世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7
C07K 5/103, A61K 38/06, 38/07, A61P 17/14, 37/04, A61K 7/06

A1

(11) 国際公開番号 WO00/29425

(43) 国際公開日 2000年5月25日(25.05.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06329

(22) 国際出願日 1999年11月12日(12.11.99)

(30) 優先権データ
特願平10/323331 1998年11月13日(13.11.98) JP
特願平11/54954 1999年3月3日(03.03.99) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
協和醗酵工業株式会社
(KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP]
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
吉川正明(YOSHIKAWA, Masaaki)[JP/JP]
〒610-0114 京都府城陽市市辺北垣内8-1 Kyoto, (JP)
高畑京也(TAKAHATA, Kyoya)[JP/JP]
〒700-0082 岡山県岡山市津島中1-2 Okayama, (JP)
古川忠康(FURUKAWA, Tadayasu)[JP/JP]
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
協和醗酵工業株式会社 本社内 Tokyo, (JP)
高橋知也(TAKAHASHI, Tomoya)[JP/JP]
〒305-0841 茨城県つくば市御幸が丘2番地
協和醗酵工業株式会社 筑波研究所内 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES**

(54)発明の名称 生理活性ペプチド

(57) **Abstract**

Peptides represented by the following general formula or pharmacologically acceptable salts thereof: R^1-Met-Ile-X-R^2 wherein X represents Trp, Phe, Trp-Leu, Phe-Leu, Tyr-Leu, Ile-Leu or Leu-Leu; R^1 represents hydrogen or an amino-protective group; and R^2 represents a hydroxy- or carboxyl-protective group.

(57)要約

本発明は、式R^1－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｘ－R^2（式中、Ｘは、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕを表し、R^1は、水素またはアミノ基の保護基を表し、R^2は、ヒドロキシまたはカルボキシル基の保護基を表す）で表されるペプチドまたはその薬理的に許容される塩を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明　　細　　書

生　理　活　性　ペ　プ　チ　ド

技　術　分　野

本発明は、育毛活性、免疫系賦活作用等を有するペプチド、および該ペプチドを含有する育毛食品、育毛剤、経口育毛剤、免疫系賦活剤に関する。

背　景　技　術

大豆蛋白質由来の式Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｔｈｒ－Ｌｅｕで表されるペプチド（ＭＩＴＬ）およびＭＩＴＬの配列を分子内に有するいくつかのペプチドが、免疫系賦活作用［例えば貪食（ファゴサイトーシス）促進作用、活性酸素産出促進作用、腫瘍壊死因子分泌促進作用］（特開平７－２２４０９３および特開平８－７３３７４）および抗脱毛作用（特開平９－２４９５３５）を示すことが知られている。

育毛を目的とする食品として、アマチャヅルとカキノハと昆布の抽出物を含む食品が知られている（特開昭６０－２５１８６６）。

抗がん剤の副作用としての脱毛症状を抑制、改善または予防する目的の、ウーロン茶抽出物を有効成分とする経口抗脱毛症剤が知られている（特開平９－３０９８４０）。

また、経口育毛医薬品として、Type II 5 α-リダクターゼ阻害剤であるフィナステライド（finasteride）が知られている［オーストラレイジアン ジャーナル オブ デルマトロジー(Australasian Journal of Dermatology), 38, 20 (1997)］。しかしながら、当薬剤は、男性ホルモンの代謝に作用する薬剤であることから、副作用が心配され、使用上の注意や制限が多い。

本発明の目的は、育毛活性、免疫系賦活作用等を有するペプチド、および該ペプチドを含有する育毛食品、育毛剤、経口育毛剤、免疫系賦活剤を提供することにある。

発　明　の　開　示

本発明は、式R^1－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｘ－R^2（式中、Ｘは、Ｔｒｐ、

Ｐｈｅ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕを表し、R^1は、水素またはアミノ基の保護基を表し、R^2は、ヒドロキシまたはカルボキシル基の保護基を表す）で表されるペプチド（以下、ＭＩＸという）またはそれらの薬理的に許容される塩に関する。別の形態としては、本発明は、上記ＭＩＸにおいてＸがＴｒｐ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕであるペプチド（以下、ＭＩＸ’という）またはそれらの薬理的に許容される塩に関する。これらの中でも、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであるペプチドまたはそれらの薬理的に許容される塩が好ましい（以下、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＴｒｐであるペプチドをＭＩＷ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＰｈｅであるペプチドをＭＩＦ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＴｒｐ－ＬｅｕであるペプチドをＭＩＷＬ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＰｈｅ－ＬｅｕであるペプチドをＭＩＦＬ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＴｙｒ－ＬｅｕであるペプチドをＭＩＹＬ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＩｌｅ－ＬｅｕであるペプチドをＭＩＩＬ、R^1が水素であり、R^2がヒドロキシであり、ＸがＬｅｕ－ＬｅｕであるペプチドをＭＩＬＬという）。

また、本発明は、Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｘ（式中、Ｘは、前記と同義である）の配列を分子内に有するペプチド（以下、ＭＩＸおよびＭｅｔ－Ｉｌｅ－Ｘの配列を分子内に有するペプチドをまとめてＭＩＸＣという）またはその薬理的に許容される塩に関する。別の形態としては、本発明は、上記ＭＩＸＣにおいてＸがＴｒｐ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕであるペプチド（以下、ＭＩＸ’Ｃという）またはそれらの薬理的に許容される塩に関する。

また、本発明により、ＭＩＸＣ、ＭＩＸ、ＭＩＸ’Ｃ、ＭＩＸ’またはそれらの薬理的に許容される塩を含有する医薬が提供される。

また、本発明により、ＭＩＸＣ、ＭＩＸ、ＭＩＸ’Ｃ、ＭＩＸ’またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する育毛剤が提供される。

また、本発明により、ＭＩＸＣ、ＭＩＸ、ＭＩＸ’Ｃ、ＭＩＸ’またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する経口育毛剤が提供される。

また、本発明により、ＭＩＸＣ、ＭＩＸ、ＭＩＸ’Ｃ、ＭＩＸ’またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する免疫系賦活剤が提供される。

さらに、本発明により、ＭＩＸＣ、ＭＩＸ、ＭＩＸ’Ｃ、ＭＩＸ’またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する育毛食品が提供される。

上記の中でも、ＭＩＦＬ、ＭＩＹＬ、ＭＩＩＬ、ＭＩＬＬもしくはそれらの薬理的に許容される塩、またはこれらを含有する医薬、育毛剤、経口育毛剤、免疫系賦活剤、育毛食品が好ましい。

上記式の定義において、アミノ基の保護基としては、例えば、泉屋信夫ほか著、「ペプチド合成の基礎と実験」、丸善（株）発行（１９８５年）等に記載のものがあげられ、低級アルカノイル等が好ましい。カルボキシル基の保護基としては、例えば、泉屋信夫ほか著、「ペプチド合成の基礎と実験」、丸善（株）発行（１９８５年）等に記載のものがあげられ、低級アルコキシ、アミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノ等が好ましい。

低級アルカノイル、低級アルコキシおよびモノまたはジ低級アルキルアミノにおける低級アルキル部分としては、炭素数１～６の直鎖または分岐状の、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、イソアミル、ネオペンチル、ヘキシル等があげられる。

本明細書におけるアミノ酸の略号は、当該分野で一般に使用されるもので、以下の意味を有する。

Ｍｅｔ：Ｌ－メチオニン
Ｉｌｅ：Ｌ－イソロイシン
Ｔｒｐ：Ｌ－トリプトファン
Ｌｅｕ：Ｌ－ロイシン
Ｐｈｅ：Ｌ－フェニルアラニン
Ｔｙｒ：Ｌ－チロシン
Ｔｈｒ：Ｌ－スレオニン

本発明のペプチドの薬理的に許容される塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸塩があげられる。

次に、本発明のペプチドの製造法について説明する。

本発明のペプチドは、固相法、液相法等の通常用いられるペプチド合成方法により製造することができる。例えば、矢島治明、柳原俊平著、日本生化学編、「生化学実験講座（Ｉ）：蛋白質の化学、４巻」、東京化学同人発行（１９７７年）：泉屋信夫ほか著、「ペプチド合成の基礎と実験」、丸善（株）発行（１９８５年）等に記載されている方法あるいはそれらに準じて製造することができる。

固相法を用いる場合、例えば以下のようにして製造することができる。

ｐ－ベンジルオキシベンジルアルコールタイプ樹脂（ポリスチレン）をペプチドを得るための支持体とし、α－アミノ保護アミノ酸の１つがエステル結合で上記樹脂に結合したものが市販品として入手可能である。使用するアミノ酸のα－アミノ基は９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基で保護し、トリプトファンのインドリル基はトリチル（Ｔｒｔ）基でそれぞれ保護するのが好ましい。保護アミノ酸の縮合は、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリピロリジノフォスフォニウム　ヘキサフルオロフォスフェート（ＰｙＢＯＰ）等の縮合剤を用い、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）存在下に行うことが好ましい。溶媒としてはＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）を用い、Ｆｍｏｃ基の脱保護には

Ｎ－メチルモルホリンを用いることが好ましい。アミノ酸を順次延長し保護ペプチド樹脂を合成した後、チオアニソール、エタンジチオール、エチルメチルスルフィド、チオフェノール等の含硫化合物の存在下、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）等の酸で処理することにより、粗合成ペプチドを得ることができる。通常の縮合反応においては、樹脂の水酸基または樹脂に最初に結合したアミノ酸に対し、保護アミノ酸、縮合剤およびＨＯＢｔは１～１５当量用いられ、反応は室温で３０分～５時間行われる。樹脂からの合成ペプチドの脱離反応は、室温で１～１０時間行われる。

得られたペプチドは、逆相シリカゲルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）あるいは分配、吸着樹脂、シリカゲル、アルミナ、珪藻土、珪酸マグネシウム、イオン交換樹脂、あるいはゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィー等により精製することができる。

本発明のペプチドの薬理的に許容される塩は、例えば対応する酸の水溶液に本発明のペプチドを溶解し、凍結乾燥することによって得られる。

本発明のペプチドおよびその薬理的に許容される塩は、水あるいは各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これら付加物も本発明に包含される。

次に、上記製造法で得られる本発明のペプチドの理化学的性質を示す。

ＭＩＷ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝４８９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：１ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＦ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝４１０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：３０ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＷＬ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝５６２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：０．２ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＦＬ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝５２３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：０．２ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＹＬ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝５３９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：０．３ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＩＬ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝４８９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：０．２ｍｇ／ｍＬ

ＭＩＬＬ

性状：白色粉末

質量分析：ｍ／ｚ＝４８９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

水溶性：０．２ｍｇ／ｍＬ

次に、本発明のペプチドの作用について、試験例により具体的に示す。

試験例１．マウス培養毛包細胞に対する増殖促進効果

毛包細胞の分離および培養は、Tanigakiらの方法［アーカイヴズ　オブ　ダーマトロジカル　リサーチ(Archives of Dermatological Research), 284, 290-296(1992)］を改変して行った。

４日令のＣ３Ｈマウス（日本チャールス・リバー）の背部皮膚を採取し、該皮膚を５００単位／ｍＬのディスパーゼ（合同酒清）および５％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）を含むイーグルＭＥＭ培地（Eagle's Minimum Essential Medium、日水製薬社製）で４℃、１６時間処理した。該皮膚

切片から表皮を剥離して得られた真皮層を、０．２５％コラゲナーゼＮ－２（新田ゼラチン社製）および１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium）で３７℃、１時間処理し、真皮懸濁液を得た。該真皮懸濁液を２１２μｍのナイロンメッシュ（日本理化学器械製）で濾過後、該濾液を１０００ｒｐｍで５分間遠心分離処理し、毛包組織を含むペレットを得た。該ペレットに、カルシウム・マグネシウムフリーＰＢＳ（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline）溶液を加え、ピペットを用いて懸濁後、１５分間静置することにより毛組織を沈降させた。得られた毛組織を用いて、上記操作（カルシウム・マグネシウムフリーＰＢＳ溶液の添加、ピペットによる懸濁、１５分間静置・沈降操作）と同様の操作を３回繰り返した。得られた毛組織に０．１％エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）－０．２５％トリプシン水溶液（ギブコ社製）を加え、３７℃で５分間処理後、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地を加え、3×10^5／ｍＬの細胞濃度の毛組織細胞液を調製した。

該毛組織細胞液を２４穴コラーゲンコートプレート（イワキガラス社製）へ１ｍＬ／ウェルずつ播種し、３７℃、５％CO_2下で２４時間培養を行った。培養後、ＭＣＤＢ１５３培地（極東製薬社製）にウシインシュリン（シグマ社製）５ｍｇ／Ｌ、マウス上皮成長因子（ＥＧＦ）（宝酒造社製）５μｇ／Ｌ、ウシ下垂体抽出物（極東製薬社製）４０ｍｇ／Ｌ、ヒトトランスフェリン（シグマ社製）１０ｍｇ／Ｌ、ハイドロコーチゾン（シグマ社製）０．４ｍｇ／Ｌ、プロゲステロン（コラボラティブ　リサーチ社製）０．６３μｇ／Ｌ、Ｏ－ホスホエタノールアミン（シグマ社製）１４ｍｇ／Ｌ、エタノールアミン（シグマ社製）６．１ｍｇ／Ｌ、ペニシリン（和光純薬社製）５０Ｕ／ｍＬ、ストレプトマイシン（和光純薬社製）５０μｇ／ｍＬおよび本発明のペプチドを含むジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）溶液（培地に対し１／１００体積加えた）を添加した培地へ培地交換し、さらに、３７℃、５％CO_2下で５日間培養を行った。培地は１日おきに交換した。

上記培地において、当該ペプチドを含むＤＭＳＯ溶液の代わりにＤＭ

ＳＯのみを１／１００体積培養液に加えた培地で培養したものを対照群（コントロール）とした。

細胞増殖度の測定は、ニュートラルレッドを用いた方法［ジャーナルオブ　ティッシュ　カルチャー　メソッド(Journal of Tissue Culture Method), 9, 1, 7-9 (1984)］を参考に行った。

培養後の培地を吸引し、５０ｍｇ／Ｌのニュートラルレッド（シグマ社製）を添加したＭＣＤＢ１５３培地で３７℃、５％CO_2下３時間培養を行った。培養上清を除去した後、得られた培養細胞を、塩化カルシウムを１％含む１％ホルマリン水溶液で１分間洗浄・固定を行った。洗浄・固定後、上清を除去し、１％酢酸を含む５０％エタノール水溶液（０．４ｍＬ／１穴＝２ｃｍ^2）を添加し、ニュートラルレッドを抽出した。該抽出液の５４０ｎｍでの吸光度を測定することにより、細胞の増殖度を求めた。

本発明のペプチドの毛包細胞増殖促進活性を第１表に示す。数値はコントロールに対する相対細胞増殖率（％）で示した。

第　１　表

ペプチド	濃度（μＭ）	相対細胞増殖率（％）（対コントロール）
ＭＩＷ	１	９７
	３	１４３
	１０	１３０
	３０	１２３
	１００	１１９

本発明の生理活性ペプチドは、著しいマウス毛包細胞増殖促進効果を示した。

試験例２．マウスの発毛に対する効果

小川らの方法［ザ　ジャーナル　オブ　ダーマトロジー(The Journal of Dermatology), 10, 45-54 (1983)］を参考に、マウスによる発毛効果の試験を行った。

毛周期の休止期にある９週令のＣ３Ｈ／ＨｅＳｌｃ雄性マウス（日本ＳＬＣ）（一群４～５匹）の背部毛を電気バリカンと電気シェーバーで注意深く剃毛した後、参考例１～４で作製した飼料を与え、飼育を行った。

本発明のペプチドを含有しない飼育用粉末飼料（ＣＥ－２、日本クレア製）のみを用いて飼育した群を対照群とした。

試験開始後２０日目のマウス背部皮膚を採取し写真撮影を行った後、画像解析処理装置（アビオニクス社製、スピカII）を用いて背部皮膚全面積に対する発毛部の面積の百分率を求め、本発明のペプチドを含有する飼育用粉末飼料投与群の発毛率の値から対照群の発毛率の値を差し引いた値を増加発毛面積率（％）とした。

結果を第２表に示す。

第　２　表

ペプチド	投与量	増加発毛面積率（％）
ＭＩＷＬ	飼料に０．０５％添加	３４．４
ＭＩＷ	飼料に０．０５％添加	２３．７
ＭＩＷ	飼料に０．００５％添加	２０．７
ＭＩＦ	飼料に０．００５％添加	２６．８

第２表に示すように、本発明の生理活性ペプチドを含有する飼料を与えることにより、著しいマウスの毛包成長促進効果が認められた。

試験例３．ファゴサイトーシス活性の測定

ヒト末梢血にリン酸緩衝液を含む生理食塩水（ＰＢＳ）を加え、１０００ｒｐｍ－５分の遠心分離で血球を洗浄した後、ＰＢＳで4×10^{6}個／ｍＬの血球の懸濁液を調製した。この溶液１００μｌに、ＰＢＳに溶解させたペプチド溶液１０μｌを加え、３７℃で１０分間インキュベートを行った。次いで、ヒト末梢血でオプソニン化した4×10^{8}個／ｍＬの蛍光標識ラテックスビーズ液１０μｌを加え、さらに５分間インキュベートを行った。エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）を含むＰＢＳを加えて反応を停止させ、遠心により血球を分離した後、塩化アンモニウム溶血剤を加えて溶血させて白血球を得た。これをＥＤＴＡを含むＰＢＳに懸濁させた後、フローサイトメトリーで測定し、ラテックスビーズを貪食した細胞数を算出した。

結果を第３表に示す。数値はコントロール（ＰＢＳのみ）に対する倍率で示した。

第 3 表

ペプチド	濃度（μM）	ファゴサイトーシス活性
ＭＩＷＬ	3	3．04 ± 0．50
	1	3．11 ± 0．07
	0．3	2．74 ± 0．25
	0．1	1．93 ± 0．18
ＭＩＦＬ	3	3．06 ± 0．25
	1	2．45 ± 0．17
	0．3	1．68 ± 0．08
	0．1	1．10 ± 0．09
ＭＩＹＬ	10	3．12 ± 0．32
	3	2．21 ± 0．25
	1	1．32 ± 0．15
ＭＩＩＬ	30	2．95 ± 0．20
	10	2．52 ± 0．18
	3	1．62 ± 0．08
	1	1．18 ± 0．07
ＭＩＬＬ	30	2．97 ± 0．17
	10	2．05 ± 0．08
	3	1．28 ± 0．09
ＭＩＴＬ	30	2．34 ± 0．46
	10	1．60 ± 0．06
	3	1．34 ± 0．05

本発明の育毛剤の剤型としては、錠剤、カプセル剤、粉末、丸剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、シロップ剤、トローチ剤、注射剤等があげられる。製剤の投与形態は特に限定されないが、例えば投与経路として、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与等をあげることができる。例えば経口投与の場合は、ＭＩＸＣの純品、精製物、

粗精製物等をそのまま投与してもよいが、薬理的に許容される賦形剤とともに投与してもよい。賦形剤としては、ソルビトール、ラクトース、グルコース、乳糖等の糖類、デキストリン、澱粉、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム等の無機物、結晶セルロース、蒸留水、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、大豆油、綿実油等、一般に使用されているものであればいずれも用いることができる。製剤化する際には、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、希釈剤、緩衝剤、抗酸化剤、細菌抑制剤等の添加剤を用いることもできる。

ＭＩＸＣの投与量は、疾患の症状、患者の年齢等により異なるが、例えば経口の場合、通常成人一日あたり１０～１００００ｍｇ、好ましくは５０～２０００ｍｇ、さらに好ましくは１００～５００ｍｇである。

本発明の免疫系賦活剤の形態としては、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末、丸剤、シロップ剤、トローチ剤、注射剤等があげられる。製剤の投与形態は特に限定されないが、例えば投与経路として、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与等をあげることができる。例えば経口投与の場合は、ＭＩＸＣの純品、精製物、粗精製物等をそのまま投与してもよいが、薬理的に許容される賦形剤とともに、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等の形態で投与してもよい。賦形剤としては、ソルビトール、ラクトース、グルコース、デキストリン、澱粉、乳糖等の糖類、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム等の無機物、結晶セルロース、蒸留水、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、大豆油、綿実油等、一般に使用されているものであればいずれも用いることができる。製剤化する際には、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、希釈剤、緩衝剤、抗酸化剤、細菌抑制剤等の添加剤を用いることもできる。

ＭＩＸＣの投与量は、疾患の症状、患者の年齢等により異なるが、通常成人一日あたり１０～１００００ｍｇ、好ましくは５０～２０００ｍｇ、さらに好ましくは１００～５００ｍｇである。

本発明の食品は、例えば、食品原料、特にＭＩＸＣを本来実質的に含有しない食品原料に、ＭＩＸＣを０．０１％以上、好ましくは０．０１～４％、より好ましくは０．０５～１％含有するようにＭＩＸＣを純品、精製物、粗精製物等の形態として添加し、一般的食品製造方法を用いることにより加工製造することができる。

本発明の育毛食品の形態としては、錠剤、カプセル剤、粉末、丸剤、ゼリー、飲料、冷凍食品、粉末食品、シート状食品、瓶詰食品、缶詰食品、レトルト食品等の形態の他、自然流動食、半消化栄養食、成分栄養食等の加工形態等があげられ、食品に使われる一般的な原料、例えば蛋白質、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等を添加することができ、常法により製造される。

食品の種類としては、ジュース類、清涼飲料水、茶類、乳酸菌飲料、発酵乳、冷菓、乳製品（バター、チーズ、ヨーグルト、加工乳、脱脂乳等）、畜肉製品（ハム、ソーセージ、ハンバーグ等）、魚肉練り製品（蒲鉾、竹輪、さつま揚げ等）、卵製品（だし巻き、卵豆腐等）、菓子類（クッキー、ゼリー、スナック菓子等）、パン類、麺類、漬物類、燻製品、干物、佃煮、塩蔵品、スープ類、調味料等があげられる。

発明を実施するための最良の形態

実施例１．育毛用錠剤の作製

次の処方で、常法により錠剤（１錠あたり３００ｍｇ）を製造する。

ＭＩＷ	５０ｍｇ
乳糖	１９０ｍｇ
コーンスターチ	３０ｍｇ
合成ケイ酸アルミニウム	１２ｍｇ
カルボキシメチルセルロースカルシウム	１５ｍｇ
ステアリン酸マグネシウム	３ｍｇ

実施例２．育毛用ハードカプセル剤の作製

次の処方で、ハードカプセル剤（１カプセルあたり３６０ｍｇ）を製造する。

ＭＩＷＬ	５０ｍｇ
乳糖	１９０ｍｇ
コーンスターチ	１００ｍｇ
ヒドロキシプロピルセルロース	２０ｍｇ

ＭＩＷＬ，５０ｍｇに乳糖１９０ｍｇおよびコーンスターチ１００ｍｇを添加して混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース２０ｍｇの水溶液を添加して練合する。次いで、押し出し造粒機を用いて、常法により顆粒を製造する。この顆粒をゼラチンハードカプセルに充填することにより、ハードカプセル剤を製造する。

実施例３．育毛用ソフトカプセル剤の作製

次の処方で、ソフトカプセル剤（１カプセルあたり１７０ｍｇ）を製造する。

ＭＩＦＬ	５０ｍｇ
大豆油	１２０ｍｇ

大豆油１２０ｍｇにＭＩＷ，５０ｍｇを添加して混合する。次いで、ロータリー・ダイズ式自動成型機を用いて、常法に従い、ソフトカプセルに充填することにより、ソフトカプセル剤を製造する。

実施例４．育毛用散剤の作製

次の処方で、常法により散剤（１包あたり１０００ｍｇ）を製造する。

ＭＩＹＬ	５０ｍｇ
乳糖	７６０ｍｇ
コーンスターチ	１９０ｍｇ

実施例５．免疫系賦活剤用錠剤の作製

次の処方で、常法により、錠剤を製造する。

ＭＩＩＬ	１０．０ｇ
乳糖	９０．０ｇ
乾燥コーンスターチ	２．０ｇ
タルク	１．８ｇ
ステアリン酸カルシウム	０．２ｇ

実施例６．育毛用飲料の作製

次の処方で配合し、精製水を加えて全量を１０００ｍＬとして、育毛用飲料を調製する。

ＭＩＬＬ	１．０ｇ
安息香酸ナトリウム	１．０ｇ
果糖	１０．０ｇ
香料	適量
色素	適量

参考例１．ＭＩＷＬを含む動物実験用飼料の作製

ＭＩＷＬ，５０ｍｇを１００ｇの飼育用粉末飼料（ＣＥ－２、日本クレア製）に加え、乳鉢で均一に混合したものを試験用飼料とした。

参考例２．ＭＩＷを含む動物実験用飼料の作製

ＭＩＷ，５０ｍｇを１００ｇの飼育用粉末飼料（ＣＥ－２、日本クレア製）に加え、乳鉢で均一に混合したものを試験用飼料とした。

参考例３．ＭＩＷを含む動物実験用飼料の作製

ＭＩＷ，５ｍｇを１００ｇの飼育用粉末飼料（ＣＥ－２、日本クレア製）に加え、乳鉢で均一に混合したものを試験用飼料とした。

参考例４．ＭＩＦを含む動物実験用飼料の作製

ＭＩＦ，５ｍｇを１００ｇの飼育用粉末飼料（ＣＥ－２、日本クレア製）に加え、乳鉢で均一に混合したものを試験用飼料とした。

産業上の利用可能性

本発明によれば、育毛活性、免疫系賦活作用等を有するペプチド、および該ペプチドを含有する育毛食品、育毛剤、経口育毛剤、免疫系賦活剤を提供することができる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号１－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号２－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号３－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号４－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号５－人工配列の説明：合成アミノ酸

請　求　の　範　囲

1．　式R^1－Ｍｅｔ－Ｉｌｅ－Ｘ－R^2（式中、Ｘは、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕを表し、R^1は、水素またはアミノ基の保護基を表し、R^2は、ヒドロキシまたはカルボキシル基の保護基を表す）で表されるペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

2．　ＸがＴｒｐ、Ｔｒｐ－Ｌｅｕ、Ｐｈｅ－Ｌｅｕ、Ｔｙｒ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－ＬｅｕまたはＬｅｕ－Ｌｅｕである請求の範囲１記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

3．　R^1が水素であり、R^2がヒドロキシである請求項１または２記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

4．　請求項１～３のいずれかに記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩を含有する医薬。

5．　請求項１～３のいずれかに記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する育毛剤。

6．　請求項１～３のいずれかに記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する経口育毛剤。

7．　請求項１～３のいずれかに記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する免疫系賦活剤。

8．　請求項１～３のいずれかに記載のペプチドまたはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する育毛食品。

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

<130>11166WO1

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Amino Acid

<400> 1

Met Ile Trp Leu

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Amino Acid

<400> 2

Met Ile Phe Leu

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Amino Acid

<400> 3

Met Ile Tyr Leu

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Amino Acid

<400> 4

Met Ile Ile Leu

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Amino Acid

<400> 5

Met Ile Leu Leu

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C07K 5/103, A61K 38/06, A61K 38/07, A61P 17/14, A61P 37/04, A61K 7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C07K 5/103, A61K 38/06, A61K 38/07, A61P 17/14, A61P 37/04, A61K 7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Antal Rot et al.,"A series of six ligands for the human formyl peptide receptor:Tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), Vol.84, No.22, p.7967-7971	1-3
X	Marvin Lesser et al., "Hydrolysis of N-formylmethionyl chemotactic peptides by endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15", Peptides (1996), Vol.17, No.1, p.13-16	1-3
PA	EP, 916652, A1 (L'OREAL SA), 19 May, 1999 (19.05.99) & JP, 11-228525, A	1-8
PA	EP, 911320, A2 (SHISEIDO CO LTD), 28 April, 1999 (28.04.99) & JP, 11-217365, A	1-8
PA	EP, 903344, A1 (SHISEIDO CO LTD), 24 March, 1999 (24.03.99) & JP, 11-124370, A & US, 5972929, A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 February, 2000 (08.02.00)	22 February, 2000 (22.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06329

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/07772, A1 (QUEST INT BV), 06 March, 1997 (06.03.97) & JP, 11-512091, W & EP, 845974, A1	1-8

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP99／06329

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷　C07K 5／103, A61K 38／06, A61K 38／07, A61P 17／14,
A61P 37／04, A61K 7／06

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷　C07K 5／103, A61K 38／06, A61K 38／07, A61P 17／14,
A61P 37／04, A61K 7／06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CA（STN）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	Antal Rot et al., "A series of six ligands for the human formyl peptide receptor:Tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy", Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1987), Vol.84 , No.22 , p.7967-7971	1－3
X	Marvin Lesser et al., "Hydrolysis of *N*-formylmethionyl chemotactic peptides by endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15", Peptides (1996) , Vol.17 , No.1 , p.13-16	1－3
PA	EP,916652,A1 (L'OREAL SA)　19.5月.1999 (19.05.99) & JP,11-228525,A	1－6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 08．02．00	国際調査報告の発送日 22.02.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 光本　美奈子　印　4B　9359 電話番号　03－3581－1101　内線　3448

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９９／０６３２９

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
ＰＡ	EP,911320,A2 (SHISEIDO CO LTD)　28.4月.1999 (28.04.99) & JP,11-217365,A	１－８
ＰＡ	EP,903344,A1 (SHISEIDO CO LTD)　24.3月.1999 (24.03.99) & JP,11-124370,A & US,5972929,A	１－８
Ａ	WO,97/07772,A1 (QUEST INT BV)　6.3月.1997 (06.03.97) & JP,11-512091,W & EP,845974,A1	１－８