

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7106525号

(P7106525)

(45)発行日 令和4年7月26日(2022.7.26)

(24)登録日 令和4年7月15日(2022.7.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 5/077(2010.01)

C 1 2 N 5/077

C 0 8 B 37/08 (2006.01)

C 0 8 B 37/08

A

請求項の数 3 (全13頁)

(21)出願番号 特願2019-513748(P2019-513748)

(86)(22)出願日 平成29年8月9日(2017.8.9)

(65)公表番号 特表2019-530445(P2019-530445
A)

(43)公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(86)国際出願番号 PCT/KR2017/008603

(87)国際公開番号 WO2018/048104

(87)国際公開日 平成30年3月15日(2018.3.15)

審査請求日 令和2年6月5日(2020.6.5)

(31)優先権主張番号 10-2016-0115364

(32)優先日 平成28年9月8日(2016.9.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 517142668

ザ インダストリー アンド アカデミック
コオペレーション イン チュンナム ナ
ショナル ユニバーシティー (アイエー
シー)大韓民国 3 0 5 - 7 6 4 デジョン, ユ
ソン - グ, デハク - ロ, 9 9 (グン - ド
ン, チュンナム ナショナル ユニバーシ
ティー)

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞培養用培地組成物

(57)【特許請求の範囲】

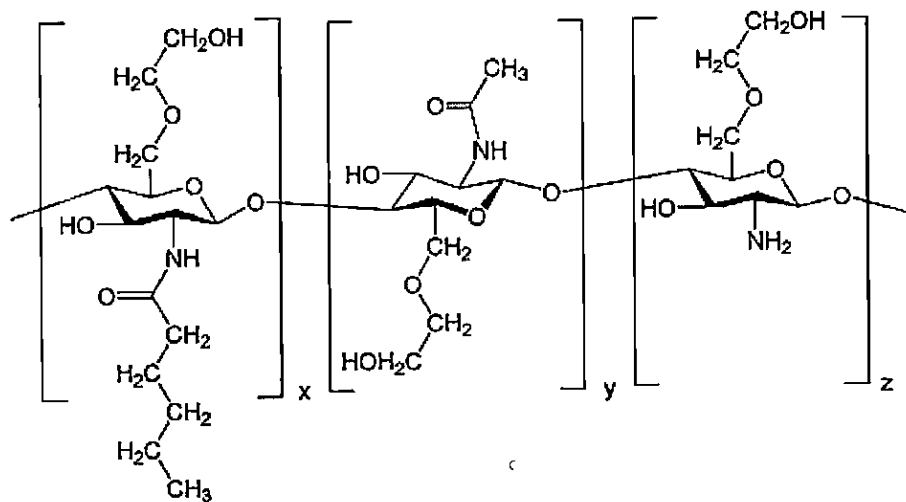
【請求項1】

下記化学式1で表されるヘキサノイルグリコールキトサン(Hexanoyl glycol chitosan: HGC)を0.1~0.25%(w/v)含み、ヘキサノイル基(Hexanoyl group、-C(=O)C₅H₁₁)の置換度が10~50%である細胞培養用培地組成物であって、

前記細胞培養用培地組成物は、ヒト由来線維芽細胞を培養するための培地組成物である細胞培養用培地組成物。

【化 1】

【化学式 1】



10

(ただし、前記化学式 1 において、 x 、 y 、 z は、10 ないし 10000 の整数で、これらのモル比は、 $0.1 \leq x \leq 0.5$ 、 $0.1 \leq y \leq 0.2$ 、及び $0.3 \leq z \leq 0.8$ である)

20

【請求項 2】

前記ヘキサノイルグリコールキトサンは、重量平均分子量 (M_w) が $100 \sim 5,000$ 、 000 であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養用培地組成物。

【請求項 3】

前記細胞培養用培地組成物は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、MEM (Minimal Essential Medium)、BME (Basal Medium Eagle)、RPMI 1640、F-10、F-12、DMEM-F12、 α -MEM (α -Minimal Essential Medium)、G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium)、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、McCoy's 5A 培地、AmnioMax、AminoMax complete Medium、Chang's Medium 及び MesenCult-XF Medium からなる群から選択される基本培地用組成物であることを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養用培地組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016年09月08日付韓国特許出願第10-2016-0115364号に基づく優先権の利益を主張し、当該韓国特許出願の文献に開示されている全ての内容は、本明細書の一部として含む。

40

【0002】

本発明は、細胞培養用培地組成物に係り、より詳しくは、ヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) を利用して細胞増殖を活性化させる細胞培養用培地組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

最近、動物や植物の体内で異なる役目をしている様々な器官、組織、及び細胞を生体外で増殖あるいは維持させるための技術が発展してきている。これらの器官、組織を生体外で増殖あるいは維持することは、それぞれの器官培養、組織培養と呼ばれ、器官、組織から分離された細胞を生体外で増殖、分化あるいは維持することは細胞培養と呼ばれている。

【0004】

50

細胞培養は、分離した細胞を培地の中で生体外で増殖、分化あるいは維持する技術であり、生体内の各種器官、組織、細胞の機能及び構造を詳細に解釈するための不可欠なものとなっている。また、当該技術によって培養された細胞及び／または組織は、化学物質、医薬品などの薬効及び毒性評価や、酵素、細胞増殖因子、抗体などの有用物質の大量生産、疾患や欠損によって失った器官、組織、細胞を補う再生医療、植物の品種改良、遺伝子組み換え作物の生産など、様々な分野で利用されている。

【 0 0 0 5 】

最近、細胞培養は、その技術達成によって、生命現象の解明だけでなく、ウイルスワクチン製造、バイオ医薬品生産、遺伝子治療や再生医療、免疫細胞治療法に利用することにも検討、実施されている。

10

【 0 0 0 6 】

一方、グリコールキトサンは、水溶性キトサン誘導体の一つで、親水性エチレングリコール基の導入により、中性のpHで水溶性を表す。以前の研究によれば、グリコールキトサンは非細胞毒性、生体適合性を表し、低濃度で軟骨細胞の成長を刺激すると報告されたことがある。

【 0 0 0 7 】

特に、グリコールキトサンのバックボーンに沿って存在するアミン基は、用途を改善するために変形可能な部位である。グリコールキトサンの特性を改善したり、新しい特性を与えるために様々な官能基または分子をグリコールキトサンバックボーンに取り入れたグリコールキトサン誘導体が提案されたことがある。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 文献 】韓国登録特許公報第 1 5 0 2 5 7 9 号「疎水性置換基を持つグリコールキトサン誘導体、この製造方法及び用途」

韓国公開特許公報第 2 0 1 6 - 0 0 2 7 6 6 9 号「温度感应性グリコールキトサン誘導体を用いたスフェロイド形成用培養容器及びこれを用いたスフェロイド形成方法」

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

上述したように、グリコールキトサンのバックボーンに沿って存在するアミン基の置換を通して、細胞培養技術に適する細胞培養用培地組成物に適用するために、本発明者らは多角的に研究した結果、本発明で示す細胞培養用培地組成物が細胞増殖率が有意的に向上させることを確認することで本発明を完成した。

30

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の目的は、生産効率が高く、細胞の増殖率を促進する細胞培養用培地組成物を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

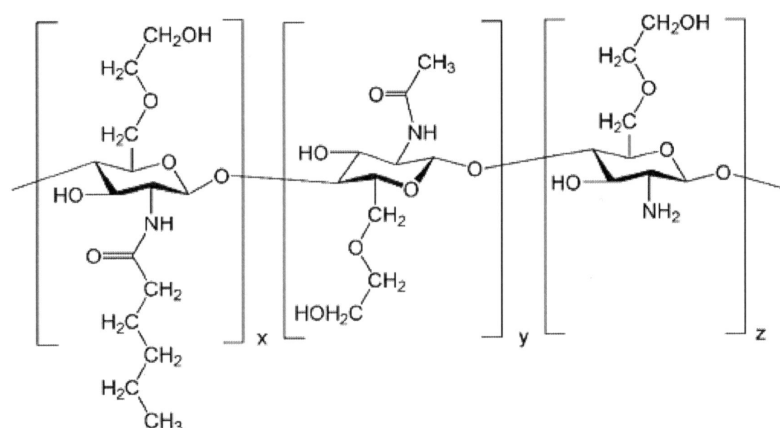
【 0 0 1 1 】

前記目的を達成するために、本発明は下記化学式 1 で表されるヘキサノイルグリコールキトサン (Hexanoyl glycol chitosan: HGC) を 0.1 ~ 0.5 % (w/v) 含み、ヘキサノイル基 (Hexanoyl group、 $-C(=O)C_5H_{11}$) の置換度が 10 ~ 50 % である細胞培養用培地組成物を提供する。

40

【化 1】

[化学式 1]



10

(ただし、前記化学式 1 において、 x 、 y 、 z は、1 0 ないし 1 0 0 0 0 の整数で、これらのモル%は $0.1 \leq x \leq 0.5$ 、 $0.1 \leq y \leq 0.2$ 、及び $0.3 \leq z \leq 0.8$ である)

【発明の効果】

【0012】

本発明による細胞培養用培地組成物は、ヘキサノイルグリコールキトサン (Hexanoyl glycol chitosan: HGC) を比較的に低濃度で含有するだけでも、細胞のモルフォロジーと生存率に影響を与えず、効果的に細胞増殖率を向上させることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】本発明による HGC 含有培地と HGC 未含有培地で培養された繊維芽細胞のモルフォロジーである。

【図 2】本発明による HGC 含有培地と HGC 未含有培地で培養された繊維芽細胞の蛍光顕微鏡イメージである。

【図 3】本発明による A549 細胞の HGC の濃度別細胞増殖率を示すデータである。

30

【図 4】本発明による角膜上皮細胞の HGC の濃度別細胞増殖率を示すデータである。

【図 5】本発明による繊維芽細胞の HGC の濃度別細胞増殖率を示すデータである。

【図 6】本発明による HGC 含有培地と HGC 未含有培地で培養された繊維芽細胞の細胞増殖率を示すデータである。

【図 7】本発明によるヘキサノイル基で置換されない GC 含有培地で培養された繊維芽細胞の細胞増殖率を示すデータである。

【図 8】本発明によるヘキサノイル基で 36% 置換された HGC 36 含有培地で培養された繊維芽細胞の細胞増殖率を示すデータである。

【図 9】本発明によるヘキサノイル基で 40% 置換された HGC 40 含有培地で培養された繊維芽細胞の細胞増殖率を示すデータである。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を具体的に説明する。

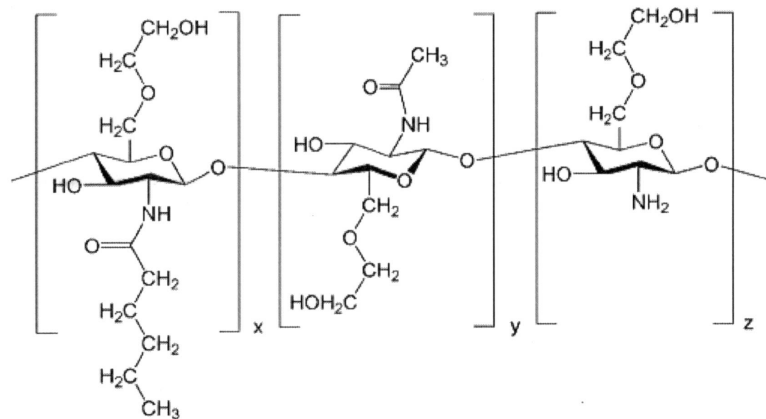
【0015】

本発明は、下記化学式 1 で表されるヘキサノイルグリコールキトサン (Hexanoyl glycol chitosan: HGC) を $0.1 \sim 0.5\%$ (w/v) 含み、ヘキサノイル基 (Hexanoyl group、 $-C(=O)C_5H_{11}$) の置換度が $10 \sim 50\%$ である細胞培養用培地組成物を示す。

50

【化 2】

[化学式 1]



10

(ただし、前記化学式 1 において、 x 、 y 、 z は、10 ないし 10000 の整数で、これらのモル%は、 $0.1 \leq x \leq 0.5$ 、 $0.1 \leq y \leq 0.2$ 、及び $0.3 \leq z \leq 0.8$ である)

【0016】

20

前記化学式 1 で表すヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) は、疎水性置換基を有するグリコールキトサン誘導体であって、5 位グリコール基 ($\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_4\text{OH}$) が存在し、2 位アミノ基 ($-\text{NH}_2$) の一部がアセチル基と疎水性 R 基で置換された構造で、より具体的に、ヘキサノイル基 (Hexanoyl group、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_5\text{H}_{11}$) で置換された化合物である。

【0017】

前記ヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) は重量平均分子量 (Mw) が 100 ないし 5,000,000 である。

【0018】

前記ヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) は、化学式 1 で表されるように、置換基としてグリコール基、アミノ基、アセチル基及び疎水性基が存在する。前記グリコール基とアミノ基は親水性を、アセチル基と疎水性基は疎水性を表し、本発明によるヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) は両親性高分子と言える。

30

【0019】

本発明による細胞培養用培地組成物を含む培地は、糖、アミノ酸、各種栄養物質、血清、成長因子、無機質などの細胞の成長及び増殖などに必須的要素を含む生体外 (in vitro) で細胞の成長及び増殖のための混合物であって、当業界では様々な培地が市販されており、人為的に製造して使うこともできる。市販中の培地としては、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、MEM (Minimal Essential Medium)、BME (Basal Medium Eagle)、RPMI 1640、F-10、F-12、DMEM-F12、 α -MEM (α -Minimal Essential Medium)、G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium)、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、McCoy's 5A 培地、AmnioMax、AminoMax II complete Medium 及び Chang's Medium MesenCult-XF Medium などがあり、人為的に製造することができる培地とともに、本発明の培地組成物に含まれる基本培地として使用してもよい。

40

【0020】

後述する本発明の実施例によれば、前記ヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) を有効成分として含むものの、比較的に低濃度で含有する。その含量が細胞の種類ごとに少し

50

差はあったが、全細胞培養用培地組成物の体積を基準として0.1～0.5% (w/v) 含有され、このような低濃度でも細胞のモルフォロジーと生存率に否定的影響を与えずに、効果的に細胞増殖率を向上させることができる。本発明の実験例1ないし4によれば、ヘキサノイル基 (Hexanoyl group、 $-C(=O)C_5H_{11}$) の置換度が10～50%の細胞培養用培地組成物で細胞増殖が促進されることを確認した。

【0021】

また、前記細胞培養用培地に含まれる成長因子としては、例えば、変換成長因子 (transforming growth factor- β 、TGF)、インスリン-類似成長因子 (insulin-like growth factor、IGF)、表皮成長因子 (epidermal growth factor、EGF)、神経細胞成長因子 (nerve growth factor、NGF)、血管内皮細胞成長因子 (vascular endothelial growth factor、VEGF)、繊維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor、FGF)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor、HGF)、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor、PDGF) 及び骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein、BMP) が可能である。

【0022】

本発明で示す前記ヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) を含む細胞培養用培地組成物を用いて培養できる細胞は、本発明で特に限定せず、該分野で公知された細胞の適用が可能であり、一例として上皮細胞、繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、心筋細胞、肝細胞、ヒト由来さい帯血細胞及び中間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor cell)、胚芽幹細胞 (Embryonic stem cell)、根毛細胞 (Myoblast)、心筋幹細胞 (Cardiac stem cell) などが利用されてもよく、より好ましくは、ヒト肺癌細胞株であるA549細胞、ヒト角膜上皮細胞及びヒト由来繊維芽細胞である。

【0023】

本発明で示す化学式1のヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) の製造方法には制限がないが、例えば、次の方法によって製造可能である。

出発物質としてグリコールキトサン公知の方法を利用して直接製造したり、市販されるものを購入して使用する。この時、市販のグリコールキトサンとしては、WAKO社、SIGMA社、東京化成社から販売しているものを購入して使用可能である。

前記反応は最終的に得ようとするヘキサノイルグリコールキトサン (HGC) 内でヘキサノイル基 (Hexanoyl group、 $-C(=O)C_5H_{11}$) の置換度によってグリコールキトサンとヘキサン酸無水物 (Hexanoic anhydride) のモル比を異にしてもよく、一例としてグリコールキトサンのアミン基とヘキサン酸無水物が1:0.1～1:70のモル比内で適宜調節してもよい。

【0024】

この時の反応は-10ないし60℃で、好ましくは、15ないし25℃で、反応時間は10ないし50時間であり、好ましくは、40ないし50時間行う。また、必要な場合、反応溶媒、触媒、反応終決剤などの使用が可能である。使用可能な溶媒は、本発明で特に限定せず、水、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどの低級アルコールと、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、トルエン、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、キシレン、ベンゼン、n-ブチルアセテート、メチルシクロヘキサン、ジメチルシクロヘキサン及びこれらの混合溶媒からなる群から選択された1種が可能である。

【実施例】

【0025】

以下、本発明の好ましい実施例及び実験例を記す。下記実施例及び実験例は、本発明をより明確に表現するための目的で記載するだけで、本発明の内容が下記実施例に限定されることではない。

10

20

30

40

50

【0026】

<実施例1> ヘキサノイルグリコールキトサン (Hexanoyl glycol chitosan: HGC) 合成

グリコールキトサン (GC) 3 g を 3 次蒸留水 375 mL に十分溶解させた後、蒸留水と同じ量のメタノール (Methanol) を添加して均一に攪拌した。グリコールキトサンの glucosamine 残基に対して 1 : 0.45 のモル比 (Molar ratio) でヘキサノ酸無水物 (Hexanoic anhydride) を一滴ずつ滴下した後、48 時間反応させた。以後、反応溶液をアセトン (Acetone) に沈殿し、遠心分離を通して高分子を得た。合成した高分子を透析膜 (Molecular weight cut off = 12,000 ~ 14,000) を利用して 3 日間 3 次蒸留水に透析し、凍結乾燥を通して最終パウダー形態でヘキサノイルグリコールキトサン (Hexanoyl glycol chitosan: HGC) を取得した。

10

【0027】

<実験例1> HGC の細胞適合性評価

HGC の細胞適合性を評価するために、細胞はヒトの肺から分離した繊維芽細胞 (Human lung fibroblast) を使用し、継代培養する間 10 % の牛胎児の血清と 1 % のペニシリン - ストレプトマイシンが含まれた DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培地を使用した。前記実施例 1 で製造した HGC を 0.25 % (w/v) で溶解して繊維芽細胞を培養し、HGC 未添加培地で培養した細胞を対照群 (Control) として使用した。

20

【0028】

A) HGC が繊維芽細胞のモルフォロジーに及ぼす影響

HGC が含まれた DMEM 培地で繊維芽細胞を培養した後、培養した繊維芽細胞を 0.05 % のトリプシン酵素を処理して単一細胞の形態で浮遊させ、DMEM 培地を利用して取得した。前記取得した細胞を計数して 5.6×10^4 個ずつ 35 mm 細胞培養プレートに敷いた後、37 °C、5 % 二酸化炭素培養器で培養した。24 時間後、HGC が含まれた培地に入れ替え、培地の入れ替え後、1 日目、3 日目に顕微鏡で繊維芽細胞のモルフォロジーを観察した。

図 1 を参考すれば、HGC が含まれた培地で培養された繊維芽細胞は、対照群である HGC 未含有培地で培養された繊維芽細胞と比べた時、本来の形態を保ちながらよく育つことを確認することができた。すなわち、HGC 処理の有無は、繊維芽細胞のモルフォロジーに大きい影響を及ぼさないことが分かった。

30

【0029】

B) HGC が細胞の生存率に及ぼす影響

HGC が含まれた DMEM 培地で繊維芽細胞を培養した後、培養した繊維芽細胞を 0.05 % のトリプシン酵素を処理して単一細胞形態で浮遊させ、DMEM 培地を利用して取得した。前記取得した細胞を 4 - well 細胞培養プレートに 15,000 個 / ウェル (cells / well) 単位で継代し、37 °C、5 % の CO₂ 培養器で培養した。24 時間後、HGC が含まれた培地に入れ替え、培地の入れ替えから 48 時間後、生存 / 死滅 (live / dead) 分析キットで染色して蛍光顕微鏡で観察した。

40

【0030】

図 2 を参考すれば、48 時間後、HGC が含まれた培地で培養された繊維芽細胞が対照群である HGC 未含有培地で培養された細胞と同様、大概緑色の蛍光を帯びていることを確認した。これを通して HGC は、繊維芽細胞の生存率にほとんど影響を及ぼさないことが分かった。

【0031】

<実験例2> HGC が細胞増殖に及ぼす影響

HGC が細胞の増殖活性に影響を及ぼすか否かを確認するために、MTT (3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide) assay を実施した。

50

【0032】

細胞は、ヒト肺癌細胞株であるA549、ヒト角膜上皮細胞 (Human corneal epithelial cell)、ヒト由来繊維芽細胞を使用した。継代培養する間、A549細胞は10%の牛胎児の血清と1%のペニシリン - ストレプトマイシンが含まれたRPMI 1640培地を使用し、角膜上皮細胞と繊維芽細胞の場合、10%の牛胎児の血清と1%のペニシリン - ストレプトマイシンが含まれたDMEM培地を使用した。また、前記実施例1で製造したHGCを0.1、0.25、0.5、1% (w/v) 濃度でそれぞれの細胞培養培地に溶解して細胞に処理し、HGC未添加培地で培養した細胞を対照群 (Control) として使用した。

【0033】

A) MTT assay を利用したA549細胞増殖評価

培養したA549細胞は、0.05%のトリプシン酵素を処理して単一細胞の形態で浮遊させた後、RPMI 1640培地を利用して収得した。前記収得したA549細胞を96-well細胞培養プレートで1000個/ウェル (cells/well) 単位で継代培養し、37、5%CO₂培養器で24時間培養した後、HGCが添加された培地に入れ替えた。培地の入れ替え日を0日目とし、それぞれ0~5日目、5mg/mlでPBSに溶解されたMTT溶液を各ウェル当たり20μlずつ処理し、37、5%CO₂培養器で2時間培養した。ホルマザン結晶が形成されたことを確認した後、上澄み液を取り除いた。DMSOを利用して結晶を溶かした後、540nmの波長帯でマイクロプレートリーダー (Microplate reader) を通して吸光度を測定し、細胞の増殖を確認した。

【0034】

図3で分かるように、HGCが添加された培地で培養されたA549細胞は、対照群であるHGC未添加培地で培養されたA549細胞と比べた時、時間の流れによる統計上、有意的により高い細胞増殖率を示すことを確認することができた。

【0035】

B) MTT assay を利用した角膜上皮細胞増殖評価

培養した角膜上皮細胞は、0.05%のトリプシン酵素を処理して単一細胞形態で浮遊させた後、DMEM培地を利用して収得した。前記収得した細胞を96-well細胞培養プレートに2000個/ウェル (cells/well) 単位で継代培養した後、前記A549細胞と同様の過程を経て培地入れ替えから0~7日目に吸光度を測定し、細胞の増殖を確認した。

図4で分かるように、HGCが添加された培地で培養された角膜上皮細胞は、全ての濃度での細胞増殖率がHGC未添加培地で培養した細胞の増殖率より高いことを確認することができ、特に、0.5% (w/v) 濃度の培地で培養された細胞が最も高い増殖率を示すことを確認した。

【0036】

C) MTT assay を利用した繊維芽細胞増殖評価

培養した繊維芽細胞は、0.05%のトリプシン酵素を処理して単一細胞の形態で浮遊させた後、DMEM培地を利用して収得した。前記収得した細胞を96-well細胞培養プレートに2000個/ウェル (cells/well) 単位で継代培養した後、前記A549細胞と同様の過程を経て培地入れ替えから0~7日目に吸光度を測定し、細胞の増殖を確認した。

【0037】

図5で分かるように、HGCが添加された培地で培養された繊維芽細胞は、HGC未添加培地で培養した細胞の増殖率より高く示されることを確認することができ、その中でも0.25% (w/v) 濃度の培地で培養された細胞が最も高い増殖率を示すことを確認した。

【0038】

< 実験例3 > HGC処理によるDNA含量比較

流細胞分離測定機 (Fluorescent activating cell sort

10

20

30

40

50

ing、FACS)を利用してHGCが繊維芽細胞の細胞周期に及ぼす影響を分析した。

【0039】

先ず、繊維芽細胞を35mm細胞培養プレートに 5.6×10^4 個ずつ継代培養した。24時間後、HGCが0.25%(w/v)添加された培地に入れ替えた。それぞれ1、3、5、7日目にトリプシン酵素を処理して繊維芽細胞を収得し、0.5%のTween 20が含まれた95%エタノールを添加して固定した。固定溶液を除去した後、ヨウ化プロピジウム(Propidium iodide)を添加して常温で30分間細胞のDNAを染色した。40 μ mの細胞ろ過器(Cell strainer)で細胞を通した後、流細胞分離測定機(FACS)を利用して細胞のDNA含量を測定した。

【0040】

図6で分かるように、HGCが添加された培地で培養された繊維芽細胞でG2/M周期を有する細胞の占める割合が、HGCを処理していない細胞群より高い割合を示すことを確認した。G2/M期に当たる細胞の割合が高いということは、細胞の増殖が比較的活発に行われるという意味で解釈されるので、上の結果と同様に、HGCが細胞の増殖を誘導するという結果を確認することができた。

【0041】

<実験例4> HGCの置換度が細胞増殖に及ぼす影響比較

化学的改質をしていないグリコールキトサン(GC)とヘキサノイル基の置換度(Degree of Substitution、DS)が異なる二種類のHGCが細胞増殖に及ぼす影響を比べるために、CKK-8(Cell counting kit-8) assayを実施した。HGCは、置換度が約36%であるHGC 36とDSが約40%であるHGC 40は使用し、それぞれ0.05、0.1、0.25%(w/v)で細胞培養培地に溶解して細胞に処理した。Controlは、GC及びHGC未添加培地で培養した細胞であり、細胞は繊維芽細胞を使用した。

【0042】

培養した繊維芽細胞は、0.05%のトリプシン酵素を処理して単一細胞の形態で浮遊させた後、DMEM培地を利用して収得した。前記収得した細胞を計数して96-well細胞培養プレートに2000個/ウェル(cells/well)単位で継代培養し、37、5%CO₂培養器で培養し、24時間後にGC、HGC 36、HGC 40が添加された培地に入れ替えた。培地の入れ替え後から1、3、5日目に、CKK-8溶液を各ウェル当たり10 μ lずつ処理し、37、5%CO₂培養器で1時間30分間培養した。Microplate readerを使って450nmの波長帯で吸光度を測定し、細胞の増殖を確認した。

【0043】

図7ないし図9で分かるように、HGCを添加した培地で培養した細胞(HGC 36、HGC 40)の場合、ControlとGCを添加した培地で培養した細胞と比べた時、比較的の高い細胞増殖率を示すことを確認することができた。また、HGC 36とHGC 40培地で培養した細胞を比べた時、置換度がより高いHGC 40培地で培養した細胞の細胞増殖率がより高いことを確認することができ、その中でも0.25%(w/v)の濃度が最も高い値を示すという結果を確認することができた。

10

20

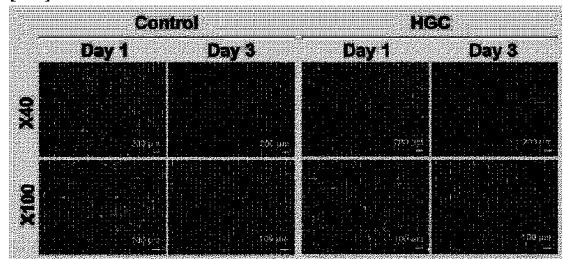
30

40

【図面】

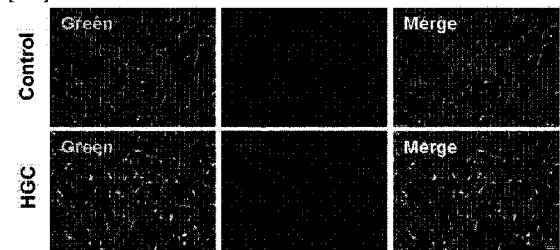
【図 1】

【図 1】



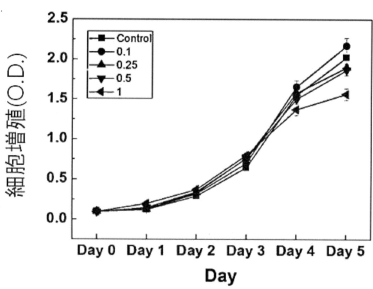
【図 2】

【図 2】

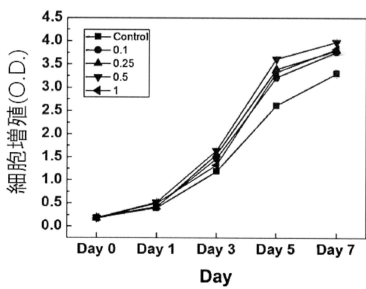


10

【図 3】



【図 4】



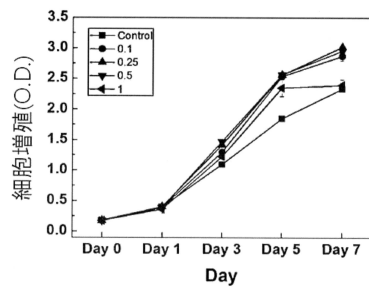
20

30

40

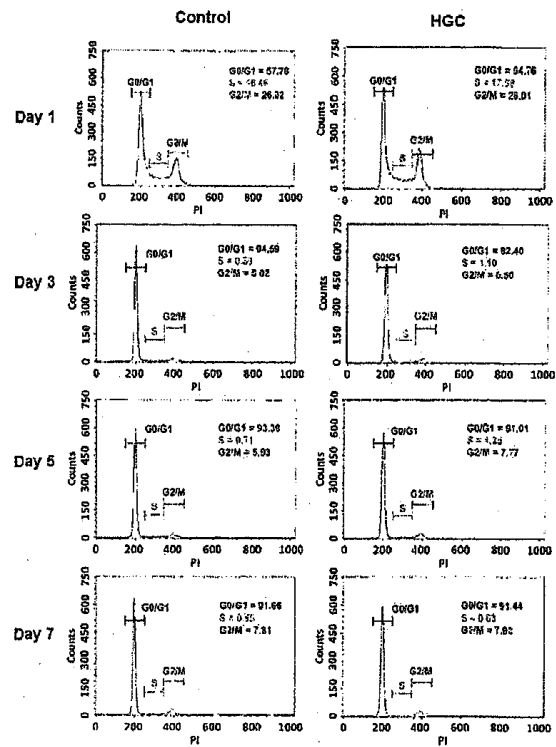
50

【図 5】



【図 6】

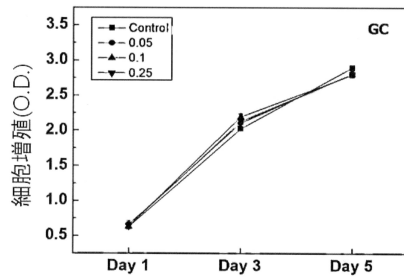
[E6]



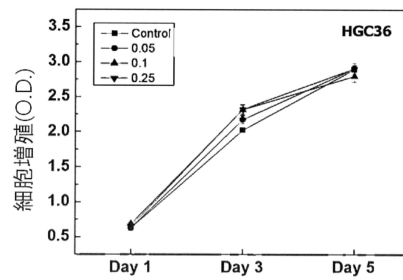
10

20

【図 7】



【図 8】

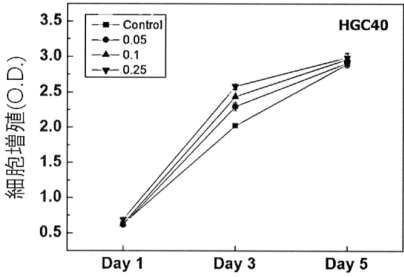


30

40

50

【 図 9 】



10

20

30

40

50

(72)発明者 カン・ム・ホ
大韓民国・テジョン・３４１４０・ユソン - グ・オウン - ロ・５７・１３１ - １５０３

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 韓国公開特許第１０ - ２０１６ - ００２７６６９（ＫＲ，Ａ）
特表２０１６ - ５０５６４３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００
Ｃ１２Ｎ ５／０７７
Ｃ０８Ｂ ３７／０８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）