

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-63192

(P2020-63192A)

(43) 公開日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/98 (2006.01)	A 6 1 K 8/98	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2018-67683 (P2018-67683)	(71) 出願人	504268685 株式会社セルバンク
(22) 出願日	平成30年3月30日 (2018. 3. 30)		東京都中央区勝どき1丁目13-1イヌイビル・カチドキ3F
(31) 優先権主張番号	特願2019-508138 (P2019-508138)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成29年3月31日 (2017. 3. 31)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112 弁理士 中西 基晴
		(74) 代理人	100107386 弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、化粧用組成物およびその製造方法に関する。

【解決手段】本発明の化粧用組成物は、当該化粧用組成物を使用するヒト対象から得た皮膚片より分離した真皮線維芽細胞の培養上清液を含む、ここにおいて、当該培養上清液は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られた血清含有培地を用いて真皮線維芽細胞を培養した培養上清液である。本発明の製造方法は、(i) 当該化粧用組成物を使用するヒト由来の真皮線維芽細胞を培養し、継代する、ここで当該血清は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られたものである；(i i) (i) で得られた培養物の培養上清液を回収する；(i i i) 回収した培養上清液を濃縮する；そして、(i v) ベース化粧品に、(i i i) で濃縮した培養上清液を添加する；工程を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化粧品用組成物であって、当該化粧品用組成物を使用するヒト対象から得た皮膚片より分離した真皮線維芽細胞の培養上清液を含む、

ここにおいて、当該培養上清液は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られた血清含有培地を用いて真皮線維芽細胞を培養した培養上清液である、前記化粧品用組成物。

【請求項 2】

培養上清液が、濃縮された培養上清液である、請求項 1 に記載の化粧品用組成物。

【請求項 3】

培養上清液を、3% (w/w) ~ 10% (w/w) で含む、請求項 1 または 2 に記載の化粧品用組成物。

【請求項 4】

化粧水、乳液、クリームである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化粧品用組成物。

【請求項 5】

真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧品用組成物の製造方法であって、以下の工程：

(i) 当該化粧品用組成物を使用するヒト由来の真皮線維芽細胞を血清含有培地を用いて培養し、継代する、ここで当該血清は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られたものである；

(ii) (i) で得られた培養物の培養上清液を回収する；

(iii) 回収した培養上清液を濃縮する；

(iv) ベース化粧品に、(iii) で濃縮した培養上清液を添加する；

を含む、前記方法。

【請求項 6】

工程 (i) において、少なくとも 2 回継代することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (i) における最終回の継代が、培地 40 mL あたり $0.6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞で播種し、コンフルエントになるまで培養することを含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (iii) が、培養上清液を 1.5 ~ 30 倍濃縮することを含む、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (iv) が、培養上清液をベース化粧品の重量に対して 3% (w/w) ~ 10% (w/w) で添加することを含む、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (i) の前に、ヒト由来の真皮線維芽細胞を、以下の工程：

(a) ヒト対象より得た皮膚片をプロテアーゼ処理して表皮と真皮を分離する；

(b) 真皮を細切し、シャーレ中で培養して真皮線維芽細胞を伸展させる；

により得ることを含む、請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (i) で使用する真皮線維芽細胞が、当該化粧品用組成物を使用するヒトから採取後、凍結保存された後のものである、請求項 5 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧品用組成物およびその製造方法に関する。本発明はまた、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む組成物を皮膚に適用することを含む美容方法、化粧品用組成物の製造のための真皮線維芽細胞の培養上清液の使用、および美容方法における使用のための真皮線維芽細胞の培養上清液に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

美容医療の分野における再生医療の一つとして「肌の再生医療」が知られている（非特許文献1～6）。肌の再生医療は、患者の皮膚の一部から分離した肌細胞（真皮線維芽細胞）を培養し、培養した細胞を患者の皮膚に移植する技術である。真皮線維芽細胞は、コラーゲン、エラスチンおよびヒアルロン酸といった皮膚を構成するタンパク質を形成する細胞であり、加齢と共に減少することが知られている。真皮線維芽細胞の移植は、小じわの低減、ハリの向上といった皮膚の外観や状態の改善または向上に効果を示すものである。

【0003】

一方、真皮線維芽細胞を培養した際に生じる培養上清液については、特段の用途は見出されておらず、従来廃棄されてきた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Watson, D., et al., Arch Facial Plast Surg., 1999 Jul-Sep; 1(3):165-70.

【非特許文献2】Weiss, R.A., et al., Dermatol Surg., 2007 Mar; 33(3):263-8.

【非特許文献3】Boss, W.K. Jr, et al., Clin Plast Surg., 2000 Oct; 27(4):613-26.

【非特許文献4】Boss, W.K. Jr, et al., Ann Plast Surg., 2000 May; 44(5):536-42.

【非特許文献5】Zhao, Y., et al., Cell Transplant., 2008; 17(7):775-83.

【非特許文献6】北條元治ら、形成外科、53(10):1087～1093、2010年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物およびその製造方法を提供する。本発明はまた、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む組成物を皮膚に適用することを含む美容方法、化粧用組成物の製造のための真皮線維芽細胞の培養上清液の使用、および美容方法における使用のための真皮線維芽細胞の培養上清液を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本件の発明者は、真皮線維芽細胞の培養液に注目し、研究を開始した。鋭意検討の結果、化粧品に真皮線維芽細胞の培養上清液を添加することで、保湿効果が高く、皮膚の状態および外観を改善する化粧用組成物が得られることを見いだした。当該知見に基づいて、本発明は完成された。

【0007】

すなわち、一態様において、本発明は以下のとおりであってよい。

[1]化粧用組成物であって、当該化粧用組成物を使用するヒト対象から得た皮膚片より分離した真皮線維芽細胞の培養上清液を含む、

ここにおいて、当該培養上清液は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られた血清含有培地を用いて真皮線維芽細胞を培養した培養上清液である、前記化粧用組成物。

【0008】

[2]培養上清液が、濃縮された培養上清液である、上記[1]に記載の化粧用組成物。

[3]培養上清液を、3%(w/w)～10%(w/w)で含む、上記[1]または[2]に記載の化粧用組成物。

【0009】

[4]化粧水、乳液、クリームである、上記[1]～[3]のいずれか1項に記載の化粧用組成物。

10

20

30

40

50

[5] 真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物の製造方法であって、以下の工程：

(i) 当該化粧用組成物を使用するヒト由来の真皮線維芽細胞を血清含有培地を用いて培養し、継代する、ここで当該血清は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られたものである；

(i i) (i) で得られた培養物の培養上清液を回収する；

(i i i) 回収した培養上清液を濃縮する；

(i v) ベース化粧品に、(i i i) で濃縮した培養上清液を添加する；
を含む、前記方法。

【 0 0 1 0 】

[6] 工程 (i) において、少なくとも 2 回継代することを含む、上記 [5] に記載の方法。

[7] 工程 (i) における最終回の継代が、培地 4 0 m L あたり $0.6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞で播種し、コンフルエントになるまで培養することを含む、上記 [5] または [6] に記載の方法。

【 0 0 1 1 】

[8] 工程 (i i i) が、培養上清液を 1.5 ~ 3 0 倍濃縮することを含む、上記 [5] ~ [7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[9] 工程 (i v) が、培養上清液をベース化粧品の重量に対して 3 % (w / w) ~ 1 0 % (w / w) で添加することを含む、上記 [5] ~ [8] のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 1 2 】

[1 0] 工程 (i) の前に、ヒト由来の真皮線維芽細胞を、以下の工程：

(a) ヒト対象より得た皮膚片をプロテアーゼ処理して表皮と真皮を分離する；

(b) 真皮を細切し、シャーレ中で培養して真皮線維芽細胞を伸展させる；

により得ることを含む、上記 [5] ~ [9] のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 1 3 】

[1 1] 工程 (i) で使用する真皮線維芽細胞が、当該化粧用組成物を使用するヒトから採取後、凍結保存された後のものである、上記 [5] ~ [1 0] のいずれか 1 項に記載の方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 4 】

本発明は、保湿効果が高く、皮膚の状態および外観を向上または改善する新たな化粧用組成物を提供するものである点で有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 - 1 】 図 1 - 1 は、濃縮肌細胞由来成分を含む化粧品（グラフ中、「上清あり」と表記する）と当該成分を含まない化粧品（グラフ中、「上清なし」と表記する）についてアンケート調査を行った結果を示すグラフである。肌の乾燥、保湿感、小じわ、ハリ弾力、たるみ、明るさ、しみ、および肌荒れについての結果を示す。

【 図 1 - 2 】 図 1 - 2 は、図 1 - 1 の続きであり、毛穴、柔らかさ、キメ、およびノリについての結果を示すグラフである。

【 図 2 - 1 】 図 2 - 1 は、真皮線維芽細胞の 3 回目の継代培養における上清中の代謝物（グルコース (Glc)、ラクトース (Lac)、グルタミン (Gln)、アンモニア (NH₃)、グルタミン酸 (Glu)) の増減を評価した結果を示すグラフである。丸で囲った数字は検体番号を示す。

【 図 2 - 2 】 図 2 - 2 は、真皮線維芽細胞の 3 回目の継代培養における上清中の各種イオン（カルシウムイオン (Ca)、マグネシウムイオン (Mg)、ナトリウムイオン (Na)) の増減を評価した結果を示すグラフである。丸で囲った数字は検体番号を示す。

【 図 3 】 図 3 は、実施例 1 および 2 示す方法で真皮線維芽細胞を培養 (5 % 血清含有 H F

10

20

30

40

50

DM - 1 (+) 中での培養) 際に真皮線維芽細胞からコラーゲンが産生されていることを確認したグラフである。

【図4】図4は、若年層(30歳未満)の対象から採取した皮膚と、高年層(70歳以上)の対象から採取した皮膚の検体由来の真皮線維芽細胞を、HFD M - 1 (+) (株式会社細胞科学研究所)を用いて培養して得られた細胞増殖能(倍化時間)を示した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下に本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書で特段に定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。

10

【0017】

<化粧用組成物>

一態様において、本願は、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物である。当該化粧用組成物は、ベース化粧品に真皮線維芽細胞の培養上清液を添加したものである。

【0018】

ベース化粧品は、特に限定されないが、化粧水(ローション)、乳液(スキンミルク)、クリーム、美容液、ジェル、パック、ムースであってもよい。ベース化粧品の組成は特に限定されず、化粧品として許容される成分であればいかなる成分を含むものであってもよい。ベース化粧品に含まれることが好ましい成分としては、例えば、アスペルギルスノ(コメ/コメヌカ)発酵液、アスコルビルグルコシド、パルミチン酸アスコルビルリン酸3Na、トリペプチド-3、オリゴペプチド-6、カプロオイルテトラペプチド-3、オリゴペプチド-34、ヘキサペプチド-3、トリフルオロアセチルトリペプチド-2、等が挙げられる。

20

【0019】

真皮線維芽細胞の培養上清液は、ヒト由来の真皮線維芽細胞をヒト線維芽細胞の培養に適した培地中で培養した培養物の培養上清液またはその濃縮液である。培地は特に限定されないが、以下の<化粧用組成物の製造方法>の項目において説明する特徴を有する培地であってもよく、例えばHFD M - 1 (+) (株式会社細胞科学研究所)であってもよい。培地は、血清含有培地である。

30

【0020】

真皮線維芽細胞の培養上清液は、得られた化粧用組成物を使用する対象から得た皮膚片より分離した真皮線維芽細胞の培養上清液またはその濃縮液である。また、その際、培養に用いる血清含有培地は、前記対象と同一対象由来の血液から得られた血清を含んでいてもよい。好ましくは、当該培養上清液は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られた血清含有培地を用いて真皮線維芽細胞を培養した培養上清液である。このように化粧用組成物を使用する対象自身の皮膚から得られた真皮線維芽細胞の培養上清液を用いること、並びに、細胞培養培地として、得られた化粧用組成物を使用する対象から得た血清を含有する培地を用いることで、化粧品に対象自身の細胞から作られる成分を添加したオーダーメイドの化粧品を提供することができる。このようなオーダーメイド化粧品は、より効果が高く、より安全で、そして、当人に馴染みやすい化粧品となり得る。

40

【0021】

別の態様において、本願の化粧用組成物に含まれる真皮線維芽細胞の培養上清液は、濃縮された培養上清液である。培養上清液の濃縮率は、特に限定されないが、1.5~30倍、2~20倍、2~15倍、5~15倍、5~10倍であってもよい。

【0022】

本願の化粧用組成物に含まれる真皮線維芽細胞の培養上清液またはその濃縮液の量は特に限定されないが、例えばベース化粧品の重量に対して2~15%(w/w)、3~10%(w/w)、3~7%(w/w)3~5%(w/w)であってもよい。

50

【0023】

真皮線維芽細胞の培養上清液には、以下：アルギニン塩酸塩、アスパラギン酸、システイン塩酸塩、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン塩酸塩、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、ピオチン、塩化コリン、葉酸、ナイアシンアミド、リボフラビン、チアミン塩酸塩、トコフェロール、アラキドン酸、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、チミジン、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、コハク酸、および組換え体ヒトEFG、からなる群より選択される1以上の成分が含まれていてもよい。真皮線維芽細胞の培養上清液に含まれる成分は、真皮線維芽細胞を培養することにより、真皮線維芽細胞から分泌される成分に由来するものであってもよいし、培地成分に由来するものであってもよい。

10

【0024】

本願の化粧用組成物は、下記「化粧用組成物の製造方法」において説明する方法により製造してもよい。

<化粧用組成物の製造方法>

一態様において本願は、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物の製造方法であって、以下の工程：

(i) 当該化粧用組成物を使用するヒト由来の真皮線維芽細胞を培養し、継代する、ここで当該血清は、真皮線維芽細胞を採取した対象と同一のヒト由来の血液から得られたものである；

20

(ii) (i) で得られた培養物の培養上清液を回収する；

(iii) 回収した培養上清液を濃縮する；

(iv) ベース化粧品に、(iii) で濃縮した培養上清液を添加する；
を含む、前記方法に関する。

【0025】

ヒト由来の真皮線維芽細胞は、ヒト対象より採取した皮膚片より分離した真皮線維芽細胞をそのまま用いてもよく、凍結保存された真皮線維芽細胞を用いてもよい。

真皮線維芽細胞をヒト対象より採取した皮膚片より分離する場合、以下の工程：

(a) ヒト対象より得た皮膚片をプロテアーゼ処理して表皮と真皮を分離する；

(b) 真皮を細切し、シャーレ中で培養して真皮線維芽細胞を伸展させる；

30

により、真皮線維芽細胞を得ることができる。ここで、工程(a)に用いるプロテアーゼは表皮と真皮を分離可能なプロテアーゼであれば特に限定されないが、例えばディスパーゼ(登録商標)I(三光純薬株式会社)等を使用できる。工程(b)の真皮線維芽細胞の伸展は、細切した真皮をヒト線維芽細胞の培養に適した培地中で培養することにより行う。ヒト線維芽細胞の培養に適した培地として、例えば、工程(i)に使用するものとして以下に記載するものを用いることができる。

【0026】

凍結保存された真皮線維芽細胞を用いる場合、凍結された細胞を当業者に公知の手法により解凍して用いることができる。例えば、ヒートブロックによる急速解凍により凍結保存された真皮線維芽細胞を解凍して使用することができる。また、凍結保存された真皮線維芽細胞は、上記工程(i)で培養した真皮線維芽細胞の一部を凍結保存することにより得てもよい。その際、凍結保存する真皮線維芽細胞の継代数は特に限定されず、少なくとも1回継代培養したものであればよい。真皮線維芽細胞の凍結保存は、当業者に公知の手法のいずれかを用いて行うことが可能であるが、例えば、実施例1の工程(3-2)に記載の手法により行ってもよい。

40

【0027】

真皮線維芽細胞は、好ましくは、当該化粧用組成物を使用するヒト対象が、若年層の間に採取した皮膚由来の真皮線維芽細胞を用いる。若年層とは、好ましくは、40代以下、30代以下、20代以下である。若年層の対象から採取した皮膚検体由来の真皮線維芽細胞を培養した場合、高齢になってから採取した皮膚検体由来の真皮線維芽細胞を培養した

50

た場合よりも、高い細胞増殖能を得られる。即ち、効果の高い化粧用組成物の提供が可能となる。化粧用組成物の製造において、凍結保存された真皮線維芽細胞を用いることが可能なため、当人が若年層のうちに皮膚を採取して真皮線維芽細胞を得て、後に、必要な時に解凍して化粧品組成物の製造のために使用することができる。凍結保存可能な期間は特に限定されない、非限定的に、凍結保存は、3か月以上、6ヶ月以上、1年以上、3年以上、5年以上、10年以上、15年以上、20年以上、30年以上可能である。

【0028】

真皮線維芽細胞は、好ましくは、10歳以上、15歳以上、20歳以上のヒト対象から採取する。

工程(i)において、真皮線維芽細胞の培養は、当業者に公知の手法のいずれかにより行ってもよい。培地は、ヒト線維芽細胞の培養に適した培地であれば特に限定されない。ヒト線維芽細胞の培養に適した培地は、以下の成分：

- ・アミノ酸として、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トリプトファン、およびトレオニンからなる群より選択される1以上の成分；

- ・ビタミン類として、アスコルビン酸、ビオチン、塩化コリン、葉酸、ナイアシンアミド、D-パントテン酸カルシウム、リボフラビン、チアミン、ビタミンB12、およびビタミンEからなる群より選択される1以上の成分；

- ・核酸として、チミジン；および/または

- ・その他の成分として、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、および/またはコハク酸；

を含むものであってもよい。好ましくは、ヒト線維芽細胞の培養に適した培地は、さらに以下の成分：

- ・脂質として、アラキドン酸、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸からなる群より選択される1以上の成分；および/または

- ・タンパク質として、組換え体ヒトEGF、および/または組換え体ヒトインスリン；

を含むものであってもよい。このような培地としては、例えばHFDM-1(+)(株式会社細胞科学研究所)を利用することができる。

【0029】

また、一態様において、培地は、好ましくは、血清含有培地である。血清含有培地に含まれる血清の種類は特に限定されないが、好ましくは培養する真皮線維芽細胞を採取した対象と同一対象由来の血液から得られたものであってもよい。培地中に含まれる血清の量は、特に限定されないが、例えば、0.5~20%(v/v)、1~15%(v/v)、3%~15%(v/v)、5%~10%(v/v)であってもよい。

【0030】

培養は、例えば、37°CのCO₂インキュベーター内で行ってもよい。また、培養は平板培養で行っても、浮遊培養で行ってもよい。好ましくは平板培養で行う。

工程(i)において、真皮線維芽細胞を継代する回数に特に限定はないが、好ましくは、少なくとも2回、または少なくとも3回行う。継代培養は、培養スケールの拡大、および不純物の除去を目的に行うものであるため、その回数に上限はない。しかしながら、継代数が増加すると化粧用組成物の製造コストも増大することに鑑みれば、継代数の上限は5回、7回、または10回であってもよい。ここで、凍結保存された真皮線維芽細胞を用いて化粧用組成物を製造する場合において、継代数は、細胞の解凍後の培養についての継代数である。

【0031】

工程(i)における培養スケールは特に限定されないが、好ましくは最終回の継代が、培地40mLあたり0.6~1.5×10⁶細胞で播種し、コンフルエントになるまで培養することを含んでもよい。225cm²フラスコにおいて、0.6~1.5×10⁶細胞

10

20

30

40

50

胞を40mLの培地に播種して培養する場合、約4日間の培養でコンフルエントに達する。

【0032】

工程(i i)では、工程(i)で得られた培養物の培養上清液を回収するが、工程(i)で得られた培養物とは、工程(i)の最終回の継代の培養物を意味する。培養上清の回収は、当業者に公知の手法のいずれかにより行うことができる。平板培養である場合、培養上清の回収はピペットによる吸引によって行ってもよい。浮遊培養である場合、培養上清の回収は培養液の遠心分離後、培養上清のデカントにより行ってもよい。

【0033】

工程(i i i)の培養上清液の濃縮は、当業者に公知の手法のいずれかにより行うことができる。例えば、限外ろ過膜付チューブに培養上清液を入れて遠心することにより、培養上清液を濃縮することができる。培養上清液の濃縮率は、特に限定されないが、1.5~30倍、2~20倍、2~15倍、5~15倍、5~10倍であってもよい。

10

【0034】

工程(i v)において、工程(i i i)で得た濃縮した培養上清液をベース化粧品に添加する。濃縮した培養上清液をベース化粧品に添加した後は、均一になるように混合する。ベース化粧品については、化粧用組成物の項目において上述したとおりである。濃縮した培養上清液は、ベース化粧品の重量に対して2~15%(w/w)、3~10%(w/w)、3~7%(w/w)3~5%(w/w)で添加してもよい。

【0035】

20

<美容方法等>

一態様において、本願は、真皮線維芽細胞の培養上清液を含む組成物を対象の皮膚に適用することを含む美容方法を提供する。真皮線維芽細胞の培養上清液を含む組成物は、上述した本願の化粧用組成物であってもよい。組成物は、1日1回または1日2回、皮膚に適用する。組成物を使用する期間は、特に限定されないが、7日間以上、14日間以上、1ヶ月以上、あることが好ましい。使用期間の上限は特にない。

【0036】

本願の美容方法は、皮膚の状態および外観を改善し、または向上させるための方法である。ここで、皮膚の状態および外観の改善または向上とは、肌の乾燥の改善、肌の保湿感の向上、小じわの改善(低減)、ハリ弾力の向上、たるみの改善(低減)、肌の明るさの向上、しみの改善(目立たなくなる)、肌荒れの改善、毛穴の改善(目立たなくなる)、柔らかさの向上、キメの向上、および化粧のりの向上、からなる群より選択される1以上の状態の改善または向上を意味する。

30

【0037】

別の態様において本願は、化粧用組成物の製造のための真皮線維芽細胞の培養上清液の使用を提供する。また別の態様において本願は、美容方法における使用のための真皮線維芽細胞の培養上清液を提供する。「美容方法」および「真皮線維芽細胞の培養上清液」の用語の定義については上述のとおりである。

【実施例】

【0038】

40

以下に本発明の実施例を説明する。本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって限定されない。

実施例1：化粧用組成物の製造(1) / 皮膚片からの製造

以下(1)~(7)の手順により、化粧用組成物を製造した。

【0039】

(1) 皮膚片の酵素処理および細切

(1-1) 皮膚片の酵素処理

以下(i)~(i i i)の操作は、安全キャビネット内にて室温下で行った。

【0040】

(i) 被験者の同意を得て採取した皮膚片を、滅菌済みピンセットを用いて、1%イソ

50

ジン（登録商標）溶液（株式会社明治）を含む50 mL遠沈管（ポリプロピレン製）に入れた。皮膚片を1%イソジン（登録商標）溶液（20 mL）中で穏やかに1分間振盪した。遠沈管を蓋が下となるように転倒させ、皮膚片を蓋内側に付けた後、遠沈管を元の向きに戻した。

【0041】

(ii)滅菌済みピンセットを用いて、皮膚片を20 mL生理食塩水を含む50 mL遠沈管に移した。皮膚片を生理食塩水中で激しく15秒間攪拌した。遠沈管を蓋が下となるように転倒させ、皮膚片を蓋内側に付けた後、遠沈管を元の向きに戻した。

【0042】

(iii)滅菌済みピンセットを用いて、皮膚片を1.5 mLディスパーゼ（登録商標）I溶液（三光純薬株式会社、GD81060）を含む15 mL遠沈管（ポリプロピレン製）に移した。但し、皮膚片が大きい場合は、2等分など適宜分割した上で移した。

10

【0043】

(iv)37 で1~1.5時間インキュベートした。15~30分おきに反応液をゆっくりと攪拌した。表皮が剥がれにくい場合はインキュベート時間を延長した。

(1-2)皮膚片の細切

(i)上記工程(1-1)終了後、遠沈管を蓋が下となるように転倒させ、皮膚片を蓋内側に付けた後、遠沈管を元の向きに戻した。滅菌済みピンセット2本を用いて、蓋の上で表皮と真皮を分離した。表皮が剥がれにくい場合は、皮膚片をディスパーゼ（登録商標）I溶液中に戻し、37 でさらに10分間反応させた後、分離した。

20

【0044】

(ii)真皮を20 mL生理食塩水を含む50 mL遠沈管に移し、生理食塩水中で激しく15秒間攪拌した。遠沈管を蓋が下となるように転倒させ、真皮を蓋内側に付けた後、遠沈管を元の向きに戻した。

【0045】

(iii)50 mL遠沈管に、HFDM-1(+)(株式会社細胞化学研究所、型番2102P10、以下、実施例において「HFDM」と表記する) 36 mLと被験者の非働化血清 4 mLを加え、10%ヒト血清培地を作成した。10 cm培養ディッシュに、10%ヒト血清培地をディッシュ1枚あたり10 mLずつ分注し、底面を培地で覆った後、約8 mLをピペットに吸い戻し、新しい遠沈管に移した。

30

【0046】

(iv)真皮を上記の培養ディッシュに移し、(iii)で準備した培養ディッシュ上で約1 mm四方に細切した。皮膚片の浮きが多い場合には、37 のCO₂インキュベーター内でしばらく静置した。(iii)で新しい遠沈管に移した培地を培養ディッシュに戻し、全量を10 mLとした。皮膚片の一部を参考品として保存するために、セルバンカー1 mLに皮膚片2片を加えて浮遊させ、クライオチューブを4 に予冷したバイセルに入れた。培養ディッシュは37 のCO₂インキュベーター内で6日間培養した。

(2)細胞の継代(1回目)

(i)上記工程(1-2)の培養ディッシュの培養上清を1ディッシュあたり数mLピペットで吸引し、遠沈管に回収する。残りの培養上清も吸引し、廃棄した。

40

【0047】

(ii)DPBS(Life technologies社、型番14190-2335) 4 mLをピペットで皮膚片に水流が当たらないようにディッシュに加え、底面をDPBSで浸した。ピペットでDPBSを吸引して廃棄し、それぞれのディッシュにピペットでTryple Select(Life technologies社、型番12563-029) 3 mLを加え、インキュベーターにて37 で酵素処理を行った。約2~3分の処理後、顕微鏡で観察し、細胞の剥離開始が観察されなければ処理時間を延長した。顕微鏡下で細胞の剥離開始が観察された後、ディッシュ内の細胞/Tryple Select懸濁液をピペットで吸引し、ディッシュ表面に滴下することで、可能な限り多くの細胞を剥離させた。

【0048】

50

(i i i) 細胞浮遊液を工程 (i) の遠沈管に回収した。細胞回収後のディッシュに H F D M 4 m L を加えて共洗いし、前記の遠沈管に回収した。細胞浮遊液を 4 、 3 3 0 × g (1 3 0 0 r p m) で 6 分間遠心した。

【 0 0 4 9 】

(i v) 細胞回収後のディッシュに 1 0 % 血清含 H F D M 1 0 m L を加え、インキュベーターに戻した。皮膚片の浮きが多い場合には、1 0 % 血清含む H F D M 2 m L を加えて一時的に静置し、皮膚片をディッシュ表面に接着させ、その後 8 m L 加え全量を 1 0 m L にした。細胞の回収が少ない場合は、再度このディッシュから同様の手順にて細胞を回収する。

【 0 0 5 0 】

(v) 工程 (i i i) の遠心後のペレットに H F D M を 2 m L 加えて細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液の細胞数を測定した。細胞浮遊液に H F D M を加え、1 m L あたりの細胞数が $0.6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞以上となるように調整した。

【 0 0 5 1 】

(v i) 2 2 5 c m ² フラスコに H F D M 3 7 m L 、血清 2 m L を加えた。細胞浮遊液をフラスコへ 1 m L ずつ播種する。細胞を播種したフラスコを 3 7 の C O ₂ インキュベーターへ入れ、フラスコ内の細胞密度がほぼ飽和状態に達するまで (約 4 日間) 培養した。

【 0 0 5 2 】

(3) 保管細胞 (P) の保存、および細胞の継代 (2 回目)

(3 - 1) フラスコからの細胞の回収

(i) 2 2 5 c m ² フラスコ内の 1 フラスコあたり 1 0 m L の培養上清を遠沈管に回収し、残りは廃棄した。

【 0 0 5 3 】

(i i) ピペットで D P B S 1 0 m L をフラスコに加え、ゆっくりとフラスコを揺すった。D P B S をデカントにて除去後、再度 D P B S 1 0 m L を用いて洗浄した。D P B S をデカントにて除去後、新しいピペットで 3 7 に保温してある Triple Select 1 0 m L を加え、3 7 のインキュベーターにて酵素処理を行った。約 2 ~ 3 分間の処理後、顕微鏡で観察し、細胞の剥離開始が観察されなければ処理時間を延長した。顕微鏡下で細胞の剥離開始が観察された後に、フラスコの側面をたたいて、フラスコ底面からすべての細胞を剥離した。

【 0 0 5 4 】

(i i i) 細胞 / Triple Select 懸濁液を工程 (i) の遠沈管に回収した。細胞回収後のフラスコに H F D M 1 0 m L を加え、フラスコに付着した細胞を取りきるように共洗いし、前記遠沈管に回収した。

【 0 0 5 5 】

(i v) (i i i) の細胞浮遊液を 4 、 3 3 0 × g (1 3 0 0 r p m) で 6 分間遠心した。遠心後のペレットに H F D M を 1 フラスコあたり 3 m L 加えて細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液の細胞数を測定した。継代する分の細胞を別のチューブに分けた。通常は、 $0.6 \sim 1.5 \times 10^6 / 2 2 5 c m^2$ フラスコで継代する。

【 0 0 5 6 】

(3 - 2) 保管細胞 (P) の保存

(i) クライオチューブ 1 本あたりの細胞数が $2.0 \sim 2.5 \times 10^6 /$ チューブになるよう、本数および細胞数を決定した。

【 0 0 5 7 】

(i i) 上記工程 (3 - 1) (i v) で取り分けた後の細胞浮遊液に、合わせて 2 0 m L になるように D P B S を加えた。細胞浮遊液を 4 、 3 3 0 × g (1 3 0 0 r p m) で 6 分間遠心した。D P B S をデカントにて除去した。

【 0 0 5 8 】

(i i i) クライオチューブ 1 本あたり 1 m L のセルバンカーを加えて、細胞を再浮遊

10

20

30

40

50

させた。クライオチューブに細胞懸濁液を1 mLずつ分注した。クライオチューブを4に予冷したバイセルに入れた。バイセルを-80で保存した。一晚、保存後、液体窒素にて長期保存する。保存は半永久的に可能である。このように保存した細胞を保管細胞(P)と表記する。

【0059】

(3-3) 細胞の継代(2回目)

225 cm² フラスコに血清2 mL、及びHFD M 37 mLを加えた。上記工程(3-1)(iv)で取り分けた後の遠心後のペレットに、播種予定フラスコ1枚あたり1 mLのHFD Mを加えた。細胞浮遊液を225 cm² フラスコへ1 mLずつ播種した。225 cm² フラスコを37のCO₂ インキュベーターへ入れ、フラスコ内の細胞密度がほぼ飽和状態に達するまで(約4日間)培養した。

10

(4) 細胞の継代(3回目)および細胞培養上清の回収

(i) 上記(3-1)および(3-3)と同様に、フラスコからの細胞の回収および細胞の継代培養(3回目)を行った。

【0060】

(ii) (i)の培養物について、培養上清を化粧品原材料としてボトルに回収した。

(5) 低濃度濃縮肌細胞由来成分の調製

(i) 限外ろ過膜付チューブ(日本ポール株式会社、オメガブレン、型番J52041)の上部に70%アルコールを20 mL加え、4、3000×gで5分間遠心した。遠心後、チューブの上部に残った液とメンブレンを通ったアルコールをデカントで廃液ボトルに捨てた。アルコールをデカントにて除去後、DPBSを20 mL加え、4、3000×gで5分間遠心した。遠心後、チューブの上部に残った液とメンブレンを通ったDPBSをデカントで廃液ボトルに捨てた。

20

【0061】

(ii) 工程(4)(i)で回収した培養上清を洗浄したチューブの上部に20 mL加え、4、3000×gで遠心した。概ね、1時間15分の遠心で2倍、2時間の遠心で4倍の濃縮倍率が得られるが、所望の濃縮倍率になるように遠心の時間は適宜調製した。遠心終了後、各チューブの上部に残った濃縮された培養上清をセルストレイナーに通し、50 mL遠沈管に回収した。

30

【0062】

(iii) 濃縮倍率1.5~10倍未満の濃縮液を、「低濃度濃縮肌細胞由来成分」とした。濃縮液は、遠沈管に分注し、-80で約1年保管した。

(6) 高濃度濃縮肌細胞由来成分の調製

(i) 工程(5)(i)と同様に、限外ろ過膜付チューブを洗浄した。

【0063】

(ii) 工程(4)(i)で回収した培養上清を洗浄したチューブの上部に20 mL加え、4、3000×gで遠心した。概ね、3時間の遠心で10倍の濃縮倍率が得られるが、所望の濃縮倍率になるように遠心の時間は適宜調製した。10倍濃縮より濃縮する場合は、10倍濃縮になったら新しい限外ろ過膜チューブ1本につき20 mL以内になるようにまとめて所望の濃縮倍率になるまで遠心を行う。10倍濃縮以下の場合、遠心終了後、各チューブの上部に残った濃縮された培養上清をセルストレイナーに通し、50 mL遠沈管に回収した。

40

【0064】

(iii) 濃縮倍率10倍以上の濃縮液を、「高濃度濃縮肌細胞由来成分」とした。濃縮液を、-80で約1年保管した。

(7) 濃縮肌細胞由来成分のベース化粧品への添加

工程(5)または(6)で得られた濃縮液を、ベース化粧品(化粧水、乳液、クリーム)に添加して、化粧用組成物を得た。当該濃縮液は、ベース化粧品が化粧水、乳液、またはクリームのいずれである場合も、3~10%の割合となるように添加した。

【0065】

50

実施例 2：化粧品組成物の製造（2） / 保管細胞（P）からの製造

以下（1）～（7）の手順により、化粧品組成物を製造した。

（1）細胞の解凍

実施例 1、工程（3 - 2）の保管細胞（P）を解凍する。

【0066】

（i）遠沈管にクライオチューブ本数 × 9 mL の HFDM を入れておいた。

（ii）P2 保管細胞が入っている凍結クライオチューブを 37 °C ヒートブロックにて急速解凍した。解凍した細胞浮遊液を吸引し、ピペットの先を上記（i）の遠沈管の液面につけて細胞浮遊液を注ぎ込み、ピペッティングし、細胞懸濁液とした。同じピペットで細胞懸濁液を 1 mL 吸引し、細胞回収後のクライオチューブを数回ピペッティングすることで共洗いし、細胞を遠沈管に回収した。

10

【0067】

（iii）細胞懸濁液を 4 °C、330 × g（1300 rpm）で 6 分間遠心した。遠心後のペレットに HFDM（播種予定フラスコ枚数 × 1 mL）を加えて細胞を再浮遊させる。細胞浮遊液の細胞数を測定した。

【0068】

（2）フラスコへの播種（細胞の継代（1回目））

（i）下記表 1 に従い、播種細胞数を決定した。

【0069】

【表 1】

20

	播種細胞数 規定
25 cm ² フラスコ	特に規定は設けない。
75 cm ² フラスコ	0.2-5.0×10 ⁶ /75 cm ² フラスコ
225 cm ² フラスコ	0.6-1.5×10 ⁶ /225 cm ² フラスコ
トリプルフラスコ	1.0-2.0×10 ⁶ /トリプルフラスコ

【0070】

（ii）下記表 2 に従い、各種フラスコに血清及び HFDM を加えた。

【0071】

30

【表 2】

	血清	HFDM
25cm ² フラスコ	0.5 mL	8.5 mL
75cm ² フラスコ	0.75 mL	13.2 mL
225cm ² フラスコ	2 mL	37 mL
トリプルフラスコ	2.5 mL	46.5 mL

【0072】

（iii）上記工程（1 - 1）（iii）で得た細胞浮遊液に HFDM を加え、1 mL あたりの細胞数が播種細胞数になるように調製した。細胞浮遊液を各種フラスコへ 1 mL ずつ播種した。各種フラスコを 37 °C の CO₂ インキュベーターへ入れ、フラスコ内の細胞密度がほぼ飽和状態に達するまで（4～6日間）培養した。

40

【0073】

（3）保管細胞（P）の保存、および細胞の継代（2回目）

上記工程（2）の培養物を用い、実施例 1 の工程（3）と同様の手順を行った。

（4）細胞の継代（3回目）および細胞培養上清の回収

実施例 1 の工程（4）と同様の手順を行った。

【0074】

（5）低濃度濃縮肌細胞由来成分の調製

実施例 1 の工程（5）と同様の手順を行った。

50

(6) 高濃度濃縮肌細胞由来成分の調製

実施例1の工程(6)と同様の手順を行った。

【0075】

(7) 濃縮肌細胞由来成分のベース化粧品への添加

実施例1の工程(7)と同様の手順を行い、化粧用組成物を得た。

実施例3：化粧品の評価

公募による31名のモニターを対象に、濃縮肌細胞由来成分を含むまたは当該成分を含まない化粧用組成物(化粧水、乳液、およびクリーム)について、各モニターが直近に使用していた化粧品との比較について、アンケート調査を行った。濃縮肌細胞由来成分を含む化粧用組成物として、真皮線維芽細胞の培養上清液の2倍濃縮液を5%(w/w)で含む化粧用組成物を用いた。アンケート調査のために、各モニターは評価対象の化粧用組成物を2週間連用した。31名のうち、16名は濃縮肌細胞由来成分を含まない化粧品についての使用感を評価し、15名は当該成分を含む化粧品についての使用感を評価した。それぞれの群は無作為に分け、また各モニターには評価している化粧品が濃縮肌細胞由来成分を含むか否かは開示しなかった。

10

【0076】

結果を以下の表3-1および表3-2、ならびに図1-1および図1-2に示す。

【0077】

【表3-1】

使用感の評価(濃縮肌細胞由来成分を含まない化粧品)

20

年代別回答者数	20代	30代	40代	50代	60代	合計
	4	4	6	1	1	16

質問内容	悪くなった	変化なし	どちらともいえない	やや改善	とても改善	合計
Q1 肌の乾燥	2	5	1	5	3	16
Q2 保湿感	4	1	2	8	2	17
Q3 小じわ	1	6	3	6	1	17
Q4 ハリ弾力	1	5	3	4	2	15
Q5 たるみ	0	11	4	2	0	17
Q6 明るさ	0	6	5	4	2	17
Q7 しみ	0	13	2	2	0	17
Q8 肌荒れ	1	9	4	0	0	14
Q9 毛穴	0	13	1	3	0	17
Q10 柔らかさ	2	2	4	5	3	17
Q11 キメ	0	6	4	5	1	16
Q12 ノリ	4	2	2	5	3	16
Q14 勧めたいか	0	2	7	3	4	16

30

質問内容	悪くなった	変化なし	どちらともいえない	やや改善	とても改善	
Q1 肌の乾燥	12.5%	31.3%	6.3%	31.3%	18.8%	
Q2 保湿感	23.5%	5.9%	11.8%	47.1%	11.8%	
Q3 小じわ	5.9%	35.3%	17.6%	35.3%	5.9%	
Q4 ハリ弾力	6.7%	33.3%	20.0%	26.7%	13.3%	
Q5 たるみ	0.0%	64.7%	23.5%	11.8%	0.0%	
Q6 明るさ	0.0%	35.3%	29.4%	23.5%	11.8%	
Q7 しみ	0.0%	76.5%	11.8%	11.8%	0.0%	
Q8 肌荒れ	7.1%	64.3%	28.6%	0.0%	0.0%	※1名「元からなし」と回答
Q9 毛穴	0.0%	76.5%	5.9%	17.6%	0.0%	
Q10 柔らかさ	11.8%	11.8%	23.5%	35.3%	17.6%	
Q11 キメ	0.0%	37.5%	25.0%	31.3%	6.3%	
Q12 ノリ	25.0%	12.5%	12.5%	31.3%	18.8%	
Q14 勧めたいか	0.0%	12.5%	43.8%	18.8%	25.0%	

40

質問内容	乾燥	しわ	たるみ	くすみ	しみ	肌荒れ	毛穴
Q13 効果実感	10	3	2	1	0	0	1

質問内容	効果実感	使用感のよさ	香り	成分内容	使い勝手のよさ
Q14-2 勧めたい部分	6	3	0	5	1

【0078】

【表 3 - 2】

使用感の評価（濃縮肌細胞由来成分を含まない化粧品）

年代別回答者数	20代	30代	40代	50代	60代	合計
	5	4	4	1	1	15

質問内容	悪くなった	変化なし	どちらともいえない	やや改善	とても改善	合計
Q1 肌の乾燥	0	5	2	7	3	17
Q2 保湿感	0	3	1	6	7	17
Q3 小じわ	0	8	2	7	0	17
Q4 ハリ弾力	0	6	6	4	1	17
Q5 たるみ	0	12	3	2	1	18
Q6 明るさ	0	8	3	4	2	17
Q7 しみ	0	13	2	2	0	17
Q8 肌荒れ	2	5	5	3	0	15
Q9 毛穴	0	8	5	4	0	17
Q10 柔らかさ	1	5	2	6	3	17
Q11 キメ	1	4	6	5	1	17
Q12 ノリ	1	7	2	5	2	17
Q14 勧めたいか	1	3	3	6	4	17

質問内容	悪くなった	変化なし	どちらともいえない	やや改善	とても改善
Q1 肌の乾燥	0.0%	29.4%	11.8%	41.2%	17.6%
Q2 保湿感	0.0%	17.6%	5.9%	35.3%	41.2%
Q3 小じわ	0.0%	47.1%	11.8%	41.2%	0.0%
Q4 ハリ弾力	0.0%	35.3%	35.3%	23.5%	5.9%
Q5 たるみ	0.0%	66.7%	16.7%	11.1%	5.6%
Q6 明るさ	0.0%	47.1%	17.6%	23.5%	11.8%
Q7 しみ	0.0%	76.5%	11.8%	11.8%	0.0%
Q8 肌荒れ	13.3%	33.3%	33.3%	20.0%	0.0%
Q9 毛穴	0.0%	47.1%	29.4%	23.5%	0.0%
Q10 柔らかさ	5.9%	29.4%	11.8%	35.3%	17.6%
Q11 キメ	5.9%	23.5%	35.3%	29.4%	5.9%
Q12 ノリ	5.9%	41.2%	11.8%	29.4%	11.8%
Q14 勧めたいか	5.9%	17.6%	17.6%	35.3%	23.5%

質問内容	乾燥	しわ	たるみ	くすみ	しみ	肌荒れ	毛穴
Q13 効果実感	10	3	2	2	1	3	1

質問内容	効果実感	使用感のよさ	香り	成分内容	使い勝手のよさ
Q14-2 勧めたい部分	6	4	2	7	0

10

20

【0079】

濃縮肌細胞由来成分を含む化粧用組成物は、特に、肌の乾燥、保湿感、といった項目において、改善されたという評価が多かった。肌荒れ、くすみ、毛穴、に対する効果を実感したという評価も、濃縮肌細胞由来成分を含む化粧用組成物の方が多かった。また、総合的に他の人に勧めたいという評価も、濃縮肌細胞由来成分を含む化粧用組成物の方が多かった。

30

【0080】

実施例 4：培養上清液の評価（1） - 代謝物および各種イオン

被験者 3 名の検体について、実施例 1 または 2 と同様に真皮線維芽細胞を培養し、工程（4）の 3 回目の継代培養を 5 日間行った。培養液を 1 日毎にサンプリングし、培養上清液中の代謝物（グルコース（Glc）、ラクトース（Lac）、グルタミン（Gln）、アンモニア（NH₃）、グルタミン酸（Glu））および各種イオン（カルシウムイオン（Ca）、マグネシウムイオン（Mg）、ナトリウムイオン（Na））の増減を、Cedex Bio（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を用いて評価した。真皮線維芽細胞を播種していない培地をコントロールとした。また、培養 5 日後の培養上清液の 2 倍濃縮液についても各種代謝物およびイオンの量を同様に評価した。

40

【0081】

結果を図 2 - 1 および図 2 - 2 に示す。ここで、培養上清の濃縮液については、比較を容易にする観点から、濃縮前の濃度に換算した値を示している。

グルコース、グルタミン酸については培養日数の経過とともに減少する傾向が見られた。ラクトース、グルタミン酸、アンモニアについては、培養日数の経過とともに増加する傾向が見られた。各種イオンについては、培養前後でその量に変化はなかった。また、培

50

養上清液を濃縮しても、培養上清中に含まれる代謝物や各種イオンの成分が失われることはないことを確認した。

【0082】

実施例5：培養上清液の評価(2) - コラーゲン産生

実施例1または2と同様に5%血清含有HFD M - 1 (+)培地で真皮線維芽細胞を培養し、工程(4)の3回目の継代培養まで行った。また、比較例として、同様の継代培養を10%血清含有MEM培地で行った。3回目の継代培養の上清液に含まれるコラーゲン量を評価した。

【0083】

結果を図3に示す。真皮線維芽細胞の培養にHFD Mを用いた場合、細胞が産生・分泌するコラーゲン量が多いことが確認された。

ここで、HFD M - 1 (+)培地は線維芽細胞の培養に適した培地であるのに対し、MEM培地は広く哺乳類細胞の培養に用いられる培地である。成分の違いの一例としては、前者は組換え体ヒトEGFまたは組換え体ヒトインスリンなどのタンパク質や脂質成分を含む点が挙げられる。

【0084】

実施例6：真皮線維芽細胞の皮膚採取時の年齢別の細胞増殖能

若年層(30歳未満)の対象から採取した皮膚3例と、高年層(70歳以上)の対象から採取した皮膚3例の検体由来の真皮線維芽細胞を、実施例1または2と同様に培養した。具体的には、工程(4)の3回目の継代培養まで行い、細胞増殖能(倍化時間)を評価した。

【0085】

$$\text{倍化時間} = t \log 2 / (\log N 2 - \log N 1)$$

(t: 培養日数; N1: 細胞播種数; N2: 細胞回収数)

結果を表4及び図4に示す。

【0086】

10

20

【表 4】

世代	年齢	平均年齢	治療用細胞播種数 ($\times 10^6$ cells)	治療用細胞回収細胞数 ($\times 10^6$ cells)	培養日数 (日)	倍加時間 (td)	平均倍化時間 (td)	STDEV
若年層	20	24	0.762	14.8	3	16.8	17.4	1.95
	26		0.61	14.4	3	15.8		
	26		1.38	17.7	3	19.6		
高年層	74	75	1.44	14.4	3	21.7	21.6	0.32
	76		0.665	14.4	4	21.8		
	76		0.6	13.8	4	21.2		

10

20

30

40

若年時（30歳未満）の対象から採取した皮膚検体由来の真皮線維芽細胞を培養した場合、高年時（70歳以上）の対象から採取した皮膚検体由来の真皮線維芽細胞を培養した場合よりも、細胞増殖能が向上していることが確認された。

【産業上の利用可能性】

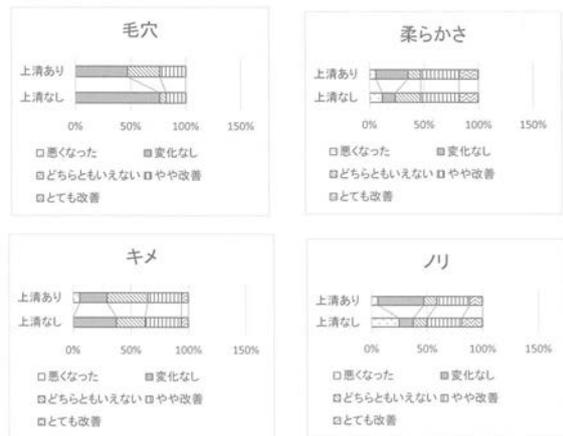
【0088】

本発明の真皮線維芽細胞の培養上清液を含む化粧用組成物は、保湿効果が高く、皮膚の状態および外観を改善する新たな化粧用組成物を提供するものである。特に、対象自身の皮膚から得られた真皮線維芽細胞の培養上清液を用いるオーダーメイド化粧品は、自身の肌質に合う化粧品を求める消費者のニーズを満たすものとして、新たな市場を開拓するものである。

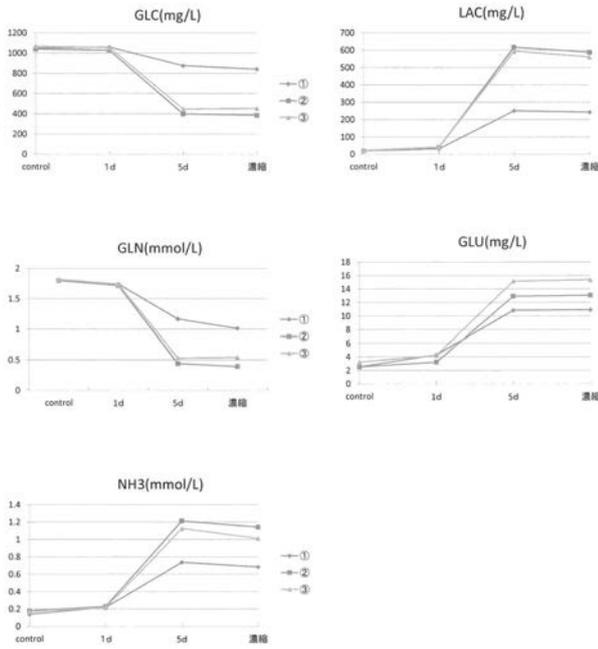
【図1-1】



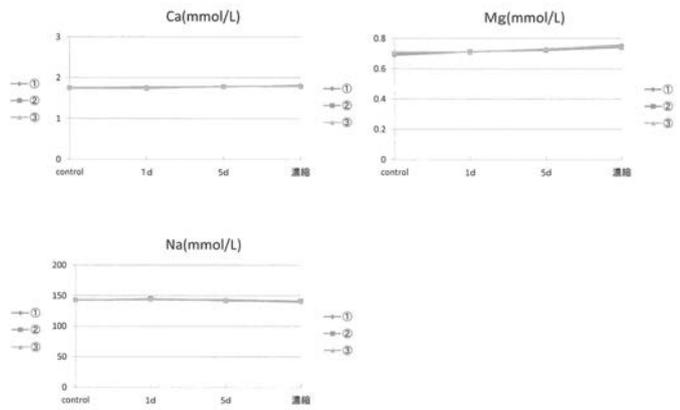
【図1-2】



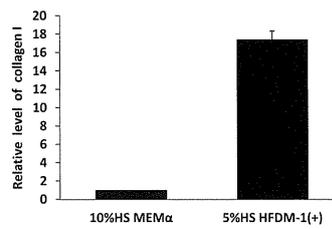
【 図 2 - 1 】



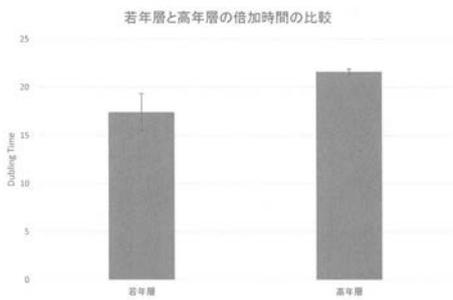
【 図 2 - 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 古市 和典

東京都中央区勝どき 1 - 1 3 - 1 株式会社セルバンク内

(72)発明者 小島 由載

東京都中央区勝どき 1 - 1 3 - 1 株式会社セルバンク内

(72)発明者 矢島 琢己

東京都中央区勝どき 1 - 1 3 - 1 株式会社セルバンク内

Fターム(参考) 4C083 AA071 AA072 CC01 CC02 CC03 CC04 CC05 EE06 EE07 EE12
EE13 FF01