

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-133371

(P2011-133371A)

(43) 公開日 平成23年7月7日(2011.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	2 GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	
	GO 1 N 33/53	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2009-293563 (P2009-293563)	(71) 出願人	000001959
(22) 出願日	平成21年12月24日 (2009.12.24)		株式会社 資生堂
			東京都中央区銀座7丁目5番5号
		(74) 代理人	100103160
			弁理士 志村 光春
		(72) 発明者	萩原 基文
			神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株
			式会社資生堂リサーチセンター (新横浜)
			内
		(72) 発明者	飯野 雅人
			神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株
			式会社資生堂リサーチセンター (新横浜)
			内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 毛髪糖化度の特定方法、及び、これを用いる評価方法

(57) 【要約】

【課題】潜在的な毛髪老化の指標となる現象を見出し、その容易な把握手段を提供すること。

【解決手段】健常者であっても、加齢により毛髪糖化が進行し、さらに、この毛髪糖化の進行を、免疫染色により視覚的に示すことが可能であり、この方法が毛髪糖化度の把握手段として非常に好ましいものであることを見出すことにより、本発明は完成された。すなわち、本発明者は、毛髪における糖化タンパク質を染色対象とする免疫染色を行い、当該染色像を可視化することにより、毛髪糖化度を特定する方法、及び、この特定方法を用いた毛髪タンパク質糖化抑制・改善成分の評価方法、を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

毛髪における糖化タンパク質を染色対象とする免疫染色を行い、当該染色像を可視化することにより、毛髪の糖化度を特定する方法。

【請求項 2】

免疫染色において一次抗体として用いられる抗体は、A G E s (Advanced Glycation End Products) に対して結合可能な抗体である、請求項 1 に記載の特定方法。

【請求項 3】

A G E s に対して結合可能な抗体は、抗 C M L (N' - カルボキシメチルリジン) 抗体である、請求項 2 に記載の毛髪の糖化度の特定方法。

10

【請求項 4】

毛髪の免疫染色像に毛髪の長さ方向に対する横断面像を用いて、毛髪内部の糖化度を特定する請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の毛髪の糖化度の特定方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の特定方法により、下記 (1) ~ (3) の毛髪の糖化度を比較測定することを特徴とする、毛髪タンパク質の糖化抑制・改善成分の評価方法。

(1) 単糖類又は二糖類溶液中に、12 時間 ~ 10 日間浸漬した毛髪。

(2) 前記 (1) の処理を行う前あるいは処理後、又は、浸漬中に、評価被験成分を添加した毛髪。

20

(3) 未処理の毛髪。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、生体成分の検出方法に関する発明であり、より具体的には、毛髪老化に伴って増加する、毛髪における糖化成分を免疫染色により可視化し、特定する手段に関する発明である。

【背景技術】**【0002】**

加齢に伴い、皮膚が老化することは良く知られている。一方、毛髪の老化に関しては、白髪、脱毛、毛髪の細り等の現象が、老化と関連して認められている。

30

【0003】

しかしながら、これらの毛髪における現象は、毛髪に老化が進行した、いわば結果である。よって、これらに至るまでの潜在的な毛髪の老化の指標となり、かつ、把握が容易なものの提供が望まれている。

【0004】

ところで、毛髪の糖化程度の増加は、糖尿病患者において認められることが知られている (特許文献 1、非特許文献 1)。しかしながら、加齢に伴い、これが増加することは知られていない。

【0005】

また、毛髪の糖化程度の測定方法として、ルミノール化学発光を用いる方法は提供されているが (非特許文献 1)、免疫染色法を用いる方法は知られていない。

40

【先行技術文献】**【特許文献】****【0006】**

【特許文献 1】特開平 6 - 30791 号公報

【非特許文献】**【0007】**

【非特許文献 1】BUNSEKI KAGAKU Vol.54, No.9, pp.743-748 (2005)

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】**

50

【 0 0 0 8 】

本発明は、潜在的な毛髪の老化の指標となる現象を見出し、その容易な把握手段を提供することを課題とする発明である。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者は、上記の課題に対して検討を重ねた結果、糖尿病の発症とは別個に、健常者であっても、加齢により毛髪の糖化が進行することを見出し、さらに、この毛髪の糖化の進行を、免疫染色により視覚的に示すことが可能であり、この方法が毛髪の糖化度の把握手段として非常に好ましいものであることを見出して、本発明を完成した。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、毛髪における糖化タンパク質を染色対象とする免疫染色を行い、当該染色像を可視化することにより、毛髪の糖化度を特定する方法（以下、本発明の特定方法ともいう）を提供する発明である。

【 0 0 1 1 】

また、本発明の特定方法（上記）により、下記（１）～（３）の毛髪の糖化度を比較測定することを特徴とする、毛髪タンパク質の糖化抑制・改善成分の評価方法（以下、本発明の評価方法ともいう）を提供する発明である。

（１）単糖類又は二糖類溶液中に、１２時間～１０日間浸漬した毛髪。

（２）前記（１）の処理を行う前あるいは処理後、又は、浸漬中に、評価被験成分を添加した毛髪。

（３）未処理の毛髪。

【 0 0 1 2 】

本発明における「毛髪の糖化度」とは、毛髪タンパク質（実質上はケラチン：非特許文献１）に対して糖付加が行われている度合いを意味するものであり、毛髪における糖化タンパク質（以下、「糖化タンパク質」と略記することもある）に対する免疫染色により得られる染色像から、視覚的に特定されるパラメーターである。毛髪の糖化度は、毛髪における免疫染色がなされている箇所が多い方が、又は、当該染色箇所の色が濃い方が、大きく、毛髪タンパク質の糖化が進んでいることを示すものである。本発明の評価方法は、毛髪の内部方向への糖化が、どの程度進行しているかを把握するのに、特に適している。

【 0 0 1 3 】

本発明の特定方法では、糖化タンパク質に対して結合する抗体を用いた免疫染色を、毛髪に対して行い、これにより得られる染色像によって、毛髪の糖化度を視覚的に特定することにより、本発明の特定方法を行うことができる。

【 0 0 1 4 】

前述のように、毛髪タンパク質の糖化は、糖尿病に伴って認められる現象であるが、後述する実施例に示すように、加齢に伴って、毛髪の糖化タンパク質は増加するものである。

【 0 0 1 5 】

よって、毛髪の糖化を抑制又は改善する成分を見出すことは、毛髪のケアを行う上で有用であると認められるが、本発明の特定方法を用いて、被験成分における毛髪の糖化に対する抑制効果又は改善効果の評価を簡便かつ明確に行うことが可能な、本発明の評価方法は、所望する毛髪の糖化の抑制成分又は改善成分を見出す上で大きな役割を担うものである。なお、「毛髪の糖化の抑制」とは、毛髪タンパク質の糖化の進行を抑制することを意味するものであり、「毛髪の糖化の改善」とは、毛髪タンパク質の糖化が、毛髪のケア上、好ましくない程度にまで進行した毛髪におけるタンパク質の糖化を、緩和することを意味するものとする。

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明により、毛髪タンパク質の糖化度を、簡便かつ明確に特定する方法が提供される

10

20

30

40

50

。当該方法は、毛髪の内方向に対して糖化の状況の把握に適している。さらに、この特定方法を用いて、毛髪タンパク質の糖化の抑制成分又は改善成分を見出し、確認するための、優れたスクリーニング方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】化学発光法により、20代の毛髪と50代60代の毛髪における糖化タンパク質の変化を検討した結果を示す図面である。

【図2】本発明の特定方法（免疫染色法）を行った、毛髪の長さ方向に対する横断面像の顕微鏡写真と、それに対応する図1の結果を対比した図面である（図面代用写真として原物を提出する）。

【図3】毛髪にアルギニンとグルタミン酸ナトリウムを接触させることによる、糖化抑制効果を検討した図面である（図面代用写真として原物を提出する）。

【発明を実施するための形態】

【0018】

1. 本発明の特定方法

(1) 毛髪試料

毛髪試料は、毛髪の長さ方向に対する横断面像を想定するものであっても、縦断面像を想定するものであっても、さらには斜断面像を想定するものであってもよいが、毛髪試料の調製の容易性と糖化タンパク質の存在頻度の把握の容易性、さらに、毛髪糖化の毛髪内部への浸潤状況の把握の容易性を考慮すると、横断面像であることが好適である。毛髪試料の調製は、公知の方法を用いて行うことが可能である。すなわち、凍結切片法、未凍結切片法、パラフィン切片法のいずれも用いることが可能であるが、切片の厚みは5～20μm程度が好適であるため、凍結切片法又はパラフィン切片法を用いることが有利である。

【0019】

(2) 抗体の調製と使用

毛髪糖化タンパク質の免疫染色の前提として、糖化タンパク質に対して特異的に結合する抗体が、一次抗体として必要である。当該抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。

【0020】

所望する抗体を得るための免疫原は、糖化タンパク質の糖鎖部分に相当する成分に相当するものの一部又は全部であることが好適であり、その限りにおいて特に限定されるものではない。また、必要に応じて、傘貝ヘモシアニン等のハプテンを併せて用いて免疫原とすることも可能である。かかる免疫原を用いて、常法に従い、所望のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得ることができる。

【0021】

現状において、免疫原の基礎とするのに特に好適な成分として、AGEs (Advanced Glycation End Products) が挙げられる。すなわち、所望する抗体は、AGEs に対して結合可能な抗体であることが好適であるといえる。なお、AGEs は、タンパク質の非酵素的糖付加反応（メイラード反応）により、シッフ塩基、アマドリ転移生成物を經由し、脱水、酸化、縮合等の反応を経て生成される最終生成物である。

【0022】

AGEs に対して結合可能な抗体を製造する場合、AGEs 分子を構成する主要部分である、CML (N^ε-カルボキシメチルリジン) を用いることが好適である。すなわち、本発明の特定方法における免疫染色の一次抗体として好適なものとして、抗CML抗体が挙げられる。抗CML抗体として、抗CMLマウス抗体が「抗CMLモノクローナル抗体NF-1G」が、トランスジェニック社 (Trans Genic Inc.) から提供されている。

【0023】

上記の抗体は、上述した毛髪試料と接触させて、糖化タンパク質との結合が行われる。この際、当該抗体は、免疫染色の一次抗体として用いることができる。免疫染色は、この

10

20

30

40

50

一次抗体において視覚的に把握可能な標識を施して、その標識を直接的に毛髪糖化度の標識とする「直接法」と、毛髪糖化タンパク質に結合した無標識の一次抗体に対して、標識を施した二次抗体、あるいは、二次抗体及び標識を施した三次抗体、を作用させる「間接法」に大別される。本発明においては、一次抗体と二次抗体を用いる間接法を行うことが、鋭敏性と簡便性を兼ね備えており、好適であるが、これに限定されるものではなく、直接法や三次抗体を用いる間接法を用いて本発明の特定方法を行うことができる。

【0024】

上述した抗体に施す標識は、当該標識物質単独で又は当該標識物質と他の物質とを反応させることにより、検出可能なシグナルをもたらす標識物質であり、その限りにおいて、特に限定されるものではない。具体的には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等の酵素が挙げられる。これらの酵素は、それぞれ対応する基質を接触させることによって、発色が認められる。また、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、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、GFP等の蛍光物質が挙げられる。これらの蛍光物質は、励起光を照射することにより、特徴的な蛍光が認められる。また、ビオチン-アビジン（ストレプトアビジン）系を用いることができる。この系では、例えば、ビオチン標識を行った抗体に、上記の酵素標識や蛍光標識が施されたアビジン（ストレプトアビジン）を接触させて、ビオチンとアビジン（ストレプトアビジン）の結合を形成させ、そこに改めて基質や励起光を施すことで、発色や蛍光を顕すことができる。さらに、上記の発色物質を多数結合させた高分子ポリマーを抗体に標識する酵素標識ポリマー法を行うことも可能である。その他、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 等の放射性同位体を標識して、印画紙で可視化することも可能である。

10

20

【0025】

(3) 染色像の視覚的な特定

また、染色像の視覚的な特定は、顕微鏡で行うが、用いる顕微鏡は、上述した標識の種類に応じて選択することが好ましい。蛍光を伴わない染色標識の場合には、通常の明視野顕微鏡を用いることが好適であり、蛍光標識の場合には、蛍光顕微鏡又は共焦点顕微鏡を用いることが好適である。

【0026】

このように、毛髪染色像を視覚的に特定して、染色された領域の量と質によって、毛髪試料における糖化タンパク質の量と分布を知ることが可能であり、これにより、毛髪試料提供者の毛髪における糖化度を把握することができる。すなわち、染色された領域の面積が大きく、色が濃い方が、毛髪糖化がより進行しており、同面積が小さく、色が薄い方が、毛髪糖化程度は小さく止まっている、と把握される。特に、染色された領域が、毛髪横断面の中心部に向かって浸潤している度合いが大きいほど、毛髪糖化が、毛髪中心に向けて深く食い込んでおり、毛髪実質的な変化の予兆の指標として把握することが可能である。

30

【0027】

染色像の視覚的な特定は、目視による顕微鏡像に基づいて行うことも可能であり、また、当該顕微鏡像の写真に基づいて行うことも可能である。また、当該顕微鏡像の画像データの染色要素を抽出して、その総量、密度、分布等を把握することにより行うことも可能である。

40

【0028】

2. 本発明の評価方法

上述した本発明の評価方法において、毛髪単糖類又は二糖類溶液中における浸漬処理は、強制的な毛髪タンパク質の糖化処理である。単糖類又は二糖類の溶液は、好ましくは、グルコース、リボース、フルクトース等の単糖類の水溶液であって、当該浸漬処理は、毛髪を、12時間～10日間程度浸漬することにより容易に行うことができる。そして、(1)未処理の毛髪を、評価被験成分を溶解させた溶媒（水等）に浸漬させ、その後、

50

上記の糖化処理を行い、又は、(2)糖類の水溶液に評価被験成分を共存させつつ、上記の糖化処理を行い、又は、(3)上記の糖化処理を行った毛髪(糖化毛髪)を、評価被験成分を溶解させた溶媒(水等)に、再び浸漬して、当該(1)~(3)のいずれかの被験毛髪の糖化度について、本発明の評価方法による評価を行い、これと、陽性対照の糖化毛髪との比較を、好ましくは陰性対照の非糖化毛髪との比較と共にを行い、評価被験成分を施した糖化毛髪の糖化度が、陽性対照よりも有意に低下している場合に、当該評価被験成分を、毛髪の糖化抑制又は糖化の改善における有効成分として評価することができる。

【実施例】

【0029】

以下、本発明を、実施例を用いて、具体的に説明する。ただし、本実施例の記載は、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0030】

(1)加齢による糖化タンパク質の変化の検討

健常な20代女性20名と、50~60代女性20名から提供された毛髪の糖化量を、非特許文献1に記載の方法に準じて測定を行った。

【0031】

すなわち、それぞれの毛髪試料を個別に切断後、37℃の温エタノール中で30分間洗浄し、エタノールを除去後、600mM水酸化ナトリウム溶液1mlを加え、96℃の水浴中で10分間加熱溶解し、それぞれの毛髪試料に対する試料溶液を得た。

【0032】

糖化タンパク質の測定は、調製した毛髪試料溶液を、600mM水酸化ナトリウム溶液により40倍希釈後、マイクロタイタープレートに50μl注入し、プレートリーダーに内蔵されている送液ポンプから、化学発光溶液(0.1mM フェリシアン化カリウム及び40mM フェロシアン化カリウム含有0.005mM ルミノール水溶液)を50μl注入した。測定は、内蔵ポンプから試液が分注されると同時に測定を開始する瞬時測光により行い、5分間積分値を発光強度とした。

【0033】

糖化タンパク質の定量値は、GPLの換算値として算出した。なお、糖化タンパク質量の定量スタンダードは、AGE-BSA(MBL社)を用いた。

【0034】

その結果を、図1に示す。図1により、毛髪の糖タンパク質量は、加齢に伴い増加することが明らかになった。

【0035】

(2)本発明の特定方法

上記(1)で用いられた毛髪試料のうち、28歳女性の毛髪試料(糖化値10.17)と、53歳女性の毛髪試料(糖化値19.84)について、本発明の特定方法を行い、その結果が、当該糖化値の差を反映しているか否かの検証を行った。

【0036】

すなわち、それぞれの毛髪試料の厚さ10μmの、長さ方向に対する横断切片を、凍結切片方によって作成し、1%BSA含有PBSに、室温で30分間浸漬してブロッキングを行い、次いで、PBSによる5分間の洗浄を3回行った。

【0037】

このようにしてブロッキングを完了した試料に対し、抗CMLマウス抗体(抗CMLモノクローナル抗体 NF-1G:トランスジェニック社)を、4℃下で作用させた後、PBSによる5分間の洗浄を3回行った(一次抗体反応)。

【0038】

次いで、ペルオキシダーゼ付加抗マウス抗体を室温で1時間接触させた後、PBSによる5分間の洗浄を3回行った(二次抗体反応)。

【0039】

この二次抗体反応の後、AEC基質(アミノエチルカルバゾール)(ニチレイバイオサ

10

20

30

40

50

イエンス社)を添加して、5分間作用させた。次いで、純水で3回洗浄を行い、切片をスライドガラスに載せて、明視野顕微鏡で観察を行い、その400倍像を、図1の結果と対比した図面を、図2として示した(図面代用写真提出)。図面代用写真の赤色の部分が糖化部分である。図2により、確かに、53歳女性の毛髪の糖化タンパク質量を示す染色が、それよりも同糖化タンパク質量が少ない28歳女性よりも、明らかに濃く、かつ、毛髪の中心部に向けて浸潤していることが示されており、本発明の特定方法は、毛髪におけるタンパク質の糖化の進行を正しく示すことが明らかになった。

【0040】

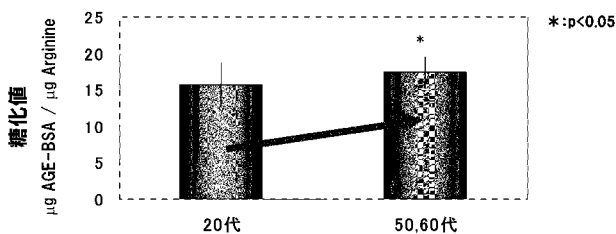
(3) 毛髪の糖化の抑制成分の評価

20歳代女性の毛髪を、(a)そのまま(未糖化毛髪)、(b)1Mのリボース水溶液に7日間浸漬(強制糖化毛髪)、及び、(c)当該強制糖化毛髪試料を、1%アルギニン及び1%グルタミン酸ナトリウム水溶液に1日浸漬(処理毛髪)、の3パターンの毛髪試料として、(2)に示した要領で、本発明の特定方法を行った結果を、図3に示した(図面代用写真提出)。図面代用写真の赤色の部分が糖化部分である。

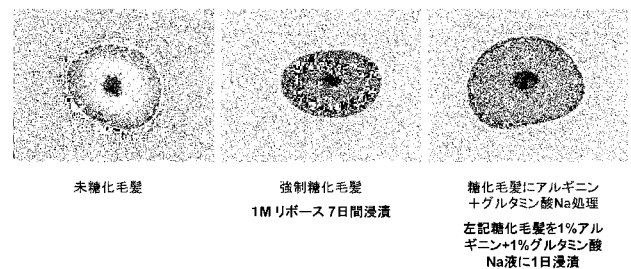
【0041】

図3により、上記の1%アルギニン及び1%グルタミン酸ナトリウム水溶液による処理により、毛髪の糖化が軽減されたことが明らかになり、この組合せ成分が、毛髪の糖化抑制又は改善成分として有効であることが確認された。

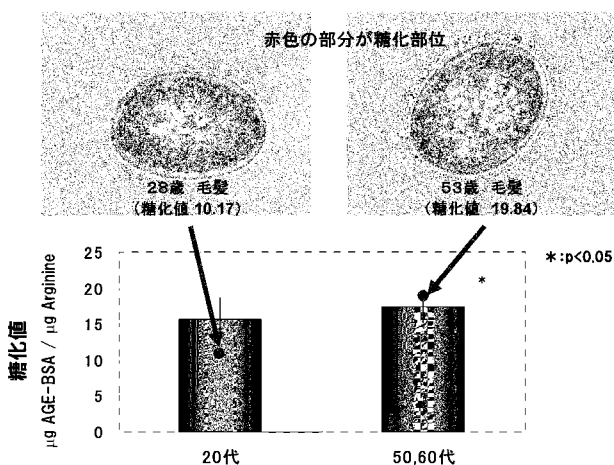
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

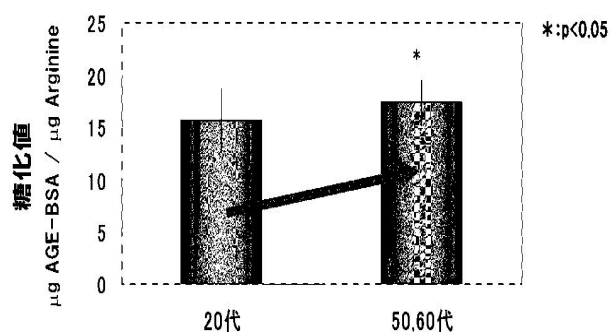
F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA11 BA13 BB21 BB24 BB30 BB35 CB16 DA30
DA35 DA44 FA16 FB01 FB02 FB03

专利名称(译)	用于鉴定头发的糖基化程度的方法和使用其的评估方法		
公开(公告)号	JP2011133371A	公开(公告)日	2011-07-07
申请号	JP2009293563	申请日	2009-12-24
[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	萩原基文 飯野雅人		
发明人	萩原 基文 飯野 雅人		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/48.P G01N33/53.S		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BA13 2G045/BB21 2G045/BB24 2G045/BB30 2G045/BB35 2G045/CB16 2G045/DA30 2G045/DA35 2G045/DA44 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03		
代理人(译)	志村光晴		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，找到一个现象作为头发老化的潜在指标，并轻松获得它。解决方案：本发明通过发现即使对于正常人来说由于老化而使头发的糖基化进展而完成，通过免疫染色可以在视觉上指示头发的糖基化的进展，并且该方法作为获取的手段非常令人满意。头发的糖基化程度。换句话说，发现通过提供一种通过对待染色的糖化蛋白质进行免疫染色并使染色图像可视化来指定毛发糖基化程度的方法和评价抗糖化作用的方法，可以解决该问题。通过使用指定方法改善头发蛋白质的组成。Z

【图 1】



【图 2】