

發明專利說明書 200522937

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93138990

※申請日期：93 年 12 月 15 日

※IPC 分類：A61K31/21

一、發明名稱：

(中) 促進動物細胞增殖用劑油脂組成物、含有此組成物之動物細胞培養用培養基、及皮膚外用劑組成物

(英)

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 出光興產股份有限公司

(英) IDEMITSU KOSAN CO., LTD.

代表人：(中) 1. 富永一途

(英) 1. TOMINAGA, KAZUTO

地 址：(中) 日本國東京都千代田區丸之內三丁目一番一號

(英) 1-1, Marunouchi 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中英) 日本 JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

1. 姓 名：(中) 島內敏次

(英) SHIMAUCHI, TOSHITSUGU

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

2. 姓 名：(中) 中島壽昭

(英) NAKAJIMA, TOSHIAKI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

3. 姓 名：(中) 近藤彰宏

(英) KONDO, AKIHIRO

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

4. 姓 名：(中) 冷牟田修一

國 籍：(英) HIYAMUTA, SHUICHI
(中) 日本
(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

- | | | | |
|-------|--------------|---------------|--|
| 1. 日本 | ； 2003/12/17 | ； 2003-419615 | ☒ 有主張優先權 |
| 2. 日本 | ； 2003/12/17 | ； 2003-419616 | ☒ 有主張優先權 |

國 籍：(英) HIYAMUTA, SHUICHI
(中) 日本
(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

- | | | | |
|-------|--------------|---------------|--|
| 1. 日本 | ； 2003/12/17 | ； 2003-419615 | ☒ 有主張優先權 |
| 2. 日本 | ； 2003/12/17 | ； 2003-419616 | ☒ 有主張優先權 |

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於含具有促進動物細胞增殖能力之 γ -亞麻酸（以下簡稱為GLA）或 γ -亞麻酸甘油酯之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，及由此油脂組成物所形成之動物細胞培養用培養基。

另外，本發明係關於含具有促進動物細胞增殖能力之 γ -亞麻酸或 γ -亞麻酸甘油酯之油脂組成物為有效成份之皮膚外用劑組成物。

【先前技術】

近年來，顯示隨著分子生物學發展，動物細胞培養之必要性明顯地增加。動物細胞培養技術係廣泛地使用於細胞融合、單株抗體之製造及疫苗之製造等，不僅於研究，作為疾病治療藥製造之先端技術，社會上亦強烈地要求該發展之生物技術。

動物細胞係無法於僅含胺基酸、糖分及鹽類等營養成份之培養基中增殖，為使動物細胞增殖，單純的營養成份以外之細胞增殖用劑之存在係必要的。

傳統上，作為如此細胞增殖用劑，使用牛胎兒血清等各種血清。然而，血清中存在多數個細胞增殖因子，而且現階段該因子多為未知成份，亦無法測定該因子含量。因此，使用上述血清為動物細胞用培養基時，隨著各個培養基而有細胞增殖活性不齊之問題。另外，血清細胞增殖因

子活性係依所採取動物個體差異而有變動，亦有血清品質不穩定之問題。

另一方面，除了上述血清以外，亦開發各種促進動物細胞增殖用劑。開發例如 5-胺基果糖酸 (aminolevulinic acid) (例如參考專利文獻 1)、根黴 (Rhizopus) 屬產生物質 (RU 物質) (例如參考專利文獻 2)、5-羥基-2,7-二甲氧基-6-甲基-1,4-萘醌 (例如參考專利文獻 3)、御種紅蘿蔔萃取液 (例如參考專利文獻 4)、植物肝醣 (phytoglycogen) (纖維母細胞用) (例如參考專利文獻 5)、糖 (單糖、雙糖) 及脂肪酸之糖酯 (例如參考專利文獻 6) 等之促進動物細胞用劑。然而，此等之促進動物細胞用劑係有生產困難、生產成本高及品質不安定等問題，要求開發價廉且品質安定性優異之促進動物細胞增殖用劑。

另外，傳統之皮膚外用劑領域中，實施許多賦活化皮膚細胞，活化皮膚機能本身，顯示改善皮膚症狀或抗炎症效果或創傷治癒效果之研究。傳統上作為相關的皮膚外用劑，使用激素劑、維生素劑、 γ -谷維醇及皂角苷等之生藥萃取物、植物凝集素、菇類萃取物，進而來自動物之蛋白質等之各種物質。

此等物質中，作為具有改善皺紋等之皮膚老化症狀作用之物質或防止因陽光紫外線所引起皮膚老化或炎症作用之物質，已知 α -羥酸或松香油有效地修復皺紋。然而，因為 α -羥酸中顯示尤其有效作用之乙醇酸或乳酸等係

親油性，經皮吸收差，增加配合量時，顯示皮膚刺激等之不良副作用。另外，因松香油接觸空氣容易氧化，所以通常作為與脂肪酸之酯體使用，但此脂肪酸酯係脂溶性，所以難以配合於水溶性基材。

於治療創傷（外科之切開、腸胃管的傷口或潰瘍、剝離、裂傷、切斷、褥瘡、發炎及感染所引起的表面組織損傷）上，認為依賴細胞增殖及上皮組織形成，刺激或促進於創傷治癒過程所包含之細胞分化、增殖過程之藥劑係有效的。顯示創傷治癒效果之藥劑，亦嘗試使用作為有效成份之蘆薈等萃取物、抗生素、抗炎症劑、血管舒緩素、腺嘌呤、煙酸、尿囊素、維生素 A、鋅、cAMP 衍生物（例如參考專利文獻 7），以及上述之細胞成長因子（b-EGF）（例如參考專利文獻 8）。然而，上述有效成份有時不能得到充份的效果，生產困難，生產成本高，有效成份化學上不安定等之問題，要求價廉且品質安定性優異之具有改善皮膚症狀效果或治癒效果之皮膚外用劑。

專利文獻 1：特開平 5-49472 號公報

專利文獻 2：特開平 5-97685 號公報

專利文獻 3：特開平 5-137569 號公報

專利文獻 4：特開平 6-239759 號公報

專利文獻 5：特開平 11-255657 號公報

專利文獻 6：特開 2003-52366 號公報

專利文獻 7：特開昭 63-107935 號公報

專利文獻 8：特開平 3-106823 號公報

【發明內容】

發明之揭示

發明所欲解決之課題

本發明係有鑑於上述事實而實施者，係以提供價廉且品質安定性優異，具有促進動物細胞增殖能力之油脂組成物及含有此油脂組成物之動物細胞培養用培養基為目的者。

另外，本發明係以提供價廉且品質安定性優異之具有改善皮膚症狀效果或治癒效果之皮膚外用劑組成物為目的者。

課題之解決手段

本發明者等係為解決上述課題而重覆努力研究的結果係發現由含有具有促進動物細胞增殖能力之特定物質之油脂組成物，而達成上述目的。本發明係基於相關發現而完成者。

亦即，本發明係提供含三甘油酯、二甘油酯、單甘油酯及游離脂肪酸之油脂組成物，含有一種以上選自 γ -亞麻酸及 γ -亞麻酸甘油酯之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物者。

並且，本發明係提供含有此促進動物細胞增殖用劑油脂組成物之動物細胞培養用培養基者。

另外，本發明係提供含三甘油酯、二甘油酯、單甘油

酯及游離脂肪酸之油脂組成物，含有一種以上選自 γ - 亞麻酸及 γ - 亞麻酸甘油酯之皮膚外用劑組成物者。

發明之功效

依據本發明而可得到價廉且品質安定性優異之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，及含有此促進動物細胞增殖用劑油脂組成物之動物細胞培養用培養基。另外，可得到價廉且品質安定性優異之具有改善皮膚症狀效果或治癒效果之皮膚外用劑組成物。

用以實施發明之最佳型態

對於構成本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物成份之三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之脂肪酸並無限制，可舉例如碳原子數為 2 至 24 個之飽和脂肪酸及不飽和脂肪酸。作為適合之脂肪酸，可舉例如辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻烯酸、十五碳烯酸、棕櫚酸、棕櫚烯酸、硬脂酸、花生酸、二十二烷酸、二十四烷酸、二十六烷酸、油酸、亞油酸、 α - 亞麻酸、 γ - 亞麻酸、十八烷四烯酸、二十碳烯酸、二十碳二烯酸、二十碳三烯酸、二十碳四烯酸、花生浸烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳烯酸、二十二碳二烯酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸等。

作為甘油酯，並無特別的限制，化學合成品、來自植物、動物者、來自微生物者皆可使用，但就容易取得之觀

點上，以來自植物或微生物者為宜。

本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物中所含之三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率，就為防止動物細胞增殖效果不齊之觀點，係對於甘油酯總量，以分別為 10 至 79 質量%、20 至 70 質量%、1 至 70 質量% 為宜。三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率，係對於甘油酯總量，以分別為 10 至 70 質量%、25 至 60 質量%、3 至 65 質量% 尤佳。對於甘油酯總量，以分別為 10 至 65 質量%、30 至 60 質量%、5 至 60 質量% 最好。

如此組成之甘油酯係可以已知方法而可製造。例如由將三甘油酯型油脂，使用化學催化劑或酵素催化劑，衍生成二甘油酯及單甘油酯之方法（例如參考特開 2000-236888，特開 2000-333688 號公報）而可製造。

本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物之有效成份之 GLA 係不僅作為游離脂肪酸，亦可作為酯而存在。所謂「GLA 含量」係指以本發明之油脂組成物中之 GLA 衍生物全部為游離 GLA，由水解甘油酯所得之游離脂肪酸以及存在於促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物之游離脂肪酸之合計所算出。例如 GLA 作為酯存在時，測定水解此酯所得之游離 GLA 量即可。

促進動物細胞增殖用劑油脂組成物中之 GLA 含量係因應成為促進增殖對象之動物細胞種類而可適當地調整。

一般就防止因動物細胞種類相異而增殖動物細胞效果不齊之觀點上，對於構成甘油酯之脂肪酸及游離脂肪酸之合計量，以 5 質量%以上為宜。以 10 質量%以上尤佳，以 20 質量%以上更好。GLA 含量並無特定的上限，但即使含超過 98 質量%，並不會更提昇動物細胞增殖效果，就經濟觀點上，以 98 質量%以下為宜。

另外，皮膚外用劑組成物中之 GLA 含量係因應皮膚外用劑組成物之劑型或種類，適當地調整即可。一般就防止因劑型或使用用途而治療效果不齊之觀點上，對於構成甘油酯之脂肪酸及游離脂肪酸之合計量，以 5 質量%以上為宜。以 10 質量%以上尤佳，以 20 質量%以上更好。GLA 含量並無特定的上限，但即使含超過 98 質量%，並不會更提昇動物細胞增殖效果，就經濟觀點上，以 98 質量%以下為宜。

GLA 係可化學合成而得，亦可得自琉璃苣、月見草及虎耳草等之植物種子或螺旋藻（*Spirulina*）屬等之藻類、小克銀漢黴（*Cunninghamella*）屬、被孢黴（*Mortierella*）屬及毛黴（*Mucor*）屬等之微生物。所得之 GLA 為衍生物時，可直接使用，亦可進行水解處理或酯交換處理。

本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物係將甘油酯與 GLA 油脂以上述所定比率，以已知混合方法混合而可製造。另外，本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物係由含 GLA 之微生物，萃取含 GLA 微生物體內油脂或微生物分泌油

脂，將此含 GLA 油脂，由水解處理或酯交換處理而可得之。

此含 GLA 油脂係將具有生產含 GLA 油脂能力之微生物，由常法培養而可得之。作為具有生產含 GLA 油脂能力之微生物，如上所述，可舉例如絲狀菌或酵母、藻類等之各種者。例如，作為具有生產含 γ -亞麻酸油脂能力之微生物，可舉例如特開昭 60-168391 號公報等所記載之被孢黴 (*Mortierella*) 屬所屬微生物、特開昭 63-283589 號公報等所記載之毛黴 (*Mucor*) 屬所屬微生物、特開昭 63-133994 號公報等所記載之根黴 (*Rhizopus*) 屬所屬微生物等。

更具體地，作為被孢黴 (*Mortierella*) 屬所屬微生物，可舉例如 (*Mortierella isabellina*) IFO7824 或 (*Mortierella ramaniana* var. *angrispora*) IFO8187 等。另外，作為毛黴 (*Mucor*) 屬所屬微生物，可舉例如 (*Mucor circinelloides*) HUT1121 (FERM P-9359) 或 (*Mucor javanicus*) HUT1162 (FERM P-9360) 等。

培養上述微生物用之培養基係只要上述微生物生長發育良好，矽生產目的之脂質者即可，可使用含碳來源、氮來源及無機鹽類及因應所需之微生物生長發育良好的胺基酸等成份者。作為碳來源，可使用葡萄糖、澱粉及廢糖蜜等糖類或有機酸或醋酸鈉等，以葡萄糖等之糖類尤佳。另外，作為氮來源，可舉例如銨鹽、酵母萃取物、玉米浸漬液及胨肽等。作為無機鹽類，可舉例如鎂鹽、鈣鹽、磷酸

鹽、鐵鹽及銅鹽等。

關於培養，將碳來源或氮來源或磷酸鹽，於最初加入總量於培養基時，因為將造成微生物生長發育不良影響，所以由開始培養後之適當時期部份追加，可提昇 γ -亞麻酸之生產性為宜。

其他培養條件，例如溫度、培養時間係考量培養基組成或目的之 γ -亞麻酸含有率或脂質生產性，設定適宜的條件即可。溫度通常為20至35℃程度，以25至30℃為宜，pH通常為3至7程度，以3.5至6.5為宜，通常進行72至240小時程度，以96至168小時為宜。

因為含GLA脂質通常蓄積於微生物菌體中，所以由常法將培養液固液分離，而得含有含GLA脂質之菌體。依GLA用途，雖亦可直接使用此菌體，但為進一步將油脂萃取精製，以Bligh & Dyer法、Folich法或特開昭57-144986號公報等所記載之方法，進行菌體破碎、溶劑萃取，而可得目的之含GLA油脂。

將如上述所得之含GLA油脂，由已知方法水解處理或酯交換處理，可得本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物。以如此方法得到本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物時，促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物中之GLA含有比率係採取部份之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物，經甲基酯化後，由氣相層析所決定（參考特開昭57-144986號公報）。

本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物中，只要非抑制本發明效果者，亦可含有其他成份。作為其他成份，可舉例如 GLA 以外之上述脂肪酸等。使用來自植物、來自微生物者為甘油酯或 GLA 時，亦可含有來自植物、來自微生物之其他成份。

本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物係依據使用於培養表皮角化細胞、皮膚纖維母細胞、黑色素細胞、小腸上皮細胞、人類子宮頸部癌細胞（Hela）及肺纖維母細胞等之定著依賴性細胞（anchorage dependent cell）、淋巴球細胞、骨髓腫瘤細胞、白血病細胞及由某細胞與其他細胞之細胞融合所得之融合瘤細胞（hybridoma）等之動物細胞，可達成縮短培養時間與增收細胞量。

然而，本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物係只要需要動物細胞增殖之用途，可使用而無限制。可舉例如動物細胞增殖培養基用添加劑、人工皮膚劑（細胞增殖用添加劑）、醫藥品、食品及化粧品成份等。以下係說明關於此等用途。

由添加本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物於動物細胞培養用培養基，可有效率地使動物細胞增殖。可適用之動物細胞培養用培養基係只要適合於增殖動物細胞者即可，並無特別的限制，可為市售基本培養基，亦可為將此等適當改變者。作為具體之基本培養基，可舉例如 MEM（Minimun Essential Medium）培養基、Iscove's 培養基、RPM11640 培養基、Ham's F-12 培養基、Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM) 培養基、Dulbecco's modified MEM 培養基及加入 10% FBS 之 IMDM 培養基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)，以 DMEM 培養基為宜。此等培養基係可單獨或組合二種以上使用。本發明之油脂組成物於培養基之添加量係依對象動物細胞種類適當地調整即可。一般添加本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，使培養液中之濃度成為 0.001 至 100mg/毫升程度，以 0.01 至 10mg/毫升為宜，以 0.01 至 1mg/毫升尤佳。

加入本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物於培養基時，係以作為溶液加入為宜。調製此溶液所使用之溶媒係以溶解本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，而且與培養液相溶性為宜。作為如此溶媒，可舉例如甲醇、二甲基亞碸及丙酮等，以丙酮為宜。此等溶媒係可單獨或組合二種以上使用。另外，就抑制因所添加溶媒對於動物細胞影響之觀點上，溶媒係使用對於培養基總量之 2 質量% 以下為宜。

添加本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物於人工皮膚生產用培養基，或塗佈或噴射於所培養之人工皮膚，可促進人工皮膚早期形成或人工皮膚增加。於塗佈或噴射時，亦可將本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物溶解於適當溶媒之溶液或分散之分散液塗佈或噴射。作為溶媒係可使用與上述相同者。人工皮膚生產用培養基時，溶媒係與上述同樣地，以使用對於培養基總量之 2 質量%

以下爲宜。另外，上述溶液或分散時，溶媒係於不造成所培養之人工皮膚不良影響之範圍下，可塗佈或噴霧。

使用本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物爲醫藥品、食品或化粧品成份時，可期待由促進動物細胞增殖之各種效果。混合本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物於醫藥品等，可使用已知之方法。

於本發明之皮膚外用劑組成物中，只要不抑制本發明效果者，可含有一般作爲皮膚外用劑所使用之其他成份。作爲其他成份，可舉例如精製水、醇類、油性物質、抗頭皮屑劑、殺菌劑、藥效成份、防腐劑、增黏劑、收斂劑、保濕劑、粉體、香料、乳化安定劑及 pH 調整劑等。使用來自植物、來自微生物者爲甘油酯或 GLA 時，亦可含有來自植物、來自微生物之其他成份。

作爲醇類，可舉例如乙醇、具有直鏈或支鏈之烷基或烯基之高級醇類等，作爲油性物質，可舉例如流動鏈烷烴、凡士林及固體鏈烷烴等之烴類；液狀含水羊毛脂、羊毛脂脂肪酸等之羊毛脂衍生物；二甲基聚矽氧烷、聚醚變性聚矽氧烷及胺基變性聚矽氧烷等之聚矽氧烷衍生物、高級醇高級脂肪酸酯類、高級脂肪酸、具有烷基或烯基之長鏈醯胺等之油脂類；貂油及橄欖油等之動植物性油脂類等。作爲藥效成份，可舉例如維生素類等。作爲防腐劑，可舉例如 paraben 類等，作爲增黏劑，可舉例如水溶性高分子化合物等。作爲保濕劑，可舉例如丙二醇、甘油、卡必醇、3-甲基-1,3-丁二醇及糖類等。

作為本發明之皮膚外用劑組成物之劑型，並無特別的限制，可直接使用，亦可適用乳霜狀、乳液狀、化粧水狀、軟膏狀、粉末狀、糊劑、粉末劑、滴下劑、貼付劑及氣溶膠劑等之通常皮膚外用劑劑型。

本發明之皮膚外用劑組成物之使用量係可依用途而適當調整。例如配合化粧品時，化粧品中之濃度，通常可為 0.001 至 100mg/毫升程度，以配合 0.01 至 10mg/毫升為宜，以 0.01 至 1mg/毫升。另外，使用於創傷（包含褥瘡）治療時，治療藥中之濃度，通常可為 0.001mg/毫升以上～（直接使用），以配合 0.01 至 500mg/毫升為宜，以 0.01 至 100mg/毫升尤佳。

【實施方式】

實施例

其次，由實施例再詳細地說明本發明，但本發明並不局限於此等例者。

使用下述實施例及比較例之原料油脂及油脂組成物之脂肪酸組成係由特開昭 57-144896 號公報所記載之方法而甲基酯化，由氣相層析法測定。另外，構成實施例及比較例之油脂組成物之甘油酯組成係基於 Iatroscan 法（J. Jpn. Oil Chem. soc., Vol35, No.8, 625-631(1986)），由組合薄層層析法（TLC）及氫火焰離子檢測器（FID）之 Iatroscan TH-10 型（Iatroscan 社製）而求之。亦即，將 1 微升之試樣溶液，滴於矽膠薄層棒（Chromalod S III，Iatroscan

(14)

社製)單側後，進行溶媒展開，溶媒展開後，將矽膠薄層棒安裝於上述分析機 TH-10 型，以下述條件分析。

試樣溶液濃度：20mg/毫升丙酮

TLC 展開溶媒：己烷/二乙醚/醋酸 = 70/30/1 (容量比)

展開距離：10.0cm

Iatroscan 分析條件

氫流量：160 毫升/min

空氣流量：2.0 毫升/min

掃描速度：30sec/SCAN

偵測器：氫火焰離子檢測器 (FID)

實施例 1 (製造油脂組成物)

含 100g 之具有如表 1 所示脂肪酸組成之含 GLA 油脂 (出光興產 (股) 製，商品名：GlanoilHGC，GLA：25.9 質量%) 及 100g 之蒸餾水之反應系統，加入 20,000 單位之 *Rhizopus niveus* 產生脂肪酶 (天野酵素 (股) 製，Newlase F3G，30,000U/g)，於攪拌下，以 30℃ 下反應 48 小時。

〔 表 1 〕

脂 肪 酸 組 成	含 有 率 (質 量 %)
棕 櫚 酸	13.5
棕 櫚 烯 酸	2.6
硬 脂 酸	1.7
油 酸	41.9
亞 油 酸	11.7
γ - 亞 麻 酸	25.9

添加 10 質量 % 之氫氧化鈉水溶液於所得之分解反應物，調整分解反應物之 pH 為 8 至 9 後，使用 200 毫升之二乙醚萃取分解反應物中之油份，水洗，脫水後，除去醚而得 56.4g 之油份（油脂組成物）。

使用部份之此油脂組成物，由上述方法進行構成甘油酯組成分析，另外，甲基酯化部份之油脂組成物後，以氣相層析法分析脂肪酸組成。其結果如表 3 所示。另外，於表 3 中，例如 C16：0 係指碳原子數為 16 個，無雙鍵之脂肪酸，C18：3 係指碳原子數為 18 個，有 3 個雙鍵之脂肪酸。

實施例 2（製造油脂組成物）

於 100g 之與實施例 1 所使用者相同之含 GLA 油脂中，加入 3g 水、30g 之甘油及 300,000 單位之 *Alcaligenes* sp. 產生脂肪酶（名糖產業（股）製，lipasePL，90,000U/g

），於攪拌下，以 30℃ 反應 72 小時。

添加 10 質量 % 之氫氧化鈉水溶液於所得之分解反應物，調整分解反應物之 pH 為 8 至 9 後，使用 200 毫升之二乙醚萃取分解反應物中之油份，水洗，脫水後，除去醚而得 87.9g 之油份（油脂組成物）。

使用部份之此油脂組成物，由上述方法進行構成甘油酯組成分析，另外，甲基酯化部份之油脂組成物後，以氣相層析法分析脂肪酸組成。其結果如表 3 所示。

實施例 3（製造油脂組成物）

實施例 1 中，除了使用具有如表 2 所示脂肪酸組成之含 GLA 油脂（出光興產（股）製，商品名：GlanoilCS，GLA：7.9 質量 %）為含 GLA 油脂以外，由與實施例 1 相同的酵素處理及萃取而得油脂組成物。

〔表 2〕

脂肪酸組成	含有率（質量 %）
棕櫚酸	31.7
棕櫚烯酸	1.8
硬脂酸	2.6
油酸	40.7
亞油酸	14.2
γ -亞麻酸	7.9

所得之油脂組成物之分析結果如表 3 所示。

比較例 1（製造油脂組成物）

實施例 1 中，除了使用未具有 GLA 酸之紅花油（SIGMA 社製）以取代使用含 GLA 油脂以外，進行與實施例 1 相同的處理，而得油脂組成物。所得油脂組成物之分析結果如表 3 所示。

〔表 3〕

實施例 1 實施例 2 實施例 3 比較例 1					
脂肪酸組成（質量％）					
棕櫚酸	(C _{16:0})	9.2	15.0	16.6	5.4
棕櫚烯酸	(C _{16:1})	2.0	2.3	1.9	0.4
硬脂酸	(C _{18:0})	0.0	1.7	2.2	1.8
油酸	(C _{18:1})	45.8	40.5	47.9	16.7
亞油酸	(C _{18:2})	11.7	13.1	17.1	74.9
γ-亞麻酸	(C _{18:3})	29.4	25.7	12.4	0.0
甘油酯組成（質量％）					
三甘油酯：TG		59.2	13.8	50.5	52.3
二甘油酯：DG		37.2	37.9	43.5	33.4
單甘油酯：MG		3.6	46.3	6.0	4.3

實施例 4（細胞增殖試驗）

評估實施例 1 至 3 及比較例 1 所得之油脂組成物，對

於正常人類表皮角化細胞之促進增殖效果。

進行將正常人類表皮角化細胞（三光純藥（股）製，Cryo NHEK - Neo：來自新生兒），使用於 500 毫升之 BlettkitKMG 基礎培養基（三光純藥（股）製），添加 2 毫升之附屬之牛腦下垂體萃取液、0.5 毫升之上皮成長因子（hEGF）及 0.5 毫升之胰島素之試驗培養基，於 37℃，5% CO₂ 之存在下，培養 4 至 7 天，使用成為 70 至 90% 之未匯合(subconfluent)者於增殖試驗。

進行增殖試驗係使用 96 孔微培養盤，以細胞密度為 3.5×10^3 cell/well，接種正常人類表皮角化細胞（三光純藥（股）製，Cryo NHEK - Neo：來自新生兒），使用於 500 毫升之 BlettkitKMG 基礎培養基（三光純藥（股）製），添加 2 毫升之附屬之牛腦下垂體萃取液、0.025 毫升之上皮成長因子（hEGF）及 0.5 毫升之胰島素之試驗培養基，於 37℃，5% CO₂ 之存在下，培養 6 天，測定細胞數。

細胞數係使用 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System（寶酒造（股）製），以 well leader（生化學工業（股）製，SK601 型）測定於 450nm 吸收。另外，以不含本發明之油脂組成物之試驗培養基之細胞數為基準（100%），算出添加油脂組成物時之增殖率（%）。結果如表 4 所示。

〔 表 4 〕

試料	試料添加量	
	0.01mg/ml	0.1mg/ml
非添加	100%	
實施例 1	140%	143%
實施例 2	130%	140%
實施例 3	124%	122%
比較例 1	104%	106%

實施例 5（細胞增殖及提昇抗體生產試驗）

評估實施例 1 至 3 及比較例 1 所得之油脂組成物，對於 CHO 細胞（來自中國倉鼠卵細胞之培養細胞）之促進增殖效果。使用 100 毫升之 CHO-S-SFM II 培養基（GIBCOBRL 社製），將 CHO 細胞（ATCC 保存株：CRL-11397 株），於 37℃，5% CO₂ 之存在下，靜置培養 7 天者，使用於增殖試驗中。

增殖試驗係如下進行。亦即，以 0.1mg/毫升之濃度，添加各實施例 1 至 3 及比較例 1 所得之油脂組成物於 CHO-S-SFM II 培養基（GIBCOBRL 社製）之 10 毫升試驗培養基，懸濁 1×10^5 cell 之 CHO 細胞（ATCC 保存株：CRL-11397 株），添加於 INTEGRA CELLINE（INTEGRA BIOSCIENCES 社製，CL-350）中之培養細胞空間。另外，將 200 毫升之未添加上述油脂組成物之 CHO-S-SFM II 培養基（GIBCOBRL 社製）作為基礎培養基，添加於培

養細胞空間。

將添加培養基與 CHO 細胞之上述 INTEGRA CELLINE，於 37℃，5% CO₂ 之存在下，靜置培養 7 天後，由培養液細胞空間回收 10 毫升之細胞懸濁液。將此細胞懸濁液離心分離（200G，5 分鐘），將細胞懸濁於新的試驗培養基（以 0.1mg/毫升之濃度，添加各實施例 1 至 3 及比較例 1 所得之油脂組成物於 CHO-S-SFM II 培養基（GIBCOBRL 社製）之培養基），將此放回培養細胞空間。之後，繼續於 37℃，5% CO₂ 之存在下，靜置培養 7 天。

合計進行 14 天之培養後，回收細胞懸濁液總量。使用血球計算盤測定此細胞懸濁液中之細胞數後，由酵素結合免疫吸附法（ELISA 法）測定培養上澄液中之 IgG 抗體產生量。另外，以僅不含本發明油脂組成物之基礎培養基（CHO-S-SFM II 培養基（GIBCOBRL 社製））進行相同試驗時之細胞數及 IgG 抗體產生量為基準（100%），算出添加油脂組成物時之增殖率（%）及提昇 IgG 抗體產生率（%）。結果如表 5 所示。

〔 表 5 〕

試 樣	細 胞 數	提 昇 IgG 抗 體 產 生
無 添 加	100%	100%
實 施 例 1	163%	197%
實 施 例 2	154%	185%
實 施 例 3	133%	160%
比 較 例 1	108%	112%

實 施 例 6 (治 癒 效 果 試 驗)

評 估 使 用 實 施 例 1 至 3 及 比 較 例 1 所 得 之 油 脂 組 成 物 為 皮 膚 外 用 劑 組 成 物 時 之 治 癒 效 果 。

將 10g 之 甘 油 、 10g 之 流 動 鏈 烷 烴 及 79g 之 白 色 凡 士 林 ， 加 溫 至 80℃ 溶 解 後 ， 冷 卻 至 45℃ ， 添 加 混 合 1g 之 實 施 例 1 所 得 之 油 脂 組 成 物 ， 將 此 混 合 物 急 速 冷 卻 ， 調 製 均 勻 的 軟 膏 劑 。 以 此 為 實 施 例 1 軟 膏 。 同 樣 地 ， 使 用 實 施 例 2 及 3 及 比 較 例 1 所 得 之 油 脂 組 成 物 ， 調 製 實 施 例 2 軟 膏 及 實 施 例 3 軟 膏 及 比 較 例 1 軟 膏 。

此 等 軟 膏 劑 治 癒 效 果 係 由 下 述 方 法 評 估 。 亦 即 ， 將 皮 膚 出 現 老 化 症 狀 (皺 紋) 之 50 至 60 歲 女 性 20 人 ， 分 成 4 組 ， 每 組 各 5 名 ， 第 1 組 為 實 施 例 1 軟 膏 ， 第 2 組 為 實 施 例 2 軟 膏 ， 第 3 組 為 實 施 例 3 軟 膏 及 第 4 組 為 比 較 例 1 軟 膏 ， 使 用 1 個 月 ， 依 下 述 評 估 基 準 評 估 使 用 前 後 之 皮 膚 皺 紋 狀 況 。 評 估 結 果 如 表 6 所 示 。 另 外 ， 表 6 之 數 值 係 符 合 各 評 估 基 準 之 人 數 。

〈 評 估 基 準 〉

有效：顯示皺紋明顯消失，表皮張力恢復。

略有效：顯示皺紋變淺，變得不明顯等之改善效果。

無效：使用前後，未見有效果。

〔 表 6 〕

評 價	實 施 例 1 軟 膏	實 施 例 2 軟 膏	實 施 例 3 軟 膏	比 較 例 1 軟 膏
有 效	3	4	1	0
略 有 效	2	1	3	1
無 效	0	0	1	4

產 業 上 利 用 性

由利用本發明之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物於促進動物細胞增殖，可達成提昇動物細胞生產性，或提昇具有有效地產生細胞生理活性物質之生產性。

另外，本發明之皮膚外用劑組成物係具有促進人類及動物上皮形成之能力，可期待對於由表皮新陳代謝之黑斑、皺紋對策及治療創傷（包含褥瘡）等之治癒效果者。

五、中文發明摘要

發明之名稱：促進動物細胞增殖用劑油脂組成物、含有此組成物之動物細胞培養用培養基、及皮膚外用劑組成物

提供價廉且品質安定性優異，具有促進動物細胞增殖能力之油脂組成物及含有此油脂組成物之動物細胞培養用培養基、以及具有改善皮膚症狀效果或治癒效果之皮膚外用劑組成物。

含三甘油酯、二甘油酯、單甘油酯及游離脂肪酸之油脂組成物，含有一種以上選自 γ -亞麻酸及 γ -亞麻酸甘油酯之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物或皮膚外用劑組成物、及含有此油脂組成物之動物細胞培養用培養基。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

(1)

十、申請專利範圍

1. 一種促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其特徵為，含三甘油酯、二甘油酯、單甘油酯及游離脂肪酸之油脂組成物，含一種以上選自 γ -亞麻酸及 γ -亞麻酸甘油酯。

2. 如申請專利範圍第 1 項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其中該三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率係對於甘油酯總量，分別為 10 至 79 質量%、20 至 70 質量%及 1 至 70 質量%。

3. 如申請專利範圍第 2 項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其中該三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率係對於甘油酯總量，分別為 10 至 70 質量%、25 至 60 質量%及 3 至 65 質量%。

4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 頁中任一項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其中 γ -亞麻酸之含有比率係對於構成該甘油酯之脂肪酸及游離脂肪酸之合計量為 5 質量%以上。

5. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其中由水解處理或酯交換處理微生物體內油脂或微生物分泌油脂所得者。

6. 如申請專利範圍第 5 項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物，其中該微生物為被孢黴（*Mortierella*）屬菌。

7. 如申請專利範圍第 5 項之促進動物細胞增殖用劑

油脂組成物，其中該微生物為毛黴（*Mucor*）屬菌。

8. 一種動物細胞培養用培養基，其特徵為，含有如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之促進動物細胞增殖用劑油脂組成物。

9. 一種皮膚外用劑組成物，其特徵為，含三甘油酯、二甘油酯、單甘油酯及游離脂肪酸之油脂組成物，含有一種以上選自 γ -亞麻酸及 γ -亞麻酸甘油酯。

10. 如申請專利範圍第 9 項之皮膚外用劑組成物，其中該三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率係對於甘油酯總量，分別為 10 至 79 質量%、20 至 70 質量%及 1 至 70 質量%。

11. 如申請專利範圍第 10 項之皮膚外用劑組成物，其中該三甘油酯、二甘油酯及單甘油酯之含有比率係對於甘油酯總量，分別為 10 至 70 質量%、25 至 60 質量%及 3 至 65 質量%。

12. 如申請專利範圍第 9 項至第 11 項中任一項之皮膚外用劑組成物，其中 γ -亞麻酸之含有比率係對於構成該甘油酯之脂肪酸及游離脂肪酸之合計量為 5 質量%以上。

13. 如申請專利範圍第 9 項至第 12 項中任一項之皮膚外用劑組成物，其中由水解處理或酯交換處理微生物體內油脂或微生物分泌油脂所得者。

14. 如申請專利範圍第 13 項之皮膚外用劑組成物，其中該微生物為被孢黴（*Mortierella*）屬菌。

(3)

15. 如申請專利範圍第 13 項之皮膚外用劑組成物，
其中該微生物為毛黴（*Mucor*）屬菌。

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無