(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 35/36

(11) 공개번호 특2002-0005193
(43) 공개일자 2002년01월17일

(21) 출원번호 10-2000-0034595
(22) 출원일자 2000년06월22일

(71) 출원인 (주)트리코진
김정철
대구 중구 동인동1가 101 경북의대 면역학교실

(72) 발명자 김정철
대구 수성구 범물2동 1336 창신아파트 103-102
김도원
대구광역시수성구수성4가화성쌍용타운104동1512호
정현주
부산광역시금정구부곡동경남한신아파트108동204호

(74) 대리인 이후동

심사청구 : 있음

(54) 백모치료제 스크리닝 방법

요약

본 발명은 백모치료제의 스크리닝방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 백모의 외측모근초 멜라닌세포도 자외선을 조사하면 활성화된다는 특성을 이용하여, 백모치료제로 스크리닝할 물질을 처리한 모낭, 상기의 물질을 처리하지 않은 모낭 및 자외선을 조사한 모낭을 기관배양액에서 배양하여, 여기에서 얻은 모낭의 조직표본을 면역조직화학염색하는 단계를 포함하는 백모치료제의 스크리닝방법에 관한 것이다. 본 발명을 이용하여 기관배양배지에 외측모근초 멜라닌세포를 활성화시킬 수 있는 각종물질을 첨가하여 백모치료제를 스크리닝할 수 있다.

대표도
도 8a

색인어
백모치료제, 스크리닝, 자외선, 모낭

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 흑모의 NaBr에 의해 분리된 소낭내의 NKI/beteb항체에 의한 많은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 2는 백모에서의 NaBr에 의해 분리된 소낭(a) 및 냉동편(b)의 NKI/beteb항체에 의한 적은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 3은 근 주위의 흑모에서의 NaBr에 의해 분리된 소낭(a) 및 냉동편(b)의 HMB45항체에 의한 적은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 4는 근 주위의 백모에서의 NaBr에 의해 분리된 소낭(a) 및 냉동편(b)의 HMB45항체에 의한 적은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 5는 흑모에서의 NaBr에 의해 분리된 소낭(a) 및 냉동편(b)의 Mel-5항체에 의한 많은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 6은 백모에서의 NaBr에 의해 분리된 소낭(a) 및 냉동편(b)의 Mel-5항체에 의한 적은 외측모근초멜라닌세포를 나타내는 사진.

도 7은 5일간 조직배양 후 흑모소낭에서의 NKI/beteb항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.

도 8은 5일간 조직배양 후 백모소낭에서의 NKI/beteb항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.

도 9는 10일간 조직배양 후 흑모소낭에서의 NKI/beteb항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.

도 10은 10일간 조직배양 후 백모소낭에서의 NKI/beteb항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.

도 11은 5일간 조직배양 후 흑모소낭에서의 HMB45항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.. 도 12는 5일간 조직배양 후 백모소낭에서의 HMB45항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.. 도 13은 5일간 조직배양 후 흑모소낭에서의 Mel-5항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.. 도 14는 5일간 조직배양 후 백모소낭에서의 Mel-5항체에 의한 외측모근초멜라닌세포의 사진. a는 대조군, b는 자외선 조사 후의 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 백모치료제 스크리닝 방법에 관한 발명으로, 더욱 상세하게는 백모의 외측모근초 멜라닌세포도 자외선을 조사하면 활성화된다는 특성을 이용하여, 백모치료제로 스크리닝할 물질을 처리한 모낭, 상기의 물질을 처리하지 않은 모낭 및 자외선을 조사한 모낭을 기관배양액에서 배양하여, 여기에서 얻은 모낭의 조직표본을 면역조직화학염색하는 단계를 포함하는 백모치료제의 스크리닝방법에 관한 것이다.

일반적으로, 종래의 백모치료체를 스크리닝하는 방법으로는 미국특허 제5,510,113호에 기재된 것처럼 기니아 피그의 오른쪽과 왼쪽측면을 면도시킨 후 이들 중 한쪽 측면에 테스트할 물질이나 대조군물질을 처리하고, 다른 측면에는 아무런 처리도 하지 않은 상태에서 자외선을 첫 날은 5분, 둘째 날 10분, 셋째 날 15분, 넷째 날과 다섯째 날은 20분 조사하고, 마지막 조사 후에 12일 지난 후에 동물을 죽여서, 처리하고 조사한 측면과 처리하지 않고 조사한 측면에서 피부조각을 제거하여 조직학적 검사를 하는 방법이 알려져 있다.

그러나 이러한 방법은 과정이 복잡하고, 시간도 많이 소요되는 등의 문제점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 백모치료제를 스크리닝하는 새로운 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 백모치료제로 스크리닝할 물질을 처리한 모낭을 배양한 다음 상기에서 얻은 모낭의 조직표본을 면역조직화학염색하는 단계를 포함하는 백모치료제의 스크리닝방법을 제공한다.

본 발명의 발명자들은 자외선을 조사한 모낭에서 백모의 외측모근초 멜라닌세포도 자외선을 조사하면 활성화된다는 특성을 알아냈고, 이를 이용하여, 자외선을 조사한 모낭과 백모치료제로 스크리닝할 물질을 처리한 모낭의 면역조직화학적 특성이 유사한 경우 본 물질이 백모치료제로 사용할 수 있다는 것을 검색할 수 있다.

본 발명에서 의미하는 " 모낭" 은 넓게 해석하면 모간, 내모근초, 외모근초, 모유두로 이루어져 있으나, 좁게 해석하면 내모근초와 외모근초를 의미한다. 활동성 멜라닌세포는 주로 모간의 가장 하부(bulb)에 위치하며 외모근초에는 비활동성 멜라닌세포가 존재한다.

또, 본 발명에 사용되는 모낭은 모낭의 전부 또는 일부도 가능하며, 모낭의 하부 2/3정도가 바람직하며, 흑모 또는 백모 모낭이 가능하지만, 백모 모낭이 더욱 바람직하다.

또한 본 발명의 면역조직화학에 사용되는 항체는 NK1/beteb, HMB-45 및 Mel-5으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 항체가 바람직하다.

이하, 본 발명을 설명한다.

인체 모낭하부의 멜라닌세포는 모구(hair bulb)의 멜라닌세포와 외측모근초(outer root sheath, ORS)의 멜라닌세포로 구분할 수 있다. 모구의 멜라닌세포는 멜라닌을 생산하는 활성화 상태의 세포인데 반해 외측모근초의 멜라닌세포는 dopa 음성이며 toluidine blue 염색시 투명세포로 나타나는 멜라닌 결핍성 멜라닌세포(amelanotic melanocyte)이다(Staricco RG. J Invest Dermatol 1959;33:295-7). 이 세포는 그 성상이 표피나 모구의 멜라닌세포와는 달라 정상 상태에서는 멜라닌을 합성하지 않지만 박피술(dermabrasion)이나 자외선 조사 또는 약물에 의해 활성화되어 멜라닌을 합성하게 된다(Staricco RG. J Invest Dermatol 1962;36:99-104;Staricco RG, Miller-Milinska A. J Invest Dermatol 1962;36:163-4). 임상에서는 특히 백반증이 치료되어 가는 과정에서 모낭 주위를 중심으로 색소 침착이 시작되는 것으로 인하여 외측모근초 멜라닌세포의 역할이 주목을 받게 되었다. 이 세포의 활성화, 증식, 분화 등에 대해서는 계속 연구중이나 아직까지 이 세포의 생물학적 성상과 특징은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 최근 전멜라닌소체(premelanosome), 멜라닌소체(melanosome) 및 티로시나제(tyrosinase)와 관련된 항원 등을 이용한 면역조직화학염색을 통해 외측모근초 멜라닌세포의 특징을 관찰한 보고를 위시하여 이 세포의 세포생물학적 성상을 규명하려는 노력이 시도되고 있다.

노화성 백모 (gray hair)는 노화과정에서 나타나는 필연적인 결과로 인식되고 있으나 그 자세한 발생기전은 알려져 있지 않다. 백모의 경우의 경우 모구 멜라닌세포는 감소하여 결국은 사라지지만 외측모근초에는 여전히 비활성화 상태의 멜라닌세포가 일부 남아있음이 보고되어 있다(Takada K, Sugiyama K, Tamamoto I, Takeuchi T. J Invest Dermatol 1992;99:629-33;Horikawa T, Norris DA, Johnson TW, et al. J Invest Dermatol 1996;106:28-35).

자외선 조사와 외측모근초 멜라닌세포와의 관계를 살펴보면 색소를 가진 정상적인 모발에서는 외측모근초 멜라닌세포가 자외선조사 후 활성화 되는 것으로 알려져 있고(Ortonne JP, MacDonald DM, Micoud A, Thivolet J. Br J Dermatol 101-1-12, 1979), 백반증의 자외선 치료시 외측모근초 멜라닌세포가 활성화되면서 표피로 이동함도 보고되어 있으나(Cui J, Shen LY, Wang GC. J Invest Dermatol 97:410-416, 1991), 노화성백모에서 자외선에 의한 외측모근초 멜라닌세포의 활성화 여부는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

Philpott 등(Philpott MP, Green MR, Kealey T. J Cell Sci 1990;97:463-471)이 1990년 처음으로 사람의 생장기 모낭을 실험관 내에서 인체에서와 같은 속도로 수일간 배양하는데 성공한 이래 모낭 기관배양에 관한 연구는 상당히 활발하다. 배양한 기관은 배양 세포보다 생체와 더욱 가깝기 때문에 모발의 성상을 연구하는데 유리한 점이 많다.

따라서 본 발명에서는 기관배양한 모낭을 이용하여 외측모근초 멜라닌세포의 성상을 관찰하고 이를 활성화시키는 방법과 활성화시키는 물질을 스크리닝하는 방법을 개발하여 앞으로 백모치료 기술개발 연구에 응용할 수 있는 모델로 이용하고자 한다.

본 발명의 발명자들은 자외선 B 조사가 기관배양한 백모의 외측모근초 멜라닌세포 활성화에 미치는 영향을 조사함으로써 백모의 세포생물학적 특성을 알아내고 이를 이용하여 백모치료제를 스크리닝하는 방법을 개발하였다.

본 발명에서는 NKI/beteb, HMB45 및 Mel-5 단클론 항체를 이용하여 외측모근초 멜라닌세포의 특징을 관찰하였다. NKI/beteb 항체는 전멜라닌소체와 전멜라닌 유사소체의 100-, 7-kD 당단백과 결합하며, HMB45는 흑색종 단클론 항체로서 10kD 멜라닌소체와 관련된 세포질항원과 결합한다. NKI/beteb과 HMB45는 gp100-c1인 동일한 유전자에서 생산되는 것이 밝혀졌으며, NKI/beteb과 HMB45가 염색양상이 다른 것은 당화의 차이나 선택적인 유전자의 재조합으로 똑같은 유전자에서 생성되나 인지하는 항원이 달라진 것으로 생각되고 있다. Mel-5는 흑색종 세포주 유래의 항체로, 악성 흑색종 세포, 모반세포 및 멜라닌세포에 발현되는 색소관련성 당단백에 대한 항체이다. 이것의 항원은 75-kD 단백질로 타이로시네이즈 관련 단백질[tyrosinase related protein-1(TRP-1)]으로 추측되고 있으며 특히 제3기와 4기 멜라노좀에서 높게 발현된다.

외측모근초 멜라닌세포의 세포생물학적 특성을 살펴보면, 전멜라닌소체는 가지고 있으나 멜라닌소체 및 티로시나제는 가지고 있지 않은 비활성화 상태의 멜라닌세포라는 것을 Horikawa등이 관찰하였다. 정상모의 경우 외측모근초 멜라닌세포는 전멜라닌소체나 전멜라닌소체와 관련된 물질은 갖고 있지만 멜라닌소체와 관련된 물질은 갖고 있지 않으므로 NKI/beteb에는 염색되고 HMB45에는 염색되지 않는 것으로 보고되고 있다(서용원, 이혜진, 박영립, 정 현, 임승현, 황규왕. 대피연지 1998;5:63-68).

노화성 백모에서의 멜라닌세포의 존재에 대한 연구는 아직까지 충분치 못한데, Takada 등은 외측모근초 멜라닌세포에서는 in situ hybridization으로 티로시나제 mRNA의 존재를 증명하였으나, 모구에서는 나타나지 않는다고 보고하였으며 면역조직화학법으로도 외측모근초에는 티로시나제 양성 멜라닌세포가 여전히 남아 있다는 것을 보고하였다. 또한 Horikawa 등은 NKI/beteb 염색시에도 백모의 외측모근초 멜라닌세포는 양성으로 나타났으나 모구에서는 음성이라고 보고하였다. 본 발명에서는 백모의 외측모근초에서도 NKI/beteb과 Mel-5 양성세포를 상당수 관찰할 수 있었으며 HMB45도 흑모에서와 마찬가지로 모구인접부위에서 관찰할 수 있었다.

인체모낭은 쉽게 접할 수 있는 기관이지만 세포성장의 조절, 간엽조직과 상피조직의 상호작용(mesenchymal-epithelial interactions), 표피의 분화와 호르몬의 작용, 멜라닌세포 분화와 활성화 등을 포함한 많은 생물학적 현상이 아직 밝혀지지 않고 있다. 모든 모낭은 전신적 요인에 의해 조절될 수 있는 개개의 내적 리듬을 가지고 있으므로 모낭 성장주기는 종간, 동종에서는 부위간, 같은 부위에서는 모낭의 형태에 따라 다르다고 추측된다. 모낭의 각종 생물학적인 현상을 밝혀내기 위한 방법의 하나로 여러 연구가들이 모낭배양을 시도하고 있으나 아직 정립되지 못한 실정이다. Li 등(Li L, Margolis LB, Paus R, Hoffman RM. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:8764-8769)은 보다 생체내와 가까운 조건에서 인체의 모낭을 배양하기 위하여 몇 개의 모낭이 들어있는 조직절편을 배지에 충분히 적셔진 gel-form 위에 얹어서 배양하는 조직배양법을 시도한 바 있다.

그러나 모낭배양은 모낭을 채취한 부위, 배양온도, 산소의 양과 혈청, 표피성장인자, 인슐린, 부신피질 호르몬과 같은 배지에 첨가하는 성장인자 등에 따라 영향을 많이 받는다.

본 발명은 기관배양 배지에 외측모근초 멜라닌세포를 활성화시킬 수 있는 각종 물질을 첨가하여 백모치료제로 사용할 가능성이 있는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명에 사용된 인체모낭은 모발이식술을 시행한 백모를 가진 40-50대 남성 5명의 후두부에서 채취한 흑모와 백모의 모낭을 이용하였으며, 대상자는 전체 두발 중 백모의 비율이 1/2 미만이고 백모가 나타난지 10년 미만인 특별한 전신질환이 없는 정상인이었다. 모낭채취시 모낭의 전체 또는 일부도 가능하며, 바람직하게는 하부 2/3가 바람직하다.

모낭배양시 백모치료제로 사용될 수 있는 물질을 첨가하여 배양한다. 또 기관배양액으로는 페니실린(50ug/ml), 스트렙토마이신(50IU/ml)(이상 Gibco, New York NY, USA)이 들어있는 William E 배지(Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA)을 기본배지로 하였으며, 기본배지에 인슐린(10ug/ml)과 하이드로코티존(10ng/ml)(이상 Gibco, New York NY, USA)을 섞어 pH가 7.3되게 배지를 만들었다. 배양온도 37℃가 가장 바람직하고, 배양기간은 일반적으로 6일 정도 배양하고, 10일 정도까지 배양하는 경우도 있다.

자외선 B광원으로는 자외선 치료기 Waldmann 8001K (Waldmann Co., 독일)를 사용하였다.

또,면역조직화학염색에 사용된 항체로는 전멜라닌소체(premelanosome)과 그것의 유사구조의 100-kD 및 7-kD항원과 결합하는 NKI/beteb(Monosan, San Francisco CA, USA); 10-kD 멜라노좀 관련 항원과 결합하는 HMB45(DAKO Corporation, Carpinteria CA, USA); 및 75-kD 색소관련 당단백질 항원과 결합하는 Mel-5 (Signet Laboratories, Dedham MA, USA)을 사용하였고, DAKO LSAB II universal kit (DAKO Corporation, Carpenteria DA, USA)를 사용하였다.

이하, 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다.

실시예

a) 모낭채취 및 분리

모발이식술시 후두부에서 모낭이 포함된 두피를 채취한 다음 주위조직을 최대한 제거하여 흑모와 백모의 모낭을 분리하고 피지선 부착부위를 확대경으로 확인하면서 모낭의 상부를 제거하고 하부 1/2을 취하였다.

b) 모낭배양 및 자외선 B 조사

모낭을 기관배양액에서 하루동안 배양한 후 자외선B 100mJ을 조사하고 다시 4일간 혹은 9일간 추가로 배양한 다음 자외선 조사군과 자외선을 조사하지 않은 대조군 을 각각 비교하였다.

c) 면역조직화학염색

20㎛ 두께로 만든 냉동절편 혹은 NaBr 분리 모낭의 조직 표본을 콜드 아세톤에 고정시킨 후 DAKO LSAB II universal kit 에 포함된 시약을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 먼저 3% H_2O_2로 처리하여 내재성 과산효소의 활성을 억제시키고 단백질과의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 8% 우태아혈청으로 처리하였다. 표본을 NK1/beteb, HMB-45, Mel-5 모두 각각 1:25로 희석한 일차 항체에 실온에서 1시간 동안 반응시키고 바이오틴이 붙은 항-마우스 면역글로불린에 45분간 반응 시켰다. 스트렙토아비딘-퍼욱시데이즈 복합체에 30분간 반응시킨 후, 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)로 5분간 발색시켰다.

d) 판독

외측모근초 멜라닌세포가 양성으로 염색될 경우에는 세종류의 항체 어느 것이나 수지상 혹은 불규칙한 돌기를 갖은 둥근모양의 세포로 관찰되었다. 광학현미경 100배에서 10시야를 관찰하여 그 평균을 표 1과 같은 기준으로 표기하였다. 즉 모구 근처에서만 양성을 보이는 세포들이 있는 경우를 ±로 표기하였고 양성세포 10개 미만 (수개 혹은 소수)을 +로, 10개 이상(다수)을 ++로 구분하였다.

그 결과는 다음과 같았다.

기관배양전 면역조직화학염색의 결과는전구멜라노좀에 대한 항체인 NKI/beteb 염색시 흑모에서는 NaBr 분리모낭에서 다수의 양성세포들을 관찰할 수 있었고(도 1), 백모에서도 NaBr 분리모낭에서는 소수의 양성세포를 관찰할 수 있으며(도 2a) 동결절편에서는 양성세포들을 좀 더 잘 관찰할 수 있었다(도 2b).

멜라노좀에 대한 항체인 HMB45 염색시 흑모에서는 NaBr 분리모낭에서 양성세포들을 거의 관찰 할 수 없었으나(도 3a), 동결절편에서는 모구 근처에서 양성세포들을 관찰할 수 있었다(도 3b). 백모에서도 모양이 뚜렷하지는 않으나 소수의 양성세포들을 관찰할 수 있었고(도 4a), 동결절편으로 이를 확인할 수 있었다(도 4b).

색소관련 당단백에 결합하며 TRP-1에대한 항체로 간주되는 Mel-5 염색 소견은 흑모에서는 NaBr 분리모낭에서 양성세포들이 소수 관찰되며(도 5), 백모에서도 양성세포를 관찰할 수 있었다(도 6).

이를 종합하여 흑모와 백모를 비교해 보면 표 1과 같다. 기관 배양 전 외측모근초의 멜라닌세포는 NKI/beteb으로 염색하면 흑모에서는 다수 볼 수 있었으며 백모에서도 소수 관찰할 수 있었다. HMB-45 로 염색하면 모구 인접에서만 관찰할 수 있었으며 Mel-5 염색에서는 흑모와 백모 모두 외측모근초에서 비슷한 정도로 수 개씩 관찰할 수 있었다.

[표 1] 배양 전 흑모 및 백모 외측모근초의 멜라닌세포의 면역화학적 성질

	흑모	백모
NKI/beteb	++	+
HMB-45	±	±
Mel-5	+	+

한편 기관배양후 면역조직화학염색의 결과를 살펴보면, NKI/beteb항체를 사용한 경우, 배양 5일 후 흑모를 관찰한 결과 대조군에서는 양성세포들을 다수 관찰할 수 있었으며(도 7a), 자외선B 조사군에서는 양성세포의 수가 더욱 증가된 것을 관찰할 수 있었다(도 7b). 백모에서 대조군에서는 드물기는 하나 양성세포들을 관찰할 수 있었으며(도 8a), 자외선B 조사군에서는 다수로 증가한 것을 볼 수 있었다(도 8b). 또한, 배양 10일 후에는 흑모에서 대조군에서는 양성세포들을 다수 관찰할 수 있었고(도 9a), 자외선B 조사군에서는 양성세포 수와 함께 수지상 돌기(dendritic process)도

증가한 것을 관찰할 수 있었다(도 9b). 백모에서도 대조군에서는 모구 근처에서만 소수의 양성세포들이 보이나(도 10a), 자외선B 조사군에서는 다른 부위에서도 양성세포의 수가 증가된 양상을 관찰할 수 있었다(도 10b).

NKI/beteb 염색결과를 종합해 보면 표 2와 같다. 배양 5일째 흑모에서는 대조군에 비해 자외선을 조사한 경우 양성세포의 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 백모의 경우에도 자외선을 조사한 후에 흑모와 유사한 변화를 관찰할 수 있었다. 10일째에도 비슷한 변화를 볼 수 있었다.

[표 2] 모낭 기관배양에서 NKI/beteb항체에 의한 외측모근초의 멜라닌세포

	흑모		백모	
	대조군	UVB조사	대조군	UVB조사
5일	++	++*	+	++
10일	++	++*	±	+

표 2에서 *는 숫자가 증가된 것을 의미한다.

또 HMB-45항체를 사용한 경우,배양 5일후 흑모를 관찰한 결과 대조군에서 양성 세포를 수개 볼 수 있었고(도 11a), 자외선B 조사군에서도 큰 변화는 보이지 않았다(도 11b). 백모에서 대조군에서는 모구근처에서만 소수의 양성세포를 관찰할 수 있었으나(도 12a), 자외선B 조사한 후에는 다른 부위에서도 양성세포를 관찰할 수 있었으며(도 12b), 배양 10일후에는 배양 5일째와 비슷한 소견을 볼 수 있었다.

HMB45 염색결과를 종합하면 표 3과 같다. 즉 흑모의 경우 대조군과 자외선B 조사군을 비교하였을 때 양성세포의 수가 비슷하게 관찰되었고, 백모의 경우에는 대조군에서는 모구 주위에서만 관찰되었으나 자외선B 조사군에서는 다른 부위에서도 양성세포가 관찰되었다.

[표 3] 모낭 기관배양에서 HMB-45항체에 의한 외측모근초의 멜라닌세포

	흑모		백모	
	대조군	UVB조사	대조군	UVB조사
5일	+	+	±	+
10일	+	+	±	+

또한 Mel-5항체를 사용한 결과를 살펴보면배양 5일후 흑모에서 대조군에서는 많은 양성세포들이 관찰되었으며(도 13a), 자외선B 조사군에서는 더욱 증가된 소견을 보였다(도 13b). 백모에서도 대조군에서 양성세포들이 소수 보였으며(도 14a), 자외선B 조사 후에도 전체적으로 볼 때 대조군과 비슷한 소견을 볼 수 있었으며(도 14b), 배양 10일후에는 배양 5일째와 비슷한 소견을 보였다.

Mel-5 염색결과를 종합하면 표 4와 같다. 즉 흑모의 경우 자외선B를 조사한 후에 양성세포의 수가 증가된 것을 알 수 있었으나 백모의 경우에는 큰 변화가 없었다.

[표 4] 모낭 기관배양에서 Mel-5항체에 의한 외측모근초의 멜라닌세포

	흑모		백모	
	대조군	UVB조사	대조군	UVB조사
5일	++	++*	+	+
10일	++	++*	+	+

표 4에서 *는 수가 증가한 것을 의미한다.

발명의 효과

본 발명에서 백모는 흑모에 비해 활성화 된 외측모근초 멜라닌세포의 수가 감소되어 있기는 하지만 완전히 없어진 상태는 아니며 흑모 뿐만 아니라 백모의 외측모근초 멜라닌세포도 자외선 조사시 정도의 차이는 있으나 멜라닌세포가 활성화된다는 사실을 관찰할 수 있었고, 이러한 성질을 이용하여 기관배양 배지에 외측모근초 멜라닌세포를 활성화시킬 수 있는 각종 물질을 첨가하여 백모치료제로 사용할 가능성이 있는 물질을 스크리닝하는 방법에 적용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

a) 백모치료제로 스크리닝할 물질을 처리한 모낭을 배양하는 단계 ; 및

b) 상기의 배양한 모낭의 조직표본을 면역조직화학염색하는 단계를 포함하는 백모치료제의 스크리닝방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 비교군으로 자외선을 조사한 모낭및/또는 자외선을 조사하지 않은 모낭을 배양하는 것을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 백모치료제의 스크리닝방법.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기의 모낭은 백모 모낭인 것을 특징으로 하는 백모치료제의 스크리닝방법.

청구항 4.

제 1 또는 제 2 항에 있어서,

상기의 모낭은 모낭의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는 백모치료제의 스크리닝방법.

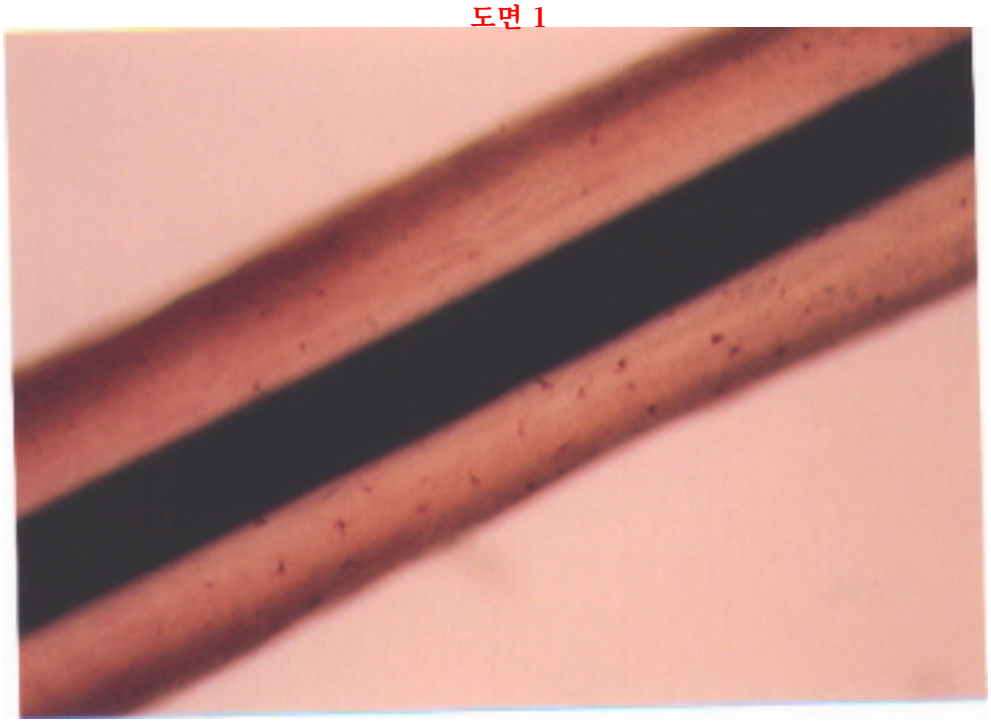
청구항 5.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기의 면역조직화학에 사용되는 항체는 NK1/beteb, HMB-45 및 Mel-5으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 항체인 것을 특징으로 하는 백모치료제의 스크리닝방법.

도면

도면 1



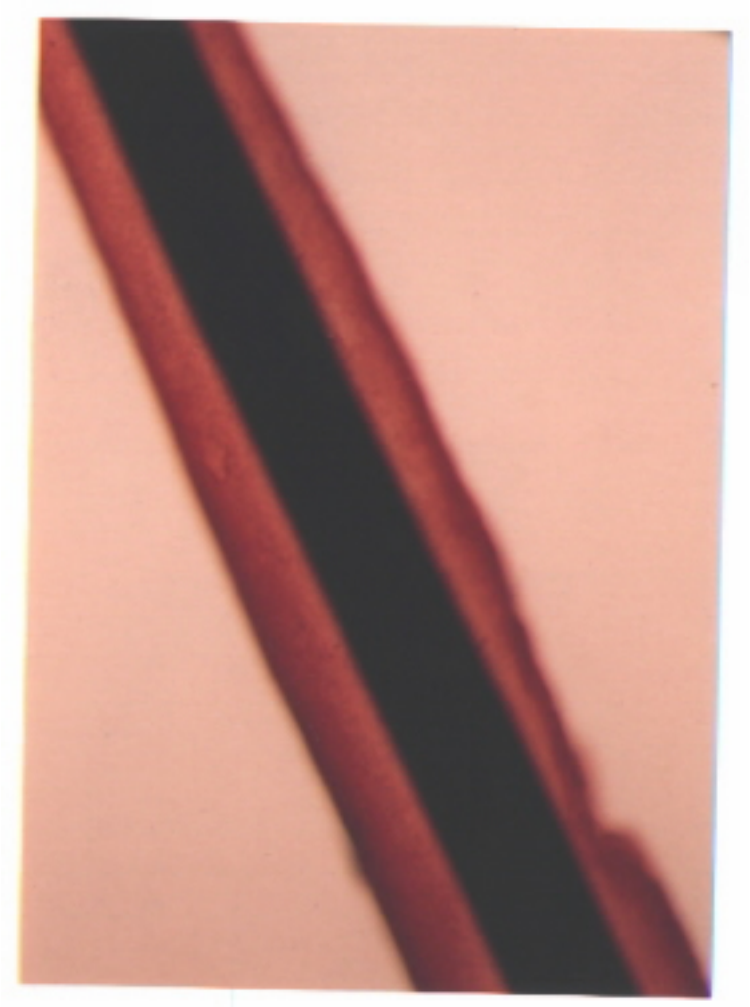
도면 2a



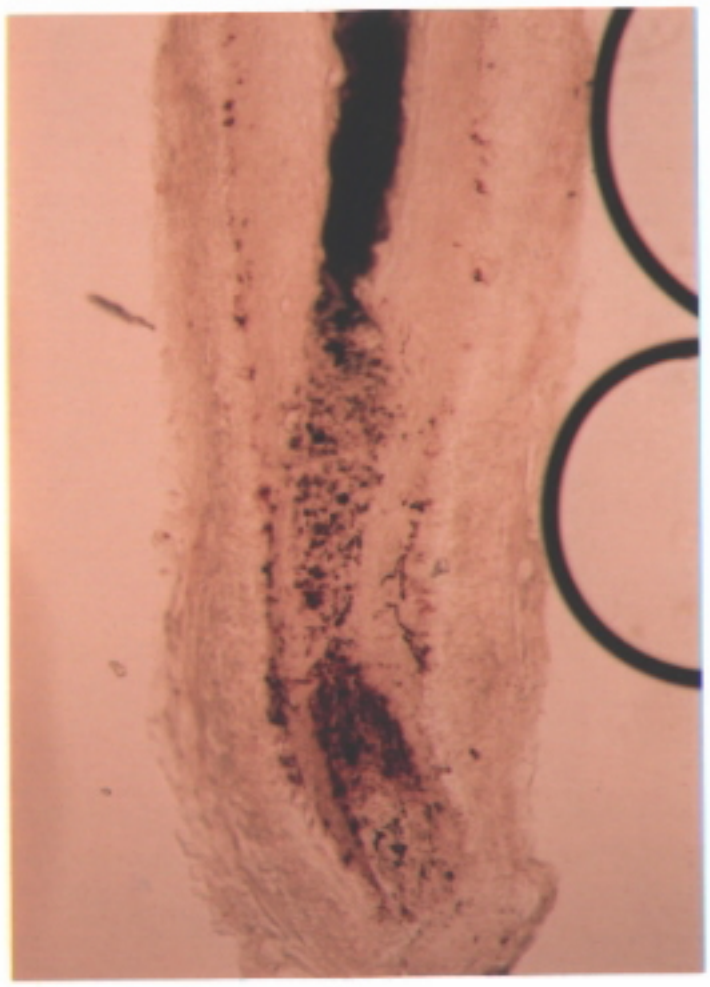
도면 2b



도면 3a



도면 3b



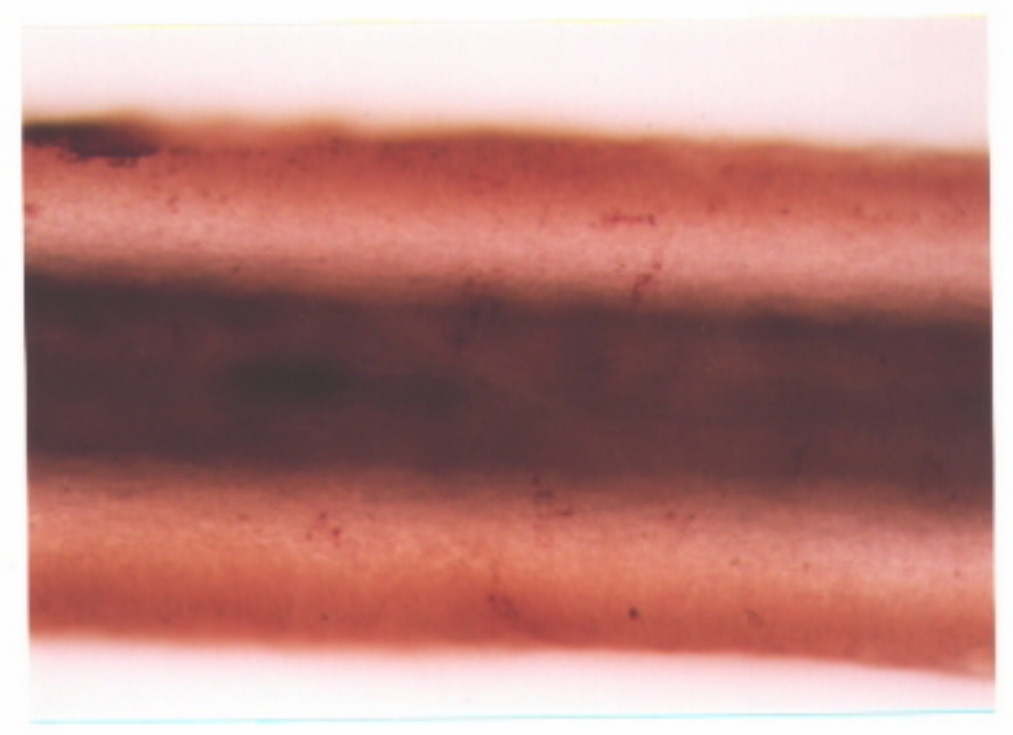
도면 4a



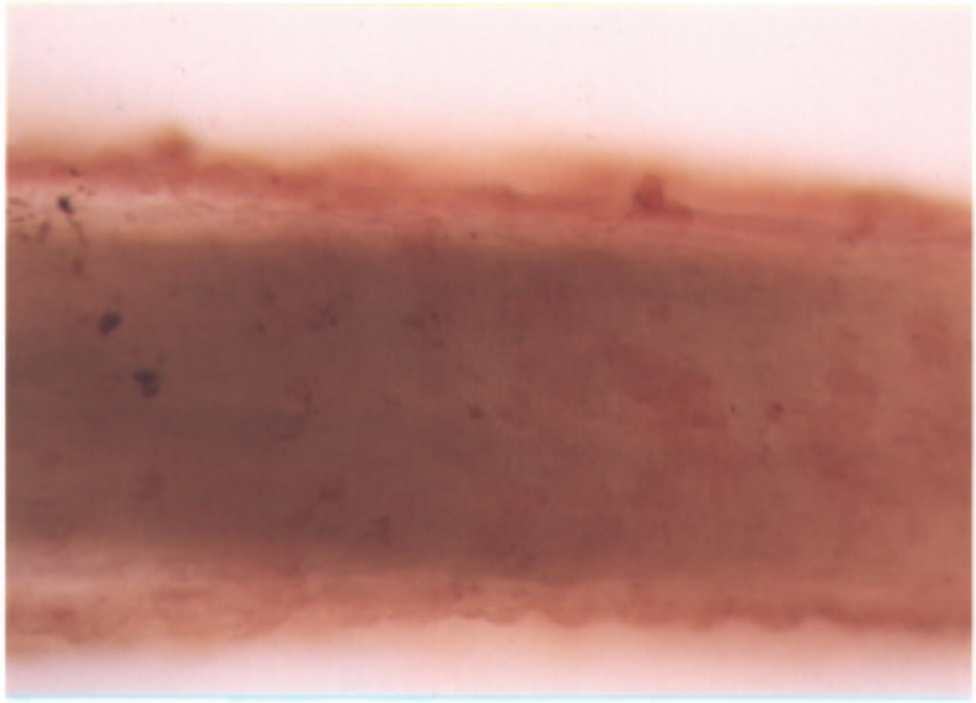
도면 4b



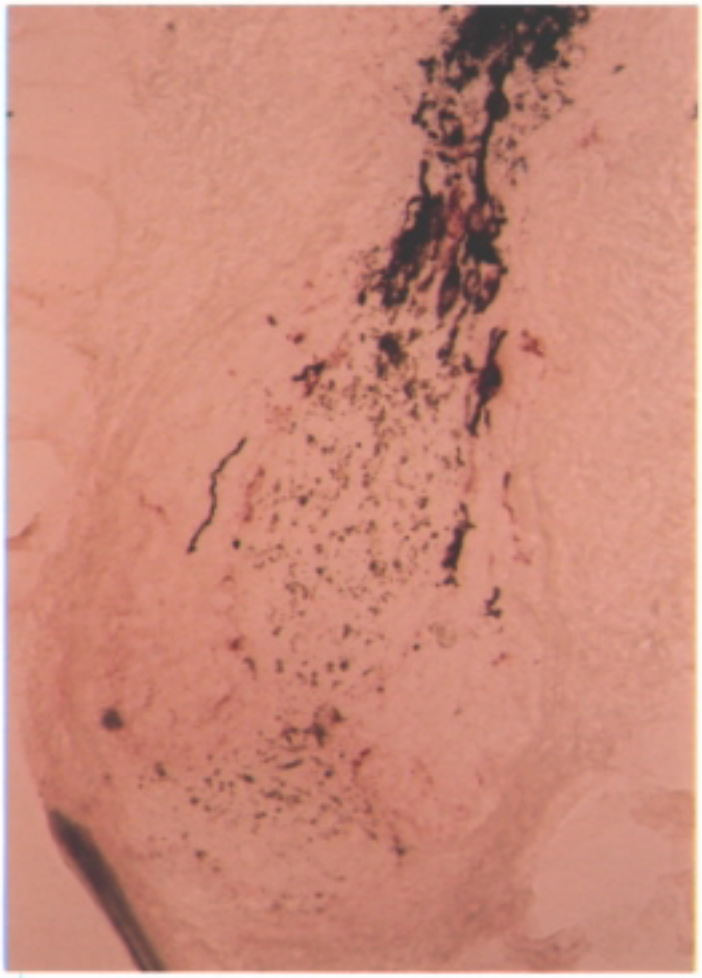
도면 5



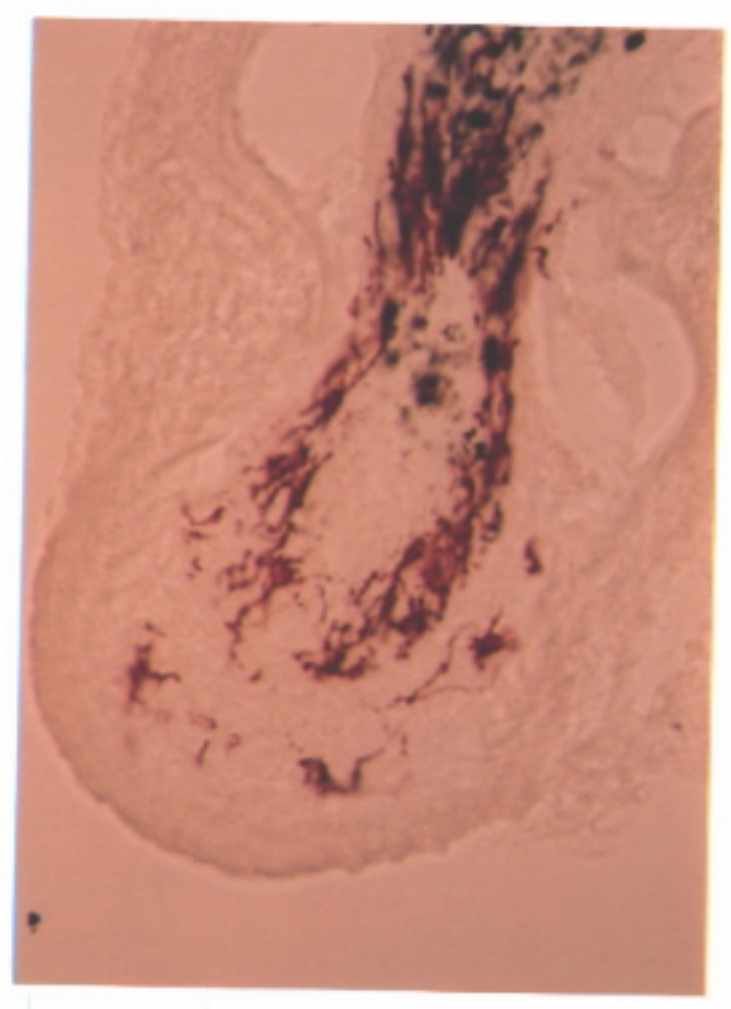
도면 6



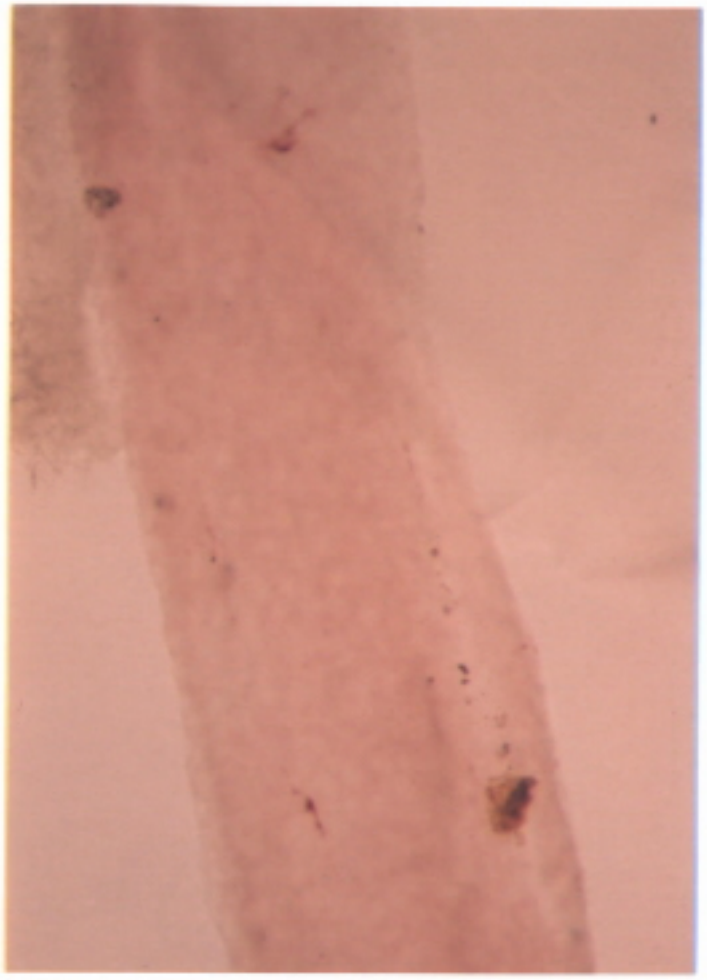
도면 7a



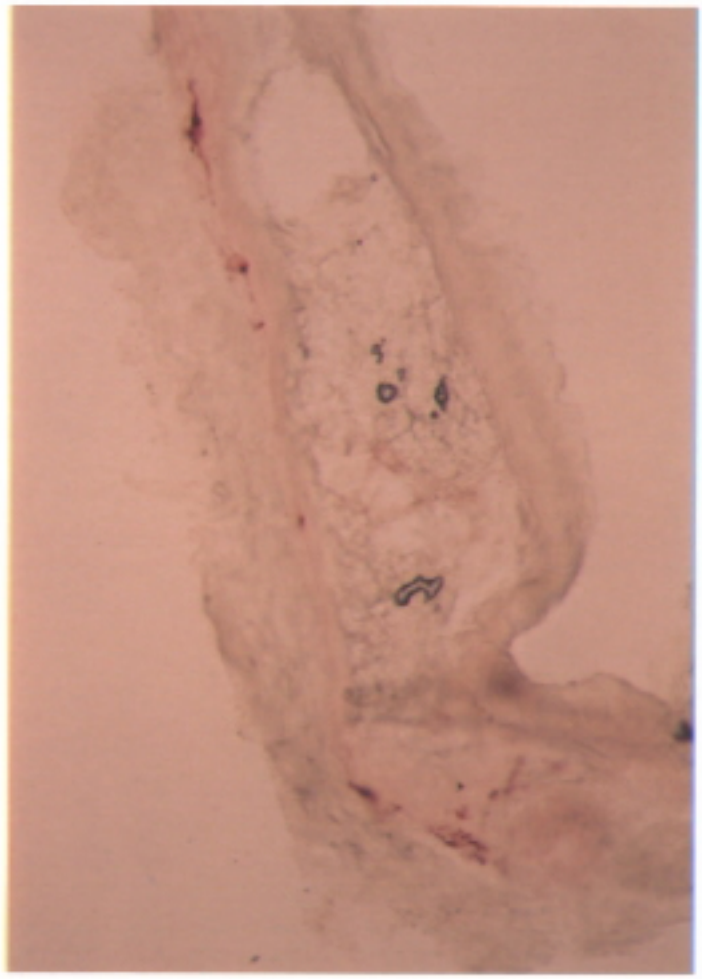
도면 7b



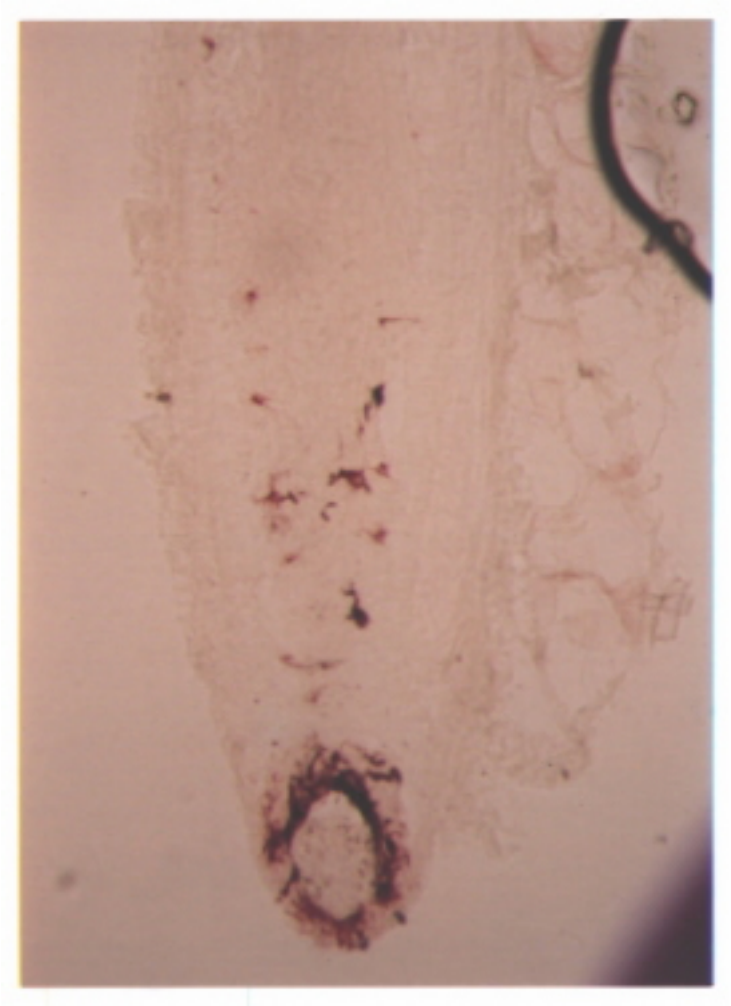
도면 8a



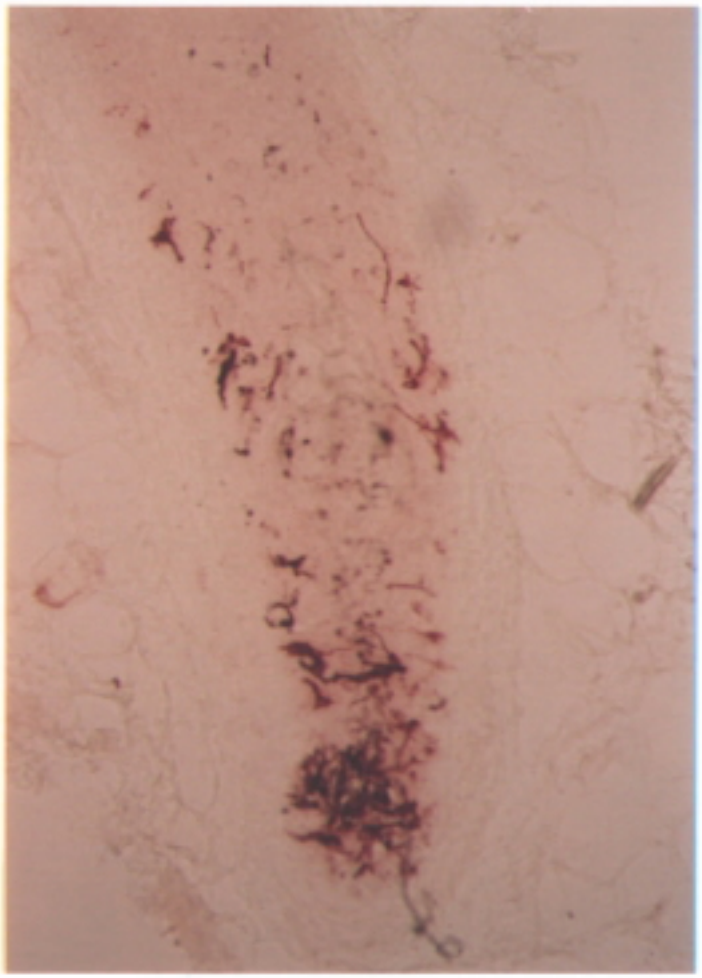
도면 8b



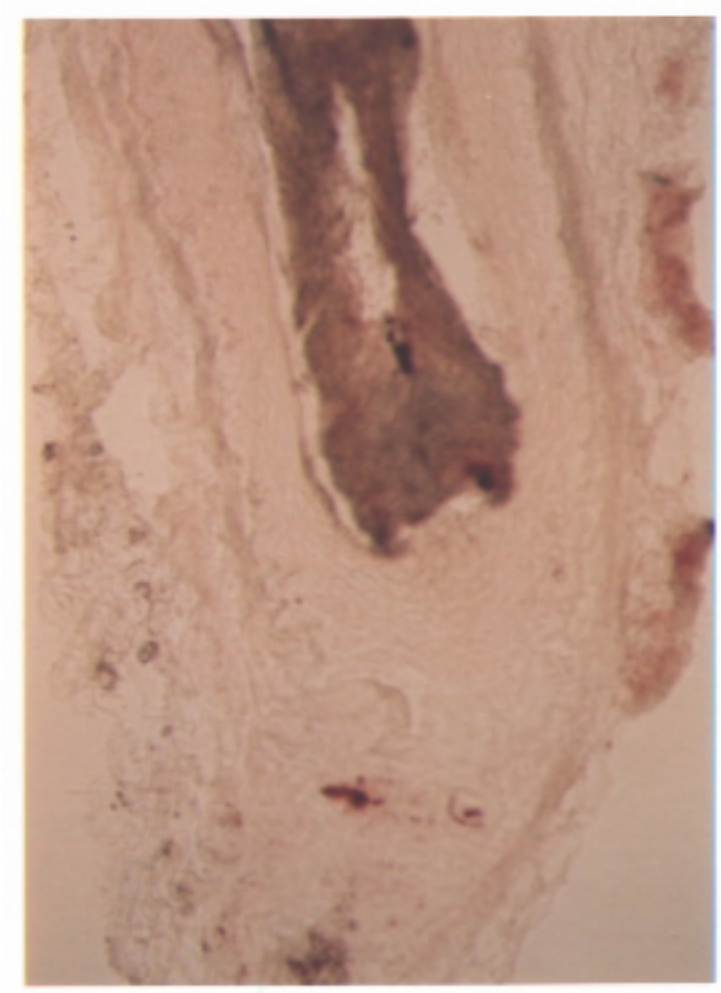
도면 9a



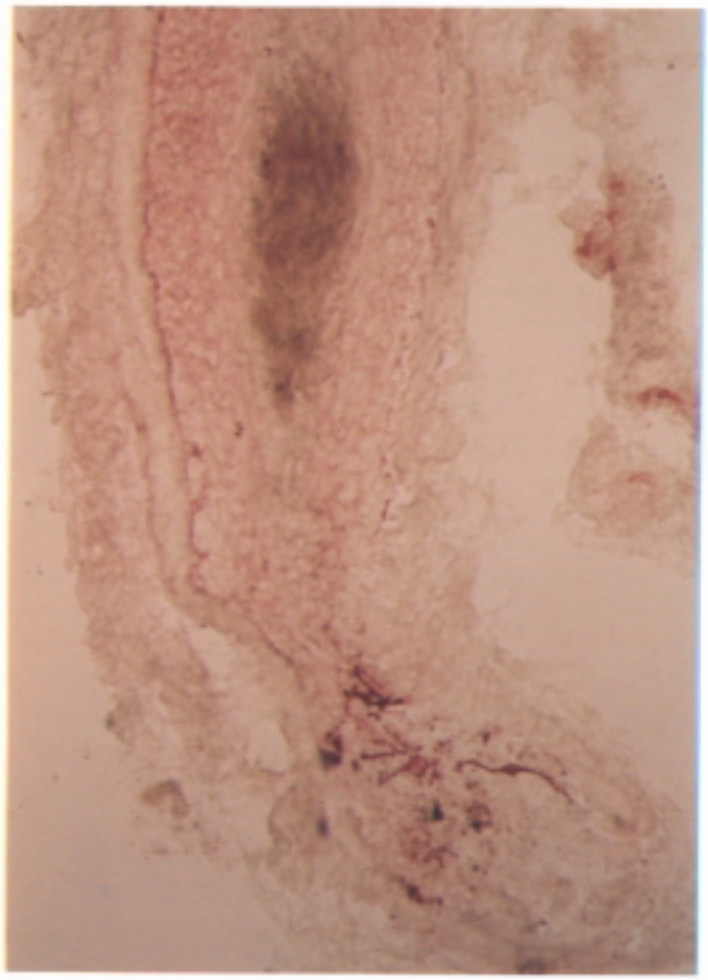
도면 9b



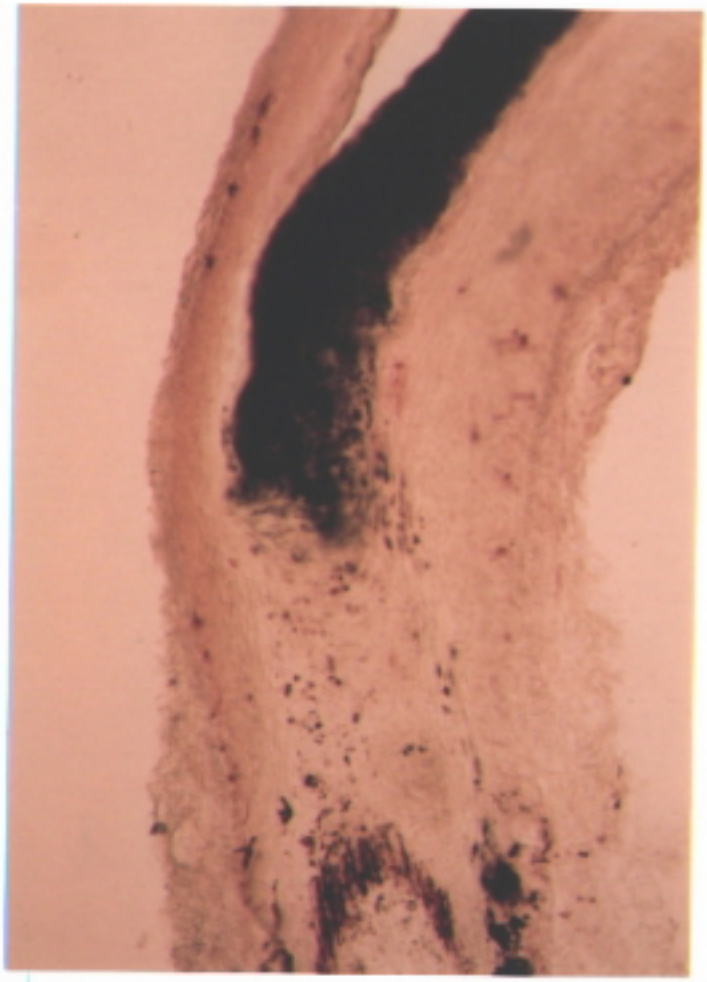
도면 10a



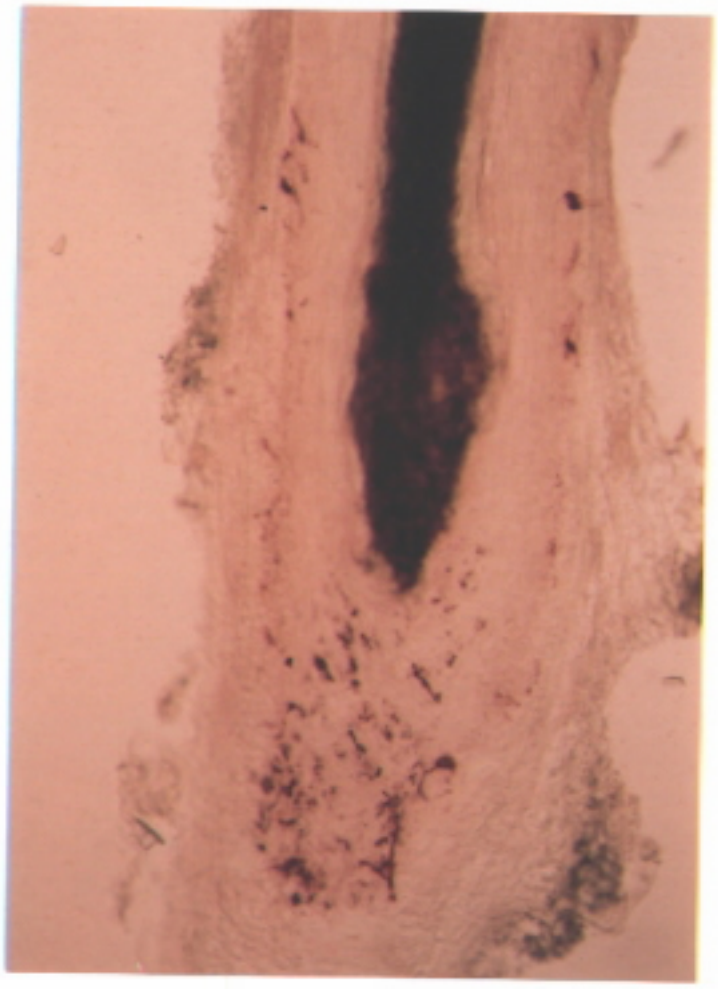
도면 10b



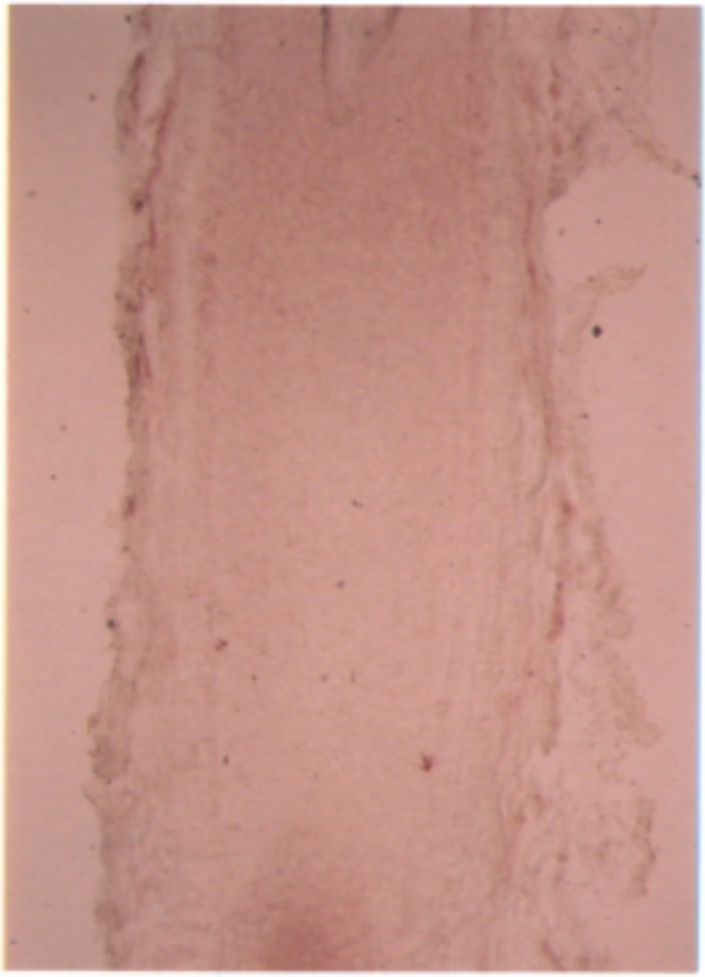
도면 11a



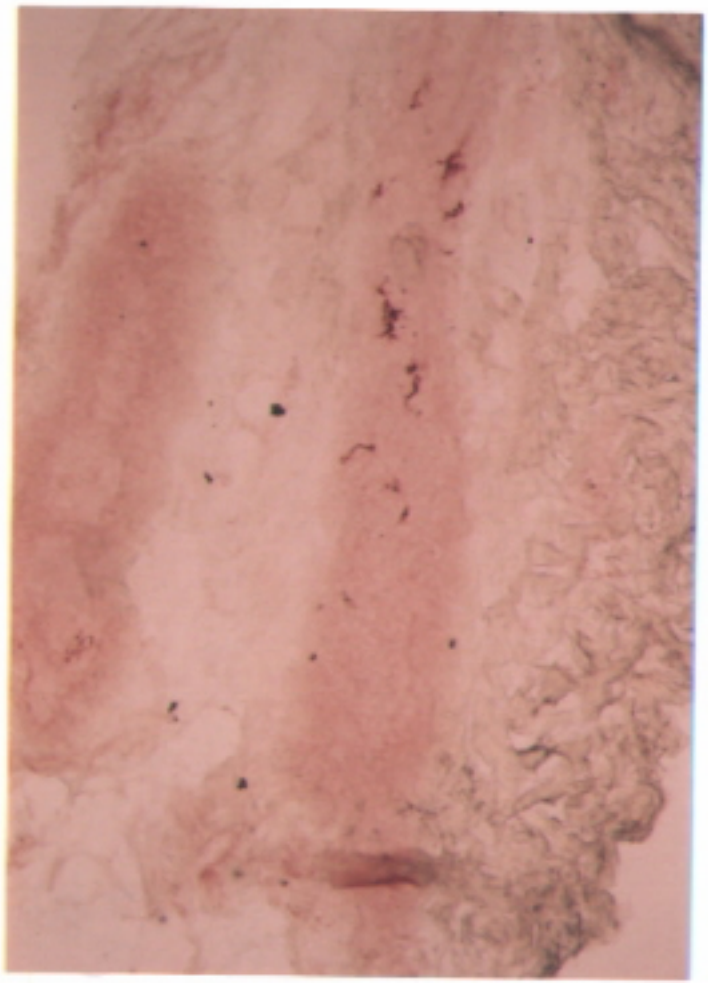
도면 11b



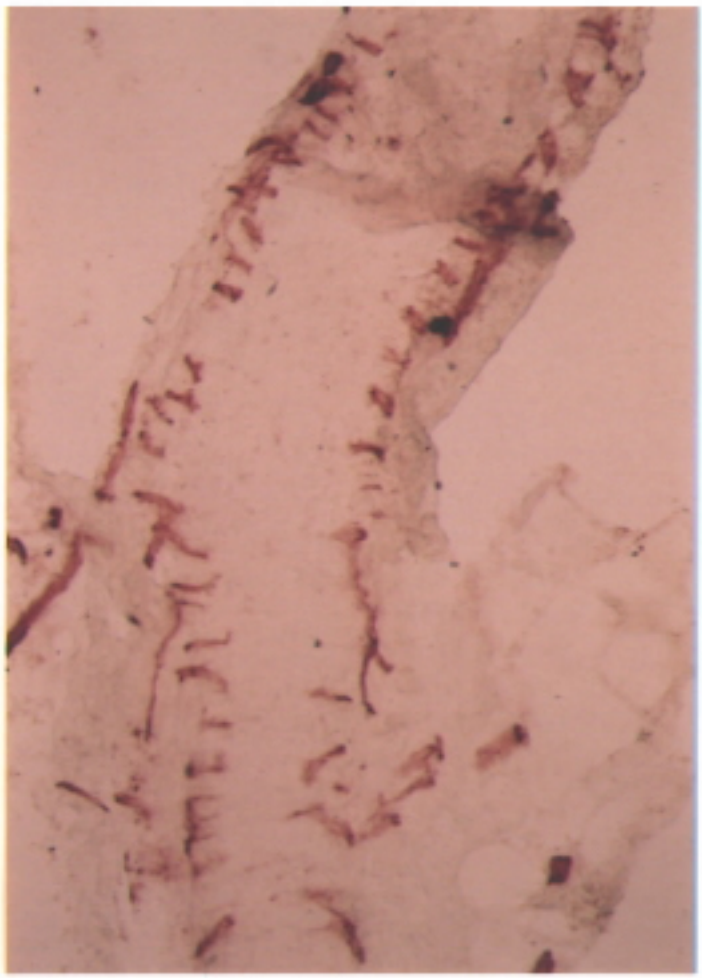
도면 12a



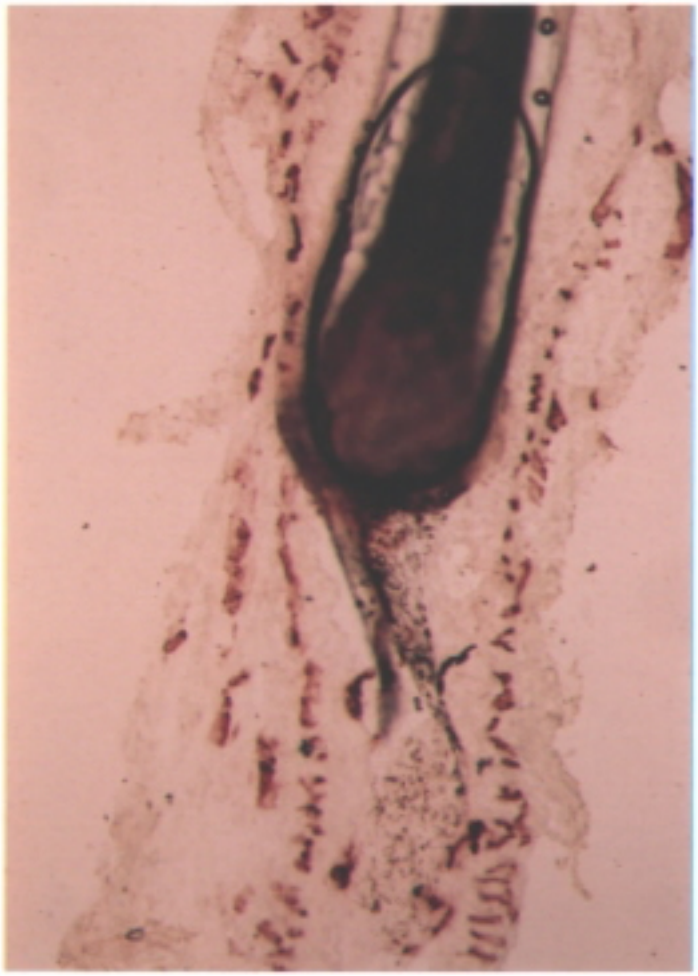
도면 12b



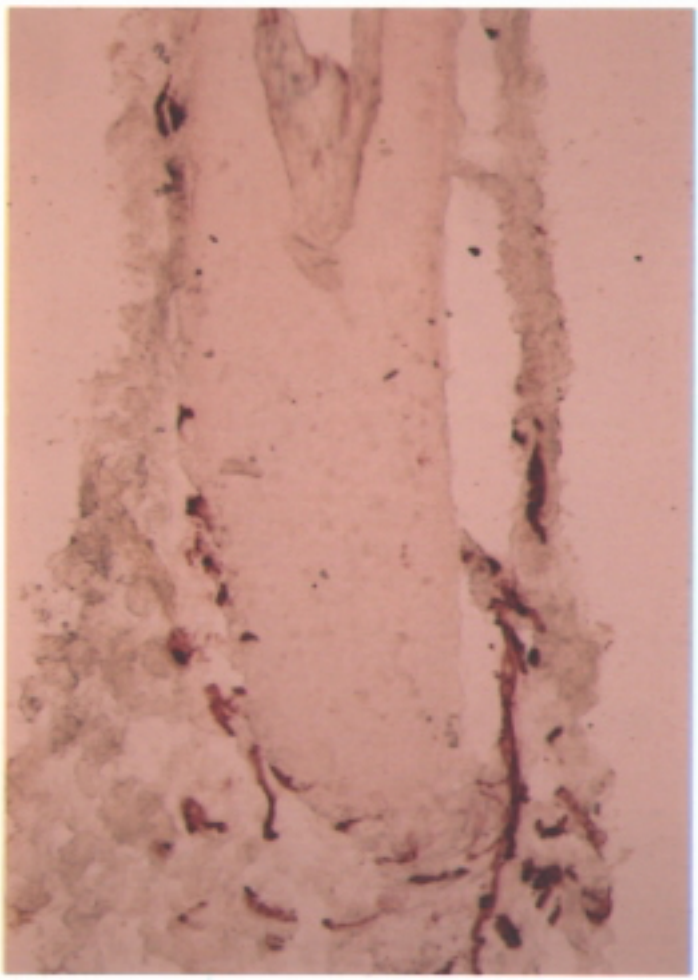
도면 13a



도면 13b



도면 14a



도면 14b

