



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119326743 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 21

(21) 申请号 202411343607.X

A61P 17/02 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.26

A61P 19/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

2017-249980 2017.12.26 JP

(62) 分案原申请数据

201880050803.4 2018.12.26

(71) 申请人 福冈大太朗

地址 日本

(72) 发明人 福冈大太朗

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int. Cl.

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书23页

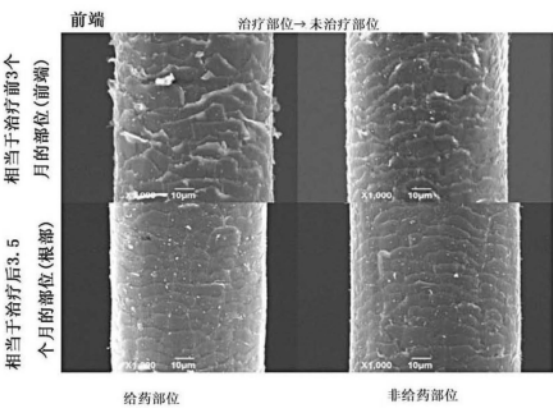
序列表 (电子公布) 附图23页

(54) 发明名称

用于增毛、头皮或皮肤的改质、创伤治愈、骨
形成促进或毛发的改质的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供用于增毛、头皮或皮肤的改质、
创伤治愈、骨形成促进或毛发的改质的药物组
合物和方法,该药物组合物包含治疗上有效量的饱
和脂肪酸或其药物上可接受的盐作为有效成分。



1. 饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于治疗创伤的局部给药用药物组合物中的应用,所述饱和脂肪酸包含由硬脂酸和/或肉豆蔻酸组成的饱和脂肪酸。
2. 饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于治疗创伤的局部给药用药物组合物中的应用,所述饱和脂肪酸由硬脂酸和肉豆蔻酸组成。
3. 饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于治疗创伤的局部给药用药物组合物中的应用,所述饱和脂肪酸由硬脂酸组成。
4. 饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于治疗创伤的局部给药用药物组合物中的应用,所述饱和脂肪酸由肉豆蔻酸组成。
5. 棕榈酸或其药物上可接受的盐在制造用于促进骨形成的药物组合物中的应用。
6. 如权利要求5所述的应用,其中,所述药物组合物中的饱和脂肪酸为涂布于生物相容性膜上的形态。

用于增毛、头皮或皮肤的改质、创伤治愈、骨形成促进或毛发的改质的药物组合物

[0001] 本申请是申请日为2018年12月26日、申请号为201880050803.4 (国际申请号为PCT/JP2018/047736)、发明名称为“用于增毛、头皮或皮肤的改质、创伤治愈、骨形成促进或毛发的改质的药物组合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于增毛、头皮或皮肤的改质、创伤治愈、骨形成促进或毛发的改质的药物组合物和方法。

背景技术

[0003] 哺乳类的乳(特别是初乳)中包含含有营养素的物质、例如免疫物质或细胞内递质、外泌体、mRNA、细胞因子等。婴儿经口摄取时,这些各种物质被摄取到体内,有助于婴儿的发育。

[0004] 通过脂肪系列细胞的有无的比较研究,报道了脂肪细胞系列细胞有助于皮肤干细胞的巢(niche)从而驱动毛发循环(非专利文献1)。在非专利文献1中,暗示了CD34阳性细胞的出现、PPAR γ 阳性脂肪细胞的增加和脂肪细胞的成熟与生长期毛发的伸长有关。另外,在非专利文献2中,报道了在组织中发生组织再生时观察到组织常驻型M2样巨噬细胞的增加。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:Festa E et al., Cell, 146: 761-71, 2011

[0008] 非专利文献2:Satoh T. et al., Nature, 495: 524-528, 2013

发明内容

[0009] 本发明提供用于对头皮或皮肤进行改质的局部给药药物组合物。另外,本发明还提供用于治疗创伤的局部给药药物组合物。此外,本发明还提供用于促进增毛或对毛发进行改质的局部给药药物组合物。

[0010] 本发明人发现,包含乳、乳的离心上清成分和大豆油、以及它们之中含有的主要脂肪酸等脂肪酸的组合物对于头皮或皮肤的改质、创伤的治愈、骨形成的促进和毛发的改质有用。本发明以这些发现为基础。

[0011] 根据本发明,提供下述发明。

[0012] (1) 一种药物组合物,其为(i)用于对头皮或皮肤进行改质的局部给药药物组合物、(ii)用于治疗创伤的局部给药药物组合物、或者(iii)用于促进增毛的局部给药药物组合物或用于对毛发进行改质的局部给药药物组合物,其包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐。

[0013] (2) 如上述(1)所述的药物组合物,其用于对头皮或皮肤进行改质。

[0014] (3) 如上述(1)所述的药物组合物,其用于治疗创伤。

- [0015] (4) 如上述 (1) 所述的药物组合物,其用于促进增毛或对毛发进行改质。
- [0016] (5) 如上述 (1) 所述的药物组合物,其用于促进骨形成。
- [0017] (6) 如上述 (6) 所述的药物组合物,其中,饱和脂肪酸为涂布于生物相容性膜上的形态。
- [0018] (7) 如上述 (1) ~ (6) 中任一项所述的药物组合物,其中,上述饱和脂肪酸为选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。
- [0019] (8) 如上述 (1) ~ (7) 中任一项所述的药物组合物,其中,还包含不饱和脂肪酸。
- [0020] (9) 如上述 (1) ~ (6) 中任一项所述的药物组合物,其含有包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的、大豆油或乳或者它们的提取物或加工物。
- [0021] (10) 如上述 (9) 所述的药物组合物,其中,乳进行了灭菌。
- [0022] (11) 如上述 (10) 所述的药物组合物,其中,乳进行了高温灭菌。
- [0023] 根据本发明,在提供能够用于上述各种药物用途、并且在治疗结束后也能够继续发挥效果的药物组合物或治疗法的方面是有利的。

附图说明

- [0024] 图1是示出乳给药对毛发的表皮层的影响的照片。
- [0025] 图2A是示出乳给药对白发减少所呈现出的效果的局部的照片。
- [0026] 图2B是示出乳给药对白发减少所呈现出的效果的头部侧面的照片。
- [0027] 图3是示出乳给药与皮肤的脂肪层的厚度的关系的图。 #1 ~ #6 分别表示治疗1 ~ 6 个月后。
- [0028] 图4A示出治疗前后的皮肤组织中的I型胶原蛋白和III型胶原蛋白的组织染色。
- [0029] 图4B示出治疗前后的皮肤组织中的I型胶原蛋白和III型胶原蛋白的组织染色。
- [0030] 图5是示出乳给药对脂肪细胞的大小的效果的图。
- [0031] 图6A是示出乳给药对创伤治愈的效果的图。
- [0032] 图6B是示出乳铁蛋白给药对创伤治愈的效果的图。
- [0033] 图6C是示出饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸给药对创伤治愈的效果的图。
- [0034] 图6D是示出大豆油给药对创伤治愈的效果的图。
- [0035] 图7示出基于乳给药的Wistar大鼠背部皮下脂肪层组织的免疫组织学染色 (Ki67 阳性脂肪细胞的染色和CD68阳性巨噬细胞的染色) 的结果。
- [0036] 图8A示出基于乳给药的头皮脂肪层组织的免疫组织学染色 (CD31染色和CD34染色) 的结果。
- [0037] 图8B示出基于乳给药的头皮脂肪层组织的免疫组织学染色 (CD68阳性巨噬细胞的染色、CD163阳性组织常驻型M2样巨噬细胞的染色和PPAR γ 阳性细胞的染色) 的结果。
- [0038] 图9示出基于乳铁蛋白经口给药的大鼠背部皮下脂肪层组织的免疫组织学染色 (CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色) 的结果。
- [0039] 图10A示出生理盐水给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。
- [0040] 图10B示出棕榈酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结

果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0041] 图10C示出硬脂酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0042] 图10D示出肉豆蔻酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0043] 图10E示出油酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0044] 图10F示出 α -亚麻酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0045] 图10G示出亚油酸给药4周后和8周后的组织中的CD68和PPAR γ 阳性细胞的染色结果。图中的箭头表示阳性细胞存在的部位,各染色像的右下的括号内的数字表示视野中的阳性细胞数。

[0046] 图11A示出基于乳给药的每种毛发长度的长度 \times 根数的总和。

[0047] 图11B是以柱状图的形式示出图11A的结果的图。图11B中,“1.4mm以上”是长度为1.4mm以上的毛发的长度的总和,“全部”是长度为0.9mm以上的毛发的长度的总和。

[0048] 图12是在骨切除部位(直径8.8 mm)上载置涂布有棕榈酸的生物相容性膜或未涂布棕榈酸的生物相容性膜,利用3D-CT对之后的骨形成进行观察而得到的图像。为了进行组织采样,对于一部分骨形成后的骨,人工地开出直径3mm的孔。

[0049] 图13示出骨形成后进行组织采样得到的骨的切片的苏木素-伊红染色像。虚线椭圆表示在骨切除部位新形成的骨。数值表示所形成的各骨的面积(像素数和 mm^2)。

[0050] 图14示出给药棕榈酸或乳后的对象中的骨形成蛋白4(Bone morphogenetic protein-4、Bmp4)和骨形成蛋白7(Bone morphogenetic protein-7、Bmp7)的基因表达的变动。

[0051] 图15示出由棕榈酸给药或乳给药带来的相对于对照的基因表达的变动。

具体实施方式

[0052] 本说明书中,“对象”是指哺乳动物。作为哺乳动物,可以列举例如人(男性和女性)。

[0053] 本说明书中,“乳”是指哺乳动物来源的乳汁。作为哺乳动物,可以列举例如人和牛。

[0054] 本说明书中,“乳清”是指从乳中除去乳脂肪成分和酪蛋白等后的水溶液。乳清例如可以通过将乳汁供于离心分离等操作、除去沉淀物而得到。

[0055] 本说明书中,“头皮”是指头部的皮肤中包括头顶部的、除面部、颞部和脖子(包括耳朵)以外的区域。本说明书中,“皮肤”以包含头皮和头皮以外的皮肤的含义来使用。人的

头皮具有约 $700\text{mm}^2 \sim 800\text{mm}^2$ 的面积。

[0056] 本说明书中,“改质”是指:改良其质地;改善其质地;提高其质地;或使质地变好。本说明书中,“改善”以包含比现在的状况变好、以及使差的部分变得更好的含义来使用。

[0057] 本说明书中,“毛发”是指皮肤上生长的毛。本说明书中,“头发”是指头皮上生长的毛。

[0058] 本说明书中,“白发”是指毛发、特别是头发中缺乏真黑素(或真性黑色素)和/或褐黑素等色素而呈白色的毛发。本说明书中,“黑发”是指包含真黑素而呈黑色的毛发。

[0059] 本说明书中,“表皮层”是覆盖毛发的表面的结构,是存在于毛发的最外层的结构。表皮层担负着保护毛发免受来自外部的刺激的作用、以及防止水分或成分从内部的皮质层向外部的损失的作用。表皮层从根部朝向毛尖以鳞片状覆盖毛发。

[0060] 本说明书中,“创伤”是指组织的物理性损伤。创伤包括体表的创伤。

[0061] 根据本发明,提供:

[0062] (A) 一种用于对头皮或皮肤进行改质的局部给药用药物组合物,其包含治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐;

[0063] (B) 一种用于治疗创伤的局部给药用药物组合物,其包含治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐;

[0064] (C) 一种用于促进增毛的局部给药用药物组合物或用于对毛发进行改质的局部给药用药物组合物,其包含治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐;以及

[0065] (D) 一种用于促进骨形成的药物组合物,其包含治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐

[0066] (以下,有时将上述(A)~(D)所述的药物组合物统称为“本发明的药物组合物”)。

[0067] 在本发明的某一方式中,作为包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的药物组合物,可以列举乳、乳提取物(例如乳清)和乳加工物(例如乳制品、例如乳酪的乳清、酸奶的乳清等)以及它们的混合物。乳、乳提取物或乳加工物可以进行了灭菌,例如可以进行了低温灭菌(例如, $62^\circ\text{C} \sim 68^\circ\text{C}$ 的加热灭菌)或高温灭菌(120°C 以上的加热灭菌)。乳的灭菌通常大致分为在 $62^\circ\text{C} \sim 68^\circ\text{C}$ 下进行约30分钟(例如, 65°C 下30分钟)的低温灭菌和在 $120^\circ\text{C} \sim 150^\circ\text{C}$ 下进行1秒~4秒(例如, $120^\circ\text{C} \sim 130^\circ\text{C}$ 下2秒~3秒)的高温灭菌。因此,在本发明的某一方式中,本发明的药物组合物包含乳作为有效成分。

[0068] 在本发明的某一方式中,作为包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的药物组合物,可以列举动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物(例如,大豆油、大豆油提取物或大豆油加工物)或者它们的混合物。

[0069] 本说明书中,来自乳或大豆油的提取物是从乳或大豆油中提取的级分,有时分别称为乳提取物或大豆油提取物,分别包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐。

[0070] 本说明书中,乳或大豆油的加工物是对乳或大豆油进行加工而得到的物质,有时分别称为乳加工物或大豆油加工物,分别包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐。

[0071] 作为包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的组合物,可以列举

包含乳和乳清的溶液、以及它们的冷冻干燥制剂。

[0072] 本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸可以是作为乳的成分所包含的脂肪酸。

[0073] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的饱和脂肪酸为选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的饱和脂肪酸。

[0074] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸可以是饱和脂肪酸,例如为选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。

[0075] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的饱和脂肪酸为棕榈酸。

[0076] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的饱和脂肪酸为硬脂酸。

[0077] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的饱和脂肪酸为肉豆蔻酸。

[0078] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物可以还包含不饱和脂肪酸,作为不饱和脂肪酸,可以包含例如选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的不饱和脂肪酸。

[0079] 在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为油酸。

[0080] 本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为 α -亚麻酸。

[0081] 本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为亚油酸。

[0082] 在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸可以是至少一种饱和脂肪酸与至少一种以上的不饱和脂肪酸的混合物。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为棕榈酸和亚油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为棕榈酸和油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为硬脂酸和亚油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为硬脂酸和油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为棕榈酸和硬脂酸以及亚油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为棕榈酸、硬脂酸和油酸。在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物中包含的脂肪酸为肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸。

[0083] 在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含例如选自饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸{在此,“可以包含”可以列举天然包含于乳中的情况和追加于乳中的情况}。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以还包含不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含例如选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含例如选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含例如一种以上的饱和脂肪酸和一种以上的不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含选自由

棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸、以及选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含肉豆蔻酸、棕榈酸和油酸。在某一方式中,本发明中可以使用的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以包含肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸。在本发明的某一方式中,上述一种以上的脂肪酸可以以乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物的形态添加至药物组合物中。

[0084] 在本发明的某一方式中,乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物中,可以使选自饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸的含量增强。关于增强,只要增强后的脂肪酸含量比增强前的乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物中的脂肪酸含量增加即可。增强例如可以通过向乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物中添加选自饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸来进行。在某一方式中,增强例如可以是选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是一种以上的饱和脂肪酸和一种以上的不饱和脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量、以及选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强可以是肉豆蔻酸、棕榈酸和油酸各自的含量的增强。在某一方式中,可以是肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸各自的含量的增强。

[0085] 在本发明的某一方式中,乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物中,可以使乳铁蛋白含量降低。乳铁蛋白含量的降低可以通过高温杀菌等方法来进行。

[0086] 在本发明的某一方式中,乳、乳提取物或乳加工物或者它们的混合物可以进行了脂肪酸含量的增强和乳铁蛋白含量的降低。

[0087] 在本发明的某一方式中,动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含选自饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸。在某一方式中,动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以还包含不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含例如选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含例如选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含例如一种以上的饱和脂肪酸和一种以上的不饱和脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸、以及选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含肉豆蔻酸、棕榈酸和油酸。在某一方式中,本发明中可以使用的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物可以包含肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸。

[0088] 在本发明的某一方式中,动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物中,可以使选自饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸的含量增强。关于增强,只要增强后的脂肪酸含量比增强前的动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物中的脂肪酸含量增加即可。增强例如可以通过向动物性油、植物性油、这些油的提取物或加工物或者它们的混合物中添加选自饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸中的一种以上的脂肪酸来进行。在某一方式中,增强例如可以是选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是一种以上的饱和脂肪酸和一种以上的不饱和脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强例如可以是选自由棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量、以及选自由油酸、 α -亚麻酸和亚油酸组成的组中的一种以上的脂肪酸的含量的增强。在某一方式中,增强可以是肉豆蔻酸、棕榈酸和油酸各自的含量的增强。在某一方式中,可以是肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸各自的含量的增强。

[0089] 在某一方式中,在本发明的局部给药用药物组合物中,以溶液化形态包含脂肪酸。在某一方式中,在本发明的局部给药用药物组合物中,以药物上可接受的盐的形式包含脂肪酸。在某一方式中,在本发明的局部给药用药物组合物中,以乳液的形态包含脂肪酸。在某一方式中,在本发明的局部给药用药物组合物中,脂肪酸不为酯形态和甘油酯形态。

[0090] 脂肪酸溶解于二甲基亚砜、乙醇、氯仿、乙醚中。脂肪酸形成药物上可接受的盐、例如钠盐时,水溶性提高。脂肪酸盐可以形成胶束而溶解于水中。

[0091] 在某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物可以为注射用的制剂。在本发明的某一方式中,本发明的局部给药用药物组合物可以以包含含有脂肪酸的溶液的冷冻干燥制剂和注射用水的试剂盒的形态提供,冷冻干燥剂可以使用注射用水在需要时制备。注射用水可以加热来使用。

[0092] 本发明的用于促进骨的形成的药物组合物可以以涂布于生物相容性膜上的状态来提供。因此,本发明中,可以提供涂布于生物相容性膜上的包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的药物。作为生物相容性膜,可以列举例如具有磷酸钙的表面的薄膜(例如磷酸钙的薄膜)、具有聚乳酸的表面的薄膜(例如聚乳酸的薄膜)、具有聚乙醇酸的表面的薄膜(例如聚乙醇酸的薄膜)、具有乳酸与聚乙醇酸的共聚物或嵌段共聚物的表面的薄膜(例如乳酸与聚乙醇酸的共聚物或嵌段共聚物的薄膜)、以及具有羟基磷灰石的表面的薄膜(例如羟基磷灰石的薄膜)。有效成分向生物相容性膜上的涂布例如可以通过将溶解有有效成分的溶液滴加至生物相容性膜上并使其干燥而进行。例如,可以将约 $10\mu\text{g}$ ~约 $50\mu\text{g}$ 的药物有效成分涂布至生物相容性膜上来使用。

[0093] 包含治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐的、用于对头皮或皮肤进行改质的局部给药用药物组合物在给药后从给药部分附近开始对头皮进行改善,其效果随时间推移逐渐传播至周围。因此,可以使其散布于头皮或皮肤上而使发明效果随时间推移也传播至周围,也可以使其密集而缩短传播所需要的时间。在本发明的某一方式中,本发明的药物组合物例如可以对于 1cm^2 ~ 10cm^2 、 1cm^2 ~ 5cm^2 、 1cm^2 ~ 4cm^2 、 1cm^2 ~ 3cm^2 、 1cm^2 ~ 2cm^2 、 0.5cm^2 ~ 2cm^2 、 0.7cm^2 ~ 1.5cm^2 设定为一处,但没有特别限定。在本发明的某一方式中,本发明的药物组合物例如可以以在 0.5cm^2 中为一处以下、在 0.6cm^2 中为一处以下、在 0.7cm^2 中为

一处以下、在 0.8cm^2 中为一处以下、在 0.9cm^2 中为一处以下或在 1cm^2 中为一处以下的给药密度进行给药。在本发明的某一方式中,本发明的药物组合物例如可以局部给药于紧挨皮下的下方、或者真皮层至脂肪层上层。给药例如可以通过注射来进行。

[0094] 另外,治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐例如可以给药每一处为 $10\mu\text{L} \sim 50\mu\text{L}$ 、 $15\mu\text{L} \sim 30\mu\text{L}$ 、 $15\mu\text{L} \sim 25\mu\text{L}$ 或约 $20\mu\text{L}$ 的溶液。

[0095] 给药部位可以适当选择,例如可以对头皮整体进行给药,或者可以对头皮整体中与其他部位相比为不良的部分进行给药。

[0096] 另外,令人惊讶的是,本发明人发现,对头皮整体中较为良好的部位进行给药时,其效果容易传播至周围。良好的部分对本发明的药物组合物的响应性高,其效果传播,也会扩至该给药部位的周围。传播所带来的改善效果在更靠近给药部位的地方表现得强烈,可扩至距给药部位数cm的范围(例如 $1\text{cm} \sim 4\text{cm}$)。因此,可以对头皮中较为良好的部位进行给药。另外,由于改善效果会从良好的部位传播至较为不良的部位,因此仅通过对较为良好的部位给药,也能够得到对不良部位的治疗效果。

[0097] 因此,可以对头皮中较为良好的部位进行给药,通过传播效果来尝试不良部分的改善。另外,若在较为不良的部位得到改善,则对本发明的药物组合物的响应性提高。因此,如果可以对头皮中较为良好的部位进行给药、通过传播效果进行不良部分的改善,则之后也可以对该曾经为不良的部分给药本发明的药物组合物。

[0098] 认为在每次给药本发明的药物组合物时,给药部位的组织刺激、巨噬细胞的活性或未成熟脂肪细胞的活性提高,修复功能升高。优选诊断患者的症状(状况)和改善程度后进行给药。

[0099] 在某一方式中,上述局部给药可以设定为每个成人的头皮为150处 \sim 250处(例如约200处)、或者250处 \sim 800处,给药部位的数量可以根据需要决定。在此,术语“约”是指包含接续在该术语后的数值的 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$ 的数值范围。

[0100] 本发明的药物组合物例如可以以一个月两次至六个月一次、一个月两次至五个月一次、一个月两次至四个月一次、一个月两次至三个月一次、一个月两次至两个月一次、一个月1.5次至1.5个月一次、或者一个月1.2次至1.2个月一次、例如约一个月一次的给药间隔进行给药,但没有特别限定。

[0101] 本发明的药物组合物即使仅一次给药也具有头皮、皮肤的改质效果,该效果可持续。因此,给药可以为一次,也可以为多次。本发明的药物组合物也可以持续给药至治疗完成为止、或者持续给药至患者满意为止。特别是,根据本发明,头皮、皮肤的改质效果从状态良好的部分开始表现,在状态差的部分表现得慢。因此,可以根据头皮、皮肤的状态来改变治疗期间和治疗间隔。本发明的药物组合物的治疗期间例如可以设定成最短为一次的治疗 \sim 3年、最短为一次的治疗 \sim 2年、最短为一次的治疗 \sim 1.5年、最短为一次的治疗 \sim 1年、最短为一次的治疗 \sim 8个月、最短为一次的治疗 \sim 6个月、或者最短为一次的治疗 \sim 4个月。另外,本发明的药物组合物可以在毛发、头皮、皮肤观察到衰老所致的变化前进行给药,也可以在观察到上述变化时或者观察到上述变化后进行给药。另外,本发明的药物组合物可以在通过本药物组合物的给药进行治疗后的对象中在毛发、头皮、皮肤观察到衰老所致的变化前、观察到上述变化时或者观察到上述变化后再次进行给药。

[0102] 在本发明的某一方式中,上述(A)所述的药物组合物可以是用于头皮或皮肤的年

轻化或者年轻化的促进的药物组合物。在本发明的某一方式中,上述(A)所述的药物组合物可以是用于头皮或皮肤的再生或再生的促进的药物组合物。在本发明的某一方式中,上述(A)所述的药物组合物可以是用于活化头皮或皮肤的药物组合物。在本发明的某一方式中,上述(A)所述的药物组合物可以与增毛剂、育毛剂组合使用。

[0103] 在本发明的某一方式中,上述(B)所述的药物组合物可以用于治疗创伤。本发明中,创伤的治疗可以为创伤的治愈、创伤的治愈的促进、或者创伤的治愈的前提。

[0104] 通过改善头皮,该效果也达到毛发本身。并且,如后述实施例中所示,作为毛发的改善效果,可以列举白发的减少、白发部分的重量的减少、以及白发的比例的减少、白发的比例的减少、表皮层的粗糙的改善、毛发的粗度和伸长速度的改善。因此,在本发明的某一方式中,上述(C)所述的药物组合物可以是用于使白发减少的药物组合物。作为白发的减少,可以列举白发的根数的减少、白发部分的重量的减少、以及白发的比例的减少。白发的减少可以伴有被各种黑色素着色的头发的根数的增加、这种头发的部分的重量的增加、以及这种头发的比例的增加。在本发明的某一方式中,上述(C)所述的药物组合物可以是用于改善毛发的表皮层的粗糙的药物组合物。作为对头发的表皮层的粗糙的改善,可以列举提高表皮层的排列的程度、以及减少表皮层的紊乱区域。在本发明的某一方式中,上述(C)所述的药物组合物可以是用于改善毛发的粗度或伸长速度的药物组合物。作为毛发的粗度的改善,可以列举使毛发变粗、增加粗毛发的根数、以及增加粗毛发的比例。作为伸长速度的改善,可以列举例如使具有一个月为10mm以上、11mm以上、12mm以上、13mm以上、14mm以上、15mm以上、16mm以上、17mm以上、18mm以上、19mm以上、20mm以上或21mm以上的伸长速度的毛发的根数或比例增加。

[0105] 在本发明的某一方面,提供:

[0106] (a) 一种在有此需求的对象(或有此需求的部位)中对头皮或皮肤进行改质的方法,其包括对头皮或皮肤局部给药治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐;

[0107] (b) 一种在有此需求的对象中治疗创伤的方法,其包括对头皮或皮肤局部给药治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐;

[0108] (c) 一种在有此需求的对象中促进增毛的方法、或者在有此需求的对象中对毛发进行改质的方法,其包括对头皮或皮肤局部给药治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐;以及

[0109] (d) 一种在有此需求的对象中促进骨形成的方法,其包括对需要进行骨形成的部位(例如,骨的损伤部位)给药治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐{在此,治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐可以以涂布于生物相容性膜上的状态给药}。

[0110] 在本发明的某一方面,提供:

[0111] (α) 治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于对头皮或皮肤进行改质的局部给药用药物制剂中的应用;

[0112] (β) 治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于治疗创伤的局部给药用药物制剂中的应用;

[0113] (γ) 治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于促进增毛的局部给药用药物制剂或用于对毛发进行改质的局部给药用药物制剂中的应用;以及

[0114] (δ) 治疗上有效量的饱和脂肪酸或其药物上可接受的盐在制造用于促进骨形成的药物组合物或药物制剂中的应用{在此, 药物制剂可以以治疗上有效量的脂肪酸(特别是饱和脂肪酸)或其药物上可接受的盐涂布于生物相容性膜上的状态提供}。

[0115] 在本发明的某一方式中, 药物组合物除了包含治疗上有效量的脂肪酸或药物上可接受的其盐以外, 还可以包含赋形剂(例如, 溶剂、共溶剂、增溶剂、润湿剂、助悬剂、增稠剂、乳化剂、螯合剂、缓冲液、pH调节剂、抗氧化剂、还原剂、抗菌剂、保存剂、填充剂、保护剂或等渗剂)。在本发明的某一方式中, 药物组合物可以为注射剂的形态。在本发明的某一方式中, 药物组合物可以进行局部给药、例如皮内给药或皮下给药。

[0116] 实施例

[0117] 实施例1: 乳的制备和给药

[0118] (1) 如下进行乳的制备。

[0119] 作为用于给药于人的乳, 使用吸乳器, 从34岁女性和40岁女性的乳房得到所谓的初乳(在生产后3个星期以内采集的乳汁)。

[0120] 作为用于给药于大鼠的乳, 使用作为牛乳的通过手挤得到的牛的初乳或市售的牛乳。

[0121] (2) 如下进行乳的给药。

[0122] 以每一处20 μ L的量将乳注射于人的头皮的右半部分或左半部分或者大鼠的背部皮肤。在人的情况下, 对于每位患者, 对该患者的头的一半注射合计为2mL的初乳(即, 每位为100处)。在大鼠的情况下, 在12周龄Wistar大鼠(雄性)的背部从头部至尾部设定3个区域, 进而将各区域在椎骨的左右分为2个区域, 由此在背部设定合计6个区域。在各区域的中央附近对各2处注射20 μ L/一处的乳。需要说明的是, 上述2处间的距离设定为1cm。

[0123] 实施例2: 发质的变化

[0124] 本实施例中, 对头发的表皮层在处置前后是否观察到改善进行了考察。

[0125] 作为乳, 使用实施例1中记载的人的初乳。毛发的平均伸长速度为一个月约10mm。分别采集给药部位和非给药部位的毛发各一根, 考虑患者的毛发的伸长速度, 分别将相当于治疗前3个月的毛发的部分和相当于治疗开始后第3.5个月的毛发的部分作为样品。在毛发采集日或其第二天将检查部位的毛发用树脂胶粘固定于固定板上。在其第二天或第三天进行碳固定, 在同一天根据常规方法利用扫描电子显微镜对头发的表皮层的状态进行观察。作为阴性对象, 使用同一患者的未经处置的部分(非给药部位)的毛发。对毛发的新伸长的部分(根部侧)与已有的部分(前端侧)进行比较。将代表性的示例示于图1。图1是同一患者的毛发的电子显微镜图像。

[0126] 其结果是, 对于治疗后的毛发而言, 在前端侧, 表皮层是粗糙的, 与此相对, 在新伸长的部分即根部侧, 观察到表皮层整齐的样子, 发质的差异明显得到了改善。与此相对, 在阴性对象的未经处置的部分的毛发中, 根部和前端侧均观察到表皮层的粗糙, 在未经处置的部分未确认到发质的改善效果。

[0127] 对更多的患者实施同样的评价。评价基于电子显微镜图像按照下述评分来进行。评价由作为医疗从业者的医生等7名来进行。求出评分的平均值。

[0128] 发质评价的评分表

[0129] 5分: 表皮层整齐, 未观察到粗糙

[0130] 4分:表皮层比平均更整齐,但略微观察到粗糙

[0131] 3分:表皮层的整齐情况为平均

[0132] 2分:表皮层比平均粗糙,略微观察到剥离

[0133] 1分:表皮层整体上粗糙,整体上观察到剥离

[0134] 结果如表1所示。

[0135] [表1]

[0136] 表1:由治疗带来的发质评价的改善

患者编号	评分 (治疗侧根部)	评分 (未治疗侧根部)	评分 (治疗侧前端)
1	4.43	2.86	3.29
1	3.71	3.00	2.00
2	3.29	3.86	3.00
2	3.29	2.29	3.29
3	3.43	3.29	3.00
3	3.43	2.71	3.14
4	3.43	3.29	2.57
4	3.14	2.14	2.00
整体平均	3.52	2.93	2.79

[0138] 如表1所示,求出同一根头发的前端和根部的评分之差,结果无论是治疗侧还是未治疗侧,均是根部的评价更高。具体而言,治疗侧的根部的电子显微镜图像的平均评分为3.52,而治疗侧前端的平均评分为2.79,该差值在统计学上是显著的($p=0.017$)。更具体而言,改善程度(根部的评分-前端的评分)在治疗侧为0.73、在未治疗侧为0.39,治疗侧的改善程度高($n=4$ 、33~56岁、女性4人、平均年龄45.8岁)。另外,如表1所示,治疗侧的根部的平均评分为3.52,而未治疗侧的根部的平均评分为2.93,确认到治疗侧与未治疗侧的根部的评分之差在统计学上是显著的($p=0.036$)。由此表明,通过乳给药,在治疗侧的根部部分、即治疗后新生的毛发部分表现出发质改善效果。

[0139] 实施例3:发质的变化

[0140] 本实施例中,着眼于头发的颜色(白发),对处置前后的改善效果进行了考察。

[0141] 具体而言,在将患者的两侧的眼角向头侧延伸而与连结两耳和头顶的线交叉的两点处,用墨汁纹身,以标记为中心对2cm的范围进行剃发。在剃发3天后,按照对头皮一处注射实施例1中记载的20 μ L的人的初乳的方式对头部一半进行2mL、100处的注射,在一个月后进行观察。毛发显微像(trichogram)以每次的标记为中心进行拍摄(Canon Power Shot A520、东京、日本),对拍摄范围中包含的以纹身为中心的直径11mm的圆(面积95mm²)内的毛发进行照片拍摄,通过目视进行计量。

[0142] 其结果是,在上述剃发部,治疗前有白发的3位患者中在单次注射后治疗后6个月,3人的白发全部减少,每个上述拍摄范围内减少平均7.7根/95mm²的白发($n=3$)。另外,在治疗侧的治疗前后,白发根数减少至92.9%。将未治疗侧的治疗开始前设为100时的白发减少

率与将治疗侧的治疗开始前设为100时相比低28.2%,在治疗侧白发大幅减少(n=3)。

[0143] 将剃发、初乳的单次注射后经过半年的患者(48岁女性)的头发的代表例示于图2A。如图2A所示,在非给药部位,未确认到白发的减少,而在给药部位,白发明显减少。具体而言,在非给药部位,在治疗前白发根数为49根,而在6个月后增加至63根,与此相对,在给药部位,在治疗前为85根,而在6个月后减少至66根。

[0144] 进一步,对于在头皮每一处注射了4次实施例1中记载的人初乳20 μ L的患者(50岁男性),将治疗开始后13个月后的颞部与非治疗侧的颞部进行比较。结果如图2B所示。如图2B所示,在非治疗侧的颞部,白发区域的面积为833cm²,与此相对,在治疗侧的颞部,白发面积为294cm²。这样可知,通过初乳给药,白发减少。在图2B中,在颞部的照片上重叠格栅,对于格栅的各方格,在通过目视判断为白色的方格中标上记号“○”。可知,与非治疗侧相比,在治疗侧记号“○”的数量减少。

[0145] 实施例4:头皮的改质效果的验证

[0146] 毛发的改质如上所述,对于这是基于头皮的何种改质进行了验证。

[0147] 作为乳,使用实施例1中记载的人初乳。对患者的头皮进行头皮每一处为20 μ L、100处的乳的注射(注射一次的为6人、一个月一次注射4次的为1人)。

[0148] 通过使用10Mz的探头的回波检查,对单次给药后的头皮的皮下组织的脂肪层的厚度的变化进行观察。该检查中,考虑对皮脂腺区域至下方部分的区域进行测定,对大致至真皮层为止的区域的厚度进行测定(其中,真皮层不包含在测定值中)。结果如图3中所示。图3中,“#1~#6”分别示出治疗1~6个月后得到的数据。如图3所示,在治疗开始后6个月,确认到脂肪层的厚度稍有增加,但未确认到大的变化。

[0149] 实施例5:头皮的组织像

[0150] 上述实施例中,确认到表皮层的改善和白发减少的效果。本实施例中,为了考察这些效果是否是由头皮的改善产生的,对头皮的胶原蛋白量进行了考察。

[0151] 对人患者的头皮皮下给药每一处为20 μ L的乳。给药每月进行一次。作为乳,使用实施例1中记载的人的初乳。

[0152] (1) 胶原蛋白像的变化

[0153] 首先,观察I型胶原蛋白和III型胶原蛋白的增减。具体而言,制作头皮的组织(从表皮朝向头盖骨的面)的切片,使用天狼星红染色试剂盒试剂(Polysciences, Inc., Cat#: 24901-250)按照制造商的说明书对I型胶原蛋白和III型胶原蛋白进行染色。I型胶原蛋白被染色为黄色系,III型胶原蛋白被染色为绿色系。该系统中,III型胶原蛋白以外的胶原蛋白被染色为红黄色系。

[0154] 在显微镜(株式会社Nikon、OLYMPUS株式会社)上安装偏振滤光装置,对染色像进行观察,利用显微镜附带的相机(DP-22 OLYMPUS株式会社、DS-Fi3株式会社NIKON INSTECH)进行拍摄。以灰阶制成数字图像保存于计算机中,由各像素的亮度推定胶原蛋白量。图4A示出单次给药后经过5个月的女性患者(49岁)的头皮样品,图4B示出进行4次每月的给药、初次治疗后经过15个月的男性患者(50岁)的头皮样品。

[0155] 其结果是,如图4A和4B所示,在治疗前和未治疗侧,观察到I型胶原蛋白和III型胶原蛋白的存在。

[0156] 图4A中,将绿色系的像素数(相当于III型胶原蛋白量)、黄色系的像素数(相当于I

型胶原蛋白量)和红黄色系(相当于III型胶原蛋白以外的胶原蛋白的总量)汇总于表中。

[表 2]

表 2: 图 4A 的照片的像素分析结果

[0157]	像素数	治疗前	治疗后	增减(%的差值)
	绿色系	27084(49.6%)	11217(19.6%)	减少 30.0%
	红黄色系	27546(50.4%)	46022(80.4%)	增加 30.0%
	黄色系的内数	16469(30.1%)	35635(62.3%)	增加 32.1%
	合计	54630(100%)	57239(100%)	

※数字表示照片内的像素数, 括号内的数字表示其相对于整体的比例。

[0158] 如表2所示可知,在单次给药后经过5个月的患者中,III型胶原蛋白的比例从49.6%减少至19.6%,I型胶原蛋白的比例从30.1%增加至62.3%。可知III型胶原蛋白以外的胶原蛋白整体的总量也同样从50.4%增加至80.4%,认为该增加主要是由I型胶原蛋白的增加引起的。

[0159] 图4B中,将绿色系的像素数(相当于III型胶原蛋白量)、黄色系的像素数(相当于I型胶原蛋白量)和红黄色系(相当于III型胶原蛋白以外的胶原蛋白的总量)汇总于表中。

[表 3]

表 3: 图 4B 的照片的像素分析结果

[0160]	像素数	未治疗侧	治疗侧	增减(%的差值)
	绿色系	9640(26.3%)	1815(2.8%)	减少 23.5%
	红黄色系	27023(73.7%)	62214(97.2%)	增加 23.5%
	黄色系的内数	9047(24.7%)	36071(56.3%)	增加 31.7%
	合计	36663(100%)	64029(100%)	

※数字表示照片内的像素数, 括号内的数字表示其相对于整体的比例。

[0161] 另外,如表3所示,对于治疗开始15个月后的患者,在未治疗侧与治疗侧的对比中,观察到如下情形:III型胶原蛋白从26.3%大幅减少至2.8%,I型胶原蛋白从24.7%增加至56.3%(参考图4B)。可知III型胶原蛋白以外的胶原蛋白整体的总量也同样从73.7%增加至97.2%,认为该增加主要是由I型胶原蛋白的增加引起的。

[0162] 在治疗侧的前后比较、以及未治疗侧与治疗侧的左右比较中均观察到同样的倾向,可知:通过乳给药,III型胶原蛋白减少,I型胶原蛋白增加。此外,在人样本(n=3)中也进行了同样的观察,结果在任意一个样本中均观察到如下情形:通过乳的给药,III型胶原蛋白减少,I型胶原蛋白增加。需要说明的是,关于该结果,在被红黄色系染色的胶原蛋白(III型胶原蛋白以外)中也确认到与被黄色系染色的I型胶原蛋白的增加同样的倾向。

[0163] III型胶原蛋白的减少和I型胶原蛋白的增加是组织修复、特别是创伤治愈中产生的现象。由本实施例的结果暗示,乳的给药诱发了头皮和皮肤的组织修复。

[0164] (2) 脂肪细胞的年轻化

[0165] 因此,对脂肪细胞的年轻化进行了观察。

[0166] 脂肪细胞随着生长,细胞质几乎都变成脂肪滴,在细胞质中蓄积脂肪滴而发生肥

大化。因此,大的细胞意味着成熟的老细胞,小的细胞为未成熟的新细胞(即,未成熟的脂肪细胞)。本实施例中,对于小而未成熟的细胞是否通过乳给药而增加进行了确认。更具体而言,对给药了乳20 μ L的人头皮组织切片进行观察,确认脂肪层中的脂肪细胞的大小的变化。将脂肪细胞的图像近似成圆,基于其直径分类为S、M或L。将其直径为51 μ m以下的细胞记作“S”,将超过51 μ m且为63 μ m以下的细胞记作“M”,将超过63 μ m的细胞记作“L”,进行合计。关于患者,在单次给药后经过6个月的患者(以下称为“患者1”)、以及每月一次进行4次给药、治疗开始后经过15个月的患者(以下称为“患者2”)中进行。结果如图5所示。

[0167] 如图5所示,在治疗后6个月后(患者1、51岁男性)和15个月后(患者2、50岁男性)的患者中,通过乳的给药,“S”脂肪细胞的比例均显著增大。另外,将患者1与患者2进行比较时,“S”脂肪细胞的比例的增大在患者2中较为显著。由此表明,与1次治疗相比,4次治疗时“S”脂肪细胞的比例的增加更大。

[0168] 由这些结果表明,通过乳的给药,未成熟的细胞增加,组织年轻化。另外,暗示出组织的年轻化可能与组织修复能力增强有关。

[0169] 实施例6:对创伤治愈的效果

[0170] 因此,本实施例中,对于乳的给药是否具有加快对皮肤的创伤的治愈的效果进行了确认。

[0171] 创伤的制作:用理发推子对12周龄Wistar大鼠的背部进行剃毛,在头侧、尾侧的左右分别各制作一个直径8毫米的圆形皮肤全层缺损。皮肤全层缺损在每一只大鼠中制作4处。

[0172] 乳的给药:在距离创部边缘4mm的部位在上下左右4处皮下注入乳20 μ L。作为乳,使用实施例1中记载的加热杀菌(130度、2秒和65度、30分钟)的市售的牛乳。

[0173] 脂肪酸的给药:将分别包含棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、亚麻酸、 α -亚麻酸和油酸作为乳中包含的脂肪酸的灭菌纯水(给药液)进行给药,饱和脂肪酸加热后给药,不饱和脂肪酸在室温的状态下给药。关于给药,在距离创伤边缘为4mm的上下左右4处进行给药液20 μ L(含有1mg脂肪酸)的皮下给药。

[0174] 创伤治愈的评分

[0175] 5分:治愈

[0176] 4分:创伤部位的面积的缩小率为70%以上

[0177] 3分:创伤部位的面积的缩小率为50%以上且小于70%

[0178] 2分:创伤部位的面积的缩小率为20%以上且小于50%

[0179] 1分:创伤部位的面积的缩小率小于20%

[0180] 关于结果,将上述评分除以生理盐水的评分,以其比来表示。如图6A所示,在乳给药的组中确认到创伤治愈的促进效果。

[0181] 利用离心分离机(2600g \times 6分钟)对市售的低温杀菌乳(65度、30分钟)8mL \times 2瓶进行离心,分别收集相当于除去起泡部分后的上清四分之一的2mL,将2瓶的量合并为4mL,对该4mL进行搅拌,用于实验(以下将所得到的试样称为“离心试样”)。将所得到的离心试样以一处为20 μ L的用量与上述同样地给药于创伤部位。结果如图6A的“离心试样”所示。

[0182] 如图6A所示,离心试样发挥出与乳同等或其以上的创伤治愈的改善效果。由此暗示,由乳产生的创伤治愈效果主要是由通过离心分离未沉淀的成分中包含的成分产生的效

果。另外可知,生理盐水给药后也产生创伤的自然治愈,但无论是乳给药还是离心试样给药均比生理盐水给药后的自然治愈更促进治愈(图6A)。

[0183] 接着,对由乳铁蛋白产生的创伤治愈的促进效果进行了研究。乳铁蛋白使用由狮王购入的乳铁蛋白(产品名:ナイスリムエッセンス62971),利用与上述同样的方法在一处给药20 μ g或60 μ g。具体而言,将乳铁蛋白粉碎后充分溶解于纯水中。按照注入量20 μ L中含有上述量的方式调节乳铁蛋白浓度。关于结果,求出将7天后和10天后的评分分别除以生理盐水给药组的评分而得到的值。结果如图6B所示。如图6B所示,乳铁蛋白在创伤治愈中未显示出显著的促进效果。由此暗示,乳铁蛋白以外的成分具有创伤治愈的促进效果。

[0184] 通常的生乳中每1L含有约3mg乳铁蛋白(也称为“LF”)。20 μ L的生乳中含有约0.06 μ g的乳铁蛋白。另外,乳铁蛋白不耐加热,认为从上述实施例中使用的在高温下加热杀菌的牛乳中基本消失(参考野吕未来等、电泳 59: 21-24, 2015)。因此,在高温杀菌的牛乳给药时观察到创伤治愈的促进效果,在离心试样给药时也观察到创伤治愈的促进效果,另一方面,在乳铁蛋白给药时几乎未观察到创伤治愈的促进效果,这是与乳铁蛋白并非有效成分的结论一致的结果。

[0185] 由上述实施例表明,给药乳或乳的离心上清时,促进创伤治愈。另外,由上述实施例还暗示出通过乳或乳的离心上清的给药而使皮肤的组织再生活跃化的可能性。

[0186] 接着,对乳中的有效成分进行鉴定。具体而言,将乳中包含的脂肪酸分别如上所述给药于创伤部,考察有无创伤治愈的促进效果。结果如图6C所示。如图6C所示可知,棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸对创伤治愈具有高的促进效果。由此表明,这些脂肪酸可能有助于乳给药中的创伤治愈的促进效果。另外,油酸、 α -亚麻酸和亚油酸具有弱的创伤治愈的促进效果。

[0187] 另外,将已知富含棕榈酸、硬脂酸、亚油酸和 α -亚麻酸的食用大豆油(理研农产化工株式会社、福岡工場制造)给药于创伤部,考察有无创伤治愈的促进效果。结果如图6D所示。如图6D所示,大豆油对创伤治愈显示出高的促进效果。

[0188] 需要说明的是,一般的牛乳1g或大豆油1g中包含的代表性脂肪酸及其含量如下所示。

[表 4]

表 4: 牛乳和大豆油中包含的代表性脂肪酸及其含量(单位: mg/g 可食部)

脂肪酸成分	含量(牛乳)	含量(大豆油)
肉豆蔻酸	3.6	0.71
棕榈酸	10	99
硬脂酸	4	40
油酸※	7.6	220
亚油酸	0.88	500
α -亚麻酸	0.13	61

[0189]

日本食品标准成分表 2015 年版(第七次修订) 脂肪酸成分表篇
由第 1 表 每 100g 可食部的脂肪酸成分表进行换算
※油酸中包含顺式异油酸

[0190] 实施例7:乳给药后的头皮组织中的组织常驻型M2样巨噬细胞和PPAR γ 阳性脂肪细胞的检测

[0191] 已报道了外周组织(特别是脂肪组织)中产生组织再生时,产生组织常驻型M2样巨噬细胞的增加(Satoh T. et al., Nature, 495: 524-528, 2013)、CD34阳性细胞的出现或PPAR γ 阳性脂肪细胞的增加(Festa E et al., Cell, 146: 761-71, 2011)。因此,本实施例中,对于在乳20 μ L给药后的头皮组织中是否产生了组织常驻型M2样巨噬细胞的增加或PPAR γ 阳性细胞的增加进行了考察。另外,对于在12周龄Wistar大鼠背部皮肤中是否产生了作为细胞增殖的活化标志物的Ki67阳性细胞的增加进行了确认。组织常驻型M2样巨噬细胞作为CD68阳性细胞或CD163阳性细胞进行检测。本实施例中,作为乳,对人给药人的初乳,对大鼠给药牛的初乳。

[0192] 利用常规方法对多只大鼠的乳给药组(一次给药)的背部皮肤的组织切片进行固定,供于免疫组织学染色。对于大鼠,分别在给药5周后和8周后对给药部位和与给药部位相距10mm的部位(远位)这两个部位进行样品的采样。对于患者,对头的一半进行治疗,剩余的一半设为未治疗。对包括从患者的头皮表面至头盖骨骨膜上方为止或者至颞筋膜上方为止的直径3mm打孔的切片进行固定。另外,本实施例中染色中使用的一次抗体和二次抗体如下所示。

[0193] [表5]

[0194] 表5:大鼠样本的免疫组织学染色中使用的一次抗体和二次抗体

[0195]	Ki-67	名称	产品编号	批次	制造商信息	
	一次	小鼠抗大鼠Ki-67抗原单克隆抗体(克隆: MIB-5)	M7248	20030236	DaKo	丹麦
	二次	用于大鼠样本的LSAB2系统-HRP	K0609	-	DaKo	丹麦
	CD68	名称	产品编号	批次	制造商信息	
	一次	小鼠抗大鼠CD68(克隆: ED1)	MCA341R	1014	BIO-RAD	美国
	二次	用于大鼠样本的LSAB2系统-HRP	K0609	-	DaKo	丹麦
	PPAR γ	名称	产品编号	批次	制造商信息	
	一次	PPAR γ (C26H12) 兔mAb	#2435	No,4	Cell Signaling Technology	美国
	二次	EnVision+ 系统-HRP标记的多聚体抗兔	K4003	-	DaKo	丹麦

[0196] 结果如图7所示。如图7所示,Ki67阳性脂肪细胞数和CD68阳性巨噬细胞数在给药5周后增加,在给药8周后各自减少。与此相对,在远位,在给药5周后未观察到阳性细胞,但在给药8周后观察到Ki67阳性细胞数和CD68阳性巨噬细胞。

[0197] 由此表明,通过乳的给药,Ki67阳性脂肪细胞增加,即脂肪细胞活化而使分裂活化;并且组织内的巨噬细胞增加。根据显微镜图像认为,Ki67阳性脂肪细胞主要为脂肪细胞和脂肪干细胞。但是,在给药8周后,Ki67阳性脂肪细胞数和巨噬细胞数减少。另一方面,令

人惊讶的是,比给药部位更晚地在远位也观察到Ki67阳性脂肪细胞数和CD68阳性巨噬细胞数的增加。这暗示出乳给药所产生的效果在组织中传播。

[0198] 对人也实施了同样的实验。对于人组织,除了CD31的染色以外,还实施了CD34、CD68、CD163和PPAR γ 的染色。

[0199] [表6]

[0200] 表6:人样本的免疫组织学染色中使用的一次抗体和二次抗体

[0201]

CD31	名称	产品编号	批次	制造商信息	
一次	小鼠抗人CD31单克隆抗体	M0823	000083027	DaKo	丹麦
二次	EnVision+ 系统-HRP 标记的多聚体抗小鼠	K4001	-	DaKo	丹麦
CD34	名称	产品编号	批次	制造商信息	
一次	小鼠抗人CD34单克隆抗体	M7165	00048997	DaKo	丹麦
二次	EnVision+ 系统-HRP 标记的多聚体抗小鼠	K4001	-	DaKo	丹麦
CD68	名称	产品编号	批次	制造商信息	
一次	CD68 小鼠单克隆抗体	NCL-CD68-KP1	211710	NOVOCASTRA	英国
二次	EnVision+ 系统-HRP 标记的多聚体抗小鼠	K4001	-	DaKo	丹麦
CD163	名称	产品编号	批次	制造商信息	
一次	抗人巨噬细胞表面抗原单克隆抗体	KT013	TG201213	Trans Genic Inc.	日本
二次	EnVision+ 系统-HRP 标记的多聚体抗小鼠	K4001	-	DaKo	丹麦
PPAR γ	名称	产品编号	批次	制造商信息	
一次	PPAR γ (C26H12) 兔 mAb	#2435	No,4	Cell Signaling Technology	美国
二次	EnVision+ 系统-HRP 标记的多聚体抗兔	K4003	-	DaKo	丹麦

[0202] 另外,图8A示出CD31和CD34染色。CD31阳性细胞仅在血管内皮被观察到。另一方面,CD34阳性细胞在除血管以外的区域被观察到。由此暗示出,通过乳给药,在给药部位CD31阴性的CD34阳性细胞增加。如图8A所示,在治疗前和单次治疗后第5个月确认到每单位

面积的CD34阳性细胞增加(女性、49岁)。另外,关于CD34阳性细胞,在未治疗侧在3mm打孔的切片整体中平均为106.7(n=3),与此相对,在治疗侧平均为129.7个(n=3),任意一位患者均在治疗侧观察到CD34阳性细胞的增加。需要说明的是,CD34阳性细胞已知为脂肪干细胞标志物,CD34阳性细胞的增加暗示出脂肪干细胞的增加。因此,由该结果表明,乳给药部位的脂肪组织被改质,产生了脂肪干细胞。

[0203] CD68阳性巨噬细胞和PPAR γ 阳性细胞的染色的结果如图8B所示。如图8B所示,在人的情况下,每单位面积的CD68阳性巨噬细胞、CD163阳性巨噬细胞、PPAR γ 阳性细胞也都通过乳20 μ L的给药而增加(女性、49岁)。另外,对于治疗开始后经过15个月的男性患者(4次给药、50岁),也观察到在乳的作用下每单位面积的CD68阳性巨噬细胞、CD163阳性巨噬细胞、PPAR γ 阳性细胞在治疗侧增加。

[0204] 这样,在乳给药部位,组织常驻型M2样巨噬细胞增加,表明了作为PPAR γ 阳性细胞的未成熟脂肪细胞的参与。

[0205] 需要说明的是,图8A和8B中,记号“H”表示毛囊,记号“V”表示血管,记号“S”表示皮脂腺。

[0206] 实施例8:乳铁蛋白所致的组织变化的研究(大容量强制经口摄取)

[0207] 作为比较试验,代替乳进行乳铁蛋白给药,确认是否产生了CD68阳性细胞和PPAR γ 阳性细胞的增加。关于乳铁蛋白,将ナイスリムエッセンス(狮王制造、62971)3片、有效乳铁蛋白300mg(人的一天摄取量)经口给药于12周龄的Wistar大鼠(n=3)。给药一天进行一次,使用经口探头注入(强制摄取)至胃内,在给药8周后利用常规方法制作背部皮肤的石蜡包埋切片,供于免疫组织学染色。结果如图9所示。

[0208] 如图9所示,在乳铁蛋白给药的情况下,未观察到CD68阳性细胞和PPAR γ 阳性细胞的增加。由此表明,对于乳铁蛋白的给药而言,虽然被宣称有毛发的增毛效果,但其不同于乳,不具有皮肤的改质效果。需要说明的是,如图9所示,使用抗CD68抗体和PPAR γ 抗体分别对18周龄Wistar大鼠的正常组织(背部)进行染色时,在正常组织与乳铁蛋白给药第8周(20周龄)之间未发现显著的差异。已报道了乳铁蛋白在抑制脂肪前体细胞的脂肪分化的同时抑制PPAR γ 的活性(参考M. Yag, et al., Journal of Oral Science, 50: 419-425, 2008),上述结果与该报道一致。乳的乳铁蛋白以外的成分被认为是乳给药所致的脂肪细胞的年轻化、脂肪前体细胞的增加的主要原因。

[0209] 实施例9:乳中包含的代表性脂肪酸所以引起的组织变化和PPAR γ 活性

[0210] 接着,将乳中包含的代表性脂肪酸给药于12周龄的Wistar大鼠的背部皮肤的多个部位,给药部位如上述实施例1(2)所述,通过免疫组织学染色对给药所引起的组织变化进行观察。更具体而言,对于通过生理盐水20 μ L/一处的给药、含有脂肪酸1mg的给药液20 μ L/一处的给药而产生的CD68阳性巨噬细胞染色像和PPAR γ 阳性细胞像的变化进行观察。关于Wistar大鼠的样品,在给药部位(给药4周后和给药8周后)分别进行采样。结果如图10A~10G所示。图10A示出生理盐水给药组(阴性对照)的结果。

[0211] 如图10B~10D中分别所示,在棕榈酸、硬脂酸或肉豆蔻酸给药的情况下,在给药4周后在给药部位观察到PPAR γ 阳性细胞、CD68阳性细胞的增加。另外,在上述任意一种脂肪酸的给药8周后,仍维持了给药部位的PPAR γ 阳性细胞和CD68阳性细胞的增加。

[0212] 需要说明的是,在饱和脂肪酸注入部位确认到许多CD68阳性细胞的浸润,确认到

正常组织的纤维化。因此,图10B~10D中,对最接近给药部位的维持了正常组织的部位(非纤维化部位)的脂肪组织的变化进行了观察。

[0213] 如图10E~10G中分别所示,在油酸、 α -亚麻酸或亚油酸给药的情况下,在给药4周后,与对照相比未确认到PPAR γ 阳性细胞、CD68阳性细胞的显著增加,但在给药8周后确认到PPAR γ 阳性细胞的增加。另一方面,油酸、 α -亚麻酸或亚油酸给药的情况下,未确认到CD68阳性细胞的大幅增加(整体上确认到较弱的效果)。CD68阳性细胞在PPAR γ 的作用下分化为组织常驻型M2样巨噬细胞,促进组织的稳态维持。认为在棕榈酸、硬脂酸或肉豆蔻酸等饱和脂肪酸给药的情况下,产生了CD68阳性细胞的增加和PPAR γ 阳性细胞的增加,因此在给药了脂肪酸的组织内,组织常驻型M2样巨噬细胞增加。另一方面,认为在不饱和脂肪酸的情况下,PPAR γ 阳性细胞增加,但未确认到CD68阳性细胞的大幅增加,认为组织常驻型M2样巨噬细胞的诱导效果有限。另外,该结果是与上述实施例6中一致的结果,即,饱和脂肪酸发挥出高的创伤治愈促进效果,而不饱和脂肪酸的创伤治愈促进效果有限。已报道了巨噬细胞的PPAR γ 活性与脂肪细胞的功能有很大关系(参考Odegaard J I, et al., Nature, 447:1116-1121, 2007),因此,由饱和脂肪酸给药所致的脂肪组织内的CD68阳性细胞的增加和PPAR γ 阳性细胞的增加也是支持通过饱和脂肪酸给药产生了皮肤的改质这样的考察的结果。需要说明的是,根据在细胞内具有脂肪滴的PPAR γ 阳性细胞的增加,确认到PPAR γ 阳性脂肪细胞的增加,由该结果暗示出由饱和脂肪酸给药产生的PPAR γ 阳性的脂肪干细胞的活化。

[0214] 棕榈酸、硬脂酸或肉豆蔻酸为饱和脂肪酸,油酸、 α -亚麻酸或亚油酸为不饱和脂肪酸。根据图10B~10G的结果,饱和脂肪酸对组织具有早期诱导PPAR γ 阳性细胞的表达(包括未成熟的脂肪细胞)的效果,不饱和脂肪酸具有比饱和脂肪酸更晚地诱导PPAR γ 阳性细胞的表达(未成熟的脂肪细胞)的效果。由该结果认为,饱和脂肪酸诱发强的组织炎症,使巨噬细胞聚集,但在巨噬细胞向组织的聚集的同时使PPAR γ 阳性细胞增加,从而抑制诱发的炎症。另一方面,认为不饱和脂肪酸使巨噬细胞向组织聚集的作用弱,由PPAR γ 所致的炎症抑制效果占主导。

[0215] 已知脂肪酸促进炎性细胞因子的分泌(参考Hotamisligil G. S., Nature, 542:177-185, 2017)。在本实施例的结果中,饱和脂肪酸诱发强的炎症反应,另一方面,通过PPAR γ 阳性细胞的增加而减弱炎症,促进组织再生。由此暗示出如下可能性:通过饱和脂肪酸给药而在组织中增加的PPAR γ 阳性细胞诱导脂肪干细胞、未成熟脂肪细胞,诱导M2巨噬细胞,引起创伤治愈反应和组织的再生。需要说明的是,确认到通过PPAR γ 的表达及其对巨噬细胞的作用,引起了免疫细胞的活化(特别是M1巨噬细胞向M2巨噬细胞的诱导)(参考Croadell A. et al., PPAR Research, ID 549691, 2015)。

[0216] 实施例10:头皮的改善与发质的改善效果和增毛效果的关系

[0217] 根据上述实施例1~9表明,通过乳给药,产生了头皮、皮肤的再生和改质,由此产生了发质提高的效果。

[0218] 本实施例中,根据上述实施例的结果,着眼于伸长速度快的头发,对乳给药的效果进行评价。具体而言,从头皮图像中提取3天伸长0.9mm以上的毛发,算出伸长的长度的总和。需要说明的是,已知成人的毛发以1个月约10mm的比例(即,3天约1mm的比例)伸长。

[0219] 出于该目的,将进行了乳20 μ L/一处的给药的多位成人(仅一次给药的治疗为6位、

一个月一次治疗4个月的为1位) 的头皮的一部分剃发,3天后拍摄剃发后的部位的图像,进行图像分析。另外,在给药一年后再次将同一部位剃发,3天后拍摄剃发后的部位的图像,进行图像分析。剃发后,毛发具有平均为0.4mm的长度。以下,对于在剃发3天后具有1.4mm以上的长度的毛发,算出伸长的长度的总和。

[0220] 将利用图像分析软件对毛发部分的长度进行计数而得到的该患者的计数结果示于图11A和11B。在此,作为代表测量例,将患者A(50岁/男性、一个月一次治疗4个月、治疗开始后经过一年)的治疗经过比较计数结果示于图11A,将2位患者(患者A、患者B(47岁/女性、仅一次给药的治疗、治疗后经过一年))的未治疗侧与治疗侧的比较测量的结果示于图11B。

[0221] 图11A中,对患者A的治疗前与治疗开始后一年的测量结果进行了比较。图10A中,分别示出了剃发3天后具有1.4mm以上的长度的毛发的长度的总和(1.4mm以上)、以及剃发3天后包括0.9mm以上且小于1.4mm的毛发在内的全部毛发的长度的总和(整体)。患者A的情况下,3天后具有1.4mm以上的长度的毛发的长度的总和在治疗前为311.9,但在治疗开始后一年时显示为337.9。剃发3天后的全部毛发的长度的总和在治疗前为405.7,但在治疗开始后一年时显示为419.2。

[0222] 图11B中对患者A和B的治疗开始一年的未治疗侧与治疗侧的测定结果进行了比较。图10B中,分别示出了剃发3天后具有1.4mm以上的长度的毛发的长度的总和(1.4mm以上)、以及剃发3天后包括0.9mm以上且小于1.4mm的毛发在内的全部毛发的长度的总和(整体)。患者A的情况下,剃发3天后具有1.4mm以上的长度的毛发的长度的总和在未治疗侧为199.4,但在治疗侧显示为337.9。患者B的情况下,剃发3天后具有1.4mm以上的长度的毛发的长度的总和在未治疗侧为114.3,但在治疗侧显示为300.7。

[0223] 同样地,患者A的情况下,剃发3天后的0.9mm以上的毛发的长度的总和在未治疗侧为357.8,但在治疗侧显示为419.2。患者B的情况下,剃发3天后的全部毛发的长度的总和在未治疗侧为261.5,但在治疗侧显示为378.1。

[0224] 作为阴性对照,向头部的单侧一半注入生理盐水。6个月内每月对通过向头部的单侧注入生理盐水而带来的毛发的变化(1.4mm以上的毛发根数)进行观察,治疗前与治疗第6个月的变化率为-0.84%~+1.24%,平均为1.03%。另外,在注入了生理盐水的治疗侧与未治疗侧,治疗第6个月的变化为-0.99%~+1.25%,平均为1.06%(n=4)。6个月内每月对通过向头部的单侧注入生理盐水而带来的毛发的变化(1.4mm以上的毛发的长度的总和)进行观察,治疗前与治疗第6个月的变化为-0.79%~+1.33%,平均为1.05%。另外,在注入了生理盐水的治疗侧与未治疗侧,治疗第6个月的变化为-0.95%~+1.28%,平均为1.07%(n=4)。这样,在作为阴性对照的给药生理盐水的组中,在剃发后第3天未确认到1.4mm以上的毛发的显著增加。

[0225] 这样,可知:通过乳(20 μ L/一处给药)给药,显示出头皮改质和由其带来的毛发的伸长速度的改善。

[0226] 另外,在3天后考察1.4mm以上的长度的毛发,通过图像分析可知,与伸长速度慢的毛发(3天后长度小于1.4mm的毛发)相比,1.4mm以上的长度的毛发较粗。具体而言,剃发3天后的长度为2.1~2.2mm的毛发的粗度平均为97.42 μ m,与此相对,伸长小于1.4mm的毛发的粗度平均为75.39 μ m。

[0227] 由该结果表明,通过乳(20 μ L/一处给药)给药,伸长速度快且粗的毛发增加。

[0228] 通过乳给药,观察到毛发的拉力、弹力的改善(毛发的拉力、弹力提高,观察到毛发

的体积增大),这与粗毛发增加是一致的结果。

[0229] 这样,在进行了乳给药的对象中观察到增毛,并且由乳给药引起的头皮的改质带来毛发的伸长速度的改善以及粗且具有弹力和拉力的优质毛发的增加。

[0230] 实施例A11:骨形成促进作用

[0231] 本实施例中,确认了棕榈酸给药对骨形成的效果。

[0232] 骨缺损的制作:用理发推子将12周龄(4只)和18周龄(1只)的Wistar大鼠(雄性)的头部剃毛,将眼上方与相反侧耳廓前方在对角线上引出切线,在其交叉点的后方制作直径8.8毫米的头盖骨缺损。按照1.全身麻醉、2.皮肤切开、3.骨膜剥离、4.头盖骨削除(直径8.8mm)的顺序进行。一边使用环锯和微型钻慢慢地切削周围的骨,一边制作头盖骨缺损,最后将骨提起而制成头盖骨缺损。

[0233] 骨形成的观察:将羟基磷灰石薄膜按照骨缺损部的大小进行制作,载置于骨缺损部。此时在片上涂布棕榈酸0.02mg(20 μ g)。具体而言,将在1mL中溶解1mg棕榈酸而成的溶液0.02mL(20 μ L)滴至薄膜上,使其干燥并载置于骨缺损部。

[0234] 饲养8周后,在组织采集后宰杀、进行灌流固定,对头盖骨的横截面进行苏木素-伊红染色,并进行显微镜观察。然后,对于在使用涂布有棕榈酸的薄膜的情况下和在使用未进行涂布的薄膜的情况下确认到骨形成的部分的面积进行比较。分析使用Image J。

[0235] 头盖骨的3D-CT图像使用下述系统来取得。

[0236] 装置名 Comscan公司制造的ScanXmate-E090

[0237] 拍摄条件 X射线管电压 88 kV

[0238] X射线管电流 89 μ A

[0239] 分辨率 30.649 μ m/像素

[0240] 三维构建使用VGSTUDIO MAX(VOLUME GRAPHICS公司)进行。

[0241] 结果如图12所示。如图12中所示,在使用涂布有棕榈酸的薄膜的情况下,通过新骨的形成,头盖骨几乎完全闭合,与此相对,在使用未进行涂布的薄膜的情况下,新骨的形成不充分。

[0242] 接着,苏木素-伊红染色的切片如图13所示。如图13所示,在载置涂布有棕榈酸的薄膜的情况下,形成大量被染红的骨(参考虚线),与此相对,在载置薄膜的情况下,形成少量被染红的骨(参考虚线)。将组织断片中的骨形成部各自的染色面积(像素数以及 mm^2)进行对比,在涂布有棕榈酸的薄膜的情况下为12132像素(0.984mm^2),与此相对,在对照中不过为1025像素(0.083mm^2)。所形成的骨在涂布有棕榈酸的薄膜中显著厚于对照的薄膜。

[0243] 由此表明,棕榈酸具有骨形成促进作用。

[0244] 宰杀时采集骨组织片(直径3 mm)。

[0245] 饲养8周后,进行组织采集、灌流固定。关于骨组织采集,在骨形成充分时使用环锯(直径3mm)进行采集,对于骨形成不充分的样本(大鼠),使用骨钳(咬骨钳)采集开放骨缘部分的原有骨和再生骨。

[0246] 将采集的组织片浸泡至RNA稳定液(Thermo Fisher Scientific、立陶宛)中,利用液氮进行冷冻,在 -80°C 下保存。从被保存的组织片中如下进行总RNA的纯化和提取:将25mg的组织片与5个不锈钢珠(直径3mm)一起封入样品管中,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN GmbH、希尔登、德国)和Tissue Lyser II(QIAGEN GmbH、希尔登、德国)将组织片制

成匀浆后,按照试剂盒附带的操作规程,利用离心柱进行总 RNA的纯化和提取。关于利用定量PCR进行的基因表达分析,委托Integrated DNA Technologies, Inc(斯科基、IL、USA)进行基因特异性引物和探针的设计和合成,利用PrimeTime基因表达预混试剂(Integrated DNA Technologies, Inc、斯科基、IL、USA)和Rotor-Gene Q PCR装置(QIAGEN GmbH、希尔登、德国),每一个样本的每一基因实施两次PCR分析,分析对象基因的表达量。利用定量PCR(qPCR; $\Delta\Delta Ct$ 法)进行的基因表达分析中使用的7种大鼠基因的信息以及合成的探针和引物组的碱基序列如下所述。

- [0247] 1.)核糖体磷蛋白大亚基P0(Ribosomal protein lateral stalk subunit P0; RplP0), 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA, 1,093 bp, NM_022402.2, GI: 310616731
- [0248] 6-FAM/CCT GTC TTC /ZEN/CCT GGG CAT CAC G/IABkFQ
- [0249] CAA TCC CTG ACG CAC CG
- [0250] TGT CTG CTC CCA CAA TGA AG
- [0251] 2.)C-X-C基序趋化因子配体12(C-X-C motif chemokine ligand 12;Cxcl12), 转录变体 1, 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA 1,880 bp NM_022177.3 GI: 7649650
- [0252] 56-FAM/TCA ACA CTC /ZEN/CAA ACT GTG CCC TTC A/3IABkFQ
- [0253] GAG CCA ACG TCA AAC ATC TG
- [0254] GGC TTT GTC CAG GTA CTC TTG
- [0255] 3.)C-X-C基序趋化因子受体4(C-X-C motif chemokine receptor 4;Cxcr4), 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA 1,726 bp NM_022205.3 GI: 82617587
- [0256] 56-FAM/CAA TGC TCG /ZEN/CTC TCC AGC CCT /3IABkFQ
- [0257] CGT TTG GTG CTC CGG TAG
- [0258] TCT CCA GAC CCT ACT TCT TCG
- [0259] 4.)整联蛋白亚基 $\alpha 4$ (Integrin subunit alpha 4;Itga4), 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA 3,736 bp NM_001107737.1 GI: 157819948
- [0260] 56-FAM/CGA AGG ACG /ZEN/TCA AAT CAG CCA GTC A/3IABkFQ
- [0261] GCA TCT CCT CTA CAT ACT CAC AG
- [0262] CAC CAA CCG CTA CAT CAA CA
- [0263] 5.)CD34, 褐鼠(*Rattus norvegicus*): CD34分子(Cd34), mRNA 1,161 bp NM_001107202.2 GI: 169790781
- [0264] 56-FAM/TCC CTG GAA /ZEN/GTA CCA GCC ACT ACT /3IABkFQ
- [0265] GGA GTA TTT CCA CCA GTT CCT AC
- [0266] GAT GGC TGG TGT GGT CTT ATT
- [0267] 6.)骨形成蛋白4(Bone morphogenetic protein-4;BMP4), 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA 1,559 bp NM_012827.2 GI: 148747215
- [0268] 56-FAM/CCT TGT TTT /ZEN/CTG TCA AGA CAC CAT GAT TCC /3IABkFQ
- [0269] ATA AAA CGA CCA TCA GCA TTC G
- [0270] GCC TTT CCA GCA AGT TTG TTC
- [0271] 7.)骨形成蛋白7(Bone morphogenetic protein-7;BMP7), 褐鼠(*Rattus norvegicus*): mRNA 2,448 bp NM_001191856.2 GI: 683523995

[0272] 56-FAM/TGC GAT GAT /ZEN/CCA GTC CTG CCA G/3IABkFQ

[0273] CGT TCA TGT AGG AGT TCA GAG G

[0274] CTG TAT GTT AGC TTC CGA GAC C

[0275] 将作为管家基因的核糖体磷蛋白大亚基P0 (Rp1P0) 与目标基因的mRNA的表达量 (Ct值) 之差 (样本两次检查的平均、12周龄和18周龄各1只) 和对照 (12周龄、无棕榈酸给药) 的情况下的Rp1P0与目标基因的mRNA的表达量之差进行比较, 将它们的差转换为基因表达比 (倍率), 进一步对该倍率进行log2转换, 并示于图上 (参考图14)。

[0276] 如图14所示, 与仅埋入薄膜相比, 确认到对骨形成重要的BMP4和BMP7的升高。

[0277] 实施例A12: 皮下给药后的组织中的基因表达的变化

[0278] 接着, 确认了组织中的基因表达的变化。在12周龄Wistar大鼠 (雄性) 背部从头部至尾部设定3个区域, 进而将各区域在椎骨的左右分为2个区域, 由此在背部设定合计6个区域。在各区域的中央附近对各2处注射20 μ L/一处的乳或棕榈酸。需要说明的是, 上述2处间的距离设定为1cm。

[0279] 将采集的组织片用液氮进行冷冻, 在-80℃下保存。从被保存的组织片中如下进行总RNA的纯化和提取: 将25mg的组织片与5个不锈钢珠 (直径3mm) 一起封入样品管中, 使用RNeasy Mini试剂盒 (QIAGEN GmbH、希尔登、德国) 和Tissue Lyser II (QIAGEN GmbH、希尔登、德国) 将组织片制成匀浆后, 按照试剂盒附带的操作规程, 利用离心柱进行总RNA的纯化和提取。关于利用定量PCR进行的基因表达分析, 委托Integrated DNA Technologies, Inc (斯科基、IL、USA) 进行基因特异性引物和探针的设计和合成, 利用PrimeTime基因表达预混试剂 (Integrated DNA Technologies, Inc、斯科基、IL、USA) 和Rotor-Gene Q PCR装置 (QIAGEN GmbH、希尔登、德国), 每一个样本的每一基因实施两次PCR分析, 分析对象基因的表达量。将作为管家基因的核糖体磷蛋白大亚基P0 (Rp1P0) 与目标基因的mRNA的表达量 (Ct值) 之差 (各样本两次检查的3只平均) 和对照 (无棕榈酸或乳的给药) 的情况下的Rp1P0与目标基因的mRNA的表达量之差进行比较, 将它们的差转换为基因表达比 (倍率), 进一步对该倍率进行log2转换, 并示于图上。

[0280] 结果如图15所示。如图15所示可知, 在棕榈酸给药和乳给药的任意一种情况下, 组织中的Cxc112、Cxcr4和Itga4的表达量均大幅增加。Itga4和Cxcr4是在骨髓细胞中确认到的标志物, 其在组织中进行表达这一点表明, 来源于骨髓的细胞被募集到组织中。Cxc112在组织中进行表达这一点还表明, 接受这些来源于骨髓的细胞的机制同时做好了准备。此外, 如图15所示, 同时还确认到CD34的增加。考虑在骨髓前体细胞和巨噬细胞存在下脂肪细胞被诱导的可能性。

[0281] 文献清单

[0282] 野吕未来等, 电泳, 59: 21-24, 2015

[0283] Satoh T. et al., Nature: 495, 524-528, 2013

[0284] Festa E et al., Cell, 146: 761-71, 2011

[0285] M. Yag, et al., Journal of Oral Science, 50: 419-425, 2008

[0286] Odegaard J I, et al., Nature, 447: 1116-1121, 2007

[0287] Hotamisligil G. S., Nature, 542: 177-185, 2017

[0288] Croadell A. et al., PPAR Research, ID 549691, 2015

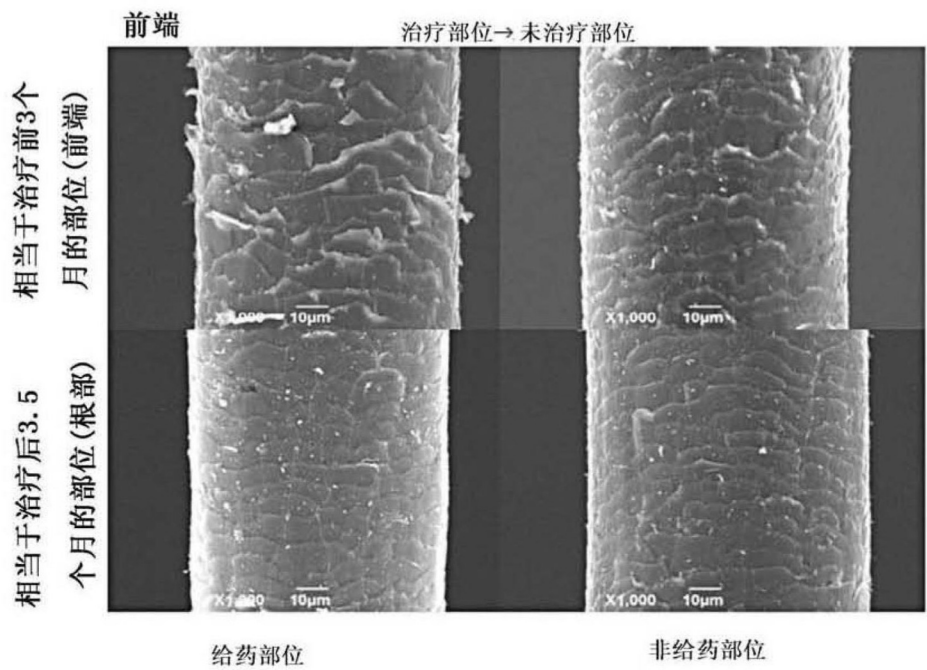


图1

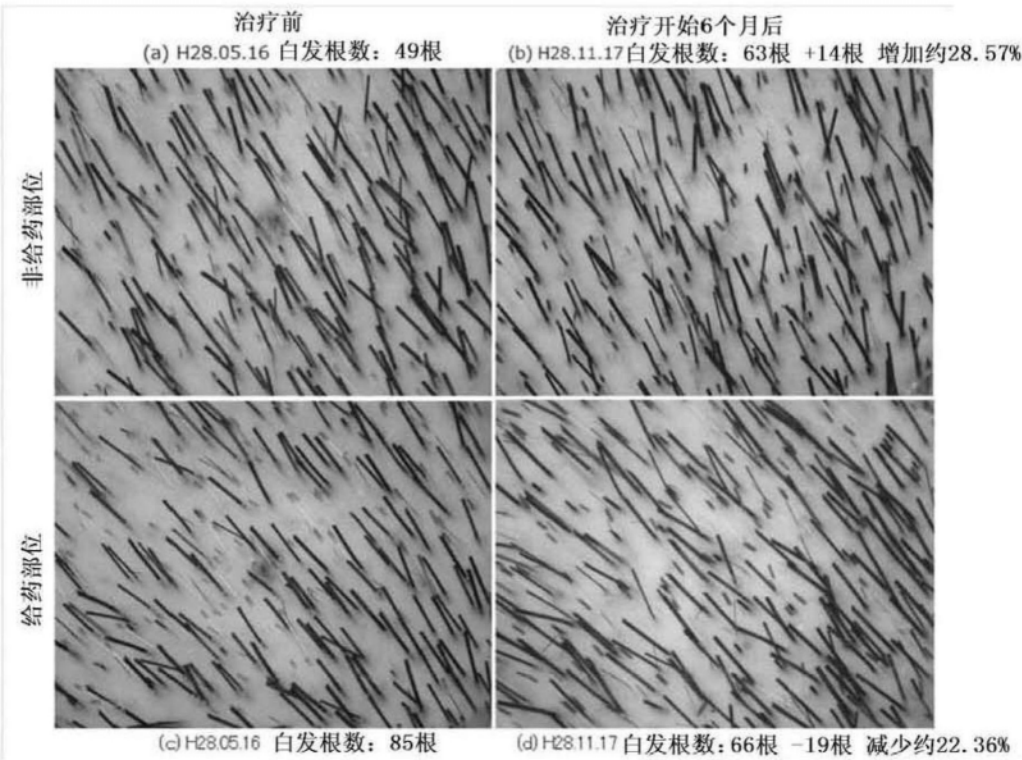


图2A

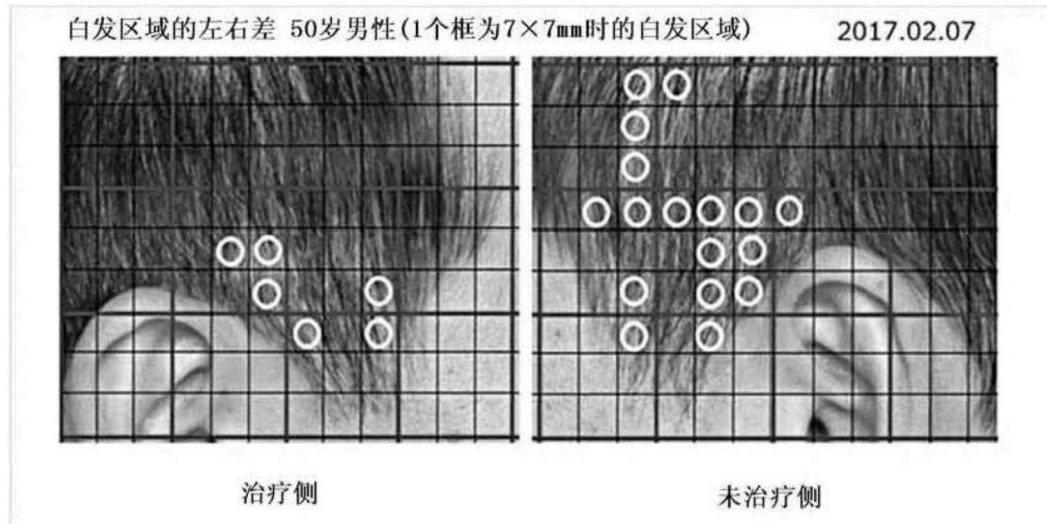


图2B

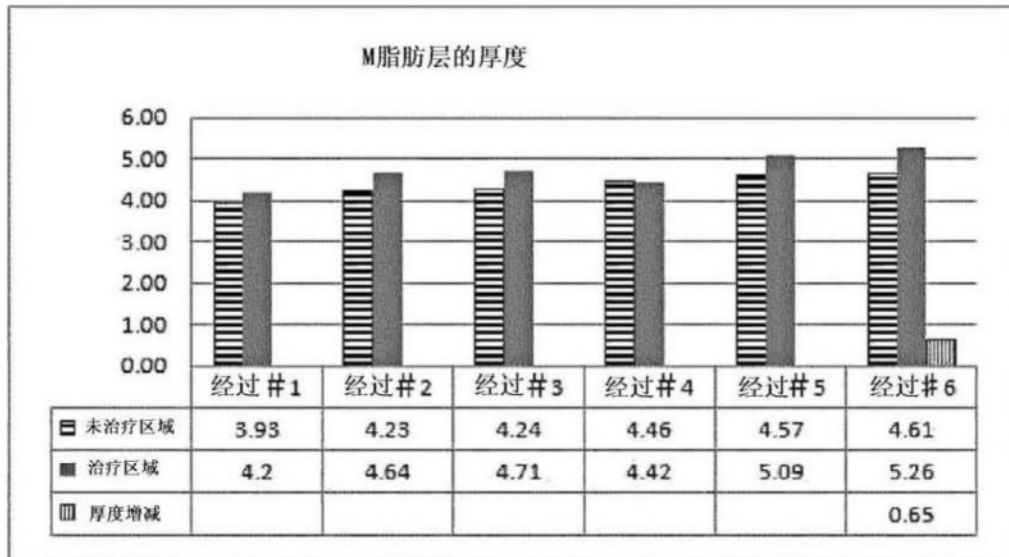


图3

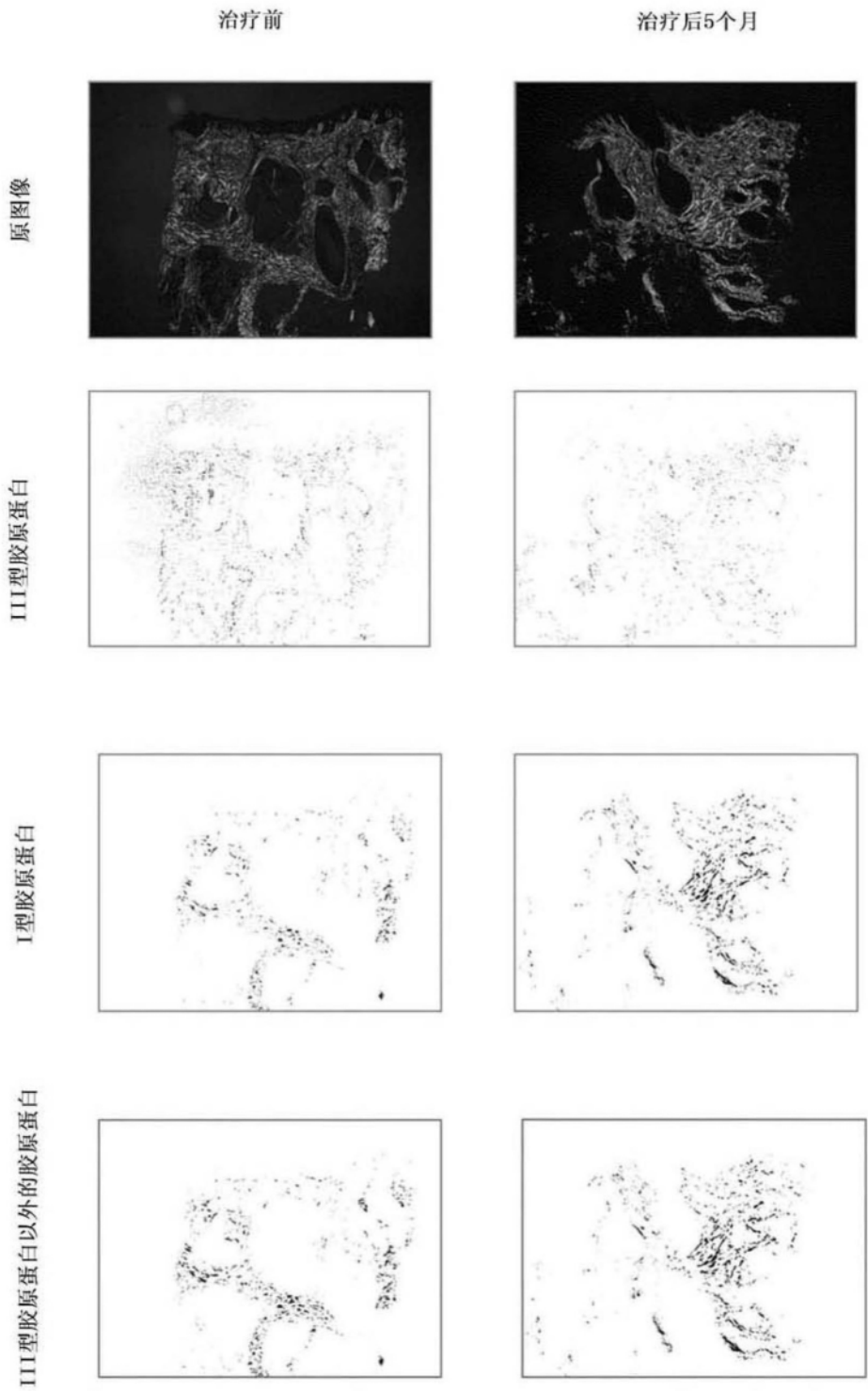


图4A

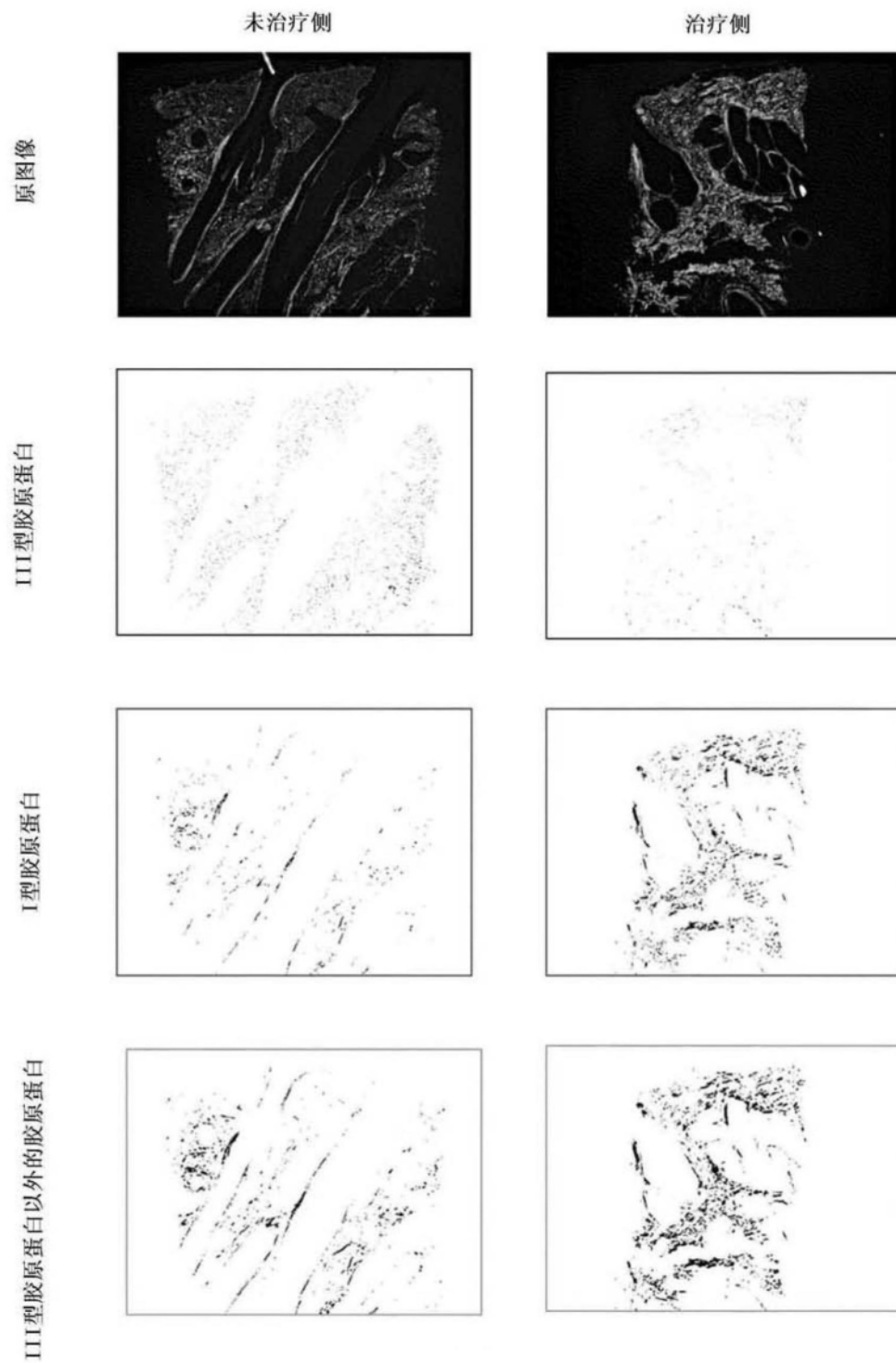


图4B

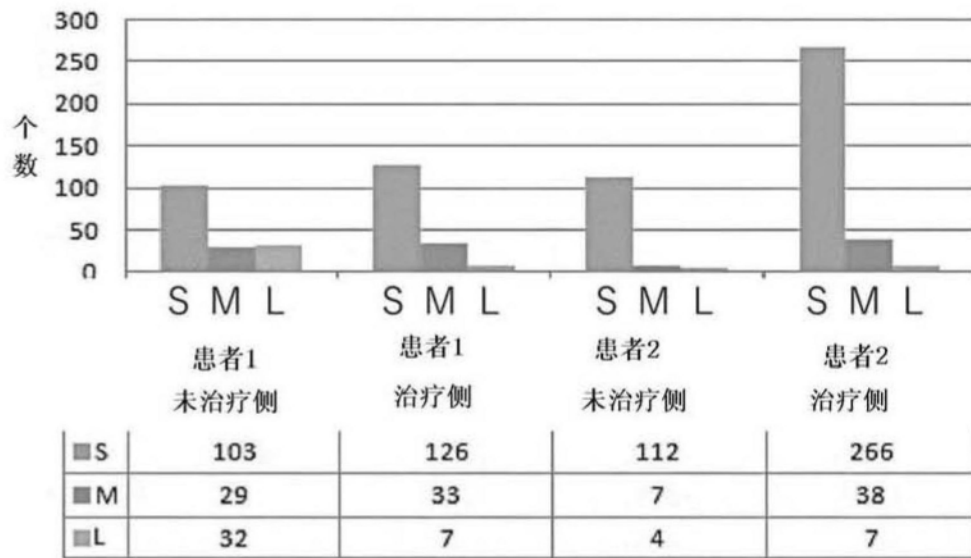


图5

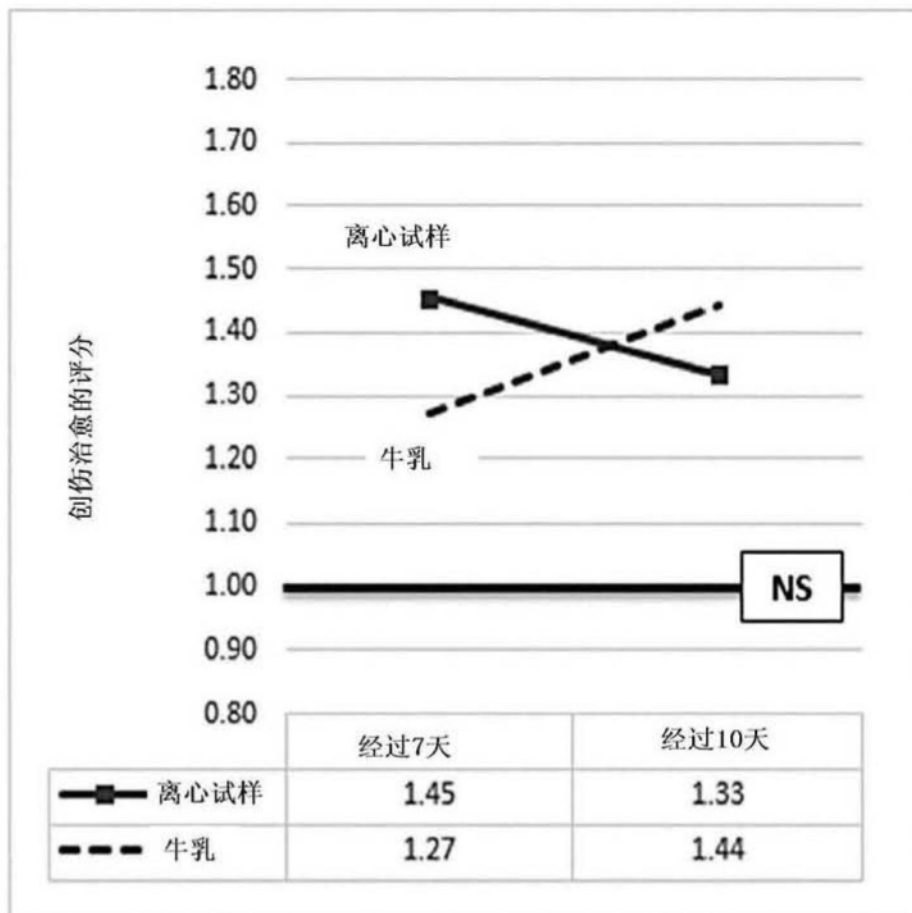


图6A

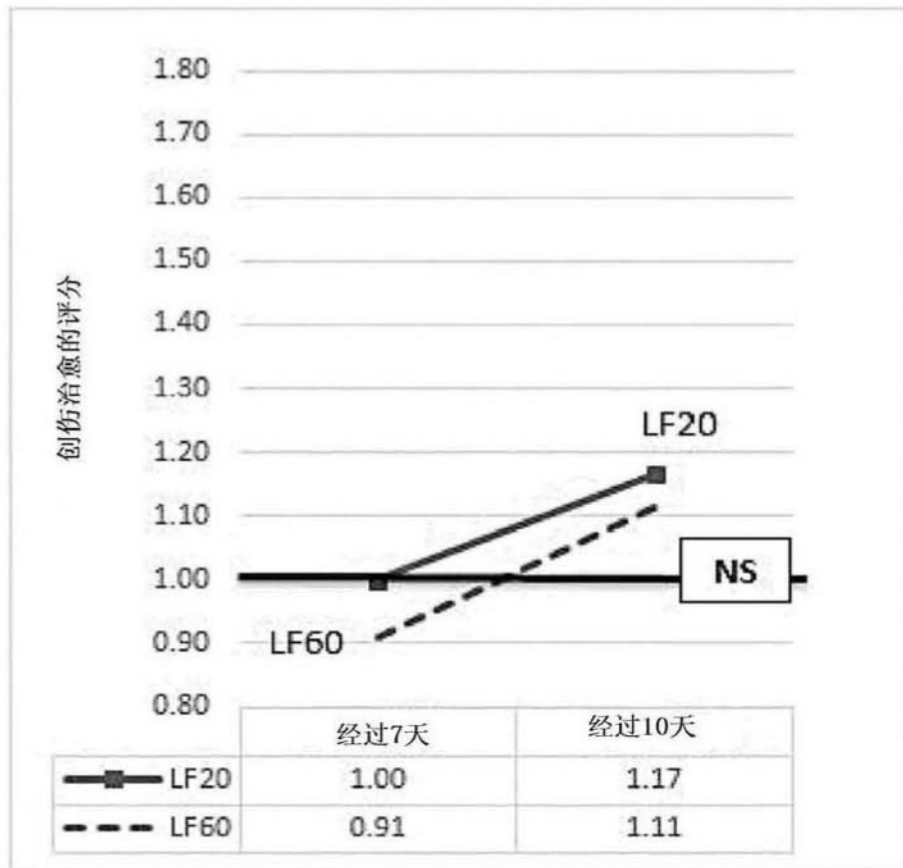


图6B

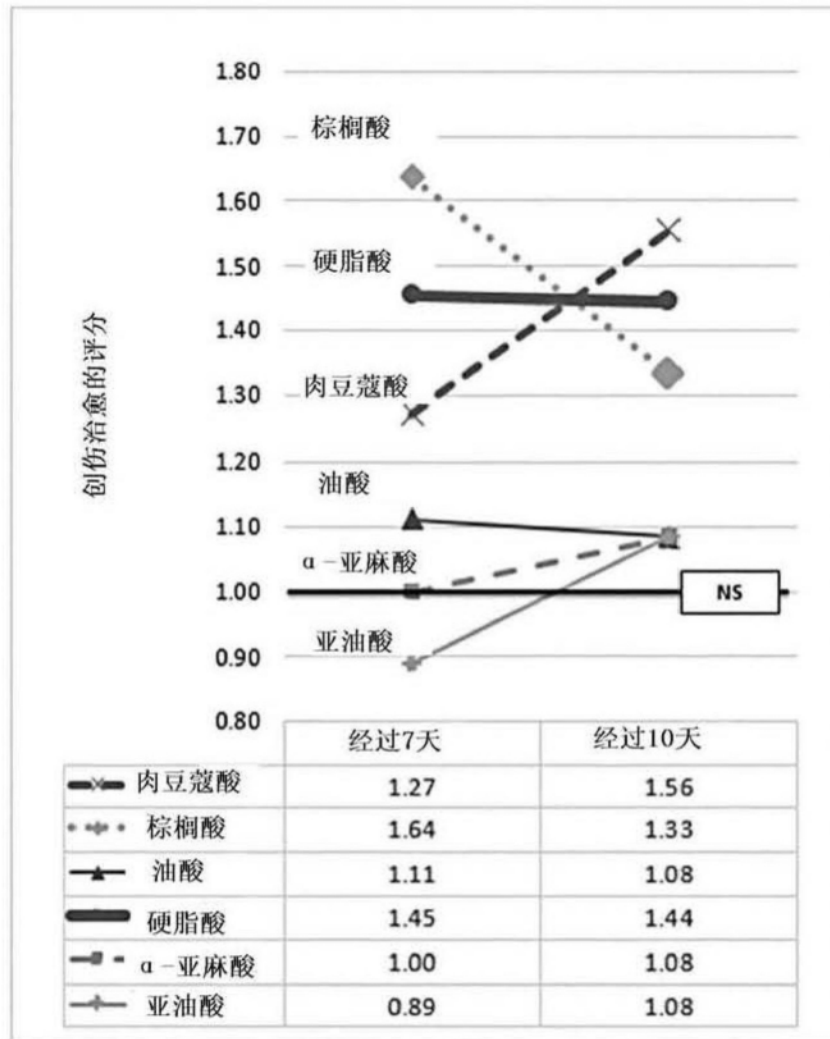


图6C

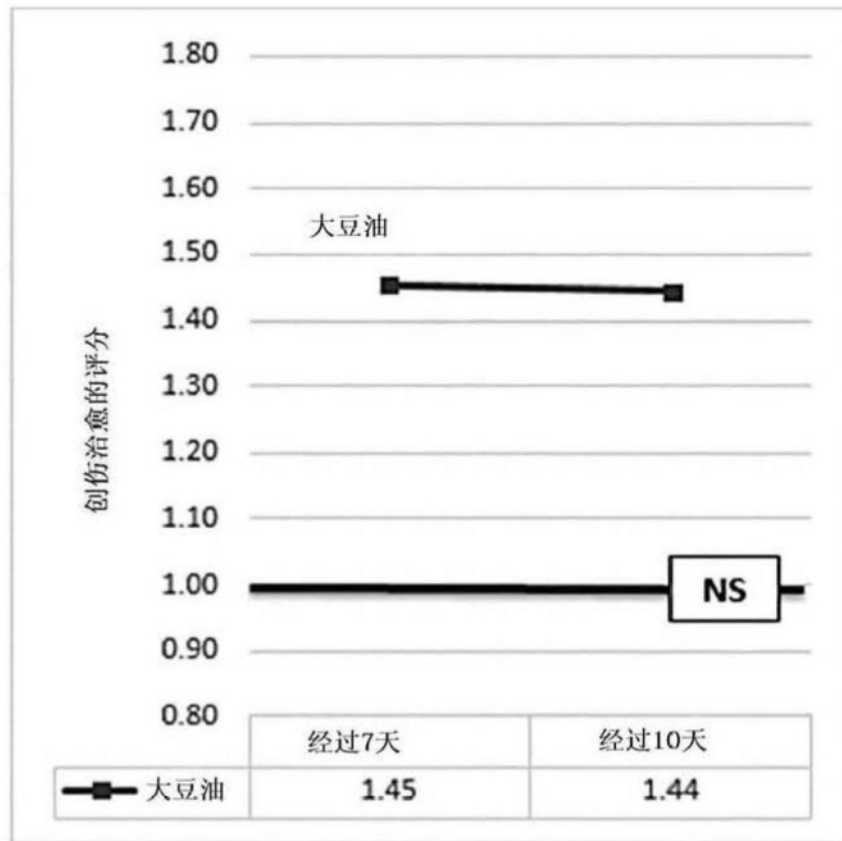


图6D

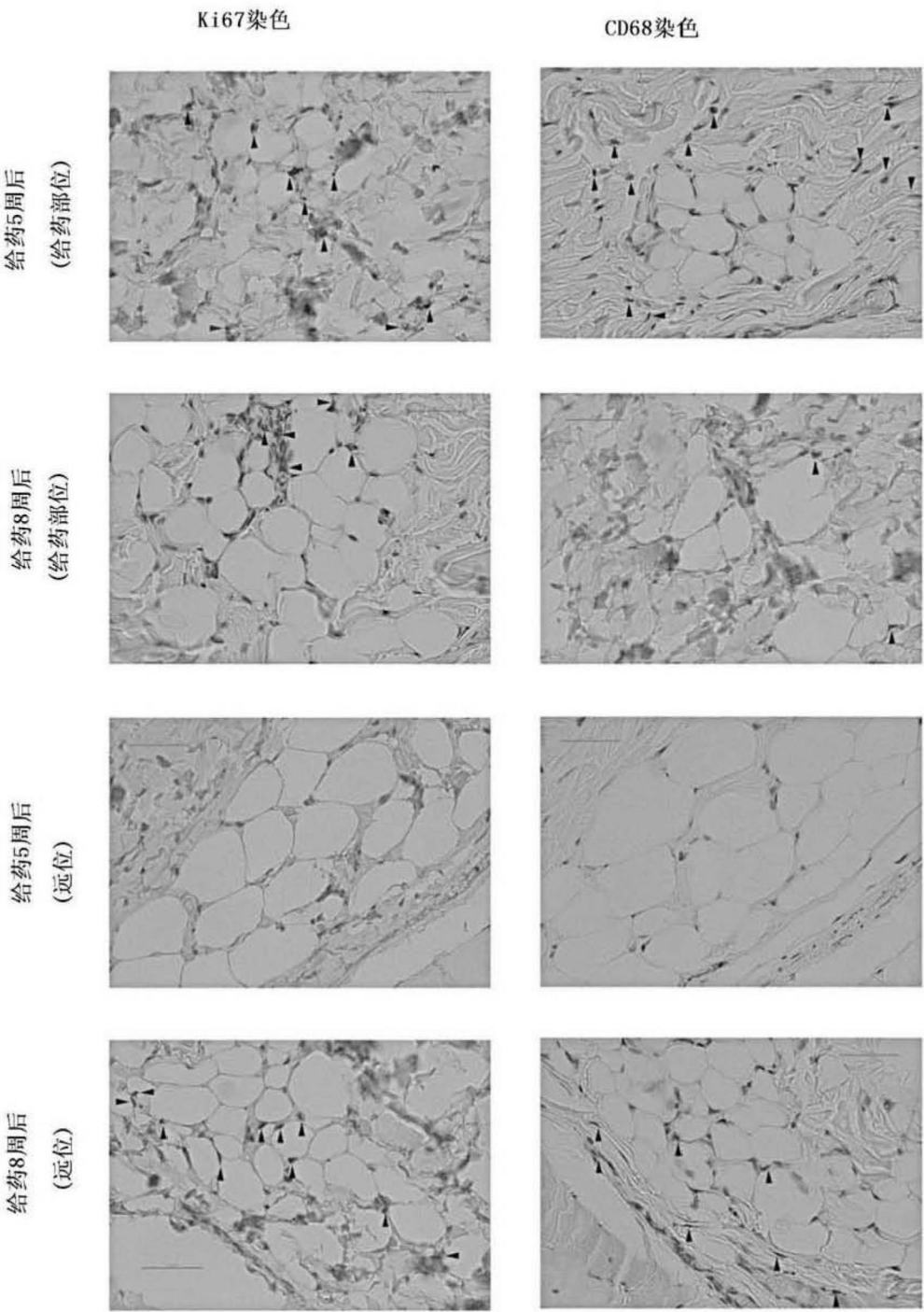


图7

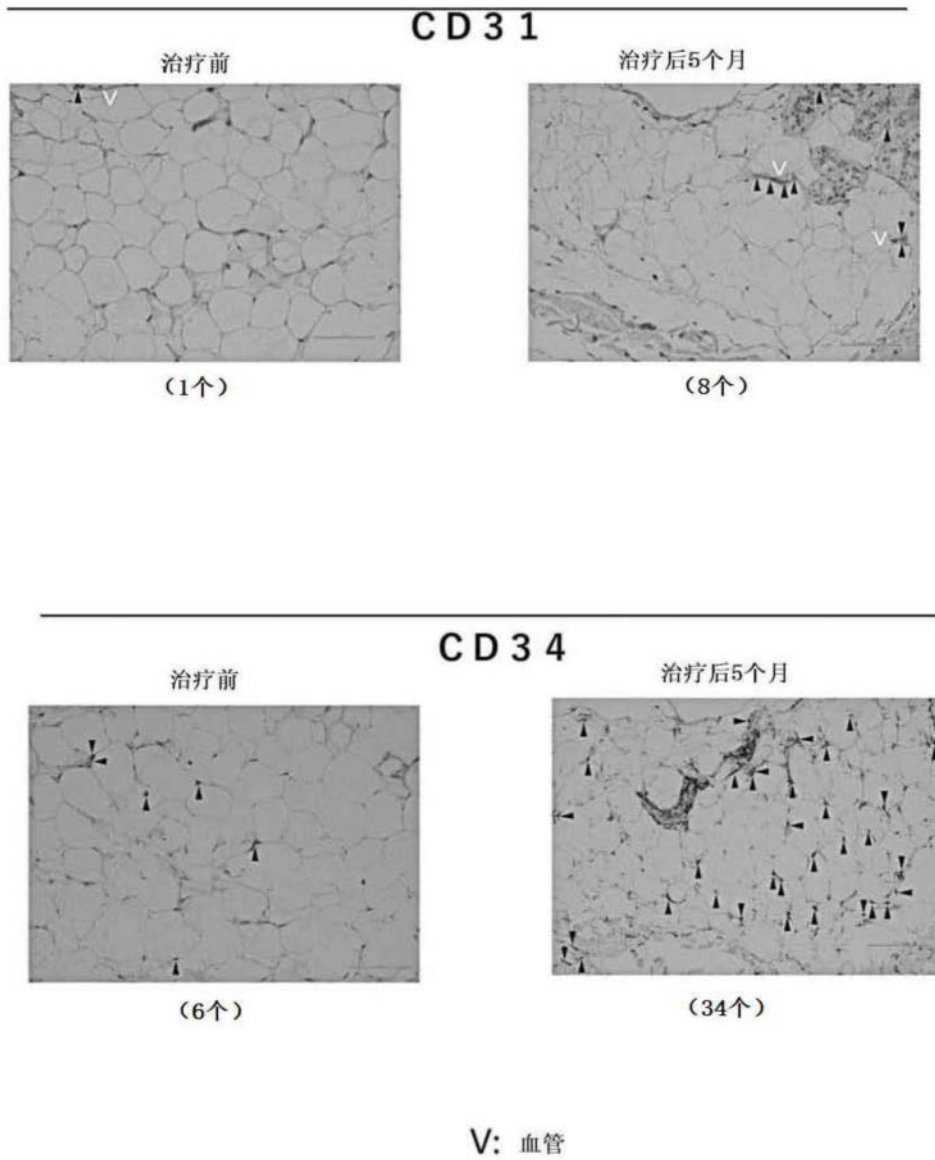


图8A

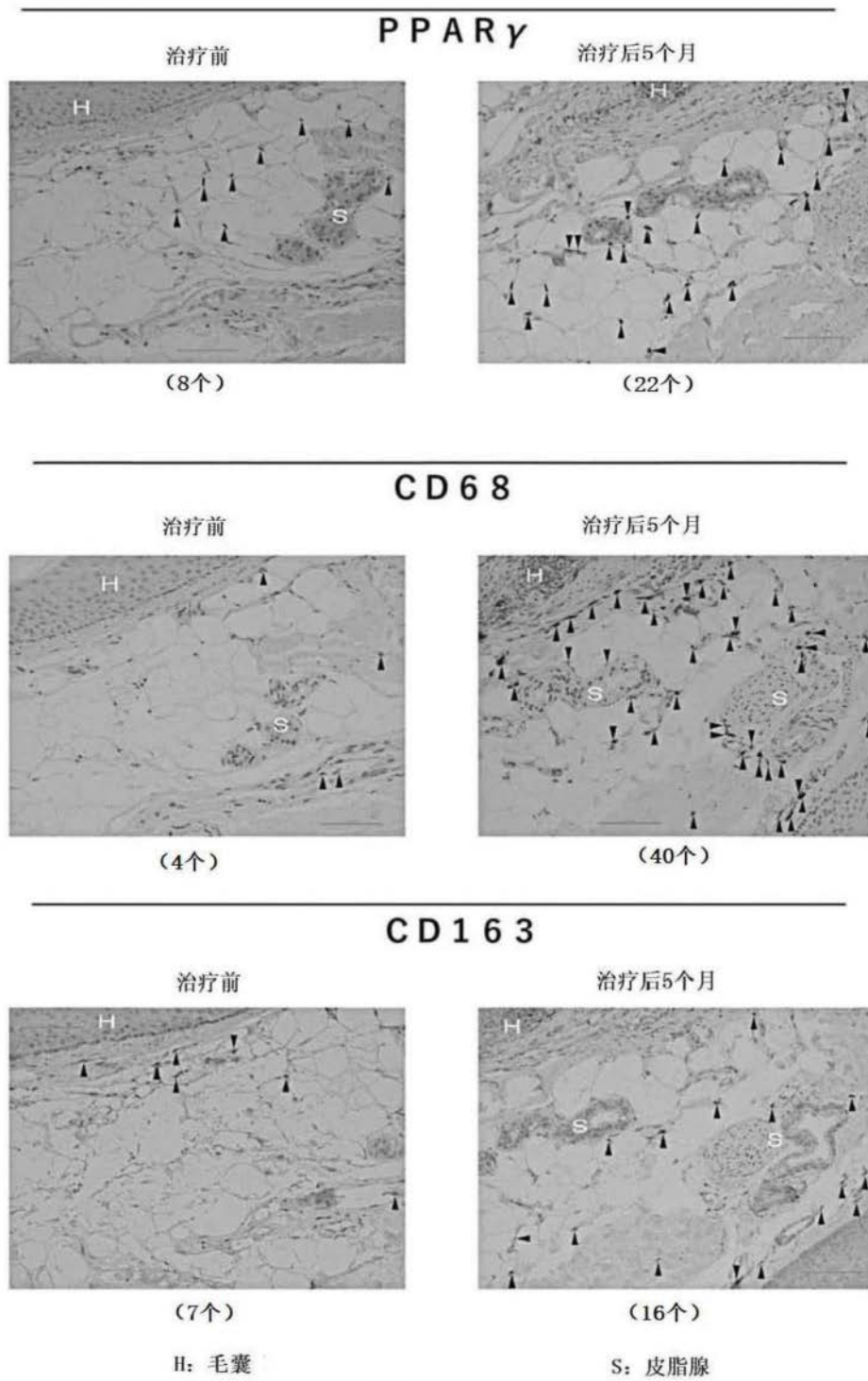


图8B

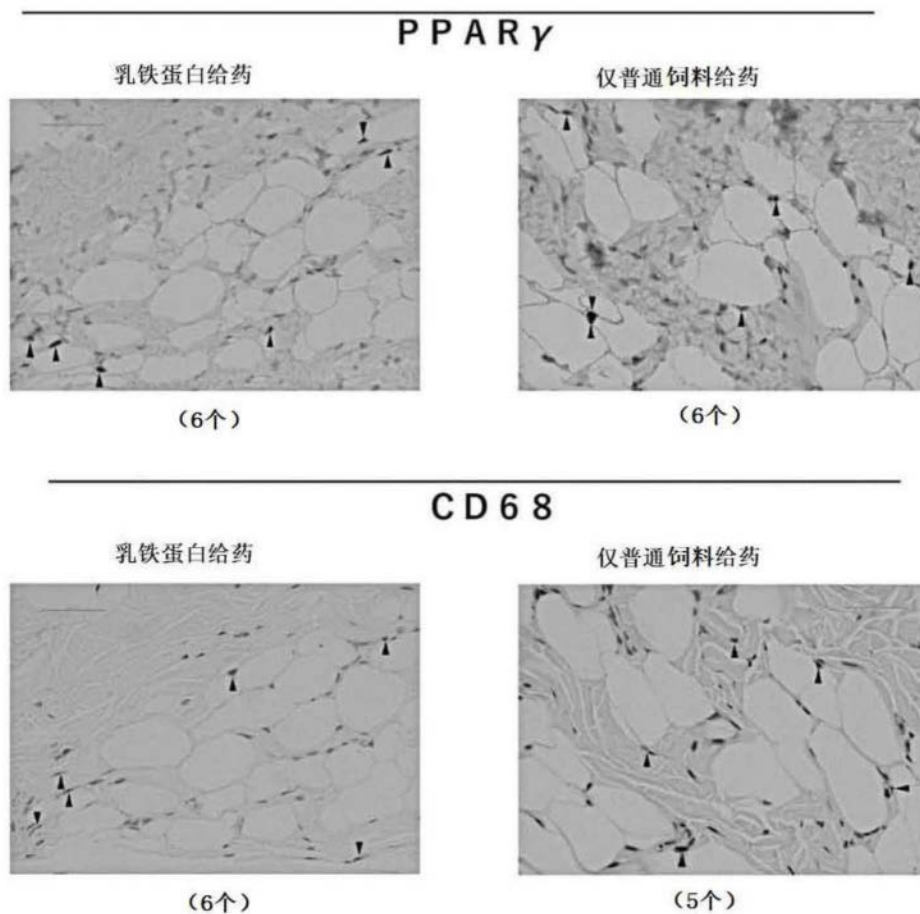


图9

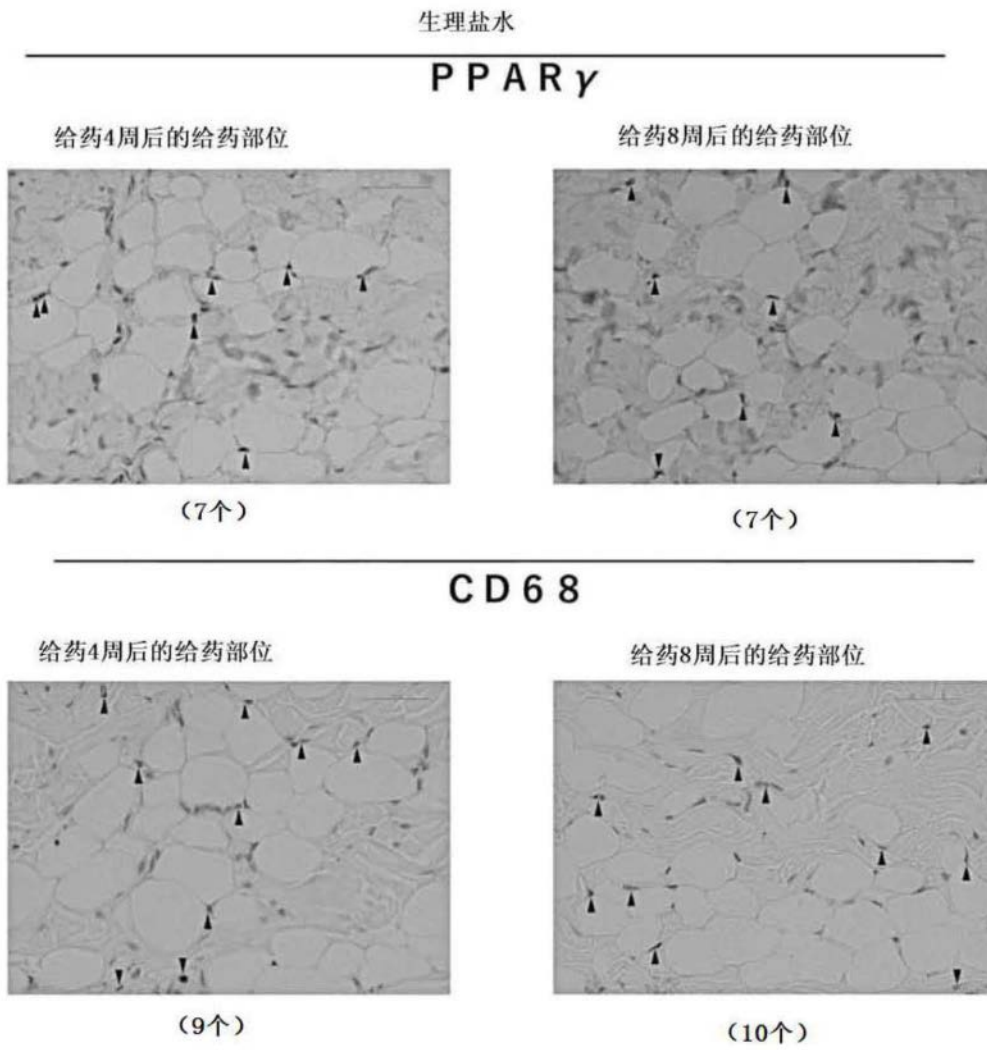


图10A

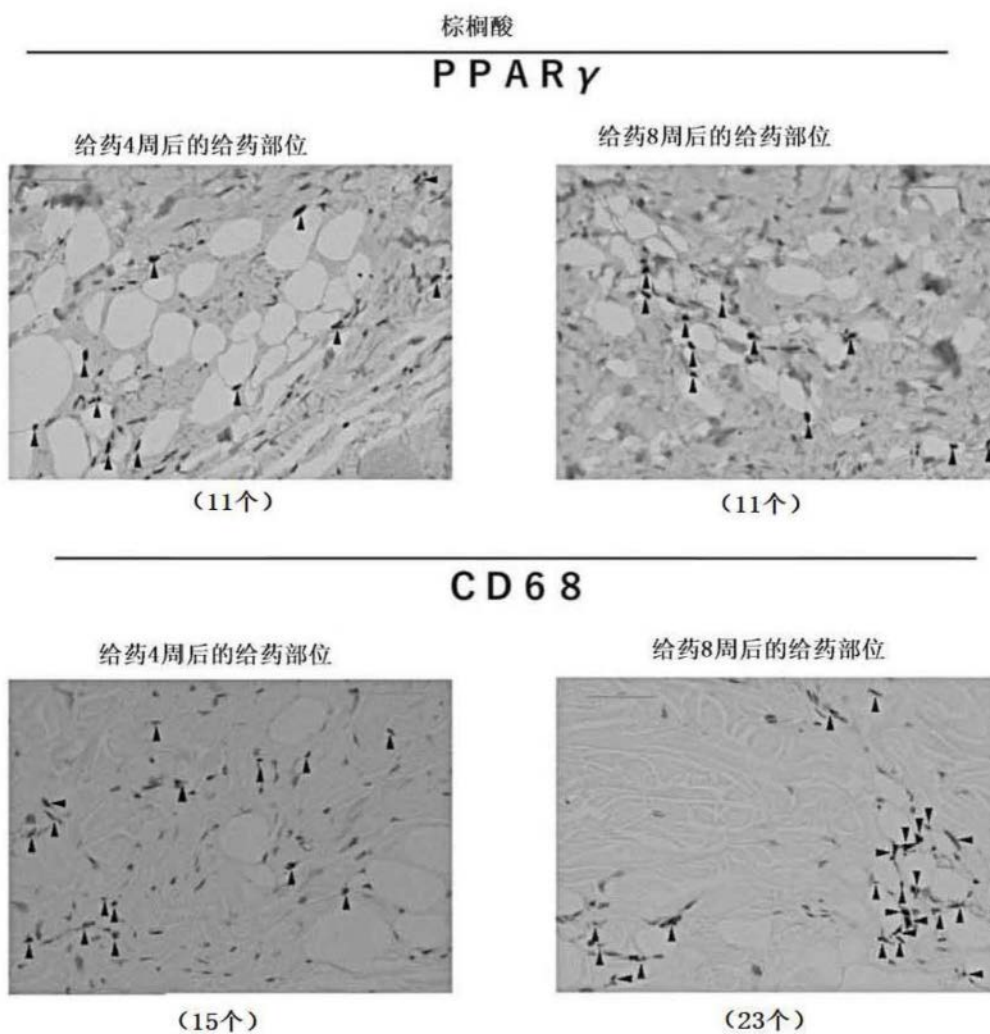


图10B

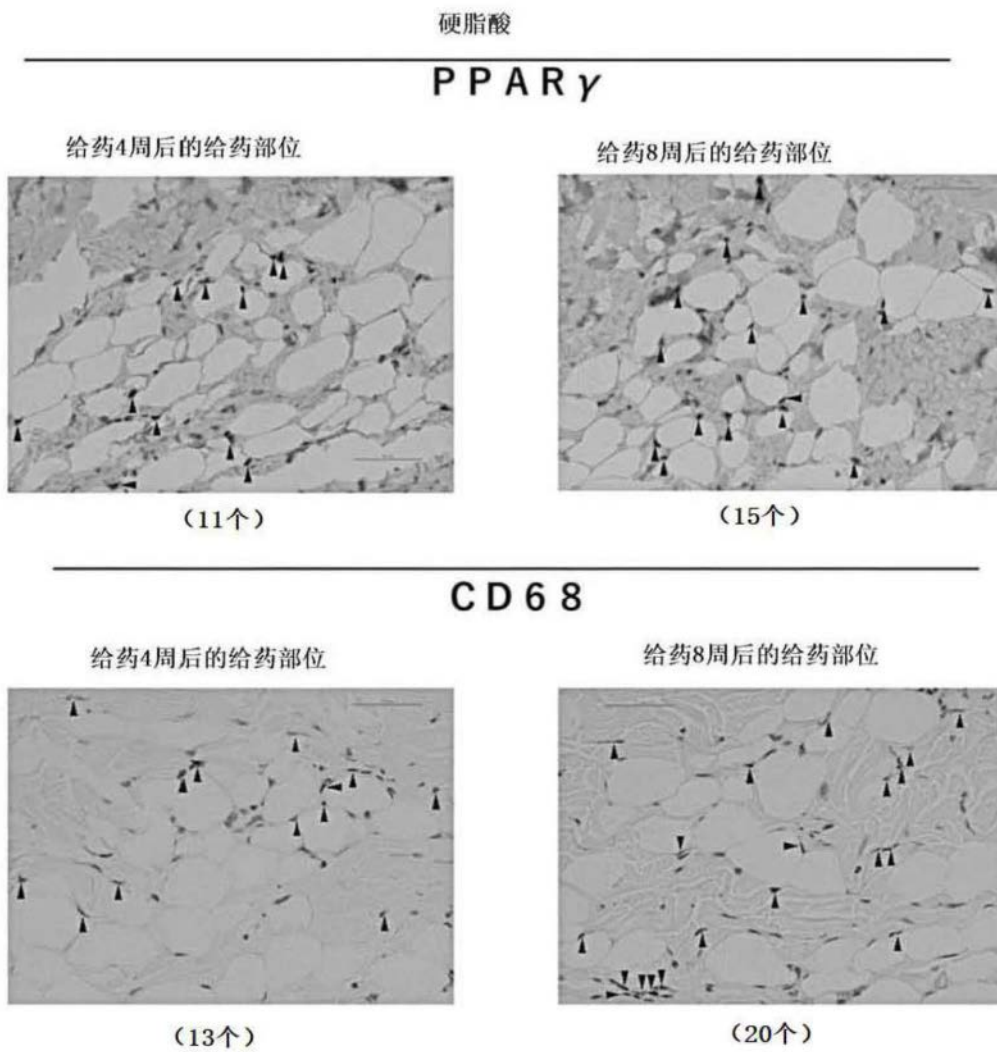


图10C

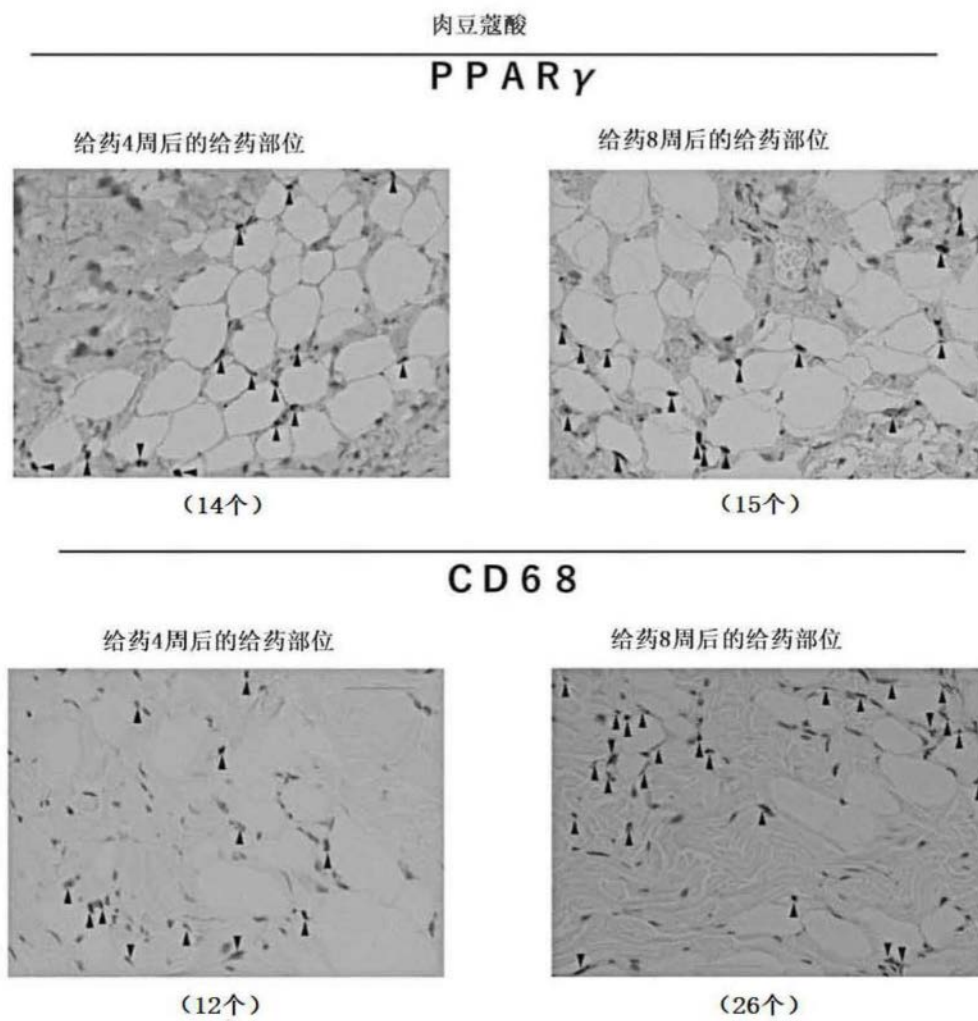


图10D

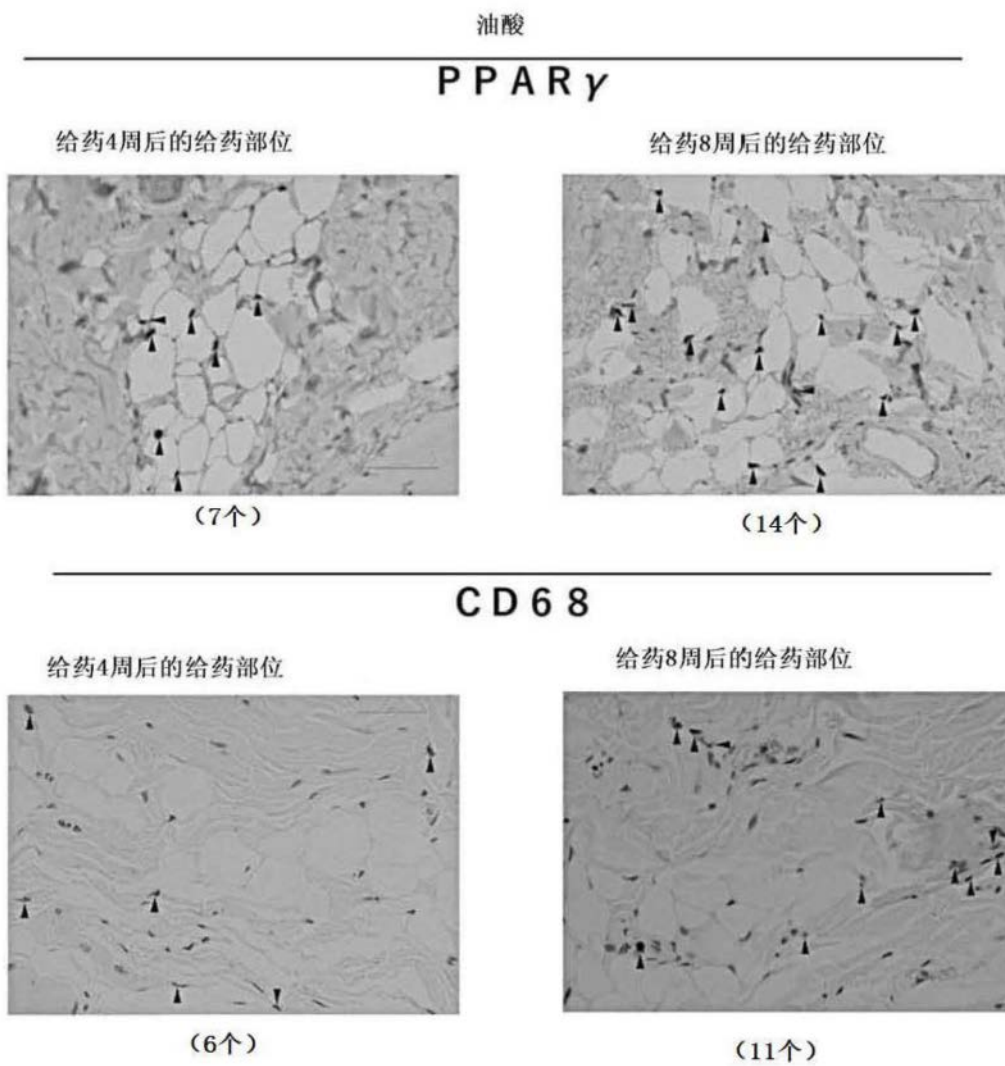


图10E

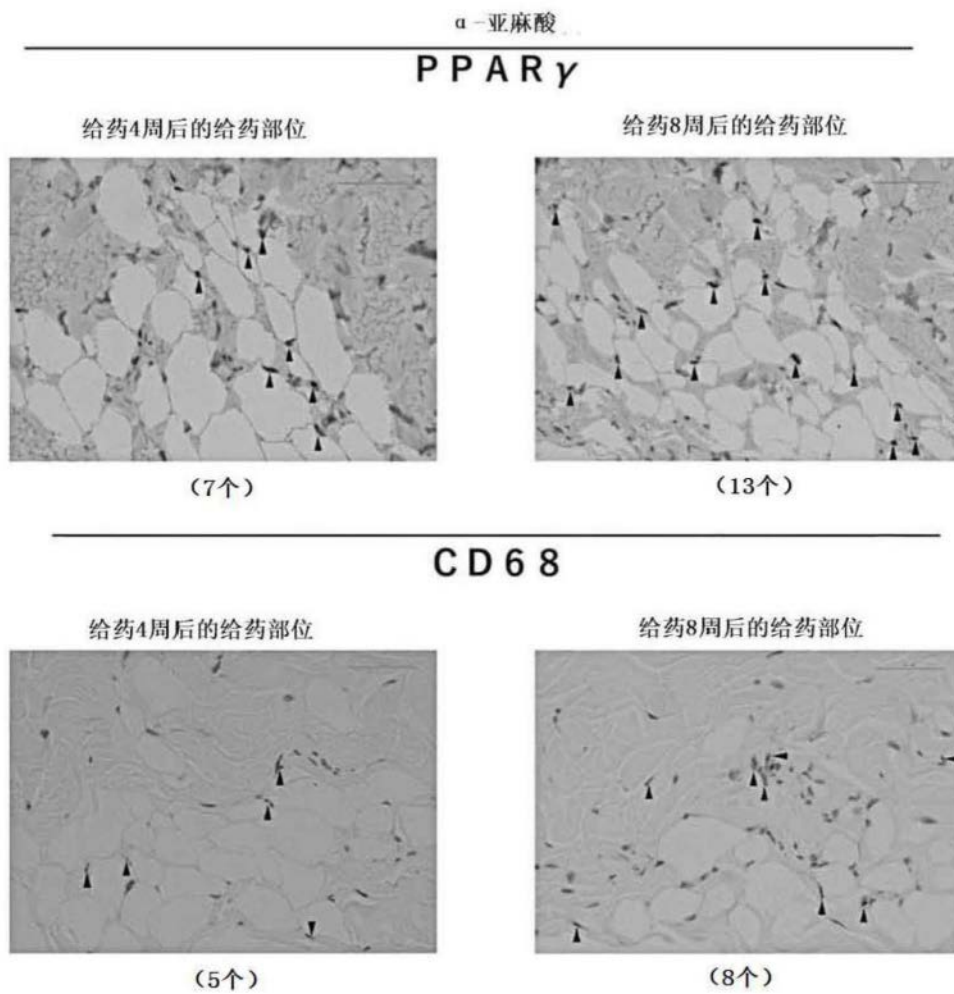


图10F

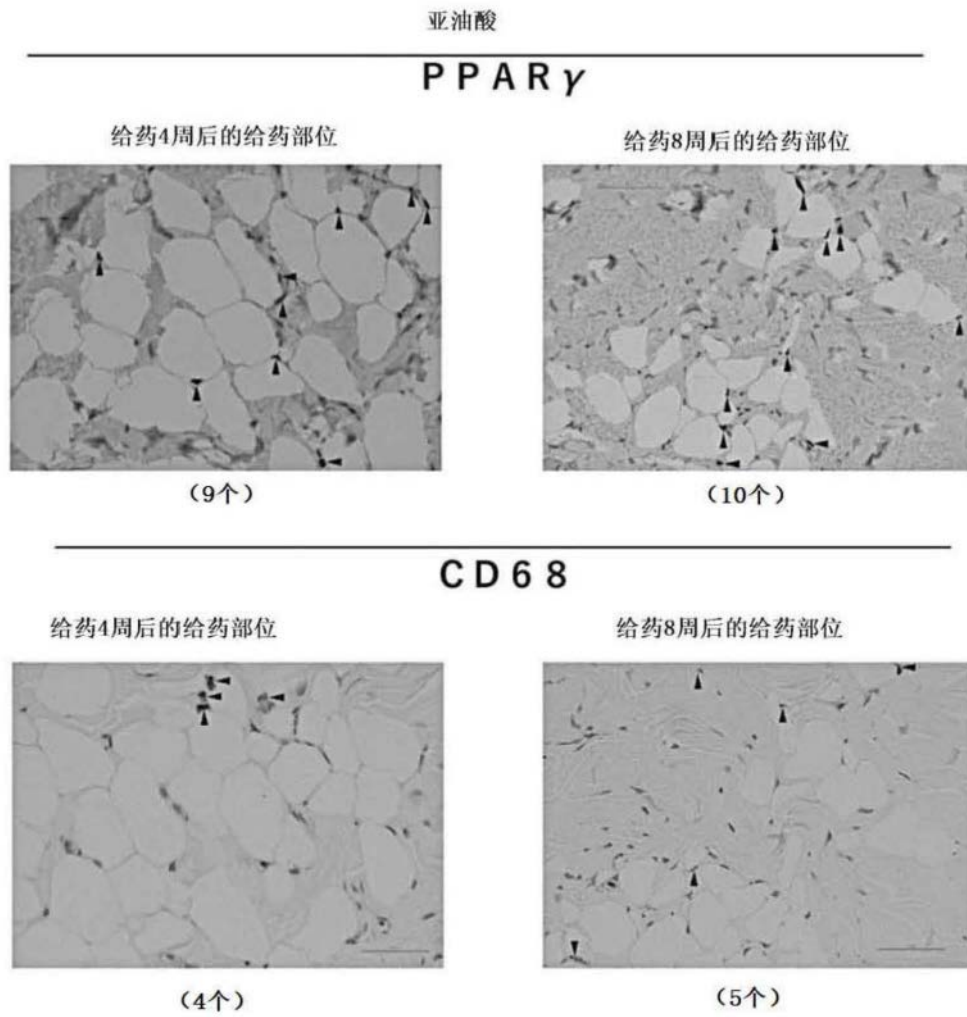


图10G

长度测量例(治疗经过比较)

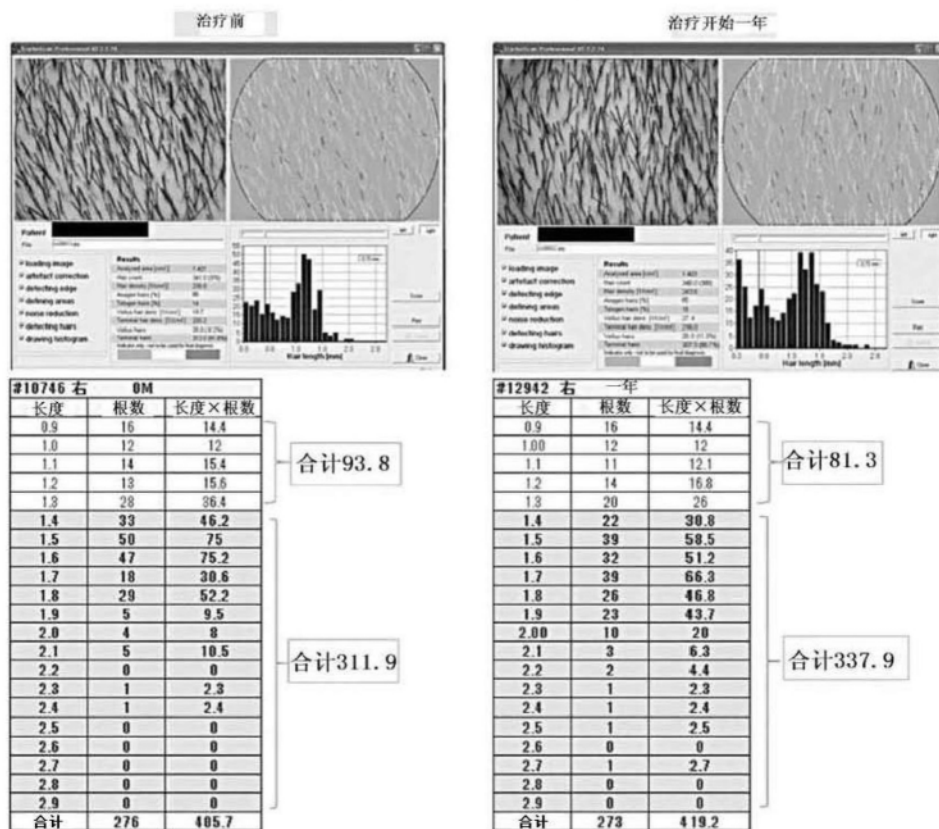


图11A

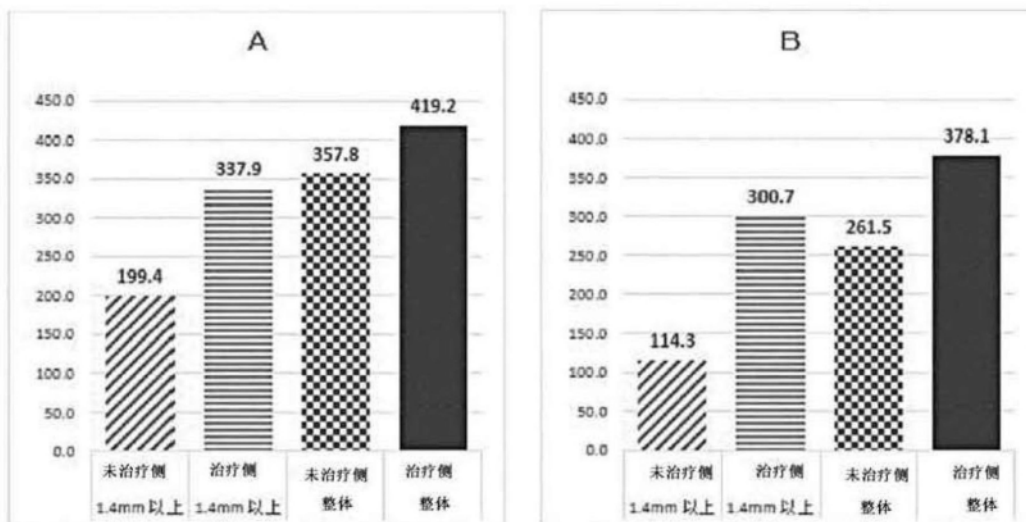


图11B

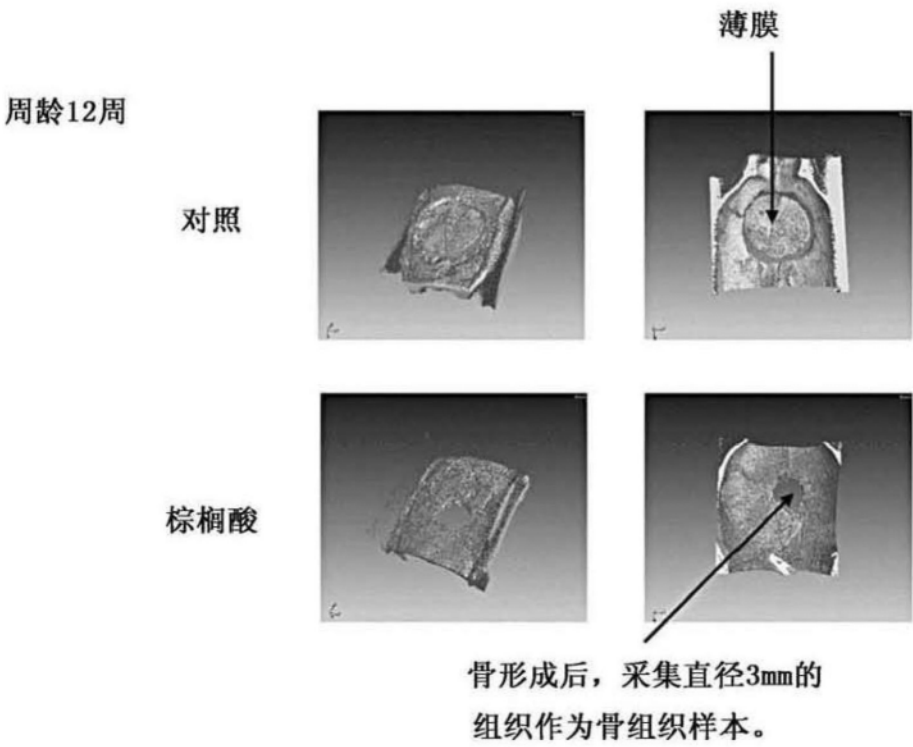


图12

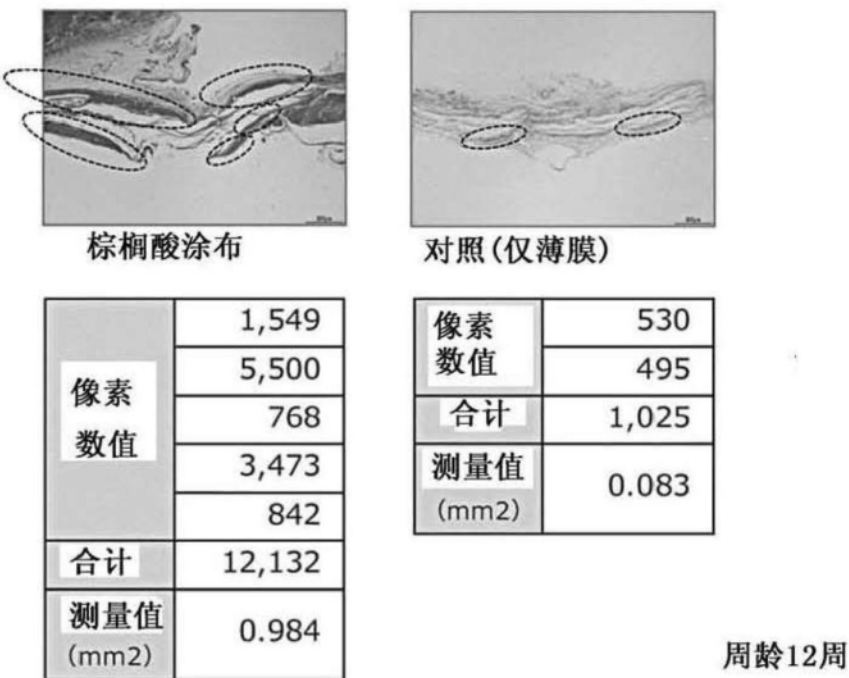


图13

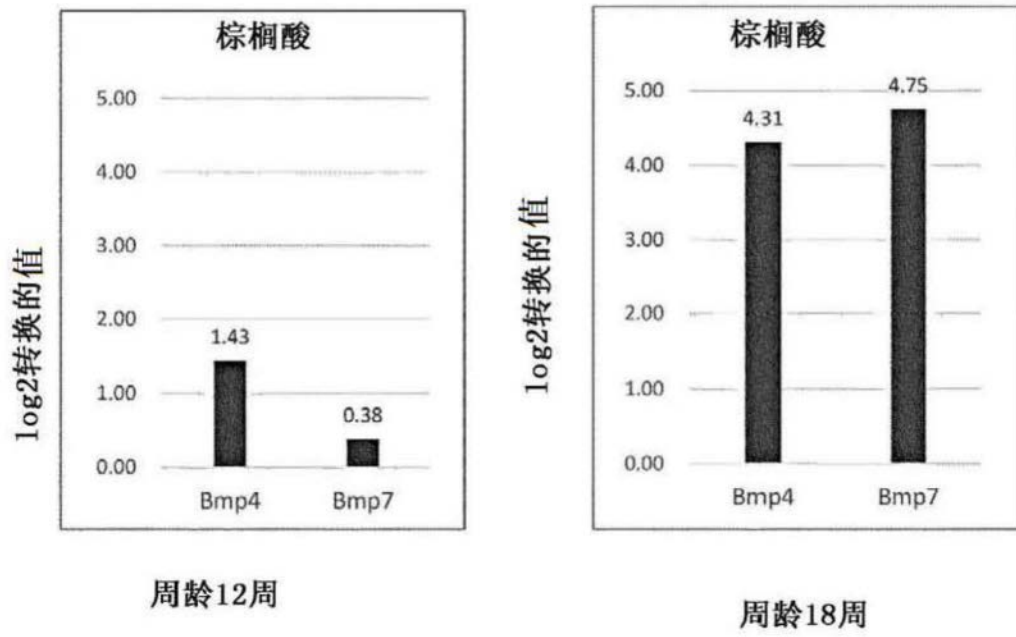


图14

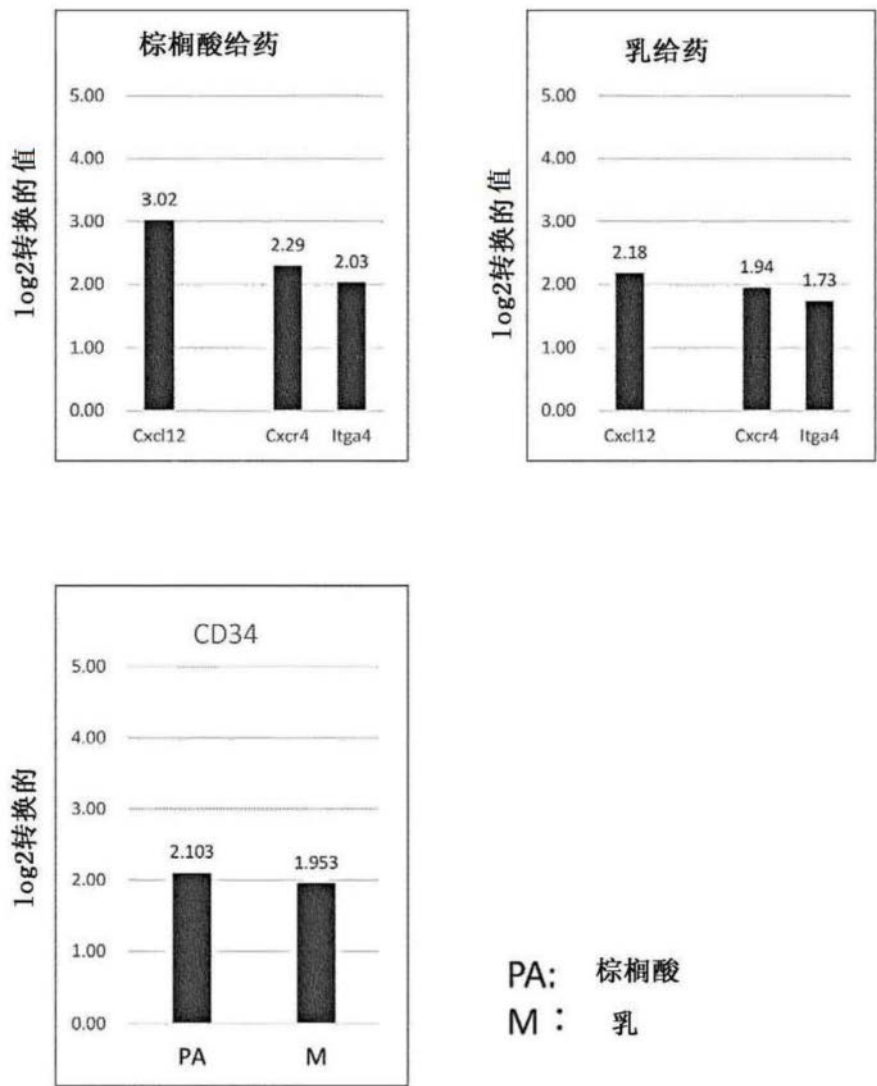


图15