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVII型コラーゲンを定量することを特徴とする方法を提供する。かかる方法において、VII型コラーゲン産生細胞のVII型コラーゲン産生能が制御(促進又は抑制)されたら、当該因子はVII型コラーゲン産生制御(促進又は抑制)因子と認定できる。

【0010】好ましくは、前記VII型コラーゲン産生細胞はケラチノサイト又は線維芽細胞である。更に好ましくは、前記VII型コラーゲンの定量は、VII型コラーゲンに特異的な2種類のモノクローナル抗体を使用し、前記細胞から産生されたVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法により実施する。更に好ましくは、前記スクリーニング方法において、前記モノクローナル抗体として抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32(G. P. Lunstrum et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262:13706-13712)を利用する。更に好ましくは、前記VII型コラーゲン産生制御因子はVII型コラーゲン産生促進因子である。

【0011】別の態様において、本発明は前記VII型コラーゲンの産生制御因子をスクリーニングする方法によ

りスクリーニングされ得るVII型コラーゲン産生制御因子を提供する。好ましくは、前記VII型コラーゲン産生制御因子はVII型コラーゲン産生促進因子である。

【0012】別の態様において、本発明は前記VII型コラーゲンの産生制御因子をスクリーニングする方法によりスクリーニングされ得るVII型コラーゲン産生制御因子を含有するVII型コラーゲン産生制御剤を供する。好ましくは、前記VII型コラーゲン産生制御剤はVII型コラーゲン産生促進剤、より好ましくは基底膜ケア剤、更により好ましくはヒト基底膜ケア剤である。

【0013】更なる別の態様において、本発明は抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32を利用する、VII型コラーゲンの定量するための免疫測定方法を提供する。好ましくは、かかる方法はサンドイッチ免疫測定方法である。更に好ましくは、かかる免疫測定方法はサンドイッチELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)である。

【0014】本発明は、第二の観点において、IV型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法であって、IV型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、し 20 かる後に当該細胞が産生するIV型コラーゲンを抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199(Kino et al. J. Biochem. 1988, 103:829-835)及び抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-CLIV(コスモバイオ株式会社)の組み合わせを利用する免疫測定方法により定量することを特徴とする方法を提供する。好ましくは、かかる方法はサンドイッチ免疫測定方法である。更に好ましくは、かかる免疫測定方法はサンドイッチELISAである。かかる方法において、IV型コラーゲン産生細胞のIV型コラーゲン産生能が制御(促進又は 30 抑制)されたら、当該因子はIV型コラーゲン産生制御(促進又は抑制)因子と認定できる。

【0015】好ましくは、前記IV型コラーゲン産生細胞はケラチノサイト又は線維芽細胞である。更に好ましくは、前記IV型コラーゲン産生制御因子はIV型コラーゲン産生促進因子である。

【0016】別の態様において、本発明は前記IV型コラーゲンの産生制御因子をスクリーニングする方法によりスクリーニングされ得るIV型コラーゲン産生制御因子を提供する。好ましくは、前記IV型コラーゲン産生制御因子はIV型コラーゲン産生促進因子である。 40

【0017】別の態様において、本発明は前記IV型コラーゲンの産生制御因子をスクリーニングする方法によりスクリーニングされ得るIV型コラーゲン産生制御因子を含有するVII型コラーゲン産生制御剤を供する。好ましくは、前記IV型コラーゲン産生制御剤はIV型コラーゲン産生促進剤、より好ましくは基底膜ケア剤、更により好ましくはヒト基底膜ケア剤である。更に好ましくは、前記IV型コラーゲン産生促進因子はトランスフォーミング成長因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1 及 50

び血小板由来増殖因子から成る群から選択されたI又は2種以上のものである。

【0018】更なる別の態様において、本発明は抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199及び抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-CLIVの組み合わせを利用する、IV型コラーゲンの定量するための免疫測定方法を提供する。好ましくは、かかる方法はサンドイッチ免疫測定方法である。更に好ましくは、かかる免疫測定方法はサンドイッチELISAである。 10

【0019】本発明は、第三の観点において、基底膜ケア因子をスクリーニングする方法であって、VII型コラーゲン産生細胞及びIV型コラーゲン産生細胞を各々被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVII型コラーゲン及びIV型コラーゲンを各々定量することを特徴とする方法を提供する。かかる方法において、上記細胞のIV型コラーゲン及びIV型コラーゲンの両者の産生能が促進されたら、当該因子は基底膜ケア因子と認定できる。好ましくは、前記VII型コラーゲン産生細胞及びIV型コラーゲン産生細胞はケラチノサイト又は線維芽細胞である。前記VII型コラーゲンの定量においては、好ましくは、VII型コラーゲンに特異的な2種類の抗体を使用し、前記細胞から産生されたVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法により実施する。更に好ましくは、前記抗体として抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32を利用する。前記IV型コラーゲンの定量においては、好ましくは、IV型コラーゲンに特異的な2種類の抗体を使用し、前記細胞から産生されたVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法により実施する。更に好ましくは、前記抗体として、抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199及び抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-CLIVの組み合わせを利用する。

【0020】別の態様において、本発明は前記基底膜ケア因子をスクリーニングする方法によりスクリーニングされ得る基底膜ケア因子を提供する。

【0021】別の態様において、本発明は前記基底膜ケア因子をスクリーニングする方法によりスクリーニングされ得る基底膜ケア因子を含有する基底膜ケア剤、好ましくはヒト基底膜ケア剤を提供する。更に好ましくは、前記基底膜ケア因子はトランスフォーミング成長因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1及び血小板由来増殖因子から成る群から選択された1又2種以上のものである。

【0022】本発明は更に、皮膚基底膜をダメージから保護するための、又は皮膚基底膜のダメージを修復するための方法であって、上記基底膜ケア剤を皮膚に塗布することを含んで成る方法に関する。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明に係るVII型及び/又はIV

型コラーゲン産生制御因子をスクリーニングする方法は、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞を被験因子と接触させ、しかる後に当該細胞が産生するVII型及び/又はIV型コラーゲンを定量することを特徴とする方法を提供する。かかる方法において、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞のVII型及び/又はIV型コラーゲン産生能が制御(促進又は抑制)されたら、当該因子はVII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御(促進又は抑制)因子と認定できる。

【0024】本発明でいうVII型及び/又はIV型コラーゲン産生能の促進とは、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞のVII型及び/又はIV型コラーゲンを産生する能力を、コントロール細胞が産生するVII型及び/又はIV型コラーゲンの量と比較して、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、更に好ましくは少なくとも100%、特に200%以上高めることをいう。

【0025】また、本発明でいうVII型及び/又はIV型コラーゲン産生能の抑制とは、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞のVII型及び/又はIV型コラーゲンを産生する能力を、コントロール細胞が産生するVII型及び/又はIV型コラーゲンの量と比較して、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、更に好ましくは少なくとも90%、特に95%以上抑制することをいう。

【0026】上記VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞はVII型及び/又はIV型コラーゲンを産生することのできる皮膚を構成する種々の細胞であってよいが、好ましくはケラチノサイト又は線維芽細胞である。本発明に係るスクリーニング方法において、かかる細胞は組織から単離してそのまま使用してもよいし、又は好ましくはその培養物を使用してもよい。ケラチノサイトや線維芽細胞は皮膚より単離された均一の細胞として市販されており、ケラチノサイトはケラチノサイト増殖培地、線維芽細胞は10%の牛胎児血清を含むDMEEM(ダルベッコ改良イーグル)培地を使用することにより当業者であれば容易に培養することができる(例えば、S.Amano et al. J. Immunol. Method, 224:161-169, 1999参照)。

【0027】VII型及び/又はIV型コラーゲン産生細胞とVII型及び/又はIV型コラーゲン産生制御因子との接触は、例えば適当な培地、例えばケラチノサイト増殖培地やDMEEM培地にて培養した上記細胞にかかる因子を添加し、適当な時間、例えば1時間~3日間、好ましくは1~2日間、37℃の温度でインキュベーションすることにより行うことができる。このようにしてインキュベーションした後、培養液を回収し、細胞が培養液に放出したVII型及び/又はIV型コラーゲンの定量測定を行う。培養プレートに結合したVII型及び/又はIV型コラー

ゲンは、界面活性剤とタンパク質分解酵素阻害剤を含むリン酸緩衝生理食塩液を培地を回収した後に添加し、凍結後、氷上で超音波処理して回収し、抽出されたVII型及び/又はIV型コラーゲンの定量測定を行うことができる。

【0028】本発明に係るIV型コラーゲン又はVII型コラーゲンの定量方法は、IV型コラーゲン又はVII型コラーゲンを測定する任意の方法に従って実施することができる。具体的には、免疫測定方法、例えば酵素ラベルを利用するELISA法、放射性ラベルを利用するRIA法、抗体と抗原との反応で生ずる濁りの吸光度の変化から抗原量を定量する免疫比濁法、抗原と抗体感作ラテックスビーズもしくは抗体感作赤血球との反応によって生ずる凝集反応の度合いから抗原量を測定するラテックス凝集法や赤血球凝集法等、様々な方法が挙げられる。免疫測定法の方式には競合法やサンドイッチ法が挙げられる。

【0029】上記免疫測定方法において使用するIV型コラーゲン又はVII型コラーゲンに特異的な抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体が特に好ましい。モノクローナル抗体やポリクローナル抗体の作成方法は当業者に周知であり、例えばLunstrum et al., J Biol. Chem. 1986, 261: 9042-9048; Hurlle et al. J Cell Science 1994, 107: 2623-2634に記載されている。

【0030】本発明に係るスクリーニング方法における定量方法においては、サンドイッチ免疫測定法が特に好ましい。特に、2種類のモノクローナル抗体を利用してIV型又はVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法が好ましい。

【0031】特に、本発明に係るVII型コラーゲンの産生制御因子をスクリーニングする方法においては、VII型コラーゲンに特異的な2種類のモノクローナル抗体を利用してVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法が好ましい。

【0032】VII型コラーゲンの高精度な定量は、本発明者がはじめて達成できたものである。VII型コラーゲンに関しては、VII型コラーゲンを特異的に認識する抗体を用いるウェスタンブロットング法にて、出現バンドの濃淡を指標とし、デンシトメーターにて測定する半定量的な方法が報告されていた。しかしながら、かかる方法は、電気泳動を行う前に濃縮操作、透析などの煩雑な前処理を要し、多数の検体を処理するには不向きであった。また、培養細胞を用い、細胞が産生したVII型コラーゲンを特異的な抗体で免疫染色して、その染色強度でVII型コラーゲンの産生の程度を予想する方法が報告されている(Chen et al., J. Invest. Dermatol., 102: 205-209, 1994)。しかしながら、かかる方法ではVII型コラーゲンを数100ngのオーダーでしか測定できず、半定量的であり、定量的な解析には不十分であった。し

かしながら、本発明者はVII型コラーゲンに特異的な2種類のモノクローナル抗体として抗VII型コラーゲンモノクローナル抗体NP-185及び/又はNP-32を使用してVII型コラーゲンをサンドイッチする免疫測定方法を実施することにより、VII型コラーゲンを数ngのオーダーで定量することに成功した。

【0033】更に、本発明者は、IV型コラーゲンの定量において、抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199及び抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-CLIVの組み合わせを利用するサンドイッチ免疫測定方法を実施することにより、IV型コラーゲンを数ngのオーダーで定量することにも成功した。

【0034】上述のサンドイッチ免疫測定方法は例えば下記の通りに実施できる。

【0035】2種類のIV型又はVII型コラーゲンに特異的な抗体の一方を一次抗体として担体に固定化する。担体としては固体担体が好ましく、例えば固体担体として免疫測定法において常用される任意のものを使用してよく、例えば任意の大きさ、形状に成形されたスチレンやポリスチレンなどの高分子担体のほか、これらの適当な材料で成形した反応容器の内壁などが挙げられる。

【0036】上記一次抗体の担体への固定化は常法に従って行うことができ、例えば上記一次抗体を緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)、重炭酸緩衝液などに溶解して担体に吸着させることにより固定化することができる。また、例えば上記一次抗体に結合する抗体やその他の蛋白質、例えばプロテインAまたはプロテインGをあらかじめ担体に固定化し、これを上記一次抗体と接触させる等してもよい。更に、非特異的な結合を抑えるため、このようにして一次抗体を固定化した担体に適当なブロッキング剤、例えばブロックエース(大日本製薬株式会社製)を加え、約4~40、好ましくは20~37で、5分から数日、好ましくは10分から24時間、より好ましくは1~3時間インキュベーションすることによりブロッキングするのが好ましい。

【0037】上記2種類のIV型又はVII型コラーゲンに特異的な抗体の他方の抗体は二次抗体として使用し、標識する。標識としては、酵素標識、放射線標識、蛍光標識、などが挙げられる。酵素標識する場合、酵素を二次抗体に直接結合させて標識するか、または例えばアビジン-ビオチンのような相互反応性蛋白質を介して間接的に酵素で標識することもできる。酵素の抗体などへの結合は、例えば市販のチオール導入基試薬を利用して酵素及び標識すべき抗体などのそれぞれにチオール基を導入してから両者をS-S結合させることを行うことができる。酵素としては、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどが挙げられる。酵素の検出は、その酵素に特異的な基質を用いて行うことができる。例えばホースラデ

ィッシュペーパーオキシダーゼを利用する場合、ABTS(2,2'-アジジ[3-エチルベンズチアゾリン]スルホネート)やTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)などが利用できる。

【0038】かかる免疫測定は、前記一次抗体を固定した担体、前記標識した二次抗体、被験細胞の培養上清液等の被験試料を混合し、インキュベーションすることにより、担体に固定化された一次抗体に被験試料中のIV型又はVII型コラーゲンを結合せしめ、このコラーゲン分子に標識二次抗体を結合せしめる。

【0039】このようにして、標識化抗体は、試料中のIV型又はVII型コラーゲンの量を反映した量において、担体に固定化された一次抗体と試料由来するIV型又はVII型コラーゲンを介して担体上に固定される。かかるインキュベーションは、適当な緩衝液、例えばPBS中で約4~40、好ましくは20~37で、5分から数日、好ましくは10分から24時間、より好ましくは10分~3時間行う。

【0040】次に、上記担体から未結合の標識化抗体を分離する操作を行う。担体が固体担体である場合、この分離操作は固液分離により簡単に行うことができる。一定の既知量の標識二次抗体を使用した場合、担体に結合した標識もしくは未結合の標識又はこの両者を測定することができる。他方、任意の標識抗体を使用した場合、担体に結合した標識を検出、測定する。担体に結合した標識を検出するには、好ましくは担体を洗浄液、例えば適当な界面活性剤の入った緩衝液、例えばPBS-Tween20により洗浄して未結合の標識化抗体を除去した後に検出を行う。検出は標識の種類に依存して常法に従って行うことができる。

【0041】VII型及び/又はIV型コラーゲンの産生促進因子、即ち基底膜ケア因子を含有する本発明に係る基底膜ケア剤は、皮膚中の基底膜のVII型及び/又はIV型コラーゲンの産生を促進することで皮膚の基底膜をダメージから保護、あるいは基底膜のダメージを修復する効果を発揮し、また皮膚の老化を防止する作用をもつ。

【0042】本発明に係る、VII型及び/又はIV型コラーゲン産生促進剤はVII型及び/又はIV型コラーゲンの産生を促進するのに有効な量で、本発明に係るスクリーニング方法によりスクリーニングされたVII型及び/又はIV型コラーゲン産生促進因子を含む。特に、本発明に係る基底膜ケア剤は基底膜ケア因子を基底膜ケア効果を発揮するのに有効な量で含む。基底膜ケア因子の具体的な配合量はその因子の種類、活性、基底膜ケア剤の剤型及び用途に応じて適宜変えられるが、一般には当該基底膜ケア剤1g当たり0.1pmol~1mol、好ましくは1pmol~100pmol程度であろう。

【0043】また、本発明の基底膜ケア剤には、上記必須成分以外に、通常化粧品や医薬品等の皮膚外用剤に用いられる成分、例えば、美白剤、保湿剤、酸化防止剤、

油性成分、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色剤、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を必要に応じて適宜配合することができる。

【0044】その他、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属封鎖剤、カフェイン、タンニン、ベラパミル、トラネキサム酸およびその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸およびその誘導体またはその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の他の美白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類、レチノイン酸、レチノール、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA類なども適宜配合することができる。

【0045】本発明の基底膜ケア剤は、例えば軟膏、クリーム、乳液、ローション、パック、浴用剤等、従来皮膚外用剤に用いるものであればいずれでもよく、剤型は特に問わない。

【0046】

【実施例】以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

【0047】(1) コラーゲン標準品の調製

1) VII 型コラーゲン標準品の調製

VII 型コラーゲンの標準品としては、ヒトプラセンタホモジネートよりVII 型コラーゲンモノクローナル抗体を結合させたアフィニティカラムを用いて精製したVII 型コラーゲンをを用いた (Rouselle et al., J Cell Biol. 30 1997 Aug. 11, 138(3):719-28)。

【0048】2) IV型コラーゲン標準品の調製

IV型コラーゲンの標準品としては、Sigma社より販売されているIV型コラーゲン(Sigma C7251)を用いた。

【0049】(2) 抗体の調製

VII 型コラーゲン及びIV型コラーゲンに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は上記精製VII 型コラーゲン及びIV型コラーゲンをそれぞれ抗原として、モノクローナル抗体の場合はマウスを感作動物として、またポリクローナル抗体の場合はウサギを感作動物として 40 用い、常法(Lunstrum et al., J Biol.Chem. 1986, 261:9042-9048; Hurlle et al., J Cell Science 1994, 107: 2623-2634) に従って作製されたものである。本実施例において使用した抗体は以下の通りである：

VII 型コラーゲン特異的抗体

モノクローナル抗体 NP - 185 ；

モノクローナル抗体 NP - 32 ；

IV型コラーゲン特異的抗体

モノクローナル抗体 JK - 199 ；

ポリクローナル抗体 MO - S - C L I V

【0050】(3) モノクローナル抗体の大量調製  
E L I S A 実験に用いるため、純度の高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清液より、プロテインGを結合させたアフィニティカラムを用いてIgG抗体を精製した。ハイブリドーマの培養には、Gibco - R B L 社の無血清ハイブリドーマ培地に1%のIgG抗体を取り除いた牛胎児血清(Gibco-RBL社)を添加した培地を用いた。培養は、10段のセルファクトリー(Nunc社)を用いて行い、培地1リットル又は1.5リットル中でハイブリドーマをコンフルエントとなるように培養し、培養終了後、濾過によってハイブリドーマを除去し、濾液をアフィニティカラムにかけ、産生されたモノクローナル抗体(IgG)を精製した。(4) ポリクローナル抗体の精製

感作動物から得られた抗血清をプロテインA又はプロテインGを結合させたアフィニティカラムを用いてIgGフラクションを精製分離した。このIgGフラクションよりIV型コラーゲンペプチドを結合させたアフィニティカラムを用いて特異抗体を精製した。

20 (5) 抗体のビオチン化

精製抗体を2mg/mlとなるようにPBSに溶解させた。これに精製水に溶解した1mg/mlのスルホスクシニミジル6 - (ビオチンアミド)ヘキサノエートを抗体溶液1mlに対して75μl添加し、室温で30分間反応させた。その後、その反応液をPBSに対して透析し、ビオチン化抗体を得た。

【0051】実施例1

2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによるVII 型コラーゲンの測定

精製抗VII 型コラーゲンモノクローナル抗体NP - 185を5μg/mlの濃度になるようにPBSを用いて調製し、これを100μlずつ、96穴ELISAプレートの各ウェルに分注し、一晚室温におき、プレートの固相に抗体NP - 185を結合させた。その後、プレートへの非特異的な結合を阻害するために、ブロッキング溶液(ブロクエースをPBS - Tween 20で1/4希釈した溶液、300μl/ウェル)にて1時間インキュベートした。この抗体結合プレートは-20において長期保存が可能である。

【0052】検体と標準品の溶液を、ブロッキング溶液をあらかじめ入れておいたNP - 185結合プレートの各ウェルに添加した。抗原抗体反応を37で2時間行い、VII 型コラーゲンをこのプレートに結合したNP - 185と反応させて固相に固定した。洗浄して非特異的に結合した成分を除去した後、ビオチン化抗VII 型コラーゲンモノクローナル抗体NP - 32とアビジン - HRP(ホスラディッシュパーオキシダーゼ)とを含むPBS - Tween溶液を100μl各ウェルに添加し、更に1時間反応させた。洗浄後、HRPの基質であるABTS(図 50 1)又はTMB溶液(図2)を加え、405又は450nmの吸

光度をE L I S Aプレートリーダーを用いて測定した。標準物質で同時に作製した検量線(図1及び2)から、検体中のVII型コラーゲン量を算出した。図1及び2の結果から明らかな通り、本E L I S Aに従うと、0-50ng/mlの範囲において良好な直線性が確認され、VII型コラーゲンをng/mlのオーダーで定量測定することができることがわかる。

#### 【0053】実施例2

##### 希釈直線性の検討

2種類の培養液検体のPBS希釈系列を作製し、上記E L I S Aの希釈直線性を検討した。その結果を図3に示す。図3の結果から明らかな通り、上記E L I S A測定法の検体希釈直線性は極めて良好であった。

#### 【0054】実施例3

##### 添加回収試験

検体に50ng/mlのVII型コラーゲン標準検体を添加し、上記E L I S AによりVII型コラーゲンの量を測定することで添加回収試験を行った。その結果を下記の表1に示す。

#### 【0055】

##### 【表1】

表1. 添加回収試験

検体番号	実測値	理論値
No. 25	142ng/ml	
No. 25+50ng/ml	200ng/ml	192ng/ml

【0056】表1の結果から明らかな通り、上記E L I S Aにおいて、VII型コラーゲンの添加量が良好に測定結果に反映することが確認された。

#### 【0057】実施例4

##### 2種類の抗体を用いたサンドイッチE L I S AによるIV型コラーゲンの測定

精製抗IV型コラーゲンモノクローナル抗体JK-199を14.5µg/mlの濃度になるようにPBSを用いて調製し、これを100µlずつ、96穴E L I S Aプレートの各ウェルに分注し、一晚室温におき、プレートの固相に抗体JK-199を結合させた。その後、プレートへの非特異的な結合を阻害するために、ブロッキング溶液(ブロクエースをPBS-Tween 20で1/4希釈した溶液、300µl/ウェル)にて1時間インキュベートした。この抗体結合プレートは-20において長期保存が可能である。

#### 【0058】検体と標準品の溶液を、ブロッキング溶液

をあらかじめ入れておいたJK-199結合プレートの各ウェルに添加した。抗原抗体反応を37で2時間行い、IV型コラーゲンをこのプレートに結合したJK-199と反応させた固相に固定した。洗浄して非特異的に結合した成分を除去した後、ビオチン化抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体MO-S-CLIVとアビジン-HRPとを含むPBS-Tween溶液を100µl各ウェルに添加し、更に1時間反応させた。洗浄後、HRPの基質であるABTS又はTMB溶液を加え、405又は450nmの吸光度をE L I S Aプレートリーダーを用いて測定した。標準物質で同時に作製した検量線(図4)から、検体中のIV型コラーゲン量を算出した。図4の結果から明らかな通り、本E L I S Aに従うと、0-50ng/mlの範囲において良好な直線性が確認された。

#### 【0059】実施例5

##### VII型及びIV型コラーゲン産生評価試験

##### 1)表皮ケラチノサイトの培養とVII型及びIV型コラーゲン産生評価試験

表皮ケラチノサイトはヒト包皮より単離し、カルシウム濃度の低いケラチノサイト増殖培地(KGM)にて培養した。この培地には牛脳下垂体抽出液とEGFを添加した。細胞を第4代までKGMで培養後、トリプシン-EDTA処理によって接着細胞を浮遊させ、濾過によって細胞の凝集物を除き、均一な細胞懸濁液を得た。遠心分離によって細胞を集め、KGMに再懸濁後、24穴プレートに蒔いた。細胞が接着した後、培地を除き、被験物質とアスコルビン酸、そのリン酸塩、及びそのグルコース結合体を添加したKGM又はDMEM-F12(2:1)-0.1%BSAを添加した。その後、培養液中に遊離されたIV、VII型コラーゲン量及び細胞層に存在するIV、VII型コラーゲンを可溶化して上記サンドイッチE L I S Aにて定量した。

##### 2)線維芽細胞の培養とVII型及びIV型コラーゲン産生評価試験

線維芽細胞は、ヒト皮膚真皮より単離し、DMEM-10%FBSにて培養した。細胞を24穴プレートに蒔き、被験物質を含むアスコルビン酸、そのリン酸塩、及びそのグルコース結合体を添加したDMEM-0.25%FBSにて培養し、培養液中に遊離されたIV、VII型コラーゲン量及び細胞層に存在するIV、VII型コラーゲンを可溶化して上記サンドイッチE L I S Aにて定量した。これらの結果を以下の表2に示す。

#### 【0060】

##### 【表2】

表2  
ケラチノサイトを用いた評価 (n=3、平均値)

	IV型コラーゲン (ng/ml)	VII 型コラーゲン (ng/ml)
コントロール	3.4	9.5
TGFβ1 (1 ng/ml)	9.4	19.6

線維芽細胞を用いた評価 (n=3、平均値)

	IV型コラーゲン	VII 型コラーゲン
コントロール	232.1+8.3	146.1+6.5
TNFα (0.1ng/ml)	250.1+11.4	158.5+5.4
TNFα (1 ng/ml)	314.6+20.0	156.4+8.8
TNFα (10ng/ml)	405.9+9.0	172.4+7.1
IL-1β (0.01ng/ml)	268.9+21.0	178.7+12.8
IL-1β (0.1ng/ml)	358.2+18.9	187.9+10.2
IL-1β (1 ng/ml)	384.2+22.9	188.5+6.2
コントロール	258.6+46.5	140.8+3.2
IGF-1 (0.01ng/ml)	254.9+5.9	144.3+1.8
IGF-1 (0.1ng/ml)	257.5+16.7	136.0+11.8
IGF-1 (1 ng/ml)	236.0+2.6	139.3+3.6
IGF-1 (10ng/ml)	283.2+58.0	153.1+5.6
PDGF (1 ng/ml)	244.5+7.3	150.6+5.0
PDGF (10ng/ml)	308.3+41.6	159.8+4.8
PDGF (100ng/ml)	449.6+47.0	222.4+0.9
コントロール	228.7+16.0	130.1+7.4
TGFβ1 (0.1ng/ml)	295.7+7.1	153.5+4.6
TGFβ1 (0.3ng/ml)	357.9+5.4	171.7+5.1
TGFβ1 (1 ng/ml)	424.4+19.7	191.3+9.6
TGFβ1 (3ng/ml)	474.4+17.5	221.6+6.1
TGFβ1 (10ng/ml)	469.9+19.3	215.5+7.9

【0061】表2に示すように、ケラチノサイト及び線維芽細胞に各種のサイトカイン、増殖因子を作用させ、IV型、VII 型コラーゲン産生に及ぼす影響に関して検討した。培地中に遊離されたIV型、VII 型コラーゲンは、上記IV型、VII 型コラーゲンに特異的なサンドイッチELISAにて測定した。ケラチノサイトではトランスフォーミング成長因子-1がIV型、VII 型コラーゲンの産生を高める作用を示した。同様に、線維芽細胞においても、検討したサイトカイン、トランスフォーミング成長因子-1、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1、及び血小板由来増殖因子が濃度依存性をもってIV

型、VII 型コラーゲンの産生を高めた。

【図面の簡単な説明】

【図1】基質としてABTSを用いた本発明に係るVII 型コラーゲンサンドイッチELISAの検量線。

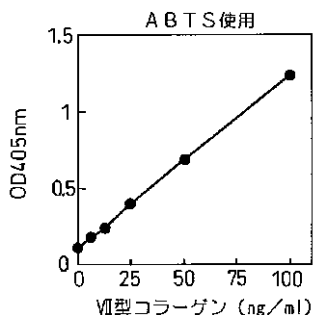
【図2】基質としてTMBを用いた本発明に係るVII 型コラーゲンサンドイッチELISAの検量線。

【図3】本発明に係るVII 型コラーゲンサンドイッチELISAの希釈直線性。

【図4】IV型コラーゲンサンドイッチELISAの検量線。

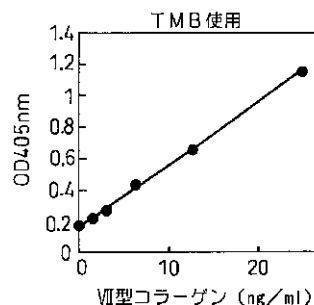
【図1】

図1 VII型コラーゲンサンドイッチELISAの検量線



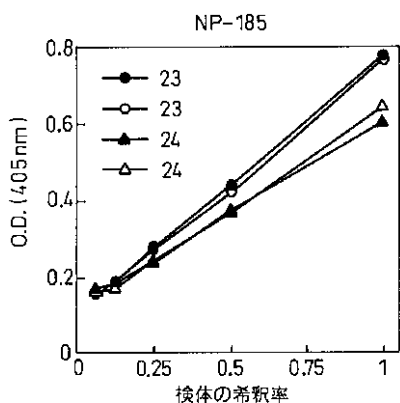
【図2】

図2 VII型コラーゲンサンドイッチELISAの検量線



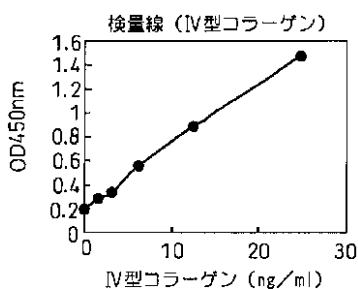
【図3】

図3 検体の希釈直線性



【図4】

図4 IV型コラーゲンの検量線



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マコード(参考)

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 33/15

C 1 2 P 21/08

33/53

(C 1 2 Q 1/02

// C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 Q 1/02

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 37/02

C 1 2 R 1:91)

37/24

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB09 DA36 FA26 FA27  
FA29 FB03 FB07 GC10  
4B063 QA01 QA20 QQ08 QQ79 QR48  
QS33 QX02  
4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24  
DA01 DA13  
4C084 AA02 AA17 DA13 DA25 DB52  
MA02 MA63 NA05 ZA891  
ZB211 ZC781

专利名称(译)	基底膜护理剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002267663A</a>	公开(公告)日	2002-09-18
申请号	JP2001063749	申请日	2001-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	资生堂公司, 有限公司		
[标]发明人	天野 聡 曾根原 信子		
发明人	天野 聡 曾根原 信子		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/22 A61K45/00 A61P43/00 C12P21/08 C12Q1/02 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K45/00 A61P43/00.107 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12R1/91 A61K37/02 A61K37/24 A61K38/00 A61K38/18 A61K38/22		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB09 2G045/DA36 2G045/FA26 2G045/FA27 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GC10 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/DA13 4C084/DA25 4C084/DB52 4C084/MA02 4C084/MA63 4C084/NA05 4C084/ZA891 4C084/ZB211 4C084/ZC781		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于筛选VII型和/或IV型胶原蛋白生产调节剂的方法, 通过这种筛选方法筛选的VII型和/或IV型胶原蛋白生产调节剂, 以及进一步的VII型和/或IV型胶原蛋白生产调节剂。一个目的是提供包含IV型胶原蛋白产生调节剂, 尤其是基底膜护理剂的VII型和/或IV型胶原蛋白产生调节剂。解决方案: VII型和/或IV型胶原蛋白生产控制因子包括使VII型和/或IV型胶原蛋白生产细胞与测试因子接触, 然后定量细胞产生的VII型或IV型胶原蛋白。可以进行筛选。在这些胶原蛋白产生控制因子中, 促进VII型和/或IV型胶原蛋白产生的因子可以用作用于修复基底膜损伤的基底膜护理剂。

表1] 表1. 添加回收試験

検体番号	実測値	理論値
No. 25	142ng/ml	
No. 25+50ng/ml	200ng/ml	192ng/ml