



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I823964 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：108123673

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 04 日

(51)Int. Cl. : A61K35/12 (2015.01)

A61P17/14 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2018/07/04 日本

2018-127901

(71)申請人：佐伯正典 (日本) SAEKI, MASANORI (JP)

日本

(72)發明人：佐伯正典 SAEKI, MASANORI (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 103463128A

CN 104203257A

CN 108126187A

KR 10-1178032B1

KR 10-2017-0043196A

WO 2014/178438A1

審查人員：葉士緯

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：3 共 37 頁

(54)名稱

幹細胞濾液製劑及其調製方法

(57)摘要

本發明提供一種對毛髮再生用、由變形關節病或類風濕性關節炎等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而對損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療有用之幹細胞濾液製劑。本發明之一態樣之幹細胞濾液製劑之特徵在於：含有已去除細胞膜之幹細胞之濾液。該幹細胞可設為選自脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS 細胞及 ES 細胞中之至少 1 種，進而亦可包含脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分。

指定代表圖：

圖3A



【圖3】

圖3B





I823964

【發明摘要】

【中文發明名稱】

幹細胞濾液製劑及其調製方法

【中文】

本發明提供一種對毛髮再生用、由變形關節病或類風濕性關節炎等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而對損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療有用之幹細胞濾液製劑。

本發明之一態樣之幹細胞濾液製劑之特徵在於：含有已去除細胞膜之幹細胞之濾液。該幹細胞可設為選自脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞及ES細胞中之至少1種，進而亦可包含脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分。

【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

幹細胞濾液製劑及其調製方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種對毛髮再生用、由變形關節病或類風濕性關節炎等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療亦有用之幹細胞濾液製劑。

【先前技術】

【0002】 近年來，因由生活環境之變化或壓力等引起之激素分泌平衡之不均衡等原因，不論男女，皆大量存在因毛髮稀少或脫髮而煩惱的人。因此，對於對生毛促進、毛髮生長、脫髮抑制等有效之生髮劑之開發之期待或社會性要求不斷提高。先前，報告有多種調配低分子化合物、植物萃取物、植物素材之醱酵物等而成之生髮劑(例如參照專利文獻1(日本專利特開2011-132812號公報)及專利文獻2(日本專利特開2010-265252號公報)等)。又，近年來，調配敏樂定、卡普氯鉍、反式-3,4'-二甲基-3-羥基黃烷酮、菸鹼醯胺、吡羅克酮乙醇胺、腺苷等而成之生髮劑正得到實用化。然而，於先前之生髮劑中，僅進行毛乳頭細胞之增生促進或活化，其效果很大程度上受個人差異影響而有限。

【0003】 另一方面，近年來，隨著利用多能性幹細胞之再生醫學技術之進步，毛髮再生醫學之研究亦積極地進行。例如，報告有使用人工多能性幹細胞(iPS細胞)，可局部再生產生毛髮之組織「毛囊」。進而，亦報告有藉由自毛囊幹細胞人工製作毛囊原型，將其移植到皮膚內而可使毛囊再生。進而，亦已知培養脂肪組織及前驅含脂肪細胞，關於對單離型人毛

囊之生長促進活性，對自包含該等細胞之培養液回收之培養基進行測試，結果為促進生髮(參照專利文獻3(日本專利特表2005-519591號公報))。

【0004】 於使用此種自包含脂肪組織及前驅含脂肪細胞(脂肪幹細胞)之培養液回收之培養基之情形時，由於必須培養自患者自身採集之組織，故而為了獲得特定之生髮用細胞製劑而需要較長時間。與此相對，本發明人揭示一種無需培養之含有自脂肪組織採取之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞之毛髮再生用之細胞製劑之發明(參照專利文獻4(國際公開WO2014/178438號公報))。該毛髮再生用之細胞製劑係使脂肪組織源性間葉系幹細胞成為與脂肪細胞共存之狀態者，若將其移植到希望生毛之部位，則於該部位確認到生毛，可使毛髮再生。

【0005】 進而，作為使人之軟組織之容積增大之方法，已知玻尿酸注入、脂肪細胞之移植等，多用於顏面之皺紋去除、凹陷治療、乳房再建等美容外科、整形外科等領域。然而，雖然利用玻尿酸注入之治療較為容易，但另一方面，由於所注入之玻尿酸於大約半年內被吸收，故而存在缺乏效果之持續性之問題。又，關於脂肪細胞之移植，亦存在移植後脂肪細胞於活體內壞死、或被吸收之情況。因此，存在需要再次手術，或視情況而產生癍痕之缺點。

【0006】 為了消除該等缺點，而提出脂肪幹細胞之移植，開發有效率地分離脂肪幹細胞之方法(例如參照專利文獻5(日本專利特表2005-519883號公報)及專利文獻6(日本專利特表2007-509601號公報))。藉由移植脂肪幹細胞，改善移植後之細胞之定著率，確認到對軟組織再生有一定之效果。然而，存在利用此種方法所獲得之脂肪幹細胞中包含雜質之情況，因此有可能於移植後脂肪細胞壞死，或產生硬塊(鈣化)。脂肪細胞一

般係藉由抽脂而獲得，但所抽吸之脂肪係除脂肪細胞或脂肪幹細胞以外，亦包含各種雜質之混合物。作為應自此種混合物去除之雜質，可列舉：血液(尤其是紅血球)、死活細胞、老化細胞等。

【0007】 與此相對，提出如下方法：使用專利文獻7(日本專利特表2007-533396)中所記載之安裝有重力過濾器(weight filter)之注射器施加離心分離，自包含利用抽脂而採集之脂肪細胞或脂肪幹細胞之混合物去除引起鈣化或脂肪壞死之雜質，調製包含健康之濃縮脂肪細胞及脂肪幹細胞之細胞製劑(Condensed Rich Fat：CRF(註冊商標))，注入此種細胞製劑。根據此種方法，由於細胞之定著率提高，亦難以產生硬塊等問題，故而被廣泛接受。

【0008】 如此，關於脂肪細胞及脂肪幹細胞之分離及濃縮，開發出各種技術，且不斷提供安全且定著性優異之脂肪細胞及脂肪幹細胞。又，包含該等脂肪細胞及脂肪幹細胞之細胞製劑如專利文獻8(專利第5572777號公報)所示，用作對由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和、及該疾病之治療有用之細胞製劑，或對損傷之肌肉之修復有用之細胞濾液製劑。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0009】 專利文獻1：日本專利特開2011-132812號公報

專利文獻2：日本專利特開2010-265252號公報

專利文獻3：日本專利特表2005-519591號公報

專利文獻4：國際公開WO2014/178438號

專利文獻5：日本專利特表2005-519883號公報

專利文獻6：日本專利特表2007-509601號公報

專利文獻7：日本專利特表2007-533396號公報

專利文獻8：日本專利第5572777號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0010】 根據上述之毛髮再生用之細胞製劑或對由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和、及該疾病之治療有用之細胞製劑，僅藉由自所採集之脂肪粗組織，採集脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞使成為共存之狀態，即便不進行培養處理亦可發揮特定之治療效果。然而，由於該等細胞製劑中之幹細胞係活的且可進一步分化之細胞，故而於將該等細胞製劑移植到特定之部位時，有可能細胞原位增生或分化，給移植部位帶來不良影響。此外，幹細胞之使用存在各種法律限制，存在無法自由地用於治療之制約。

【0011】 本發明人為了解決使用包含此種幹細胞之細胞製劑之情形之課題而進行了銳意研究，結果發現，以藉由去除幹細胞之細胞膜(以下有時表述為「破壞幹細胞」)而使用幹細胞之內容物(以下稱為「濾液」。再者，於該狀態下，不為幹細胞)之方法，於已去除幹細胞之細胞膜之濾液、即幹細胞濾液中，由於包含由幹細胞分泌之對上述毛髮再生或特定之疾病之治療有效之成分，故而對該等毛髮再生或特定之疾病之治療有效，從而完成了本發明。

【0012】 即，本發明之另一目的在於提供一種使用已去除幹細胞之細胞膜之幹細胞濾液製劑之可實現毛髮再生之幹細胞濾液製劑、對由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療有用之幹細

胞濾液製劑、進而對損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療有用之幹細胞濾液製劑。

[解決問題之技術手段]

【0013】 本發明之第1態樣之幹細胞濾液製劑之特徵在於：含有已去除細胞膜之幹細胞之濾液。

【0014】 於藉由去除幹細胞之細胞膜而獲得之濾液、即幹細胞濾液中，包含由幹細胞分泌之對毛髮再生或由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療有效之成分。本發明之第1態樣之幹細胞濾液製劑由於含有此種幹細胞濾液，故而若用於毛髮再生或由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療，則可發揮良好之效果。

【0015】 又，本發明之第1態樣之幹細胞濾液製劑由於不包含活的幹細胞自身，故而即便移植到特定之部位，幹細胞亦不會增生或分化，故而不會給移植部位帶來不良影響。此外，幹細胞之使用存在各種法律限制，但本發明之第1態樣之幹細胞濾液製劑由於不包含活的幹細胞自身，故而不受法律限制，而可自由地用於各種治療。

【0016】 再者，於該態樣之幹細胞濾液製劑中，可視需要添加先前公知之藥學上容許之載體、賦形劑、消炎劑、鎮痛劑、免疫抑制劑等。進而，於不損壞該態樣之幹細胞濾液製劑之效果之範圍內，亦可添加膠原蛋白、纖維母細胞、成長因子、生長因子、細胞激素等，又，例如亦可併用PRP(Platelet Rich Plasma：富血小板血漿)等已知組織再生作用之大量細胞製劑。

【0017】 於該態樣之幹細胞濾液製劑中，上述幹細胞可設為選自脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞(induced pluripotent stem cell)及ES細胞(胚性幹細胞：embryonic stem cell)中之至少1種。

【0018】 已知該等各種幹細胞有與各者對應之各種疾病之治療效果。根據該態樣之幹細胞濾液製劑，若用於與各者之幹細胞對應之各種疾病之治療，則可發揮良好之效果。

【0019】 又，亦可為將脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞及及ES細胞中之至少2種混合使用而得者。於iPS細胞或ES細胞之濾液之情形時，即便為1種亦可獲得充分之效果，但於添加混合脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、及色素性幹細胞之濾液之情形時，可獲得更良好之效果。再者，於僅為脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞及色素性幹細胞之濾液之情形時，若組合該等中之2種以上，則效果較高，又，若組合3種，則效果更大。

【0020】 又，於該態樣之幹細胞濾液製劑中，亦可進而包含脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分。若不僅包含幹細胞濾液，且包含脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分，則除利用幹細胞濾液本身所獲得之各種治療效果以外，可見基於脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分之共存之效果之提高。尤其是作為毛髮再生用、由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療用、或損傷之肌肉之修復用、褥瘡之預防或治療用，可發揮良好之效果。

【0021】 並且，若包含脂肪細胞或存在於脂肪細胞周邊之ECM(細胞外基質)等，則可改善關節等之滑動而於早期緩和關節痛，緩和由骨間

接合部之疾病引起之疼痛，其間，促進利用幹細胞濾液之骨組織、軟骨組織、軟組織等關節內之組織再生。又，藉由將該態樣之幹細胞濾液製劑注入椎間盤等，不僅起到緩衝之作用，發揮改良(改善)椎體之運動之效果，且關節痛之緩和效果長時間持續。又，若組合使用脂肪細胞及幹細胞濾液，則藉由脂肪細胞之作用，幹細胞濾液保持於患部，進一步促進幹細胞濾液之生著效率及組織再生效率，因而對骨間接合部之疾病之治療更有效。

【0022】 進而，若組合使用脂肪細胞及幹細胞濾液，則尤其對因肌肉之改性或手術所引起之肌肉之切除而損傷之肌肉具有優異之修復效果，可早期緩和由肌肉損傷所引起之疼痛，故而亦有助於提高患者之QOL(Quality of Life，生活質量)。又，若將自脂肪細胞提取之有效成分、例如作為炎症性細胞激素之IL-1 β 添加於幹細胞濾液，則有抑制軟骨細胞中之IL-1 β 誘導性蛋白分解酵素表現，保護軟骨組織之作用。

【0023】 進而，本發明之第2態樣之幹細胞濾液製劑之調製方法之特徵在於：包括以下之(1)及(2)之步驟。

(1)破壞幹細胞之細胞膜，獲得包含已破壞之細胞膜、細胞核及細胞質之成分之步驟；

(2)自上述(1)之步驟中所獲得之成分去除細胞膜並以幹細胞濾液之形式進行採集之步驟。

【0024】 於該態樣之幹細胞濾液製劑之調製方法中，作為上述幹細胞，可使用選自脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞(induced pluripotent stem cell)及ES細胞(胚性幹細胞：embryonic stem cell)中之至少1種。又，亦可將脂肪組織源性間葉系幹細

胞、上皮性幹細胞、及色素性幹細胞中之至少2種以上進行混合。於脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、及色素性幹細胞之濾液之情形時，若組合該等中之2種以上，則效果較高，又，若組合3種，則效果更大。又，於iPS細胞或ES細胞之濾液之情形時，即便為1種亦可獲得充分之效果。

【0025】 又，於該態樣之幹細胞濾液製劑之調製方法中，上述(1)之步驟亦可為如下之步驟：對自體內取出之脂肪組織或體內之脂肪組織照射雷射光或超音波，破壞上述脂肪組織內之間葉系幹細胞之細胞膜。

【0026】 又，於該態樣之幹細胞濾液製劑之調製方法中，亦可於上述(2)之步驟中所獲得之幹細胞濾液中，進而添加脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分。

【0027】 根據本發明之第2態樣之幹細胞濾液製劑之調製方法，可容易地調製本發明之第1態樣之幹細胞濾液製劑。

[發明之效果]

【0028】 如以上所述，根據本發明之幹細胞濾液製劑，由於含有幹細胞之內容物，故而若用於毛髮再生或由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療、進而損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療，則可發揮良好之效果，並且，由於不包含活的幹細胞自身，故而即便移植到特定之部位，幹細胞亦不會增生或分化，故而不會給移植部位帶來不良影響。此外，幹細胞之使用中存在各種法律限制，但本發明之幹細胞濾液製劑由於不包含活的幹細胞自身，故而不受法律限制，可自由地用於各種治療。進而，根據本發明之幹細胞濾液製劑之調製方法，可容易地調製發揮上述毛髮再生或由變形關節病等骨間接合部之疾病引起之疼痛

之緩和及該疾病之治療、進而損傷之肌肉之修復、褥瘡之預防或治療效果之幹細胞濾液製劑。

【圖式簡單說明】

【0029】

圖1係於本發明之幹細胞濾液製劑之投予前後，觀察受驗者A之前頂部之生毛狀態而得之結果。

圖2係於本發明之幹細胞濾液製劑之投予前後，觀察受驗者B之前頂部之生毛狀態而得之結果。

圖3A係表示投予幹細胞濾液製劑前之受驗者C之右膝關節之X射線照片，圖3B係表示自投予幹細胞濾液製劑起大約2個月後之受驗者C之右膝關節之X射線照片。

【實施方式】

【0030】 以下，使用各種實施形態對本發明之幹細胞濾液製劑及其調製方法詳細地進行說明。但是，以下所示之各種實施形態係表示用於將本發明之技術思想具體化之例者，而非意在將本發明特定於該等實施形態中所示者。本發明亦可同等應用於申請專利範圍中所包含之其他實施形態。

【0031】

[實施形態1]

於實施形態1中，調製包含脂肪組織源性幹細胞濾液與脂肪細胞之混合物之幹細胞濾液製劑。該實施形態1之幹細胞濾液製劑係適合毛髮再生用者。再者，所謂脂肪組織源性間葉系幹細胞，主要指可分化為脂肪組織、肌肉細胞、骨、軟骨、韌帶、皮膚細胞、神經細胞之幹細胞。

【0032】 實施形態1中所使用之脂肪組織源性間葉系幹細胞可使用採集於自活體採集之脂肪組織者，又，亦可直接使用活體之脂肪組織中所含有者。尤其皮下脂肪組織內所存在之脂肪組織源性間葉系幹細胞相對低襲擊且可容易採集，並且可相對多量地採集，又，可與脂肪細胞同時採集，因此藉由破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞膜並過濾，直接混合所採集之脂肪組織，可調製實施形態1之幹細胞濾液製劑。再者，於實施形態1之幹細胞濾液製劑中，與脂肪細胞相比，與脂肪組織源性間葉系幹細胞對應之濾液成分越多，則發揮越良好之治療效果。

【0033】 再者，脂肪細胞(fat cell)係具有合成、儲藏、釋出脂肪之功能，且形成脂肪組織之細胞。又，脂肪細胞由於完全分化，故而不會引起細胞分裂。於脂肪細胞中，存在白色脂肪細胞及褐色脂肪細胞，可使用該等之任一者，亦可使用兩者之混合物。作為脂肪細胞，可使用使脂肪細胞單離之狀態者，又，亦可使用存在於脂肪細胞周邊之細胞外基質(extra cellular matrix：ECM)與脂肪細胞之混合物。具體而言，作為脂肪細胞，可直接使用所採集之脂肪組織，又，亦可使用自所採集之脂肪組織去除細胞外基質而得者。

【0034】 又，關於實施形態1之幹細胞濾液製劑中之對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液成分之濃度並無特別限制，但就有效率地促進毛髮再生之觀點而言，例如可列舉與幹細胞濾液製劑每1 mL，作為脂肪組織源性間葉系幹細胞之數量以1萬個以上、較佳為10萬個以上、進而較佳為15萬個以上、尤佳為15~20萬個對應之濾液成分濃度。

【0035】 又，關於實施形態1之幹細胞濾液製劑中之脂肪細胞之數量並無特別限制，但就有效率地促進毛髮再生之觀點而言，例如可列舉幹

細胞濾液製劑每1 mL為1,000個以上、較佳為5,000個以上、進而較佳為1萬個以上、尤佳為1萬~2萬個脂肪細胞或與其對應之濾液成分濃度。

【0036】於實施形態1之幹細胞濾液製劑中，關於對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液成分及脂肪細胞之數量之比率並無特別限制，可認為對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液成分之含量越多，則可獲得越優異之毛髮再生效果。例如，關於對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液成分，可列舉：1個脂肪細胞之至少1倍以上、較佳為100倍以上、更佳為500~1000倍左右。

【0037】於實施形態1之幹細胞濾液製劑中，以自體移植為目的，藉由使用源自所投予之患者之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞，還可避免免疫排斥反應。但是，實施形態1之幹細胞濾液製劑並不限制使用源自所投予之患者以外之人之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞進行調製，並用於異體移植。於使用源自所投予之患者以外之人之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞之情形時，較佳為對於濾液調製前自他人採集之脂肪細胞(包含存在於脂肪細胞周邊之細胞外基質(ECM))，例如進行 γ 射線照射等用於去除抗原性之處理。又，脂肪組織源性間葉系幹細胞通常為不具有免疫原性之細胞，但視需要亦可使用供上述處理者。進而，亦可培養脂肪組織源性間葉系幹細胞，自所培養之脂肪組織源性間葉系幹細胞調製幹細胞濾液製劑。

【0038】又，由於脂肪組織中通常包含脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞，故而作為實施形態1之幹細胞濾液製劑，可直接使用所採集之脂肪組織進行調製，又，亦可使用自所採集之脂肪組織去除雜質(例如於脂肪採集時所注入之麻醉液(即腫脹液)、老化之脂肪細胞、血液、組織

液等)而得者、自所採集之脂肪組織去除雜質及一部分脂肪細胞而得者等進行調製。

【0039】

<其他含有成分>

又，實施形態1之幹細胞濾液製劑中，可視需要添加先前公知之藥學上容許之載體、賦形劑、消炎劑、鎮痛劑、免疫抑制劑等。進而，於不損壞實施形態1之幹細胞濾液製劑之效果之範圍內，亦可添加膠原蛋白、纖維母細胞、成長因子、生長因子、細胞激素等。

【0040】 又，只要不損壞實施形態1之幹細胞濾液製劑之效果，則例如亦可將PRP(Platelet Rich Plasma：富血小板血漿)等已知組織再生作用之其他細胞製劑與實施形態1之幹細胞濾液製劑併用。但是，就進一步提高毛髮再生效率之觀點而言，較佳為去除轉化生長因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)而使用。

【0041】

<實驗例1之幹細胞濾液製劑之調製方法>

實施形態1之幹細胞濾液製劑係包含藉由自由已破壞細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞或者已破壞細胞膜之iPS細胞所獲得之液體成分過濾去除固體成分而獲得之液體組分者。因此，為了調製實施形態1之幹細胞濾液，可採用以下之方法(a)~(c)。

【0042】

<方法(a)>

(1a)自由體內採集之脂肪組織去除液體組分，獲得細胞組分之步驟；

(2a)自上述步驟(1a)中所獲得之細胞組分之至少一部分分離脂肪組織

源性間葉系幹細胞與脂肪細胞之步驟；

(3a)藉由對已分離之脂肪組織源性間葉系幹細胞照射雷射光或超音波來破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜而獲得液體成分之步驟；

(4a)過濾上述步驟(3a)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；及

(5a)將上述步驟(2a)中所獲得之脂肪細胞之一部分、與上述步驟(4a)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液的濾液進行混合之步驟。

【0043】

<方法(b)>

(1b)一面利用雷射溶脂儀(LipoLaser)(註冊商標名)等對體內之脂肪組織照射雷射光，一面獲得包含脂肪細胞之細胞組分、以及已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞之步驟；

(2b)自上述(1b)中所獲得之已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞過濾固體成分而獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；

(3b)自上述(1b)中所獲得之細胞組分分離而獲得脂肪細胞之步驟；

及

(4b)將上述步驟(2b)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液與上述步驟(3b)中所獲得之脂肪細胞之一部分進行混合之步驟。

【0044】

<方法(c)>

(1c)於培養液中培養iPS細胞之步驟；

(2c)自上述步驟(1c)之培養液去除液體組分，獲得細胞組分之步驟；

(3c)自上述步驟(2c)中所獲得之細胞組分之至少一部分分離iPS細胞之步驟；

(4c)藉由對已分離之iPS細胞照射雷射光或超音波以破壞iPS細胞之細胞膜而獲得液體成分之步驟；

(5c)過濾上述步驟(4c)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；及

(6c)於上述步驟(5c)中所獲得之濾液中添加脂肪細胞之步驟。

【0045】

<方法(a)之詳細內容>

調製實施形態1之幹細胞濾液製劑之方法(a)包括：

(1a)自由體內採集之脂肪組織去除液體組分，獲得細胞組分之步驟；

(2a)自上述步驟(1a)中所獲得之細胞組分之至少一部分分離脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞之步驟；

(3a)藉由對已分離之脂肪組織源性間葉系幹細胞照射雷射光或超音波來破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜而獲得液體成分之步驟；

(4a)過濾上述步驟(3a)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；及

(5a)將上述步驟(2a)中所獲得之脂肪細胞之一部分、與上述步驟(4a)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液的濾液進行混合之步驟。

【0046】此處，所採集之脂肪組織係指利用抽脂、脂肪切除、除脂術等自脂肪組織採集之脂肪組織源性細胞組分及液體組分之混合物。細胞組分中包含脂肪細胞、脂肪幹細胞及雜質(血球、死活細胞、老化細胞等)。又，液體組分中包含腫脹液、細胞組織液等。

【0047】液體組分與細胞組分之分離簡便而言可藉由將所採集之脂肪靜置而使細胞組分沈澱並分離。液體組分之去除方法並無特別限定，例如可列舉：傾析、抽吸等。又，亦可視需要進行離心分離、過濾等。

【0048】關於離心分離及過濾之條件，只要不損傷脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞且可去除雜質，則無特別限定，例如可列舉以700~2500 ×g進行1~15分鐘、較佳為以2000~2200 ×g進行5~10分鐘之條件。

【0049】又，若為進行過濾之情形，則可藉由使所採集之脂肪組織通過例如具有10~300 μm、較佳為10~150 μm、更佳為10~100 μm、進而較佳為15~20 μm之孔大小之網狀過濾器而去除投予至採集血液、組織液、脂肪之部位之麻醉藥(腫脹液)等而於過濾器上獲得脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞之混合物。又，亦可向具備此種網狀過濾器之容器填充所採集之包含雜質之脂肪組織，供離心分離。

【0050】如此，可獲得已去除液體組分之包含脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞(包含細胞外基質)之細胞組分。於步驟(2a)中，自步驟(1a)中所獲得之細胞組分之至少一部分、較佳為一半分離脂肪組織源性間葉系幹細胞。然後，於步驟(3a)中，藉由對步驟(2a)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞照射雷射光或超音波而破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜而獲得液體成分。繼而，於步驟(4a)中，過濾步驟(3a)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液。進而，於步驟(5a)中，向步驟(2a)中所獲得之脂肪細胞之一部分添加步驟(4a)中所獲得之已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液，藉此可用作實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0051】再者，於上述步驟(2a)之後，亦可設置培養已分離之脂肪組織源性間葉系幹細胞之步驟。

【0052】又，於上述步驟(2a)之後，亦可包括將已分離之脂肪細胞微細化之步驟。脂肪細胞之微細化可利用該技術領域中通常採用之方法進行，並無特別限定，例如視需要可藉由利用鑽孔器等切割已分離之脂肪細胞而進行。此處，微細之脂肪細胞係指具有可通過26~30 gauge、較佳為18~30 gauge之注射針之程度之大小之脂肪細胞。此種將脂肪細胞微細化之處理可進行至少1次、較佳為1~數次、更佳為1~2次。藉由將脂肪細胞微細化，可提高幹細胞濾液製劑之每單位體積之脂肪幹細胞之濃度，不僅進一步顯著發揮毛髮再生效果，且進一步顯著發揮由骨間接合部之疾病或肌肉損傷引起之疼痛之緩和效果、骨間接合部內之組織再生效果、及肌肉修復效果。

【0053】此處，作為分離脂肪組織源性間葉系幹細胞之方法，例如可列舉專利文獻5(日本專利特表2005-519883號公報)中所記載之方法。更具體而言，由於藉由將細胞間之結合分解而變得容易分離脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞，故而於細胞組分添加蛋白質分解酵素。作為蛋白質分解酵素，可例示膠原酶、胰蛋白酶、脂肪酶等，可單獨使用選自該等中之1種，亦可組合2種以上使用。

【0054】作為自經酵素處理之細胞組分分離脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞之方法，並無特別限定，可自先前公知之方法進行適當選擇，例如可列舉：離心分離、過濾等。作為離心分離之條件，只要為可不損傷脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞而進行分離者，則無特別限定，例如可列舉：以100~500 ×g進行1~20分鐘、較佳為以100~300 ×g

進行5~10分鐘之條件。藉由供此種離心分離，可以沈澱物之形式獲得脂肪組織源性間葉系幹細胞，於上清液中濃縮脂肪細胞。

【0055】 並且，藉由使沈澱物中之脂肪組織源性間葉系幹細胞通過具有10~100 μm 、較佳為10~50 μm 、進而較佳為15~20 μm 之孔大小之網狀過濾器而可於過濾器上獲得脂肪組織源性間葉系幹細胞，可於濾液中獲得脂肪細胞。

【0056】 經酵素處理之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞較佳為於分離後供洗淨處理，洗淨可利用磷酸緩衝溶液(PBS)、生理鹽水、林葛爾氏溶液、葡聚糖等進行。洗淨處理可視需要反覆進行複數次，亦可於洗淨後回收細胞時，視需要供離心分離。作為離心分離之條件，只要按照自上述經酵素處理之細胞組分分離脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞時所採用之條件即可。

【0057】 並且，藉由使用網孔更細之過濾器過濾分離脂肪組織源性間葉系幹細胞後之包含脂肪細胞之濾液，而於過濾器上分離脂肪細胞。

【0058】 於例如利用雷射法或超音波法將以此方式分離之脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜進行破壞之後，利用過濾器過濾已破壞之細胞膜等固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液。繼而，藉由將已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液與脂肪細胞以特定之比率進行混合，可獲得實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0059】

<方法(b)之詳細內容>

調製實施形態1之幹細胞濾液製劑之方法(b)包括：

(1b)一面利用雷射溶脂儀等對體內之脂肪組織照射雷射光，一面獲得

包含脂肪細胞之細胞組分、以及已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞之步驟；

(2b)自上述(1b)所獲得之已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞過濾固體成分而獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；

(3b)自上述(1b)所獲得之細胞組分分離而獲得脂肪細胞之步驟；

及

(4b)將上述步驟(2b)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液與上述步驟(3b)中所獲得之脂肪細胞之一部分進行混合之步驟。

【0060】 於一面使用雷射溶脂儀自體內對體內之脂肪組織照射雷射光，一面取出細胞組分時，可獲得細胞組分、以及已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞。

【0061】 於步驟(2b)中，自步驟(1b)中所獲得之已破壞細胞膜之狀態之脂肪組織源性間葉系幹細胞過濾固體成分而獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液。繼而，於步驟(1b)中所獲得之脂肪細胞之一部分添加步驟(2b)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液，藉此可用作實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0062】 關於離心分離之條件，只要可分離濾液即可，並無特別限定，例如可列舉：以 $700 \sim 2500 \times g$ 進行1～15分鐘、較佳為以 $2000 \sim 2200 \times g$ 進行5～10分鐘之條件。

【0063】 再者，於步驟(1b)之後，亦可包含將自細胞組分分離之脂肪細胞微細化之步驟。脂肪細胞之微細化可利用該技術領域中通常所採用之方法進行，並無特別限定，例如視需要可藉由利用鑽孔器等切割已分離

之脂肪細胞而進行。此處，微細之脂肪細胞係指具有可通過26～30 gauge、較佳為18～30 gauge之注射針之程度之大小之脂肪細胞。此種將脂肪細胞微細化之處理可進行至少1次、較佳為1～數次、更佳為1～2次。藉由將脂肪細胞微細化，可提高幹細胞濾液製劑之每單位體積之脂肪幹細胞之濃度，不僅進一步顯著發揮毛髮再生效果，且進一步顯著發揮由骨間接合部之疾病或肌肉損傷引起之疼痛之緩和效果、骨間接合部內之組織再生效果、及肌肉修復效果。

【0064】於步驟(3b)中，自步驟(1b)中所獲得之細胞組分分離而獲得脂肪細胞。該步驟與(2a)之步驟相同。

【0065】於步驟(4b)中，將步驟(2b)中所獲得之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液與步驟(3b)中所獲得之脂肪細胞之一部分進行混合，藉此可獲得實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0066】

<方法(c)之詳細內容>

方法(c)包括：

(1c)於培養液中培養iPS細胞之步驟；

(2c)自上述步驟(1c)之培養液去除液體組分，獲得細胞組分之步驟；

(3c)自上述步驟(2c)中所獲得之細胞組分之至少一部分分離iPS細胞之步驟；

(4c)藉由對已分離之iPS細胞照射雷射光或超音波而破壞iPS細胞之細胞膜而獲得液體成分之步驟；

(5c)過濾上述步驟(4c)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之步驟；及

(6c)於上述步驟(5c)中所獲得之濾液中添加脂肪細胞之步驟。

【0067】於步驟(1c)中，於培養液中培養iPS細胞，於步驟(2c)中，自上述步驟(1c)之培養液去除液體組分，獲得細胞組分。然後，於步驟(3c)中，自步驟(2c)中所獲得之細胞組分之至少一部分分離iPS細胞。於步驟(4c)中，藉由對步驟(3c)中所獲得之iPS細胞照射雷射光或超音波而破壞iPS細胞之細胞膜而獲得液體成分。繼而，於步驟(5c)中，過濾步驟(4c)中所獲得之液體成分而去除固體成分，獲得已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液。進而，於步驟(6c)中，於步驟(5c)中所獲得之濾液中添加脂肪細胞，藉此可用作實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0068】此處，步驟(6c)中所添加之脂肪細胞可使用步驟(2a)或步驟(3b)中所分離之脂肪細胞。再者，亦可省略步驟(6c)，僅將步驟(5c)之iPS細胞之濾液用作實施形態1之幹細胞濾液製劑。

【0069】於方法(a)~(c)中，以對幹細胞濾液添加脂肪細胞為例進行了說明，但亦可添加自脂肪細胞提取之有效成分代替脂肪細胞。作為添加於幹細胞濾液之自脂肪細胞提取之有效成分，例如作為抗炎症性細胞激素之抗IL-1 β 抗體等，將有抑制軟骨細胞中之IL-1 β 誘導性蛋白分解酵素表現，而保護軟骨組織之作用。

【0070】

<用途、投予方法>

實施形態1之幹細胞濾液製劑可藉由投予至需要毛髮再生之部位之真皮或皮下組織，而於該部位促進生毛，使毛髮再生。實施形態1之幹細胞濾液製劑可改善由彌漫性脫髮症、產後脫髮症、男性型脫髮症、脂漏性脫髮症、老年性脫髮症、圓形禿、癩痕性脫髮症、由精神疾病引起之脫髮症

等所導致之毛髮稀少。

【0071】 關於實施形態1之幹細胞濾液製劑之投予量，可根據投予部位之毛髮量、患者之性別、體格等進行適當設定，關於脂肪組織源性間葉系幹細胞或iPS細胞之濾液濃度並無特別限制，但就有效率地促進毛髮再生之觀點而言，例如換算為實施形態1之幹細胞濾液製劑每1 mL中所包含之脂肪組織源性間葉系幹細胞或iPS細胞之數量，可列舉1萬個以上、較佳為10萬個以上、進而較佳為15萬個以上、尤佳為15~20萬個之濾液。同樣地換算為實施形態1之幹細胞濾液製劑每1 mL中所包含之脂肪細胞數，可列舉1,000~10萬個左右、較佳為1,000~5萬個左右、進而較佳為5,000~1萬個左右之脂肪細胞數。又，關於幹細胞濾液製劑之投予量，例如投予部位每1 cm²，可列舉0.1~1.0 mL、較佳為0.1~0.5 mL、進而較佳為0.2~0.5 mL。

【0072】 關於將實施形態1之幹細胞濾液製劑投予至需要毛髮再生之部位之方法，並無特別限制，可採用先前公知之投予方法，例如可列舉利用注射器、套管等注入之方法。再者，關於實施形態1之幹細胞濾液製劑之毛髮再生效果，存在個人差異，但通常於投予後2~6周左右確認到生毛，於該部位毛髮再生。

【0073】

< 脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜之破壞 >

於調製實施形態1之幹細胞濾液製劑時，較佳為使用雷射光或超音波以破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜。雷射光通常利用光纖照射於特定之脂肪組織，破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜。此時，若使用作為雷射溶脂儀而眾所周知之雷射光照射裝置，則可一次破壞廣範圍之

脂肪組織。通常之雷射光照射裝置係自光纖之照射端沿直線方向照射雷射光，但雷射溶脂儀光照射裝置係自光纖之照射端將雷射光沿立體角360度之方向擴散照射者。

【0074】 又，利用超音波之脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜之破壞處理可使用周知之超音波均質機進行。由於利用超音波之細胞膜之破壞處理係利用來自探針之機械能產生極小之氣泡並使其破裂，反覆激烈地衝擊細胞使其破碎者，故而於處理中容易產生熱量，因此較理想為於脈衝模式下進行照射。

【0075】 於使用任一雷射光照射裝置或超音波均質機之情形時，藉由對自活體摘出之脂肪組織或脂肪組織源性間葉系幹細胞，或者對活體內之脂肪組織直接照射雷射光或超音波，皆可破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜。尤其對活體內之脂肪組織直接照射雷射光之方法於抽脂中被廣泛採用，該情形時可自活體直接獲得包含已破壞細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞組分及液體組分之混合物。

【0076】 又，自活體組織直接採集脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞時，可採用周知之超音波抽吸法，但由於所採集之脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞之細胞膜未被破壞，故而必須另外採用使用上述雷射光或超音波之細胞膜之破壞方法。再者，作為破壞細胞膜之方法，以使用雷射光照射裝置或超音波均質機為例進行了說明，但只要為照射雷射光或超音波之裝置即無特別限定。又，破壞細胞膜之方法並不限定於使用照射雷射光或超音波之裝置者，本發明亦包括藉由反覆進行冷凍及解凍1次以上而破壞細胞膜之方法、或破壞細胞膜之其他方法。

【0077】

[試驗例1]

以下，利用試驗例1對實施形態1之幹細胞濾液製劑之作用、效果具體地進行說明，但實施形態1之幹細胞濾液製劑並不限定於該等實驗例進行解釋。

【0078】**(1)幹細胞濾液製劑之調製**

幹細胞濾液製劑之調製使用LIPOMAX-SC(Medikan Corp.製造，韓國首爾)套組。於本幹細胞濾液製劑之調製步驟中，可使細胞完全不與外部大氣接觸而進行。具體方法如下。

【0079】 使用注射器(製造成用於LIPOMAX-SC之注射器：Medikan Corp.製造，韓國首爾)，自各受驗者進行抽脂。將包含所採集之脂肪之注射器於室溫(約25°C)下靜置約10分鐘而分離為細胞組分與液體組分，將包含腫脹液之液體組分作為廢液。其後，將注射器以2200 ×g離心分離8分鐘。利用離心分離，分離為上層(游離油脂)、中間層(脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞)、下層(細胞組織液等液體組分)之三層。其後，於注射器內僅留下中間層而廢棄上下層，藉此獲得脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞之濃縮物。其次，由該濃縮物分離為脂肪組織源性間葉系幹細胞與脂肪細胞。

【0080】 其次，對脂肪細胞進行膠凝化(Gelling)處理，進行相對較大之脂肪細胞之微細化。膠凝化處理進行1~3次。膠凝化中，使用鑽孔器(Filler Geller切割機：MEDIKAN公司製造)，切割脂肪細胞而進行微細化，進而以2200 ×g離心分離5分鐘，藉此獲得微細化之脂肪細胞。

【0081】 將脂肪組織源性間葉系幹細胞抽吸至與上述相同之注射器

內，藉由於該注射器內照射雷射溶脂儀光，破壞脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜。繼而，將注射器以 $2200 \times g$ 離心分離8分鐘。利用離心分離，分離為上層(游離油脂)、中間層(已破壞之細胞膜等固體成分)、下層(脂肪組織源性間葉系幹細胞濾液)之三層。其後，採集濾液，將於該濾液中添加經微細化之脂肪細胞而得者作為試驗例1之幹細胞濾液製劑投予至患部。

【0082】 再者，由於脂肪細胞及脂肪組織源性間葉系幹細胞使用了源自各患者之脂肪細胞及脂肪組織源性間葉系幹細胞，故而對各患者進行上述操作。與對應於所獲得之幹細胞濾液製劑中之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液成分及對應於脂肪細胞之濾液成分分別對應之細胞數根據患者而不同，幹細胞濾液製劑每1 mL包含對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞約15~20萬個之濾液成分、對應於脂肪細胞約1萬~2萬個之濾液成分。

【0083】

(2)毛髮再生效果之確認

對2名由於脫髮症等而前頂部變得毛髮稀少之受驗者，使用注射器將上述所獲得之幹細胞濾液製劑2.5 mL注射於變得毛髮稀少之右前頂部(約 12.5 cm^2)之皮下。

【0084】 針對受驗者A及B，觀察自幹細胞濾液製劑投予起2~3個月後投予部位之生毛狀況而得之結果分別示於圖1及圖2。根據該結果，確認到包含脂肪組織源性間葉系幹細胞及脂肪細胞之幹細胞濾液製劑有於毛髮稀少部位促進生毛而使毛髮再生之作用。

【0085】

[實施形態2]

於實施形態2中，將以上述(c)之方式調製之包含脂肪組織源性間葉系幹細胞濾液及脂肪細胞之幹細胞濾液製劑用作用於治療骨間接合部之疾病之幹細胞濾液製劑。再者，於實施形態2中所使用之幹細胞濾液製劑中，例如亦可併用PRP(Platelet Rich Plasma：富血小板血漿)等已知組織再生作用之其他細胞濾液製劑，進而，藉由向PRP添加洛沙坦(losartan)等血管緊張素II受體拮抗劑，而進一步提高軟骨組織之再生效果。但是，就組織再生效率提高之觀點而言，例如於期待軟骨組織之再生之情形時，較佳為自PRP去除VEGF(血管內皮細胞生長因子)，於期待骨再生之情形時，較佳為去除BMPs(骨形成蛋白質)而使用。

【0086】 實施形態2之幹細胞濾液製劑對骨間接合部之疾病亦發揮優異之治療效果。骨間接合部係指骨之連結部分，包含利用軟骨或軟骨與纖維性結締組織之組合連接之軟骨性連結、利用包裹軟骨及關節囊之滑膜連接之滑膜性連結、及利用纖維性結締組織連接之纖維性連結，但此處尤其係指利用軟骨性連結及滑膜性連結而連接之具有可動性之部分。作為骨間接合部，具體而言，可例示：脊椎關節、膝關節、足關節、足趾關節、腕關節、手關節、肘關節、肩關節、手指關節、肩鎖關節、薦腸關節等。又，例如於膝關節之情形時，韌帶、半月板等軟組織亦包含於上述骨間接合部，於脊椎關節之情形時，關節盤(椎間盤)等亦包含於上述骨間接合部。

【0087】 又，所謂骨間接合部之疾病，可列舉：突出(脫出)、變形、改性、炎症等，具體而言，可列舉：椎間盤突出、變形性脊椎病等脊椎疾病；變形性關節病(包括變形性腕關節病、變形性膝關節病等)、慢性關節病等關節疾病；類風濕性關節炎等自己免疫性疾病；膝關節特發性骨

壞死症、股骨頭壞死症等骨壞死症等；較佳可列舉：椎間盤突出、變形性關節病、慢性關節病、膝關節特發性骨壞死症、股骨頭壞死症。

【0088】 作為實施形態2之幹細胞濾液製劑中之對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之含量，只要為可獲得骨間接合部之疾病之治療效果之範圍，則無特別限定，可認為對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之含量越多，則可獲得越優異之治療效果，例如可列舉與相對於脂肪細胞1個，對應於脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液之含量為至少1個以上、較佳為5個以上、更佳為1~10個、進而較佳為5~10個對應之濾液含量。又，較佳為包含實施形態2之幹細胞濾液製劑每1 mL中所包含之脂肪組織源性間葉系幹細胞之數量通常為10萬個以上、較佳為15萬個以上、進而較佳為15~20萬個之濾液。

【0089】 關於實施形態2之幹細胞濾液製劑之投予量，只要為可獲得對骨間接合部之疾病之治療效果之範圍，則無特別限定，可根據投予部位之大小、疾病之部位、疾病之程度、患者之性別、體格等進行適當設定，可列舉：0.5~20 mL、較佳為1~10 mL、進而較佳為1~5 mL。又，例如，對於膝關節，可投予實施形態2之幹細胞濾液製劑1~20 mL、較佳為1~10 mL、進而較佳為5~10 mL。又，對於椎間盤，可投予實施形態2之幹細胞濾液製劑0.5~20 mL、較佳為1~15 mL、進而較佳為1~2 mL。

【0090】 作為投予方法，可列舉使用注射器、套管等注入至骨間接合部之疾病部位(例如關節腔、椎間盤(intervertebral disk)等)之方法，但並不限定於此。又，注入時，藉由以注射針或套管之前端刺激注入部位，可獲得更優異之治療效果。刺激之方法並無特別限定，例如可列舉如下方

法：於注入幹細胞濾液時，將前端被傾斜切割之套管於前後左右旋轉而刺激注入部位。

【0091】 於將實施形態2之幹細胞濾液製劑投予至具有該等疾病之患者之情形時，亦可視需要於進行利用公知之方法之處置後進行投予。例如，若為椎間盤突出之情形，則可於利用PLDD(Percutaneous Laser Disc Decompression，經皮雷射椎間盤減壓術)等先前公知之方法去除脫出之椎間盤後，投予(注入)實施形態2之幹細胞濾液製劑。藉由實施形態2之幹細胞濾液製劑中所包含之脂肪細胞之作用，由骨間接合部之疾病引起之疼痛(關節痛)得到緩和，進而，於包含中胚層系幹細胞濾液之情形時，利用該細胞之作用促進骨間接合部中之骨組織、軟骨組織、軟組織等之再生。

【0092】 又，於實施形態2之幹細胞濾液製劑中，亦可將步驟(2c)中分離脂肪幹細胞而獲得之脂肪細胞洗淨後於步驟(5c)中混合於幹細胞濾液中。洗淨可利用與上述對脂肪幹細胞進行之洗淨處理相同之方法進行。此處所獲得之脂肪細胞由於選擇、濃縮健康之經微細化之脂肪細胞，故而對由骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和起到進一步顯著優異之效果。再者，此處對使用以上述(c)之方法調製之幹細胞濾液製劑進行了說明，但於使用以上述(a)、(b)、(d)及(e)之方法調製之幹細胞濾液製劑之情形時，亦起到與上述(c)之情形相同之優異之效果。

【0093】

[試驗例2.由變形性關節病引起之疼痛緩和效果]

將上述實施形態2之幹細胞濾液製劑投予至具有變形性膝關節病之受驗者，觀察症狀之變化。其結果為，於注入實施形態2之幹細胞濾液製劑之受驗者中，自注入當天膝關節痛減輕，其效果持續大約1個月。又，若

與注入玻尿酸之受驗者相比，明顯自早期表現出膝關節痛之緩和效果，疼痛之緩和效果亦顯著。

【0094】

[試驗例3.對變形性關節病之組織再生效果]

受驗者C

做手術時年齡66歲 男性

既往病歷：股骨內髌壞死(右膝)

對受驗者C，使用前端被傾斜切割之套管，將上述步驟(c)中調製之包含已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞濾液及脂肪細胞之幹細胞濾液製劑(5 mL，包含脂肪幹細胞約75萬~200萬個)注入到右膝關節。將於幹細胞濾液製劑之注入前及自注入起大約2個月後所拍攝之受驗者C之右膝關節外側關節裂隙之X射線照片分別示於圖3A及圖3B。

【0095】

(結果)

於治療當天~5天以內，受驗者C之膝關節之疼痛顯著改善，其後疼痛改善狀態亦持續，又，行走顯著改善。

【0096】 根據受驗者C之X射線照片所見，顯示變形性關節病之改善及關節裂隙之擴大。即，如圖3所示，受驗者C之右膝關節之關節裂隙自治療前之圖3A之狀態於治療後約1個月時擴大至圖3B之狀態，症狀得到改善。

【0097】 根據試驗例3之結果，顯示藉由將包含已去除細胞膜之幹細胞之濾液及脂肪細胞之濾液之幹細胞濾液製劑注入到具有變形性膝關節病之受驗者C之膝關節，促進膝關節內之組織再生。

【0098】

[試驗例4.對骨壞死之組織再生效果]

對除變形性膝關節病以外，併發骨壞死之試驗例3之受驗者C，將上述步驟(c)中調製之包含已去除細胞膜之幹細胞之濾液及脂肪細胞之幹細胞濾液製劑(包含5~10 mL對應於脂肪幹細胞約75~200萬個之濾液)注入到骨壞死部位。

【0099】 受驗者C中，於將幹細胞濾液製劑剛注入到關節內後~注入2天以內，行走困難、疼痛等症狀得到顯著改善。關節裂隙於自治療起大約2個月內得到顯著改善。進而，於受驗者C之關節內注入幹細胞濾液製劑後2個月內確認到骨壞死影像之顯著改善。

【0100】

[試驗例5.於將作為抗炎症性細胞激素之抗IL-1 β 添加於幹細胞濾液之情形時之效果]

於試驗例5中，對於脂肪組織源性間葉系幹細胞濾液，使用將自脂肪細胞提取之有效成分之一且作為抗炎症性細胞激素之抗IL-1 β 添加於幹細胞濾液而得之幹細胞濾液製劑。若將添加有抗IL-1 β 抗體之幹細胞濾液製劑注入到受驗者之關節內，則有抑制軟骨細胞中之IL-1 β 誘導性蛋白分解酵素表現，且保護軟骨組織之作用。

【0101】

[實施形態3.肌肉修復方法]

於實施形態3中，將與實施形態2中所使用者相同之幹細胞濾液製劑投予至具有肌肉損傷之患者之肌肉損傷部位。再者，於該肌肉修復用幹細胞濾液製劑中，亦可視需要添加先前公知之藥學上容許之載體、賦形劑、

消炎劑、鎮痛劑、免疫抑制劑等。又，亦可於不損壞實施形態3之幹細胞濾液製劑之效果之範圍內添加膠原蛋白、纖維母細胞、成長因子、生長因子、細胞激素等。

【0102】 同樣地，只要不損壞實施形態3之幹細胞濾液製劑之效果，則例如亦可併用PRP(Platelet Rich Plasma：富血小板血漿)等已知組織再生作用之其他細胞濾液製劑，但就進一步提高肌組織之再生效率之觀點而言，較佳為去除轉化生長因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)使用。

【0103】 實施形態3之幹細胞濾液製劑於應用於肌肉損傷部位之情形時發揮優異之肌肉修復效果。肌肉損傷中除肌肉改性、肌肉之纖維化、肌纖維之破壞或壞死、肌萎縮、肌麻痺、肌肉力量降低等以外，亦包含由於手術或外傷等切除肌肉之情形。又，應用實施形態3之幹細胞濾液製劑之肌肉之部位或種類並無特別限定，例如可列舉：軀幹肌(包括上肢或下肢之肌肉、大胸肌)等骨骼肌；膀胱括約肌等平滑肌；心肌。例如，藉由於上肢之肌肉之損傷部位投予實施形態3之幹細胞濾液製劑，由肌肉損傷所引起之疼痛於早期得到緩和，進而肌肉得到修復，藉此可實現上肢之ROM(Range of Motion：關節活動範圍)之擴大或運動功能之改善。

【0104】 又，藉由對呈現由膀胱括約肌之肌肉力量降低或損傷等所引起之尿失禁、尿頻等排尿障礙之患者之膀胱括約肌投予實施形態3之幹細胞濾液製劑，可提高膀胱括約肌之肌肉力量而安全且容易地消除尿失禁、漏尿等問題。又，亦可應用於具有心肌梗塞、缺血再灌注損傷、肌肉萎縮症(例如Duchenne肌肉萎縮症(DMD))、肌炎(肌病)等肌肉疾病之患者之肌肉損傷部位。

【0105】 又，肌肉損傷大多伴隨著疼痛，但藉由將實施形態3之幹

細胞濾液製劑投予至肌肉損傷部位，可於早期緩和疼痛。此種疼痛緩和效果並非要求本發明之限定解釋，可認為實施形態3之幹細胞濾液製劑中所包含之幹細胞濾液之效果藉由脂肪細胞而協同地發揮作用。

【0106】 以肌肉修復為目的而使用實施形態3之幹細胞濾液製劑之情形時之投予量只要為可獲得肌肉修復效果之範圍，則無特別限定，可根據投予部位之大小、疾病之部位、疾病之程度、患者之性別、體格等進行適當設定。例如，作為損傷肌肉之單位體積每10 mL之投予量，可列舉換算為幹細胞數為10～400萬個、較佳為20～200萬個、進而較佳為20～100萬個之濾液。又，於使用利用包括步驟(b)之方法所獲得之幹細胞濾液製劑之情形時，例如損傷肌肉之單位體積每10 mL，可列舉0.5～20 mL、較佳為1～10 mL、進而較佳為1～5 mL。

【0107】 以肌肉修復為目的而使用本發明之幹細胞濾液製劑之情形時之投予方法並無特別限定，可採用先前公知之投予方法，例如可列舉：利用注射器、套管等注入到肌肉損傷部位之方法。再者，於使用利用上述(a)～(e)之任一方法調製之幹細胞濾液製劑之情形時，亦發揮優異之肌肉修復效果。

【0108】 於上述實施形態1～3中，示出了使用包含幹細胞濾液及脂肪細胞者之例，但本發明並不限定於此，僅使用幹細胞濾液之情形、使用包含幹細胞濾液及自脂肪細胞提取之有效成分者之情形、使用複數種幹細胞濾液之情形之任一者皆可實施，與實施形態1～3中所說明者同樣地可獲得顯著之治療效果。例如，不論僅使用脂肪組織源性間葉系幹細胞濾液之情形，又，還是僅iPS細胞濾液之情形，皆可獲得顯著之治療效果。

【0109】 再者，此處示出了以肌肉修復為目的而使用本發明之幹細

胞濾液製劑之例，但若使用本發明之幹細胞濾液製劑，褥瘡之預防或治療亦可獲得顯著之治療效果。例如，褥瘡之治療中，於應治療之部位單獨塗佈本發明之幹細胞濾液製劑，或者與周知之褥瘡治療劑一同併用以保護患部即可。又，褥瘡之預防中，於容易產生褥瘡之部位單獨塗佈本發明之幹細胞濾液製劑或者與周知之保濕劑等一同塗佈即可。

【0110】 又，於實施形態1~3中，示出了使用包含幹細胞濾液及脂肪細胞者之例，但本發明並不限定於此，僅為選自脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞及ES細胞中之至少1種之去除細胞膜之濾液、於該等濾液中添加脂肪細胞或自脂肪細胞提取之有效成分而得者、或者將選自該等濾液與脂肪細胞或自脂肪細胞提取之有效成分之濾液中之複數種進行混合而得者，皆可發揮與各者之幹細胞之種類對應之特定之治療效果。例如，於使用iPS細胞之情形時，亦可獲得顯著之治療效果。又，脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞及ES細胞亦可為經培養者。又，例如亦可將脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、及色素性幹細胞中之至少2種以上進行混合。於脂肪組織源性間葉系幹細胞、上皮性幹細胞、及色素性幹細胞之濾液之情形時，若組合該等中之2種以上，則效果較高，又，若組合3種，則效果更大。又，於iPS細胞或ES細胞之濾液之情形時，即便為1種亦可獲得充分之效果，進而，亦可向其中添加脂肪細胞或自細胞脂肪提取之有效成分。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液、以及微細化之脂肪細胞、抗IL-1 β 抗體、細胞激素、膠原蛋白、細胞外基質、纖維母細胞、成長因子、生長因子、或免疫抑制劑之至少任一者的用途，

於毛髮再生之治療中更包含選自上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞或ES細胞中之至少1種幹細胞之濾液的用途，

上述用途係用以製造使用於毛髮再生之治療、及

由包含變形關節病或類風濕性關節炎之骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療之至少任一者的治療用幹細胞濾液製劑。

【第2項】

一種幹細胞濾液製劑之製造方法，該幹細胞濾液製劑係含有已去除細胞膜之脂肪組織源性間葉系幹細胞之濾液、以及

微細化之脂肪細胞、抗IL-1 β 抗體、細胞激素、膠原蛋白、細胞外基質、纖維母細胞、成長因子、生長因子、或免疫抑制劑之至少任一者，

該幹細胞濾液製劑係使用於毛髮再生、及

由包含變形關節病或類風濕性關節炎之骨間接合部之疾病引起之疼痛之緩和及該疾病之治療之至少任一者，

於用於毛髮再生時，該幹細胞濾液製劑進而含有選自上皮性幹細胞、色素性幹細胞、iPS細胞或ES細胞中之至少1種幹細胞之濾液，且

該製造方法之特徵在於：包括以下之(1)~(3)之步驟：

(1)破壞幹細胞之細胞膜，獲得包含已破壞之細胞膜、細胞核及細胞

質之成分之步驟；

(2)自上述(1)之步驟中所獲得之成分去除細胞膜並以幹細胞濾液之形式進行採集之步驟；

(3)將自上述(2)之步驟中所獲得之幹細胞濾液、與微細化之脂肪細胞、抗IL-1 β 抗體、細胞激素、膠原蛋白、細胞外基質、纖維母細胞、成長因子、生長因子、或免疫抑制劑之至少任一者進行混合之步驟。

【第3項】

如請求項2之幹細胞濾液製劑之製造方法，其中上述(1)之步驟係藉由選自對自活體摘出之脂肪組織或脂肪組織源性間葉系幹細胞、或者對活體內之脂肪組織照射雷射光或超音波之方法、或

對自活體摘出之脂肪組織或脂肪組織源性間葉系幹細胞反覆進行冷凍及解凍至少1次以上之方法中之至少1種方法，而破壞上述脂肪組織源性間葉系幹細胞之細胞膜之步驟。

【發明圖式】

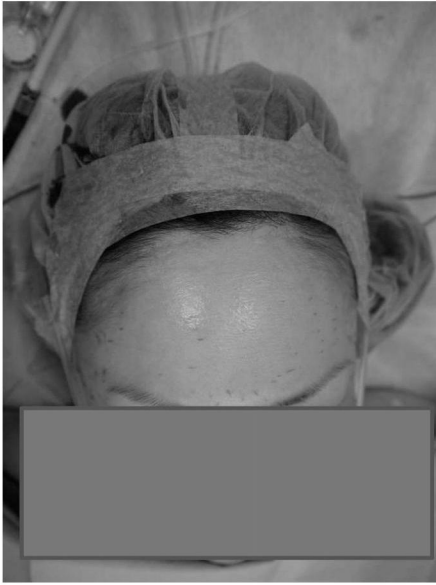


圖1A



圖1B

【圖1】



圖2A



圖2B

【圖2】

圖3A



圖3B



【圖3】