202228759

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202228759 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：110135956 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 09 月 24 日

(51)Int. Cl.： *A61K38/06 (2006.01)* *A61P17/14 (2006.01)*

A61K8/64 (2006.01) *A61Q7/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/09/24 日本 2020-159776

2021/09/24 世界智慧財產權組織 PCT/JP2021/035009

(71)申請人：日商日本安佳榜化妝股份有限公司 (日本) ADJUVANT COSME JAPAN CO., LTD. (JP)

日本

國立研究開發法人理化學研究所 (日本) RIKEN (JP)

日本

(72)發明人：中村莊太 NAKAMURA, SOUTA (JP) ；高橋秀樹 TAKAHASHI, HIDEKI (JP) ；中池佑紀美 NAKAIKE, YUKIMI (JP) ；辻孝 TSUJI, TAKASHI (JP) ；小川美帆 OGAWA, MIHO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：4 共 21 頁

(54)名稱

育毛劑

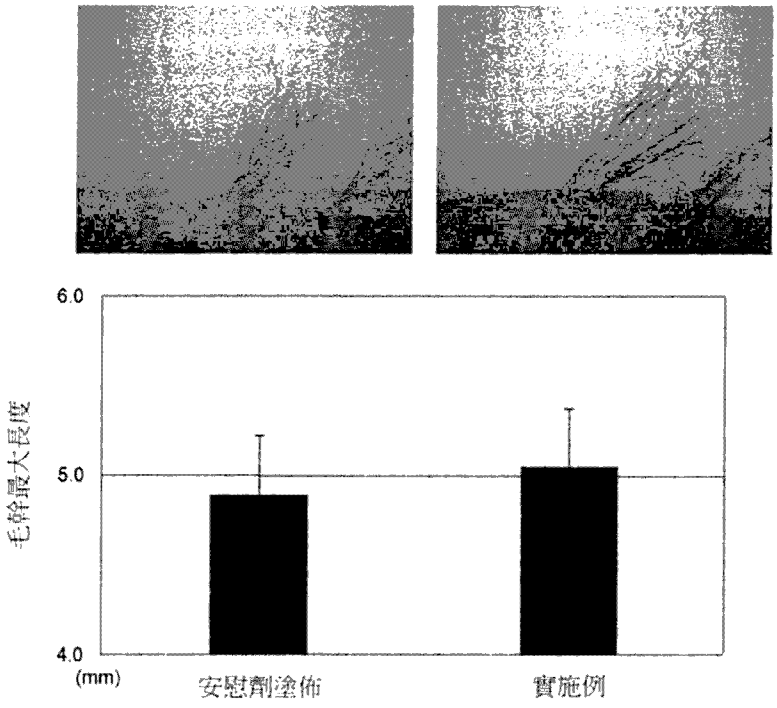
(57)摘要

為了提供具促進頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛中之毛幹成長，增強有助於真皮乳頭細胞中之育毛的基因表現，毛髮生長、毛幹伸長速度之提升、毛幹最大長度之提升、及毛幹徑之增大的效果之屬於外用劑之育毛劑、頭皮護理劑及增強有助於真皮乳頭細胞中之育毛的基因表現之劑，而含有棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸者作為此等劑之有效成分。

In order to provide external preparations such as a hair restorer, a scalp care agent, and an agent that enhances gene expression that contributes to hair growth in dermal papilla cells, which have the effect of promoting hair shaft growth in hair, beard, eyebrows and/or eyelashes, enhancing gene expression that contributes to hair growth in hair papilla cells, hair growing, improving hair shaft elongation rate, improving hair shaft maximum length, and increasing the diameter of the hair shaft, these agents contain palmitoyl dipeptide-5 diaminobutyroyl hydroxythreonine as an active ingredient.

指定代表圖：

TW 202228759 A



【圖1】

202228759

【發明摘要】

【中文發明名稱】 育毛劑

【英文發明名稱】 HAIR RESTORER

【中文】

為了提供具促進頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛中之毛幹成長，增強有助於真皮乳頭細胞中之育毛的基因表現，毛髮生長、毛幹伸長速度之提升、毛幹最大長度之提升、及毛幹徑之增大的效果之屬於外用劑之育毛劑、頭皮護理劑及增強有助於真皮乳頭細胞中之育毛的基因表現之劑，而含有棕櫚醯二肽-5二胺基丁醯羥基蘇胺酸者作為此等劑之有效成分。

【英文】

In order to provide external preparations such as a hair restorer, a scalp care agent, and an agent that enhances gene expression that contributes to hair growth in dermal papilla cells, which have the effect of promoting hair shaft growth in hair, beard, eyebrows and/or eyelashes, enhancing gene expression that contributes to hair growth in hair papilla cells, hair growing, improving hair shaft elongation rate, improving hair shaft maximum length, and increasing the diameter of the hair shaft, these agents contain palmitoyl dipeptide-5 diaminobutyroyl hydroxythreonine as an active ingredient.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 育毛劑

【英文發明名稱】 HAIR RESTORER

【技術領域】

【0001】 本發明係關於育毛劑。更詳細而言，係關於屬於包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之外用劑的育毛劑。

【先前技術】

【0002】 在包括人類在內的哺乳動物中，對改善育毛效果及毛種與毛質的育毛劑等之外用劑的需要逐漸增加。為了改善育毛效果及毛種與毛質，提案了有助於調整屬於毛髮的生命週期之毛髮週期的有效成分，並作為育毛劑而在市場上銷售。

【0003】 例如，提案了利用米諾地爾作為育毛劑的有效成分（參照專利文獻 1 至 3 等），並經過人體臨床試驗，以米諾地爾作為有效成分的育毛劑在市場上銷售。然而，其醫藥用途在日本僅限於男性中年脫髮症等，無法充分地滿足廣大消費者對育毛效果及毛種與毛質改善效果的需求。

【0004】 此外，提案了利用手性肌醇作為育毛劑的有效成分（參照專利文獻 4）。然而，專利文獻 4 所述之屬於包含手性肌醇之外用劑的育毛劑僅在不具有胰島素抵抗性的對象中得到育毛效果的支持，以致投與對象者受限。因此，無法充分地滿足廣大消費者對育毛效果及毛種與毛質改善效果的需求。

【0005】 已知棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸係作為化妝品原材料的成分（參照專利文獻 5）。然而，並未有關於棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之育毛效果的報導。

【0006】

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻 1] 美國專利第 4139619 號說明書

[專利文獻 2] 日本特開昭 63-150211 號公報

[專利文獻 3] 日本特開昭 63-145217 號公報

[專利文獻 4] 國際公開第 2017/188393 號

[專利文獻 5] 日本特許第 5028474 號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0007】 本發明之目的係提供一種具有優異育毛作用的育毛劑。

[解決課題之手段]

【0008】 本發明者等為了解決上述課題進行重複研究之結果發現，藉由將棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸作為有效成分，則可使育毛活性發揮、發揮頭皮護理效果及使真皮乳頭細胞之 FGF-7 產生促進效果發揮，從而完成本發明。

【0009】 用於解決上述課題之本發明之第 1 之手段係，一種育毛劑，其係包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的外用劑。

【0010】用於解決上述課題之本發明之第 2 之手段係，如本發明之第 1 之手段所述之育毛劑，其中，棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之含量，相對於整體，係 0.001 至 20 重量%。

【0011】用於解決上述課題之本發明之第 3 之手段係，如本發明之第 1 之手段或第 2 之手段所述之育毛劑，其中，棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之含量，相對於整體，係 0.005 至 10 重量%。

【0012】用於解決上述課題之本發明之第 4 之手段係，如本發明之第 1 至第 3 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係用於促進毛幹生長或毛髮生長。

【0013】用於解決上述課題之本發明之第 5 之手段係，如本發明之第 1 至第 4 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係使用於使毛幹伸長速度提升。

【0014】用於解決上述課題之本發明之第 6 之手段係，如本發明之第 1 至第 4 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係使用於使毛幹最大長度提升。

【0015】用於解決上述課題之本發明之第 7 之手段係，如本發明之第 1 至第 4 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係使用於使毛幹徑增大。

【0016】用於解決上述課題之本發明之第 8 之手段係，如本發明之第 1 至第 4 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係使用於使毛髮數量增加。

【0017】用於解決上述課題之本發明之第 9 之手段係，如本發明之第 1 至第 8 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係溶液。

【0018】 用於解決上述課題之本發明之第 10 之手段係，如本發明之第 1 至第 9 之手段中任一項之手段所述之育毛劑，其係用於頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛。

【0019】 用於解決上述課題之本發明之第 11 之手段係，一種育毛方法，係包含將本發明之第 1 至第 10 之手段中任一項之手段所述之育毛劑投與至對象。

【0020】 用於解決上述課題之本發明之其他之手段係，一種頭皮護理劑，其係包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的外用劑。

【0021】 用於解決上述課題之本發明之其他之手段係，一種頭皮症狀改善方法，其係包含將屬於包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之外用劑的頭皮護理劑投與至對象。

【0022】 用於解決上述課題之本發明之其他之手段係，一種真皮乳頭細胞之 FGF-7 產生促進劑，其係包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸。

[發明效果]

【0023】 依據本發明之手段，可提供一種育毛劑、頭皮護理劑及真皮乳頭細胞之 FGF-7 產生促進劑，此等係藉由將棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸作為屬於外用劑之育毛劑的有效成分，而在頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛中，促進毛幹生長、毛幹伸長速度的提升、毛幹最大長度的提升、毛幹徑的增大之效果以及頭皮護理效果優異。

【圖式簡單說明】

【0024】

圖 1 係確認在棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸 0.05%溶液之塗佈後，小鼠之藥劑塗佈部位中之毛髮生長之狀態的照片、及顯示小鼠之藥劑塗佈部位中之毛幹長度之變化的圖。圖之縱軸表示毛幹長度（mm）。又，安慰劑塗佈意指顯示不含藥劑之 60%乙醇水溶液塗佈在第一毛髮週期的標準數據。

圖 2 係顯示藥劑塗佈後之毛幹徑的測定結果。

圖 3 係顯示人真皮乳頭細胞中之因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的刺激引起真皮乳頭細胞之增殖促進效果。

圖 4 係顯示人真皮乳頭細胞中之因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的刺激引起 FGF-7 基因表現量之變化。

【實施方式】

【0025】 以下說明用於實施本發明之型態。又，本發明並非限定於此等例示，當然，在不脫離本發明之主旨的範圍內可進行各種變更。

【0026】 本發明之屬於外用劑的育毛劑及頭皮護理劑之有效成分係由棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸（Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyloyl Hydroxythreonine（Palm-Lys-Val-Dab-Thr-OH））所構成。

【0027】 本發明之育毛劑及頭皮護理劑中之屬於有效成分的棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的濃度，相對於育毛劑及頭皮護理劑之整體，係 0.001 至 20 重量%。更具體而言，係 0.005 至 10 重量%。

【0028】 本發明之育毛劑及頭皮護理劑可使用作為包含醫藥品、準藥品、頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛用之化妝品及頭皮用化妝品的化妝品等，

並且可使用作為軟膏、糊劑、搽劑、洗劑、外用液劑、噴霧劑、霜劑、凝膠劑、乳液、養髮劑、髮膠、微針等各種態樣的製劑，惟並非限定於此等者。

【0029】此外，在不妨礙本發明之育毛效果及頭皮護理效果之程度中，亦可進一步調配通常含有在包含醫藥品、準藥品、頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛用化妝品及頭皮用化妝品之化妝品等中允許的添加物等成分者。作為該添加物等成分，係列舉例如賦形劑、穩定劑、矯味劑、基劑、分散劑、稀釋劑、陰離子性界面活性劑、兩性界面活性劑、非離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑、陰離子性聚合物、非離子性聚合物、環氧乙烷/環氧丙烷嵌段共聚物、醇類、乳化劑、經皮吸收促進劑、pH 調整劑、保存劑、著色劑、油脂、礦物油等油分、保濕劑、增黏劑、聚合物、皮膜形成劑、紫外線吸收劑、細胞賦活劑、保濕劑、無機鹽、機能性珠粒與膠囊類、聚矽氧類、金屬螯合物劑、抗氧化劑、防腐劑、清涼劑、除臭劑、顏料、染料、香料、糖類、胺基酸類、維他命類、有機酸、有機胺、植物萃取物、黏土礦物及各種聚合物等黏度調整劑等，惟並非限定於此等者。

【0030】本發明之育毛劑及頭皮護理劑可含有具有毛髮生長、育毛、養毛等效果的習知成分者。

【0031】可調整每次投與本發明之手段中之育毛劑及頭皮護理劑的有效成分之投與量，從而表現出本發明之育毛劑及頭皮護理劑的效果。然後，其投與量，例如可為 0.005 至 200mg，具體而言，可為 0.05 至 100mg，更具體而言，可為 0.5 至 10mg。

【0032】本發明之育毛劑及頭皮護理劑的投與次數可為 1 次或複數次，以表現出本發明之育毛劑及頭皮護理劑的效果。然後，本發明之育毛

劑及頭皮護理劑的投與次數，例如可為每天 1 至 6 次。然後，具體而言，可為每天 1 至 3 次，更具體而言，可為每天 1 至 2 次。

【0033】本發明之育毛劑及頭皮護理劑係關於促進毛幹生長、毛髮生長及防脫毛者，較佳係關於促進毛幹生長及毛髮生長者。

【0034】本說明書中，「促進毛幹生長」之用語，係意指使毛幹伸長速度提升、使毛幹最大長度提升、及/或使毛幹徑增大。

【0035】本說明書中，「毛髮生長」之用語，係意指促進從毛髮不生長（毛幹不從表皮長出）或毛髮數量少之部位中毛髮生長已停止、或毛髮生長能力降低的毛孔長出新的毛髮，並使毛髮數量增加，詳細而言，縮短毛髮週期中之休止期、及/或恢復已停止的毛髮週期。

【0036】本說明書中，「具有促進毛幹生長效果」係意指，有利於促進毛幹生長之作用，將顯示促進毛幹生長效果之特質稱為「促進毛幹生長活性」。此外，「具有毛髮生長效果」係意指，有利於毛髮生長之作用，將顯示毛髮生長效果之特質稱為「毛髮生長促進活性」。

【0037】本說明書中，「脫毛」之用語，係意指毛幹從毛孔脫落的現象，詳細而言，係意指阻害細胞增殖之抑制性細胞介素等之增加及、此等之細胞死亡。將顯示防脫毛效果之特質稱為「防脫毛活性」。此外，「具有防脫毛效果」係意指，經介抑制細胞介素之阻害或者減少、及細胞死亡之抑制，減少毛幹從毛孔的脫落數，並與顯示促進毛幹生長、毛髮生長效果之特質相異的生理現象。

【0038】本說明書中，「頭皮症狀」係意指，頭皮屑、頭皮粗糙、頭皮乾燥、紅斑、瘙癢、丘疹等症狀。然後，本說明書中，「頭皮症狀改善」

係意指，頭皮屑、頭皮粗糙、頭皮乾燥、紅斑、瘙癢、丘疹等之抑制或改善。

【0039】本發明之育毛劑可使用於使毛幹伸長速度或毛幹最大長度提升。然後，針對毛幹伸長速度，與毛髮週期之標準數據中之毛幹伸長速度比較，例如可提升最大 110%左右，具體而言，可提升 25 至 110%左右，更具體而言，可提升 33 至 110%左右。此外，針對毛幹最大長度，與毛髮週期之標準數據中之毛幹最大長度比較，例如可提升最大 49%左右，具體而言，可提升 1 至 49%左右，更具體而言，可提升 2 至 49%左右。

【0040】本發明之育毛劑，可使用於使毛幹徑增大。

【0041】本發明之育毛劑可使用於促進從毛髮不生長（毛幹不從表皮長出）或毛髮數量少之部位中毛髮生長已停止、或毛髮生長能力降低的毛孔長出新的毛髮，並使毛髮數量增加，詳細而言，可使用於縮短毛髮週期中之休止期、及/或恢復已停止的毛髮週期。

【0042】本發明之育毛劑及頭皮護理劑，除了人類以外，亦可使用於家畜及寵物等動物用（非人動物用）。在本發明之一個方面中，提供一種育毛方法及頭皮症狀改善方法，係包括提供將包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之外用劑投與至包含人類及家畜與寵物等動物之對象。

[實施例]

【0043】＜試驗例 1：因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸引起的育毛活性評估＞

【0044】1.材料與方法

（1）實驗動物

從日本 SLC 股份有限公司（日本）購入 C57BL/6N 小鼠（雄）及 Balb/c nu/nu 小鼠（雌），飼養後進以下實驗。又，動物之飼養及試驗係遵守相關法規、部級法令、及指南，並經理化學研究所實驗倫理審查會之認可而實施者。

【0045】（2）試劑

各別準備以下試劑。

安慰劑：60%乙醇水溶液

實施例 1：棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸 0.05%溶液

【0046】（3）源自小鼠背部體毛皮膚之皮膚試驗片的製作

【0047】為了採集脫毛後 12 至 14 天之成長期 VI 皮膚作為背部體毛皮膚，將 7 至 8 週齡之 C57BL/6N 小鼠的背部體毛皮膚採集擬定部位脫毛，飼養 12 至 14 天。其後，在藉由頸椎脫臼使已脫毛的 C57BL/6N 小鼠安樂死後，從背部體毛皮膚採集擬定部位適量採集背部體毛皮膚。

【0048】將採集的皮膚浸入包含 10mM HEPES、10%胎牛血清、及 1%青黴素/鏈黴素溶液之 DMEM 培養基（以下，稱為「DMEM10」）。將採集的背部體毛皮膚以彎鑷夾住，在滅菌用溶液中浸泡 10 秒進行處理。以優碘 7%溶液處理 2 次、PBS（-）處理 3 次、DMEM10 處理 2 次之順序，各別使用新鮮的溶液進行滅菌處理。滅菌處理後，浸漬在乾淨的 DMEM10 中。

【0049】將滅菌處理後之背部體毛皮膚裁切並封堵化。使用弧形剪刀切除附著在皮膚之皮筋層的透明結合組織，沿著毛流將毛群裁切成長方形

條狀。此時，毛囊係以成為短軸 5 排的方式而調整，長軸之毛囊係以成為 6 排之方式而裁切並封堵化。

【0050】（4）皮膚試驗片移植至 Balb/c nu/nu 小鼠

【0051】將上述所製作的源自背部體毛皮膚之皮膚試驗片移植至 4 至 6 週齡的 Balb/c nu/nu 小鼠。

【0052】具體而言，依據常規方法藉由異氟醚對小鼠進行氣體麻醉。其次，使用優碘 7%溶液將小鼠背部消毒後，使其置於自然橫臥位。然後，使用 MANI Ophthalmic Knife.（MANI 股份有限公司、日本）刺穿小鼠背部，形成從皮膚表皮層延伸至真皮層下層部的移植傷口。將源自背部體毛皮膚之皮膚試驗片以使毛群面向移植傷口的體表側的方式插入到形成的移植傷口。皮膚試驗片之移植深度係以毛群之上端部露出在移植傷口上端部之狀態的方式而調整。其次，將移植有源自背部體毛皮膚之皮膚試驗片的移植傷口使用 Nurseban（註冊商標）（股份有限公司 Sun Planet、日本）及手術膠帶（3M Japan 股份有限公司、日本）作為保護帶覆蓋，以保護移植傷口。移植後 5 至 7 天去除保護膠帶，將經移植源自背部體毛皮膚之皮膚試驗片的情況以目視或數位顯微鏡（股份有限公司 Keyence、日本）判斷後，進行後續追蹤。

【0053】（5）對移植皮膚試驗片之藥劑塗佈

在毛髮週期之第 1 週，塗佈作為安慰劑的 60%乙醇水溶液。對移植了上述皮膚試驗片的 Balb/c nu/nu 小鼠，使用微量吸移管將 25μL 之 60%乙醇分別塗佈在移植的皮膚試驗片的左右背部。其後，使用烘乾機吹冷風使乙醇快速乾燥。此作業在小鼠左右背部各重複 4 次。

【0054】 從毛髮週期之第 2 週期以後，依據上述方法，在經毛群移植的 Balb/c nu/nu 小鼠，使用棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸溶液取代 60%乙醇水溶液而塗佈。

【0055】 （6）毛髮生長後續追蹤及組織學的分析

從 Balb/c nu/nu 小鼠之皮膚試驗片的移植部位各別選擇 3 個區域，從此等區域各別選擇 5 根毛，確認並記錄毛髮生長之狀態。藉由目視及數位顯微鏡（股份有限公司 Keyence、日本）進行觀察與記錄。

【0056】 2.結果

【0057】 對於每種藥劑，每 1 至 3 天測量一次毛幹長度，將隨時間變化之各時間點的毛幹長度的平均值繪製為 1 個點繪製在圖上，並對 5 隻重複相同的繪製。將結果表示於表 1 及圖 1。

【0058】 [表 1]

	安慰劑塗佈 （第 1 毛髮週期）	藥劑作用之數據 （第 2 毛髮週期）
毛幹成長速度（mm/天）	0.36±0.06	0.40±0.08
對標準數據比		110.45%
毛幹最大長度（mm）	4.9±0.3	5.1±0.3
對標準數據比		103.27%

【0059】 在將含有 0.05%棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之溶液塗佈於小鼠之皮膚試驗片的移植部位之情況下，與標準數據進行比較，

其毛幹成長速度及毛幹最大長度提升（參照表 1 及圖 1）。從此等結果，確認出含有 0.05%棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的溶液具育毛活性。

【0060】＜試驗例 2：因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸引起的毛增粗化活性評估＞

【0061】1.材料與方法

（1）毛增粗化之測量方法

使用上述試驗例 1 中第 2 週期結束後的毛幹進行毛增粗化的測量。在採集的毛幹中，使用 3 根 Zigzag 毛進行毛增粗化的測量。將其中心部分增粗之範圍以 1 邊 100μm 之正方形選擇 3 處。針對各選擇的範圍進一步選擇 5 個相異處，並測量那裡 Zigzag 毛之毛幹徑以評估毛增粗化的程度。

【0062】2.結果

將測量了毛幹徑之結果表示於圖 2 及表 2。於此，圖 2 及表 2 中之**顯示在 $p<0.01$ 係顯著者。

【0063】[表 2]

	安慰劑塗佈（第 1 毛髮週期）	藥劑作用之數據（第 2 毛髮週期）
毛幹徑	16.1±1.8	22.0±1.6**
增加率		137

**$p<0.01$

【0064】塗佈屬於本發明之手段之有效成分的棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸時，與成為對照之塗佈 60%乙醇水溶液之情況的第 2 週期結束的毛幹徑相比，確認出明顯產生毛增粗化。

【0065】＜試驗例 3：因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸引起的毛增粗化活性評估＞

【0066】1. 材料與方法

（1）針對人真皮乳頭細胞及培養基

購入人真皮乳頭細胞（目錄編號：CA602t05a、白人種、源自 29 歲男性、東洋紡股份有限公司（日本）），依據規程所記載的方式維持與培養細胞並進行試驗評估。

【0067】（2）藥劑

調製由包含以下各濃度（最終濃度）之棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的人真皮乳頭細胞用培養基所構成的藥劑溶液，並使用此作為試驗用藥劑。

實施例 1：10.268375μM

實施例 2：20.53675μM

實施例 3：41.0735μM

實施例 4：82.147μM

實施例 5：164.294μM

實施例 6：328.588μM

【0068】（3）試驗方法

將人真皮乳頭細胞以成為 1×10^3 個/孔之方式播種於 96 孔盤。在 CO_2 培養器（5%CO_2、37℃）內培養 1 天後，將人真皮乳頭細胞之培養基取代由包含上述各濃度之棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的人真皮乳頭細胞用培養基所構成的藥劑溶液。其後，將細胞盤放回 CO_2 培養器，進一步

培養 24 小時、48 小時、及 72 小時。培養後，除去培養上清液，以磷酸鹽緩衝液（簡稱：PBS）洗滌細胞。以 PBS 洗滌後，每孔添加 100μL 包含活細胞數測定試劑 SF（Nacalai Tesque 股份有限公司（日本））10%的培養基。添加後，測定培養上清液之吸光度(測定波長 450nm、參照波長 620nm)。以此值為基礎，各別算出將無添加對照群之細胞增殖率作為 100%之際，各孔的細胞增殖率。

【0069】 2. 結果

測定在人真皮乳頭細胞使棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸作用後隨時間變化的活細胞率之變化，將其結果表示於圖 3。

【0070】 如圖 3 所示，確認出相對於人真皮乳頭細胞，使棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸（實施例 1 至實施例 6）作用，則與無添加對照群相比，細胞增殖率增加。更且，確認出在本次檢測的濃度區域內，依據棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之濃度，細胞增殖率上升。

【0071】 ＜試驗例 4：因棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸引起的人真皮乳頭細胞中之 FGF-7 基因表現的評估＞

【0072】 1.材料與方法

（1）針對人真皮乳頭細胞及培養基

與上述試驗例 3 同樣地維持與培養人真皮乳頭細胞並進行試驗評估。

【0073】 （2）藥劑

調製以下各濃度（最終濃度）的藥劑溶液並使用作為試驗用藥劑。

比較例 1：腺苷 100μM

實施例 1：棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸 1μM

實施例 2：棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸 10μM

實施例 3：棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸 300μM

【0074】（3）試驗方法

將人真皮乳頭細胞以成為 6×10^3 個/孔的方式播種於 24 孔盤。在 CO_2 培養器（5%CO_2、37℃）內培養 1 天後，取代為包含各試驗用藥劑的培養基。其後，將細胞盤放回 CO_2 培養器，進一步培養 24 小時。

【0075】培養後，從各孔抽取並回收總 RNA，將此反向轉錄為 cDNA。使用所調製的 cDNA，以即時 PCR 法測定 FGF-7 基因的表現。使用 GAPDH 基因作為內標準，算出 FGF-7 基因表現量作為與陰性對照群之相對值。

【0076】從細胞之總 RNA 的回收中使用 FastGene RNA Basic Kit（目錄編號：FG-80250、日本 Genetics 股份有限公司（日本））。每孔添加 300μL 之溶解緩衝劑 RL，以移液溶解細胞。在細胞溶解液添加 300μL 之 70%乙醇，以移液混合。將試樣溶液添加於 FastGene RNA 結合管柱，在室溫以 10000g 離心 1 分鐘。通過管柱的濾液從收集試管廢棄，將 FastGene RNA 結合管柱放回原收集試管後，將 600μL 之洗滌緩衝劑 RW1 加入 FastGene RNA 結合管柱，在室溫以 10000g 離心 1 分鐘。將 FastGene RNA 結合管柱轉移到新的收集試管並設置，將 700μL 之洗滌緩衝劑 RW2 加入 FastGene RNA 結合管柱，在室溫以 10000g 離心 1 分鐘。將 FastGene RNA 結合管柱轉移到新的收集試管並設置，在室溫以 15000rpm 離心 1 分鐘。將 FastGene RNA 結合管柱轉移到新的收集試管並設置，將 50μL 之溶出緩衝劑 RE 添加於 FastGene RNA 結合管柱之膜中央，在室溫以 10000g 離心 1 分鐘，並回收純化的 RNA。以 NanoDrop Lite（目錄編號：

ND-LITE、賽默飛世爾科技股份有限公司）測定回收的 RNA 之濃度，保存在-80℃直至後續的 cDNA 化作業為止。

【0077】 cDNA 之合成中使用 FastGene scriptaseII cDNAsynthesis 5×Ready Mix(目錄編號:NE-LS64、日本 Genetics 股份有限公司(日本))。將新試管所產生的總 RNA 之濃度成為 20ng/mL 的方式，以 RNase Free Water 稀釋，在該試樣溶液 16μL 中添加 FastGene scriptaseII cDNAsynthesis 5×Ready Mix 4μL，以渦漩攪拌。使用 MiniAmp 熱循環儀（賽默飛世爾科技股份有限公司），在 25℃培養 10 分鐘、在 42℃培養 60 分鐘、在 85℃培養 5 分鐘，並合成 cDNA。

【0078】 將以上述方法所合成的 cDNA 使用於即時 PCR。在 96 孔盤之指定孔中，添加各 cDNA 模板稀釋液，添加 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（目錄編號：QPS-201、東洋紡股份有限公司（日本））與引子並混合，以 QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System(目錄編號:4485693、賽默飛世爾科技股份有限公司）分析基因表現。作為 PCR 反應，進行 95℃ 5 秒鐘、60℃ 30 秒鐘的 40 個循環。

【0079】 試驗中所使用的 FGF-7 基因特異引子及作為內標準的 GAPDH 基因特異引子係如下所示。

FGF-7 基因表現檢測用引子

順方向：gagagaaaatccttctgcctgttg（序列編號 1）

逆方向：cctggtgcaacttgagcctt（序列編號 2）

GAPDH 基因表現檢測用引子

順方向：catccctgcctctactggcgctgcc（序列編號 3）

逆方向：ccaggatgcccttgaggggcccctc（序列編號 4）

【0080】 如下所示般算出各基因之相對表現量。

從各基因之增幅曲線與閾值線之交點算出 Ct 值（PCR 循環次數）。相對表現量係從目的基因之 Ct 值除以內標準 GAPDH 基因之 Ct 值而得的值。

【0081】 2.結果

在人真皮乳頭細胞使棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸作用 24 小時後，測定 FGF-7 基因之表現量的變化，並將其結果表示於圖 4。於此，圖 4 中之**顯示在 $p<0.01$ 係顯著者。

【0082】 如圖 4 所示，確認出相對於人真皮乳頭細胞，使棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸（實施例 1、2）作用 24 小時，則與無添加對照群相比，FGF-7 基因表現量上升。然後，確認出增加棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之添加量，則 FGF-7 基因表現量較大於使腺苷（比較例 1）作用之情況。

[產業利用性]

【0083】 依據本發明之手段，能夠提供一種新穎的育毛劑及頭皮護理劑，其係藉由使用棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸作為屬於外用劑之育毛劑的有效成分，而具有頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛等毛中之毛幹之成長促進效果、毛幹伸長速度之提升效果及毛幹最大長度之提升效果、頭皮護理效果及真皮乳頭細胞之 FGF-7 產生促進劑。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種育毛劑，係包含棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸的外用劑。

【請求項2】 如請求項 1 所述之育毛劑，其中，棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之含量，相對於整體，係 0.001 至 20 重量%。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述之育毛劑，其中，棕櫚醯二肽-5 二胺基丁醯羥基蘇胺酸之含量，相對於整體，係 0.005 至 10 重量%。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述之育毛劑，其係用於促進毛幹生長或毛髮生長。

【請求項5】 如請求項 1 至 4 中任一項所述之育毛劑，其係使用於使毛幹伸長速度提升。

【請求項6】 如請求項 1 至 4 中任一項所述之育毛劑，其係使用於使毛幹最大長度提升。

【請求項7】 如請求項 1 至 4 中任一項所述之育毛劑，其係使用於使毛幹徑增大。

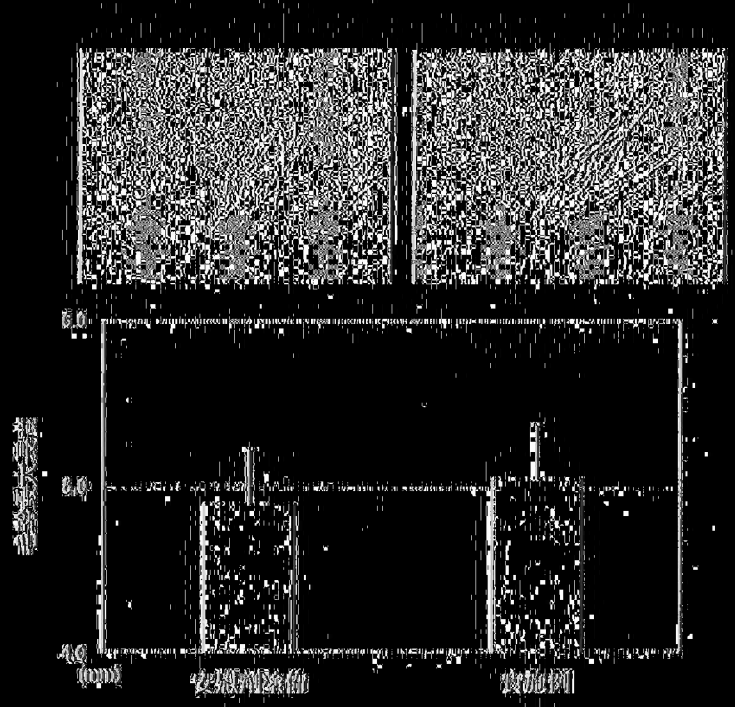
【請求項8】 如請求項 1 至 4 中任一項所述之育毛劑，其係使用於使毛髮數量增加。

【請求項9】 如請求項 1 至 8 中任一項所述之育毛劑，其係溶液。

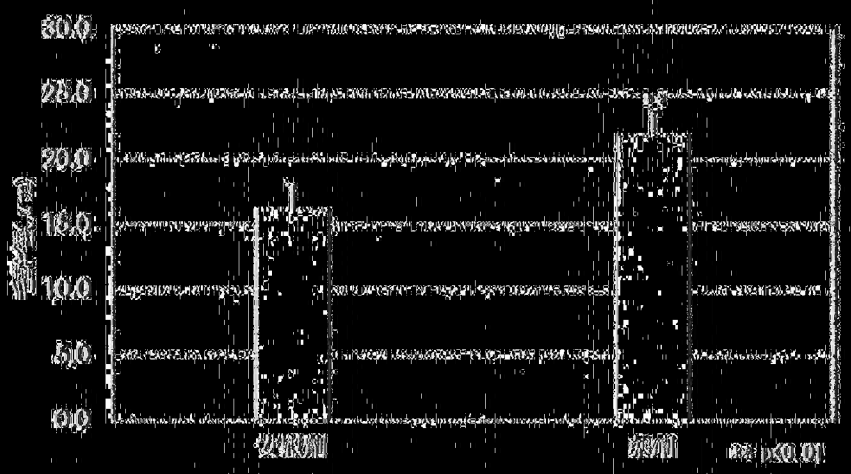
【請求項10】 如請求項 1 至 9 中任一項所述之育毛劑，其係用於頭髮、鬚毛、眉毛及/或睫毛。

【請求項11】 一種育毛方法，係包含將請求項 1 至 10 中任一項所述之育毛劑投與至對象。

【發明圖式】

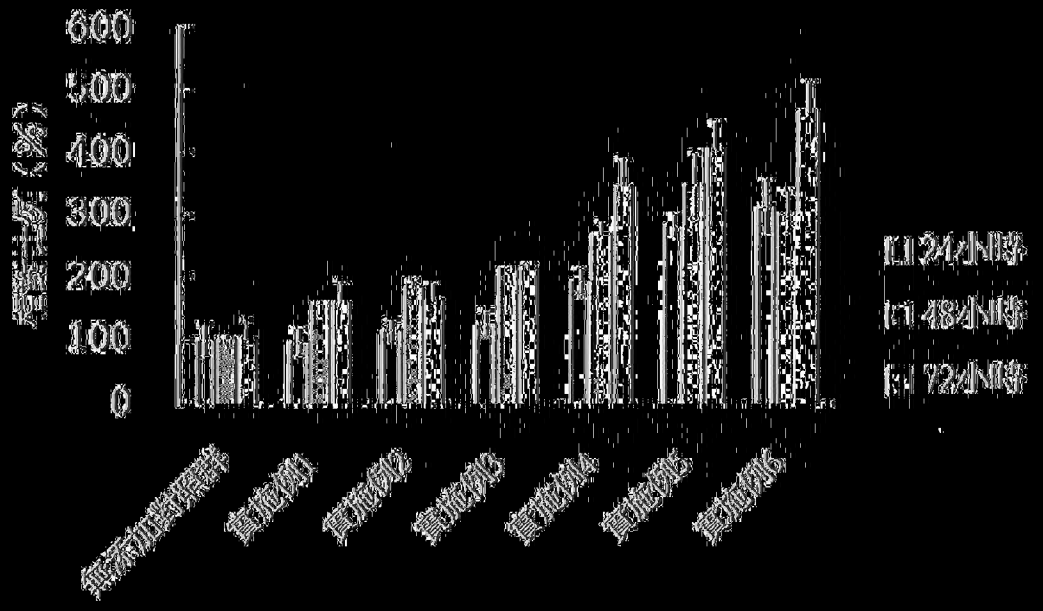


【圖1】

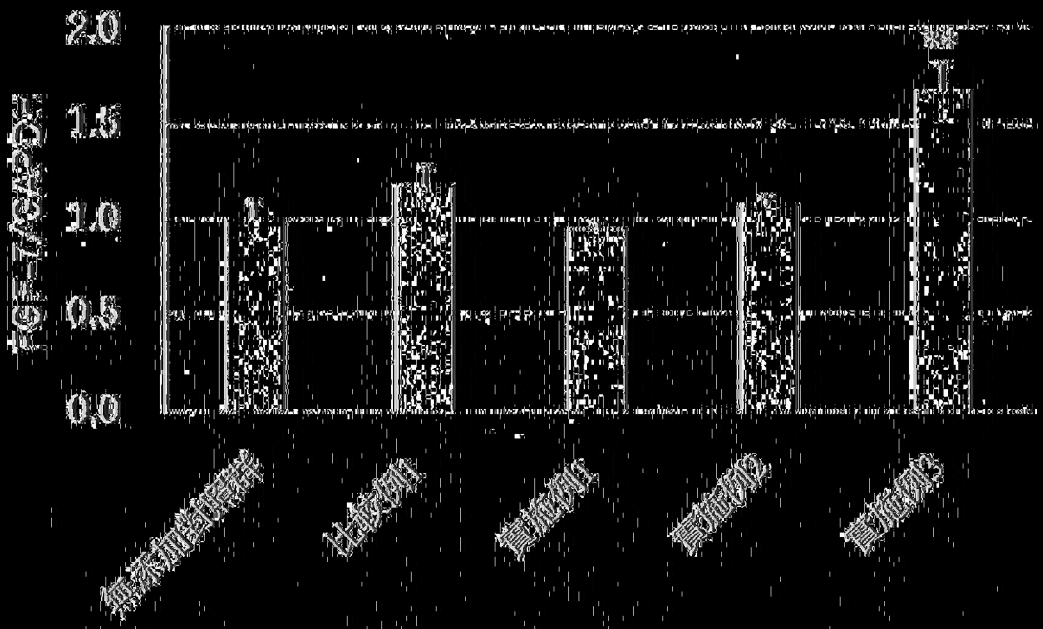


【圖2】

202228759



【图3】



**p<0.01 vs 低深加速度时

【图4】