

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6188249号  
(P6188249)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	35/51	(2015.01)	A 6 1 K 35/51
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K 38/19
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 K	8/98	(2006.01)	A 6 1 K 8/98
A 6 1 K	8/64	(2006.01)	A 6 1 K 8/64

請求項の数 5 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-201108 (P2015-201108)  
 (22) 出願日 平成27年10月9日(2015.10.9)  
 (65) 公開番号 特開2016-79178 (P2016-79178A)  
 (43) 公開日 平成28年5月16日(2016.5.16)  
 審査請求日 平成27年10月14日(2015.10.14)  
 (31) 優先権主張番号 103135488  
 (32) 優先日 平成26年10月14日(2014.10.14)  
 (33) 優先権主張国 台湾(TW)

(73) 特許権者 515282108  
 訊聯生物科技股▲分▼有限公司  
 台湾台北市内湖区新湖一路36巷28號1樓  
 (74) 代理人 100082418  
 弁理士 山口 朔生  
 (72) 発明者 席宇廷  
 台湾台北市内湖区新湖一路36巷28號1樓  
 (72) 発明者 蔡政憲  
 台湾新北市中和區中正路738號11樓之8  
 審査官 安藤 公祐

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物、その製造方法および該組成物を含有する創傷治癒用医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

豚の臍帯組織を備えるステップと、  
 血球および体液を完全に除去するために、洗浄液で該臍帯を洗浄するステップと、  
 洗浄された前記臍帯から細胞を分離させ、該臍帯から分離された細胞を血清無含有の培地に12日間継代培養を行い、サイトカインを獲得するステップと、  
 サイトカインおよび細胞に対して、凍結融解サイクルを少なくとも二回以上繰り返し、ポリペプチド混合物を獲得するステップと、  
 該ポリペプチド混合物に対して、濃縮および脱塩を施し、3000ダルトンより大きい分子量を有すると共に、塩基性線維芽細胞成長因子と、血小板由来成長因子と、トランスフォーミング増殖因子-1とを有する組成物を獲得するステップと、を有することを特徴とする、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物の製造方法。

【請求項2】

前記豚の臍帯組織は、特定病原体不在豚由来の臍帯組織であることを特徴とする、請求項1に記載の、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物の製造方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載の製造方法によって製造され、皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果を有する、豚の臍帯組織由来の成分を有効成分とすることを特徴とする、創傷治癒用組成物。

【請求項4】

有効量の請求項 3 に記載の組成物と、医薬的に許容される溶剤および/または賦形剤とを有することを特徴とする、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物を含有する創傷治癒用医薬品。

【請求項 5】

前記組成物の有効量は、 $0.05 \text{ ng/ml}$  ないし  $20 \text{ ng/ml}$  であることを特徴とする、請求項 4 に記載の、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物を含有する創傷治癒用医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に臍帯 (umbilical cords) 組織由来の線維芽様細胞の培養により得られた特定の成分を有する創傷治癒用組成物の製造方法に関する。

本発明における他の側面は、皮膚コラーゲンの増加を刺激する創傷治癒用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

従来の技術は、上皮細胞または間葉系幹細胞の培養により、幹細胞因子 (stem cell factor、SCF)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor、VEGF)、表皮成長因子 (epidermal growth factor、EGF)、インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor、IGF) などの成長因子を得るものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、上記の従来技術には、以下のような問題がある。

従来の凍結工程は、漸進的に行われるものであるため、時間コストの増大および単位時間当たりの生産量が低下してしまう。

また、濃縮・脱塩が施されていないので、複雑な培養工程が行われていたものの、培養工程で用いられる培地が含有する塩類が皮膚や毛への刺激になってしまう。

【0004】

そこで、出願されたのが本発明であって、スキンケア用組成物の製造方法を提供することを目的としている。

本発明に係る前記製造方法は、液体窒素による凍結融解サイクルで細胞を破壊し、細胞溶解物 (cell lysate) を回収し、大量のポリペプチド・タンパク質カクテル (polypeptide or protein cocktail) を抽出すると共に、濃縮・脱塩を施すことにより、特定の分子量を有する組成物を得るものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本願の請求項 1 の発明は、豚の臍帯組織を備えるステップと、血球および体液を完全に取り除くために、洗浄液で該臍帯を洗浄するステップと、洗浄された前記臍帯から細胞を分離させ、該臍帯から分離された細胞を血清無含有の培地に 12 日間継代培養を行い、サイトカインを獲得するステップと、サイトカインおよび細胞に対して、凍結融解サイクルを少なくとも二回以上繰り返し、ポリペプチド混合物を獲得するステップと、該ポリペプチド混合物に対して、濃縮および脱塩を施し、 $3000$  ダルトンより大きい分子量を有すると共に、塩基性線維芽細胞成長因子と、血小板由来成長因子と、トランスフォーミング増殖因子 - 1 とを有する組成物を獲得するステップと、を有することを特徴とする、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物の製造方法、を提供する。

【0006】

【0007】

10

20

30

40

50

【0008】

【0009】

本願の請求項2の発明は、前記豚の臍帯組織は、特定病原体不在豚由来の臍帯組織であることを特徴とする、請求項1に記載の、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物の製造方法、を提供する。

【0010】

本願の請求項3の発明は、請求項1または2に記載の製造方法によって製造され、皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果を有する、豚の臍帯組織由来の成分を有効成分とすることを特徴とする、創傷治癒用組成物、を提供する。

【0011】

【0012】

本願の請求項4の発明は、有効量の請求項3に記載の組成物と、医薬的に許容される溶剤および/または賦形剤とを有することを特徴とする、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物を含有する創傷治癒用医薬品、を提供する。

【0013】

本願の請求項5の発明は、前記組成物の有効量は、 $0.05 \text{ ng/ml}$ ないし $20 \text{ ng/ml}$ であることを特徴とする、請求項4に記載の、豚の臍帯組織由来の創傷治癒用組成物を含有する創傷治癒用医薬品、を提供する。

【0014】

本発明でいう「洗浄液」とは、豚の臍帯と等張の溶液である。

本発明でいう洗浄液は、例えば、90%塩化ナトリウム溶液またはリン酸緩衝塩類溶液 (phosphate buffered saline、PBS) であっても良い。

【0015】

本発明でいう「細胞の分離」とは、例えば豚の臍帯から切った臍帯細片を4枚ないし6枚を、例えばアルファMEM培地と10%のウシ胎児血清とからなる10ミリリットルの成長培地を含む培養皿に播いてから、該臍帯細片を含有する培養皿を、恒温培養器で培養する。

培養10日目、該臍帯細片を培養皿の成長培地から取り除き、例えば週二回それぞれ3ミリリットルの新鮮な成長培地を添加する方式で培養した細胞を獲得することである。

また、前記恒温培養器は、例えば5%の二酸化炭素雰囲気インキュベータであることがこのましい。

【0016】

本発明でいう「継代培養」とは、培養細胞が高密度になる時、細胞を回収し、希釈してから、希釈された細胞を新しい培地を有する培養皿に低密度から継続的に培養することである。

また、希釈比率は、細胞種類により異なるものである。

【0017】

本発明でいう「凍結融解サイクル」とは、サイトカインおよび細胞を液体窒素で凍結させてから、室温で融解させることを複数回繰り返すことにより、細胞膜を破壊する効果を発揮することである。

例えば、細胞を保持するバイアルを液体窒素に浸入して凍結させてから、該凍結されたバイアルをセ氏37度の水浴で解凍することを、少なくとも二回以上繰り返し、破壊された細胞をさらに $1000 \text{ G}$ で15分間ないし20分間遠心してもよい。

【0018】

本発明でいう「濃縮および脱塩」とは、ポリペプチド混合物を含有する溶液をろ過し、上清液を取り除くことにより、該ポリペプチド混合物を含有する溶液における体積を縮減し、濃度を増大させると共に、塩類を除去することである。

例えば、ポリペプチド混合物を含有する溶液を、超ろ過装置または遠心ろ過装置でろ過し、該ポリペプチド混合物を含有する溶液における体積の縮減、濃度の増大ならびに塩類などの不純物の除去を行うことにより、 $3000 \text{ Dalton}$  (dalton、Da) より大き

10

20

30

40

50

い分子量を有する組成物を獲得することができる。

【0019】

本発明でいう「豚の臍帯組織」とは、特定病原体不在 (specific pathogen free、SPF) 豚由来の臍帯組織である。

【0020】

本発明でいう「皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果」とは、本発明に係る組成物が適用されていないコントロールに比べて、本発明に係る組成物による皮膚コラーゲンの増加量は、0.5倍ないし3.5倍増大することである。

【0021】

本発明でいう「医薬的に許容される溶剤および/または賦形剤」とは、人類や動物の内用または外用に好適な溶剤/賦形剤である。

例えば、該医薬的に許容される溶剤および/または賦形剤は、エタノール水溶液、水、生理食塩水であっても良い。

また、該医薬的に許容される溶剤および/または賦形剤が水または生理食塩水であると共に、該溶剤および/または賦形剤の添加量が本発明に係る組成物の有効量を維持することができるものであることがこのましい。

【発明の効果】

【0022】

本発明に係るスキンケア用組成物の製造方法は、血清無含有の培地を用い、細胞を既定の日数培養することにより、サイトカインを回収することができる。また、凍結融解サイクルを繰り返すことにより、細胞を破壊し、ポリペプチド混合物を得ることができると共に、濃縮・脱塩を施すことにより、特定の分子量を有する組成物を得ることができる。得られた組成物は、皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果を有するものである。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明に係る組成物を適用した細胞増殖実験の結果を示す柱状グラフである。

【図2】本発明に係る組成物を適用したMTS試験の結果を示す柱状グラフである。

【図3】本発明に係る組成物を適用した創傷治癒実験の細胞の状態を示す写真である。「D0」と標示した第一枚の写真は、実験初日、細胞を保持する培養皿にスクラッチが作られた状況を示すものである。「D3」と標示した第二枚ないし第四枚の写真は、実験三日目の状況を示すものであり、また、第二枚の写真に表示される「SFM」は、血清無含有培地を意味するものである。また、第三枚の写真に表示されたのは、本発明に係る組成物を濃度が0.055ng/mlになるように添加した状況を示すものであると共に、第四枚の写真に表示されたのは、本発明に係る組成物を濃度が0.11ng/mlになるように添加した状況を示すものである。

【図4】本発明に係る組成物を適用したコラーゲン増加実験の結果を示す柱状グラフである。横軸に表示されるbFGFの濃度は希釈テストの基準とされる。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、図面を参照して本発明の好適な実施の形態を詳細に説明する。

【0025】

[製造例1]

本製造例は、豚の臍帯から細胞を分離させることに関する。

【0026】

豚の臍帯を備え、血球および体液を完全に取り除くために、該臍帯を75%のエタノールで20秒ないし30秒洗うと共に、PBSによりさらに洗浄する。洗浄された前記臍帯を、3等分または4等分し、滅菌器の皿に置く。

さらに、前記臍帯をメスまたはピンセットで静脈に沿って切開してから、二本のピンセットで該切開された臍帯を広げる状態で、ハウートンゼリーに血を付けないように、動脈、ならびに静脈を取り除く。

10

20

30

40

50

該ホウオートンゼリーを、臍帯羊膜から、該ホウオートンゼリーの湿潤性が維持されるように、新鮮なアルファMEM培地に移動する。

手術用剪刀で該動脈、静脈およびホウオートンゼリーを除去された臍帯を切って細かく裂くことにより、臍帯細片が得られる。

前記4枚ないし6枚臍帯細片を、アルファMEM培地と10%のウシ胎児血清とからなる10ミリリットルの成長培地を含む培養皿に播いてから、該臍帯細片を含有する培養皿を、5%の二酸化炭素雰囲気インキュベータで保管し、週二回、毎回3ミリリットルの前記成長培地を該培養皿に添加するように、該培養皿に細胞を培養する。

培養10日目、該臍帯細片を培養皿の成長培地から取り除き、PBSで培養皿の細胞を洗い流してから、新鮮な成長培地を添加し、細胞を80%ないし90%コンフルエントの状況まで培養する。

【0027】

[製造例2]

本製造例は、細胞の継代培養に関する。

【0028】

アスピレーターで、80%ないし90%コンフルエントの状況まで培養された前記細胞を保持する培養皿から、成長培地を除去した後、5ミリリットルのPBSで培養皿に保持されている細胞を洗い流す。

PBSを除去し、濃度が0.25%のトリプシン-EDTAを培養皿に添加する。前記トリプシン-EDTAを添加された培養皿をセ氏37度で5分放置してから、分離された細胞を15-ml遠心管に移す。

400Gで5分間遠心した後、上清液を除去し、2ミリリットルの成長培地を添加すると共に、細胞を再懸濁させ、細胞懸濁液を調製する。

10マイクロリットルの前記細胞懸濁液と、10マイクロリットルのトリパンプルーとを混合させてなる混合液に対して、自動細胞計数装置で細胞を計数する。

【0029】

[製造例3]

本製造例は、サイトカインの製造に関する。

【0030】

サイトカインを製造するために、前記製造例2で得られた細胞を、サイトカイン製造用培養皿に接種し、各サイトカイン製造用培養皿に、細胞数が $3 \times 10^5$ ないし $7 \times 10^5$ になるまで培養してから、二酸化炭素雰囲気インキュベータに、セ氏37度で、週二回の頻度、すなわち三日または四日おきに成長培地を交換し、さらに90%コンフルエントになるまで培養する。

【0031】

90%コンフルエントの状況まで培養された前記細胞を、二回、5ミリリットルのPBSで洗い流してから、各サイトカイン製造用培養皿に8ミリリットルの血清無含有培地を添加し、セ氏37度で、二酸化炭素雰囲気インキュベータに、12日間培養してサイトカインを獲得する。

【0032】

[製造例4]

本製造例は、ポリペプチド混合物の回収に関する。

【0033】

一部のサイトカインは前記培地へ放出されるが、ほかのサイトカインは培地へ放出されずに細胞内に留まる。

該培地を回収し、前記サイトカイン製造用培養皿の表面に付着される細胞を、該培養皿に添加される濃度が0.2%のトリプシン-EDTAにより、セ氏37度で5分間処理する。

トリプシン-EDTA処理で剥離された細胞を回収し、40Gで5分間遠心した後、上清液を除去し、さらに10ミリリットルのPBSで沈殿された細胞を再懸濁し、該懸濁細

10

20

30

40

50

胞液に対して再び遠心および上清液除去の工程を行ってから、3ミリリットルのPBSに細胞を再懸濁する。

再懸濁された細胞を凍結バイアルに移し、液体窒素に浸入して凍結させる。

凍結されたバイアルをセ氏37度の水浴で解凍する。

前記凍結融解サイクルを二回繰り返すことにより、細胞を破壊する。

破壊された細胞を1000Gで15分間ないし20分間遠心してから、ポリペプチド混合物を含有する溶液として、上清液および、該上清液に懸濁される細胞溶解物を回収することにより、総産出を向上させる。

また、酵素結合免疫吸着測定法(enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA)で、例えばbFGFまたはPDGFを対象として、上清液におけるポリペプチド混合物の濃度を測定する。

10

【0034】

[製造例5]

本製造例は、ポリペプチド混合物の濃縮および脱塩に関する。

【0035】

前記ポリペプチド混合物を含有する溶液を濃縮することにより、特定の濃度のポリペプチドを得ることができる。

前記製造例4に述べた該上清液および該上清液に懸濁される細胞溶解物を超ろ過装置(stirred cell、アメリカ、Amicon社)または遠心ろ過装置(filter centrifugation device、アメリカ、Amicon社)を用い、該ポリペプチド混合物を含有する溶液における体積の縮減および濃度の増大を図り、ポリペプチド混合物濃縮液を得る。

20

該ポリペプチド混合物濃縮液を前記超ろ過装置または遠心ろ過装置から回収チューブに移して保存する。

2ミリリットルの該ポリペプチド混合物濃縮液を取って、濃度を測定してもよい。

【0036】

[製造例6]

本製造例は、ポリペプチド濃縮液の凍結乾燥に関する。

【0037】

50ミリリットルの前記製造例5で製造されたポリペプチド混合物濃縮液をチャック袋に入れ、セ氏-80度で一晩(12時間ないし16時間)凍結させる。

30

凍結乾燥装置で、該チャック袋に保持されたままの該凍結されたポリペプチド混合物濃縮液に対して、四日間ないし五日間をかけて、凍結乾燥工程を施す。凍結乾燥されたポリペプチド混合物濃縮液を、無菌水に再懸濁させ、10ng/mlの塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor、bFGF)溶液を得る。

本発明に係る組成物とされる該bFGF溶液を0.22μmメンブレンフィルターでろ過し、セ氏-80度で保存する。

また、前記bFGFの濃度を基準として、該bFGF溶液は、168pg/mlのトランスフォーミング増殖因子-1(Transforming growth factor-1、TGF-1)、および6ng/mlの血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor、PDGF)を有する。

40

【0038】

[製造例7]

本製造例は、MTS試験における細胞増殖の測定方法に関する。

【0039】

MTS試験の試薬として、Promega社のCellTiter(登録商標)Aqueous One Solution Cell Proliferation Assayが用いられる。

該MTS試験は、20マイクロリットルの前記試薬を、100マイクロリットルの細胞

50

培養4日目の培地に添加するステップと、試薬を添加された前記培地を、セ氏37度で、5%の二酸化炭素雰囲気インキュベータに1.5時間静置するステップと、分光光度計を用い、波長450nmにおいて、吸光度を測定することにより、生存の細胞の増殖率を試験するステップとを有する。

【0040】

[製造例8]

本製造例は、コラーゲン増加実験に関する。

【0041】

コラーゲン増加実験の試薬として、Procollagen Type I C-peptide (PIP) EIA kitが用いられる。

まずは、96ウェル免疫分析プレートにそれぞれ100マイクロリットルのantibody-POD conjugate溶液を添加する。

ウェルごとに20マイクロリットルの被験物を添加し、セ氏37度で、3時間反応させてから、一回400マイクロリットルのPBSで該96ウェル免疫分析プレートを四回洗浄する。

洗浄された該96ウェル免疫分析プレートにウェルごとに100マイクロリットルの基質溶液(substrate solution)を添加し、15分間反応させてから、100マイクロリットルの停止液(stop solution)を添加し、分光光度計を用い、波長450nmにおいて、吸光度を測定する。

【実施例1】

【0042】

本実施例は、細胞増殖実験に関する。

【0043】

$5 \times 10^4$  / ウェルの密度で人類線維芽細胞を6ウェルプレートに培養する。培養4日目、培地を製造例6において得られた、それぞれ、bFGFの濃度が0.055ng/mlまたは0.11ng/mlであるbFGF溶液を含有する培地と交換する。

培養7日目、トリプシン処理で、細胞を該6ウェルプレートから剥離して、細胞数を計数する。

図1に示すように、コントロールと比べて、0.11ng/ml濃度のbFGFで培養された人類線維芽細胞の増殖率は、31.8%である。

【実施例2】

【0044】

本実施例は、MTS試験に関する。

【0045】

$2 \times 10^3$  / ウェルの密度で人類線維芽細胞を96ウェルプレートに培養する。

培養4日目、培地を製造例6において得られたbFGF溶液を含有する培地と交換する。

更に4日間培養した後、上述した製造例7に記載の方法により、細胞増殖の測定を行う。

図2に示すように、コントロールと比べて、0.11ng/ml濃度のbFGFで培養された生存の人類線維芽細胞の増殖率は、35.9%である。

【実施例3】

【0046】

本実施例は、創傷治癒実験に関する。

【0047】

生体外(in vitro)スクラッチ試験で細胞の移動を測定する。 $5 \times 10^4$  / ウェルの密度で人類線維芽細胞を6ウェルプレートに培養する。

培養7日目、培地を製造例6において得られたbFGF溶液を含有する培地と交換すると共に、ウェルにスクラッチを作る。

培養10日目、細胞の移動状況を写真で記録する。

10

20

30

40

50

図3に示すように、コントロールと比べて、スクラッチ後3日目、0.11ng/ml濃度のbFGFで培養された人類線維芽細胞は、移動することと、スクラッチによる傷を埋めることができる。

即ち、0.055ng/mlないし0.11ng/ml濃度のbFGFは、線維芽細胞の成長および移動を促進する効果を有する。

【実施例4】

【0048】

本実施例は、コラーゲン増加実験に関する。

【0049】

製造例6において得られたbFGF溶液を含有する培地で、前記製造例8に記載の方法により、皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果を測定すると、該効果はbFGF溶液の濃度と比率するものであることが分かる。

10

特に、bFGFの濃度が0.0625ng/mlないし1ng/mlであることがこのましい。

【産業上の利用可能性】

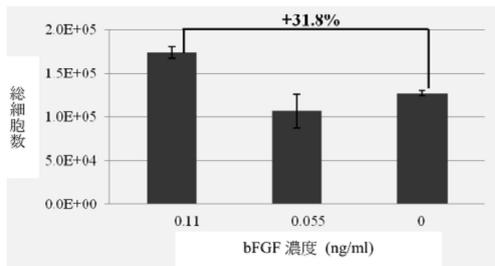
【0050】

本発明に係るスキンケア用組成物の製造方法は、血清無含有の培地を用い、細胞を既定の日数培養することにより、サイトカインを回収することができる。また、凍結融解サイクルを繰り返すことにより、細胞を破壊し、ポリペプチド混合物を得ることができると共に、濃縮・脱塩を施すことにより、特定の分子量を有する組成物を得ることができる。

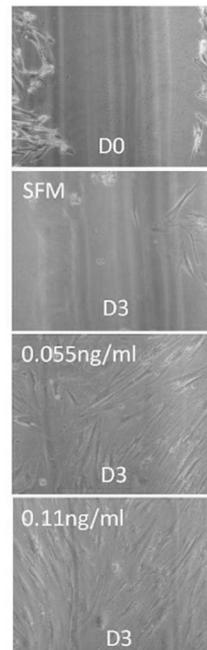
20

得られた組成物は、皮膚コラーゲンの増加を刺激する効果を有するものである。

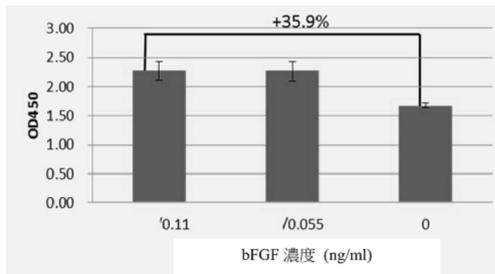
【図1】



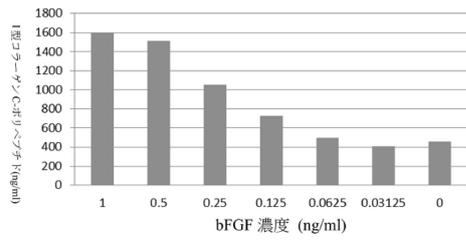
【図3】



【図2】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 Q 19/00 (2006.01) A 6 1 Q 19/00

(56)参考文献 国際公開第2009/048119(WO, A1)  
特開平07-179356(JP, A)  
特開2009-221207(JP, A)  
特表2008-531712(JP, A)  
特表2014-525398(JP, A)  
特開2007-129942(JP, A)  
特開2014-144959(JP, A)  
特表2010-515443(JP, A)  
特開2002-080378(JP, A)  
臨床免疫, 1992年, 24(1), 145-52  
Placenta, 2011年, 32, 153-60

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 5 1

A 6 1 K 8 / 6 4

A 6 1 K 8 / 9 8

A 6 1 K 3 8 / 1 9

A 6 1 P 1 7 / 0 0

A 6 1 Q 1 9 / 0 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)