

(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2003 - 210169

(P2003 - 210169A)

(43)公開日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/02	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/50	H 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08			Q 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 12数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 328067(P2002 - 328067)

(22)出願日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 347340(P2001 - 347340)

(32)優先日 平成13年11月13日(2001.11.13)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 武部 京子

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気

工業株式会社横浜製作所内

(72)発明者 平井 洋平

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気

工業株式会社横浜製作所内

(74)代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体及びそれを用いた育毛活性評価方法

(57)【要約】

【課題】 育毛活性を評価する際に有用な、上皮性の新生毛包に存在する抗原を特異的に認識する抗体を提供すること。

【解決手段】 上皮性の新生毛包に存在する約 2 2 0 k D a の抗原を特異的に認識する抗体またはその断片。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項2】 上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原が、成体の成長期または胎児の発達期に特異的に発現する抗原である、請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項3】 受託番号FERM BP-8121(FERM P-18578より移管)を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項4】 請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片が認識する抗原。

【請求項5】 上皮性の新生毛包に存在し、分子量が約220kDa(SDS-PAGEで測定した場合)である、請求項4に記載の抗原。

【請求項6】 請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項7】 成長期の皮膚から採取した毛から抽出したタンパク質および/または成長期のヒゲの毛包または毛包抽出液を含む免疫原で免疫された哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物のミエローム細胞とを融合して得られる、請求項6に記載のハイブリドーマ。

【請求項8】 受託番号FERM BP-8121(FERM P-18578より移管)を有するハイブリドーマ。

【請求項9】 請求項6から8の何れかに記載のハイブリドーマを培養する工程、及び該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を採取する工程を含む、請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片を用いる育毛活性評価方法。

【請求項11】 生体由来の皮膚組織片を被験物質の存在下で培養する工程；該皮膚組織片を回収し、請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片と反応させる工程；及び皮膚組織片と反応した該モノクローナル抗体またはその断片を検出または測定する工程；を含む、請求項10に記載の育毛活性評価方法。

【請求項12】 請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片を含む、育毛活性評価キット。

【請求項13】 請求項5に記載の抗原を認識するポリクローナル抗体。

【請求項14】 請求項13に記載のポリクローナル抗体またはその断片を用いる育毛活性評価方法。

【請求項15】 生体由来の皮膚組織を被験物質の存在下で培養する工程；該皮膚組織片を回収し、請求項13に記載のポリクローナル抗体またはその断片と反応させ

る工程；及び皮膚組織片と反応した該ポリクローナル抗体またはその断片を検出または測定する工程；を含む、請求項14に記載の育毛活性評価方法。

【請求項16】 請求項13に記載のポリクローナル抗体またはその断片を含む、育毛活性評価キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、上皮性の新生毛包に特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体が認識する抗原、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いる育毛活性評価方法、該モノクローナル抗体を含む育毛活性評価キット、上記抗原を認識するポリクローナル抗体、該ポリクローナル抗体を用いる育毛活性評価方法、並びに該ポリクローナル抗体を含む育毛活性評価キットに関する。

【0002】

【従来の技術】上皮組織の正常な形態形成は上皮組織の周りに存在する間充織細胞由来の因子による制御を受けていることが示唆されており、また、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の多くが間充織細胞の異常を原因としていることから、間充織細胞が上皮組織の形態形成を制御するメカニズムの解明に興味もたれている。しかしながら、上皮組織の形態形成の制御に関する物質群は複雑な系の中で時間的及び空間的な制御を受けて発現されており、それらの物質を単離して機能を解析することは極めて困難であること、また、上皮組織の形態形成を単純化したモデル実験系の構築も難しいことなどの理由から、この分野の研究には今日まで大きな進展が見られていない。上皮組織の形態形成に起因する疾患の発症機序の解明やそれらの疾患の治療方法の確立などのために、上皮組織における形態形成の制御メカニズムの解析が切望されていた。

【0003】このような状況下において、上皮組織の形態形成の制御に関するエピモルフィン(epimorphin)が分離・精製された(特開平6-25295号公報)。この物質は277ないし289個のアミノ酸からなる蛋白質をコア・蛋白質とする生理活性物質であり、主として間充織細胞により生合成されていることが明らかにされた。また、エピモルフィンは、上皮細胞に作用して上皮組織の形態形成を促進する作用を有していること、並びにエピモルフィンが機能しない場合には正常な組織形成が行われないことも明らかにされた。

【0004】エピモルフィンの構造については、エピモルフィン分子が構造上大きく4個のフラグメントに分けられることが見いだされている(欧州特許公開第0698666号)。すなわち、エピモルフィンの全長を構成するポリペプチドは、N末端側より、コイルドコイル領域(1)、機能ドメイン(2)、コイルドコイル領域(3)、及びC末端の疎水性領域に分けることができる。これらのフラグメントのうち、機能ドメイン(ヒト・エピモルフィ

ンではN末端より104番目から187番目のアミノ酸により特定される領域)については、この領域が細胞接着に関与しており、エピモルフィンの生理活性の発現に密接にかかわっていることが示唆されている(上掲欧州特許公開)。

【0005】エピモルフィンが正常な形態形成を促進する作用を有することから、この物質は、形態形成の異常に起因する疾患などの予防や治療のための医薬や、又は育毛剤などの医薬の有効成分として有用であることが期待される。

【0006】しかしながら、哺乳類動物から得られた天然型エピモルフィンは生理食塩水などの水性媒体に難溶であり、医薬として実用に供することが困難であった。このため、天然型エピモルフィンの形態形成促進作用を実質的に保持しつつ、溶解性に優れたエピモルフィン誘導体を創製する試みがなされている。このような新規なエピモルフィン誘導体を創製する試みにおいては、育毛活性を評価することが欠かせない。

【0007】育毛活性を評価するための具体的な方法としては、以下の方法がある。C3HやC57BL/6マウスは生後45日から95日前後まで約50日間休止期が続くことが知られている。また、休止期ではピンク、成長期ではグレー又はクロと皮膚の色が変化するため、毛周期の判定が容易である。このマウスを使用し、被験物質の投与により、成長期への移行が促進されるか否かを評価することにより、育毛活性を評価することが可能である。しかし、インビトロにおいてより簡便かつ迅速に育毛活性を評価する方法の開発が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、育毛活性を評価する際に有用な、上皮性の新生毛包に存在する抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することである。本発明の別の課題は、上記のモノクローナル抗体が認識する抗原、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、上記のモノクローナル抗体を用いる育毛活性評価方法、上記のモノクローナル抗体を含む育毛活性評価キット、上記抗原を認識するポリクローナル抗体、該ポリクローナル抗体を用いる育毛活性評価方法、並びに該ポリクローナル抗体を含む育毛活性評価キットを提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討し、B57BLマウスの成長期の皮膚から採取した毛から抽出したタンパク質と、B57BLマウスのヒゲの成長期の毛包との混合物を免疫原として用いてラットを免疫し、該免疫ラットの抗体産生細胞を回収し、スクリーニングすることにより、上皮性の新生毛包に存在する抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明によれば、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体またはその断片が提供される。好ましくは、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原が、成体の成長期または胎児の発達期に特異的に発現する抗原である。本発明の特に好ましい態様によれば、受託番号FERM BP-8121(FERM P-18578より移管)を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体またはその断片が提供される。

10 【0011】本発明の別の側面によれば、上記した本発明のモノクローナル抗体またはその断片が認識する抗原が提供される。好ましくは、本発明の抗原は、上皮性の新生毛包に存在し、分子量が約220kDa(SDS-PAGEで測定した場合)である。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。好ましくは、本発明のハイブリドーマは、成長期の皮膚から採取した毛から抽出したタンパク質および/または成長期のヒゲの毛包または毛包抽出液を含む免疫原で免疫された哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物のミエローム細胞とを融合して得られるものであり、特に好ましくは、受託番号FERM BP-8121(FERM P-18578より移管)を有するハイブリドーマである。

【0012】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のハイブリドーマを培養する工程、及び該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を採取する工程を含む、上記した本発明のモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0013】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いる育毛活性評価方法が提供される。本発明の育毛活性評価方法は、好ましくは、生体由来の皮膚組織片を被験物質の存在下で培養する工程；該皮膚組織片を回収し、上記した本発明のモノクローナル抗体またはその断片と反応させる工程；及び皮膚組織片と反応した該モノクローナル抗体またはその断片を検出または測定する工程；を含む。

40 【0014】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のモノクローナル抗体またはその断片を含む、育毛活性評価キットが提供される。

【0015】本発明のさらに別の側面によれば、上皮性の新生毛包に存在する約220kDa(SDS-PAGEで測定した場合)の抗原を認識するポリクローナル抗体が提供される。

50 【0016】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のポリクローナル抗体またはその断片を用いる育毛活性評価方法が提供される。本発明の育毛活性評価方法は、好ましくは、生体由来の皮膚組織を被験物質の存在下で培養する工程；該皮膚組織片を回収し、上記した本発明のポリクローナル抗体またはその断片と反応さ

せる工程；及び皮膚組織片と反応した該ポリクローナル抗体またはその断片を検出または測定する工程；を含む。

【0017】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のポリクローナル抗体またはその断片を含む、育毛活性評価キットが提供される。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明のモノクローナル抗体およびそれが認識する抗原

本発明のモノクローナル抗体は、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識することを特徴とする。より具体的には、本発明のモノクローナル抗体が認識することができる上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原は、成体の成長期または胎児の発達期に特異的に発現する抗原である。

【0019】このようなモノクローナル抗体の一例としては、本明細書の実施例に記載したモノクローナル抗体mAb27が挙げられる。モノクローナル抗体mAb27を産生するハイブリドーマは、受託番号FERM P-18578として平成13年11月2日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託されている。受託番号FERM P-18578として寄託されたモノクローナル抗体mAb27を産生するハイブリドーマは、平成14年(2002年)7月22日付けにて受託番号FERM BP-8121として国際寄託に移管された。

【0020】本明細書で抗体と言う場合、全長の抗体だけでなく抗体の断片も包含する。本発明によれば、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の断片が提供される。抗体の断片とは、機能性の断片であることが好ましく、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab'などが挙げられる。 $F(ab')_2$ 、Fab'とは、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）で処理することにより製造されるもので、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体断片である。さらに、本明細書で抗体の断片と言う場合には、該抗体をコードする遺伝子由来の抗原結合部位を含む蛋白質も包含するものとする。

【0021】例えば、IgG1をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL(L鎖可変領域)とCL(L鎖定常領域)からなるL鎖、及びVH(H鎖可変領域)とCH1(H鎖定常領域中の1領域)とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各

々Fab'という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

【0022】また、本発明のモノクローナル抗体は、固相担体などの不溶性担体上に固定された固定化抗体として使用したり、標識物質で標識した標識抗体として使用することができる。このような固定化抗体や標識抗体は全て本発明の範囲内である。

【0023】固定化抗体とは、不溶性担体に物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある抗体を言う。これらの固定化抗体は、試料（例えば、体毛、毛包、又はそれらの抽出物など）中に含まれる抗原（即ち、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原）を検出、定量、分離または精製するために用いることができる。抗体を固定化するのに使用できる不溶性担体としては、例えば、(1)ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに(2)セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0024】標識抗体とは、標識物質で標識された抗体を意味し、これらの標識抗体は、試料（例えば、体毛、毛包、又はそれらの抽出物など）中に含まれる抗原（即ち、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原）を検出または定量するために用いることができる。本発明で用いることができる標識物質は、抗体に物理的結合又は化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするものであれば特に限定されない。標識物質の具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等が挙げられ、より具体的には、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコ-ス-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコピリタンバク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、³H、¹⁴

C、¹²⁵I若しくは¹³¹I等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

【0025】ここで、放射性同位体及び蛍光物質は単独で検出可能なシグナルをもたらすことができるが、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルを生じる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法(比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等)に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的である。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0026】(2)本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ

本発明は、上記した上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマにも関する。本発明のモノクローナル抗体は当該ハイブリドーマを用いて製造することができる。以下、本発明の上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製方法を説明する。

【0027】先ず、成長期の皮膚から採取した毛から抽出したタンパク質および/または成長期のヒゲの毛包などの免疫原を用いて哺乳動物を免疫することによって、動物体内で抗体産生細胞を調製する。哺乳動物の種類は特に限定されないが、一般的にはマウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等が挙げられ、好ましくはマウス、ラット、ウサギ等のげっ歯類であり、より好ましくはマウスまたはラットである。マウスの例として、A/J系統、BALB/C系統、DBA/2系統、C57BL/6系統、C3H/He系統、SJL系統、NZB系統、CBA/JNcrj系統のマウスが挙げられる。BALB/C系統のマウスは、ハイブリドーマ作製時に同系統の骨髓腫由来細胞株が確立しているので好ましい。

【0028】本発明においては、成長期の皮膚から採取した毛から抽出したタンパク質および/または成長期のヒゲの毛包を免疫原として用いることができるが、本発明のモノクローナル抗体が認識する上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を含む限り、任意の材料を免疫原として使用することができる。

【0029】免疫前に、免疫原は、免疫応答を増強させるためにアジュバントと混合してもよい。アジュバントの例としては、油中水型乳剤(例えば、不完全フロイン

トアジュバント)、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲル、シリカアジュバント、粉末ベントナイト、およびタピオカアジュバントの他に、BCG、*Propionibacterium acnes*などの菌体、細胞壁およびトレハロースダイコレート(TDM)などの菌体成分;グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖体(LPS)およびリピドA画分; - グルカン(多糖体);ムラミジペプチド(MDP);ベスタチン;レバミゾールなどの合成化合物;胸腺ホルモン、胸腺ホルモン液性因子およびタフトシンなどの生体成分由来のタンパク質またはペプチド性物質;ならびにそれらの混合物(例えば、完全フロイントアジュバント)などが挙げられる。これらのアジュバントは、投与経路、投与量、投与時期などに依存して免疫応答の増強または抑制に効果を示す。さらにアジュバントの種類によって、抗原に対する血中抗体産生、細胞性免疫の誘導、免疫グロブリンのクラスなどに差が認められる。それゆえ、目的とする免疫応答に応じて、アジュバントを適切に選択することが好ましい。アジュバントによる処理方法は当該分野で公知である。

【0030】哺乳動物の免疫は、当該分野で公知の方法に従って行われる。例えば、抗原は、哺乳動物の皮下、皮内、静脈、または腹腔内に注射する。免疫応答は、免疫される哺乳動物の種類および系統によって異なるので、免疫スケジュールは、使用される動物に合わせて適宜設定する。抗原投与は、最初の免疫後に、何回か繰り返し行う。追加免疫は、例えば、最初の免疫から4週間後、6週間後、および半年後に行うことができる。

【0031】免疫後、哺乳動物から採血し、得られた血液を毛包結合活性の存在についてアッセイすることにより、哺乳動物の体内で毛包に対する抗体が産生されていることを確認する。アッセイ法としては、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射免疫アッセイ法(RIA)、蛍光抗体法等の公知の方法が挙げられる。

【0032】毛包結合性抗体の産生を確認後、特異抗体産生能のある免疫細胞を細胞融合に適した状態にするために、ブースト(免疫原の追加注射)を行うことができる。ブーストで投与する免疫原の量は特に限定されないが、最初に免疫した量の約4~5倍程度が好ましい。ブーストは、一般的には、免疫原と不完全フロイントアジュバントとのエマルジョンを用いて行うことができる。投与経路は、皮下、皮内、静脈、または腹腔内等から適宜選択される。

【0033】最終免疫後、免疫した哺乳動物から脾臓細胞を摘出し、骨髓腫由来の細胞株と細胞融合する。細胞融合には、増殖能力の高い細胞株を用いることが好ましく、また骨髓腫由来の細胞株は、融合する脾臓細胞の由来する哺乳動物と適合性があることが好ましい。マウスの骨髓腫由来の細胞株としては、P3U1、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO・1、

S194/5、XX0BU、I、P3/NS1/1-Ag4-1などが挙げられる。細胞融合は、当該分野で公知の方法に従って行われる。細胞融合法の例として、例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、電流を利用する方法などが挙げられる。得られた融合細胞は、当該分野で公知の条件に従って増殖させることができる。産生される抗体の結合能に基づいて、所望の融合細胞を選択する。

【0034】融合細胞から産生される抗体の結合能は、当該分野で公知の方法に基づいてアッセイすることができる。本発明においては、毛包に特異的かつ高い結合能を有する抗体を産生する融合細胞を得るために、毛包に対する結合能に基づく選別を利用して、目的の細胞株をクローニングする。抗体の結合能は、抗体産生の確認に関して上述したのと同様に、ELISA法、RIA法、蛍光抗体法などの方法を用いてアッセイすることができる。簡便で感度が高いことから、ELISA法が好ましい。

【0035】融合細胞のクローニングは、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる。クローニング法としては、限界希釈法、軟寒天法などが挙げられ、操作が容易で再現性が高いことから、限界希釈法が好ましい。細胞融合により得られた多くの融合細胞の中から、効率よく有用な細胞を選択するために、細胞選別は、クローニングの初期の段階から行うことが好ましい。このようにして、望ましい結合能を有する抗体を産生する融合細胞株を最終的に選別することができる。

【0036】上記のようにして選別されたモノクローナル抗体産生細胞株を大量培養することにより、毛包に対して特異的なモノクローナル抗体を大量に産生することができる。モノクローナル抗体産生細胞株の大量培養方法として、インビボおよびインビトロでの培養が挙げられる。インビボでの大量培養の例としては、哺乳動物の腹腔内に融合細胞を注射して増殖させ、腹水中に抗体を産生させる方法が挙げられる。インビトロでの培養では、融合細胞を培地中で培養し、抗体を培地中に産生させる。

【0037】大量培養により得られた腹水または培養上清から、当該分野で公知の方法を用いて、本発明のモノクローナル抗体を精製することができる。精製のためには、例えば、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法などが適宜組み合わせ用いられる。本発明の抗体は、好ましくは、約90%の純度、好ましくは約95%の純度、より好ましくは約98%の純度となるように精製することができる。

【0038】(3)本発明のポリクローナル抗体
本発明により上皮性の新生毛包に存在する約220kDa(SDS-PAGEで測定した場合)の抗原が同定されたことにより、該タンパク質を認識するポリクローナ

ル抗体を作製することができる。ポリクローナル抗体の作製は定法により行なうことができる。

【0039】例えば、上皮性の新生毛包に存在する約220kDaのタンパク質を認識するポリクローナル抗体は、当該タンパク質を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。抗原投与は、例えば7~30日間隔で2~3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05~2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹腔腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等に応じてアジュバントを使用しない場合もある。

【0040】免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、該哺乳動物の血清をサンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、例えば10 μ g~1000 μ gの抗原を用いて追加免疫を行なう。最後の投与から1~2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウム又はポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、本発明のタンパク質を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。なお血清は、たとえば、56で30分間処理することによって補体系を不活性化してもよい。

【0041】(4)本発明のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた育毛活性評価方法

本発明はさらに、本発明のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその断片を用いて免疫アッセイを行うことを特徴とする、育毛活性評価方法にも関する。この方法は、好ましくは、少なくとも下記(a)~(c)の工程を含む。

(a) 生体由来の皮膚組織を被験物質の存在下で培養する工程；

(b) 該皮膚組織片を回収し、本発明の抗体またはその断片と反応させる工程；及び

(c) 皮膚組織片と反応した該抗体またはその断片を検出または測定する工程；

【0042】本発明の育毛活性評価方法は、抗体を用いるアッセイ、即ち免疫アッセイであれば、いずれの方法でもよく、例えば、又はウエスタンブロット法、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法(RIA)、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、または粒子凝集反応等が挙げられる。

【0043】本発明の評価方法に供される被験物質の種類は特に限定されず、オリゴペプチドでも低分子有機化合物でもよい。例えば、育毛活性を有することが判明しているエピモルフィンの部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドなどを使用することができる。

【0044】本発明の育毛活性評価方法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体のうち少なくとも1種が本発明の抗体であればよい。

【0045】固相担体としては、固定化抗体に関連して不溶性担体の具体例として本明細書中上記したものを使用できる。また、標識物質も標識抗体に関連して本明細書中上記したものを使用できる。

【0046】測定の方法は公知の方法(日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」, 臨床病理刊行会, 1983年, 石川榮治ら編「酵素免疫測定法」, 第3版, 医学書院, 1987年, 北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」, 共立出版, 1987年)により行うことができる。

【0047】例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させて、固相化抗体 - 抗原 - 標識抗体の複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体の量より試料中の抗原量を測定することができる。具体的には、酵素免疫測定法(ELISA)の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法等により測定する。蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。発光免疫測定法の場合には発光反応系による発光量を測定する。

【0048】本発明の検出及び/又は定量法を免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応又は粒子凝集反応等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませて

もよい。

【0049】抗体を固相担体に感作させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレン、スチレン - ブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

【0050】この感作の方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの方法の併用等の公知の方法を使うことができる。測定の操作法は公知の方法により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

【0051】また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロタイタープレート等の容器中で、試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。なお、目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

【0052】(5)本発明のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を含む育毛活性評価キット
本発明のキットは、本発明により提供される上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその断片を含むものである。ここで言うモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその断片としては、本明細書中上記した固定化抗体や標識抗体でもよい。

【0053】例えば、本発明により提供される上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識する抗体を一次抗体として使用する場合、本発明のキットには、抗原抗体結合反応により形成された複合体を検出するための二次抗体を含めてもよい。本発明のキットには、該キットを効率的かつ簡便に利用できるようにするために、これら抗体以外に種々の補助剤を含めてもよい。補助剤としては、例えば固体状の二次抗体を溶解させるための溶解剤、不溶性担体を洗浄するために使用される洗浄剤、抗体の標識物質として酵素を使用した場合に酵素活性を測定するための基質、その反応停止剤などの免疫学的測定試薬のキットとして通常使用されるものが挙げられる。さらに、本発明のキットには、育毛活性評価を行うための説明書を含めることができる。

【0054】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は実施例によって限定されることはない。

実施例1：新生毛包に特異的なモノクローナル抗体の作製

B57BLマウスの成長期(48から50日目)の皮膚

から毛を切り取り、8M尿素、2% SDS、100mMのDTTを含むPBS中で37℃で一晩インキュベートし、タンパク質を抽出した。また、B57BLマウスのヒゲの毛包（毛球部に色素がついているもの；成長期）を実体顕微鏡で採取し、PBS中にホモジナイズした。上記2種類の試料（タンパク質量として0.5mg）を混合し、等量のコンブリートアジュバンドと混合してミセルを作製した。

【0055】上記で得たミセル（0.2mg）をラット（Wister）の皮下（3箇所）に分けて投与して免疫した。初回免疫の1ヵ月後に上記と同様に追加免疫を行なった。さらに2週間後に上記と同様に2回目の追加免疫を行なった。2回目の追加免疫の3日後に、免疫ラットから脾臓を取り出し、メッシュにて血球成分を回収した。この血球成分の中には抗体産生細胞が含まれている。上記で回収した血球成分（全量）とマウスミエローマP3U1（ダルベッコ/ハムF12混合培地）とをポリエチレングリコール1500を用いて混合し、ダルベッコ/ハムF12混合培地中に懸濁し（ 10^7 細胞/ml）、96ウエルプレートに各ウエル100μlずつ播いた。翌日、等量（100μl）のHAT培地（シグマ社）を各ウエルに添加した。2日後に各ウエルから150μlずつを吸引廃棄し、150μlの新培地を各ウエルに添加した。96ウエルプレートを37℃のCO₂インキュベーター内に静置した。

【0056】成長期のB57BLマウスのヒゲの毛包を8M尿素中に超音波粉碎機を用いて溶解した。この溶液にニトロセルロースメンブレンを5分間浸し、PBSで十分に洗浄したものをBioradドットプロッターに装着したものをを用いて、上記の96ウエルプレートの各ウエルから回収したハイブリドーマ上清を一次スクリーニングした。まず、上記で作製したBioradドットプロッターに装着したニトロセルロースメンブレンを、5%スキムミルクを溶解したトリスバッファー（TBS）でブロッキングした後、96ウエルの各ウエルにハイブリドーマ上清を100μlを添加した。1時間インキュベートした後、トリスバッファーで洗浄し、二次抗体であるホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗ラットIgG（TBSに1mg/mlで溶解したものを）を添加した。発色基質であるECL試薬を添加して、発色の有無により成長期のヒゲの毛包と反応する抗体（全部で50種類）を選出した（一次スクリーニング）。

【0057】上記の一次スクリーニングで選出した抗体（50種類）について、成長期ヒゲ毛包の凍結切片（10μm）を用いて特異的に反応にするものを選出した（二次スクリーニング）。具体的には、スライドガラス上に成長期ヒゲ毛包の凍結切片を置き、一次スクリーニングで選出されたハイブリドーマ上清を添加し、二次抗体で発色させた。具体的には、クライオスタット（ブライト社）で作成した成長期ヒゲ毛包の凍結切片を-20

メタノールで処理し、TBSで1時間ブロッキングを行った後、ハイブリドーマ上清を1時間反応させた。トリスバッファーで洗浄後、FITC標識抗ラットIgG（TBSに100μg/mlで溶解したものを）を反応させた。トリスバッファーで洗浄後、カバーガラスをかけて、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

【0058】二次スクリーニングの結果、全部で8種類の抗体を選出した。これらの抗体は表皮とは反応せず、毛包に特異的に反応するものであった。これら8種類の抗体を限界希釈法でクローニングした。

【0059】これら8種類の抗体について、成長期ヒゲ毛包又は休止期ヒゲ毛包をサンプルとしたウエスタンブロットで反応性を調べ、さらに毛包が形成されている14日齢マウス胎児皮膚の切片試料を用いて反応性を調べた。その結果、成長期ヒゲ毛包及び形成途中毛包（新生毛包）と特異的に反応し、休止期ヒゲ毛包とは反応しないモノクローナル抗体としてmAb27を取得した。モノクローナル抗体mAb27を産生するハイブリドーマは、受託番号FERM P-18578として平成13年11月2日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託され、平成14年（2002年）7月22日付けにて受託番号FERM BP-8121として国際寄託に移管された。

【0060】mAb27を用いた免疫分析の結果を図1に示す。図1の(A)は、ウエスタンブロットによりmAb27の抗原を検出した結果を示す。左側から右側の各レーンは、成長期と休止（退行）期のヒゲ、並びに成長期と休止（退行）期の背中の皮膚から抽出したタンパク質を電気泳動した後、ウエスタンブロットし、本発明のモノクローナル抗体mAb27を用いて抗原を検出した。

【0061】具体的には、抗原としては、ヒゲの毛包を8M尿素中で超音波粉碎機にて粉碎した液をそのまま希釈等せずに用いた。電気泳動の条件は30mAの定電流とし、SDS-PAGE（アクリルアミド4~20%）にて電気泳動した。泳動バッファーはグリシン14.4g/L、トリス1g/L、SDS1g/Lである。電気泳動後、PVDF膜にトランスファーし、5%スキムミルクを含むトリス緩衝液（TBS）中で1時間インキュベートした。mAb27（ハイブリドーマ上清を100μl）と1時間反応後、TBSにて十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG（アマシャム社）（TBSに1mg/mlで溶解したものを）を二次抗体として反応させ、十分に洗浄後、ECLキット（アマシャム社）を用いてmAb27の反応の強さを調べた。その結果、本発明のモノクローナル抗体mAb27は、成長期のサンプルに特異的に存在する約220kDaの抗原を検出することが判明した。

【0062】図1の(B)は、成体の毛と14日目マウ

ス胎児の上顎を用いた組織染色の結果を示す。操作方法は、実施例1で行なった抗体の二次スクリーニングの操作と同様である。

【0063】その結果、本発明のモノクローナル抗体mAb27を用いた場合、成体の毛においては上皮は染色されず、毛球のみ染色され、また14日目マウス胎児の上顎においても上皮は染色されず、毛包のみ染色されることが判明した。

【0064】図1の(A)および(B)に示した結果より、本発明のモノクローナル抗体mAb27は新生毛包10に存在する約220kDaの抗原を特異的に認識することが実証された。

【0065】実施例2：オリゴペプチドの作製

下記のアミノ酸配列：Ser-Ile-Glu-Gln-Ser-Cys-Asp-Gln-Asp-Gluで表されるオリゴペプチドをFmocを用いた固相法により合成した。合成したオリゴペプチドは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製し、HPLC及びMassによって純度が90%以上であることを確認した。

【0066】HPLCの条件は以下のとおりである。

カラム：ODS-UG3 (モノメリックODS、野村化学製) 内径 20
1.0 mm、全長100 mm

測定：室温(25)

検出：UV 214 nm、280 nm

溶出溶媒：溶媒A及び溶媒Bのグラジエント(溶媒A：0.1% トリフルオロ酢酸；溶媒B：90%アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸、5分後(溶媒B：0%)から55分(溶媒B：55%)の直線濃度勾配)

流速：75 ml/ml

リテンションタイム：21.52分(dimer), 20.59分(monomer) 30

【0067】上記で製造したオリゴペプチドを0.3 mg/mlとなるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解し、この溶液に等容量の100%エタノールを加えて0.15 mg/mlの50%エタノール・PBS溶液を調製した。オリゴペプチドの架橋は以下のように行った。PBSに溶解した1 mg/mlのオリゴペプチド溶液(5 ml)に対して33 µg/µlとなるようにジメチルスルホキシドに溶解したBMH(65 µl)を攪拌しながら徐々に加え、一晚4 で反応させた。この溶液に、さらに6.6 mlのPBSと5 mg/mlとなるようにPBSに溶解した塩酸システイン溶液(5 ml)を加えて混合すること 40により、終濃度0.3 mg/mlのSS架橋した(架橋剤が結合している単量体および二量体が混在している)オリゴペプチド溶液を調製した。このSS架橋したオリゴペプチドを参考例1および実施例3における毛成長促進作用の評価に用いた。

【0068】参考例1：インビボ法による育毛活性の評価

C3HやC57BL/6マウスは生後45日から95日前後まで約50日間休止期が続くことが知られている。また、休止期ではピンク、成長期ではグレー又はクロと皮膚の色が変化す 50

るため、毛周期の判定が容易である。このマウスを使用し、本発明のオリゴペプチドの投与により、成長期への移行が促進されるか否か評価した。C57BL/6マウスの7週齢(48~50日齢、雌)を購入し、背中(約3×2.5 cm²)を動物用電気バリカンで傷が付かないように注意深く刈毛し、皮膚の色から毛周期が休止期であることを確認した。上記で調製したオリゴペプチド溶液を0.2 mlずつ毎日1回、週5日間、実験開始後38日まで各群5匹ずつ塗布を行った。塗布は針の付いていない注射器を用いて行った。なお、ジペプチド(Ile-Lys)及びトリペプチド(Glu-Ile-Lys)のN-末端をそれぞれビオチン化したものを混合し、架橋試薬を加えたものをコントロール溶液とした。

【0069】評価は週2回マウスを観察し、毛を刈った面積に対する再生した面積の割合に応じてスコアを6段階に設定し、複数人(2人)が肉眼判定することにより行った。また、写真撮影も行った。発毛スコアは以下の要領で計算した。毛を刈った部分のうち、皮膚の色がグレー又はクロになった部分の割合により下記のようにスコアを付けた。0~20%：1、20~40%：2、40~60%：3、60~80%：4、80~100%：5。各群における上記スコアの合計を発毛スコアとした。判定者1人あたり発毛スコアの各群の最大値は50であり、判定者を2人としたので発毛スコアの最大値は100である。SS架橋した(架橋剤が結合している単量体および二量体が混在している)オリゴペプチドを塗布した群では、コントロール群に比べて成長期への移行が早まっており、毛の再生が促進されていた。

【0070】実施例3：本発明のモノクローナル抗体を用いた育毛活性の評価

12日目のICRマウス胎児の上アゴ皮膚組織を実体顕微鏡で採取し、左と右に分けて5頭分を回収した。回収した5頭分の皮膚を左(コントロール用)と右(被験オリゴペプチド用)を別々に5個ずつ一枚のヌクレオアメンブレン(孔径8 µm、直径13 mm)の上に載せ、実体顕微鏡で観察して外側が上になるようにした。1% BSAを含むダルベッコMEM/ハムF12培地500 µlを24ウエルディッシュの2ウエルに添加し、片方には被験オリゴペプチド溶液(溶媒はPBS)を最終濃度20 µMとなるように添加し、他方には溶媒(PBS)を対照として同量入れた。被験オリゴペプチドとしては、実施例2で作製したSS架橋したオリゴペプチド(ss7)を用いた。

【0071】皮膚組織を載せたメンブレン1枚ずつを上記のウエル中の溶液に浮かべ、37 で6日間培養した。メンブレンから5個の組織片をSDSサンプルバッファ(SDS 0.02 g/ml、グリセロール 0.2 g/ml、pH 6.8)100 µl中に回収し、超音波粉碎器により溶解した。対照も同様に処理した。上記処理で得た溶液をSDS-PAGE(アクリルアミド4

~20%)にて電気泳動後(35mA、1.5時間)、PVDf膜にトランスファーし、5%スキムミルクを含むトリス緩衝液(TBST)中で1時間インキュベートした。実施例2で取得したmAb27(TBST中10 μ g/ml)と1時間反応後、TBSTにて十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(アマシャム社)をTBSTで1/1000に希釈したものを二次抗体として反応させ、十分に洗浄後、ECLキット(アマシャム社)を用いてmAb27の反応の強さを調べた。

【0072】得られた結果を図2に示す。図2において、左のレーン(ss7)は、実施例2で作製したSS架橋したオリゴペプチド(ss7)を添加したサンプルの結果を示し、右のレーン(control)は溶媒のみを添加したサンプルの結果を示す。図2の結果から分かるように、SS架橋したオリゴペプチド(ss7)を添加したサンプルでは、コントロールよりも強いバンドが検出された。これはmAb27が認識する抗原の発現量が増大していることを反映する。即ち、参考例からss7は育毛活性を有することが実証された。実施例3からは、ss7がmAb27の抗原の発現量を増大させることが分かる。また、実施例1からは、mAb27の抗原は毛包の成長期に特異的であることが分かる。従って、mAb27の抗原が増大することが育毛活性を表す一つの指標であると考えられる。即ち、mAb27を用いてその抗原の発現を調べることにより、育毛活性を評価することができる。

【0073】実施例4：上皮性の新生毛包に存在する約220kDaの抗原の精製

(1)アフィニティーカラムの作製

Afigel 10 (Biorad) を4にし、ゲルを均一にし、ブフナーポートに入れて過した。ゲルの3倍量の4の脱イオン水で洗浄した。洗浄後、ゲルをフラスコに入れ、PBSに溶解したモノクローナル抗体mAb27の溶液(ゲル1mlに対し0.5mlの抗体溶液を使用)を添加した。十分に攪拌して懸濁させ、そのまま振とう機でゆっくり攪拌しながら1時間室温で反応させた。遠心により上清を除去し、PBSで10mlに調整した。ゲル1ml当たり0.1mlの1Mグリシンエチルエステル(pH8)を加え、1時間反応させた。反応後、ゲルをエコパックカラム(Biorad、~20ml用)につめて、蒸留水にてOD₂₆₀にて反応物が検出されなくなるまで洗浄した。最後に、溶出液(10mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、1mM EDTA、プロテインインヒビターカクテル(ロッシュ、商品名コンプリートミン)、0.15M NaCl、0.5% Triton X-100、HClでpH3.0に調整)で洗浄した。

【0074】(2)抗原の精製

30匹分のC57BLマウスの成長期背中皮膚をPBSで洗浄後、10mM Tris-HCl (pH7.5)、

1mM MgCl₂、1mM EDTA、及びプロテインインヒビターカクテル(ロッシュ、商品名コンプリートミニ)の混合液100mlに入れて、ホモジナイザーで十分に粉碎した。次いで、NaClを終濃度0.15Mになるように添加し、Triton X-100を終濃度0.5%になるように添加し、スターラーで4で3時間攪拌した。2500rpmで10分間遠心し、上清を回収して、C57BLマウスの成長期背中皮膚から蛋白質を抽出した。得られた抽出液100mlを上記(1)で作製したアフィニティーカラムにかけた。

【0075】洗浄液(10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM MgCl₂、1mM EDTA、プロテインインヒビターカクテル(ロッシュ、商品名コンプリートミニ)、0.15M NaCl、0.5% Triton X-100)で洗浄後、溶出液(洗浄液をHClでpH3.0に調整した液)をカラムに添加し、溶出液を2mlずつ回収し、OD280nmの吸収でタンパク質含有画分を回収した。

【0076】(3)精製抗原の電気泳動による分子量の測定

上記(2)で回収したタンパク質含有画分をSDS-PAGEで電気泳動し、モノクローナル抗体mAb27を用いたウエスタンブロットを行った結果、220kDaの位置にバンドが検出された。これによりmAb27抗原が220kDaのタンパク質であることが同定された。また、上記(2)で回収したタンパク質含有画分をSDS-PAGEで電気泳動したゲルをクマシーブルーで染色し、220kDaのバンドを切り出すことにより精製抗原を調製した。

【0077】実施例5：220kDaの抗原を認識するポリクローナル抗体の作製

実施例4(3)で調製した精製抗原(即ち、220kDaのバンドを含む切り出したゲル)を20%エタノールに回収し、一晩置いた。ゲルを回収し、~100 μ g程度の220kDaタンパク質を含む試料をタイターマックスゴールド(CytRXコーポレーションのアジュバンド)と混合してエマルジョンを作製し、ラットに2ヶ月間(全部で3回)免疫した。初回免疫の2ヵ月後、ラットから採血し、定法により血清を調製し、220kDaの精製抗原を認識するポリクローナル抗体を得た。

【0078】実施例6：220kDaの抗原を認識するポリクローナル抗体を用いた育毛活性の評価

ヒトケラチノサイトの分化を評価した。ヒトケラチノサイト(皮膚の細胞であり、表皮角化細胞及び毛包由来細胞などが混ざっている)をサンコー純薬から購入した。細胞に添付されている培養液にssb7(Ser-Ile-Glu-Gln-Ser-Cys-Asp-Gln-Asp-Glu)のN末端をビオチン化した(NHS-Biotin, ピアース社)ものをS-S架橋したペプチドを20 μ Mになるように添加し、96穴プレートで1週間培養した。ウエルから細胞を回収し、SDSサン

ブルバッファ (SDS 0.02g/ml、グリセロール 0.2g/ml、pH6.8) 100µl中に回収し、超音波粉碎器により溶解した。対照も同様に処理した。上記処理で得た溶液をSDS-PAGE (アクリルアミド4~20%)にて電気泳動後(35mA、1.5時間)、PVD F膜にトランスファーし、5%スキムミルクを含むトリス緩衝液(TBST)中で1時間インキュベートした。実施例5で取得したポリクローナル抗体(血清を1/100に希釈したもの)と1時間反応後、TBSTにて十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(アマシャム社)をTBSTで1/1000に希釈したものを二次抗体として反応させ、十分に洗浄後、ECLキット(アマシャム社)を用いてポリクローナル抗体の反応の強さを調べた。また、参考のために、実施例5で取得したポリクローナル抗体の代わりにモノクローナル抗体mAb27を用いて、同様に反応の強さを調べた。

【0079】得られた結果を図3に示す。図3において、左のレーンはssb7未添加の対照の結果を示し、右のレーンはssb7を添加した結果を示す。図3の結果から分かるように、モノクローナル抗体mAb27はヒトの抗原を認識しないが、実施例5で作製したポリクローナル抗体はヒトの抗原を認識することが分かる。また、オリゴペプチド(ssb7)を添加したサンプルでは、対照よりも強いバンドが検出された。これは実施例5で作製したポリクローナル抗体が認識する抗原の発現量が増大していることを反映する。

【0080】

【発明の効果】本発明の抗体は、上皮性の新生毛包に存*

*在する抗原を特異的に認識することができ、育毛活性の評価に有用である。

【0081】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Electric Industries, Ltd.

<120> An antibody and a method for evaluating a hair growth promoting activity using the same

<130> A21716A

<160> 1

【0082】<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 1

Ser Ile Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu

1

5

10

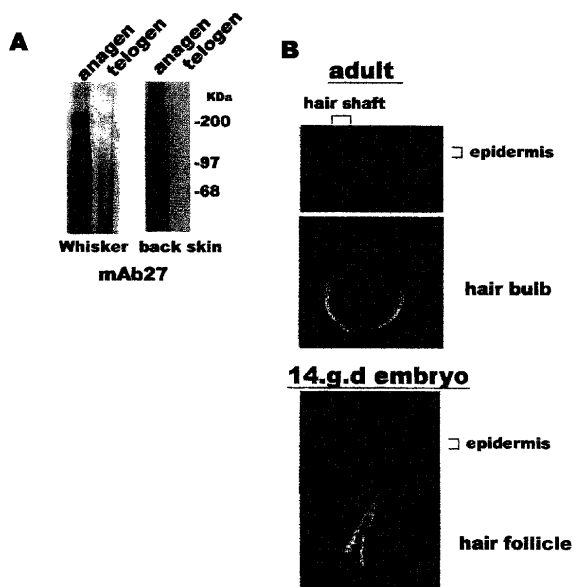
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明で取得したモノクローナル抗体mAb27を用いた免疫分析の結果を示す。

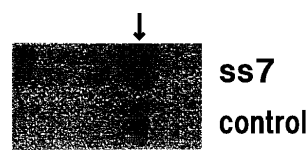
【図2】図2は、本発明で取得したモノクローナル抗体mAb27を用いてオリゴペプチドの毛成長促進作用の評価を行った結果を示す。

【図3】図3は、本発明で取得したポリクローナル抗体を用いてオリゴペプチドの毛成長促進作用の評価を行った結果を示す。

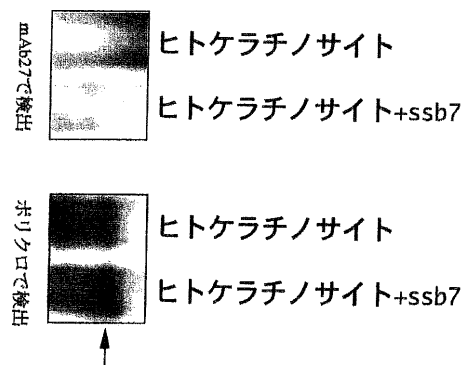
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)	
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/53	D
	33/53		33/577	Y
	33/577	C 0 7 K	7/06	B
// C 0 7 K	7/06	C 1 2 N	15/00	Z N A C
			5/00	B

(72)発明者 岡 由美子
 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
 気工業株式会社横浜製作所内

Fターム(参考) 2G045 AA29 BB01 BB14 BB20 BB24
 BB50 BB51 CB01 CB16 FA16
 FB03 FB05 FB12
 4B024 AA01 AA11 BA43 GA03 GA18
 HA11 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
 DA01 DA11 DA13
 4B065 AA91X AB05 AC14 BA08
 BA24 BB01 CA25 CA43 CA44
 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 BA15 CA40 DA75 DA76 DA86
 EA20 EA50 FA33 FA58 FA71
 FA72 GA21

专利名称(译)	用于评估毛发生长活性的抗体和方法		
公开(公告)号	JP2003210169A	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2002328067	申请日	2002-11-12
申请(专利权)人(译)	住友电气工业株式会社		
[标]发明人	武部京子 平井洋平 岡由美子		
发明人	武部 京子 平井 洋平 岡 由美子		
IPC分类号	G01N33/50 C07K7/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/50.H G01N33/50.Q G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/577.B C07K7/06 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB01 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB16 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA11 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BB01 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA58 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA21		
优先权	2001347340 2001-11-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种可用于评估毛发生长活性并特异性识别新上皮毛囊中存在的抗原的抗体。 特异性识别存在于上皮新毛囊中的约220kDa抗原的抗体或其片段。

【 2】

