



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114939097 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 26

(21) 申请号 202210686304.2

A61K 8/99 (2017.01)

(22) 申请日 2018.04.25

A61K 8/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 9/06 (2006.01)

62/500,117 2017.05.02 US

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/545 (2015.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 17/00 (2006.01)

201880029436.X 2018.04.25

A61P 17/02 (2006.01)

(71) 申请人 田边刚士

A61P 17/14 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州帕罗奥图市

A61P 43/00 (2006.01)

申请人 爱平世股份有限公司

A61Q 7/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

(72) 发明人 田边刚士 伊达朗 须藤健太

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司

公司 11286

专利代理师 陈宇 周爽

(51) Int. Cl.

A61K 8/98 (2006.01)

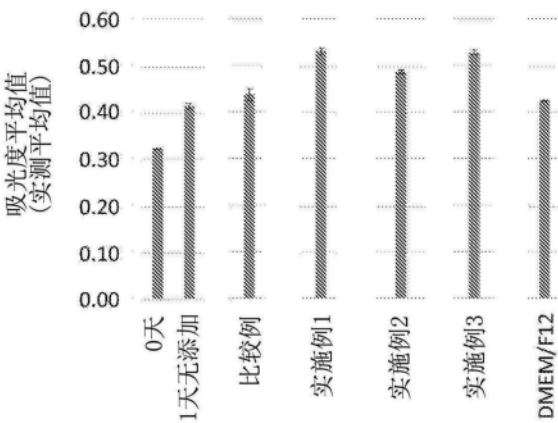
权利要求书1页 说明书14页 附图8页

(54) 发明名称

医药品组合物及化妆品组合物

(57) 摘要

本发明提供医药品组合物,该医药品组合物包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。医药品组合物中,干细胞是多能性干细胞。



成纤维细胞 增殖性试验 第1天
条线=平均值±SD, N=3

1. 一种胶原产生促进剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

2. 一种透明质酸产生促进剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

3. 一种创伤治疗剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

4. 一种表皮细胞增殖促进剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

5. 一种生发剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

6. 一种养发剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

7. 一种毛乳头细胞的活化剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

8. 一种成纤维细胞生长因子族产生促进剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

9. 一种血管内皮细胞增殖因子产生促进剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

10. 一种细胞保护剂,其从压力中保护成纤维细胞和表皮细胞,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

11. 一种细胞存活率提高剂,其使受到压力的成纤维细胞和表皮细胞的存活率提高,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

12. 一种针对皮肤的斑点、皱纹及松弛中任意其一的、形成防止及改善剂,

包含将NANOG、OCT3/4、以及TRA 1-60为阳性的诱导多能性干细胞以未分化状态保持培养后的悬浮凝胶培养基的上清液。

医药品组合物及化妆品组合物

[0001] 本申请是向中国国家知识产权局提交的申请日为2018年4月25日的发明名称为“医药品组合物及化妆品组合物”的第201880029436.X号申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及医药品组合物及化妆品组合物。

背景技术

[0003] 胚胎干细胞(ES细胞)是从人类或老鼠的早期胚胎建立的干细胞。ES细胞具有能向生物体中存在的全部的细胞分化的多能性。当前,人类ES细胞能够利用于针对帕金森病、青少年糖尿病、及白血病等许多疾病的细胞移植疗法。但是,对于ES细胞的移植,也有障碍。特别是,ES细胞的移植会引起与在不成功的脏器移植之后发生的排斥反应同样的免疫排斥反应。另外,针对破坏人类胚胎而建立的ES细胞的利用,从伦理观点考虑,批判和反对意见较多。

[0004] 在这样的背景情况下,京都大学的山中伸弥教授成功地通过将四种基因:Oct3/4、Klf4、c-Myc、及Sox2导入到体细胞,从而建立了诱导多能性干细胞(iPS细胞)。由此,山中教授获得2012年的诺贝尔生理学/医学奖(例如,参照专利文献1)。iPS细胞是没有排斥反应和伦理性问题的理想的多能性细胞。因此,期待iPS细胞在细胞移植疗法中的利用。另一方面,有将在iPS细胞的培养中使用过的培养基再利用于医药品组合物中的报告(例如,参照专利文献2)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特许第4183742号公报,

[0008] 专利文献2:日本特开2016-128396号公报。

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 但是,本发明者们经过验证,认为:专利文献2中记载的培养方法中,由于iPS细胞分化了,因此,实际上,被再利用的培养基,不是培养iPS细胞的培养基,而是培养分化后的细胞的培养基。本发明的目的之一在于,提供有效利用了iPS细胞等干细胞的培养基的医药品组合物及化妆品组合物。

[0011] 解决问题的方案

[0012] 本发明者们进行专心研究的结果,发现将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液成为医药品或者化妆品的有效成分。

[0013] 根据本发明的形态,提供一种医药品组合物或医药品组合物原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供医药品组合物或医药品组合物原料中使用的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在医药品组合物

或医药品组合物原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0014] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的医药品组合物向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物或者植物。

[0015] 根据本发明的形态,提供一种包含上述的医药品组合物的针对皮肤的斑点、皱纹及松弛中任意其一的形成防止及改善剂。另外,根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含上述的医药品组合物的针对皮肤的斑点、皱纹及松弛中任意其一的形成防止及改善剂向对象投药或涂敷。对象也可以是人类或非人类动物。

[0016] 根据本发明的形态,提供一种化妆品组合物或化妆品组合物原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供化妆品或化妆品组合物原料中使用的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在化妆品组合物或化妆品组合物原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0017] 根据本发明的形态,提供一种包含上述的化妆品组合物的针对皮肤的斑点、皱纹及松弛中任意其一的形成防止和改善剂。另外,根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含上述的化妆品组合物的针对皮肤的斑点、皱纹及松弛中任意其一的形成防止和改善剂向对象投药或涂敷。对象也可以是人类或非人类动物。

[0018] 根据本发明的形态,提供一种胶原产生促进剂或胶原产生促进剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于促进胶原产生的将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在胶原产生促进剂或胶原产生促进剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0019] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的胶原产生促进剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0020] 根据本发明的形态,提供一种透明质酸产生促进剂或透明质酸产生促进剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于促进透明质酸产生的将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在透明质酸产生促进剂或透明质酸产生促进剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0021] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的透明质酸产生促进剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0022] 根据本发明的形态,提供一种创伤治疗剂或创伤治疗剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于创伤的治疗的将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在创伤治疗剂或创伤治疗剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养

基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0023] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的创伤治疗剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0024] 根据本发明的形态,提供一种表皮细胞增殖促进剂或表皮细胞增殖促进剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于促进表皮细胞的增殖的将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在表皮细胞增殖促进剂或表皮细胞增殖促进剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0025] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的表皮细胞增殖促进剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0026] 根据本发明的形态,提供一种生发剂或生发剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于生发的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在生发剂或生发剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0027] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的生发剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0028] 根据本发明的形态,提供一种毛乳头细胞的活化剂或毛乳头细胞的活化剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供作为毛乳头细胞的活化剂或毛乳头细胞的活化剂原料而使用的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在毛乳头细胞的活化剂或毛乳头细胞的活化剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0029] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的毛乳头细胞向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0030] 根据本发明的形态,提供一种成纤维细胞生长因子(FGF)族产生促进剂或FGF族产生促进剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于促进FGF族的产生的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。作为FGF族的例,是FGF-2及FGF-7。在FGF族产生促进剂或FGF族产生促进剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0031] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的FGF产生促进剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0032] 根据本发明的形态,提供一种血管内皮细胞增殖因子(VEGF)产生促进剂或VEGF产生促进剂原料,其包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于促进VEGF的产生的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在VEGF产生促进剂或VEGF产生促进剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0033] 根据本发明的形态,提供一种治疗方法,包含以下步骤:将包含培养基的上清液的VEGF产生促进剂向对象投药或涂敷,该培养基是将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基。对象也可以是人类或非人类动物。

[0034] 根据本发明的形态,提供一种细胞保护剂或细胞保护剂原料,其保护细胞免受压力,包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于保护细胞免受压力的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在细胞保护剂或细胞保护剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0035] 根据本发明的形态,提供一种细胞存活率提高剂或细胞存活率提高剂原料,其提高受到压力后的细胞的存活率,且包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于提高受到压力后的细胞的存活率的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在细胞存活率提高剂或细胞存活率提高剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0036] 根据本发明的形态,提供一种生物材料保护剂或生物材料保护剂原料,其保护由核酸、蛋白质、蛋白质复合体、脂蛋白、核糖体、及生物膜构成的组中选择的至少一种生物材料免受压力,包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。换言之,提供用于保护由核酸、蛋白质、蛋白质复合体、脂蛋白、核糖体、及生物膜构成的组中选择的至少一种生物材料免受压力的、将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。在生物材料保护剂或生物材料保护剂原料中,干细胞也可以是多能性干细胞。多能性干细胞也可以是iPS细胞。多能性干细胞也可以是ES细胞。培养基也可以是凝胶培养基。培养基也可以包含结冷胶。

[0037] 发明效果

[0038] 根据本发明,能够提供有效利用了干细胞的培养基的医药品组合物及化妆品组合物。

附图说明

[0039] 图1是表示实施例4的成纤维细胞的增殖性试验的结果的图表。

[0040] 图2是表示实施例4的成纤维细胞的增殖性试验的结果的图表。

[0041] 图3是表示实施例5的基于成纤维细胞的胶原产生试验的结果的图表。

[0042] 图4是表示实施例5的基于成纤维细胞的胶原产生试验的结果的图表。

[0043] 图5是表示实施例5的基于成纤维细胞的透明质酸产生试验的结果的图表。

[0044] 图6是表示实施例6的表皮细胞的游走能力试验的结果的照片。

- [0045] 图7是表示实施例6的表皮细胞的游走能力试验的结果的图表。
- [0046] 图8是表示实施例7的毛乳头细胞的增殖性试验的结果的图表。
- [0047] 图9是表示实施例8的基于毛乳头细胞的FGF-7产生试验的结果的图表。
- [0048] 图10是表示实施例8的基于毛乳头细胞的VEGF产生试验的结果的图表。

具体实施方式

[0049] 下面,对本发明的实施方式详细地进行说明。此外,下面所示的实施方式是示例地显示了用于将本发明的技术思想具体化的装置和方法,本发明的技术思想的构成部件的组合等不特定于下述内容。可以在权利要求中加上对于本发明的技术思想进行各种改变的内容。

[0050] 实施方式的医药品组合物、医药品组合物原料、化妆品组合物、及化妆品组合物原料,分别包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液。干细胞例如是人工多能性(iPS)干细胞、以及胚胎干细胞(ES细胞)等多能性干细胞。干细胞可以被黏附培养,也可以被悬浮培养。

[0051] 作为干细胞用培养基,例如,可以使用TeSR2(STEMCELL Technologies(加拿大干细胞技术有限公司))等人类ES/iPS培养基。但是,干细胞用培养基不限于此,可以使用各种干细胞培养基。例如也可以利用Primate ES Cell Medium(灵长类动物干细胞培养基,饲养层培养)、Reprostem(灵长类ES/iPS细胞用培养基,饲养层培养)、ReproFF(灵长类ES/iPS细胞用培养基,无饲养层)、ReproFF2(灵长类ES/iPS细胞用培养基,无饲养层)、ReproXF(灵长类ES/iPS细胞用培养基,无异源蛋白成分)(Reprocell)、mTeSR1(人类ES/iPS细胞用培养基)、TeSRE8(人类ES/iPS细胞用培养基)、ReproTeSR(血细胞重编程培养基)(STEMCELL Technologies)、PluriSTEM(注册商标)Human ES/iPS Medium(人类ES/iPS培养基)(Merck:默克集团)、NutriStem(注册商标)XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells(XF/FF人类IPS和ES细胞的培养基)、Pluriton reprogramming medium(体细胞编程培养基)(Stemgent)、PluriSTEM(注册商标)、Stemfit AK02N(人类iPS细胞用培养基)、Stemfit AK03(人类iPS细胞用培养基)(Ajinomoto,日本味之素集团)、ESC-Sure(注册商标)serum and feeder free medium for hESC/iPS(人类ESC/iPS无血清/无饲养层培养基)(Applied StemCell,美国基因编辑公司)、L7(注册商标)hPSC Culture System(人类多功能干细胞培养体系)(LONZA,瑞士龙沙公司)、及Primate ES Cell Medium(灵长类动物胚胎干细胞培养基)(日本ReproCELL公司)等。

[0052] 或者,作为干细胞用培养基,也可以是血清替代品、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸溶液、2-巯基乙醇、及添加了盘尼西林/链霉素的杜氏改良伊格尔培养基/哈姆F-12(DMEM/F12)。干细胞用培养基也可以包含basic fibroblast growth factor(bFGF)(碱性成纤维细胞生长因子)等生长因子。

[0053] 在悬浮培养干细胞的情况下,使用凝胶培养基。例如通过向干细胞用培养基以终浓度为0.5重量%至0.001重量%、0.1重量%至0.005重量%、或者0.05重量%至0.01重量%的方式添加低酰基结冷胶等结冷胶来制备凝胶培养基。此外,本发明中,所谓结冷胶被设为包括低酰基结冷胶。

[0054] 凝胶培养基也可以包含由透明质酸(hyaluronic acid)、鼠李聚糖胶(Rhamsan

gum)、黛玉滩糖胶(Daiyutan gum)、黄原胶(xanthan gum)、角叉菜胶(carrageenan)、褐藻糖胶(fucoidan)、果胶、果胶酸、果冻酸、硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)、肝素(heparin)、硫酸类肝素(heparitin sulfate)、硫酸角质素(Keratan sulfate)、硫酸软骨素(Chondroitin sulfate)、硫酸皮肤素(Dermatan sulfate)、硫酸鼠李聚糖(rhamnan sulfate)、以及它们的盐构成的组中选择的至少一种高分子化合物。另外,凝胶培养基也可以包含甲基纤维素、以及溶血磷脂酸及1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate)等类脂物。通过含有这些物质,细胞彼此之间的凝集被进一步抑制。

[0055] 或者,凝胶培养基也可以包含从聚甲基丙烯酸甘油酯(poly(glycerol monomethacrylate)(PGMA))、聚(2-羟丙基甲基丙烯酸酯)(poly(2-hydroxypropyl methacrylate)(PHPMA))、聚N-异丙基丙烯酰胺(Poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAM))、胺封端(amine terminated)、羧酸封端(carboxylic acid terminated)、马来酰亚胺封端(maleimide terminated)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯封端(N-hydroxysuccinimide(NHS) ester terminated)、三乙氧基硅烷封端(triethoxysilane terminated)、聚N-异丙基丙烯酰胺-CO-丙烯酸(Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-CO-丙烯酸)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-CO-丙烯酸丁酯)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-CO-甲基丙烯酸)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-CO-甲基丙烯酸-CO-丙烯酸十八酯)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate))、及N-异丙基丙烯酰胺(N-Isopropylacrylamide)中选择的至少温度感应型凝胶。

[0056] 也可以在凝胶培养基中例如以使得终浓度为1000 $\mu\text{mol/L}$ 以上且0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、100 $\mu\text{mol/L}$ 以上且1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、或者5 $\mu\text{mol/L}$ 以上且20 $\mu\text{mol/L}$ 以下的方式添加ROCK(Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil forming protein kinase))抑制剂。通过在凝胶培养基中添加ROCK抑制剂,从而促进了基于干细胞的菌落形成。

[0057] 凝胶培养基例如也可以不包含bFGF等生长因子。或者,也可以凝胶培养基以400 $\mu\text{g/L}$ 以下、100 $\mu\text{g/L}$ 以下、40 $\mu\text{g/L}$ 以下、或10 $\mu\text{g/L}$ 以下的低浓度包含bFGF等生长因子。

[0058] 另外,凝胶培养基也可以不包含TGF- β (转化生长因子- β)、或者以600ng/L以下、300ng/L以下、或100ng/L以下的低浓度包含TGF- β 。

[0059] 例如,干细胞在被悬浮培养之前被分解为单细胞,被分解为单细胞的干细胞被投入到凝胶培养基。不搅拌凝胶培养基。单细胞保持克隆性及未分化的状态不变进行增殖,在凝胶培养基中形成菌落。对于干细胞是否保持着未分化的状态,可以通过检查细胞是否表达未分化标记物来进行确认。

[0060] 对干细胞进行保持培养时的温度例如为37 $^{\circ}\text{C}$ 。对干细胞进行保持培养时的二氧化碳的浓度例如是5%。对干细胞进行保持培养的期间例如是1日以上且90日以下、2日以上且60日以下、5日以上且30日以下、或者7日以上且21日以下。对于将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液,也可以通过过滤及离心等,除去干细胞。

[0061] 实施方式的医药品组合物也可以是皮肤涂敷组合物。实施方式的医药品组合物也可以是皮肤疾病治疗剂。作为能够通过实施方式的皮肤疾病治疗剂治疗的疾病的例,可例

举：寻常性痤疮、寻常性牛皮癣、瘢痕瘤、脂溢性皮炎、接触性皮炎、异位性皮炎、异位性干燥性皮炎、皮肤疏松症 (dermatoporosis)、光化性弹性纤维病、日光性角化病、眼睑下垂症、簇状脱发症、头发脱发症、睫毛贫毛症、褐黄斑、老年性色斑、痱子、雀斑、迟发性两侧性太田胎记、脂漏性角化病、早衰症引起的皮肤疾病、以及单纯疱疹等。

[0062] 作为通过实施方式的化妆品组合物能够改善或解除的状态的例，可例举：斑点、雀斑、皱纹、松弛、不柔和、皮肤弹性下降、暗淡、敏感肌肤、干燥肌肤、及少发等。作为实施方式的化妆品组合物的效果，可例举：调整肌肤、调整肌肤的纹理、保持肌肤健康、防止肌肤粗糙、收紧肌肤、给皮肤带来湿润、补充保持皮肤的水分及油分、保持皮肤的柔软性、保护皮肤、防止皮肤干燥、使肌肤柔软、给肌肤带来弹力、给肌肤带来光泽、使肌肤滑润、给肌肤弹力、使斑点不显眼、抑制皱纹及使肌肤发亮等。而且，作为实施方式的化妆品组合物的与头皮或头发有关的效果，可例举：保持头皮健康、生发、预防少发、预防发痒、预防脱发、促进养发、促进生发、预防病后或产后脱发、及养发等。

[0063] 实施方式的医药品组合物也可以是创伤治疗剂、表皮细胞增殖促进剂、表皮再生促进剂、生发剂、养发剂、及睫毛贫毛症治疗药。实施方式的医药品组合物及化妆品组合物也可以是胶原产生促进剂、透明质酸产生促进剂、生发剂、成纤维细胞生长因子 (FGF) 族产生促进剂、及血管内皮细胞增殖因子 (VEGF) 产生促进剂。

[0064] 在头发的生长中，毛根的毛母细胞分裂，在此产生的细胞不断地构成头发。另一方面，在头发的生长中，有称为毛发周期的周期，重复生长期、退化期、及休止期。毛乳头细胞通过增殖因子的产生与释放，对毛囊上皮干细胞的增殖及分化带来影响，控制着毛发周期。可以说毛乳头细胞、毛母细胞的活性化对毛发生长的机制带来贡献。另外，与毛发周期相应地，在毛囊中活泼地进行血管的重塑，但是，若这时的血管形成存在问题，则用于头发形成的营养、氧的供给变得不充分。可以说，来自毛囊血管网的血流的不足涉及到男性型脱发症 (AGA) 的病态。

[0065] 关于毛乳头细胞的基因和生发及毛发生长，已知如下情况。即，作为乳头细胞向毛母细胞分泌的增殖因子，已知有 FGF-7 及 IGF-1 等。这些基因有保持毛囊生长的作用。血管内皮生长因子 (VEGF) 从毛乳头细胞分泌，并与毛囊血管的增生有关，另外，具有以自分泌方式使毛乳头细胞增殖的效果，但是，随着从生长期向退化期转移，表达量减少。VEGF 基因在 AGA (男性型脱发症) 的毛发组织中表达降低。VEGFB (血管内皮生长因子 B) 竞相与 VEGF 作用的受体即 VEGFR-1 结合。VEGFB 保持血管内皮细胞的增殖和渗透性亢进活性，但是，在毛囊中的效果不清楚。

[0066] 实施方式的医药品组合物及化妆品组合物具有以下效果：直接作用于毛乳头，提高生发促进因子即 FGF-7 的产生量并促进生发，从而使毛发周期的生长期变长，从细弱的毛发养育成粗硬的毛发的效果，和提高血管内皮生长因子 (VEGF)，从毛乳头细胞被分泌并涉及到毛囊血管的增生，另外，以自分泌的方式使毛乳头细胞增殖的效果。

[0067] 在将实施方式的医药品组合物及化妆品组合物作为养发剂或生发剂而使用的情况下，也可以包含米诺地尔 (Minoxidil)、当药、D-泛醇乙醚 (Pantothenyl ethylether)、维生素 E 醋酸酯、甘草酸钾、及腺苷等其他有效成分。

[0068] 作为通过实施方式的创伤治疗剂能够治疗的创伤的例，可例举：烧伤、皮肤擦伤、划破、撞伤、缝合伤、褥疮、及无皮创伤等。

[0069] 实施方式的医药品组合物或化妆品组合物也可以是包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液的、保护细胞免受压力的细胞保护剂。另外,实施方式的医药品组合物或化妆品组合物也可以是包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液的、使受到压力的细胞稳定,例如提高存活率的细胞存活率提高剂。受到压力的细胞例如是成纤维细胞、表皮细胞、及毛乳头细胞,但是不限于这些细胞,也可以是任何细胞。或者,实施方式的医药品组合物或化妆品组合物也可以是包含将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液的、保护由核酸、蛋白质、蛋白质复合体、脂蛋白、核糖体、及生物膜构成的组中选择的至少一种生物材料的生物材料免受压力的保护剂。在此,生物膜包括细胞膜。

[0070] 实施方式的医药品组合物及化妆品组合物含有将干细胞以未分化状态保持培养后的培养基的上清液有效量。在此,所谓有效量是指,作为医药品组合物或者化妆品组合物而能够发挥效用的量。有效量根据患者的年龄、对象疾病、有无其他成功成分、及其他配合物的量,适当地设定。

[0071] 实施方式的医药品组合物及化妆品组合物也可以包含制剂上允许的载体、赋形剂、衰变剂、缓冲剂、乳化剂、助悬剂、无痛化剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、及生理盐水等。作为赋形剂的例,可例举:乳糖、淀粉、山梨糖醇、D-甘露糖醇、及白糖。作为衰变剂的例,可例举:羧甲基纤维素、及碳酸钙。作为缓冲剂的例,可例举:磷酸盐、柠檬酸盐、及醋酸盐。作为乳化剂的例,可例举:阿拉伯胶、褐藻酸钠、及黄芪树胶。

[0072] 作为助悬剂的例,可例举:甘油单硬脂酸酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、及月桂硫酸钠。作为无痛化剂的例,可例举:苯甲醇、氯代丁醇、及山梨糖醇。作为稳定剂的例,可例举:丙二醇、及抗坏血酸。作为保存剂的例,可例举:苯酚、氯化苯甲烃铵、苯甲醇、氯代丁醇、及对羟基苯甲酸甲酯。作为防腐剂的例,可例举:氯化苯甲烃铵、对羟苯甲酸、及氯代丁醇。

[0073] 另外,可以在实现实施方式的医药品组合物及化妆品组合物的目的的范围内,在实施方式的医药品组合物及化妆品组合物中,混合水、乙醇、表面活性剂(阳离子、阴离子、非离子、及两性表面活性剂等)、保湿剂(甘油、1,3丁二醇、丙二醇、1,2丙二醇、戊二醇、聚季铵盐、氨基酸、尿素、吡咯烷酮羧酸盐、核酸类、单糖类、及低聚糖等、以及它们的衍生物等)、增稠剂(多糖类、聚丙烯酸盐、羧乙烯聚合物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、甲壳素、几丁聚糖、海藻酸、角叉菜胶、黄原胶、及甲基纤维素等、以及它们的衍生物等)、蜡、凡士林、烃饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、及硅油等、以及它们的衍生物、辛酸/癸酸甘油三酯、及三辛酸甘油酯等甘油酯类、硬脂酸异丙酯等酯油类、天然油脂类(橄榄油、椿油、牛油果油、杏仁油、可可油、月见草油、葡萄籽油、全缘叶澳洲坚果油、桉叶油、蔷薇果油、角鲨烷、大西洋胃胸鲷油、羊毛脂、及神经酰胺等)、防腐剂(羟基苯甲酸衍生物、脱氢醋酸盐、感光素、山梨酸、及苯氧乙醇等、以及它们的衍生物等)、杀菌剂(硫黄、三氯碳酰替苯胺、水杨酸、吡硫鎓锌、及日扁柏醇等、以及它们的衍生物等)、紫外线吸收剂(对胺苯甲酸、及甲氧基肉桂酸等、以及它们的衍生物等)、抗炎药(尿囊素、没药醇、 ϵ -氨基己酸、乙酰法尼基半胱氨酸、及甘草酸等、以及它们的衍生物等)、抗氧化剂(生育酚、BHA、BHT、及虾青素等、以及它们的衍生物等)、络合剂(依地酸、及羟基乙叉二膦酸等、以及它们的衍生物等)、动植物提取物(八丈草、芦荟、营实、斯克妥、黄柏、海藻、木梨、母菊、甘草、几维果、黄瓜、桑叶、白桦、当归、大蒜、牡丹、蛇麻

草、欧洲七叶树、薰衣草、迷迭香、桉树、牛奶、各种缩氨酸、胎盘、蜂王浆、梭微子提取物、水解梭微子提取物、及梭微子油等、以及它们的含有成分提纯物或发酵物等)、pH调整剂(无机酸、无机酸盐、有机酸、及有机酸盐等、以及它们的衍生物等)、维生素类(维生素A类、维生素B类、维生素C、维生素D类、泛醌、及烟酰胺等、以及它们的衍生物等)、酵母、曲霉及乳酸菌的发酵液、复膜酵母菌发酵产物培养液、美白剂(传明酸、传明酸十六烷基酯、4-正丁基间苯二酚、熊果素、曲酸、鞣花酸、甘草黄酮、烟酰胺、及维生素C衍生物等)、神经酰胺/神经酰胺衍生物、抗皱剂(松香油、及视黄醛、以及它们的衍生物、烟酰胺、及寡肽等、以及它们的衍生物等、中性粒细胞弹性蛋白酶抑制、以及MMP-1及MMP-2抑制作用的某种天然及合成成分等)、氧化钛、滑石、云母、硅石、氧化锌、氧化铁、硅、及对它们进行加工处理得到的粉体类等。

[0074] 此外,能够添加到实施方式的医药品组合物及化妆品组合物中的成分不限于上述,如果是能够使用于医药品组合物及化妆品组合物中的成分,可以自由选择。在将实施方式的医药品组合物及化妆品组合物作为湿敷剂使用的情况下,除了上述成分,还可以在实现目的范围内混合主剂(高岭土、及膨润土等)、胶凝剂(聚丙烯酸盐、及聚乙烯醇等)。在将实施方式的医药品组合物及化妆品组合物作为沐浴露使用的情况下,也还可以在实现目的范围内适当混合硫酸盐、碳酸氢盐、硼酸盐、色素、及保湿剂,而制备成香粉类型、液剂类型。

[0075] 可以通过本技术领域中公知惯用的方法制造实施方式的医药品组合物及化妆品组合物。

[0076] 实施例1

[0077] (实施例1:将干细胞保持培养后的培养基的上清液的制备)

[0078] 在5mL的L-谷氨酰胺(25030-081,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司))、5mL的非必需氨基酸溶液(11140-050,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司))、1mL的2-巯基乙醇(21985-023,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司))、2.5mL的盘尼西林/链霉素(15140-122,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司))中添加DMEM/F12(10565-018,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司))、及血清替代品(KSR:KnockOut Serum Replacement(注册商标),10828028,Invitrogen(美国英杰生命技术有限公司)),制成了总量为500mL的培养基。对该培养基添加0.2mL的10 μ g/mL bFGF(basic fibroblast growth factor,R and D(碱性成纤维细胞生长因子-R和碱性成纤维细胞生长因子-D)),成为干细胞用培养基。干细胞用培养基中的bFGF的浓度是4ng/mL。

[0079] 使用如上述那样制成的干细胞用培养基,在黏附培养用培养皿上的饲养细胞上,对人类iPS细胞进行了黏附保持培养。每一周对人类iPS细胞进行传代。在传代时,利用包含0.25%的胰蛋白酶、0.1mg/mL的胶原酶IV、1mmol/L的CaCl₂、及20%的KSR的剥离溶液,对人类iPS细胞进行了处理。

[0080] 使用ES细胞解离液(TrypLE Select(注册商标),ThermoFisher(美国赛默飞世尔科技公司))从黏附培养用培养皿中,剥下如上述那样被保持培养的人类iPS细胞。将剥下的人类iPS细胞播种到利用层粘连蛋白(日本Nippi公司)包被的盘上。之后,使用添加了10 μ mol/L的ROCK抑制剂的TeSR2培养基(Stemcell(加拿大干细胞技术有限公司)),对人类iPS细胞培养了一周。每天进行培养基替换。

[0081] 之后,将培养基置换为干细胞用培养基,两天后,回收干细胞用培养基的上清液。

使回收到的干细胞用培养基的上清液,以1500转离心5分钟,在将培养基的上清液再次回收后,以3000转离心3分钟,将离心后的干细胞用培养基的上清液通过0.22 μ m的过滤器进行了过滤。将过滤后的干细胞用培养基的上清液作为实施例1的上清液溶液。

[0082] 另外,确认了被保持培养后的iPS细胞的作为未分化标记物的NANOG、OCT3/4、及TRA 1-60为阳性。

[0083] (实施例2:将干细胞保持培养后的培养基的上清液的制备)

[0084] 与实施例1同样地对人类iPS细胞保持培养。之后,与实施例1同样地,将人类iPS细胞从黏附培养用培养皿中剥下,分割为单细胞。接着,在添加结冷胶及10 μ mol/L的ROCK抑制剂(美国Selleck(赛力克)公司)而进行了凝胶化后的干细胞用培养基上,播种人类iPS细胞,将人类iPS细胞悬浮培养了21天。这期间,两天一次,向培养器补充凝胶化后的干细胞用培养基。

[0085] 之后,将悬浮着人类iPS细胞的凝胶化干细胞用培养基利用网眼过滤器进行过滤,除去细胞块。进而,将过滤后的凝胶化干细胞用培养基以1500转离心5分钟来使细胞和凝胶沉淀,在将离心后的干细胞用培养基的上清液再次回收后,以3000转离心3分钟,将离心后的干细胞用培养基的上清液利用0.22 μ m的过滤器进行了过滤。将过滤后的干细胞用培养基的上清液作为实施例2的上清液溶液。

[0086] 另外,确认了被保持培养后的iPS细胞的作为未分化标记物的NANOG、OCT3/4、及TRA 1-60为阳性。

[0087] (实施例3:将干细胞保持培养后的培养基的上清液的制备)

[0088] 与实施例1同样地对人类iPS细胞保持培养。之后,与实施例1同样地,将人类iPS细胞从黏附培养用培养皿中剥下,分割为单细胞。接着,在添加结冷胶及100 μ mol/L的ROCK抑制剂(美国Selleck(赛力克)公司)而进行了凝胶化后的干细胞用培养基上,播种人类iPS细胞,将人类iPS细胞悬浮培养了14天。这期间,两天一次,向培养器补充凝胶化后的干细胞用培养基。

[0089] 之后,将悬浮着人类iPS细胞的凝胶化干细胞用培养基利用网眼过滤器进行过滤,除去细胞块。进而,将过滤后的凝胶化干细胞用培养基以1500转进行离心来使细胞及凝胶沉淀,在将离心后的干细胞用培养基的上清液再次回收后,以3000转离心3分钟,将离心后的干细胞用培养基的上清液利用0.22 μ m的过滤器进行了过滤。将过滤后的干细胞用培养基的上清液作为实施例3的上清液溶液。

[0090] 另外,确认了被保持培养后的iPS细胞的作为未分化标记物的NANOG、OCT3/4、及TRA 1-60为阳性。

[0091] (比较例:将培养了分化的细胞的培养基的上清液的制备)

[0092] 依照日本特开2016-128396号公报中记载的实施例对人类iPS细胞进行了培养。即,使用与实施例1相同的干细胞用培养基,在黏附培养用培养皿上的饲养细胞上,对人类iPS细胞进行了黏附保持培养。每一周对人类iPS细胞进行传代。在传代时,利用包含0.25%的胰蛋白酶、0.1mg/mL的胶原酶IV、1mmol/L的CaCl₂、及20%的KSR的剥离溶液,对人类iPS细胞进行了处理。

[0093] 使用ES细胞解离液(TrypLE Select(注册商标),ThermoFisher(美国赛默飞世尔科技公司))从黏附培养用培养皿中,剥下如上述那样被培养后的人类iPS细胞。将剥下的人

类iPS细胞,在放入到非黏附培养用培养皿中的未凝胶化的人类iPS细胞中,悬浮培养了一周。其结果,形成了胚状体(EB)。将所形成的胚状体播种到黏附培养用培养皿上,使其在含有10%FBS的DMEM中生长(outgrowth)一周。

[0094] 接着,将细胞使用0.05%胰蛋白酶-EDTA溶液从黏附培养用培养皿中剥下,将分割为单细胞的细胞播种到新的黏附培养用培养皿中。之后,作为培养基使用含有10%FBS的DMEM,将细胞培养一周。

[0095] 在确认了细胞的70%至80%以上进行了细胞汇合之后,将培养基置换为无血清培养基(不包含FBS的DMEM),在培养两天后,回收了培养基的上清液。将所回收的培养基的上清液以1500转离心5分钟,在将培养基的上清液再次回收后,以3000转离心3分钟,将再次回收培养基的上清液而得到的培养基的上清液,作为比较例的上清液溶液。

[0096] 另外,确认了被培养后的细胞的作为未分化标记物的NANOG、OCT3/4、及TRA 1-60为阴性,是分化后的细胞。

[0097] (实施例4:成纤维细胞的增殖性试验)

[0098] 作为增殖培养基A,准备了添加10%FBS及1%盘尼西林-链霉素的DMEM培养基。接着,将来源于成人的正常人类成纤维细胞(KF-4109,StrainNo.(菌株代号):01035,KURABO(日本仓敷纺绩株式会社)),以浓度成为 5×10^3 细胞/0.1mL/孔的方式,在增殖培养基A中悬浮,播种到96孔板,在CO₂培养器内(5%CO₂、37℃)培养了一天。

[0099] 作为试验培养基A,准备了添加1%FBS及1%盘尼西林-链霉素的DMEM培养基。接着,将实施例1至3和比较例的上清液溶液的每个和试验培养基A,以体积比10.00:90.00进行混合,得到浓度为10.00v/v%的添加实施例1至3和比较例的上清液的培养基A。将一部分的孔内的增殖培养基A置换为各个添加了实施例1至3和比较例的上清液的培养基A。

[0100] 作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基A置换为未添加1%FBS及1%盘尼西林-链霉素的DMEM培养基(无添加试验培养基A)。另外,作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基A置换为将DMEM/F12和试验培养基A以体积比10.00:90.00混合而得到的稀释试验培养基A。

[0101] 在置换后的培养基中,对成纤维细胞培养1天和3天,使用活细胞数测定试剂SF(Cat.No.(型号):07553-15,日本Nacalai Tesque公司)及板测读者(Varioskan MicroPlate Reader(Varioskan酶标仪),Thermo Scientific(美国赛默飞))通过WST-8法进行了活细胞数测定。将结果表示于图1及图2。在使用浓度为10.00v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基A的情况下,与使用了无添加试验培养基A、稀释试验培养基A、及添加了比较例的上清液的培养基A的情况相比较,确认了成纤维细胞有优势地增殖了。另外,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液对提高细胞的存活率是有效的。进而,在传代时的自培养皿的剥离时、或者被分割为单细胞时,对细胞施加了压力等物理性压力和利用剥离剂施加了化学性压力。但是,受到这些压力的细胞由于添加实施例的上清液的培养基而增殖了,由此,给出如下启示:添加实施例的上清液的培养基缓和细胞所受到的压力,保护细胞免受压力,使细胞稳定化,使存活率提高。根据这些结果,给出如下启示:添加实施例的上清液的培养基对细胞中包含的核酸、蛋白质、蛋白质复合体、脂蛋白、核糖体、及生物膜进行保护。在此,生物膜包括细胞膜。

[0102] (实施例5:基于成纤维细胞的I型胶原及透明质酸产生试验)

[0103] 与实施例4同样地,在增殖培养基A中将来源于成人的正常人类成纤维细胞培养了一天。之后,除了浓度为1.00v/v%、10.00v/v%或100.0v/v%以外,与实施例4同样地,将一部分的孔内的增殖培养基A置换为各个添加了实施例1至3和比较例的上清液的培养基A。

[0104] 作为阳性对照,未置换一部分的孔的增殖培养基A。作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基A置换为无添加试验培养基A。另外,作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基A置换为与实施例4同样地进行了调整的稀释试验培养基A。

[0105] 在替换培养基后,对成纤维细胞培养3天,回收培养基的上清液,在-80℃下进行了保存。之后,将培养基的上清液解冻,通过人I型胶原ELISA kit试剂盒(Cat.No.(型号):EC1-E105),对培养基的上清液的I型胶原浓度进行了测定。另外,使用DueSet Hyaluronan (DueSet透明质酸检测试剂盒)(Cat.No.(型号):DY3614,美国R&D Systems公司)对培养基的上清液的透明质酸浓度进行了测定。将结果示于图3、图4及图5。

[0106] 在图3及图4中,右侧的修正后的条线示出修正后的数据,该修正为将对成纤维细胞进行培养之前原来就包含在培养基中的胶原的量除去。左侧的原始数据的条线示出修正前的数据。如图3所示,在使用了浓度为1.0v/v%的添加实施例1的上清液的培养基A的情况下,与使用了无添加试验培养基A、增殖培养基A、稀释试验培养基A、及添加比较例的上清液的培养基A的情况相比较,I型胶原的产生量有优势地增加了。如图4所示,在使用了浓度为1.0v/v%及100.0v/v%的添加实施例3的上清液的培养基A的情况下,与使用了增殖培养基A的情况比较,I型胶原的产生量显著地增加了。因此,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液促进胶原的产生,针对皮肤的皱纹及松弛的形成防止及改善是有效的。

[0107] 在图5中,右侧的修正后的条线示出修正后的数据,该修正为将对成纤维细胞进行培养之前原来就包含在培养基中的透明质酸的量除去。左侧的原始数据的条线示出修正前的数据。在使用了浓度为10.0v/v%及100.0v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基A的情况下,与无添加试验培养基A、稀释试验培养基A、及添加比较例的上清液的培养基A相比较,透明质酸的产生量显著地增加了。因此,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液促进透明质酸的产生,针对透明质酸的减少引起的皱纹及松弛的形成防止及改善是有效的。

[0108] (实施例6:表皮细胞的游走性试验)

[0109] 作为增殖培养基B,准备了包含增殖添加剂(10μg/mL的胰岛素、0.1ng/mL的hEGF、0.67μg/mL的氢化可的松、4μL/mL的牛脑垂体萃取液BPE)及抗菌剂(50μg/mL的庆大霉素、50ng/mL的两性霉素)的、500mL的表皮细胞培养基(HuMedia-KG2、KURABO(日本仓敷纺绩株式会社))。

[0110] 利用10μg/mL的Mitomycin C(丝裂霉素C)(Cat.No.(型号):20898-21,日本Nacalai tesque公司)对来源于成人的正常人类表皮细胞处理2小时,使细胞分裂停止。接着,将人类表皮细胞,以浓度成为 4×10^4 细胞/0.1mL/孔的方式,在增殖培养基B中悬浮,在测定细胞的游走能力的试剂盒(Oris Cell Migration Assay(注册商标,Oris细胞迁移分析试剂盒))的已包被好胶原的板上播种,在CO₂培养器内(5%CO₂、37℃)培养一天,在板上的未用塞棒堵塞的塞棒的外缘部固定表皮细胞。之后,从板上撤去塞棒。

[0111] 作为试验培养基B,准备了在500mL的表皮细胞培养基中添加了抗菌剂(50μg/mL的庆大霉素及50nm/mL的两性霉素)的培养基。接着,将实施例1至3和比较例的上清液溶液的各个和试验培养基B,以体积比10.0:90.0、1.0:99.0进行混合,得到添加实施例1至3和比较

例的上清液的培养基B。将一部分的板上的增殖培养基B,分别置换为各个添加了实施例1至3和比较例的上清液的培养基B。

[0112] 将一部分的板上的增殖培养基B,作为阴性对照,置换为未添加增殖添加剂的表皮细胞培养基(无添加试验培养基B)。另外,作为阴性对照,将一部分的板上的增殖培养基B置换为,将DMEM/F12和试验培养基B以体积比10.0:90.0、1.0:99.0进行混合而得到的稀释试验培养基B。

[0113] 在创伤治愈的过程中,表皮细胞向伤口游走而使创伤收缩。在本实施例中,使用板测读器分析表皮细胞是否游走到用塞棒堵塞之处。具体地,从置换培养基起23小时后,使用活细胞染色试剂(Calcein AM(钙黄绿素),Cat.NO.(型号):341-07901,DOJINDO(日本同仁化学研究所))对表皮细胞染色,使用板测读器(Varioskan MicroPlate Reader(Varioskan 酶标仪),Thermo Scientific(美国赛默飞)),测定相对于波长485nm的激发光的、波长538nm的荧光。

[0114] 将结果示于图6及图7。在使用浓度为1.0v/v%及10.0v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基B的情况下,与无添加试验培养基B、稀释试验培养基B、及添加比较例的上清液的培养基B相比较,确认了表皮细胞的游走能力的统计上的显著促进效果。因此,显示出:干细胞的培养基的上清液对创伤治愈是有效的。另外,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液例如对紫外线暴露引起的皮肤损伤中产生的皮肤表层的斑点及非均匀的肤色的形成防止及改善是有效的。另外,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液使细胞稳定化,对存活率的提高是有效的。进而,在传代时的自培养皿剥离时、或者被分割为单细胞时,对细胞施加了压力等物理性压力和利用剥离剂施加了化学性压力。但是,受到这些压力的细胞由于添加实施例的上清液的培养基而增殖了,由此,给出如下启示:添加实施例的上清液的培养基缓和细胞所受到的压力,保护细胞免受压力,使细胞稳定化,使存活率提高。根据这些结果,给出如下启示:添加实施例的上清液的培养基对细胞中包含的核酸、蛋白质、蛋白质复合体、脂蛋白、核糖体、及生物膜进行保护。在此,生物膜包括细胞膜。

[0115] (实施例7:毛乳头细胞的增殖性试验)

[0116] 作为增殖培养基C,准备了添加完专用添加剂(牛胎儿血清、胰岛素与运铁蛋白及三碘甲腺原氨酸的混液、牛脑垂体萃取液、醋酸环丙孕酮(cyproterone acetate))的毛乳头细胞专用培养基(Cat.No.(型号):TMTPGM-250,TOYOB0(东洋纺公司))。接着,将正常人类毛乳头细胞(Cat.No.(型号):CA60205a, Lot.No.(批号):2868,TOYOB0(东洋纺公司)),以浓度成为 1.2×10^4 细胞/0.3mL/孔的方式,在增殖培养基C中悬浮,播种到I型胶原包被48孔板,在CO₂培养器内(5%CO₂、37℃)中培养了一天。

[0117] 将实施例1至3和比较例的上清液溶液的每个、和未添加添加剂的毛乳头细胞专用培养基(无添加试验培养基C),以体积比30.0:70.0进行混合,得到添加实施例1至3和比较例的上清液的培养基C。将一部分的孔内的增殖培养基C置换为各个添加实施例1至3和比较例的上清液的培养基C。

[0118] 作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基C,置换为未添加添加剂的毛乳头细胞专用培养基(无添加试验培养基C)。另外,作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基C置换为,将DMEM/F12和无添加试验培养基C以体积比30.0:70.0进行混合而得到的稀释试验培养基C。

[0119] 在置换后的培养基中,对毛乳头细胞培养3天,通过WST-8法进行了活细胞数测定。将结果示于图8。在使用了浓度为30.0v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基C的情况下,与使用无添加试验培养基C及稀释试验培养基C的情况相比较,确认了毛乳头细胞有优势地增殖了。因此,给出了如下启示:干细胞的培养基的上清液具有少发的治疗、脱发的预防、养发促进和生发促进等养发及生发效果。

[0120] (实施例8:基于毛乳头细胞的FGF-7及VEGF产生试验)

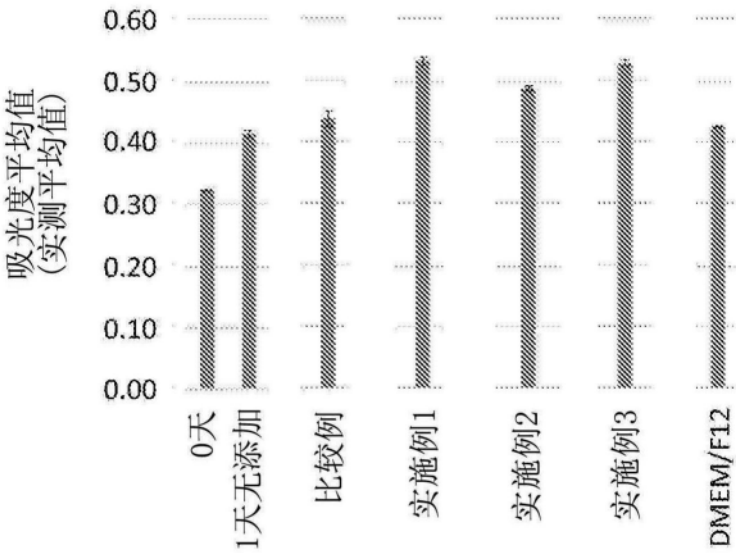
[0121] 与实施例7同样地,在增殖培养基C中将正常人类毛乳头细胞培养了一天。之后,除了浓度为0.3v/v%、30.0v/v%、或100.0v/v%以外,与实施例7同样地,将一部分的孔内的增殖培养基C置换为各个添加了实施例1至3和比较例的上清液的培养基C。

[0122] 作为阴性对照,将一部分的孔的增殖培养基C分别置换为无添加试验培养基C及稀释试验培养基C。另外,作为参考对照,将一部分的孔的增殖培养基C,分别置换为在毛乳头细胞专用培养基中添加了100 μ mol/L的腺苷的腺苷添加培养基、和在毛乳头细胞专用培养基中添加了30 μ mol/L的米诺地尔(Minoxidil)的腺苷添加培养基。另外,作为米诺地尔的空白对照,将一部分的孔的增殖培养基C置换为在毛乳头细胞专用培养基中添加了0.1%DMSO的DMSO添加培养基。

[0123] 在替换培养基后,对毛乳头细胞培养3天,回收培养基的上清液,在-80℃下进行了保存。之后,将培养基的上清液解冻,利用FGF-7 Human ELISA kit(人类酶联免疫吸附测定试剂盒)(Cat.No.(型号):ab100519,abcam(英国Abcam公司)),对培养基的上清液的成纤维细胞生长因子7(FGF-7)浓度进行了测定。另外,使用Human VEGF Quantikine ELISA(人血管内皮生长因子ELISA试剂盒)(Cat.No.(型号):DVE00,美国R&D Systems公司),对培养基的上清液的血管内皮细胞增殖因子(VEGF)浓度进行了测定。将结果示于图9及图10。

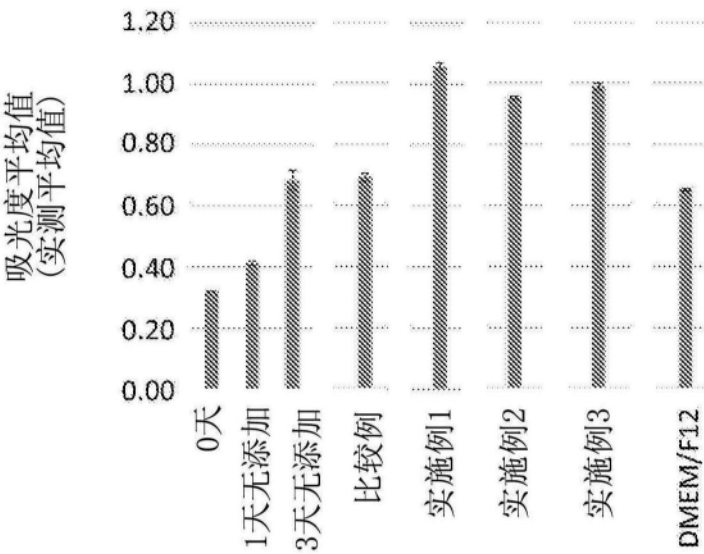
[0124] 在图9中,右侧的修正后的条线示出修正后的数据,该修正为将对毛乳头细胞进行培养之前原来就包含在培养基中的FGF-7的量除去。左侧的原始数据的条线示出修正前的数据。在使用了浓度为0.3v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基C的情况下,与无添加试验培养基C、稀释试验培养基C、及添加比较例的上清液的培养基C情况相比较,确认了FGF-7的产生量出现统计上的显著增加。

[0125] 在图10中,右侧的修正后的条线示出修正后的数据,该修正为将对毛乳头细胞进行培养之前原来就包含在培养基中的VEGF的量除去。左侧的原始数据的条线示出修正前的数据。在使用了浓度为30.0v/v%及100.0v/v%的添加实施例1至3的上清液的培养基C的情况下,与使用了稀释试验培养基C及添加比较例的上清液的培养基C的情况相比较,确认了VEGF的产生量出现统计上的显著增加。



成纤维细胞 增殖性试验 第1天
条线=平均值±SD, N=3

图1



成纤维细胞 增殖性试验 第3天
条线=平均值±SD, N=3

图2

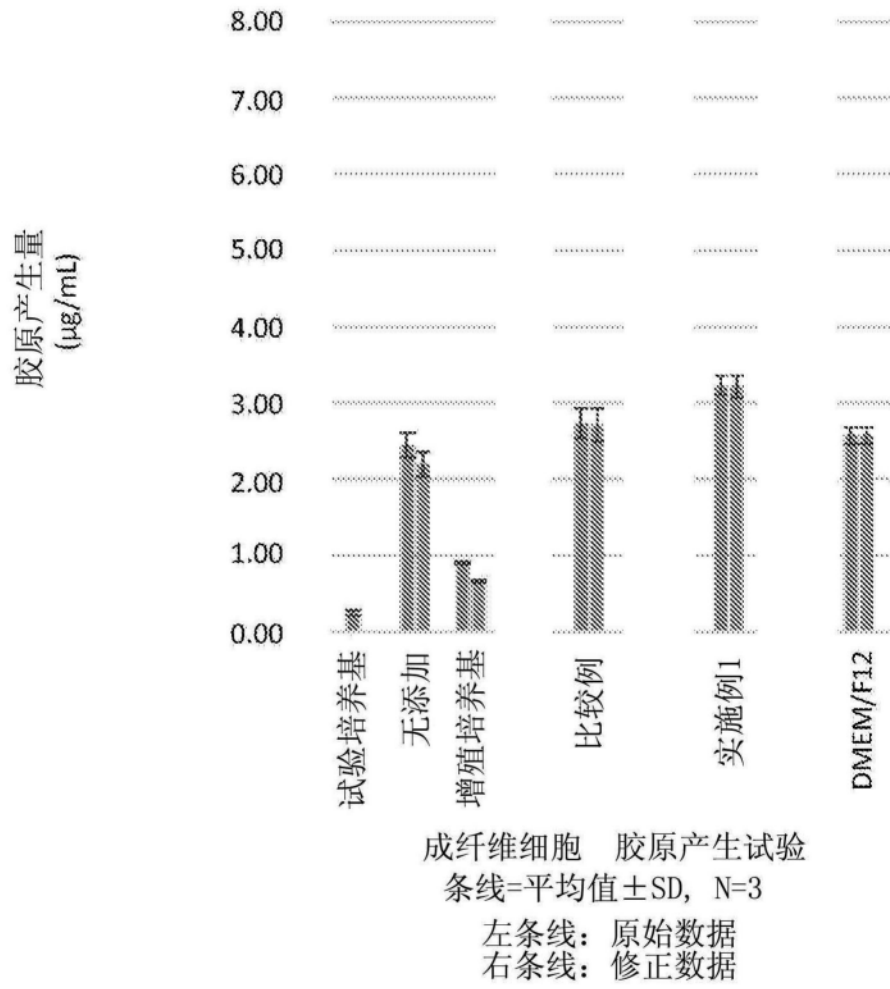


图3

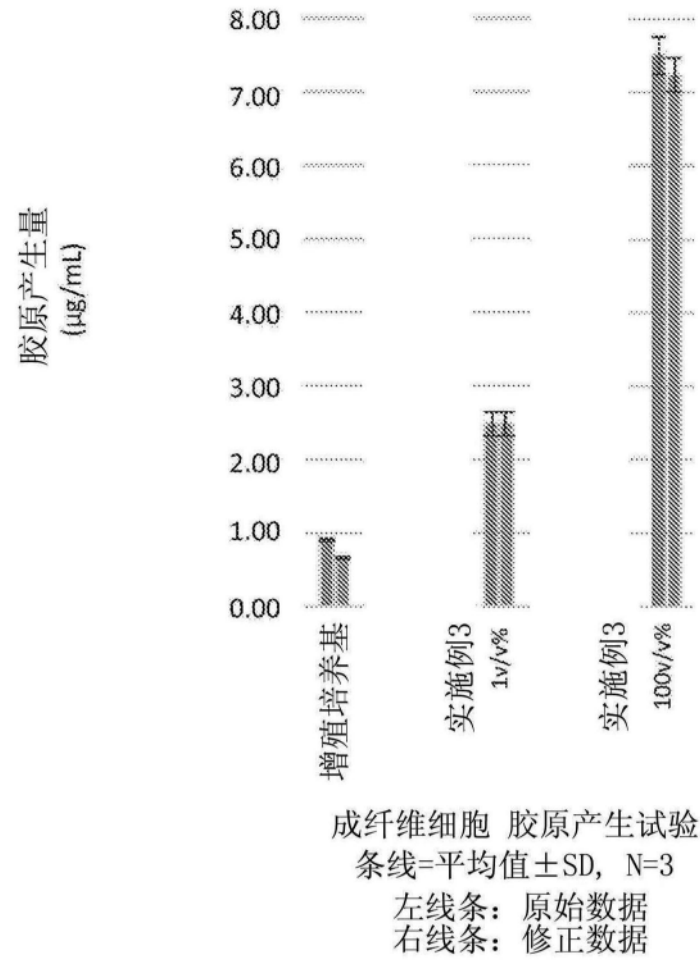


图4

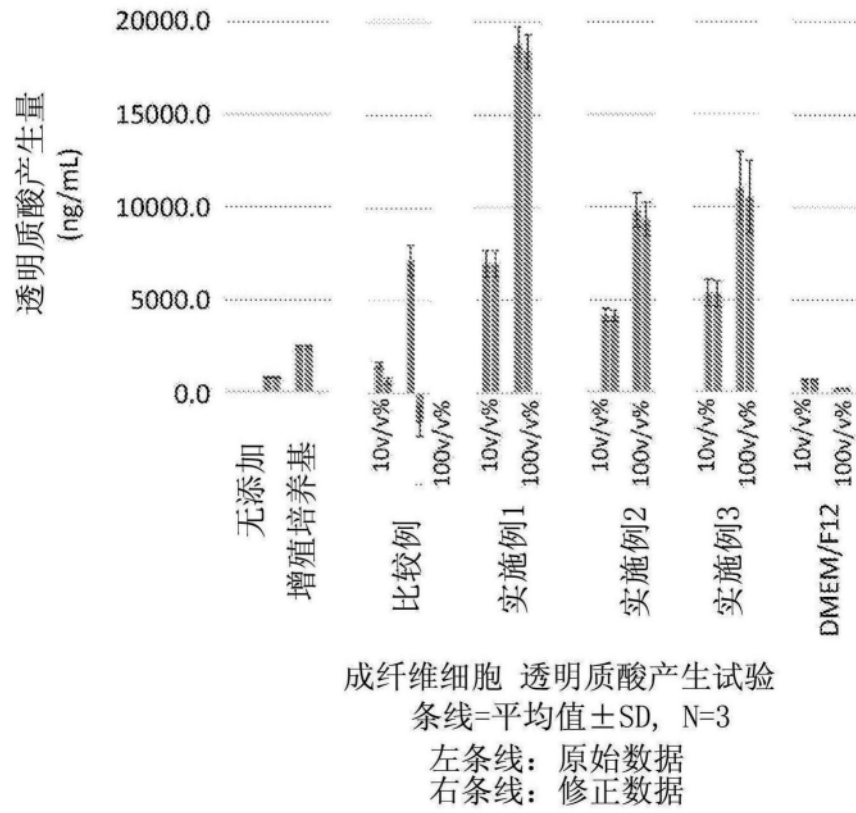


图5

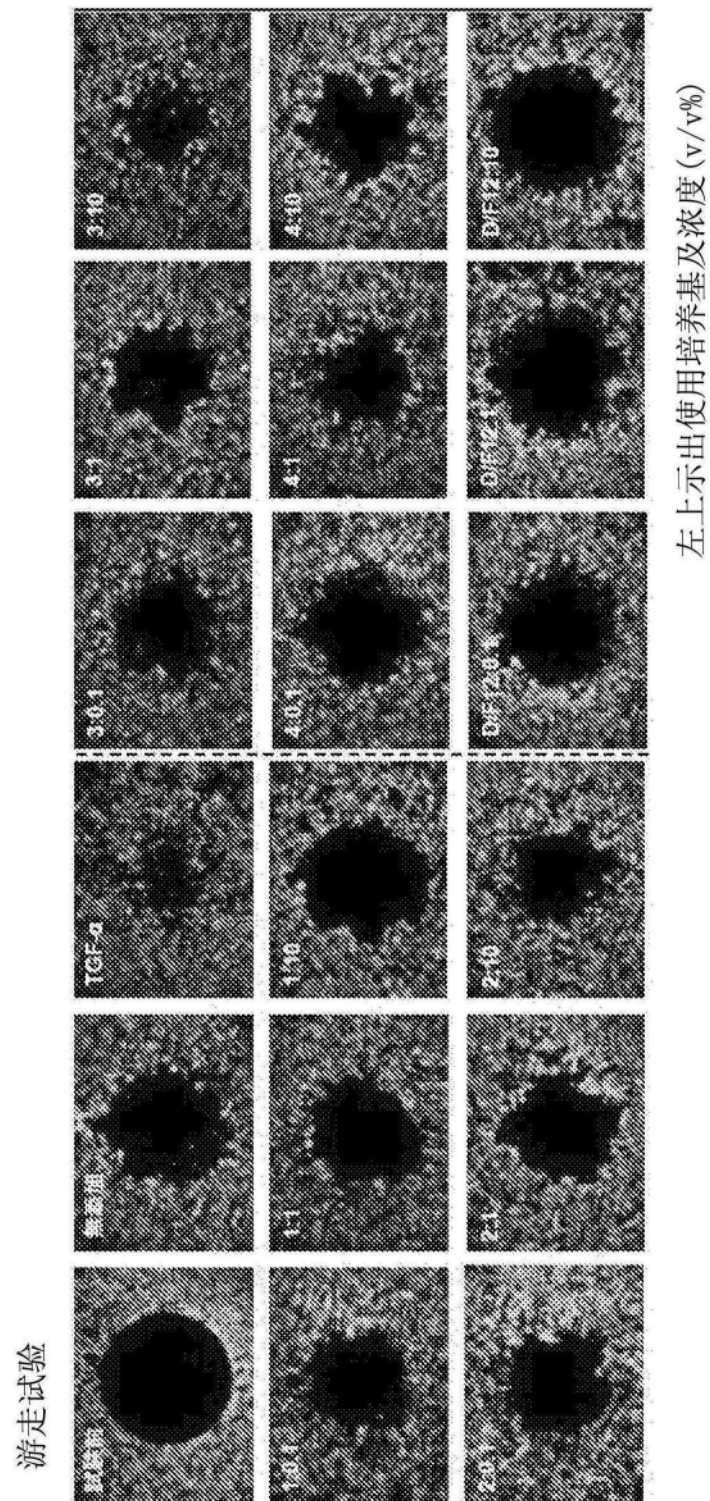


图6

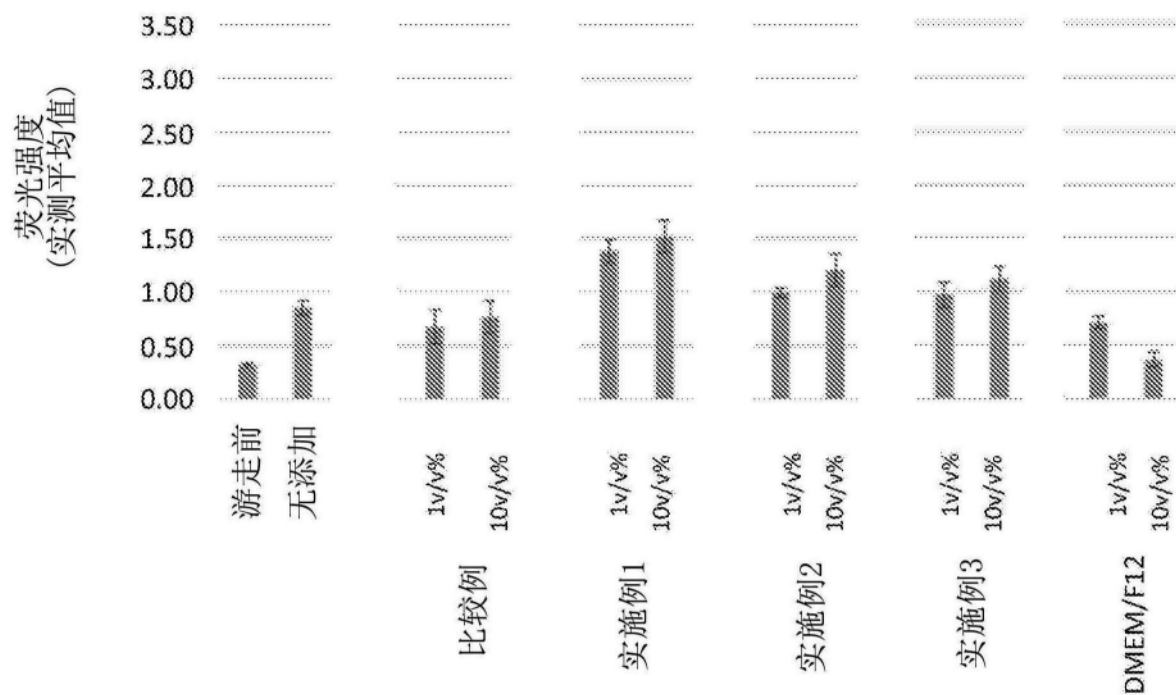
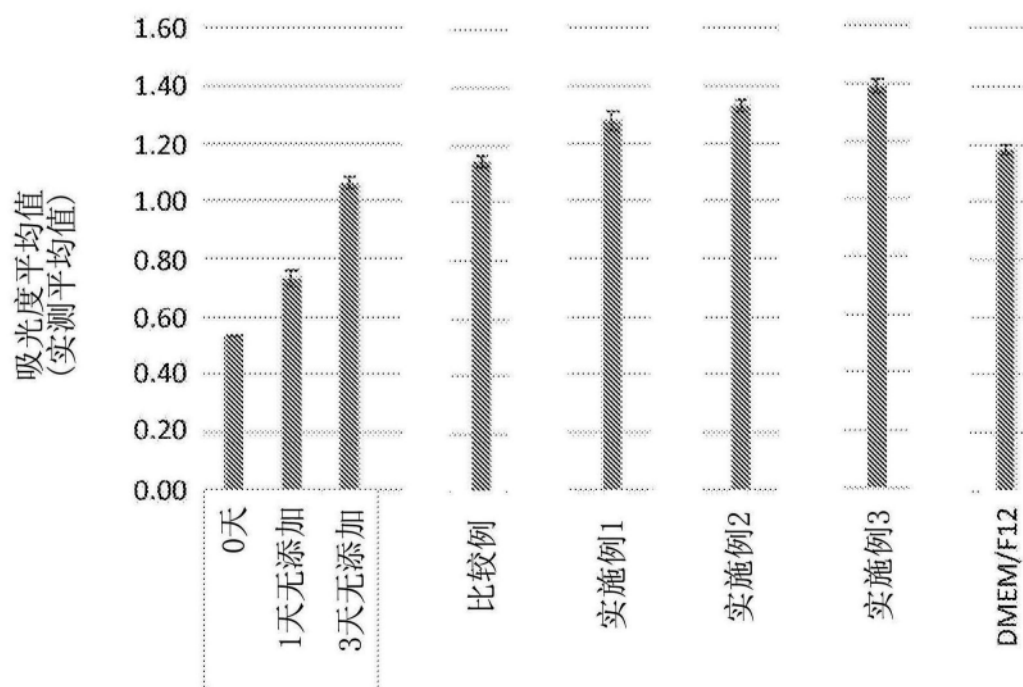
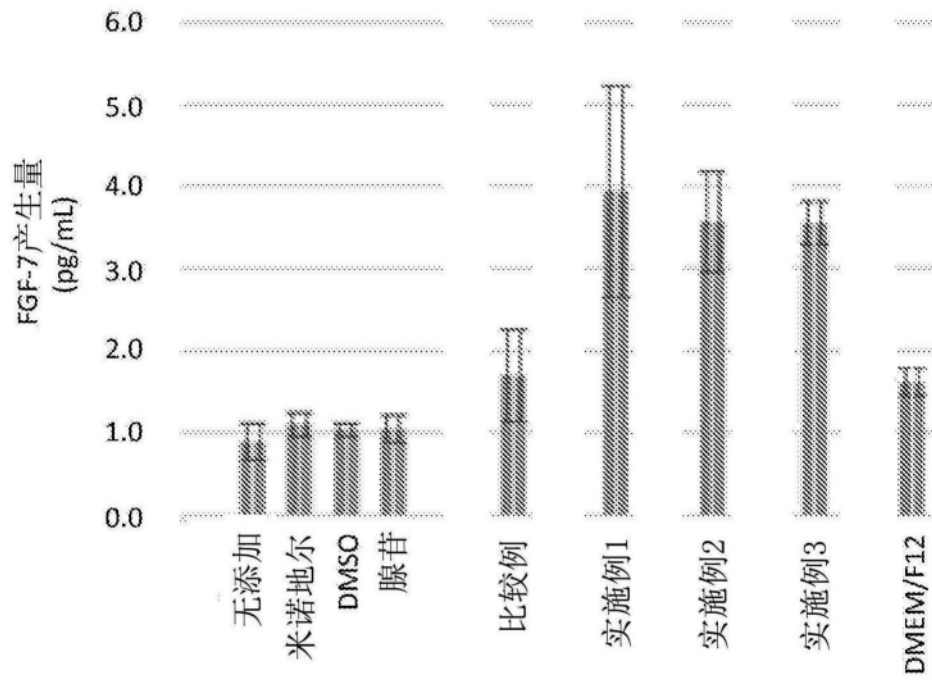


图7



毛乳头细胞 增殖性试验 第3天
条线=平均值 \pm SD, N=3

图8



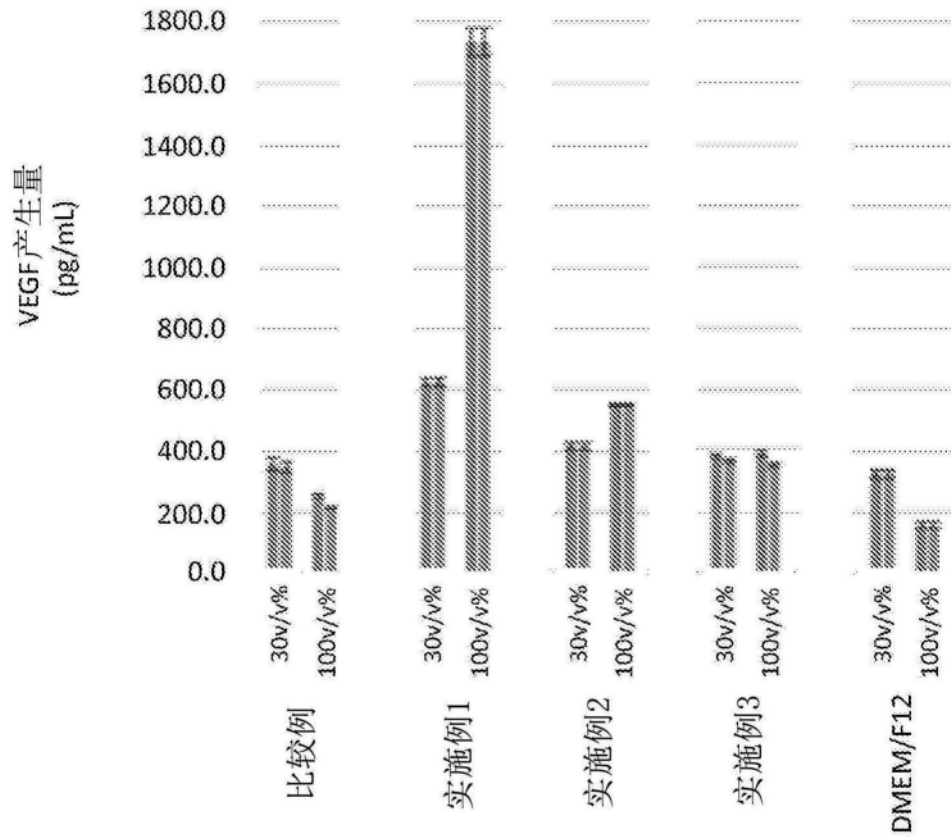
毛乳头细胞 FGF-7产生试验

条线=平均值 \pm SD, N=3

左条线: 原始数据

右条线: 修正数据

图9



毛乳头细胞 VEGF产生试验
条线=平均值 \pm SD, N=3

图10