

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第6967308号  
(P6967308)

(45) 発行日 令和3年11月17日(2021.11.17)

(24) 登録日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(51) Int.Cl.		F I
<b>A 6 1 K 35/50</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K 35/50
<b>A 6 1 K 35/51</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K 35/51
<b>A 6 1 K 35/54</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K 35/54
<b>A 6 1 K 38/17</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 38/17
<b>A 6 1 P 25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00

請求項の数 13 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-149878 (P2020-149878)	(73) 特許権者	504174180
(22) 出願日	令和2年9月7日(2020.9.7)		国立大学法人高知大学
審査請求日	令和2年9月15日(2020.9.15)		高知県高知市曙町二丁目5番1号
(31) 優先権主張番号	特願2020-113456 (P2020-113456)	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	令和2年6月30日(2020.6.30)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
早期審査対象出願		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74) 代理人	100150810
			弁理士 武居 良太郎
		(74) 代理人	100185856
			弁理士 朝倉 栄二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎児付属物由来組織細胞培養上清を含む脳神経障害治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

胎児付属物由来組織細胞の培養上清を有効成分として含む、脳神経障害治療剤であって、前記胎児付属物由来組織細胞がワルトン膠質由来間葉系細胞、羊膜由来間葉系細胞、絨毛膜由来間葉系細胞、またはこれらの組み合わせであって、かつ単離された幹細胞ではなく、前記培養上清が、分泌されたタンパク質であるCCL2、CXCL1、CXCL7、CXCL8、CXCL10、FGF4、IFN-g、IL-6、IL-10、PDGFbb、TGF-b2及びVEGF-Aを含む、脳性小児麻痺における脳神経障害治療剤であって、脳神経障害の回復を促進する、脳神経障害治療剤。

【請求項2】

前記胎児付属物由来組織細胞が、ワルトン膠質由来間葉系細胞である、請求項1に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項3】

前記胎児付属物由来組織細胞が、羊膜由来間葉系細胞、絨毛膜由来間葉系細胞、またはこれらの組み合わせである、請求項1に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項4】

前記胎児付属物由来組織細胞が、トリプシンにより調製される、請求項3に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項5】

前記脳神経障害治療剤が、神経前駆細胞の軸索を伸長させる、請求項1~4のいずれか

1 項に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項 6】

前記脳神経障害治療剤が、脳障害の症状が固定される慢性期に投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項 7】

前記脳神経障害治療剤が、脳室内投与、髄腔内投与又は経鼻投与である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の脳神経障害治療剤。

【請求項 8】

( a ) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程及び ( b ) 前記胎児付属物由来組織細胞の培養上清を回収する工程を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の脳神経障害治療剤の製造方法。

10

【請求項 9】

前記 ( a ) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程が、1 ~ 3 日間の培養である、請求項 8 に記載の脳神経障害治療剤の製造方法。

【請求項 10】

前記 ( a ) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程が、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$  個 / mL の培養開始時の細胞の密度である、請求項 8 又は 9 に記載の脳神経障害治療剤の製造方法。

【請求項 11】

前記 ( a ) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程が、95% 空気、5% CO<sub>2</sub> 条件下である、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の脳神経障害治療剤の製造方法。

20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の脳神経障害治療剤を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

凍結乾燥製剤である、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を含む脳障害の治療剤に関する。

【背景技術】

30

【0002】

周産期の新生児脳障害は出生 1000 人に 1 ~ 2 人の頻度で合併し、その後の生涯にわたる脳性麻痺の原因となり、また本人のみならず養育する家族にも多大な負担がかかる病態である。

【0003】

脳性麻痺の原因となる周産期脳障害には、低酸素性虚血性脳症、脳出血、脳室周囲白質軟化症などがあり、これらの主病態は細胞内 Ca 上昇、ミトコンドリア機能不全から生じる活性酸素の上昇、マクロファージの活性化とそれに伴う高サイトカイン血症という炎症病態である。特に、脳出血は未熟児に合併しやすく、最も症状が重く生命予後が悪い。

【0004】

40

治療法として低体温療法が有効とされているが、施行児 8 ~ 9 人の内 1 人に効果があるとされる程度である。且つ低体温療法以外に確立された治療法がないのが現状である。

【0005】

これまで、自家骨髄由来間葉系細胞をそのまま脳性麻痺患者へ投与する臨床研究が進められており、その有効性が報告されている ( 非特許文献 1 )。また、臍帯由来細胞の投与の報告はあるが、一部の運動機能において著明な改善には至っていない ( 非特許文献 2 )。さらに、臍帯血由来細胞を新生児脳出血モデルマウスに投与することにより、運動機能障害が有意に改善することが報告されている ( 特許文献 1 )。また、臍帯及び胎盤由来細胞を視神経傷害モデルマウスに移植することにより、視神経の再成長が促進されることが報告されている ( 特許文献 2 )。

50

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】Cytotherapy 2013 Dec; 15(12): 1549-62

【非特許文献2】Cytotherapy 2015 17(2): 224-231

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】国際公開第2017/204231号

【特許文献2】特表2007-521793号公報

10

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

脳出血や虚血等を起因とする脳神経障害では、原因となる出血や虚血を治癒するだけでなく、当該原因により障害を受けた神経細胞等の保護または再生を促進する必要がある。このような神経細胞等の保護または再生のため臍帯由来細胞を投与することが考えられているが、臍帯からの採取方法によって得られる細胞の特性が異なり、臍帯由来であれば如何なる細胞、または如何なるドナーであってもその効果を有するか不明である。また、脳神経障害において、腰椎穿刺によるクモ膜下腔内投与において行われることが想定されているが、当該投与方法はリスクが高くより容易な投与経路にて効果を奏する治療剤を提供することを課題とする。

20

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、胎児付属物由来組織細胞の培養上清が、脳神経前駆細胞の増殖・生存、脳障害部位へのホーミング、脳神経前駆細胞の分化・成熟を促進することにより、脳神経を再生し、脳神経障害に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0010】

すなわち、本発明は、下記に関するものである：

- (1) 胎児付属物由来組織細胞の培養上清を有効成分として含む、脳神経障害治療剤。
- (2) 胎児付属物由来組織細胞が、臍帯細胞、胎盤細胞、卵膜細胞、絨毛膜細胞、羊膜細胞、またはこれらの組み合わせである、(1)に記載の脳神経障害治療剤。
- (3) 胎児付属物由来組織細胞が、ワルトン膠質由来間葉系細胞、羊膜由来間葉系細胞、絨毛膜由来間葉系細胞、またはこれらの組み合わせである、(1)または(2)に記載の脳神経障害治療剤。
- (4) 培養上清中にサイトカイン及びケモカインを含む、(1)～(3)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。
- (5) IL-6、CXCL1、CXCL7、CXCL8及びCCL2を含む、(1)～(4)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。
- (6) 培養上清が、胎児付属物由来組織細胞を1～3日間培養して得られる、(1)～(5)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。
- (7) 培養開始時の胎児付属物由来組織細胞の密度が $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個/mLである、(1)～(6)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。
- (8) 脳神経障害が、遺伝性疾患ではない脳神経障害である、(1)～(7)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。
- (9) 脳神経障害が、ジスキネジア(レボドパ誘発性ジスキネジア、慢性もしくは遅発性ジスキネジア、または口腔顔面ジスキネジア)、下肢静止不能症候群(薬剤誘発性または特発性)、薬物誘発性ジストニア、舞蹈病(ハンチントン病、毒素誘発性舞蹈病、シデナム(Sydenham)舞蹈病、妊娠舞蹈病、ウィルソン病、薬物誘発性舞蹈病、または代謝性もしくは内分泌系舞蹈病)、顔面けいれん(運動性、音声性、単純性、複雑性また

30

40

50

はトゥレット症候群など)、ジストニア(急性、全身性、限局性、分節性、性的、中間性、心因性または急性ジストニー反応など)、Sodemytopi cパーキンソン病、常同性運動障害(自閉症、遺伝性または小児性関連運動障害など)、強迫性障害、ナルコレプシー(脱力発作など)、伝達性海綿状脳症(クロイツフェルト・ヤコブ病またはクールーなど)、認知症(アルツハイマー、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、ピック病またはアルコール性認知症など)、神経有棘赤血球症、発作またはけいれん、アテトーシス(ハンチントン病、呼吸停止、新生児黄疸または脳卒中関連など)、または脳性小児麻痺である、(1)~(8)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤。

(10)(a)胎児付属物由来組織細胞を培養する工程及び(b)前記胎児付属物由来組織細胞の培養上清を回収する工程を含む、(1)~(9)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤の製造方法。

10

(11)(1)~(9)のいずれか1項に記載の脳神経障害治療剤を含む、医薬組成物。

(12)凍結乾燥製剤である、(11)に記載の医薬組成物。

(13)胎児付属物由来組織細胞の培養上清を有効成分として含む、脳神経再生促進剤。

(14)胎児付属物由来組織細胞が、臍帯細胞、胎盤細胞、卵膜細胞、絨毛膜細胞、羊膜細胞、またはこれらの組み合わせである、(13)に記載の脳神経再生促進剤。

(15)胎児付属物由来組織細胞が、ワルトン膠質由来間葉系細胞、羊膜由来間葉系細胞、絨毛膜由来間葉系細胞、またはこれらの組み合わせである、(13)または(14)に記載の脳神経再生促進剤。

(16)脳神経再生促進剤が、脳神経前駆細胞増殖・生存促進剤、脳前駆細胞ホーミング促進剤、脳神経前駆細胞分化・成熟促進剤、またはこれらの組み合わせである、(13)~(15)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

20

(17)培養上清中にサイトカイン及びケモカインを含む、(13)~(16)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

(18)IL-6、CXCL1、CXCL7、CXCL8及びCCL2を含む、(13)~(17)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

(19)培養上清が、胎児付属物由来組織細胞を1~3日間培養して得られる、(13)~(18)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

(20)培養開始時の分娩後由来組織の密度が $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個/mLである、(13)~(19)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

30

(21)脳神経再生が、遺伝性疾患ではない脳神経障害で起こる、(13)~(20)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

(22)脳神経再生が、ジスキネジア(レポドバ誘発性ジスキネジア、慢性もしくは遅発性ジスキネジア、または口腔顔面ジスキネジア)、下肢静止不能症候群(薬剤誘発性または特発性)、薬物誘発性ジストニア、舞蹈病(ハンチントン病、毒素誘発性舞蹈病、シデンナム(Sydenham)舞蹈病、妊娠舞蹈病、ウィルソン病、薬物誘発性舞蹈病、または代謝性もしくは内分泌系舞蹈病)、顔面けいれん(運動性、音声性、単純性、複雑性またはトゥレット症候群など)、ジストニア(急性、全身性、限局性、分節性、性的、中間性、心因性または急性ジストニー反応など)、Sodemytopi cパーキンソン病、常同性運動障害(自閉症、遺伝性または小児性関連運動障害など)、強迫性障害、ナルコレプシー(脱力発作など)、伝達性海綿状脳症(クロイツフェルト・ヤコブ病またはクールーなど)、認知症(アルツハイマー、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、ピック病またはアルコール性認知症など)、神経有棘赤血球症、発作またはけいれん、アテトーシス(ハンチントン病、呼吸停止、新生児黄疸または脳卒中関連など)、または脳性小児麻痺で起こる、(13)~(21)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤。

40

(23)(a)胎児付属物由来組織細胞を培養する工程及び(b)前記胎児付属物由来組織細胞の培養上清を回収する工程を含む、(13)~(22)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤の製造方法。

(24)(13)~(22)のいずれか1項に記載の脳神経再生促進剤を含む、医薬組成物。

50

(25)凍結乾燥製剤である、(24)に記載の医薬組成物。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を含む、脳神経障害の治療剤を提供することが可能となる。本製剤は、多くのドナーの細胞培養上清を混合することにより、均質な脳神経障害治療剤を製造でき、また細胞を含む製剤と比較して、製造、保管、投与が容易である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ワルトン膠質由来間葉系細胞と神経前駆細胞の共培養による神経再生。(2)共培養した場合、(1)単独培養と比較して、培養3日目および7日目において神経前駆細胞の増殖又は生存維持、移動(遊走)、及び分化・成熟が亢進した。

10

【図2】ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による神経再生(in vitro)。(2)培養上清を添加した場合、(1)培地のみを添加と比較して、培養3日目および7日目において神経前駆細胞の生存維持、移動(遊走)、及び分化・成熟が亢進した。

【図3】ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による治療(1)。培養上清を低酸素処置小児まひモデルマウスに投与した場合(左バー)、培地のみを投与(右バー)と比較して、Y-maze試験での(1)総エントリー数、(2)交替行動率が改善した。(3)Y-maze試験における健常マウス(上段)と培養上清投与による治療マウス(下段)の自発行動のパターンを示す。

20

【図4】ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による治療(2)。治療前(Pre)において、低酸素処置小児まひモデルマウス群(右バー)は健常群(左バー)と比較して、ローターロッド試験での運動機能が低下していた。2週間にわたる治療後(2W)、及びその後の休薬2週間後(4W)において、培養上清を低酸素処置小児まひモデルマウスに投与した治療群(右バー)は対照群(中バー)と比較して、ローターロッド試験での運動機能が有意に回復し( $p < 0.05$ , Tukey検定)、健常群(左バー)と同等であった。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明を具体的な実施の形態に即して詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施の形態に束縛されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において、任意の形態で実施することが可能である。

30

【0014】

なお、本開示で引用する特許公報、特許出願公開公報、及び非特許文献等は、何れもその全体が援用により、あらゆる目的において本開示に組み込まれるものとする。

【0015】

本開示において、数値に対して適用された場合の「～」とは、規定された基準値以上で、かつ規定された基準値以下の範囲に入る値の範囲を指す。

【0016】

#### 1. 胎児付属物由来組織

40

本開示において「胎児付属物由来組織」(「分娩後由来組織」ともいう)とは、分娩時に摘出される一群の組織を意味し、臍帯、卵膜(羊膜、絨毛膜、脱落膜からなる)、胎盤などを含む。本発明の胎児付属物由来組織は、哺乳類から採取された胎児付属物由来組織であれば特に限定されないが、例えば、霊長類哺乳動物の胎児付属物由来組織である。より好ましくは、ヒトの胎児付属物由来組織である。

【0017】

本開示において「臍帯」とは、胎児と胎盤を繋ぐ白色の管状組織であり、胎盤を含まない組織を意味する。臍帯の実質部分である「ワルトン膠質」は、胚外中胚葉由来の結合組織を意味し、2つの臍動脈と臍静脈とを覆うことによって臍帯を保護する。本発明の臍帯は、哺乳類から採取された臍帯であれば特に限定されないが、例えば、霊長類哺乳動物の

50

臍帯である。より好ましくは、ヒトの臍帯である。

【0018】

本開示において「卵膜」とは、羊水を包んでいる膜のことを意味する。卵膜は一枚の膜ではなく、子宮内膜の変化したものである「脱落膜」、「絨毛膜」及び「羊膜」の3層から構成されている。本発明の卵膜は、哺乳類から採取された卵膜であれば特に限定されないが、例えば、霊長類哺乳動物の卵膜である。より好ましくは、ヒトの卵膜である。また、卵膜の内層である羊膜、中間層である絨毛膜、外層である脱落膜をそれぞれ分離して使用してもよく、これらの膜組織を組み合わせ使用してもよい。

【0019】

本開示において「胎盤」とは、出産後の母体から得ることができる胎盤組織を示す。胎盤は分娩後容易に摘出することができるが、臍帯血バンクで臍帯血分離採取後、インフォームドコンセントを得て入手したヒト胎盤を用いるのが好ましい。より好ましくは、感染症等の検査結果等の詳細を把握した上記胎盤を用いる。本発明の胎盤は、哺乳類から採取された胎盤であれば特に限定されないが、例えば、霊長類哺乳動物の胎盤である。より好ましくは、ヒトの胎盤である。

10

【0020】

本開示において「胎児付属物由来組織細胞」(「分娩後由来組織細胞」ともいう)とは、胎児付属物由来組織から、物理的及び/又は酵素的処理により得られる細胞を意味し、特別に単離された幹細胞とは異なる。胎児付属物由来組織細胞は臍帯血や胎児付属物由来組織由来の各種幹細胞と異なり、多世代にわたる継代培養や詳細な細胞分画を必要としないため、調製が容易である。

20

【0021】

## 2. 胎児付属物由来組織の回収および処理

一般に、胎児付属物由来組織は生後のその娩出直後に回収する。好ましい実施形態では、胎児付属物由来組織は、インフォームドコンセント後にドナーから、又は臍帯血バンクを介して回収する。ドナーの感染症等の病歴または検査結果を得て胎児付属物由来組織と関連付けることが好ましい。このような病歴を使用して、胎児付属物由来組織またはそこから採取した胎児付属物由来組織細胞の使用を制限することができる。

【0022】

胎児付属物由来組織細胞を回収する前に、臍帯血および胎盤血等の血液を除去及び/または洗浄することが好ましい。特定の実施形態では、例えば、胎盤中の臍帯血を回収する。これには従来の臍帯血回収プロセスを施すことができる。典型的には、流注下でニードルまたはカニューレを使用して胎盤から採血する(例えば、Anderson、米国特許第5,372,581号;Hessellら、米国特許第5,415,665号を参照)。ニードルまたはカニューレは通常臍静脈中に配置し、胎盤を軽くマッサージして胎盤からの臍帯血の流出を容易にすることができる。胎盤はさらなる操作なしで流注により出血して、臍帯血回収の際の組織破壊を最小にすることが好ましい。

30

【0023】

哺乳動物の胎児付属物由来組織またはその一部分は、概して前述のように回収し調製した後、任意の当技術分野で知られている方法で処理することができる、例えば、灌流、洗浄、細切、破壊または培養容器へ接着することができる、例えば、細切後、1つまたは複数の組織破壊酵素で消化、または培養容器へ接着して胎児付属物由来組織細胞を得ることができる。

40

【0024】

一実施形態では、器官の一部または全部の物理的破壊によって、哺乳動物胎児付属物由来組から細胞を回収する。例えば、胎児付属物由来組織、またはその一部分は、例えば、破碎する、せん断する、細分する、さいの目に切る、細切れにする、細かく砕く、メッシュに通すなどすることができる。典型的には、胎児付属物由来組織は、例えば、培地、生理食塩水等の細胞の生存を害しない溶液に浸して破壊することができる。次いで組織を培養して、接着性の胎児付属物由来組織細胞の集団を得ることができる。

50

## 【0025】

物理的破壊および/または酵素による消化および細胞回収の前に、胎児付属物由来組織を個別の組織に切断することができる。例えば、羊膜、絨毛膜等の卵膜、臍帯、胎盤葉、またはこれらの任意の組合せの全部または一部を得るように切断することができる。胎児付属物由来組織細胞は、羊膜、絨毛膜、臍帯（ワルトン膠質等）またはこれらの任意の組み合わせから得ることが好ましい。典型的には、胎児付属物由来組織細胞は、胎児付属物由来組織の小さな塊、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または約1000立方ミリメートル体積である胎児付属物由来組織の塊の破壊によって得ることができる。例えばトリパンブルー色素排除試験法により測定して、破壊法が複数、より好ましくは大部分、およびより好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%の前記胎児付属物由来組織中の細胞を生存状態にするという条件で、任意の物理的破壊法を使用することができる。

10

## 【0026】

別の特定の実施形態では、胎児付属物由来組織細胞は胎児付属物由来組織の物理的破壊によって回収し、この場合物理的破壊は酵素による消化を併用し、これは1つまたは複数の組織消化酵素を使用することによって実施することができる。胎児付属物由来組織を消化するために使用することができる酵素には、パイン、デオキシリボヌクレアーゼ、セリンプロテアーゼ、トリプシン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼまたはエラスターゼなどがある。セリンプロテアーゼは血清中でアルファ2マイクログロブリンによって阻害される可能性があり、また血清中には基質となるタンパク質が大量に含まれるため、消化に使用する培地は通常無血清である。一般にEDTAおよび/またはDNaseを酵素による消化の手順中で使用して、細胞回収の効率を増大させることができる。

20

## 【0027】

組織消化酵素は任意の組合せとして使用することができる。トリプシンを使用する消化に関する典型的な濃度は、トリプシン0.05%~約2%、例えば、トリプシン約0.05%を含む。プロテアーゼは組合せで、すなわち2つ以上のプロテアーゼを同じ消化反応中で使用することができ、または同時に使用して胎児付属物由来組織細胞を切り離すことができる。例えば、一実施形態では、胎盤、またはその一部分を、例えば30分間約1~約2mg/mlで適量のコラゲナーゼIを用いて最初に消化して、次に37°Cにおいて例えば10分間約0.25%の濃度で、トリプシンを用いて消化する。セリンプロテアーゼは、他の酵素の使用後に連続して使用することが好ましい。

30

## 【0028】

消化後、消化物を例えば血清を含む培養培地で洗浄し、洗浄した細胞は培養容器に播種する。次いで細胞は差次的接着によって単離し、間葉系細胞を調製する。例えば、臍帯のワルトン膠質由来間葉系細胞、卵膜の羊膜由来間葉系細胞、卵膜の絨毛膜由来間葉系細胞、及び胎盤由来間葉系細胞を調製することができる。さらに、これらの間葉系細胞は、培養上清を調製する前に、複数回、好ましくは10、9、8、7、6、5、4又は3回以下の範囲で、血清を含む培養培地で継代培養することができる。なお、本開示における胎児付属物由来組織細胞は、特に幹細胞を単離するための工程を含まず、細胞の調製が容易である。

40

## 【0029】

## 3. 培養上清の調製

胎児付属物由来組織細胞の「培養」とは、常法に従って、例えば、以下のように実施することができる。培養容器中で、必要に応じてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、アミノ酸、ビタミン、ホルモン、サイトカイン、抗生物質、脂肪酸、糖または目的に応じてその他の化学成分もしくは血清のような生体成分を含有した基本培地中に胎児付属物由来組織細胞を加えて、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で、培養温度を30~40°C、好ましくは37°Cで、二酸化炭素ガス濃度を0.03%~40%、好

50

ましくは5～10%、さらに好ましくは5%に調節して培養する。培養期間は、数時間レベルの短期間のものから、1日、1.5日、2日、3日、5日、7日間までを挙げることができる。

#### 【0030】

培地（培養液ともいう）については、胎児付属物由来組織細胞の増殖、維持・生存、タンパク質の分泌等を阻害するものでなければいかなる培地を用いてもよい。尚、基本培地としてはダルベコ改変イーグル培地（DMEM）の他、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、ハムF12培地（HamF12）、RPMI1640培地等を用いることができる。また、二種以上の基本培地を併用することにしてもよい。混合培地の一例として、IMDMとHamF12を等量混合した培地（例えば、IMDM/HamF12）を挙げることができる。また、培地に添加可能な成分の例として、血清（ウシ胎仔血清、ヒト血清、ウマ血清、ヒツジ血清等）、血清代替物（Knockout serum replacementなど）、各種コンディションド培地、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、抗生物質、各種ビタミン、海洋深層水、各種ミネラルを挙げることができる。

10

#### 【0031】

本開示において、脳神経障害治療剤を調製するための胎児付属物由来組織細胞の培地は、血清を含まないものであることが好ましい。血清を含まないことでプリオン等の感染のリスクや、ウシ血清アルブミン等の異種タンパク質の混入を防ぐことができ、脳神経障害治療剤の安全性が高められる。例えば、血清を含まない培地（無血清培地）で胎児付属物由来組織細胞を培養することによって、血清成分を含まない培養上清を調製することができる。

20

#### 【0032】

本開示において、脳神経障害治療剤を調製するための培地は、海洋深層水を含むことができる。「海洋深層水」とは、一般的に深度200メートルより深いところの海水であって、グリーンランド周辺において、塩分濃度差によって生じた「ブルーム」と呼ばれる垂直に沈む地球規模の海流が始まりとなって、一度も大気に触れる事なく、何世紀もの歳月をかけて地球を回っているといわれる海水である。この海洋深層水は、太陽光線がほとんど届かず、しかも低温高圧の状態にあるので、細菌が少なく、無機栄養塩（ミネラル）等を豊富に含んでいる。海洋深層水を含むことにより、培養上清の分泌タンパク質の量を調節し、海洋深層水を含まない場合と比較して、より高活性の脳神経障害治療剤を調製することができる。培地中に含まれる海洋深層水の濃度（v/v）は、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%または80%以上であり、また90%、80%、70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%または10%以下であり、1～85%、5～85%、10%～85%、15%～85%、20%～85%、25%～85%、30%～85%、40%～85%、50%～85%、60%～85%、70%～85%、80%～85%、1～75%、5～75%、10%～75%、15%～75%、20%～75%、25%～75%、30%～75%、40%～75%、50%～75%、60%～75%、70%～75%、1～45%、5～45%、10%～45%、15%～45%、20%～45%、25%～45%、30%～45%、40%～45%、1～10%または5～10%の範囲であり、73%または81%である。

30

40

#### 【0033】

胎児付属物由来組織細胞の培養上清を得るための培養時間としては、例えば、5時間～7日間、1日～6日間、1日～5日間、1日～4日間、1日～3日間または1日～2日間であってもよく、0.5日間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間または7日間である。培養温度は例えば、36～38℃、例えば37℃であり、CO<sub>2</sub>濃度は4～6%、例えば5%である。また、培養は、例えば非接着性条件下での三次元培養、例えば浮遊培養（例えば、分散培養、凝集浮遊培養など）により行ってもよい。

#### 【0034】

胎児付属物由来組織細胞の培養上清を得るための、培養開始時の胎児付属物由来組織細胞

50

胞の密度としては、例えば、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  個/mL、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$  個/mL、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  個/mL、 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  個/mL、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  個/mLまたは $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  個/mLであってもよく、 $2 \times 10^5$  個/mL、 $3 \times 10^5$  個/mL、 $4 \times 10^5$  個/mL、 $5 \times 10^5$  個/mL、 $6 \times 10^5$  個/mL、 $7 \times 10^5$  個/mL、 $8 \times 10^5$  個/mL、 $9 \times 10^5$  個/mL、 $1 \times 10^6$  個/mL、 $2 \times 10^6$  個/mL、 $3 \times 10^6$  個/mL、 $4 \times 10^6$  個/mL、 $5 \times 10^6$  個/mL、 $6 \times 10^6$  個/mL、 $7 \times 10^6$  個/mL、 $8 \times 10^6$  個/mL、 $9 \times 10^6$  個/mLまたは $1 \times 10^7$  個/mLである。

#### 【0035】

10

培養後に、細胞成分を分離除去することによって、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を得ることができる。本開示において、培養上清とは、培養液から細胞成分を分離除去した上清そのものだけでなく、各種処理（例えば、遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存等）を適宜施した培養上清もその範囲に含む。培養上清の処理方法の詳細は後述する。本開示において培養上清とは、細胞成分を含まない。このため、本開示における培養上清は、培養に用いられた胎児付属物由来組織細胞は含んでおらず、細胞医療用の組成物ではない。

#### 【0036】

本開示において、胎児付属物由来組織細胞はサイトカイン、ケモカイン、増殖因子等を培地中に分泌する。培養上清中に含まれるタンパク質としては、脳神経再生に重要な I n t e r l e u k i n ( I L ) - 6、C - X - C M o t i f C h e m o k i n e L i g a n d ( C X C L ) 1、C X C L 7、C X C L 8 ( I L - 8ともいう)及びC - C M o t i f C h e m o k i n e L i g a n d ( C C L ) 2 ( M C P - 1ともいう)があげられる。

20

#### 【0037】

本開示において、胎児付属物由来組織細胞の培養上清中にはさらに以下の1種又は2種以上のタンパク質が含まれてもよい：

T N F S u p e r f a m i l y M e m b e r 1 4 ( L I G H Tともいう) , I n t e r l e u k i n ( I L ) - 1 a , I L - 1 b , I L - 2 , I L - 3 , I L - 4 , I L - 5 , I L - 7 , I L - 1 0 , I L - 1 2 p 4 0 / 7 0 , I L - 1 3 , I L - 1 5 , I L - 1 6 , I n t e r f e r o n ( I F N ) - g , T u m o r N e c r o s i s F a c t o r ( T N F ) - a , T N F - bなどのサイトカイン；

30

C - X - C M o t i f C h e m o k i n e L i g a n d ( C X C L ) 1 / 2 / 3 ( G R O a / b / gともいう) , C X C L 6 , C X C L 9 ( M I Gともいう) , C X C L 1 0 ( I P - 1 0ともいう) , C X C L 1 2 ( S D F - 1ともいう) , C X C L 1 3 , C - C M o t i f C h e m o k i n e L i g a n d ( C C L ) 1 , C C L 4 , C C L 5 , C C L 7 , C C L 8 , C C L 1 1 , C C L 1 3 , C C L 1 5 , C C L 1 7 , C C L 1 8 , C C L 2 0 ( L A R Cともいう) , C C L 2 2 , C C L 2 3 , C C L 2 4 , C C L 2 6 , C - X 3 - C M o t i f C h e m o k i n e L i g a n d ( C X 3 C L ) 1 ( F K Nともいう)などのケモカイン；

40

A n g i o g e n i n , B r a i n D e r i v e d N e u r o t r o p h i c F a c t o r ( B D N F ) , E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r ( E G F ) , F i b r o b l a s t G r o w t h F a c t o r ( F G F ) - 4 , F G F - 6 , F G F - 7 , F G F - 9 , F m s R e l a t e d R e c e p t o r T y r o s i n e K i n a s e 3 L i g a n d ( F L T - 3 L ) , G l i a l C e l l D e r i v e d N e u r o t r o p h i c F a c t o r ( G D N F ) , G r a n u l o c y t e - M a c r o p h a g e C o l o n y - S t i m u l a t i n g F a c t o r ( G M - C S F ) , G r a n u l o c y t e C o l o n y - S t i m u l a t i n g F a c t o r ( G - C S F ) , H e p a t o c y t e G r o w t h F a c t o r ( H G F ) , I n s u l i n L i k e G r o w t h F a c t o r ( I G F ) - 1 , I n s u

50

lin Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) - 2, IGFBP - 1, IGFBP - 4, IGFBP - 3, Platelet Derived Growth Factor (PDGF) - BB, Placental Growth Factor (PLGF), Transforming Growth Factor (TGF) - b1, TGF - b2, TGF - b3, Thrombopoietin (TPO), Stem Cell Factor (SCF), Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), Neurotrophin (NT) - 3, NT - 4, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Aなどの増殖因子/関連因子; Leptin, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Osteopontin (OPN), Osteoprotegerin (OPG), Oncostatin M (OSM), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) - 1, TIMP - 2などのその他メディエーターなど。

10

## 【0038】

本開示において、胎児付属物由来組織細胞の培養上清中に含まれる因子は以下の点で神経再生に重要である。本開示に係る培養上清はこれらの因子の一部又は全部を含み、脳または中枢神経の再生に適している (Boruczowskiら、Int. J. Mol. Sci. 2019 20, 2433; Watsonら、Neuroscience Letters 2020 715, 134533; Wangら、Stem Cell Research & Therapy 2017 8, 26; Babaら、PLOS ONE 2019 14(9) e0221111; Wangら、Acta Medica Okayama 2012 66(6) 429など)。

20

a) 神経前駆細胞の増殖・生存: BDNF, CCL5, CXCL1, CXCL7, CXCL8, CX3CL1, EGF, FGF - 9, G-CSF, IGF - 1, IL - 6, OPN等

b) 神経前駆細胞の分化・成熟: BDNF, CCL11, CXCL1, CXCL7, CXCL9, CXCL12, CX3CL1, FGF - 4, FGF - 9, GDNF, GM-CSF, IL - 1b, LIF, OPN, SCF, TGF - b3等

30

c) 神経前駆細胞の遊走: CCL2, CCL11, CCL20, CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL12, EGF, IGF - 1, 等

d) 神経栄養: GDNF, NGF, NT - 4 / 5等

e) アストロサイトの活性化等: BDNF, IFN - g, IL - 1a, IL - 1b等

f) ミクログリア細胞の活性化等: CCL17, CXCL10, Leptin等

g) オリゴデンドロサイトの再生等: CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL12, CX3CL1, EGF, M-CSF, NT - 4, IGFBP - 4等

h) 血管新生: Angiogenin, CCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, Groa / b / c, HGF, IGF - 1, IL - 6, VEGF, SCF等

40

i) 抗炎症: CCL4, IL - 10, IL - 13, TGF - b2等

## 【0039】

本開示において、胎児付属物由来組織細胞の培養上清であるサイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)の混合物は、胎児付属物由来組織細胞培養上清の一部として又は胎児付属物由来組織細胞培養上清から単離されたサイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)の混合物として使用され得る。胎児付属物由来組織細胞培養上清から単離されたサイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)の混合物中、サイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)の一部を1又は複数の対応する遺伝子組み換え等のサイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)で置き換え、または対応する遺伝子組み換え等のサイトカイン及びケモカイン(及び増殖因子等)を添加してもよい。

50

## 【 0 0 4 0 】

## 4 . 脳神経障害治療剤

本開示に係る脳神経障害治療剤は、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を含有することにより、脳神経障害に対して神経組織を再生する効果を奏する。この効果の程度は、従来  
 の臍帯血幹細胞等の移植の効果の一部または全部を代替しうる。また、本開示に係る脳神  
 経障害治療剤は、驚くべきことに、脳室下帯の神経前駆細胞の増殖、脳神経障害部位への  
 ホーミング、脳神経傷害部位での神経細胞の分化・成熟を促進することにより、脳神経の  
 神経組織一般に対し広く一般的な神経再生効果を奏する。このため、本開示に係る脳神  
 経障害治療剤は、特定の脳神経障害に限定されず、広範囲の脳神経障害に対して脳神経再生  
 促進剤として脳神経障害の治療、症状の軽減等に用いることが可能である。本発明の脳神  
 経障害治療剤は、脳神経障害の発症前であるために、当該脳神経障害への罹患が未知の段  
 階であっても、対象への投与により対象内における脳神経障害の進行を有効に抑制できる  
 。このため、本開示に係る脳神経障害治療剤を習慣的に用いることにより、多岐に渡る脳  
 神経障害を発症前に治療し、発症の予防、遅延又は軽減することも可能である。すなわち  
 、本開示において「治療」の範囲には、脳神経障害による症状や異常を根治する処置だけ  
 でなく、根治に至らないまでも症状や異常を軽減させる、あるいは処置をしない場合に比  
 べて遅らせる処置も含まれ、さらに、発症の予防、遅延又は軽減することも含まれる。

10

## 【 0 0 4 1 】

本開示に係る脳神経障害治療剤は、神経再生を促進することから、多岐にわたる脳神経  
 障害に適用することができる。脳神経障害としては、例えば、遺伝性疾患ではない脳神経  
 障害である。本開示に係る脳神経障害治療剤は、非限定的に、ジスキネジア（レポドバ誘  
 発性ジスキネジア、慢性及び遅発性ジスキネジア、並びに口腔顔面ジスキネジア）、下肢  
 静止不能症候群（薬剤誘発性及び特発性）、薬物誘発性ジストニア、舞蹈病（ハンチント  
 ン病、毒素誘発性舞蹈病、シデナム（Sydenham）舞蹈病、妊娠舞蹈病、ウィルソ  
 ン病、薬物誘発性舞蹈病、並びに代謝性及び内分泌系舞蹈病）、顔面けいれん（運動性、  
 音声性、単純性、複雑性及びトゥレット症候群など）、ジストニア（急性、全身性、限局  
 性、分節性、性的、中間性、心因性及び急性ジストニー反応など）、Sodemytopi  
 cパーキンソン病、常同性運動障害（自閉症、遺伝性及び小児性関連運動障害など）、  
 強迫性障害、ナルコレプシー（脱力発作など）、伝達性海綿状脳症（クロイツフェルト・  
 ヤコブ病及びクールーなど）、認知症（アルツハイマー、レビー小体型認知症、脳血管性  
 認知症、ピック病及びアルコール性認知症など）、神経有棘赤血球症、発作及びけいれん  
 、アテトーシス（ハンチントン病、呼吸停止、新生児黄疸及び脳卒中関連など）、及び脳  
 性小児麻痺があげられる。

20

30

## 【 0 0 4 2 】

ある実施形態では、本開示に係る脳神経障害治療剤により治療する脳障害、例えば脳性  
 小児麻痺の徴候又は症状は、運動機能障害、言語若しくは発話機能障害、歩行若しくは移  
 動機能障害（例えば、歩行速度の低下）、機能障害性筋力、機能障害性筋緊張、異常反射、  
 異常協調、痙直、不随意運動、異常歩行、異常バランス、筋肉量低下、障害性骨格発達又  
 は障害性筋肉発達である。いくつかの実施形態では、本開示に係る脳神経障害治療剤によ  
 り治療する脳障害、例えば脳性小児麻痺の徴候又は症状は、手の力の障害、手先の器用さ  
 の障害、歩行速度の障害又は歩行障害である。いくつかの実施形態では、本開示に係る脳  
 神経障害治療剤により治療する脳障害、例えば脳性小児麻痺の徴候又は症状は、感覚運動  
 障害又は感覚運動機能の障害、例えば、それだけに限らないが、運動失調、全身制御障害  
 、協調若しくはバランス障害、身体感覚の障害、固有受容性感覚の障害、持久力障害、手  
 の機能の障害、手の力の障害、細かな手の協調の喪失若しくは障害、反射亢進、握力の障  
 害、筋力低下、筋緊張障害、運動範囲障害、痙直、力の障害/衰弱、振戦、四肢機能の障  
 害、上肢機能障害、下肢機能障害、下肢筋力の障害、歩行障害（例えば、歩行速度低下）、  
 立つ能力の障害、発話障害（例えば、構音障害）、顎機能の障害、咀嚼の障害、及び顎関節  
 の障害、器用さの障害、反射、又は本明細書に記載する若しくは当技術分野で既知の任意  
 の他の感覚運動機能である。

40

50

## 【 0 0 4 3 】

前記脳神経障害治療剤が投与される対象は、典型的には、標的組織に損傷を有するヒト患者であるが、ヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ等）への適用も想定される。

## 【 0 0 4 4 】

前記脳神経障害の発生する部位は、特に限定はされない。前記疾患の発生する部位は、脳全体又は一部であり、脳には前脳および脳幹があり、前脳には大脳及び間脳、脳幹には中脳および菱脳がある。大脳には、嗅脳、へんとう、線条体、海馬および大脳新皮質などがあり、間脳には視床上部、視床、視床下部、視床腹部、下垂体、松果体および第三脳室などがある。中脳には、中脳蓋、大脳脚、視蓋前域および中脳水道などがあり、菱脳には、橋、小脳および延髄などがある。前記脳神経障害の発生する部位は、これらの部位のいずれであってもよい。

10

## 【 0 0 4 5 】

本開示に係る脳神経障害治療剤を用いた治療方法は、胎児付属物由来組織細胞培養上清を経鼻（鼻腔内）投与して、脳の損傷部を修復すること、を含む。本治療方法によれば、脳性小児麻痺等の脳神経障害により損傷を受けた領域を低侵襲性で且つ効果的に回復させることができる。

## 【 0 0 4 6 】

## 5 . 製造方法

本開示においては、

( a ) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程、及び

( b ) 前記胎児付属物由来組織細胞の培養上清を回収する工程、

を含む、脳神経障害治療剤の製造方法も提供される。この製造方法は、前記回収された培養上清に遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、および脱塩の中から選択される一つ以上の処理を施す工程をさらに含んでもよい。このような工程を含むことにより、脳神経障害治療剤の取り扱いや保存、運搬がより容易になる。また、前記製造方法は、前記回収された培養上清に、追加の成分を添加する工程をさらに含んでもよい。そのような追加の成分の添加により、脳神経障害治療用組成物全体の物性を変化させ、その特性を向上することが可能である。また、前記製造方法は、胎児付属物由来組織の摘出する工程、及び胎児付属物由来組織から胎児付属物由来組織細胞体細胞を調製する工程をさらに含んでもよい。各々の工程ならびに追加の成分等については、本開示に係る脳神経障害治療剤の説明において記載した事項がそのまま当てはまる。前記回収された培養上清に遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、および脱塩の中から選択される一つ以上の処理を施す工程と、前記回収された培養上清に、追加の成分を添加する工程の両方を含む場合には、両工程はどちらを先に行ってもよく、また可能な場合には同時並行して行ってもよい。

20

30

## 【 0 0 4 7 】

上記工程 ( b ) においては、胎児付属物由来組織細胞培養上清を回収する。例えば、スポイトやピペットなどで培養液を吸引して回収することができる。回収した培養上清はそのまま或いは一以上の処理を経た後に本開示に係る脳神経障害治療剤の有効成分として使用される。ここでの処理として、遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、製剤化、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存（例えば、4℃、- 80℃）を例示することができる。尚、胎児付属物由来組織細胞の培養上清は、複雑高度な精製をしなくとも、所期の作用を示す。このため、本開示に係る脳神経障害治療剤は簡便な工程で製造できる。複雑な精製工程を要しないことは、精製に伴う活性の低下を回避できる点においても有利である。

40

## 【 0 0 4 8 】

本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は、複数のドナーからの胎児付属物由来組織細胞の由来であってもよい。すなわち、複数のドナーからの胎児付属物由来組織細胞

50

を混合して培養し、培養上清を回収してもよく、個々のドナー由来の胎児付属物由来組織細胞の培養上清を混合してもよく、一以上の処理（遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、製剤化、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存）を経た後に、個々のドナー由来の胎児付属物由来組織細胞の培養上清を混合してもよい。但し、本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は、混入するウイルス等による感染のリスクがあるため、大多数のドナーからの胎児付属物由来組織細胞を混合して培養しないほうが好ましい。尚、複数のドナーからの胎児付属物由来組織細胞の培養上清は、均質な脳神経障害治療剤として製造できる点において有利である。

#### 【0049】

<胎児付属物由来組織細胞培養上清の濃縮方法>

10

本開示に係る脳神経障害治療用組成物は、製剤化されたものであってもよい。製剤化のための胎児付属物由来組織細胞培養上清の濃縮方法としては、培養上清の濃縮に通常用いられている方法を適用することができる。濃縮方法の例としては、例えば、以下の二つの方法を挙げることができる。

##### 1) スピンカラム濃縮法

培養上清を Amicon Ultra Centrifugal Filter Units - 10K (ミリポア社製) を用いて濃縮する。具体的な操作手順は次の通りである。

(i) 培養上清 (最大 15 mL) を Amicon Ultra Centrifugal Filter Units - 10K へ投入し、 $\times 4000g$  で約 60 分間遠心し、200  $\mu$ L まで濃縮する。

20

(ii) 上記チューブへ培養上清と同量の滅菌 PBS を投入し、再度  $\times 4000g$  で約 60 分間遠心し、ベース溶液を PBS へ置換する。

(iii) 得られた溶液 200  $\mu$ L をマイクロテストチューブへ回収し、濃縮胎児付属物由来組織細胞培養上清とする。

#### 【0050】

##### 2) エタノール沈殿濃縮法

培養上清をエタノール沈殿法により濃縮する。具体的な操作手順は次の通りである。

(i) 培養上清 5 mL に対し 100% エタノール 4.5 mL を加え、混和し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 60 分間放置する。

30

(ii)  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $\times 15000g$  で 15 分間遠心する。

(iii) 上澄みを除去し、90% エタノール 10 mL を加え、よく攪拌する。

(iv)  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $\times 15000g$  で 5 分間遠心する。

(v) 上澄みを除去し、得られたペレットを滅菌水 500  $\mu$ L に溶解し、マイクロテストチューブへ回収し、濃縮胎児付属物由来組織細胞培養上清とする。

#### 【0051】

<胎児付属物由来組織細胞培養上清の凍結乾燥方法>

また本開示に係る脳神経障害治療剤における胎児付属物由来組織細胞培養上清は、凍結乾燥されたものであってもよい。これにより、良好な保存安定性が得られる。胎児付属物由来組織細胞培養上清の凍結乾燥方法としては、培養上清の凍結乾燥に通常用いられている方法を適用することができる。凍結乾燥方法の例としては、例えば、以下の方法を挙げるができる。凍結乾燥した培養上清は粉末製剤として、または水等の適切な溶剤等で再構成して使用することができる。

40

(i) 上記方法で得られた胎児付属物由来組織細胞培養上清又は濃縮胎児付属物由来組織細胞培養上清を  $-80^{\circ}\text{C}$  で 2 時間から半日凍結する。

(ii) 凍結後、サンプルチューブの蓋を開放し、凍結乾燥機へセットする。

(iii) 1 ~ 2 日間凍結乾燥を行う。

(iv) 得られたサンプルを凍結乾燥胎児付属物由来組織細胞培養上清とする ( $-80^{\circ}\text{C}$  で保存可能)。

#### 【0052】

50

## 6. 医薬組成物

適用される被検体の状態に応じて、期待される治療効果が維持されることを条件として、本開示に係る脳神経障害治療剤は、医薬組成物として他の成分を追加的に含んでもよい。追加的に含まれ得る成分の一例は以下の通りである。

### (i) 生体吸収性材料

有機系生体吸収性材料としてヒアルロン酸、コラーゲン、フィブリノーゲン（例えばボルヒール（登録商標））等を使用することができる。

#### 【0053】

### (ii) ゲル化材料

ゲル化材料は、生体親和性が高いものを用いることが好ましく、ヒアルロン酸、コラーゲン又はフィブリン糊等を用いることができる。ヒアルロン酸、コラーゲンとしては種々のものを選択して用いることができるが、本開示に係る脳神経障害治療剤の適用目的（適用組織）に適したものを採用することが好ましい。用いるコラーゲンは可溶性（酸可溶性コラーゲン、アルカリ可溶性コラーゲン、酵素可溶性コラーゲン等）であることが好ましい。

10

#### 【0054】

### (iii) その他

製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることもできる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。抗生物質、pH調整剤、成長因子（例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF））等を含有させることにしてもよい。

20

30

#### 【0055】

本開示に係る医薬組成物の最終的な形態は特に限定されない。形態の例は液体状（液状、ゲル状など）及び固体状（粉状、細粒、顆粒状など、凍結乾燥製剤を含む）である。本開示に係る医薬組成物は、吸入に適した形態を有していてもよく、例えば、ネブライザーやディフューザーによって霧状に散布可能な液体の形態を有していてもよい。脳神経障害の関係部位が脳であり、血液脳関門の存在を考慮すると、本開示に係る脳神経障害治療用組成物は経鼻投与、脳室内投与または髄腔内投与が可能な形態であることが望ましい。例えばスプレー状あるいは粉末状の形態で経鼻投与を行ってもよい。胎児付属物由来組織細胞の培養上清は、事前の準備や保存の点において、胎児付属物由来組織細胞や胎児付属物由来幹細胞などを用いる場合よりも有利であり、脳神経障害の急性期や亜急性期の治療に特に適するといえる。また、細胞成分を含まず、免疫拒絶の問題を克服し得るという点においても、胎児付属物由来組織細胞の培養上清の有用性は極めて高い。

40

#### 【0056】

とはいえ、実施形態によっては、本開示に係る脳神経障害治療剤は胎児付属物由来組織細胞の培養上清に加えて胎児付属物由来組織細胞、胎児付属物由来幹細胞、ES細胞、iPS細胞、又は間葉系幹細胞等を含むもの、あるいはこれらの幹細胞等と併用であってもよい。このような幹細胞等を追加的に用いることにより、治療効果が向上する場合がある

50

## 【0057】

本開示においては、本開示に係る脳神経障害治療剤を、脳神経障害発症前の対象に、前記脳神経障害の発症を抑えるために有効な量投与することを含む、前記対象において脳神経障害発症前に前記脳神経障害の発症を抑える方法、も提供される。前記対象は、ヒト、またはヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ等）であってもよい。前記対象は、脳神経障害を発病するリスクを有すると判定された対象であってもよい。そのようなリスクは、遺伝子診断、家系分析等により判定することが出来る。例えば、特定の遺伝子における特定のアレル、SNPの存在が、特定の疾患への罹患確率に相関することが統計的に明らかにされている例がある。

10

## 【0058】

本開示に係る脳神経障害治療剤の投与量は、期待される治療効果が維持されることを条件として限定されないが、例えば、未処理の培養上清の量に換算して、0.1 mL/kg/日～100 mL/kg/日、1 mL/kg/日～100 mL/kg/日又は5 mL/kg/日～100 mL/kg/日であり、未処理の培養上清のタンパク質量に換算して、0.1 mg/kg/日～1000 mg/kg/日であり、また、1 mg/kg/日～100 mg/kg/日であってもよい。また、投与の方法は特に制限されない。例えば、前記脳神経障害治療剤の投与は、非経口投与であることが好ましく、非経口投与としては、全身性投与であっても局所投与であってもよい。前記脳神経障害治療剤の投与方法の例としては、期待される治療効果が維持されることを条件として限定されないが、例えば、静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、経肺投与（経肺吸収）、脳室内投与、髄腔内投与及び経鼻投与等を挙げることができる。中でも、経鼻投与等は、低侵襲性であり、好ましい。また、脳室内投与、髄腔内投与及び経鼻投与によれば、血液脳関門の通過可能性について懸念する必要が無いため、脳神経障害の治療においては特に有効である。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの作成においては、対象の性別、年齢、体重、病態などを考慮することができる。

20

## 【0059】

## 7. 脳神経再生促進剤

本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は脳神経再生促進剤である。「脳神経再生」とは、脳における神経前駆細胞の増加、分化・成熟等による神経の修復又は神経の発生過程で生じる様々な現象のうち少なくとも一つを示していればよい。また、その結果として、神経再生とは、本来の神経の機能が完全又は部分的に回復する現象を含むことが好ましい。効率的な神経再生が達成されたかどうかは、公知の方法により確認可能である。例えば、神経損傷があり神経再生促進剤が投与された患者又は畜患と、神経損傷があり神経再生促進剤が投与されていない患者又は畜患とを比較して、神経再生促進剤が投与された患者又は畜患のほうで、損傷した神経の機能の回復の程度が高い場合、効率的な神経再生が達成されたと判断できる。神経の機能の回復は、後述の実施例に示すように、刺激への反応や運動機能の回復等を指標に評価できる。運動機能の回復は例えば、ローターロッド試験（Ohら、Exp. Mol. Med. 2018 50(4), 22; Kossatzら、Front. Pharmacol. 2018 9, 376）、Y-maze試験（Miedelら、J. Vis. Exp. 2017(123); Sarnyaiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 97(26), 14731）、ハンギングワイヤ試験（Aartsma-Rusら、J. Vis. Exp. 2014(85)）など、公知な方法で調べることができる。

30

40

## 【0060】

神経再生は、欠損が生じた神経由来の細胞であって、治療対象部位にもともと存在する細胞（内在性の細胞）によるものであってもよいし、例えば神経再生促進剤とともに移植された細胞（外来性の細胞）によるものであってもよい。これらの細胞としては、神経細

50

胞、神経前駆細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、造血幹細胞等を挙げることができる。

【0061】

本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は脳神経再生促進剤であり、脳神経前駆細胞増殖・生存促進剤でありうる。「脳神経前駆細胞増殖・生存促進剤」とは、脳における神経前駆細胞の増殖又は生存維持を促進する薬剤である。効率的な脳神経前駆細胞の増殖又は生存維持が達成されたかどうかは、公知の方法により確認可能である。例えば、後述の実施例に示すように、脳神経前駆細胞増殖・生存促進剤を添加することにより、脳もしくは脳由来またはこれらに相当する神経前駆細胞の増殖又は生存が亢進することを観察することにより評価できる。神経前駆細胞は生体から採取した細胞でもよく、iPS等の幹細胞から分化させた細胞でもよく、細胞株（例えば、A172, B65, C6, KS-1, N2A, PC12, SH-SY5Y, SKN-BE2, T98G, U251, U87, YH-13）を使用してもよい。

10

【0062】

本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は脳神経再生促進剤であり、脳神経前駆細胞ホーミング促進剤でありうる。「脳神経前駆細胞ホーミング促進剤」とは、脳障害部位への神経前駆細胞の遊走を促進する薬剤である。効率的な脳神経前駆細胞のホーミングが達成されたかどうかは、公知の方法により確認可能である。例えば、神経損傷があり脳神経前駆細胞ホーミング促進剤が投与された患者又は畜患と、神経損傷があり脳神経前駆細胞増殖促進剤が投与されていない患者又は畜患とを比較して、脳神経前駆細胞ホーミング促進剤が投与された患者又は畜患のほうで、脳神経前駆細胞の、海馬の顆粒細胞下帯や脳室下帯からの脳障害部位への移動が多く観察される場合、効率的な脳神経前駆細胞のホーミングが達成されたと判断できる。また、神経前駆細胞などの細胞を併用して投与した場合、投与した細胞が脳障害部位へ集積することによっても同様に判断できる。脳神経前駆細胞のホーミングは、後述の実施例に示すように、脳神経前駆細胞のマーカー（例えば、DCX (doublecortin)、SOX2 (SRX (sex determining region Y) - box 2)、PAX6 (paired box 6) ) を指標に評価できる。

20

【0063】

本開示に係る胎児付属物由来組織細胞培養上清は脳神経再生促進剤であり、脳神経前駆細胞分化・成熟促進剤でありうる。「脳神経前駆細胞分化・成熟促進剤」とは、脳における神経前駆細胞が軸索を伸展して、神経細胞への分化・成熟することを促進する薬剤である。

30

効率的な脳神経前駆細胞の分化・成熟が達成されたかどうかは、公知の方法により確認可能である。例えば、後述の実施例に示すように、脳神経前駆細胞分化・成熟促進剤を添加することにより、脳または脳由来の神経前駆細胞が軸索を伸展することを観察する、あるいは進展した軸索の長さを測定することにより評価できる。神経前駆細胞は生体から採取した細胞でもよく、iPS等の幹細胞から分化させた細胞でもよく、細胞株（例えば、A172, B65, C6, KS-1, N2A, PC12, SH-SY5Y, SKN-BE2, T98G, U251, U87, YH-13）を使用してもよい。

40

【0064】

本開示に係る脳神経再生促進剤はサイトカイン、ケモカイン等を含む。サイトカイン、ケモカイン等としては、脳神経再生に重要な Interleukin (IL) - 6、C-X-C Motif Chemokine Ligand (CXCL) 1、CXCL7、CXCL8 (IL-8ともいう) 及び C-C Motif Chemokine Ligand (CCL) 2 (MCP-1ともいう) があげられる。

【0065】

本開示に係る脳神経再生促進剤はさらに以下の1種又は2種以上のタンパク質が含まれてもよい：

TNF Superfamily Member 14 (LIGHTともいう), Int

50

erleukin (IL) - 1 a , IL - 1 b , IL - 2 , IL - 3 , IL - 4 , IL - 5 , IL - 7 , IL - 10 , IL - 12 p 40 / 70 , IL - 13 , IL - 15 , IL - 16 , Interferon (IFN) - g , Tumor Necrosis Factor (TNF) - a , TNF - b などのサイトカイン ;

C - X - C Motif Chemokine Ligand (CXCL) 1 / 2 / 3 (GROa / b / gともいう) , CXCL6 , CXCL9 (MIGともいう) , CXCL10 (IP - 10ともいう) , CXCL12 (SDF - 1ともいう) , CXCL13 , C - C Motif Chemokine Ligand (CCL) 1 , CCL4 , CCL5 , CCL7 , CCL8 , CCL11 , CCL13 , CCL15 , CCL17 , CCL18 , CCL20 (LARCともいう) , CCL22 , CCL23 , CCL24 , CCL26 , C - X3 - C Motif Chemokine Ligand (CX3CL) 1 (FKNともいう) などのケモカイン ;

Angiogenin , Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) , Epidermal Growth Factor (EGF) , Fibroblast Growth Factor (FGF) - 4 , FGF - 6 , FGF - 7 , FGF - 9 , Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT - 3L) , Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) , Granulocyte - Macrophage Colony - Stimulating Factor (GM - CSF) , Granulocyte Colony - Stimulating Factor (G - CSF) , Hepatocyte Growth Factor (HGF) , Insulin Like Growth Factor (IGF) - 1 , Insulin Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) - 2 , IGFBP - 1 , IGFBP - 4 , IGFBP - 3 , Platelet Derived Growth Factor (PDGF) - BB , Placental Growth Factor (PLGF) , Transforming Growth Factor (TGF) - b1 , TGF - b2 , TGF - b3 , Thrombopoietin (TPO) , Stem Cell Factor (SCF) , Macrophage Colony Stimulating Factor (M - CSF) , Neurotrophin (NT) - 3 , NT - 4 , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - A などの増殖因子 / 関連因子 ;

Leptin , Leukemia Inhibitory Factor (LIF) , Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) , Osteopontin (OPN) , Osteoprotegerin (OPG) , Oncostatin M (OSM) , Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) - 1 , TIMP - 2 などのその他メディエーターなど。

#### 【0066】

本開示において、脳神経再生促進剤を調製するための培地は、海洋深層水を含むことができる。「海洋深層水」とは、一般的に深度200メートルより深いところの海水であって、グリーンランド周辺において、塩分濃度差によって生じた「ブルーム」と呼ばれる垂直に沈む地球規模の海流が始まりとなっており、一度も大気に触れる事なく、何世紀もの歳月をかけて地球を回っているといわれる海水である。この海洋深層水は、太陽光線がほとんど届かず、しかも低温高圧の状態にあるので、細菌が少なく、無機栄養塩（ミネラル）等を豊富に含んでいる。海洋深層水を含むことにより、培養上清の分泌タンパク質の量を調節し、海洋深層水を含まない場合と比較して、より高活性の脳神経障害治療剤を調製することができる。培地中に含まれる海洋深層水の濃度（v / v）は、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%または80%以上であり、また90%、80%、70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%または

10

20

30

40

50

10%以下であり、1~85%、5~85%、10%~85%、15%~85%、20%~85%、25%~85%、30%~85%、40%~85%、50%~85%、60%~85%、70%~85%、80%~85%、1~75%、5~75%、10%~75%、15%~75%、20%~75%、25%~75%、30%~75%、40%~75%、50%~75%、60%~75%、70%~75%、1~45%、5~45%、10%~45%、15%~45%、20%~45%、25%~45%、30%~45%、40%~45%、1~10%または5~10%の範囲であり、73%または81%である。

【0067】

脳神経再生促進剤である、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を得るための培養時間としては、例えば、5時間~7日間、1日~6日間、1日~5日間、1日~4日間、1日~3日間または1日~2日間であってもよく、0.5日間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間または7日間である。培養温度は例えば、36~38、例えば37、であり、CO<sub>2</sub>濃度は4~6%、例えば5%である。また、培養は、例えば非接着性条件下での三次元培養、例えば浮遊培養（例えば、分散培養、凝集浮遊培養など）により行ってもよい。

10

【0068】

脳神経再生促進剤である、胎児付属物由来組織細胞の培養上清を得るための、培養開始時の胎児付属物由来組織細胞の密度としては、例えば、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個/mL、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL、 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mLまたは $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個/mLであってもよく、 $2 \times 10^5$ 個/mL、 $3 \times 10^5$ 個/mL、 $4 \times 10^5$ 個/mL、 $5 \times 10^5$ 個/mL、 $6 \times 10^5$ 個/mL、 $7 \times 10^5$ 個/mL、 $8 \times 10^5$ 個/mL、 $9 \times 10^5$ 個/mL、 $1 \times 10^6$ 個/mL、 $2 \times 10^6$ 個/mL、 $3 \times 10^6$ 個/mL、 $4 \times 10^6$ 個/mL、 $5 \times 10^6$ 個/mL、 $6 \times 10^6$ 個/mL、 $7 \times 10^6$ 個/mL、 $8 \times 10^6$ 個/mL、 $9 \times 10^6$ 個/mLまたは $1 \times 10^7$ 個/mLである。

20

【0069】

本開示に係る脳神経再生促進剤は、神経再生を促進することから、多岐にわたる脳神経障害に適用することができる。脳神経障害としては、例えば、遺伝性疾患ではない脳神経障害である。本開示に係る脳神経障害治療剤は、非限定的に、ジスキネジア（レポドバ誘発性ジスキネジア、慢性及び遅発性ジスキネジア、並びに口腔顔面ジスキネジア）、下肢静止不能症候群（薬剤誘発性及び特発性）、薬物誘発性ジストニア、舞蹈病（ハンチントン病、毒素誘発性舞蹈病、シデナム（Sydenham）舞蹈病、妊娠舞蹈病、ウィルソン病、薬物誘発性舞蹈病、並びに代謝性及び内分泌系舞蹈病）、顔面けいれん（運動性、音声性、単純性、複雑性及びトゥレット症候群など）、ジストニア（急性、全身性、限局性、分節性、性的、中間性、心因性及び急性ジストニー反応など）、Sodemytopiicパーキンソン病、常同性運動障害（自閉症、遺伝性及び小児性関連運動障害など）、強迫性障害、ナルコレプシー（脱力発作など）、伝達性海綿状脳症（クロイツフェルト・ヤコブ病及びクールーなど）、認知症（アルツハイマー、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、ピック病及びアルコール性認知症など）、神経有棘赤血球症、発作及びけいれん、アテトーシス（ハンチントン病、呼吸停止、新生児黄疸及び脳卒中関連など）、及び脳性小児まひがあげられる。

30

40

【0070】

ある実施形態では、本開示に係る脳神経再生促進剤により治療する脳障害、例えば脳性小児麻痺の徴候又は症状は、運動機能障害、言語若しくは発話機能障害、歩行若しくは移動機能障害（例えば、歩行速度の低下）、機能障害性筋力、機能障害性筋緊張、異常反射、異常協調、痙直、不随意運動、異常歩行、異常バランス、筋肉量低下、障害性骨格発達又は障害性筋肉発達である。いくつかの実施形態では、本開示に係る脳神経再生促進剤により治療する脳障害、例えば脳性小児麻痺の徴候又は症状は、手の力の障害、手先の器用さの障害、歩行速度の障害又は歩行障害である。いくつかの実施形態では、本開示に係る脳

50

神経再生促進剤により治療する脳障害、例えば脳性小児麻痺の徴候又は症状は、感覚運動障害又は感覚運動機能の障害、例えば、それだけに限らないが、運動失調、全身制御障害、協調若しくはバランス障害、身体感覚の障害、固有受容性感覚の障害、持久力障害、手の機能の障害、手の力の障害、細かな手の協調の喪失若しくは障害、反射亢進、握力の障害、筋力低下、筋緊張障害、運動範囲障害、痙直、力の障害/衰弱、振戦、四肢機能の障害、上肢機能障害、下肢機能障害、下肢筋力の障害、歩行障害(例えば、歩行速度低下)、立つ能力の障害、発話障害(例えば、構音障害)、顎機能の障害、咀嚼の障害、及び顎関節の障害、器用さの障害、反射、又は本明細書に記載する若しくは当技術分野で既知の任意の他の感覚運動機能である。

【0071】

本開示においては、

- (a) 胎児付属物由来組織細胞を培養する工程、及び
- (b) 前記胎児付属物由来組織細胞の培養上清を回収する工程、

を含む、脳神経再生促進剤の製造方法も提供される。この製造方法は、前記回収された培養上清に遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、および脱塩の中から選択される一つ以上の処理を施す工程をさらに含んでもよい。このような工程を含むことにより、脳神経再生促進剤の取り扱いや保存、運搬がより容易になる。また、前記製造方法は、前記回収された培養上清に、追加の成分を添加する工程をさらに含んでもよい。そのような追加の成分の添加により、脳神経再生促進用組成物全体の物性を変化させ、その特性を向上することが可能である。また、前記製造方法は、胎児付属物由来組織から胎児付属物由来組織細胞を調製する工程をさらに含んでもよい。各々の工程ならびに追加の成分等については、本開示に係る脳神経障害治療剤の説明において記載した事項がそのまま当てはまる。前記回収された培養上清に遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、および脱塩の中から選択される一つ以上の処理を施す工程と、前記回収された培養上清に、追加の成分を添加する工程の両方を含む場合には、両工程はどちらを先に行ってもよく、また可能な場合には同時並行して行ってもよい。

【0072】

適用される被検体の状態に応じて、期待される治療効果が維持されることを条件として、本開示に係る脳神経再生促進剤は、医薬組成物として他の成分を追加的に含んでもよい。追加的に含まれ得る成分の一例は以下の通りである。

(i) 生体吸収性材料

有機系生体吸収性材料としてヒアルロン酸、コラーゲン、フィブリノーゲン(例えばボルヒール(登録商標))等を使用することができる。

【0073】

(ii) ゲル化材料

ゲル化材料は、生体親和性が高いものを用いることが好ましく、ヒアルロン酸、コラーゲン又はフィブリン糊等を用いることができる。ヒアルロン酸、コラーゲンとしては種々のものを選択して用いることができるが、本開示に係る脳神経再生促進剤の適用目的(適用組織)に適したものを採用することが好ましい。用いるコラーゲンは可溶性(酸可溶性コラーゲン、アルカリ可溶性コラーゲン、酵素可溶性コラーゲン等)であることが好ましい。

【0074】

(iii) その他

製剤上許容される他の成分(例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など)を含有させることもできる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることが

10

20

30

40

50

できる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。抗生物質、pH調整剤、成長因子（例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF））等を含むことができる。

10

#### 【0075】

本開示に係る脳神経再生促進剤の医薬組成物の最終的な形態は特に限定されない。形態の例は液体状（液状、ゲル状など）及び固体状（粉状、細粒、顆粒状など、凍結乾燥製剤を含む）である。本開示に係る医薬組成物は、吸入に適した形態を有していてもよく、例えば、ネブライザーやディフューザーによって霧状に散布可能な液体の形態を有していてもよい。脳神経障害の関係部位が脳であり、血液脳関門の存在を考慮すると、本開示に係る脳神経再生促進用組成物は経鼻投与、脳室内投与または髄腔内投与が可能な形態であることが望ましい。例えばスプレー状あるいは粉末状の形態で経鼻投与を行ってもよい。胎児付属物由来組織細胞の培養上清は、事前の準備や保存の点において、胎児付属物由来組織細胞や胎児付属物由来幹細胞を用いる場合よりも有利であり、脳神経障害の急性期や亜急性期の治療に特に適するといえる。また、細胞成分を含まず、免疫拒絶の問題を克服し得るという点においても、胎児付属物由来組織細胞の培養上清の有用性は極めて高い。

20

#### 【実施例】

#### 【0076】

次に実施例によって本発明を更に詳細に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 【0077】

##### 実施例1：胎児付属物由来組織細胞及び培養上清の調製

##### 1) ワルトン膠質由来間葉系細胞の調製

高知大学医学部附属病院産婦人科からインフォームドコンセントにて供与された、ヒト臍帯を70%エタノールに数秒浸漬させ滅菌し、リン酸緩衝液（D-PBS）を用い、周囲に付着した血液等を洗浄除去した。その後、臍帯を切開して臍静脈及び臍動脈を除去し、ワルトン膠質を臍帯周囲膜から切り離れた。ワルトン膠質を細切後、10cmプラスチックシャーレ上に2gの組織片を並べた。組織片の上から細胞培養メッシュCellamigo（登録商標）（TSUBAKIMOTO CHAIN社製）を乗せ、MEM（10% FBS, 100u/mL Penicillin, 100µg/mL Streptomycinを含む）を添加し、37、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。組織片から遊離及び増殖した接着性の細胞を2～5回継代した細胞をワルトン膠質由来間葉系細胞とした。

30

#### 【0078】

##### 2) 羊膜由来間葉系細胞の調製

高知大学医学部附属病院産婦人科からインフォームドコンセントにて供与された、ヒト卵膜を70%エタノールに数秒浸漬させ滅菌し、手法により膜の剥離を行った。卵膜胎児側から1層目を羊膜として回収し、Hematoxylin-Eosin染色により膜構造の確認を行った。[0.05% Trypsin/0.2 mM EDTA]溶液に浸漬させ、37で1.5時間反応させて羊膜上皮組織を分散させた。残った羊膜結合織に対して[2.4mg/L Collagenase, 0.01 mg/mL DNase]酵素溶液に浸漬させ、37で1.5時間反応させて羊膜結合織を分散させた。羊膜結合織分散液は70µmセルストレーナーを通過させ、通過した液に対し遠心分離及び上清除去、D-PBS再浮遊操作を2回繰り返して酵素溶液を除き、得られた細胞にMEM（10% FBS, 100u/mL Penicillin, 100µg/mL St

40

50

reptomycinを含む)を添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。増殖した細胞を2~5回継代した細胞を羊膜由来間葉系細胞とした。

#### 【0079】

##### 3) 絨毛膜由来間葉系細胞

前記ヒト卵膜を70%エタノールに数秒浸漬させ滅菌し、用手法により膜の剥離を行った。卵膜胎児側から2層目を絨毛膜結合織として回収し、Hematoxylin-Eosin染色により膜構造の確認を行った。絨毛膜結合織に対して[2.4mg/L Collagenase、0.01mg/mL DNase]酵素溶液に浸漬させ、37℃で1.5時間反応させて絨毛膜結合織を分散させた。絨毛膜結合織分散液は100μmセルストレーナーを通過させ、通過した液に対し遠心分離及び上清除去、D-PBS再浮遊操作を2回繰り返した。さらに[0.05% Trypsin/0.2mM EDTA]溶液に浸漬させ、37℃で5分間反応後、MEM(10% FBS, 100u/mL Penicillin, 100μg/mL Streptomycinを含む)を添加し反応を停止させた。Trypsinによる分散液は、70μmセルストレーナーを通過させ、通過した液に対し遠心分離及び上清除去、D-PBS再浮遊操作を2回繰り返して酵素溶液を除き、得られた細胞にMEM(10% FBS, 100u/mL Penicillin, 100μg/mL Streptomycinを含む)を添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。増殖した細胞を2-5回継代した細胞を絨毛膜由来間葉系細胞とした。

#### 【0080】

##### 4) 胎児付属物由来組織細胞の培養

ヒトワルトン膠質由来間葉系細胞、ヒト羊膜由来間葉系細胞またはヒト絨毛膜由来間葉系細胞をDMEM培地またはRPMI1640培地に2×10<sup>5</sup>個/mLで懸濁し、海洋深層水を添加せず、または添加して、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で24時間培養した。海洋深層水としては、高知県室戸の沖合から取水した「天海の水 1000」(赤穂化成社製)を使用した。NucleoCounter NC-100(ChemoMetec社製)を用いて細胞の生存率を測定したところ、経時的に生存率は低下するものの、海洋深層水の添加、非添加により差は見られなかった。培地を回収し、300Gで10分間、遠心分離して培養上清を調製した。

#### 【0081】

##### 実施例2：胎児付属物由来組織細胞と神経前駆細胞の共培養による神経再生

##### 1) 神経前駆細胞の調製

NOD/SCIDマウス(日本チャールスリバー：NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J)の生後1週齢程度の新生児を安楽死させて脳組織を採取した。脳室下帯周囲組織を切り出し、これを神経細胞用分散液(Sumitomo Dainippon Pharma社製)を用いて分散させ、得られた細胞を20ng/mLのepidermal growth factor(EGF)、10ng/mL fibroblast growth factor(FGF)、2μL/mLヘパリン(Stemcell Technologies社製)を添加したNeuroCult増殖培地(Stemcell Technologies社製)において、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、神経前駆細胞塊を形成させ、以下の試験に供した。

#### 【0082】

##### 2) 共培養

実施例1で調製したヒトワルトン膠質由来間葉系細胞と、実施例2で調製したマウス神経前駆細胞をそれぞれNeuroCult Basal complete medium(Stemcell Technologies社製)に懸濁し、μ-slide chemotaxis(ibidi社製)を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub>で、両細胞が非接触条件下で共培養した。顕微鏡的観察により培養3日目と7日目に神経前駆細胞の増殖と分化・成熟を評価した。図1に示すように、ワルトン膠質由来間葉系細胞と共培養した神経前駆細胞は、単独で培養した場合と比較して、神経前駆細胞の増殖又は生存維持が

促進し、神経前駆細胞の移動(遊走)が観察され、さらに軸索を伸展したニューロンへの分化・成熟が認められた。

以上の結果から、ワルトン膠質由来間葉系細胞は、調製した状態(すなわち、幹細胞などを単離しているわけではないため、各種細胞が含まれる状態)で、神経前駆細胞の増殖、生存、移動(遊走)、分化・成熟を亢進する因子を分泌しているものと考えられた。

#### 【0083】

##### 実施例3：胎児付属物由来組織細胞培養上清による神経再生(in vitro)

###### 1) 神経前駆細胞に対する効果

実施例2で調製した神経前駆細胞をNeuroCult Basal complete medium(Stemcell Technologies社製)に懸濁し、 $\mu$ -slide chemotaxis (ibidi社製)に播種して、そこに実施例1で得られたヒトワルトン膠質由来間葉系細胞の培養上清を50%(v/v)で添加して、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。対照として、ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清を調製する際に使用した培地を同量添加した。顕微鏡的観察により培養3日目と7日目に神経前駆細胞の増殖と分化・成熟を評価した。図2に示すように、ワルトン膠質由来間葉系細胞の培養上清を添加した神経前駆細胞は、対照と比較して、培養3日目には軸索の伸展が認められ、培養3日目、7日目には細胞の増殖又は生存維持が促進され、さらに神経前駆細胞の移動(遊走)が観察された。

以上の結果から、ワルトン膠質由来間葉系細胞は、調製した状態(すなわち、幹細胞などを単離しているわけではないため、各種細胞が含まれる状態)で、神経前駆細胞の増殖、生存、移動(遊走)、分化・成熟を亢進する因子を分泌しており、ワルトン膠質由来間葉系細胞の培養上清は神経再生を促進するものと考えられた。

#### 【0084】

###### 2) 神経前駆細胞に対する効果(2)

神経前駆細胞である、ヒト神経芽細胞腫株SH-SY5Y(ATCC、番号CRL-2226)をDMEM培養液にて $2 \times 10^5$  cells/mLで96ウェルプラスチックプレートに100 $\mu$ Lずつ播種した。実施例1で調製した各種培養上清を100 $\mu$ L添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で5日間培養した。対照として、各種培養上清を調製する際に使用した培地を同量添加して培養した。培養後位相差顕微鏡にて撮影し、解析ソフトImageJ(NIH)を使用し神経突起の長さを測定した。

対照群の平均神経突起長が29 $\mu$ mに対して、ヒトワルトン膠質由来間葉系細胞、ヒト羊膜由来間葉系細胞及びヒト絨毛膜由来間葉系細胞の培養上清を添加した場合の平均神経突起長はそれぞれ、62 $\mu$ m、43 $\mu$ m及び41 $\mu$ m(n=3ウェル)であり、胎児付属物由来組織細胞培養上清は神経前駆細胞の軸索伸長を促し、神経分化を促進することが示唆された。

以上の結果から、胎児付属物由来組織細胞は、調製した状態(すなわち、幹細胞などを単離しているわけではないため、各種細胞が含まれる状態)で、神経前駆細胞の生存維持及び分化・成熟を亢進する因子を分泌しており、胎児付属物由来組織細胞の培養上清は神経再生を促進するものと考えられた。

#### 【0085】

###### 3) 培養上清に含まれる因子

実施例1で調製したワルトン膠質由来間葉系細胞、羊膜由来間葉系細胞、絨毛膜由来間葉系細胞の培養上清中に含まれる因子を抗体アレイ(RayBiotech社製、Human Cytokine Array C5)により調べた(n=3)。表1~3に示すように、培養上清中にはIL-6などのサイトカイン、CCL2、CXCL1、CXCL5、CXCL7、CXCL8、GRO $\alpha$ /b/gなどのケモカイン、BDNF、EGFなどの増殖因子、Osteopontin(OPN)などが含まれていることが分かり、これらの因子が神経再生を促進しているものと考えられた。なお、海洋深層水を8、41、73、81%の濃度で添加した培地で培養上清を調製した場合、これらの一部の因子、またはすべての因子の濃度が増加することが分かった。

【 0 0 8 6 】

【表 1】

ワルトン膠質由来間葉系細胞の培養上清中に含まれる因子

因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度
Angiogenin	136	CXCL5	182	IGFBP-1	72	LIGHT	59
BDNF	76	CXCL6	144	IGFBP-2	131	M-CSF	83
CCL1	27	CXCL7	96	IGFBP-3	116	MIF	103
CCL2	1297	CXCL8	1396	IGFBP-4	114	NT3	244
CCL4	107	CXCL9	86	IL-1a	40	NT-4	126
CCL5	64	CXCL10	157	IL-1b	47	OPG	377
CCL7	57	CXCL12	36	IL-2	37	OPN	405
CCL8	36	CXCL13	53	IL-3	51	OSM	78
CCL11	64	EGF	62	IL-4	52	PDGF-BB	43
CCL13	76	FGF-4	55	IL-5	45	PLGF	63
CCL15	29	FGF-6	85	IL-6	1462	SCF	40
CCL17	77	FGF-7	38	IL-7	68	TGF-b1	31
CCL18	81	FGF-9	79	IL-10	74	TGF-b2	278
CCL20	70	FLT-3L	28	IL-12	38	TGF-b3	86
CCL22	74	G-CSF	32	IL-13	25	TIMP-1	373
CCL23	50	GDNF	56	IL-15	59	TIMP-2	1101
CCL24	83	GM-CSF	67	IL-16	54	TNF-a	46
CCL26	81	GRO a/b/g	349	INF-g	47	TNF-b	72
CX3CL1	38	HGF	101	Leptin	36	TPO	37
CXCL1	577	IGF-1	80	LIF	148	VEGF-A	52

10

20

【 0 0 8 7 】

【表 2】

羊膜由来間葉系細胞の培養上清中に含まれる因子

因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度
Angiogenin	137	CXCL5	166	IGFBP-1	20	LIGHT	20
BDNF	48	CXCL6	45	IGFBP-2	83	M-CSF	50
CCL1	16	CXCL7	38	IGFBP-3	68	MIF	87
CCL2	1137	CXCL8	888	IGFBP-4	42	NT-3	147
CCL4	86	CXCL9	42	IL-1a	18	NT-4	49
CCL5	20	CXCL10	130	IL-1b	20	OPG	102
CCL7	43	CXCL12	7	IL-2	22	OPN	196
CCL8	18	CXCL13	14	IL-3	30	OSM	34
CCL11	21	EGF	25	IL-4	22	PDGF-BB	25
CCL13	19	FGF-4	16	IL-5	14	PLGF	28
CCL15	6	FGF-6	40	IL-6	847	SCF	12
CCL17	43	FGF-7	15	IL-7	28	TGF-b1	19
CCL18	40	FGF-9	54	IL-10	53	TGF-b2	223
CCL20	25	FLT-3L	14	IL-12	14	TGF-b3	34
CCL22	39	G-CSF	16	IL-13	4	TIMP-1	319
CCL23	18	GDNF	18	IL-15	28	TIMP-2	1249
CCL24	31	GM-CSF	34	IL-16	20	TNF-a	31
CCL26	28	GRO a/b/g	85	INF-g	30	TNF-b	47
CX3CL1	15	HGF	19	Leptin	16	TPO	15
CXCL1	423	IGF-1	28	LIF	96	VEGF-A	27

30

40

【 0 0 8 8 】

【表 3】

## 絨毛膜由来間葉系細胞の培養上清に含まれる因子

因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度	因子	相対的濃度
Angiogenin	100	CXCL5	44	IGFBP-1	43	LIGHT	44
BDNF	106	CXCL6	33	IGFBP-2	73	M-CSF	82
CCL1	32	CXCL7	55	IGFBP-3	68	MIF	77
CCL2	1264	CXCL8	1128	IGFBP-4	44	NT3	186
CCL4	76	CXCL9	48	IL-1a	29	NT-4	27
CCL5	58	CXCL10	224	IL-1b	39	OPG	234
CCL7	41	CXCL12	45	IL-2	49	OPN	107
CCL8	41	CXCL13	38	IL-3	55	OSM	63
CCL11	48	EGF	43	IL-4	43	PDGF-BB	54
CCL13	46	FGF-4	14	IL-5	26	PLGF	63
CCL15	17	FGF-6	40	IL-6	2104	SCF	53
CCL17	99	FGF-7	18	IL-7	50	TGF- $\beta$ 1	46
CCL18	77	FGF-9	83	IL-10	51	TGF- $\beta$ 2	288
CCL20	47	FLT-3L	20	IL-12	32	TGF- $\beta$ 3	61
CCL22	56	G-CSF	28	IL-13	17	TIMP-1	386
CCL23	46	GDNF	41	IL-15	75	TIMP-2	1125
CCL24	47	GM-CSF	58	IL-16	29	TNF- $\alpha$	56
CCL26	35	GRO $\alpha$ /b/g	54	INF- $\gamma$	70	TNF- $\beta$	83
CX3CL1	25	HGF	405	Leptin	29	TPO	19
CXCL1	212	IGF-1	42	LIF	139	VEGF-A	49

10

20

## 【0089】

## 実施例 4：胎児付属物由来組織細胞培養上清による神経再生 (in vivo)

## 1) マウス低酸素再灌流処置小児脳性麻痺モデルの作製

ICRマウス(日本チャールスリバー、Cr1:CD1)を用いて、Rice-Vannucciらの方法に基づいて低酸素再灌流処置小児脳性麻痺モデルマウスを作製した(Wangら、J Matern Fetal Neonatal Med. 2015; 28(7): 842-7)。生後1週齢(7日~9日)のマウス(雌雄)を2%イソフルランで麻酔し、右側頸動脈を脳動脈瘤クリップ(ミズホ社製)で梗塞した。個体を8%酸素濃度下に120分間放置し、その後、脳動脈クリップを外して、血流を再灌流させた。脳障害の症状が固定される3週間経過後のマウスを以下の実験に供した。

30

## 【0090】

## 2) ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による治療(1)

低酸素処置小児麻痺モデルマウスに、実施例1で調製したワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清10 $\mu$ Lを2週間にわたり隔日で経鼻投与した。治療後のマウスを用いてY-maze試験(小原医科産業社製、YM-3002)を行い、8分間の自由行動について、自発的行動の指標である総エントリー数、短期作業記憶の指標である交替行動率を測定した(n=4)。図3に示すように、培養上清投与群では治療2週間後において、自発的行動、短期的作業記録が改善した。

40

## 【0091】

## 3) ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による治療(2)

低酸素処置小児麻痺モデルマウスに、実施例1で調製したワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清10 $\mu$ Lを2週間にわたり隔日で経鼻投与した。治療後のマウスを用いてローターロッド試験(室町機械社製、MK-610A)を行い、300秒間で80rpmまで加速するローター上からの落下までの時間を測定したところ、培養上清投与群では、治療1週間後を底とし、回復傾向を示した(治療前、治療1週間後及び治療2週間後の歩行時間は、健常マウスの歩行時間に対してそれぞれ、67、34、50%(n=2))。

次に、ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清の治療効果をより長期に確認した。低酸

50

素処置小児麻痺モデルマウスを無作為に2群に分け、治療群のマウスには実施例1で調製したワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清10μLを2週間にわたり隔日で経鼻投与した(n=5)。治療前後のマウスを用いてローターロッド試験(室町機械社製、MK-610A)を行い、300秒間で40rpmまで加速するローター上からの落下までの時間を測定した。対照群(非治療群:n=2)と比較して、ワルトン膠質由来間葉系細胞培養上清による、2週間にわたる治療を行った群では有意な回復が観察され(2W:p<0.05, Tukey検定)、健常マウス(n=7)と同等であった。さらに、休薬2週間後(4W)においても治療効果は継続した(図4)。

【0092】

以上のことから、胎児付属物由来組織細胞は、調製した状態(すなわち、幹細胞などを単離しているわけではないため、各種細胞が含まれる状態)で、神経前駆細胞の増殖、生存、ホーミング、分化・成熟を亢進する因子を分泌しており、胎児付属物由来組織細胞の培養上清は神経を再生し、脳性小児麻痺等の脳神経障害の治療に使用できることが分かった。

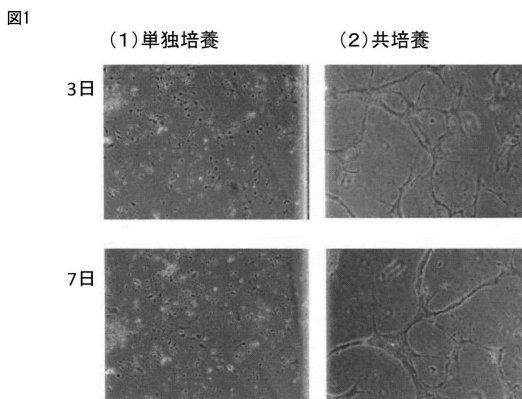
【要約】

【課題】脳出血や虚血等を起因とする脳障害では、原因となる出血や虚血を治癒するだけでなく、当該原因により障害を受けた神経細胞等の保護または再生を促進する必要がある。そこで、本発明は、このような脳神経細胞等の保護または再生を促進する効果を有する新規な脳神経障害治療剤提供することを課題とする。

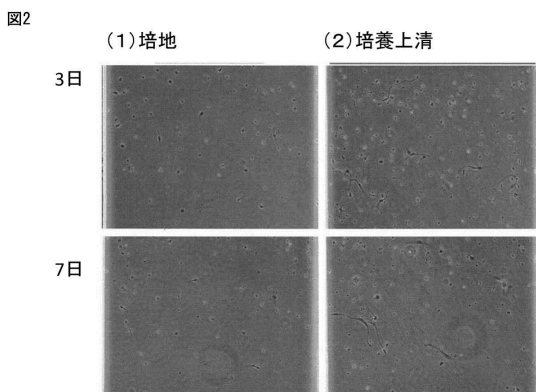
【解決手段】胎児付属物由来組織細胞の培養上清を有効成分として含む、脳神経障害治療剤。

【選択図】図3

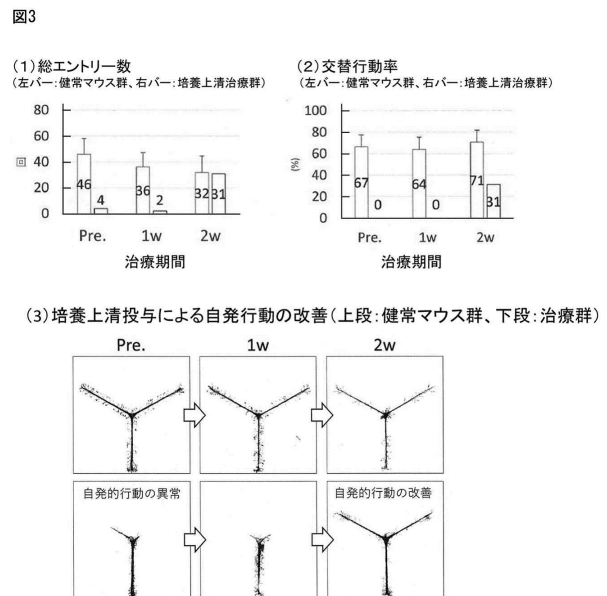
【図1】



【図2】



【図3】



10

20

【 図 4 】

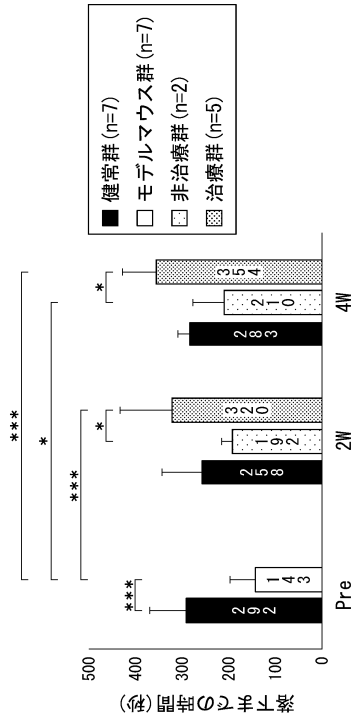


図4

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 7
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21

(72)発明者 相良 祐 輔  
高知県高知市曙町二丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

審査官 原口 美和

(56)参考文献 Journal of Chemical Neuroanatomy, 2019年10月28日, Vol. 102, Article number 101707, pp. 1-10  
Galen Medical Journal, 2017年, Vol. 6, No. 3, pp.217-225  
BRAIN RESEARCH, 2015年, Vol. 1624, pp. 489-496  
BioMed Research International, 2013年, Vol. 2013, Article ID 428726, pp. 1-8  
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2018年, Vol. 38, No. 8, pp. 1276-1292  
Regenerative Engineering and Translational Medicine, 2019年, Vol. 5, No. 4, pp. 420-434  
Cells, 2019年08月08日, Vol. 8, Article number 855, pp. 1-20  
Critical Care Medicine, 2016年, Vol. 44, No. 11, pp. e1118-e1131

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 5 / 2 8  
A 6 1 P 2 5 / 0 0  
A 6 1 K 3 5 / 5 0  
A 6 1 K 3 5 / 5 1  
A 6 1 K 3 5 / 5 4  
A 6 1 P 2 5 / 1 4  
A 6 1 P 2 5 / 0 8  
A 6 1 P 2 5 / 2 8  
A 6 1 P 2 5 / 0 2  
A 6 1 P 7 / 0 0  
A 6 1 P 2 5 / 1 6  
A 6 1 P 2 5 / 1 8  
A 6 1 P 4 3 / 0 0  
A 6 1 P 3 9 / 0 2  
A 6 1 K 9 / 1 9  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )