

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年11月1日(01.11.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/199231 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/113 (2010.01) A61K 35/50 (2015.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/016990

(22) 国際出願日: 2018年4月26日(26.04.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-089024 2017年4月28日(28.04.2017) JP

(71) 出願人:一丸ファルコス株式会社(ICHIMARU PHARCOS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5010475 岐阜県本巣市浅木318番地1 Gifu (JP). 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).

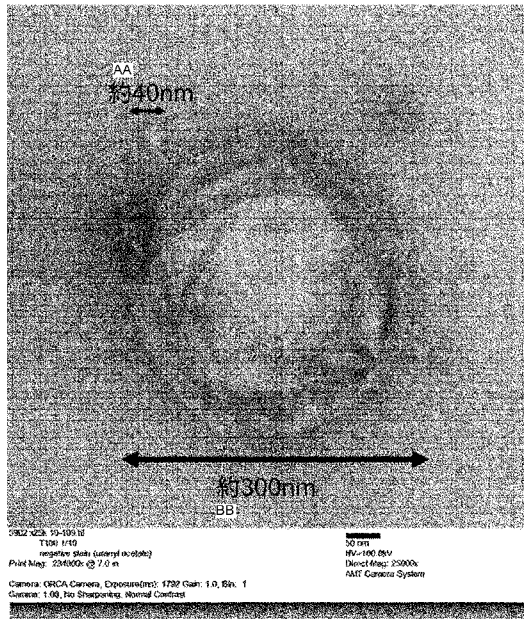
(72) 発明者: 高山 和江 (TAKAYAMA Kazue); 〒5010475 岐阜県本巣市浅木318番地1 一丸ファルコス株式会社内 Gifu (JP). 田原 栄俊 (TAHARA Hidetoshi); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究科内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人:めぶき国際特許業務法人, 外(MEBUKI IP LAW FIRM et al.); 〒4080044 山梨県北杜市小淵沢町1037番地5 Yamanashi (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: PLACENTA EXTRACT

(54) 発明の名称: プラセンタ抽出物



AA Approx. 40 nm
BB Approx. 300 nm

(57) Abstract: In the present invention, exosomes are extracted from placenta extracts and a method is established for producing swine placenta extracts, which contain a high level of exosomes. In the exosomes, multiple miRNAs having anti-aging effects were found. Exosomes containing these miRNAs can be used for: oral compositions such as tablets, supplements, and beverages having anti-aging effect; cosmetics such as lotions, cosmetic oils, and facial cleansing creams; and a fibroblast cell growth promoter.

(57) 要約: プラセンタ抽出物からエクソソームを抽出し、エクソソーム含量の高い豚プラセンタ抽出物の製造方法を確認した。このエクソソーム内には抗老化作用を有する複数のmiRNAが見出され、これらのmiRNAを含むエクソソームは、抗老化効果を有する錠剤、サプリメントおよび飲料などの経口組成物、乳液、化粧用オイルおよび洗顔クリームなどの化粧品、ならびに線維芽細胞増殖促進剤として利用することができる。



WO 2018/199231 A1

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： プラセンタ抽出物

クロスリファレンス

[0001] 本出願は、2017年4月28日に日本国において出願された特願2017-089024号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。また、本願において引用した全ての特許、特許出願及び文献に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。

技術分野

[0002] 本発明は、プラセンタに由来するエクソソームを含有する各種組成物（経口組成物、化粧品組成物、線維芽細胞増殖促進剤）の提供、およびエクソソームを含有するプラセンタ抽出物、エクソソームの製造方法に関する。

背景技術

[0003] プラセンタ（胎盤）抽出物は美容効果や健康効果をねらい、化粧品やサプリメントに配合されている（特許文献1）。プラセンタ抽出物中には、アミノ酸、ペプチド、核酸などが含まれ、それらが相乗的に生理作用に寄与していると考えられてきたが、機能性関与成分の特定や生体内への吸収など解明されていない点も多いのが現状である。そういった背景から、プラセンタ抽出物内の機能性成分の特定が食品、医薬品市場で望まれていた。

[0004] 近年、エクソソーム（細胞外小胞体）として知られる細胞分泌物が注目されている。生体内において、エクソソームは様々な臓器に由来する細胞から分泌される。これらのエクソソームには、miRNA（マイクロRNA）やアミノ酸、ペプチドなどの生理活性物質が含まれ、輸送体として働き、ホルモン様に臓器間のクロストークに役立つことが知られている（非特許文献1）。妊娠時の胎盤からもエクソソームが放出され、胎児と母体のクロストークに働いていることも報告されている（非特許文献2）。

[0005] また、ヒトの血清中に食物のエクソソームに由来するmiRNAが検出さ

れることから、エクソソームは消化管から吸収される可能性があることも知られている（非特許文献3）。これらの食物由来エクソソームは、吸収され、免疫調整などの生体の機能に有用な役割を果たすことも報告されているが、メカニズムについては不明な点も多く、特に、細胞レベルでの解明は十分ではなかった（非特許文献4）。

[0006] miRNAとは、20～25塩基からなる微小RNAである。ヒト等の生体においては数千種類のmiRNAが存在することが知られている。miRNAはタンパク質へ翻訳されないRNAであるが、メッセンジャーRNA(mRNA)配列に部分相補的に結合することで、直接的に、ほかの遺伝子の発現を調節する事ができる。1種類のmiRNAが、複数の遺伝子の発現制御に関わっていること、もしくは、複数のmiRNAの組み合わせによって機能が発揮されることもある。つまり、miRNAは単一でも機能できるときもあるが、ほかの種類のmiRNAと協力することで、複数のmRNAの遺伝子発現を抑制している。

[0007] 一方、プラセンタ抽出物による美容効果や健康効果の多くには抗老化効果が期待されるものが多いのも現状であるが、細胞レベルでの解明は十分ではなかった。プラセンタ抽出物はこのような背景から、細胞レベルでの解明も望まれていた。

[0008] 細胞レベルでの老化は、in vitroにおいて、細胞の増殖力や細胞の大きさを指標に調べることができる。例えば、動物の支持組織に存在する繊維芽細胞では、生体の老化と同様に培養継代数が増えるごとに増殖能力が低下することが知られている。また、動物種ごとに、増殖能力が低下する継代数は異なるが、ヒトの線維芽細胞では約80継代で増殖しなくなる（非特許文献5）。また、増殖能力の低下と同時に細胞の大きさが大きくなることも知られている。この現象は、老化に伴う細胞内のタンパク質の分子構造の変化や細胞の代謝能力の低下によるものである。（非特許論文6）

[0009] 生体の老化も、細胞レベルの老化を反映したものであると考えられており、皮膚、肝臓、骨などの増殖が盛んな臓器においても、老化に伴い、増殖能

力や代謝スピードが低下することが知られていた。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開2013-34423号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：臨床血液57巻（2016）10号 p. 1874-1880

非特許文献2：Stem Cells Cloning. 2015 Jul 7 ;
8 : 103-7.

非特許文献3：Bioessays. 2014 Apr ; 36(4) : 394-
406.

非特許文献4：RNA Biol. 2013 Jul ; 10(7) : 1080-6

非特許文献5：Experimental Cell Research 19
65 March ; 37 (3) : 614-636.

非特許文献6：Chromosoma. 2, 007 Oct ; 116 (5) :
431-40.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の課題は、有効成分が不明であったプラセンタ抽出物中の有効成分、およびこの有効成分を含むプラセンタ抽出物の製法を見出し、より活性の高い分画成分を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは前記課題を解決するため、プラセンタ抽出物中のエクソソームを抽出し、エクソソームおよびエクソソーム含量の高い豚プラセンタ抽出物の製造方法を確立した。さらに、エクソソーム内には表1～表3に記載した162種のmiRNAが含まれており、これらはヒト由来のエクソソームに含まれるmiRNAの塩基配列と同一であり、その内の27種（配列番号

3、8、10、18、22、29、33、34、37、39、41、51、60、61、66、71、72、75、76、77、105、108、109、138、148、157、159) については老化細胞で減少していることを確認した。

また、プラセンタ由来のエクソソーム、及び該エクソソームに含まれているmiRNAと同様の塩基配列をもつ合成miRNAをヒト線維芽細胞に添加したところ、細胞増殖が促進されたこと、細胞面積が減少したことを確認した。

[0014]

[表1]

配列番号	miRNA名	配列 5'→3'	老化細胞で減少
1	let-7a-1//let-7a-2//let-7a-3	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	
2	let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTTT	
3	let-7d	CTATACGACCTGCTGCCTTCT	*
4	let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	
5	let-7f-1//let-7f-2	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	
6	let-7f-2	GAGGTAGTAGATTGTATAGTTT	
7	let-7g	TGAGGTAGTAGTTGTACAGTT	
8	let-7i	TGAGGTAGTAGTTGTGCTGTT	*
9	mir-100	CCGTAGATCCGAACCTTGTG	
10	mir-103a-2//mir-103a-1//mir-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTAT	*
11	mir-106b	AAAGTGTGACAGTGCAGAT	
12	mir-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	
13	mir-10b	TACCCTGTAGAACC GAATTTGTG	
14	mir-1-2//mir-1-1	TGGAATGTAAGAAGATGTAT	
15	mir-1254-1//mir-1273e	CCACTGTA CTCCAGC	
16	mir-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA	
17	mir-125b-1//mir-125b-2	TCCCTGAGACCCTAACCTGTGA	
18	mir-126	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG	*
19	mir-1260b	ATCCCACCCTGCCACCA	
20	mir-1303	GGGCAACATAGCGAGACC	
21	mir-1307	CTCGGCGTGGGTCGGTCGTGG	
22	mir-130a	CAGTGCAATGTTAAAGGGCATT	*
23	mir-130b	ACTCTTCCCTGTTGCACTACT	
24	mir-133a-1//mir-133a-2	TTTGGTCCCTTCAACCAGCTGT	
25	mir-1343	CTCCTGGGGCCCGCACTCTCG	
26	mir-139	TCTACAGTGACAGTGTCTCCAGT	
27	mir-140	ACCACAGGGTAGAACCACGGACA	
28	mir-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGGCT	
29	mir-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC	*
30	mir-145	GTCCAGTTTCCCAGGAATCCCTT	
31	mir-146a	AGAACTGAATTCATGGGTT	
32	mir-146b	GAGAACTGAATTCATAGGCT	
33	mir-148a	TCAGTGCACTACAGAATTTGT	*
34	mir-148b	GAAGTCTGTATACACTCAGGC	*
35	mir-150	TCTCCAACCCCTGTACCAGTG	
36	mir-151a	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGA	
37	mir-15a	GCAGCACATAATGGTTTGTG	*
38	mir-16-1//mir-16-2	TAGCAGCACGTAATAATTGGCGT	
39	mir-17	TCAAAGTGCTTACAGTGCAGGT	*
40	mir-181a-2//mir-181a-1	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT	
41	mir-183	ATGGCACTGGTAGAATTCACT	*
42	mir-185	TGGAGAGAAAAGGCAGTTCCTGA	
43	mir-186	GCCCAAAGGTGAATTTTTGGGA	
44	mir-187	TCGTGTCTTGTGTGCAGCCGG	
45	mir-191	CAACGGAATCCAAAAGCAGCTGTT	
46	mir-192	CTGACCTATGAATTGACAGCC	
47	mir-193a	AACTGGCCTACAAAGTCCCAGT	
48	mir-193b	CGGGGTTTTGAGGGCCGAGA	
49	mir-195	TAGCAGCACAGAAATTTGGCA	
50	mir-199a-1//mir-199a-2	CCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTT	
51	mir-199b	CCCAGTGT TAGACTATCTGTTT	*
52	mir-19b-1//mir-19b-2	TGTGCAAAATCCATGCAAACTGA	
53	mir-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	
54	mir-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATGA	

[0015]

[表2]

配列番号	miRNA名	配列 5' → 3'	老化細胞で減少
55	mir-200c	TAATACTGCCGGTAATGATGGA	
56	mir-203a	GTGAAATGTTTAGGACCACTAG	
57	mir-204	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	
58	mir-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTGT	
59	mir-208a	TAAGACGAGCAAAAAGCTTGT	
60	mir-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	*
61	mir-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT	*
62	mir-210	CTGTGGGTGTGACAGCGGCT	
63	mir-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	
64	mir-218-1//mir-218-2	TTGTGCTTGATCTAACCATGT	
65	mir-22	AAGCTGCCAGTTGAAGAAGTGT	
66	mir-221	TGTCTGCTGGGTTTC	*
67	mir-223	TGTCAGTTTTGTCAAATACCCCAA	
68	mir-23a	ATCACATTGCCAGGGATTCCA	
69	mir-23a//mir-23b	ATCACATTGCCAGGGATT	
70	mir-23b	ATCACATTGCCAGGGATTACCAC	
71	mir-24-1//mir-24-2	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	*
72	mir-24-2	TGCCTACTGAGCTGAAACACAGT	*
73	mir-25	CATTGGACTTGTCTCGGTGTA	
74	mir-26a-1//mir-26a-2	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	
75	mir-26b	TTCAAGTAATCCAGGATAGGTT	*
76	mir-27a	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG	*
77	mir-27b	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGCA	*
78	mir-28	CACTAGATTGTGAGCTCCTGGA	
79	mir-299	TGGTTTACCGTCCCACATACAT	
80	mir-29a	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	
81	mir-29a-2	TAGCACCATCTGAAATCGGTTAT	
82	mir-29b-1//mir-29b-2	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	
83	mir-29c	TGACCGATTCTCCTGGTGTTC	
84	mir-302d	AGTGCTTCCATGTTGAGTGT	
85	mir-30a	TGTAACATCCTCGACTGGAAGCT	
86	mir-30b	TGTAACATCCTACACTCAGCT	
87	mir-30c-2	TGGGAGAAGGCTGTTACTCT	
88	mir-30c-2//mir-30c-1	TGTAACATCCTACACTCTCAGCT	
89	mir-30d	TGTAACATCCCGACTGGAAGCT	
90	mir-30e	TGTAACATCCTTACTGGAAGCT	
91	mir-3178	CGGGGCCGGCCGGA	
92	mir-32	TATTGCACATTAAGTTGC	
93	mir-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGAA	
94	mir-320c-1//mir-320d-1//mir-320c-2//mir-320d-2	AAAAGCTGGGTTGAGA	
95	mir-324	CGCATCCCCTAGGGCATT	
96	mir-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT	
97	mir-339	TCCCTGTCCCTCCAGGAGCTCAC	
98	mir-342	TCTCACACAGAAATCGCACCCGT	
99	mir-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	
100	mir-34c	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC	
101	mir-3529	CAACAAAATCACTAGTCTTCCA	
102	mir-3591	AAACACCATTGTCCACTCCA	
103	mir-361	TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC	
104	mir-362	AACACACCTATTCAAGGATTCA	
105	mir-363	GGTGGATCACGATGCAATTT	*
106	mir-365a//mir-365b	TAATGCCCTAAAAATCCTTAT	
107	mir-3665	GGCGGCGGCGGCGGC	
108	mir-374a	TTATAATACAACCTGATAAGTG	*

[0016]

[表3]

配列番号	miRNA名	配列 5'→3'	老化細胞で減少
109	mir-374b	ATATAATACAACCTGCTAA	*
110	mir-375	TTTGTTTCGTTTCGGCTCGCGTG	
111	mir-376b	ATCATAGAGGAAAAATCCATGT	
112	mir-376c	AACATAGAGGAAATCCACGTT	
113	mir-378a-3p	ACTGGACTTGGAGTCAGAAAGGC	
114	mir-378a-5p	CTCCTGACTCGAGGTCCTGTGT	
115	mir-382	GAAGTTGTTTCGTGGTGGATT	
116	mir-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC	
117	mir-423	AAGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT	
118	mir-424	CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA	
119	mir-425	AATGACACGATCACTCCCGTTGAG	
120	mir-4286	CCCCACTCCTGGTACCA	
121	mir-4417	CCAGCCCCAGCATCC	
122	mir-4454	ATCCGAGTCACGGCACCA	
123	mir-4472-2	GGTGGGGTGGGGGT	
124	mir-4485	GTTTAACGGCCGCGGT	
125	mir-4492	GGGCTGGGCGCGCGCC	
126	mir-4497	CTCCGGGACGGCTGG	
127	mir-449b	CAGTGTATTGTTAGCTGGC	
128	mir-4508	AGCGGGCTGGGCGCGC	
129	mir-450a-1//mir-450a-2	TTTTGCGATGTGTTCTAAT	
130	mir-450b	TTTTGCAATATGTTCTGAAT	
131	mir-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT	
132	mir-4532	CGGGGAGCCCGCGCG	
133	mir-4634	GCGCGACCGGCCCGG	
134	mir-4787	CGGGGTGGCGCGCG	
135	mir-4787-2	GCGGGGTGGCGCGC	
136	mir-483	TCACTCCTCTCCTCCCGTCTTCT	
137	mir-484	TCAGGCTCAGTCCCTCCCGAT	
138	mir-489	TGACATCACATATACGGCAGC	*
139	mir-505	GTCAACACTTGCTGGTTTTCTCT	
140	mir-5100	ATCCCAGCGGTGCCTC	
141	mir-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT	
142	mir-542	TGGGGATCATCATGTCACGAGA	
143	mir-558	GTGTGTGTGTGTGTGTGTG	
144	mir-6087	GAGGGGCTCTCGCTTCTGGCGCC	
145	mir-6089-1//mir-6089-2	GGGGTGGGGCGGGC	
146	mir-6127	TCCTCCTCCTCCTCCTCC	
147	mir-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTGC	
148	mir-660	TACCCATTGCATATCGGAGTTG	*
149	mir-6724-1//mir-6724-2//mir-6724-3//mir-6724-4	GGCCCGCGGGCGGGC	
150	mir-7-1//mir-7-2//mir-7-3	GGAAGACTAGTGATTTTTGTGT	
151	mir-744	TGCGGGCTAGGGCTAACAGCA	
152	mir-7641-1	GGGTTGGCCCTGGTTAGTAC	
153	mir-7641-1//mir-7641-2	GATCTCGGAAGCTAAGCAGGT	
154	mir-7641-2	AGCAGGGTCGGCCTGGTTAGTACTTGGAT	
155	mir-7975	ATCCTAGTCACGGCACCA	
156	mir-8485	ACACACACACACACACACACACACAC	
157	mir-874	CCTGGCCCGAGGGACCGA	*
158	mir-92a-1//mir-92a-2	TATTGCACITGTCGGCCCTGT	
159	mir-93	ACTGCTGAGCTAGCACTTCCCGA	*
160	mir-98	CTATACAACCTACTACTTCC	
161	mir-99a	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG	
162	mir-99b	CACCCGTAGAACCAGCCTTGCG	

[0017] すなわち、本発明の一実施形態に係るエクソソームは、(i) 配列番号 1 ~ 162 のいずれかで示される塩基配列の核酸分子、(ii) (i) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する核酸分子、または (iii) (i) の塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および/または置換を有する塩基配列の核酸分子、からなる群より選択される少なくとも1種の核

酸分子を含有し、哺乳類のプラセンタからの抽出物であることを特徴とするエクソソーム。ただし、前記核酸分子がRNAの場合は、前記各塩基配列で示されるTがUである。

- [0018] 上記エクソソームの好ましい態様では、少なくとも1種の核酸分子が、配列番号3、8、10、18、22、29、33、34、37、39、41、51、60、61、66、71、72、75、76、77、105、108、109、138、148、157および159で示される塩基配列の核酸分子を含有する。ただし、各核酸分子の塩基配列は、当該塩基配列と90%以上の同一性を有するか、または当該塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有してもよい。
- [0019] 上記エクソソームの他の好ましい実施形態において、少なくとも1種の核酸分子が、配列番号16、74および87で示される塩基配列の核酸分子、を含有する。ただし、各核酸分子の塩基配列は、当該塩基配列と90%以上の同一性を有するか、または当該塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有してもよい。
- [0020] また、本発明の他の実施形態では、上記エクソソームまたはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを有効成分として含有する経口組成物を提供する。
- [0021] さらに他の実施形態では、上記エクソソームまたはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを有効成分として含有する化粧品組成物を提供する。
- [0022] さらになお別の実施形態は、上記エクソソームまたはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを有効成分として含有する線維芽細胞増殖促進剤である。
- [0023] 本発明の他の視点において、哺乳類のプラセンタを熱水で抽出し、プロテアーゼによる酵素分解を行い、球状構造をしたエクソソームを含有するプラセンタ抽出物を回収することを特徴とするプラセンタ抽出物の製造方法が提供される。

[0024] さらに別の視点において、上記エクソソーム、または *mir-125a*、*mir-26a* および／または *mir-30c* の *miRNA* を、哺乳動物細胞に投与することを特徴とする細胞の老化を抑制する方法を提供する。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、プラセンタ由来エクソソーム、エクソソームに含まれる *miRNA* を提供することが可能である。また、エクソソームをヒト線維芽細胞に添加後、線維芽細胞が増殖したことも確認した。以上より、プラセンタ由来のエクソソームを含む組成物を経口投与、または経皮投与することで、真皮の構造を強化し、肌のはり、しわ、たるみ等を改善する美容、抗老化用途として提供することが可能となった。また、エクソソームに含まれる *miRNA* と同じ塩基配列を有する合成 *miRNA* を添加した場合も同様な効果がみられ、同様な効果が期待できる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]豚プラセンタ抽出物中に含まれていたエクソソームの電子顕微鏡写真である。

[図2]豚プラセンタ抽出物中に含まれていたエクソソームの粒度解析を示す図である。

[図3]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（66 PDL）を免疫染色した写真である。

[図4]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（66 PDL）の細胞数を示す図である。

[図5]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（66 PDL）の細胞サイズを示す図である。

[図6]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（83 PDL）を免疫染色した写真である。

[図7]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（83 PDL）の細胞数を示す図である。

[図8]エクソソーム添加、非添加時のヒト線維芽細胞（83 PDL）の細胞サ

イズを示す図である。

[図9]トランスウェル移行アッセイによる、本発明のエクソソームのマクロファージ遊走能を評価した結果である。

発明を実施するための形態

[0027] 尚、本発明で使用する豚プラセンタとは、特定疾患原因のないブタ（SPFブタ）の正常分娩により娩出される胎盤を用いる。また、本発明におけるエクソソームとは、ペプチド、たんぱく質、核酸等を内包し、脂質表面からなる球状の組成物である。

[0028] 本発明で使用する豚プラセンタ抽出物の抽出溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブタノール、イソブタノール等の低級アルコール或いは含水低級アルコール、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、1, 2-ブチレングリコール、1, 4-ブチレングリコール、1, 5-ペンタンジオール、1, 2-ペンタンジオール、1, 3-ペンタンジオール、1, 4-ペンタンジオール、1, 3, 5-ペンタントリオール、グリセリンや、適宜規定度を調製した酸（塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ギ酸、酢酸等）やアルカリ（水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、アンモニア等）の中から選ばれる1種もしくは2種以上の混液が挙げられ、特に水を選択することが好ましい。但し、用途により溶媒の含有が好ましくない場合においては、水のみを使用するか、或いは抽出後に溶媒を除去しやすい、揮発性の高い溶媒を用いて抽出を行い、溶媒除去後水等に溶解させるといった方法も可能である。さらにプロテアーゼを加えることが好ましい。用いるプロテアーゼとしては天野エンザイム社製の食品加工用プロテアーゼであるプロテアーゼA「アマノ」SD、プロテアーゼM「アマノ」SDまたはプロテアーゼP「アマノ」3SD等が好ましいがこれらに限定されない。

[0029] 抽出方法については、原料に対する溶媒の重量比率、又は抽出時間について任意に設定することができる。原料に対する溶媒の重量比率は、例えば原料：溶媒が、4：1～1：100の範囲内で任意に設定することができ、特

に1：1～1：20の重量比率が好ましい。

[0030] 本発明で使用する豚プラセンタ抽出物は、溶媒抽出後、更に適宜精製操作を施すことも可能であり、精製操作としては、クロマトグラフィーを用いた分画、濾紙やメンブランフィルター、限外濾過膜等を用いた濾過、乾燥、pH調整、脱臭、脱色、長時間の静置保管等が例示でき、これらを任意に選択し、組合わせた処理を行うことが可能である。

[0031] また、本発明で使用するエクソソームとは、豚プラセンタ抽出物粉体を水で溶解したもの、または豚プラセンタ抽出液から、超遠心法によって遠心分離することにより、高濃度で得ることができ、その遠心分離の前後に、ろ過等の精製操作を行うことが可能である。

[0032] このようにして得られたエクソソームから核酸分子を抽出し、次世代シーケンサを用いて塩基配列を解析し、ヒトマイクロRNAのデータベースを検索した結果、上記表1～3に示した塩基配列を有することが分かった。すなわち、少なくとも豚プラセンタ中にはこれらのヒトマイクロRNAと同じ配列を有する核酸分子が存在する。なお、好ましい核酸分子はマイクロRNAであり、その場合は、配列中のT（チミン）はU（ウラシル）である。本明細書において、プラセンタとは、出産後の母体から得ることができる胎盤組織を意味し、妊娠した動物の子宮内に形成され、母体と胎児を連絡する器官である。哺乳類のプラセンタ（胎盤）は構造的、機能的に類似していることから、豚以外のプラセンタ、例えば、羊プラセンタ、馬プラセンタ、牛プラセンタおよびヒトプラセンタを用いることもできる。これらの中でも、入手の容易性および安全性の観点から豚プラセンタが好ましい。

[0033] 本明細書において、マイクロRNA（*microRNA*；*miRNA*）とは、典型的には、成熟*miRNA*と呼ばれているものを意味する。成熟*miRNA*は、ゲノム上にコードされた内在性の20～25塩基程度の非コードRNAである。*miRNA*は、ゲノムDNA上の*miRNA*遺伝子から、まず数百～数千塩基程度の長さの一次転写物として転写され、次にプロセッシングを受けて約60～70塩基程度のヘアピン構造を有する前駆体*miRN*

Aとなる。その後、核から細胞質内へ移動し、さらにプロセッシングを受けて20～25塩基程度の二本鎖成熟miRNAとなる。二本鎖成熟miRNAは、そのうちの一本鎖がRISCと呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、標的遺伝子のmRNAに作用することで、標的遺伝子の翻訳を阻害する働きをすることが知られている。したがって、本明細書において、「miRNA」は、内在性の一本鎖及び二本鎖miRNAのみならず、これらのmiRNAと同一の塩基配列からなる合成核酸も包含する。また、miRNAは、その前駆体も包含する。

[0034] 例えば、「miR-125a」は、上記マイクロRNAの前駆体も成熟型もどちらも含むが、好ましくは成熟型であり、成熟型としては、miR-125a-5p（配列番号163）やmiR-125a-3p（配列番号166）が例示される。また、「miR-30c」は、成熟型として、miR-30c-5p（配列番号164）やmiR-30c-3p（配列番号167）を含む。同様に、「miR-26a」は、成熟型として、miR-26a-5p（配列番号165）やmiR-26a-3p（配列番号168）を含む。これらのmiRNAは、例えばサングー研究所が作成しているmiRBaseデータベース：<http://microrna.sanger.ac.uk/>等に、その塩基配列が開示されている。

[0035] 本発明では表1～3に示したmiRNAに関連して、以下のいずれかの核酸を意味する。

(i) 配列番号1～162のいずれかで示される塩基配列を有するRNA、

(ii) 配列番号1～162のいずれかで示される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するRNA、または

(iii) 配列番号1～162のいずれかで示される塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有する塩基配列を有するRNA。ただし、表1～3の各配列で示されるT（チミン）はU（ウラシル）である。なお、一般的に、成熟miRNAの5'末端から2～7番目の塩基から始まる7塩基は、シード配列と呼ばれている。この配列は、ターゲ

ットとなる mRNA の配列と完全に相補的でなければならないが、その他の塩基は必ずしも完全一致しなくともよいことが知られている。したがって、本発明の miRNA において、配列番号 1 ~ 162 に示す各配列のコアとなる配列が完全に一致すればよく、その 5' 側または 3' 側の配列が 1 または数個の塩基の欠失、付加および／または置換を有してもよい。数個とは、1 ~ 10 個が含まれ、好ましくは 5 個以下であり、より好ましくは 1 ~ 3 個である。コアとなる配列（シード配列）はターゲットとなる mRNA を解析することにより特定することができる。

[0036] 「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて 2 つのヌクレオチド配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全ヌクレオチド残基に対する、同一ヌクレオチド残基の割合（%）を意味する。

例えば、ヌクレオチド配列における同一性は、相同性計算アルゴリズム NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST-2 を用い、以下の条件（ギャップオープン = 5 ペナルティ；ギャップエクステンション = 2 ペナルティ；x__ドロップオフ = 50；期待値 = 10；フィルタリング = ON）にて 2 つのヌクレオチド配列をアラインすることにより、計算することができる。

[0037] また、本発明で使用する miRNA は、本発明で行った試験のように合成して得ることの他、同様な塩基配列を有する miRNA を抽出、精製することによって得ることも可能である。例えば、上記 (i) ~ (iii) に示した miRNA の塩基配列において一部の塩基がデオキシリボヌクレオチドに置き換えられたキメラ核酸であってもよい。

[0038] 本発明を実施する上で用いるエクソソーム、miRNA、豚プラセンタ抽出物、およびそれらを含む経口組成物としては、液状、固形状、粉末状、ペースト状等いずれの形状でも良く、最適な形状を任意に選択することができる。

る。

[0039] 上記抽出物、エクソソーム、およびmiRNAの含有量としては、本発明の効果を有することが確認できる範囲であれば特に制限はないが、一般的には0.0001mg/g~10mg/g（分母は製剤の重量を示す）の範囲に設定される。好ましくは0.001mg/g~10mg/gの範囲であって、最も好ましくは0.001mg/g~1mg/gである。

[0040] 本発明におけるエクソソーム、miRNA、線維芽細胞増殖促進剤は医薬品に配合する用途が好ましい。医薬品としては、経口投与又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングルコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。又、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、張化剤等の慣用の添加剤を適宜添加して、使用することができる。

[0041] また、エクソソーム、miRNAを経口組成物、化粧品、線維芽細胞増殖促進剤に配合する場合は、本発明の効果を損なわない範囲内で、下記に例示する成分や添加剤を任意に選択・併用して各種製剤を製造することができ、製剤中における含有量は、特に限定されないが、通常0.0001~50%の濃度範囲が好ましい。

[0042] 例えば、エクソソーム、miRNAを配合する経口組成物としては、そのまま又は種々の栄養補給、滋養強壮、疲労回復、体質改善等を加えて、食品中に含有せしめて、栄養補助食品、健康補助食品、栄養調整食品、保健機

能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、サプリメント、食品素材として食される。例えば、上述した適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形して食用に供しても良く、又、種々の食品、例えば、かまぼこ、ちくわ等の加工水産ねり製品、ソーセージ、ハム等の畜産製品、洋菓子類、和菓子類、生めん、中華めん、ゆでめん、ソバ等のめん類、ソース、醤油、タレ、砂糖、ハチミツ、粉末あめ、水あめ等の調味料、カレー粉、からし粉、コショウ粉等の香辛料、ジャム、マーマレード、チョコレートスプレッド、漬物、そう菜、ふりかけ、又は各種野菜・果実の缶詰・瓶詰等の加工野菜・果実類、チーズ、バター、ヨーグルト等の乳製品、みそ汁、スープ、果実ジュース、野菜ジュース、乳清飲料、清涼飲料、酒類等の飲料、流動食等の一般嗜好性飲食品に添加して使用することができ、又、ペットフード、動植物用飼料等にも使用することができる。又、飲食品組成物においては、栄養補給、疲労回復、強壮、細胞賦活（細胞老化防止）等の健身等の効果をはじめ、味覚の改善、色調や芳香、光沢の付与、安定化、増粘等の目的で使用することができる。さらに、この他にも、これまでに知られている各原料素材の様々な薬剂的効果を期待し、これらを組み合わせることによって、本発明の目的とする効果の増進を図ったり、多機能的な効果を期待したりする製品とすることも可能である。

[0043] 例えば、エクソソーム、miRNAを配合する化粧品としては、各種の皮膚外用剤類（動物用に使用する製剤も含む）全般において利用でき、具体的には、アンプル、カプセル、丸剤、錠剤、粉末、顆粒、固形、液体、ゲル、気泡、エマルジョン、シート、ミスト、スプレー剤等利用上の適当な形態の1)医薬品類、2)医薬部外品類、3)局所用又は全身用の皮膚用化粧品類（例えば、化粧水、乳液、クリーム、美容液、軟膏、ローション、オイル、パック等の基礎化粧品、まつ毛用塗布剤、まつ毛用美容液、まつ毛用トリートメント、まつ毛用パーマ剤、まつ毛用育毛剤等のまつ毛用化粧品、洗顔料や皮膚洗浄料、マッサージ用剤、クレンジング用剤、除毛剤、脱毛剤、髭剃り処理料

、アフターシェーブローション、プレシェーブローション、シェービングクリーム、ファンデーション、口紅、頬紅、アイシャドウ、アイライナー、マスカラ等のメイクアップ化粧品、香水類、美爪剤、美爪エナメル、美爪エナメル除去剤、パップ剤、プaster剤、テープ剤、シート剤、貼付剤、エアゾール剤等)、4)頭皮・頭髪に適用する薬用又は/及び化粧用の製剤類(例えば、シャンプー剤、リンス剤、ヘアトリートメント剤、プレヘアトリートメント剤、パーマメント液、染毛料、整髪料、ヘアトリートメント剤、育毛・養毛料、パップ剤、プaster剤、テープ剤、シート剤、貼付剤、エアゾール剤等)、5)浴湯に投じて使用する浴用剤、6)その他、腋臭防止剤や消臭剤、防臭剤、制汗剤、衛生用品、衛生綿類、ウエットティッシュ、歯磨き類、口中清涼剤、含嗽剤等が挙げられる。

[0044] 尚、本発明のエクソソーム、miRNA、およびエクソソームまたはmiRNAを含む経口組成物、化粧品、線維芽細胞増殖促進剤には、前記の必須成分に加え必要に応じ、本発明の効果を損なわない範囲内で、下記に例示する成分や添加剤を任意に選択・併用して各種製剤を製造することができ、製剤中における含有量は、特に限定されないが、通常0.0001~50%の濃度範囲が好ましい。

[0045] 高分子・増粘剤・ゲル化剤としては、グアーガム、ローカストビーンガム、クィーンズシード、カラギーナン、ガラクトタン、アラビアガム、タラガム、タマリンド、ファーセララン、カラヤガム、トロロアオイ、キャラガム、トラガントガム、アルギン酸及びナトリウム塩等の塩、マンナン；コメ、トウモロコシ、バレイショ、コムギ等のデンプン；キサンタンガム、デキストラン、サクシノグルカン、カードラン、ヒアルロン酸及びその塩、ザンサンガム、プルラン、ジェランガム、キチン、キトサン、寒天、カツソウエキス、コンドロイチン硫酸塩、カゼイン、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース及びそのナトリウム等の塩、メチルヒドロキシプロピルセルロース、セルロース硫酸ナトリウム

ム、ジアルキルジメチルアンモニウム硫酸セルロース、結晶セルロース、セルロース末等のセルロース及びその誘導体；可溶性デンプン、カルボキシメチルデンプン、メチルヒドロキシプロピルデンプン、メチルデンプン等のデンプン系高分子、塩化ヒドロキシプロピルトリモニウムデンプン、オクテニルコハク酸トウモロコシデンプンアルミニウム等のデンプン誘導体；アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル等アルギン酸誘導体；ポリビニルピドリドン（PVP）、ポリビニルアルコール（PVA）、ビニルピドリドン・ビニルアルコール共重合体、ポリビニルメチルエーテル；ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体；（メタクリロイルオキシエチルカルボキシベタイン／メタクリル酸アルキル）コポリマー、（アクリレーツ／アクリル酸ステアリル／メタクリル酸エチルアミノオキシド）コポリマー等の両性メタクリル酸エステル共重合体；（ジメチコン／ビニルジメチコン）クロスポリマー、（アクリル酸アルキル／ジアセトンアクリルアミド）コポリマー、（アクリル酸アルキル／ジアセトンアクリルアミド）コポリマーAMP；ポリ酢酸ビニル部分けん化物、マレイン酸共重合体；ビニルピロリドン・メタクリル酸ジアルキルアミノアルキル共重合体；アクリル樹脂アルカノールアミン；ポリエステル、水分散性ポリエステル；ポリアクリルアミド；ポリアクリル酸エチル等のポリアクリル酸エステル共重合体、カルボキシビニルポリマー、ポリアクリル酸及びそのナトリウム塩等の塩、アクリル酸・メタアクリル酸エステル共重合体；アクリル酸・メタアクリル酸アルキル共重合体；ポリクオタニウム－10等のカチオン化セルロース、ポリクオタニウム－7等のジアルキルジメチルアンモニウムクロリド・アクリルアミド共重合体、ポリクオタニウム－22等のアクリル酸・ジアルキルジメチルアンモニウムクロリド共重合体、ポリクオタニウム－39等のアクリル酸・ジアルキルジメチルアンモニウムクロリド・アクリルアミド共重合体、アクリル酸・カチオン化メタアクリル酸エステル共重合体、アクリル酸・カチオン化メタアクリル酸アミド共重合体、ポリクオタニウム－47等のアクリル酸・アクリ

ル酸メチル・塩化メタクリルアミドプロピルトリメチルアンモニウム共重合体、塩化メタクリル酸コリンエステル重合体；カチオン化オリゴ糖、カチオン化デキストラン、グアーヒドロキシプロピルトリモニウムクロリド等のカチオン化多糖類；ポリエチレンイミン；カチオンポリマー；ポリクオタニウム-51等の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体及びメタクリル酸ブチル共重合体等との共重合体；アクリル樹脂エマルジョン、ポリアクリル酸エチルエマルジョン、ポリアクリルアルキルエステルエマルジョン、ポリ酢酸ビニル樹脂エマルジョン、天然ゴムラテックス、合成ラテックス等の高分子エマルジョン；ニトロセルロース；ポリウレタン類及び各種共重合体；各種シリコン類；アクリル-シリコングラフト共重合体等のシリコン系各種共重合体；各種フッ素系高分子；1,2-ヒドロキシステアリン酸及びその塩；パルミチン酸デキストリン、ミリスチン酸デキストリン等のデキストリン脂肪酸エステル；無水ケイ酸、煙霧状シリカ（超微粒子無水ケイ酸）、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ケイ酸ナトリウムマグネシウム、金属石鹼、ジアルキルリン酸金属塩、ベントナイト、ヘクトライト、有機変性粘土鉱物、ショ糖脂肪酸エステル、フラクトオリゴ糖脂肪酸エステルが好ましいものとして挙げられる。

[0046] 酸化防止剤としては、 α -リポ酸、 α -リポ酸の塩、及び α -リポ酸の誘導体；トコフェロール（ビタミンE）、トコトリエノール、酢酸トコフェロール等のトコフェロール誘導体；BHT、BHA；没食子酸プロピル等の没食子酸誘導体；ビタミンC（アスコルビン酸）および／またはその誘導体；エリソルビン酸及びその誘導体；亜硫酸ナトリウム等の亜硫酸塩；亜硫酸水素ナトリウム等の亜硫酸水素塩；チオ硫酸ナトリウム等のチオ硫酸塩；メタ亜硫酸水素塩；チオタウリン、ヒポタウリン；チオグリセロール、チオ尿素、チオグリコール酸、システイン塩酸塩が好ましいものとして挙げられる。還元剤としては、チオグリコール酸、システイン、システアミン等が好ましいものとして挙げられる。酸化剤としては、過酸化水素水、過硫酸アンモニウム、臭素酸ナトリウム、過炭酸等が好ましいものとして挙げられる。

- [0047] 防腐剤・抗菌剤としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン等のヒドロキシ安息香酸及びその塩若しくはそのエステル；サリチル酸；安息香酸ナトリウム；フェノキシエタノール；1，2-ペンタンジオール、1，2-ヘキサジオール等の1，2-ジオール；メチルクロロイソチアゾリノン、メチルイソチアゾリノン等のイソチアゾリノン誘導体；イミダゾリニウムウレア；デヒドロ酢酸及びその塩；フェノール類；トリクロサン等のハロゲン化ビスフェノール類、酸アミド類、四級アンモニウム塩類；トリクロロカルバニド、ジンクピリチオン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ソルビン酸、クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、ハロカルバン、ヘキサクロロフェン、ヒノキチオール；フェノール、イソプロピルフェノール、クレゾール、チモール、パラクロロフェノール、フェニルフェノール、フェニルフェノールナトリウム等のその他フェノール類；フェニルエチルアルコール、感光素類、抗菌性ゼオライト、銀イオンが好ましいものとして挙げられる。
- [0048] キレート剤としては、EDTA、EDTA 2Na、EDTA 3Na、EDTA 4Na等のエデト酸塩（エチレンジアミン四酢酸塩）；HEDTA 3Na等のヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸塩；ペント酸塩（ジエチレントリアミン五酢酸塩）；フィチン酸；エチドロン酸等のホスホン酸及びそのナトリウム塩等の塩類；シュウ酸ナトリウム；ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸等のポリアミノ酸類；ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、リン酸；クエン酸ナトリウム、クエン酸、アラニン、ジヒドロキシエチルグリシン、グルコン酸、アスコルビン酸、コハク酸、酒石酸が好ましいものとして挙げられる。
- [0049] pH調整剤・酸・アルカリとしては、クエン酸、クエン酸ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、グリコール酸、コハク酸、酢酸、酢酸ナトリウム、リンゴ酸、酒石酸、フマル酸、リン酸、塩酸、硫酸、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、イソプロパノールアミン、トリイソプロパノールアミン、2-アミノ-2-メチル-1，3-プロパンジ

オール、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール、アルギニン、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、炭酸グアニジン、炭酸アンモニウムが好ましいものとして挙げられる。

[0050] 粉体類としては、マイカ、タルク、カオリン、セリサイト、モンモリロナイト、カオリナイト、雲母、白雲母、金雲母、合成雲母、紅雲母、黒雲母、パーミキュライト、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸バリウム、ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウム、ケイ酸ストロンチウム、タングステン酸金属塩、マグネシウム、ゼオライト、硫酸バリウム、焼成硫酸カルシウム、リン酸カルシウム、弗素アパタイト、ヒドロキシアパタイト、セラミックパウダー、ベントナイト、スメクタイト、粘土、泥、金属石鹼(例えば、ミリスチン酸亜鉛、パルミチン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム)、炭酸カルシウム、ベンガラ、黄酸化鉄、黒酸化鉄、群青、紺青、カーボンブラック、酸化チタン、微粒子及び超微粒子酸化チタン、酸化亜鉛、微粒子及び超微粒子酸化亜鉛、アルミナ、シリカ、煙霧状シリカ(超微粒子無水ケイ酸)、雲母チタン、魚鱗箔、窒化ホウ素、ホトクロミック顔料、合成フッ素金雲母、微粒子複合粉体、金、アルミニウム等の各種の大きさ・形状の無機粉体、及び、これらをハイドロジェンシリコーン、環状ハイドロジェンシリコーン等のシリコーン若しくはその他のシラン若しくはチタンカップリング剤等の各種表面処理剤で処理を行って疎水化若しくは親水化した粉体等の無機粉体；デンプン、セルロース、ナイロンパウダー、ポリエチレン末、ポリメタクリル酸メチル末、ポリスチレン末、スチレンとアクリル酸の共重合体樹脂粉末、ポリエステル末、ベンゾグアナミン樹脂粉末、ポリエチレンテレフタレート・ポリメチルメタクリレート積層末、ポリエチレンテレフタレート・アルミニウム・エポキシ積層末等、ウレタン粉末、シリコーン粉末、テフロン(登録商標)粉末等の各種の大きさ・形状の有機系粉体及び表面処理粉体、有機無機複合粉体が好ましいものとして挙げられる。無機塩類としては、食塩、並塩、岩塩、海塩、天然塩等の塩化ナトリウム含有塩類；塩化カリウム、塩化アルミニウム、塩化カルシウム、塩化マ

グネシウム、にがり、塩化亜鉛、塩化アンモニウム；硫酸ナトリウム、硫酸アルミニウム、硫酸アルミニウム・カリウム（ミョウバン）、硫酸アルミニウム・アンモニウム、硫酸バリウム、硫酸カルシウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、硫酸鉄、硫酸銅；リン酸 $1\text{Na} \cdot 2\text{Na} \cdot 3\text{Na}$ 等のリン酸ナトリウム類、リン酸カリウム類、リン酸カルシウム類、リン酸マグネシウム類が好ましいものとして挙げられる。

[0051] ビタミン類及びその誘導体類としては、レチノール、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA類；チアミン塩酸塩、チアミン硫酸塩、リボフラビン、酢酸リボフラビン、塩酸ピリドキシン、ピリドキシンジオクタノエート、ピリドキシンジパルミテート、フラビンアデニンジヌクレオチド、シアノコバラミン、葉酸類、ニコチン酸アミド・ニコチン酸ベンジル等のニコチン酸類、コリン類等のビタミンB群類；アスコルビン酸及びそのナトリウム等の塩等のビタミンC類；ビタミンD； α 、 β 、 γ 、 δ -トコフェロール等のビタミンE類；パントテン酸、ビオチン等のその他ビタミン類；アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム塩及びアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩等のアスコルビン酸リン酸エステル塩、アスコルビン酸テトライソパルミチン酸エステル・ステアリン酸アスコルビル・パルミチン酸アスコルビル・ジパルミチン酸アスコルビル等のアスコルビン酸脂肪酸エステル、アスコルビン酸エチルエーテル等のアスコルビン酸アルキルエーテル、アスコルビン酸-2-グルコシド等のアスコルビン酸グルコシド及びその脂肪酸エステル、リン酸トコフェリルアスコルビル等のアスコルビン酸誘導体；ニコチン酸トコフェロール、酢酸トコフェロール、リノール酸トコフェロール、フェルラ酸トコフェロール、トコフェロールリン酸エステル等のトコフェロール誘導体等のビタミン誘導体、トコトリエノール、その他各種ビタミン誘導体類が好ましいものとして挙げられる。

[0052] 消炎剤・抗炎症剤としては、グリチルリチン酸及びその誘導体、グリチルレチン酸誘導体、サリチル酸誘導体、ヒノキチオール、グアイアズレン、アラントイン、インドメタシン、酸化亜鉛、酢酸ヒドロコチゾン、プレドニ

ゾン、塩酸ジフェドラミン、マレイン酸クロルフェニラミン；桃葉エキス、蓬葉エキス等の植物エキスが好ましいものとして挙げられる。

[0053] ホルモン類としては、エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオール、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン等が好ましいものとして挙げられる。

[0054] 植物・動物・微生物エキス類としては、アイリスエキス、アシタバエキス、アスナロエキス、アスパラガスエキス、アボガドエキス、アマチャエキス、アーモンドエキス、アルテアエキス、アルニカエキス、アロエエキス、アンズエキス、アンズ核エキス、イチヨウエキス、インチコウエキス、ウイキョウエキス、ウコンエキス、ウーロン茶エキス、ウワウルシエキス、エイジツエキス、エチナシ葉エキス、エンメイソウエキス、オウゴンエキス、オウバクエキス、オウレンエキス、オオムギエキス、オタネニンジンエキス、オトギリソウエキス、オドリコソウエキス、オノニスエキス、オランダカラシエキス、オレンジエキス、海水乾燥物、海藻エキス、カキ葉エキス、カキョクエキス、加水分解エラスチン、加水分解コムギ末、加水分解シルク、カッコンエキス、カモミラエキス、油溶性カモミラエキス、カロットエキス、カワラヨモギエキス、カラスムギエキス、カルカデエキス、カンゾウエキス、油溶性カンゾウエキス、キウイエキス、キオウエキス、キクラゲエキス、キナエキス、キューカンバーエキス、キリ葉エキス、グアノシン、グアバエキス、クジンエキス、クチナシエキス、クマザサエキス、クララエキス、クルミエキス、クリエキス、グレープフルーツエキス、クレマチスエキス、黒米エキス、黒砂糖抽出物、黒酢、クロレラエキス、クワエキス、ゲンチアナエキス、ゲンノショウコエキス、紅茶エキス、酵母エキス、コウボクエキス、コーヒーエキス、ゴボウエキス、コメエキス、コメ発酵エキス、コメヌカ発酵エキス、コメ胚芽油、コンフリーエキス、コラーゲン、コケモモエキス、サイシンエキス、サイコエキス、サイタイ抽出液、サフランエキス、サルビアエキス、サボンソウエキス、ササエキス、サンザシエキス、サンシャエキス、サンショウエキス、シイタケエキス、ジオウエキス、シコンエキス、

シソエキス、シナノキエキス、シモツケソウエキス、ジャトバエキス、シャクヤクエキス、ショウキュウエキス、ショウブ根エキス、シラカバエキス、白キクラゲエキス、スギナエキス、ステビアエキス、ステビア発酵物、西河柳エキス、セイヨウキズタエキス、セイヨウサンザシエキス、セイヨウニワトコエキス、セイヨウノコギリソウエキス、セイヨウハッカエキス、セージエキス、ゼニアオイエキス、センキュウエキス、センブリエキス、ソウハクヒエキス、ダイオウエキス、ダイズエキス、タイソウエキス、タイムエキス、タンポポエキス、地衣類エキス、茶エキス、チョウジエキス、チガヤエキス、チンピエキス、ティートリー油、甜茶エキス、トウガラシエキス、トウキエキス、トウキンセンカエキス、トウニンエキス、トウヒエキス、ドクダミエキス、トマトエキス、納豆エキス、ニンジンエキス、ニンニクエキス、ノバラエキス、ハイビスカスエキス、バクモンドウエキス、ハスエキス、パセリエキス、バーチエキス、蜂蜜、ハマメリスエキス、パリエタリアエキス、ヒキオコシエキス、ピサボロール、ヒノキエキス、ピフィズス菌エキス、ビワエキス、フキタンポポエキス、フキノトウエキス、ブクリョウエキス、ブッチャーブルームエキス、ブドウエキス、ブドウ種子エキス、プロポリス、ヘチマエキス、ベニバナエキス、ペパーミントエキス、ボダイジュエキス、ボタンエキス、ホップエキス、マイカイカエキス、マツエキス、マロニエエキス、ミズバショウエキス、ムクロジエキス、メリッサエキス、モズクエキス、モモエキス、ヤグルマギクエキス、ユーカリエキス、ユキノシタエキス、ユズエキス、ユリエキス、ヨクイニンエキス、ヨモギエキス、ラベンダーエキス、緑茶エキス、卵殻膜エキス、リンゴエキス、ルイボス茶エキス、レイシエキス、レタスエキス、レモンエキス、レンギョウエキス、レンゲソウエキス、ローズエキス、ローズマリーエキス、ローマカミツレエキス、ローヤルゼリーエキス、ワレモコウエキス等のエキスが好ましいものとして挙げられる。

[0055] 色素・着色剤・染料・顔料としては、褐色201号、黒色401号、紫色201号、紫色401号、青色1号、青色2号、青色201号、青色202

号、青色203号、青色204号、青色205号、青色403号、青色404号、緑色201号、緑色202号、緑色204号、緑色205号、緑色3号、緑色401号、緑色402号、赤色102号、赤色104-1号、赤色105-1号、赤色106号、赤色2号、赤色201号、赤色202号、赤色203号、赤色204号、赤色205号、赤色206号、赤色207号、赤色208号、赤色213号、赤色214号、赤色215号、赤色218号、赤色219号、赤色220号、赤色221号、赤色223号、赤色225号、赤色226号、赤色227号、赤色228号、赤色230-1号、赤色230-2号、赤色231号、赤色232号、赤色3号、赤色401号、赤色404号、赤色405号、赤色501号、赤色502号、赤色503号、赤色504号、赤色505号、赤色506号、橙色201号、橙色203号、橙色204号、橙色205号、橙色206号、橙色207号、橙色401号、橙色402号、橙色403号、黄色201号、黄色202-1号、黄色202-2号、黄色203号、黄色204号、黄色205号、黄色4号、黄色401号、黄色402号、黄色403-1号、黄色404号、黄色405号、黄色406号、黄色407号、黄色5号等の法定色素；Acid Red 14等のその他酸性染料；Arianor Sienna Brown、Arianor Madder Red、Arianor Steel Blue、Arianor Straw Yellow等の塩基染料；HC Yellow 2、HC Yellow 5、HC Red 3、4-hydroxypropylamino-3-nitrophenol、N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2-nitro-p-phenylenediamine、HC Blue 2、Basic Blue 26等のニトロ染料；分散染料；二酸化チタン、酸化亜鉛等の無機白色顔料；酸化鉄(ベンガラ)、チタン酸鉄等の無機赤色系顔料； γ -酸化鉄等の無機褐色系顔料；黄酸化鉄、黄土等の無機黄色系顔料；黒酸化鉄、低次酸化チタン等の無機黒色系顔料；マンゴバイオレット、コバルトバイオレット等の無機紫色系顔料；酸化クロム、水酸化クロム、チタン酸コバルト等の無機緑色系顔料；群青、紺青等の無

機青色系顔料；酸化チタンコーテッドマイカ、酸化チタンコーテッドオキシ塩化ビスマス、酸化チタンコーテッドタルク、着色酸化チタンコーテッドマイカ、オキシ塩化ビスマス、魚鱗箔等のパール顔料；アルミニウムパウダー、銅パウダー、金等の金属粉末顔料；表面処理無機及び金属粉末顔料；赤色201号、赤色202号、赤色204号、赤色205号、赤色220号、赤色226号、赤色228号、赤色405号、橙色203号、橙色204号、黄色205号、黄色401号、青色404号、赤色3号、赤色104号、赤色106号、赤色227号、赤色230号、赤色401号、赤色505号、橙色205号、黄色4号、黄色5号、黄色202号、黄色203号、緑色3号、青色1号等のジルコニウム、バリウム又はアルミニウムレーキ等の有機顔料；表面処理有機顔料；アスタキサンチン、アリザリン等のアントラキノン類、アントシアニン、 β -カロチン、カテナール、カプサンチン、カルコン、カルサミン、クエルセチン、クロシン、クロロフィル、クルクミン、コチニール、シコニン等のナフトキノン類、ビキシン、フラボン類、ベタシアニン、ヘナ、ヘモグロビン、リコピン、リボフラビン、ルチン等の天然色素・染料；*p*-フェニレンジアミン、トルエン-2, 5-ジアミン、*o*-, *m*-, 若しくは*p*-アミノフェノール、*m*-フェニレンジアミン、5-アミノ-2-メチルフェノール、レゾルシン、1-ナフトール、2, 6-ジアミノピリジン等及びその塩等の酸化染料中間体及びカップラー；インドリン等の自動酸化型染料；ジヒドロキシアセトンが好ましいものとして挙げられる。

[0056] これらの他、日本薬局方、医薬品添加物規格、食品添加物公定書等に記載されている成分、及び、国際特許分類IPCがA61K7及びA61K8の分類に属する日本国及び諸外国特許公報及び特許公開公報（公表公報・再公表を含む）に記載されている成分等、公知の医薬品成分、食品成分等を、公知の組み合わせ及び配合比・配合量で含有させることが可能である。

[0057] 本明細書において、「投与する」とは、処置に有効な用量の上記組成物の投与を意味する。「処置に有効な量」とは、細胞の老化を抑制する効果を生

み出す用量を意味し、哺乳動物細胞の活度を高め、美容上または健康上の改善効果が得られる量であることが好ましい。正確な用量は処理の目的に応じて変化するものであり、当業者が公知の技法を用いて確認することができる。当技術分野で公知であり、全身対局所デリバリー、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、薬物相互作用、および症状の重症度に関する調整が必要であり、当業者であれば、ルーチンな実験により確かめることができる。

[0058] 以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制約されるものではない。

実施例

[0059] 本発明で用いるエクソソーム、miRNA、および豚プラセンタ抽出物の製造例を以下に詳述するが、本発明のエクソソームおよび豚プラセンタ抽出物は以下の製造例に限定されない。

[0060] (製造例1) 豚プラセンタ抽出物

冷凍豚胎盤1kgを、50℃の水8kgを加え、さらにプロテアーゼM(天野エンザイム社製)を加え2時間攪拌を行った後、90℃で1時間加熱してプロテアーゼを失活させた。30℃まで冷却後、ろ過し、豚プラセンタ抽出物を2kg得た。

[0061] (製造例2) エクソソーム

製造例1で得た豚プラセンタ抽出物2kgを乾燥し、パウダー状の豚プラセンタ抽出物を400g得た。その内、1gの抽出物を64mLの水で溶解し、0.22μmのフィルターで濾過した。濾過液を、2000×gで20分間遠心後、上清を回収した。この上清を、さらに、110,000×gで70分間遠心し、46μgのエクソソームを回収した。さらにエクソソーム10μgをリン酸緩衝液で100倍希釈しナノ粒子/マイクロ粒子マルチアナライザー(qNano、メイワフォーシス社製)を用い、エクソソーム数の確認を行ったところ 1.07×10^{12} 個/mLであった。

[0062] (試験1) エクソソームの確認

プラセンタ抽出物1gを水1mLで溶解後、0.22 μ mのフィルターで濾過し、試験サンプルとした。室温にて、カーボン指示膜付銅グリッドメッシュ上に10倍希釈した試料サンプルを滴下し、10秒静置することで、試料を分散した。蒸留水液滴上にカーボン指示膜付銅グリッドメッシュを移動し、更に、室温で30秒静置し、洗浄処理を行った。2%酢酸ウラニル水溶液液滴上にカーボン指示膜付銅グリッドメッシュを移動し、室温で10秒静置することでネガティブ染色を行った。グリッドを乾燥後、透過型電子顕微鏡HITACHI H-7600にて加速電圧100kVにて撮影した。

[0063] (試験結果)

図1に示した通り、約40nmと約300nm粒径の球状組成物が観察された。

[0064] (試験2) エクソソームの粒度の確認

プラセンタ抽出物10mgを水1mLで溶解後、0.22 μ mのフィルターで濾過し、試験サンプルとした。この試験サンプルを更に100倍希釈し、動的光散乱光度計(ZETASIZER NANO-ZS, Malvern 者製)で、粒子の大きさを測定した。

[0065] (試験結果)

図2に示した通り、粒径が41.14nmと268.2nmのものが多いことを確認した。

[0066] (試験3) エクソソーム内のmiRNAの確認

製造例2のエクソソームを用い、内包されるmiRNAをexoRNAeasy(Qiagen社製)で抽出した。そのmiRNAの配列を次世代シーケンサー(Ion PGMシーケンサ、Thermo Fisher Scientific社製)で解析した。

[0067] (試験結果)

得られたシーケンスデータをヒトmiRNAデータベースと照合した結果、表1~3に示したmiRNAが含まれていることを確認した。

[0068] (試験4) 細胞老化で減少するmiRNA

細胞はTIG-3（ヒト由来繊維芽細胞）（老人研バンクから購入）を用いた。若い細胞として39継代目（以下39PDLと記載）のTIG-3と老化細胞として80継代（以下80PDLと記載）のTIG-3よりmiRNeasy（Qiagen社製）を用い、miRNAを抽出した。それぞれのmiRNAを3D-Gene（TORAY社製）のDNAマイクロアレイ（human miRNA ver12.1）を用いて比較解析を行った。

[0069]（試験結果）

表1～3に示したエクソソームに含まれているmiRNAの内、若い細胞と比較して、老化細胞において減少しているmiRNAを老化細胞で減少*として示した。80PDLの老化細胞において、27種類のmiRNAの減少が確認できた。細胞が老化すると、これらの27種類（配列番号3、8、10、18、22、29、33、34、37、39、41、51、60、61、66、71、72、75、76、77、105、108、109、138、148、157、159）を含むmiRNA群が減少し、若い細胞の機能に関わる遺伝子の発現制御の能力が低下すると考えられる。

[0070]（試験5）miRNAの線維芽細胞への添加時の評価

細胞は74継代のTIG-3を用いた。プラセンタ抽出物由来miRNAの内、表4に示す量が含まれる3つのmiRNAに対応する以下の合成miRNA（いずれもQIAGEN社製）を、それぞれ10nMに希釈し、lipofectamin RNAmaxを用い、細胞にトランスフェクションした。

hsa-miR-125a-5p : 5'-UCCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGA-3'（配列番号163）

hsa-miR-30c-5p : 5'-UGUAAACAUCUACACUCUCAGC-3'（配列番号164）

hsa-miR-26a-5p : 5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'（配列番号165）

[0071] トランスフェクションは24時間毎に2回行い、添加して48時間後に細胞を固定、Alexa Fluor 488 Phalloidin（サーモフィッシャー社製）を用いてアクチン・細胞核を蛍光染色し、染色した細胞の細胞核数と細胞サイズを解析した。核数、細胞サイズともに、コントロール

の合成Hsa-miRNA (QIAGEN社製) をトランスフェクションした細胞との比較値で示した。

[0072] (試験結果)

細胞数、細胞サイズの比較を表4に示した。hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-30c-5pおよびhsa-miR-26a-5pの添加による細胞数の増加、細胞サイズの低下が確認できた。細胞が老化すると細胞増殖が停止し、細胞の形が扁平肥大化することが知られていることから、これらのmiRNAは抗老化活性を有するものと考えられる。

[0073] [表4]

	プラセンタ抽出物中に含まれる総miRNAに対する割合	対応する合成miRNA	核数	細胞サイズ
mir-125a	1.79%	hsa-miR-125a-5p	1.157277178	0.868743041
mir-30c	2.37%	hsa-miR-30c-5p	1.174073221	0.800776204
mir-26a	1.02%	hsa-miR-26a-5p	1.982847511	0.73004346

[0074] (試験6) エクソソームの線維芽細胞への添加時の評価

細胞はTIG3 (ヒト由来繊維芽細胞) (老人研バンクから購入) を用いた。TIG3を96穴プレートに播種しDMEM培地で培養し、66継代 (以下66PDLと記載)、83継代 (以下83PDLと記載) し、66PDL、83PDLの細胞に対し、製造例2で得たエクソソームをPBSで 5.15×10^3 particle/mL濃度に希釈したエクソソーム溶液を66PDL線維芽細胞に、 5.15×10^4 particle/mL濃度に希釈したエクソソーム溶液を83PDL線維芽細胞にそれぞれ添加した。

添加は24時間毎に2回行い、添加して48時間後に細胞を固定、Alexa Fluor 488 Phalloidin (サーモフィッシャー社製) を用いてアクチン・細胞核を蛍光染色し、染色した細胞の細胞核数と細胞サイズを解析した。

[0075] (試験結果)

66PDLの蛍光染色後の写真を図3、細胞数を図4、細胞サイズを図5に示し、83PDLの蛍光染色後の写真を図6、細胞数を図7、細胞サイズ

を図8に示した。図3～図8より、66PDL、83PDL共にエクソソーム添加による細胞数の増加、細胞サイズの低下が確認できた。細胞が老化すると細胞増殖が停止し、細胞の形が扁平肥大化することが知られていることから、エクソソームは抗老化活性を有するものと考えられる。

[0076] (処方例)

以下に本発明によって得られたエクソソームおよび豚プラセンタ抽出物の処方例を示すが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

[0077] (処方例1) 錠剤	質量%
1. 製造例1で得たプラセンタ抽出物	3.0
(又は製造例2で得たエクソソーム)	0.003)
2. 乳糖	30.0
3. コーンスターチ	58.0
4. 結晶セルロース	7.0
5. ポリビニールピロリドン	3.0
[0078] (処方例2) サプリメント	質量%
1. 製造例1で得たプラセンタ抽出物	10.0
(又は製造例2で得たエクソソーム)	0.01)
2. ヘスペリジン	80.0
3. 澱粉	10.0
4. 香料	適量
[0079] (処方例3) グミ	質量%
1. 還元水飴	40.0
2. グラニュー糖	20.0
3. ブドウ糖	18.0
4. 製造例1で得たプラセンタ抽出物	2.0
(又は製造例2で得たエクソソーム)	0.002)
5. 水	10.0
6. ゼラチン	9.0

	7. クエン酸	0.9
	8. 色素	0.1
	9. 香料	適量
[0080]	(処方例4) チューインガム	質量%
	1. ガムベース	20.0
	2. 砂糖	15.0
	3. イソマルトース	20.0
	4. パラチノース	10.0
	5. キシリトール	10.0
	6. コーンシロップ	13.0
	7. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	2.0 0.002)
	8. 水飴	10.0
	9. 香料	適量
[0081]	(処方例5) 飲料	質量%
	1. 果糖ブドウ糖液糖	40.0
	2. グレープフルーツ果汁	40.0
	3. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	2.0 0.002)
	4. イヨカン果汁	2.0
	5. アスコルビン酸ナトリウム	1.0
	6. 香料	適量
	7. 精製水	100とする残余
[0082]	(処方例6) 野菜ジュース飲料	質量%
	1. 市販の野菜ジュース	99.0
	2. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	1.0 0.001)
[0083]	(処方例7) 錠剤	質量%

1. コーンスターチ	30.0
2. カルボキシメチルセルロースカルシウム	20.0
3. 微結晶セルロース	38.0
4. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	2.0 0.002)
5. ポリビニルピロリドン	6.0
6. タルク	3.0
7. アスコルビン酸ナトリウム	1.0
8. 香料	適量
[0084] (処方例8) 菓子	質量%
1. 粉糖	88.0
2. 乳糖	2.0
3. クエン酸	2.0
4. ゼラチン1%水溶液	4.0
5. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	1.0 0.001)
6. アスコルビン酸ナトリウム	2.0
7. ショ糖脂肪酸エステル	1.0
8. 香料	適量
[0085] (処方例9) 乳液	質量%
1. スクワラン	5.0
2. オリーブ油	5.0
3. ホホバ油	5.0
4. セチルアルコール	1.5
5. グリセリンモノステアレート	2.0
6. ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル	3.0
7. ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート	2.0
8. 1,3-ブチレングリコール	1.0

9. グリセリン	2.0
10. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	1.0 0.001)
11. 防腐剤 (パラオキシ安息香酸エステル)	適量
12. 香料	適量
13. 精製水	100とする残余
[0086] (処方例10) 化粧用オイル	質量%
1. 流動パラフィン	30.0
2. スクワラン	20.0
3. オリーブ油	20.0
4. パルミチン酸イソプロピル	10.0
5. ハマスゲ全草熱水抽出液	3.0
6. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム	1.0 0.001)
7. 丁字蓄熱水抽出液	1.0
8. グレープフルーツ果実又は葉熱水抽出液	3.0
9. 杜仲葉熱水抽出液	3.0
10. オリーブ油	1.0
11. シア脂	1.0
12. ブチルヒドロキシアニソール	0.1
13. ビタミンE誘導体	0.1
14. 防腐剤 (塩化ベンザルコニウム)	適量
15. 香料 (バラ水)	適量
16. 精製水	100とする残余
[0087] (処方例11) 柔軟性化粧水	質量%
1. グリセリン	5.0
2. 1, 3-ブチレングリコール	5.0
3. モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E. O)	1.0

4. エタノール	15.0
5. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム)	1.0 0.001
6. ボダイジュ花又は果実50%1, 3-ブチレングリコール抽出液	5.0
7. ユズ果実30%エタノール抽出液	1.0
8. ハコベ全草30%エタノール抽出液	1.0
9. 葡萄茎又は葉30%エタノール抽出液	1.0
10. キウイ果実50%エタノール抽出液	1.0
11. 白樺樹液	1.0
12. 抗菌(ラクトフェリン溶液)	適量
13. 防腐剤(パラオキシ安息香酸エステル)	適量
14. 香料(西洋薄荷水)	適量
15. 精製水	100とする残余
[0088] (処方例12) パック	質量%
1. ポリビニルアルコール	15.0
2. カルボキシメチルセルロースナトリウム	5.0
3. プロピレングリコール	3.0
4. エタノール	10.0
5. 製造例1で得たプラセンタ抽出物 (又は製造例2で得たエクソソーム)	1.0 0.001
6. キイチゴ果実50%ジグリセリン抽出液	1.0
7. 丁字蕾50%ジグリセリン抽出液	1.0
8. 温州蜜柑果皮50%1, 3-ブチレングリコール抽出液	1.0
9. 緑茶葉熱水抽出液	1.0
10. 桃葉熱水抽出液	2.0
11. 豚プラセンタ熱水抽出エキス	1.0

1 2.	防腐剤（パラオキシ安息香酸エステル）	適量
1 3.	香料（バラ水）	適量
1 4.	精製水	100とする残余
[0089]	（処方例13）美容液	質量%
1.	ポリビニルアルコール	15.0
2.	キサントガム	0.4
3.	ヒドロキシエチルセルロース	0.2
4.	カルポキシビニルポリマー	0.2
5.	水酸化カリウム	0.025
6.	1, 3-ブチレングリコール	5.0
7.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	（又は製造例2で得たエクソソーム	0.001）
8.	ボタン根茎又は根皮60%エタノール抽出液	1.0
9.	グリチルリチン酸ジカリウム	0.2
10.	防腐剤（パラオキシ安息香酸メチル）	適量
11.	香料（バラ水）	適量
12.	精製水	100とする残余
[0090]	（処方例14）洗顔クリーム	質量%
1.	ミリスチン酸	25.0
2.	ステアリン酸	5.0
3.	牛脂脂肪酸	5.0
4.	プロピレングリコール	10.0
5.	水酸化カリウム	6.0
6.	ヤシ油脂肪酸ジエタノールアミド	6.0
7.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	（又は製造例2で得たエクソソーム	0.001）
8.	林檎果実20%1, 3-ブチレングリコール抽出液	2.0
9.	カワラヨモギ葉20%1, 3-ブチレングリコール抽出液	2.0

10.	ローズヒップ果実30%エタノール抽出液	1.0
11.	葛根熱水抽出液	2.0
12.	グリチルリチン酸	1.0
13.	杏子核粒	0.1
14.	防腐剤（サルチル酸）	0.1
15.	香料（当帰水）	適量
16.	精製水	100とする残余
[0091]	（処方例15）ボディーソープ	質量%
1.	ラウリン酸カリウム	15.0
2.	ミリスチン酸カリウム	5.0
3.	プロピレングリコール	5.0
4.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	（又は製造例2で得たエクソソーム	0.001）
5.	烏龍茶葉70%1, 3-ブチレングリコール抽出液	1.0
6.	当帰根茎70%2, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
7.	ワカメ70%1, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
8.	メリロート花又は葉70%1, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
9.	アロエ果肉70%エタノール抽出液	2.0
10.	グリチルリチン酸モノアンモニウム	0.1
11.	防腐剤（ウンデシレン酸、フェノール）	適量
12.	香料（ラベンダー水）	適量
13.	精製水	100とする残余
[0092]	（処方例16）サンスクリーン化粧品（O/W型）	質量%
1.	オキシベンゾン	2.0
2.	パラメトキシケイ皮酸オクチル	5.0
3.	ジヒドロキシメトキシベンゾフェノン	0.2
4.	スクワラン	10.0
5.	ワセリン	5.0

6.	ステアリルアルコール	3.0
7.	ステアリン酸	3.0
8.	グリセリルモノステアレート	2.0
9.	ポリアクリル酸エチル	1.0
10.	1, 3-ブチレングリコール	6.0
11.	エデト酸二ナトリウム	0.1
12.	トリエタノールアミン	1.0
13.	二酸化チタン	5.0
14.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	(又は製造例2で得たエクソソーム	0.001)
15.	白樺樹皮70%ジプロピレングリコール抽出液	0.5
16.	ヤグルマギク葉50%プロピレングリコール抽出液	0.5
17.	葛根50%プロピレングリコール抽出液	0.5
18.	柚子果実50%ジプロピレングリコール抽出液	0.5
19.	防腐剤(パラオキシ安息香酸ベンジル)	適量
20.	香料(ジャスミン水)	適量
21.	精製水	100とする残余
[0093]	(処方例17) サンスクリーン化粧品(オイルタイプ)	質量%
1.	流動パラフィン	70.0
2.	テトラヒドロキシベンゾフェノン	1.0
3.	セチルオクタノエート	23.8
4.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	(又は製造例2で得たエクソソーム	0.001)
5.	ローマカミツレ花10%1, 3-ブチレングリコール抽出液	1.0
6.	ゴボウ根熱水抽出液	0.5
7.	セイヨウトチノキ全草30%1, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
8.	ゼニアオイ花又は葉50%プロピルアルコール抽出液	0.5

9.	ハトムギ全草50%1, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
10.	茴香果実30%ブタノール抽出液	0.5
11.	芍薬根又は葉熱水抽出液	0.5
12.	パラアミノ安息香酸エチル	0.2
13.	酸化防止剤(ブチルヒドロキシトルエン)	適量
14.	香料(ヤグルマギク水)	適量
[0094]	(処方例18)ヘアーリキッド	質量%
1.	エタノール	29.0
2.	ポリオキシプロピレンブチルエーテルリン酸	10.0
3.	ポリオキシプロピレンモノブチルエーテル	5.0
4.	トリエタノールアミン	1.0
5.	トリメチレングリコール	5.0
6.	製造例1で得たプラセンタ抽出物	1.0
	(又は製造例2で得たエクソソーム	0.001)
7.	センブリ葉又は茎50%1, 2-ブチレングリコール抽出液	1.0
8.	オタネニンジン根熱水抽出液	1.0
9.	レモン果実50%1, 3-ブチレングリコール抽出液	0.5
10.	リンゴ果実30%エタノール抽出液	1.0
11.	白樺樹液	1.0
12.	アズレン	1.0
13.	抗菌・防腐剤(パラベン、塩化ベンザルコニウム)	適量
14.	香料(オレンジ水)	適量
15.	精製水	100とする残余
[0095]	(試験7)トランスウェル移行アッセイによるマクロファージ遊走能の評価	
	RAW264.7マウスマクロファージ様細胞を用いたトランスウェル移行アッセイにより製造例2で調製したエクソソームの作用を調べた。24ウェルプレートの各ウェルに750 μ Lずつ血清含有培地を添加し、インサートを置いた。RAW264.7細胞を 2×10^6 個/mLとなるように無血清	

培地に懸濁し、これを100 μ Lずつ、上記各ウェルのインサートに播種した。この細胞に各サンプルを添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂存在下で培養した。24時間後に各サンプルを再度添加し、さらに37 $^{\circ}$ C、5%CO₂存在下で培養した。最初のサンプルを添加してから48時間経過後に、細胞をギムザ染色し、インサートの下に遊走した細胞数を測定・解析した。細胞数の解析は、1枚のインサートにつき5視野の写真を撮影し、その合計数を遊走細胞数とした。サンプルは二重測定（n=2）した。

[0096] その結果を図9に示す。図9の縦軸は、遊走した細胞数を示し、横軸には、用いた各サンプルを示す。「未処理」とは、サンプルとしてリン酸緩衝液（PBS）を用いたものである。「試薬のみ」とは、エクソソームの精製に用いたインビトロジェン社のTotal exosome isolation kitの試薬を意味する。「処理なし」とは、製造例2で得たエクソソーム溶液をそのまま用いたことを示す。「フィルター処理」とは、製造例2で得たエクソソーム溶液を0.22 μ mのフィルターで処理したものである。「エクソソーム除去」とは、キット精製時の上清を意味し、エクソソームを含まない画分のことである。そして、「エクソソーム」とは、エクソソームが含まれるキット精製時の沈殿画分を意味する。

[0097] 図9に示したように、「未処理」や「試薬のみ」および「エクソソーム除去」などの対照サンプルに対し、エクソソームを含むサンプルを用いた場合には、有意に高い細胞遊走数が検出され、本発明のエクソソームがマクロファージなどの免疫細胞に対する活性化作用を有することが分かった。

[0098] （試験8）創傷治癒アッセイ（wound healing assay）
創傷治癒アッセイにより製造例2で調製したエクソソームのマクロファージの遊走能を調べた。6ウェルプレートの各ウェルに、翌日にはコンフルエントになるようにRAW264.7マウスマクロファージ様細胞を播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂存在下で24時間培養した後、100%コンフルエントになった細胞表面にイエローチップを用いてスクラッチ（引っ掻き傷）を引き、PBSで洗浄後、各サンプルを含む新しい培養液に交換した。37 $^{\circ}$ C、

5%CO₂環境下で培養し、0および24時間後の写真を撮影してスクラッチ部分の幅を測定・解析した。撮影した写真からスクラッチした傷の幅を測定し、24時間でどの程度修復されたかの割合を算出した。以下の式に基づき、4回の実験における平均値と標準偏差を算出した。修復割合(%) = 100 - [(24時間後の傷の幅; μm) / (0時間の傷の幅; μm) × 100]

[0099] その結果、サンプルとして、エクソソームを含まない画分に比べて、エクソソームを含む精製画分を用いた場合の修復割合は有意に高く、本発明のエクソソームがマクロファージの遊走を活性化して創傷部位の回復を促進することが示唆された。以上の結果より、本発明にかかるエクソソームは、マクロファージの遊走促進剤、免疫細胞活性化剤または創傷治癒促進剤として利用も期待される。

産業上の利用可能性

[0100] 本発明によれば、生理活性の高い豚プラセンタ由来エクソソーム、miRNA、およびエクソソーム含量の高い豚プラセンタ抽出物の提供が可能となった。

請求の範囲

- [請求項1] (i) 配列番号1～162のいずれかで示される塩基配列の核酸分子、
、
(ii) (i) の塩基配列と90%以上の同一性を有する核酸分子、
または
(iii) (i) の塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有する塩基配列の核酸分子、
からなる群より選択される少なくとも1種の核酸分子を含有し、哺乳類のプラセンタからの抽出物であることを特徴とするエクソソーム。ただし、前記核酸分子がRNAの場合は、前記各塩基配列で示されるTがUである。
- [請求項2] 前記少なくとも1種の核酸分子が、配列番号3、8、10、18、22、29、33、34、37、39、41、51、60、61、66、71、72、75、76、77、105、108、109、138、148、157および159で示される塩基配列の核酸分子を含有する請求項1に記載のエクソソーム。ただし、各核酸分子の塩基配列は、当該塩基配列と90%以上の同一性を有するか、または当該塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有してもよい。
- [請求項3] 前記少なくとも1種の核酸分子が、配列番号16、74および87で示される塩基配列の核酸分子、を含有する請求項1に記載のエクソソーム。ただし、各核酸分子の塩基配列は、当該塩基配列と90%以上の同一性を有するか、または当該塩基配列において、1個または2個の塩基の欠失、付加および／または置換を有してもよい。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載のエクソソーム、またはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを有効成分として含有する経口組成物。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれか1項に記載のエクソソーム、またはmir

−125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを、有効成分として含有する化粧品組成物。

[請求項6] 請求項1～3のいずれか1項に記載のエクソソーム、またはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30のmiRNAを有効成分として含有する線維芽細胞増殖促進剤。

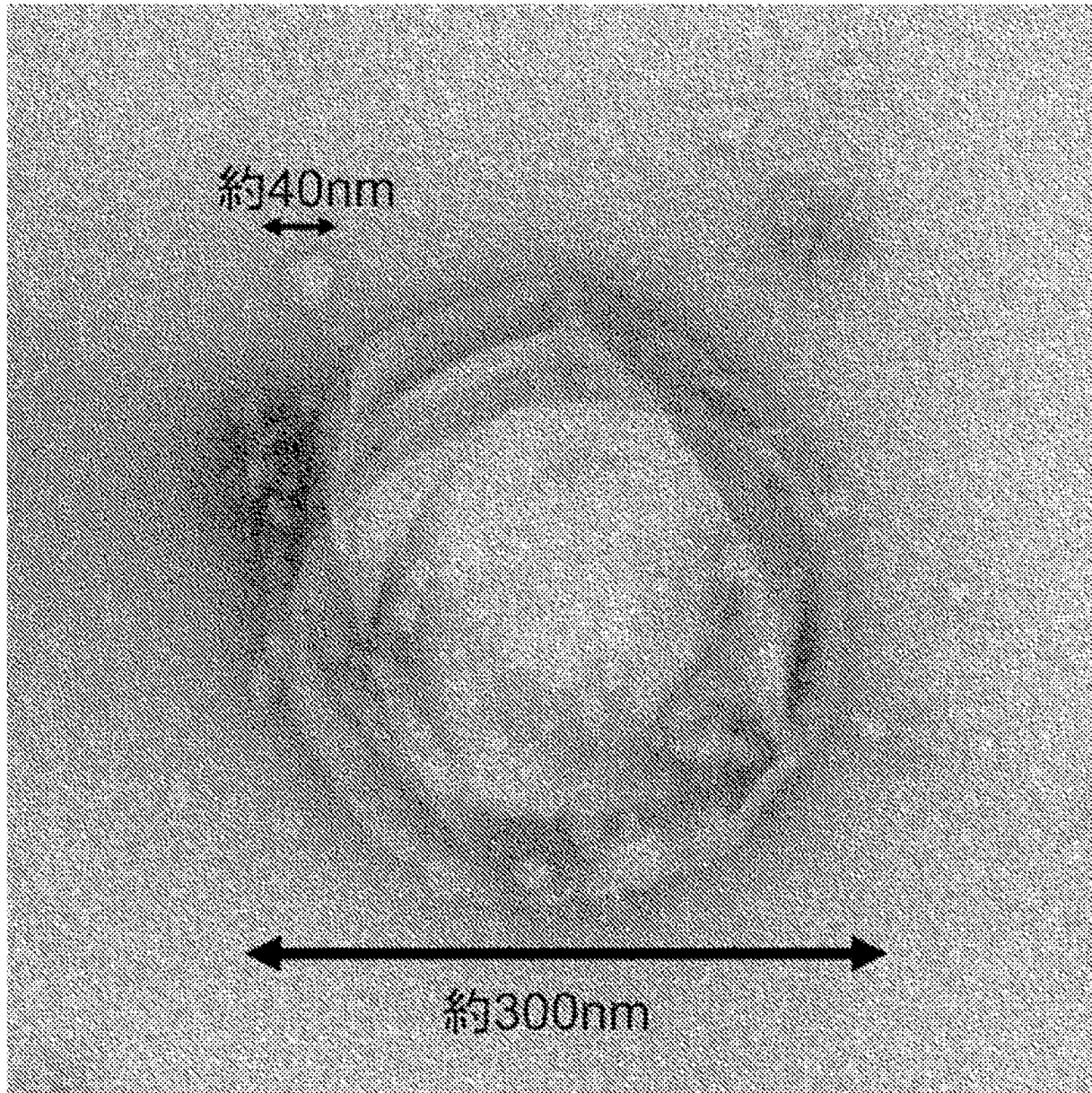
[請求項7] 哺乳類のプラセンタを熱水で抽出し、プロテアーゼによる酵素分解を行い、球状構造をしたエクソソームを含有するプラセンタ抽出物を回収することを特徴とするプラセンタ抽出物の製造方法。

[請求項8] 前記プラセンタ抽出物をさらに滅菌水で抽出する工程を含む請求項7に記載のプラセンタ抽出物の製造方法。

[請求項9] 前記哺乳類のプラセンタが、豚プラセンタである請求項7または8に記載のプラセンタ抽出物の製造方法。

[請求項10] 請求項1～3のいずれか1項に記載のエクソソーム、またはmir-125a、mir-26aおよび／またはmir-30cのmiRNAを、哺乳動物細胞に投与することを特徴とする細胞の老化を抑制する方法。

[図1]



5902 x25k 10-109.tif

F100 1/10

negative stain (uranyl acetate)

Print Mag: 234000x @ 7.0 in

Camera: ORCA Camera, Exposure(ms): 1792 Gain: 1.0, Bin: 1

Gamma: 1.00, No Sharpening, Normal Contrast

50 nm

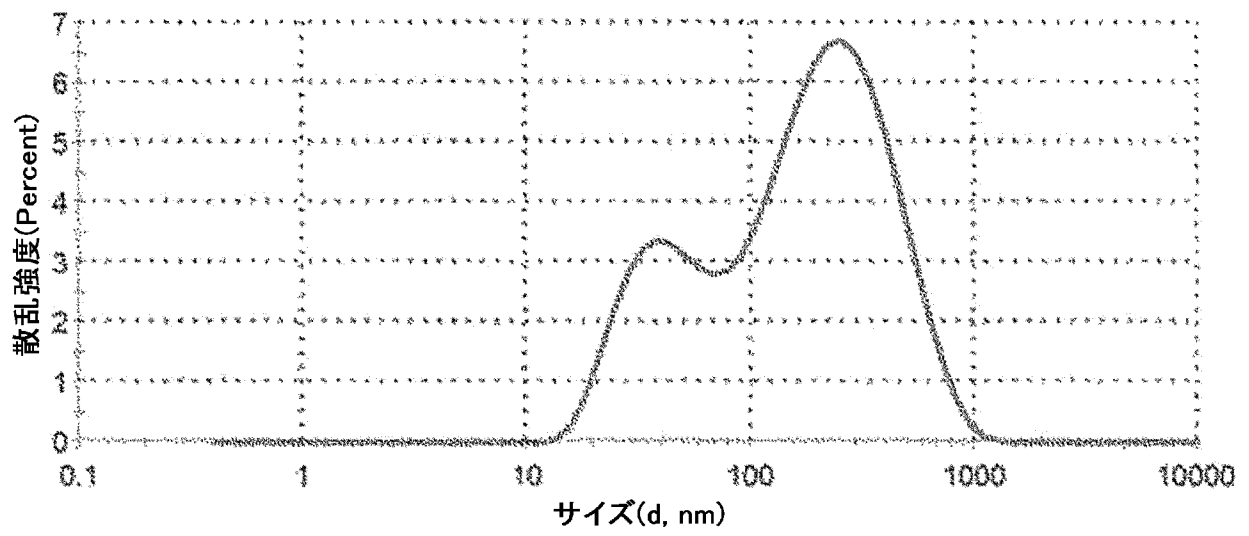
HV: 100.0kV

Direct Mag: 22000x

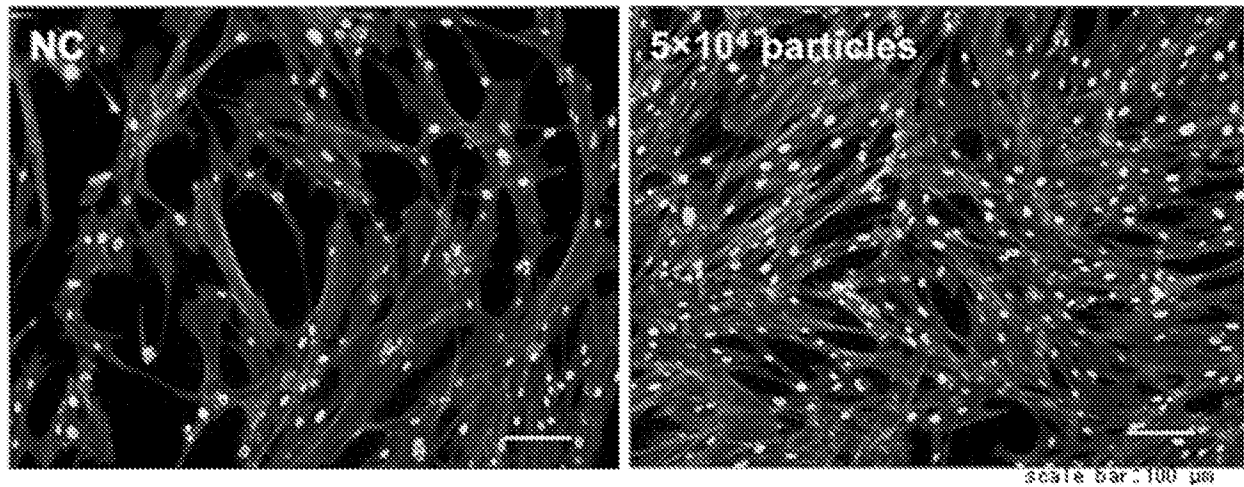
A&T Camera System

[図2]

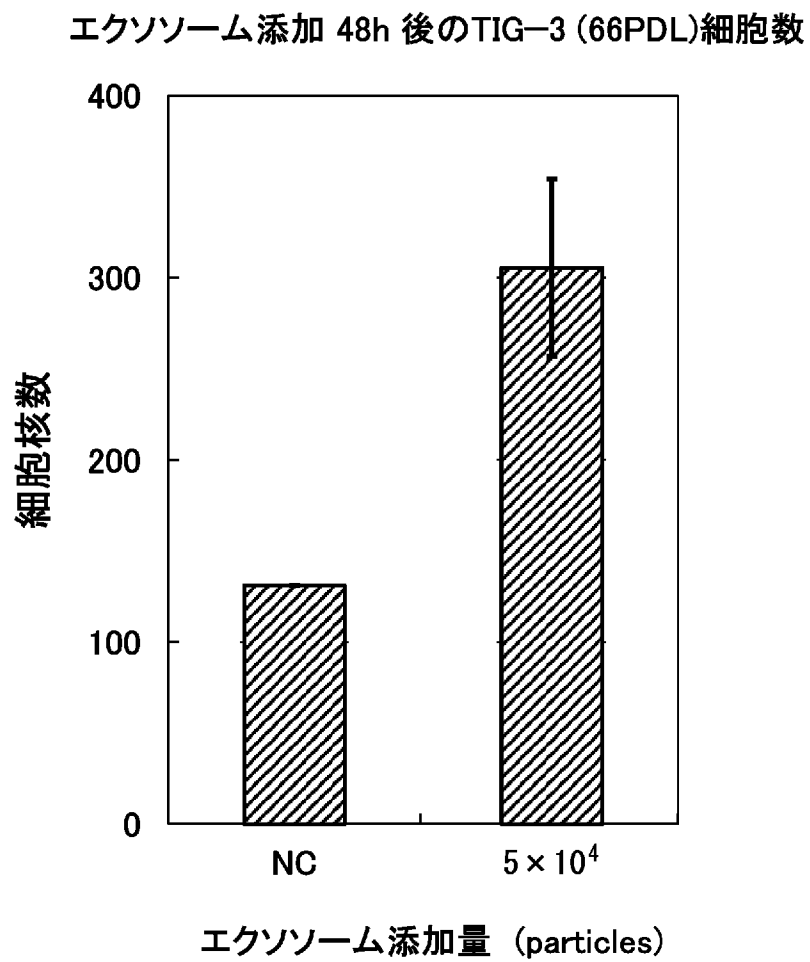
散乱強度別粒度分布



[図3]

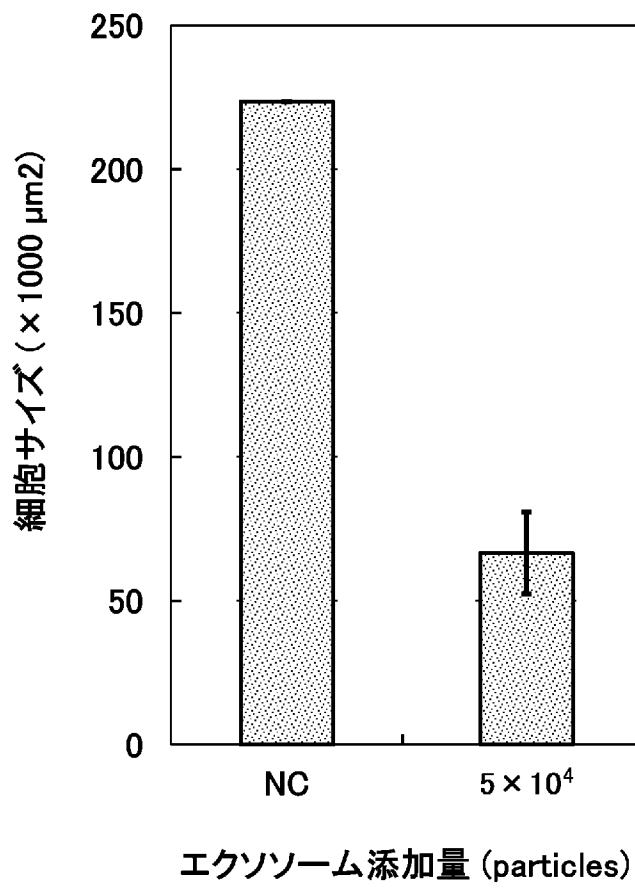


[図4]



[図5]

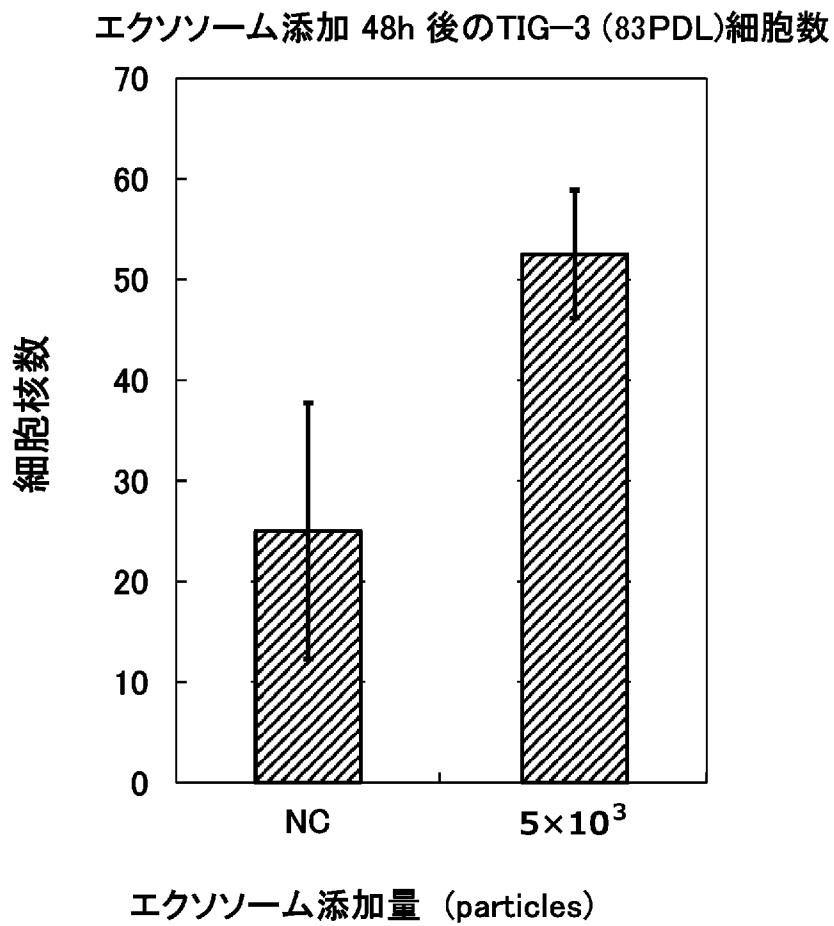
エクソソーム添加 48h 後のTIG-3 (66PDL)細胞サイズ



[図6]

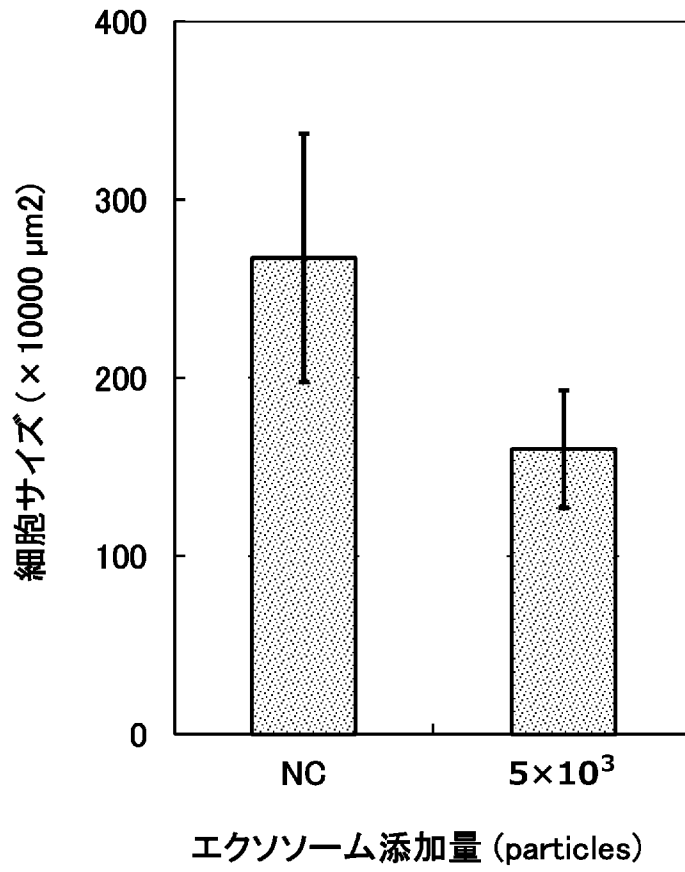


[図7]

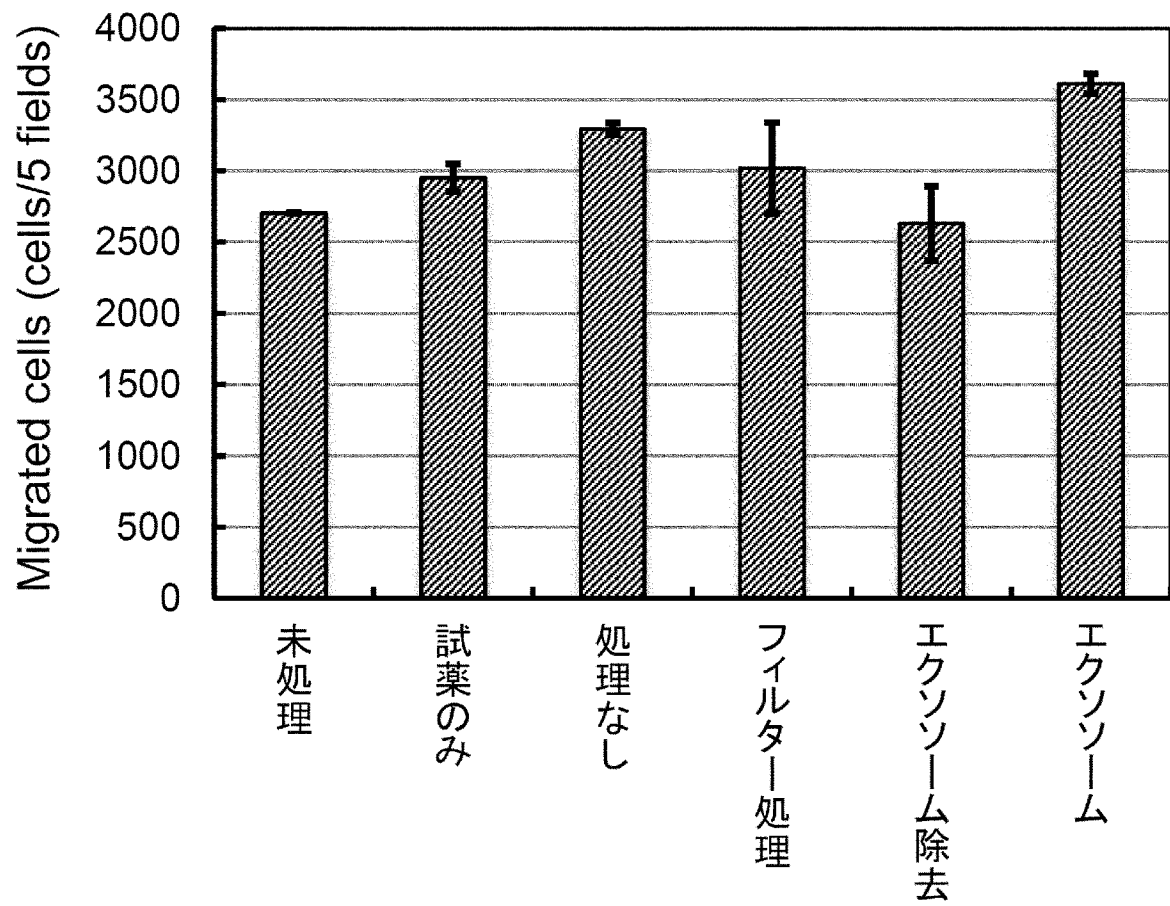


[図8]

エクソソーム添加 48h 後のTIG-3 (83PDL)の細胞サイズ



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K8/98(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K35/50(2015.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/113, A23L33/10, A61K8/98, A61K31/7105, A61K35/50, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	高山和江ほか, プラセンタ抽出物中に含有するエクソソームの解析, 臨床薬理, 31 October 2016, vol. 47, no. supplement., p.S260, non-official translation (TAKAYAMA, Kazue et al., "Analysis of exosome contained in placenta extracts", Japanese journal of clinical pharmacology)	1-5 6-10
Y	JP 2002-145729 A (PIGEON CORPORATION) 22 May 2002, claims (Family: none)	6, 10
Y	安井裕之ほか, 新規プラセンタエキスの抗老化素材としての評価, Fragr. J., 15 April 2016, vol. 44, pp. 36-45, fig. 3, (YASUI, Hiroyuki et al., "Evaluation of novel-type placental extract as anti-aging material")	6, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2018 (20.07.2018)	Date of mailing of the international search report 31 July 2018 (31.07.2018)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2010-215605 A (JE MA YU CO., LTD.) 30 September 2010, example 1 (Family: none)	7 7-9
P, X	高山和江ほか, プラセンタ抽出物パウダーから得られたエクソソーム様小胞体による老化ヒト正常繊維芽細胞の複製寿命の延長, 日本生化学会大会, 15 November 2017, vol. 90, p. 2P-1256, non-official translation (TAKAYAMA, Kazue et al., "Extension of reproduction life of normal fibroblast in aged human by means of exosome-like endoplasmic reticulum obtained from placenta extract powder", Annual conference of the Japanese Biochemical Society)	1-6, 10
A	JP 2001-39879 A (MURATA, Koji) 13 February 2001, paragraph [0006] (Family: none)	1-10
A	FARAONIO, R. et al., "A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts", Cell Death Differ., 2012, vol. 19, pp. 713-721, abstract	1-10
A	SUH, EJ et al., "A microRNA network regulates proliferative timing and extracellular matrix synthesis during cellular quiescence in fibroblasts", Genome Biol., 2012, vol. 13, R121, abstract	1-10
A	ZHAO, Y. et al., "MiR-30c protects diabetic nephropathy by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition in db/db mice", Aging Cell, 27 January 2017, vol. 16, pp. 387-400, abstract	1-10
A	MA, Y. et al., "MicroRNA-30c promotes natural killer cell cytotoxicity via up-regulating the expression level of NKG2D", Life Sci., 2016, vol. 151, pp. 174-181, abstract	1-10
A	LI, X. et al., "MicroRNA-26a modulates transforming growth factor beta-1-induced proliferation in human fetal lung fibroblasts", Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, vol. 454, pp. 512-517, abstract	1-10
A	MAES, OC et al., "Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts", J. Cell. Physiol., 2009, vol. 221, pp. 109-119, abstract	1-10
A	LEE, S. et al., "Histone deacetylase regulates high mobility group A2-targeting microRNAs in human cord blood-derived multipotent stem cell aging", Cell. Mol. Life Sci., 2011, vol. 68, pp. 325-336, abstract	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, Yet al., "MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene", FESS Lett., 2009, vol. 583, pp. 3725-3730, abstract	1-10
A	TOOI, M. et al., "Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts", J. Cell. Biochem., 2016, vol. 117, pp. 1658-1670, abstract	1-10
A	JP 2004-97033 A (KIMOTO, Eiji) 02 April 2004, examples (Family: none)	1-10
A	JP 2006-34 7926 A (ICHIMARU PHARCOS CO., LTD.) 28 December 2006, formulation examples (Family: none)	1-10
A	JP 2013-503613 A (L'OREAL) 04 February 2013, claims & US 2012/0259000 A1 & EP 2473627 A1 & WO 2011/026909 A1, claims	1-10
A	JP 2014- 198728 A (BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 23 October 2014, claims & US 2009/0180957 A1 & WO 2008/016924 A2 & EP 2056882 A1, claims	1-10
A	JP 2015-524844 A (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 27 August 2015, claims & US 2015/0203844 A1 & EP 2882445 A1 & WO 2014/028493 A2, claims	1-10
A	JP 2016-165292 A (ASURAGEN INC.) 15 September 2016, claims & US 2008/0050744 A1 & EP 1838852 A1 & WO 2006/137941 A2, claims	1-10

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K8/98(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K35/50(2015.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12N15/113, A23L33/10, A61K8/98, A61K31/7105, A61K35/50, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00</p>																	
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年</p>																	
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</p>																	
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>高山和江ほか, プラセンタ抽出物中に含有するエクソソームの解析, 臨床薬理, 2016.10.31, Vol.47, No.Supplement., p.S260</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>同上</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2002-145729 A (ピジョン株式会社) 2002.05.22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)</td> <td>6, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>安井裕之ほか, 新規プラセンタエキスの抗老化素材としての評価, Fragr. J., 2016.04.15, Vol.44, pp.36-45, 図3</td> <td>6, 10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	高山和江ほか, プラセンタ抽出物中に含有するエクソソームの解析, 臨床薬理, 2016.10.31, Vol.47, No.Supplement., p.S260	1-5	Y	同上	6-10	Y	JP 2002-145729 A (ピジョン株式会社) 2002.05.22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	6, 10	Y	安井裕之ほか, 新規プラセンタエキスの抗老化素材としての評価, Fragr. J., 2016.04.15, Vol.44, pp.36-45, 図3	6, 10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
X	高山和江ほか, プラセンタ抽出物中に含有するエクソソームの解析, 臨床薬理, 2016.10.31, Vol.47, No.Supplement., p.S260	1-5															
Y	同上	6-10															
Y	JP 2002-145729 A (ピジョン株式会社) 2002.05.22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	6, 10															
Y	安井裕之ほか, 新規プラセンタエキスの抗老化素材としての評価, Fragr. J., 2016.04.15, Vol.44, pp.36-45, 図3	6, 10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>20.07.2018</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>31.07.2018</p>																
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>西村 亜希子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<p>4N 3435</p>															

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2010-215605 A (株式会社済馬油) 2010.09.30, 実施例1 (ファミリーなし)	7 7-9
P, X	高山和江ほか, プラセンタ抽出物パウダーから得られたエクソソーム様小胞体による老化ヒト正常繊維芽細胞の複製寿命の延長, 日本生化学会大会, 2017.11.15, Vol.90, p.2P-1256	1-6, 10
A	JP 2001-39879 A (村田宏治) 2001.02.13, [0006] (ファミリーなし)	1-10
A	FARAONIO R et al., A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts, Cell Death Differ., 2012, Vol.19, pp.713-721, Abstract	1-10
A	SUHEJ et al., A microRNA network regulates proliferative timing and extracellular matrix synthesis during cellular quiescence in fibroblasts, Genome Biol., 2012, Vol.13, R121, Abstract	1-10
A	ZHAO Y et al., MiR-30c protects diabetic nephropathy by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition in db/db mice, Aging Cell, 2017.01.27, Vol.16, pp.387-400, Abstract	1-10
A	MA Y et al., MicroRNA-30c promotes natural killer cell cytotoxicity via up-regulating the expression level of NKG2D, Life Sci., 2016, Vol.151, pp.174-181, Abstract	1-10
A	LI X et al., MicroRNA-26a modulates transforming growth factor beta-1-induced proliferation in human fetal lung fibroblasts, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, Vol.454, pp.512-517, Abstract	1-10
A	MAES OC et al., Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts, J. Cell. Physiol., 2009, Vol.221, pp.109-119, Abstract	1-10
A	LEE S et al., Histone deacetylase regulates high mobility group A2-targeting microRNAs in human cord blood-derived multipotent stem cell aging, Cell. Mol. Life Sci., 2011, Vol.68, pp.325-336, Abstract	1-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	ZHANG Y et al., MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene, FEBS Lett., 2009, Vol. 583, pp. 3725-3730, Abstract	1-10
A	TOOI M et al., Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts, J. Cell. Biochem., 2016, Vol. 117, pp. 1658-1670, Abstract	1-10
A	JP 2004-97033 A (木本英治) 2004.04.02, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2006-347926 A (一丸ファルコス株式会社) 2006.12.28, 処方例 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2013-503613 A (ロレアル) 2013.02.04, 特許請求の範囲 & US 2012/0259000 A1 & EP 2473627 A1 & WO 2011/026909 A1, Claims	1-10
A	JP 2014-198728 A (ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム) 2014.10.23, 特許請求の範囲 & US 2009/0180957 A1 & WO 2008/016924 A2 & EP 2056882 A1, Claims	1-10
A	JP 2015-524844 A (シーダーズ・サイナイ・メディカル・センター) 2015.08.27, 特許請求の範囲 & US 2015/0203844 A1 & EP 2882445 A1 & WO 2014/028493 A2, Claims	1-10
A	JP 2016-165292 A (アシュラジェン インコーポレイテッド) 2016.09.15, 特許請求の範囲 & US 2008/0050744 A1 & EP 1838852 A1 & WO 2006/137941 A2, Claims	1-10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - 附属書C/ST. 25テキストファイル形式
 - 紙形式又はイメージファイル形式
 - b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST. 25テキストファイル形式の配列表
 - c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 - 附属書C/ST. 25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 - 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：