

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5456802号
(P5456802)

(45) 発行日 平成26年4月2日 (2014.4.2)

(24) 登録日 平成26年1月17日 (2014.1.17)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 31/7004 (2006.01)

A 6 1 K 31/7004

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 K 31/56 (2006.01)

A 6 1 K 31/56

A 6 1 P 17/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 3 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-11342 (P2012-11342)
 (22) 出願日 平成24年1月23日 (2012.1.23)
 (65) 公開番号 特開2013-147480 (P2013-147480A)
 (43) 公開日 平成25年8月1日 (2013.8.1)
 審査請求日 平成25年7月4日 (2013.7.4)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 592129095
 株式会社 C A C
 千葉県流山市東初石2丁目186番地
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100108578
 弁理士 高橋 詔男
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100094400
 弁理士 鈴木 三義
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (72) 発明者 山田 一
 東京都文京区大塚1-4-15-2108
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞遊走促進剤及び創傷治療用の経皮吸収剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルコースを含有する細胞遊走促進剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の細胞遊走促進剤を含有し、前記グルコースの含有量が $1 \sim 5 \text{ mol/L}$ である創傷治療用の経皮吸収剤。

【請求項 3】

ステロイド剤を含有し、前記グルコース / 前記ステロイド剤で表されるモル比が $10 \sim 10^5$ である請求項 2 に記載の創傷治療用の経皮吸収剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬組成物及びこれを用いた薬用化粧品に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌、ウイルス等の感染や物理的な傷害等の外的要因による細胞障害（外因性障害）、又は精神的ストレスや血行不良等の内的要因による細胞障害（内因性障害）の治療には、創傷治療薬、抗炎症薬等の医薬組成物が用いられている。

細胞障害の治療に用いる医薬組成物として、生体組織（以下、単に組織ということがあ
る）に対し修復作用を有する多糖類やオリゴ糖を含有するものが提案されている。例えば

、哺乳動物に対して生理活性を有し且つ糖タンパク質糖鎖及び糖脂質糖鎖を構成する単糖を一種以上構成糖として含む多糖類及び／又はそのオリゴ糖を配合・混合してなる組織・細胞障害のための予防・修復剤が提案されている（例えば、特許文献１）。

一方、循環虚脱、低血糖時の糖質補給、高カリウム血症、非経口的なエネルギー及び水補給を目的とした注射剤に含有されるグルコースは、組織の修復を遅延させると報告されている（例えば、非特許文献１）。

【０００３】

また、組織の修復を目的とした医薬組成物としては、ステロイド剤を含有するものがある。ステロイド剤は、ステロイド骨格を有する化合物であり、強力な抗炎症作用、免疫抑制作用等を示す物質として、広範な薬物療法に用いられている。

10

ステロイド剤は、元々、生体内の臓器で産生される化合物であり、一般に、副腎皮質ステロイドを指す。ステロイド剤は、その適用範囲が広く、適応症が最も多い薬剤の一つとして知られている。ステロイド剤の適用対象となる疾患としては、例えば、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎、突発性難聴、関節リュウマチ、膠原病、ネフローゼ症候群、潰瘍性大腸炎等が挙げられる。

【０００４】

炎症は、プロスタグランジンやロイコトリエン等の物質をメディエーターとして誘発される。ステロイド剤は、細胞の核内に取り込まれ、遺伝子を活性化することによりタンパク質リポコルチンを合成し、タンパク質リポコルチンがホスホリパーゼＡ２を阻害する。この結果、プロスタグランジンとロイコトリエンの合成を抑制することで抗炎症作用を発揮する。加えて、ステロイド剤は炎症性サイトカイン遺伝子、及びプロスタグランジンの生合成に関わるシクロオキシゲナーゼ－２（ＣＯＸ－２）遺伝子の発現を制御すると考えられており、これがステロイド剤の抗炎症作用の主な作用機序として認識されている。

20

【０００５】

ステロイド剤は、長期にわたり使用されたり、頻繁に使用されたりすると、生体内に十分量が存在することとなる。生体内のステロイド量が高まると、生体内でのステロイド剤の産生が低下するという問題がある。加えて、ステロイド剤は、正常細胞の増殖を抑制して（増殖抑制作用）、細胞組織の修復を遅延させやすいという問題がある。

【０００６】

こうした問題に対し、ステロイド剤と黄ごん由来組成物とを併用する抗炎症治療薬が提案されている（例えば、特許文献２）。特許文献２の発明によれば、ステロイド剤の抗炎症作用を維持しつつ、正常細胞に対するステロイド剤のアポトーシス作用を抑えられる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】特開２００８－２７３９１９号公報

【特許文献２】特開２００７－１８２３８４号公報

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Spravchikov N et al., 「Glucose Effects on Skin Keratinocytes Implications for Diabetes Skin Complications」、Diabetes 50、p. 1627 - 1635、2001年

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

しかしながら、組織の修復をより一層促進したり、より一層効果的に細胞障害を予防できる医薬組成物が求められている。

そこで、本発明は、細胞障害を効果的に予防でき、各種障害を受けた組織の修復を促進できる医薬組成物を目的とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

細胞の核内に普遍的に存在する非ヒストンタンパク質であるHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1)は、核内でタンパク質複合体を形成しクロマチン構造の安定性を保持し、様々な遺伝子の転写を制御したり、DNA損傷を修復したりするのに関わっている。HMGB1は、通常、細胞の核内に存在するが、細胞が活性化されたり、細胞が壊死したりすると、細胞外に放出される。細胞外に放出されたHMGB1は、炎症細胞を活性化したり、組織を保護したり、組織を修復したりする。例えば、HMGB1は、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、心筋細胞や幹細胞等を活性化し、それらの増殖や遊走を促進する。

10

本発明者らは、鋭意検討した結果、意外にもグルコースがHMGB1の産生を促進し、HMGB1の細胞外への放出を誘導し、正常細胞の増殖や遊走を高め、組織の修復を促進できるとの知見を得て、本発明に至った。

【0011】

即ち、本発明の医薬組成物は、グルコースを含有することを特徴とする。

さらに、ステロイド剤を含有してもよく、前記グルコース/前記ステロイド剤で表されるモル比が $10 \sim 10^5$ であることが好ましい。

【0012】

本発明の薬用化粧品は、本発明の前記医薬組成物を含有することを特徴とする。

【発明の効果】

20

【0013】

本発明によれば、細胞障害を効果的に予防でき、各種障害を受けた組織の修復を促進できる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】細胞増殖試験Aの結果を示すグラフである。

【図2】細胞増殖試験Bの結果を示すグラフである。

【図3】実施例7、比較例5の結果を示すグラフである。

【図4】実施例8～9、参考例1、比較例6の結果を示すグラフである。

【図5】実施例10～11、参考例2、比較例7の結果を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

(医薬組成物)

本発明の医薬組成物は、組織修復促進剤としてグルコースを含有するものである。

医薬組成物としては、例えば、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、関節リウマチや膠原病等の自己免疫疾患の治療薬；ネフローゼ症候群、潰瘍性大腸炎、肝炎、膵炎、甲状腺炎、感冒等の臓器炎症等の疾患の治療薬等の抗炎症薬；やけど、傷、床ずれ、にきび、あせも、しもやけ等の創傷の治療薬（創傷治療薬）等が挙げられ、特に抗炎症薬、創傷治療薬において、本発明の効果が顕著である。

【0016】

40

医薬組成物の剤形としては、特に限定されず、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤及びトローチ剤等の経口剤；軟膏、ローション、クリーム、エアゾール剤等の経皮吸収剤；注射剤、点眼剤及び坐剤等の非経口剤が挙げられ、中でも、軟膏等の経皮吸収剤において、本発明の効果が顕著に表れる。なお、注射剤は、安定性の観点から、液剤がバイアル等に充填された後、凍結乾燥処理により水分が除去され、使用直前に、凍結乾燥物が生理食塩水等に分散されて、液剤に調製されたものでもよい。

【0017】

<グルコース>

本発明の医薬組成物は、組織修復促進剤としてグルコースを含有することで、細胞での

50

H M G B 1 の産生を促進し、細胞からの H M G B 1 の放出を誘導して、組織の修復を促進できる。

組織修復促進剤は、細胞の増殖を促進し、障害細胞を含む組織の自己修復を図るものである。

医薬組成物中のグルコースの含有量は、医薬組成物の剤形、用途、用法等を勘案して決定でき、例えば、経皮吸収剤であれば、 $0.1 \sim 5 \text{ mol/L}$ が好ましく、 $1 \sim 3 \text{ mol/L}$ が好ましい。上記下限値以上であれば、経皮吸収されたグルコースによって、H M G B 1 の産出と放出とをより促進して、細胞障害をより良好に予防し、組織の修復を促進できる。上記上限値以下であれば、グルコースが医薬組成物中に均一に分散して、細胞障害をより良好に予防し、組織の修復を十分に促進できる。

10

また、例えば、注射剤であれば、 $1 \sim 1000 \text{ mM/L}$ が好ましく、 $10 \sim 100 \text{ mM/L}$ がより好ましい。上記範囲内であれば、H M G B 1 の産生と放出とをより促進して、細胞障害をより良好に予防し、組織の修復をより促進できる。

【0018】

<ステロイド剤>

医薬組成物は、ステロイド剤を含有してもよい。医薬組成物は、ステロイド剤を含有することで、抗炎症作用等の優れた作用を発揮できる。加えて、ステロイド剤を含有する医薬組成物において、本発明の効果がより顕著に発揮される。特に、ステロイド剤の抗炎症作用等の薬効が期待される抗炎症薬等の医薬組成物において、ステロイド剤の増殖抑制作用はグルコースにより顕著に軽減される。

20

【0019】

ステロイド剤としては、医薬組成物の用途等を勘案して決定でき、例えば、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメサゾン、パルミチン酸デキサメサゾン、ベタメタゾン、酢酸パラメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸ハロプレドン等が挙げられ、中でも、本発明の効果を顕著に発揮させる観点から、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメサゾン及びベタメタゾンから選択される少なくとも1種が好ましい。これらのステロイド剤は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わせられて用いられてもよい。

30

【0020】

ヒドロコルチゾンは、生理的コルチコステロイドであり、作用時間が比較的短いものである。

プレドニゾロンは経口投与剤として汎用されており、ヒドロコルチゾンのステロイド骨格の1, 2位に二重結合を有し、ヒドロコルチゾンよりも強力な抗炎症作用を持つ。

デキサメサゾンは、プレドニゾロンの9位にフッ素、16位にメチル基が導入された合成グルココルチコイドであり、プレドニゾロンよりも強力な抗炎症作用、抗アレルギー作用を発揮する。ベタメタゾンは、デキサメサゾンの異性体であり、長時間作用する強力なステロイド剤として知られている。

【0021】

40

医薬組成物中のステロイド剤の含有量は、医薬組成物の用途や、ステロイド剤の種類を勘案して決定でき、例えば、 $0.05 \sim 0.1$ 質量%とされる。上記範囲内であれば、ステロイド剤の抗炎症作用等の作用が十分に発揮されやすく、ステロイド剤の増殖抑制作用がグルコースによって、より良好に軽減される。

【0022】

医薬組成物中、グルコース/ステロイド剤で表されるモル比（以下、グルコース/ステロイド比ということがある）は、医薬組成物の用途やステロイド剤の種類を勘案して決定でき、 $10 \sim 10^5$ が好ましく、 $10^2 \sim 10^4$ がより好ましく、 $10^2 \sim 10^3$ がさらに好ましい。上記範囲内であれば、ステロイド剤の増殖抑制作用がより軽減されて、組織の修復がより促進されやすくなる。加えて、上記範囲内であれば、ステロイド剤の抗炎症

50

作用等の作用が十分に発揮されやすい。

【 0 0 2 3 】

< 任意成分 >

医薬組成物は、グルコース及びステロイド剤に加え、必要に応じて、任意成分（特に医薬任意成分ということがある）を含有できる。医薬任意成分としては、例えば、薬理学的に許容される塩、賦形剤、増粘剤、担体、香料、色素等が挙げられる。これらの医薬任意成分は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わせられて用いられてもよい。

【 0 0 2 4 】

薬理学的に許容される塩としては、慣用の無毒性の塩、即ち酸付加塩及び各種塩基との塩が挙げられ、例えば、塩酸塩、硝酸塩、硫酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩；メタンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩等のスルホン酸塩、アラニン塩、ロイシン塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩；アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等）及びアルカリ土類金属塩（例えば、マグネシウム塩、カルシウム塩等）等の無機塩基塩；トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N , N' - ジベンジルエチレンジアミン塩等の有機アミン塩等が挙げられる。これらの塩は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わせられて用いられてもよい。このような塩を含有すると、結晶化が容易なためである。

【 0 0 2 5 】

賦形剤は、医薬組成物の剤形に応じて適宜選択でき、例えば、蒸留水、イオン交換水、純水等の水、メタノール、エタノール等の炭素数1～6の低級アルコール、グリセリン等の液体の賦形剤；乳糖、デンプン、デキストリン、白糖等の固体の賦形剤等が挙げられる。これらの賦形剤は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わせられて用いられてもよい。

【 0 0 2 6 】

増粘剤は、医薬組成物の剤形に応じて適宜選択でき、例えば、ゼラチン、キサンタンガム、カラギーナン等が挙げられる。これらの増粘剤は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わせられて用いられてもよい。

【 0 0 2 7 】

医薬組成物の用法としては、例えば、疾患の種類等に応じて適宜決定される。

例えば、疾患がアトピー性皮膚炎、切り傷や擦り傷等の皮膚の創傷等である場合、経皮吸収剤である医薬組成物を直接患部に塗布する方法等が挙げられる。

また、疾患が口腔内や胃腸である場合、医薬組成物を経口剤として経口投与する方法、医薬組成物を注射剤として患部組織に注入する方法等が挙げられる。もしくは、例えば、上部内視鏡下で患部を医薬組成物で洗浄したり、患部に医薬組成物を塗布することにより、粘膜再生を促してもよい。これにより、健全な粘膜を形成でき、自然治癒を漸増させ、粘膜侵襲を防ぐことができる。さらに、医薬組成物を胃粘膜に塗布することで、胃粘膜の再生を促し、上皮組織を修復できる。上皮細胞の修復、即ち、正常細胞の活性化を促すことで、癌化細胞等の異常細胞の増殖を抑え、組織の正常化を誘導できる。

また、疾患が花粉症等、鼻・眼粘膜部の疾患である場合、医薬組成物を患部に塗布する方法が挙げられる。医薬組成物を鼻・眼粘膜部に塗布すると、鼻・眼粘膜部は、修復され、かつ粘膜層に強固なバリアを形成する。このため、鼻・眼粘膜部にアレルゲンが多数付着してもアレルギー反応を押さえ、鼻詰まりが生じたり、鼻汁又は涙が多量に分泌されたりするのを解消できる。

また、あるいは、疾患が風邪等のウィルスや細菌の感染による上気道粘膜の炎症（感冒）である場合、医薬組成物を点鼻したり吸入させたりする方法が挙げられる。これにより、上気道粘膜の炎症を抑え、上気道粘膜を修復して再生して感染進行を抑制でき、かつ自然免疫応答の賦活化を促進できる。

【 0 0 2 8 】

医薬組成物の投与量は、患者の年齢、体重、疾患の種類・程度、投与方法等に応じて適

10

20

30

40

50

宜決定される。例えば、医薬組成物がステロイド剤を含有する場合、現在、市場において用いられている医薬品中のステロイド剤と同程度の量のステロイド剤を含むように投与できる。また、本発明の医薬組成物は、ステロイド剤による正常細胞に対する修復抑制作用を軽減できるため、通常用いられている量よりも多い量のステロイド剤を含むように投与されてもよい。

【0029】

(薬用化粧品)

本発明の薬用化粧品は、本発明の医薬組成物を含有するものである。本発明の薬用化粧品は、例えば、ローション、クリーム、乳液、ファンデーション等であって、皮膚疾患の予防を目的とするものである。なお、薬用化粧品は、日本国の薬事法に定められた医薬部外品に分類されるものである。

10

【0030】

薬用化粧品中の医薬組成物の含有量は、薬用化粧品の用途や剤形等を勘案して決定でき、例えば、薬用化粧品中のグルコース濃度が、好ましくは $1 \sim 1000 \text{ mM/L}$ 、より好ましくは $10 \sim 100 \text{ mM/L}$ となる量とされる。上記範囲内であれば、HMG B1の産生と放出とをより促進して、細胞障害をより良好に予防し、組織の修復をより促進できる。また、ステロイド剤を含有する薬用化粧品を含有する場合、薬用化粧品中の医薬組成物の含有量は、ステロイド剤の種類等を勘案して決定できる。

薬用化粧品がステロイド剤を含む場合、薬用化粧品中のグルコース/ステロイド比は、 $10 \sim 10^5$ が好ましく、 $10^2 \sim 10^4$ がより好ましく、 $10^2 \sim 10^3$ がさらに好ましい。上記範囲内であれば、ステロイド剤の増殖抑制作用がより軽減されて、組織の修復がより促進されやすくなる。加えて、上記範囲内であれば、ステロイド剤の抗炎症作用等の作用が十分に発揮されやすい。

20

【0031】

薬用化粧品は、本発明の効果を阻害しない範囲で、必要に応じて、本発明の医薬組成物以外の任意成分(以下、化粧品任意成分ということがある)を含有できる。

化粧品任意成分としては、例えば、流動パラフィン、セレシン、じろう、ラノリン、ワセリン、セタノール、スクワレン、ホホバ油、ステアリン酸、パルミチン酸、ラウリルアルコール、ステアリルアルコール、セチルアルコール、ミツロウ、メチルポリシロキサン、ジメチルシクロポリシロキサン等の油剤；プロパノール、グリコール、プロピレングリコール、ヒアルロン酸、コラーゲン、ポリエチレングリコール、ヒドロキシステアリン酸コレステリル、グリセリン、ソルビトール等の保湿剤；各種界面活性剤；乳化剤；賦形剤；増粘剤；PH調整剤；酸化防止剤；色素；香料；紫外線吸収剤等が挙げられる。これらの化粧品任意成分は、1種単独で用いられてもよいし、2種以上が組み合わされて用いられてもよい。

30

【0032】

上述の通り、本発明の医薬組成物は、グルコースを含有するため、細胞障害を効果的に予防でき、各種障害を受けた組織の修復を促進できる。グルコースが細胞障害を予防する機構、組織修復を促進する機構は、次のように考えられる。グルコースが投与されると、細胞質のIP6K-1キナーゼが活性化し、活性化したIP6K-1キナーゼが細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)を活性化する。活性化したERKは、核内のHMG B1の産生を促進すると共に、HMG B1の細胞外への放出を誘導する。そして、細胞外に放出されたHMG B1は、正常細胞の増殖や遊走を促進して、炎症細胞を活性化したり、組織を保護したり、組織を修復したりする。例えば、本発明の医薬組成物を皮膚に塗布すると、皮膚角化細胞又は皮膚線維芽細胞でのHMG B1の産生が促進され、産生されたHMG B1は、細胞外に放出され、皮膚角化細胞又は上皮細胞の増殖や遊走を促進し、皮膚創傷の治癒を促進できる。

40

【0033】

加えて、本発明の医薬組成物は、ステロイド剤を含有することで、抗炎症作用に優れると共に、グルコースがステロイド剤の増殖抑制作用を軽減して、細胞障害を効果的に予防

50

でき、各種障害を受けた組織の修復を促進できる。

さらに、グルコース/ステロイド比を特定の範囲とすることで、ステロイド剤の抗炎症作用等の作用をより高度に維持したまま、ステロイド剤の増殖抑制作用を軽減して、細胞障害をより効果的に予防でき、各種障害を受けた組織の修復をより促進できる。

本発明の薬用化粧品は、本発明の医薬組成物を含有するため、細胞障害を効果的に予防でき、各種障害を受けた組織の修復を促進できる。

【実施例】

【0034】

以下、実施例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の記載によって限定されるものではない。

【0035】

(実施例1～6、比較例1～4)

1質量%仔牛血清(FBS)含有ダルベッコ変性イーグル培地(1%FBS-DMEM、ライフテクノロジーズジャパン株式会社製)に、表1の濃度となるようにL-グルコースとデキサメサゾン(製品番号:D4902、シグマ-アルドリッチ(Sigma-Aldrich)社製)とを添加し、医薬組成物を含有する培地(以下、試験用培地という)を調製した。各例の試験用培地を用いて、細胞増殖試験を行い、その結果を表1、図1～2に示す。

【0036】

<細胞増殖試験A>

1%FBS-DMEMを用い、正常ヒト皮膚角化細胞(単一ドナー由来の初代培養の正常皮膚角化細胞、タカラバイオ株式会社製)を96穴(well)マイクロプレートに20000cells/wellとなるように播種し、37℃で24時間培養した(前培養)。前培養後、各例の試験用培地を前培養に用いた培地と置換し、37℃で24時間培養した(本培養)。本培養後、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide(MTT)を0.4mg/mL含有する1%FBS-DMEMを試験用培地と置換し、37℃で4時間培養した(後培養)。後培養後、培地を除去し、Dimethyl sulfoxide 100μL/wellを添加混合して試料液とし、この試料液の吸光度(550nm)を測定してMTTの還元量()を求めた。また、本培養を行わない以外は上述の方法と同様に試料液(コントロール試料液)を調製し、このコントロール試料液の吸光度(550nm)を測定してMTTの還元量()を求め、下記(1)式により細胞増殖率を算出した。

$$\text{細胞増殖率(\%)} = \text{還元量()} \div \text{還元量()} \times 100 \quad \cdots (1)$$

【0037】

<細胞増殖試験B>

正常ヒト皮膚角化細胞を正常ヒト皮膚線維芽細胞(単一ドナー由来の初代培養の正常皮膚線維芽細胞、タカラバイオ株式会社製)に換えた以外は、「<細胞増殖試験A>」と同様に試料液(コントロール試料液)を調製し、このコントロール試料液の吸光度(550nm)を測定してMTTの還元量()を求め、下記(1)式により細胞増殖率を算出した。

【0038】

【表 1】

		実施例						比較例			
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
濃度	L-グルコース (mM/L)	1	10	100	1	10	100	-	-	-	-
	デキサメサゾン (μ M/L)	-	-	-	100	100	100	-	10	100	1000
	グルコース/ステロイド比	-	-	-	10	10 ²	10 ³	-	-	-	-
結果	細胞増殖試験A (%)	101	123	110	95	110	91	100	93	86	81
	細胞増殖試験B (%)	98	150	120	86	112	98	100	87	76	68

【0039】

図1は、細胞増殖試験Aの結果を示すグラフであり、図2は、細胞増殖試験Bの結果を示すグラフである。

表1、図1～2に示すように、本発明を適用した実施例1～3は、細胞増殖率が100%と略同等又は100%超となっていた。特に、グルコースを10～100mM/L含有する実施例2、3において、細胞増殖率の向上が顕著であった。

一方、グルコース及びデキサメサゾンを含まない比較例1は、細胞増殖試験A及びBに

において、細胞増殖率が100%であった。

実施例1～3、比較例1の結果から、グルコースを添加することにより、細胞の増殖を促進できることが判った。

比較例2～4の結果に示すように、デキサメサゾンの含有量の増加に伴い、細胞増殖率が低下していた。この結果から、デキサメサゾンによって正常細胞の増殖が抑制されていることが判った。

細胞増殖試験A及びBにおいて、グルコース及びデキサメサゾンを含む実施例4～6は、実施例4～6と同量のデキサメサゾンを含み、かつグルコースを含まない比較例3に比べて高い細胞増殖率であった。実施例4～6、比較例3の結果から、正常細胞に対するデキサメサゾンの増殖抑制効果が、グルコースによって軽減されることが判った。

以上の結果から、本発明を適用することで、正常細胞の増殖を促進して、細胞障害を予防したり、各種障害を受けた組織の修復を促進したりできることが判った。

【0040】

(実施例7)

グルコース及び正常ヒト皮膚角化細胞を1% FBS - DMEMに添加し、グルコース濃度が10 mM / L、正常ヒト皮膚角化細胞の含有量が10000 cells / mLの試料懸濁液を調製した。この試料懸濁液100 μ LをCO₂ インキュベーター(37)内で24時間培養した。培養開始前(0時間)、培養開始3時間後、6時間後、18時間後、24時間後に上清を回収し、回収した上清中のHMGB1濃度をHMGB1 ELISA Kit II (株式会社シノテスト製)で測定した。その結果を図3に示す。

【0041】

(比較例5)

グルコースを含まない試料懸濁液を用いた以外は、実施例7と同様にして上清中のHMGB1濃度を測定した。その結果を図3に示す。

【0042】

図3に示すように、グルコースを添加した実施例7は、比較例5に比べてHMGB1濃度が高かった。この結果から、グルコースが正常ヒト皮膚角化細胞からのHMGB1の放出を促進することが判った。

【0043】

(実施例8)

グルコース濃度10 mM / Lの1% FBS - DMEMを調製し、これを試験用培地とした。前培養をしないこと、及びマイクロプレートに10000 cells / wellの正常ヒト皮膚角化細胞を播種した以外は、「<細胞増殖試験A>」と同様にして細胞増殖率を求め、その結果を図4に示す。

【0044】

(実施例9)

グルコース及び正常ヒト皮膚線維芽細胞を1% FBS - DMEMに添加し、グルコース濃度が10 mM / L、正常ヒト皮膚線維芽細胞の含有量が10000 cells / mLの試料懸濁液を調製した。この試料懸濁液を37 で、24時間培養した後、上清(培養上清)を採取した。採取した培養上清100 μ Lを正常ヒト皮膚角化細胞10000 cellsに加え、37 で24時間培養した。培養後、実施例8と同様にして細胞増殖率を求め、その結果を図4に示す。

【0045】

(参考例1)

さらにニワトリ抗HMGB1ポリクローナル抗体(IgYフラクション)を10 μ g / mLとなるように試験用培地に添加した以外は、実施例9と同様にして細胞増殖率を求め、その結果を図4に示す。

【0046】

(比較例6)

グルコースを添加しない以外は、実施例8と同様にして細胞増殖率を求め、その結果を

図 4 に示す。

【 0 0 4 7 】

図 4 に示すように、試験用培地にグルコースを添加した実施例 8 は、細胞増殖率が 1 1 0 % であった。加えて、培養上清を添加した実施例 9 は、細胞増殖率が 1 4 2 % であった。即ち、培養上清を添加することにより、正常ヒト皮膚角化細胞の増殖がより促進された。

一方、グルコース及び培養上清を添加しなかった比較例 6 は、細胞増殖率が 1 0 0 % であった。

さらに、抗 H M G B 1 抗体を添加した参考例 1 は、細胞増殖率が 1 0 6 % であり、実施例 9 に比べ細胞増殖率が低かった。即ち、H M G B 1 を不活化させることで、正常ヒト皮膚角化細胞の増殖が抑制された。実施例 8 ~ 9、参考例 1 の結果から、培養上清にはグルコースの存在により放出された H M G B 1 が含まれ、この H M G B 1 によって正常ヒト皮膚角化細胞の増殖が促進されることが判った。

図 3、4 の結果から、グルコースは正常ヒト皮膚線維芽細胞からの H M G B 1 の放出を誘導し、放出された H M G B 1 は正常ヒト皮膚角化細胞の増殖を促進することが判った。

そして、本発明を適用することで、正常細胞の増殖を促進し、組織の修復を促進できることが判った。

【 0 0 4 8 】

(実施例 1 0)

グルコース濃度 1 0 m M / L の 1 % F B S - D M E M を試験用培地とし、この試験用培地を細胞遊走チャンバー (B e c t o n D i c k i n s o n 社製) の下層に添加した。1 0 0 0 0 0 個の正常ヒト皮膚角化細胞をフィルター (8 μ m ポアサイズ、B e c t o n D i c k i n s o n 社製) 付きインサートに播種した。播種されたインサートを 2 4 ウェルプレートに載置し、3 7 ° C、5 体積 % C O ₂ 環境下で 2 時間培養した。フィルター上層の細胞を綿棒で擦り取り、下層の細胞をメタノールで固定後、ヘマトキシリン染色を行った。無作為に選んだ 5 視野 (倍率 × 2 0 0) の細胞数の平均を本例の遊走細胞数とした。後述する比較例 7 で測定された遊走細胞数を基準細胞遊走数とし、下記 (2) 式により細胞遊走能を求め、その結果を図 5 に示す。

【 0 0 4 9 】

細胞遊走能 (%) = 各例の細胞遊走数 ÷ 基準細胞遊走数 × 1 0 0 …… (2)

【 0 0 5 0 】

(実施例 1 1)

グルコース及び正常ヒト皮膚線維芽細胞を 1 % F B S - D M E M に添加し、グルコース濃度が 1 0 m M / L、正常ヒト皮膚線維芽細胞の含有量が 1 0 0 0 0 0 c e l l s / m L の懸濁液を調製した。この懸濁液を 3 7 ° C で、2 4 時間培養した後、上清 (培養上清) を採取した。この培養上清 5 0 0 μ L とグルコース濃度 1 0 m M / L の 1 % F B S - D M E M 5 0 0 μ L とを混合して試験用培地とした以外は、実施例 1 0 と同様にして細胞遊走能を求めた。その結果を図 5 に示す。

【 0 0 5 1 】

(参考例 2)

さらに抗 H M G B 1 抗体を 1 0 μ g / m L となるように試験用培地に添加した以外は、実施例 1 1 と同様にして細胞遊走能を求め、その結果を図 5 に示す。

【 0 0 5 2 】

(比較例 7)

グルコースを添加しない以外は、実施例 1 0 と同様にして細胞遊走能を求め、その結果を図 5 に示す。

【 0 0 5 3 】

図 5 に示すように、試験用培地にグルコースを添加した実施例 1 0 は、細胞遊走能が 1 0 2 % であった。加えて、グルコースを加えた試料懸濁液の培養上清を添加した実施例 1 1 は、細胞遊走能が 1 7 1 % であった。即ち、培養上清を添加することにより、正常ヒト

皮膚角化細胞の遊走が誘導された。

一方、グルコース及び培養上清を添加しなかった比較例 7 は、細胞遊走能が 100% であった。

さらに、抗 H M G B 1 抗体を添加した参考例 2 は、細胞遊走能が 116% であり、実施例 11 に比べ細胞遊走能が低かった。即ち、H M G B 1 を不活化させることで、正常ヒト皮膚角化細胞の遊走がより促進された。実施例 10 ~ 11、参考例 2 の結果から、培養上清にはグルコースの存在により放出された H M G B 1 が含まれ、この H M G B 1 によって正常ヒト皮膚角化細胞の遊走が促進されることが判った。

図 3、5 の結果から、グルコースは正常ヒト皮膚線維芽細胞からの H M G B 1 の放出を誘導し、放出された H M G B 1 は正常ヒト皮膚角化細胞の遊走を促進することが判った。

そして、本発明を適用することで、正常細胞の遊走を促進し、組織の修復を促進できることが判った。

【0054】

(実施例 12)

グルコース含有量 1.9 mol/L、ステロイド(リン酸デキサメタゾンナトリウム)含有量 0.096 mol/L を含有する水溶液を調製し、これを外用薬とした。

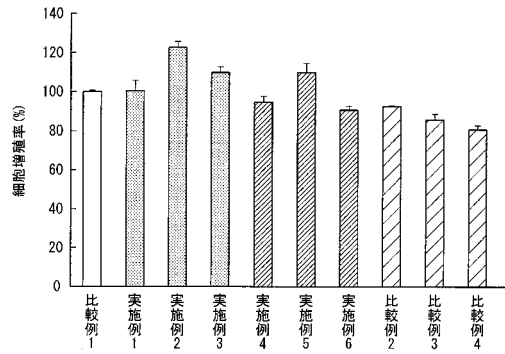
皮膚全体(顔部、上半身、下半身、指(手・足))に皮膚掻痒、色素沈着、苔癬化が見られる患者(20歳代男性)に対し、前記外用薬を患部に1回/1日塗布した。その結果、外用薬の塗布を開始した翌日には皮膚掻痒感がなくなり、外用薬の塗布を開始した3か月後には色素沈着、皮膚苔癬化が消失した。

外用薬の塗布を開始する前において、患者の血清中 IgE 濃度は 5500、患者の thymus and activation-regulated chemokine (TARC) は 5300 であった。外用薬の塗布開始3ヶ月後には、患者の血清中 IgE 濃度が 2700 ~ 2800、TARC が 170 と低値となり、アレルギー反応の顕著な改善が認められた。なお、血清中 IgE 濃度、TARC は共にアレルギー疾患の重症度の指標となるものである。

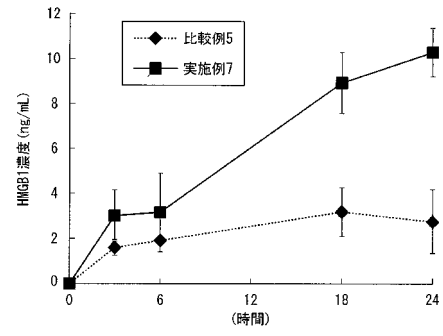
10

20

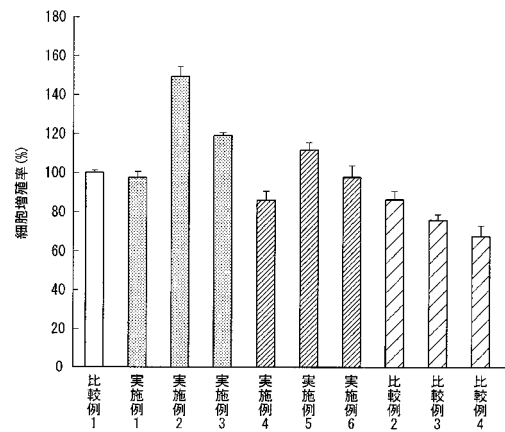
【図 1】



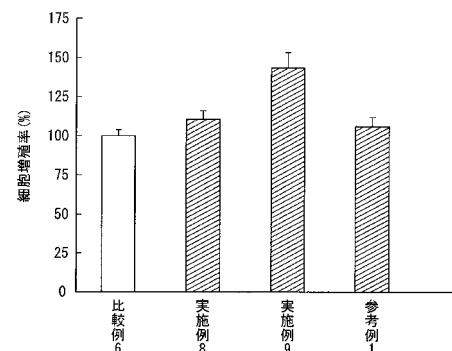
【図 3】



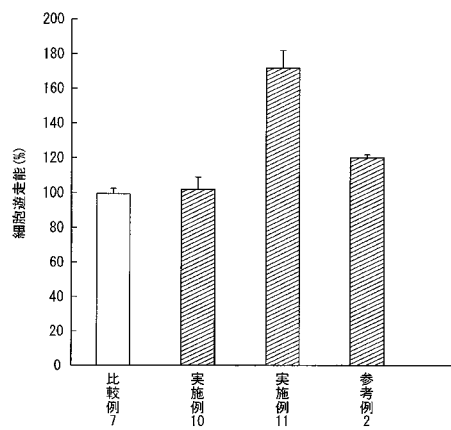
【図 2】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 17/00
A 6 1 K 31/573 (2006.01)		A 6 1 P 19/02
		A 6 1 K 31/573

(72)発明者 山田 晃
千葉県柏市若柴173-8 151街区 D-605

(72)発明者 山田 二郎
千葉県流山市東初石2丁目186番地3

(72)発明者 山田 きよ子
千葉県流山市東初石2丁目186番地3

(72)発明者 松下 健二
愛知県名古屋市天白区野並3丁目304番地801号

審査官 池上 京子

(56)参考文献 特表2008-512445(JP,A)
国際公開第2003/101460(WO,A1)
特開平09-157171(JP,A)
特表2011-503073(JP,A)
特表2001-526210(JP,A)
特表2006-517981(JP,A)
特開2005-281315(JP,A)
特開昭62-138432(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 31/00-31/80
A 6 1 K 9/00-9/72
A 6 1 K 47/00-47/48