

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6781752号
(P6781752)

(45) 発行日 令和2年11月4日(2020.11.4)

(24) 登録日 令和2年10月20日(2020.10.20)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 5/0775 (2010.01)

F I

C 1 2 N 5/0775

請求項の数 9 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2018-516145 (P2018-516145)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成27年10月8日 (2015.10.8)</p> <p>(65) 公表番号 特表2018-533926 (P2018-533926A)</p> <p>(43) 公表日 平成30年11月22日 (2018.11.22)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/CN2015/091449</p> <p>(87) 国際公開番号 W02017/059566</p> <p>(87) 国際公開日 平成29年4月13日 (2017.4.13)</p> <p>審査請求日 平成30年5月14日 (2018.5.14)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 505302362 高雄醫學大學 KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY 台湾、高雄市三民區十全一路100号 No. 100, Shih-chuan 1st Road, Sanmin Di st. Kaohsiung City, Taiwan</p> <p>(74) 代理人 100091683 弁理士 ▲吉▼川 俊雄</p> <p>(72) 発明者 王耀賢 台湾 825 高雄市橋頭区橋頭里成功路 139号</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪間質細胞を急速分離する組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2.5 ~ 4% (w/v) のコラゲナーゼタイプI、0.1% (w/v) のトリプシン、及び0.02% (w/v) の金属イオンキレート剤を含む脂肪間質細胞を分離する組成物。

【請求項2】

当該金属イオンキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸又はそのナトリウム塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸又はそのナトリウム塩、ジエチレントリアミン五酢酸又はそのナトリウム塩、ポリリン酸塩、有機リン酸塩、リン酸エステル、ポリアクリル酸塩、有機リン酸塩、グルコン酸ナトリウム、又はこれらの混合から選択される請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

当該金属イオンキレート剤はEDTAである請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

(a) 脂肪組織を採取するステップ、(b) 請求項1に記載の組成物を加え、均質化して反応させることで、消化された組織の混合物を取得するステップであって、当該組成物は、2.5 ~ 4% (w/v) のコラゲナーゼタイプI、0.1% (w/v) のトリプシン、及び0.02% (w/v) の金属イオンキレート剤を含むステップ、(c) ステップ(b) の消化された組織の混合物を遠心分離し、異物を除去して、脂肪間質細胞を含む第1濾液を取得するステップ、(d) 低張液をステップ(c) の第1濾液に加えることで、血球細胞が除去された脂肪間質細胞の第2濾液を取得するステップ、及び (e) ステ

ップ(d)の第2濾液を中和して遠心分離するステップ、を含む脂肪間質細胞を分離する方法。

【請求項5】

当該金属イオンキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸又はそのナトリウム塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸又はそのナトリウム塩、ジエチレントリアミン五酢酸又はそのナトリウム塩、ポリリン酸塩、有機リン酸塩、リン酸エステル、ポリアクリル酸塩、有機リン酸塩、グルコン酸ナトリウム、又はこれらの混合から選択される請求項4に記載の方法。

【請求項6】

当該金属イオンキレート剤はEDTAである請求項5に記載の方法。

10

【請求項7】

更に、総反応時間を1時間以内として脂肪組織を消化し、当該脂肪間質細胞を取得することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項8】

5グラムの脂肪組織から少なくとも100万個の脂肪間質細胞を分離する効果を有することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項9】

当該脂肪間質細胞は、脂肪細胞、造血細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞又は上皮細胞に分化可能である請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂肪間質細胞を急速分離する組成物、及び、脂肪間質細胞を急速分離する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脂肪幹細胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)とは、昨今、組織工学や再生医療分野に広く応用されている成体幹細胞であり、骨髄間質細胞と同様に多方向分化能を有している。現在、実験室で常用されているADSCs分離培養法では、脂肪組織から細胞を分離して取得する。この方式は数十年にわたって利用されており、一般的には組織を取得して粉碎し、コラゲナーゼ(collagenase)で細胞外基質を分解することで組織から単一細胞を放出させる。しかし、組織の分解には約12時間以上もの時間を要する(通常は一晚静置)。また、時間を要するだけでなく、長時間にわたり細胞を酵素環境に置くことは細胞の生存に不利となる。このため、往々にして細胞の生理状態が不安定となり、細胞が死亡することで細胞取得数が減少する場合もある。また、機械的手法や酵素処理方法によって赤血球等の成熟細胞を除去した後、10%のウシ胎児血清を含む培地で培養するが、こうした幹細胞の培養方法には、手法が複雑、抽出される幹細胞数が少ない、純度が低い、継代増殖が遅いといった欠点がある。

30

【0003】

一方、巷で使用されている脂肪吸引技術で取得された液状の脂肪組織をコラゲナーゼで分解し、遠心分離して得られる非脂肪単一細胞は間質血管細胞(Stromal Vascular Fraction, SVF)と称される。この場合、単一細胞の取得が迅速化するものの、脂肪吸引用プローブは超音波振動方式により脂肪を溶解して吸い出すことから、細胞の損傷が極めて大きく、細胞生存率に影響してしまう。

40

【0004】

近年では、特に整形外科での再生医療研究において、間葉系幹細胞を骨の再生・修復の細胞供給源として用いることが強調されている。そのため、将来的には、自家幹細胞の移植、特に成体脂肪幹細胞の自家移植が幹細胞移植における研究開発の流れとなってゆくだらう。しかし、自家組織から間葉系幹細胞を分離して純化するには相当複雑な操作手順を経ねばならず、時間も要する。例えば、体外で間葉系幹細胞を十分に使用可能な細胞数ま

50

で増加させるには、優良試験所基準 (Good Laboratory Practice , G L P) に準じた試験場でこれを実施し、体外操作の時間を長期化しつつ、細胞の細菌又はウイルス感染の確率を低下させる必要がある。以上が幹細胞の臨床利用を制限する要因となっているが、本発明は、将来的に手術室で短時間のうちに間質細胞を急速分離し、再生医療に応用するにあたり有用である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本文中に別途規定がない限り、本発明で使用する科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。よって、これら用語の意味及び範囲は明瞭であるが、潜在的に複数の解釈が可能な場合には、本文中で示す定義がいかなる辞書又は外部の定義に優先される。

10

【0006】

本文中の「複数の」との用語は、本発明の部材又はユニットの数を記載するためのものである。この用語は別途明確な指定がない限り、2つ以上と解釈される。

【0007】

本文中の「一の」又は「一種の」との用語は、本発明の部材及び成分を記載するためのものである。この用語は記載の便宜上、及び本発明の基本理念を示すためのものにすぎない。このような記載は、一種又は少なくとも一種を含むと解釈され、且つ、別途明確な指定がない限り、単数の場合と複数の場合を含む。

20

【0008】

本文中の「又は」との用語は、「及び/又は」と同義である。

【0009】

本発明は従来技術の不足を補うべく、患者の苦痛を軽減し、安全な臨床利用を可能とするとともに、間質細胞を短時間のうちに急速分離する組成物及び方法を提供する。

【0010】

本発明は、濃度 $0.5 \sim 8\% \text{ (w/v)}$ のコラゲナーゼタイプ I (type I collagenase)、濃度 $0.1 \sim 0.6\% \text{ (w/v)}$ のトリプシン (Trypsin)、及び濃度 $0.01 \sim 0.2\% \text{ (w/v)}$ の金属イオンキレート剤を含む脂肪間質細胞を分離する組成物を提供する。

30

【0011】

本発明で使用する「金属イオンキレート剤」とは、エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid , EDTA) 又はそのナトリウム塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (ethylene glycol tetraacetic acid , EGTA) 又はそのナトリウム塩、ジエチレントリアミン五酢酸 (Diethyltriaminepentaacetic acid , DTPA) 又はそのナトリウム塩、ポリリン酸塩、有機リン酸塩、リン酸エステル、ポリアクリル酸塩、有機リン酸塩、グルコン酸ナトリウム、又はこれらの混合から選択される。

【0012】

好ましい具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する組成物において、当該金属イオンキレート剤は EDTA である。

40

【0013】

他の好ましい具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する組成物において、 $2 \sim 4\% \text{ (w/v)}$ の当該コラゲナーゼタイプ I、 $0.1 \sim 0.3\% \text{ (w/v)}$ のトリプシン、及び $0.01 \sim 0.1\% \text{ (w/v)}$ の EDTA を含む。

【0014】

具体的実施例において、本発明の脂肪間質細胞を分離する組成物は無菌である。

【0015】

具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する組成物において、脂肪間質細胞を十分に遊離させるとともに、細胞が損傷を受けないよう保護する効果を有する。

50

【0016】

更に、本発明は、(a) 脂肪組織を採取するステップ、(b) 本発明に記載の脂肪間質細胞を分離する組成物を加え、均質化して反応させることで、消化された組織の混合物を取得するステップであって、当該組成物は、0.5～8% (w/v) のコラゲナーゼタイプI、0.1～0.6% (w/v) のトリプシン、及び0.01～0.2% (w/v) の金属イオンキレート剤を含むステップ、(c) ステップ(b) の消化された組織の混合物を遠心分離し、異物を除去して、脂肪間質細胞を含む濾液を取得するステップ、(d) 低張液をステップ(c) の濾液に加えて反応させることで、血球細胞が除去された脂肪間質細胞の濾液を取得するステップ、及び(e) ステップ(d) の濾液を中和した後に遠心分離し、脂肪間質細胞を取得するステップ、を含む脂肪間質細胞を分離する方法を提供する。

10

【0017】

本発明の具体的実施例において、当該脂肪組織は動物又はヒトを含む個体に由来する。

【0018】

本発明の好ましい具体的実施例において、当該金属イオンキレート剤はEDTAである。

【0019】

本発明の他の好ましい具体的実施例において、当該コラゲナーゼタイプIの濃度は2～4% (w/v)、トリプシンの濃度は0.1～0.3% (w/v)、及びEDTAの濃度は0.01～0.1% (w/v) である。

20

【0020】

本発明の具体的実施例において、脂肪間質細胞を分離する方法は無菌である。

【0021】

好ましい具体的実施例において、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法は更に、総反応時間を1時間以内として当該脂肪組織を十分に消化し、大量の脂肪間質細胞をより容易に取得可能であるとの特徴を有する。

【0022】

他の好ましい具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法において、5グラムの脂肪組織から少なくとも100万個の脂肪間質細胞を分離可能である。

【0023】

具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法において、当該脂肪間質細胞は、脂肪細胞、造血細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞又は上皮細胞に分化可能である。

30

【発明の効果】

【0024】

好ましい具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法において、当該脂肪間質細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞又は軟骨細胞に分化可能である。

【0025】

好ましい具体的実施例では、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法において、脂肪間質細胞を十分に遊離させるとともに、細胞が損傷を受けないよう保護する効果を有する。

40

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、本発明の脂肪間質細胞を分離する方法の一実施における手順を示す。

【図2】図2は、SDラットの大腿内側の皮下から5グラムの脂肪組織を採取し、異なる濃度の酵素配合比率で1時間以内に分離した間質細胞数の結果を示している。

【図3】図3は、モルモットの大腿内側の皮下から5グラムの脂肪組織を採取し、異なる濃度の酵素配合比率で1時間以内に分離した間質細胞数の結果を示している。

【図4】図4は、抽出した脂肪間質細胞から選別された脂肪幹細胞の分化能に関する分析を示している。

【図5】図5は、分離された脂肪幹細胞の細胞表面におけるバイオマーカーの発現量を示

50

している。

【図6】図6は、酵素配合の濃度別に間質細胞の生存への影響を示している。

【図7】図7は、本発明の組成物に代替して別種の酵素を用いた場合の内容比較を示している。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は別の形態で実施される場合もあり、以下で提示する実例に限定されない。以下の実施例は、本発明における様々な局面及び特性を代表するものにすぎない。

【0028】

一元配置分散分析 (A one-way ANOVA (analysis of variance)) によって統計的な差を検定するとともに、シェッフェの方法により多重比較 (multiple comparisons) を行った。また、明らかな差があるとは、有意確率値 (p-value) < 0.05 であると定義した。

【0029】

実施例1 間質細胞の急速分離技術

【0030】

図1は、本発明の酵素配合をスプラグ・ダウリーラット (Sprague-Dawley rat, 略称SDラット) 及びモルモット (Genia pig) の脂肪組織に適用して間質細胞を急速分離する場合のフローである。

【0031】

SDラット及びモルモットの大腿内側から5グラムの脂肪組織を採取し、本発明の酵素配合からなる緩衝溶液 (0.5~3% (w/v) のコラゲナーゼタイプI (type I collagenase)、0.1~0.3% (w/v) のトリプシン (Trypsin)、及び0.02% (w/v) のEDTAをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解したものを等量 (約5mL) 加えた。そして、これを無菌組織ホモジナイザー (GentleMACs) (ミルテニバイオテク社、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ) に投入して1分間均質化し、単一細胞状態となるまで組織を分散させた。続いて、37の水浴槽に漬けて10分間反応させた後、再び無菌組織ホモジナイザーに投入して1分間均質化し、37の水浴槽に漬けて10分間反応させた。次に、(300×g) で10分間遠心分離した後、上層の脂肪、結合組織又は未粉碎組織を取り除き、PBS (5mL) で洗淨してから10分間遠心分離 (300×g) した。そして、等量 (5mL) の低張液を加えて室温で5分間静置し、血球細胞を除去した後に、10mLのPBS緩衝溶液を投入して中和反応させた。続いて、3,000rpmで10分間遠心分離した後に溶液を除去し、最下層の細胞を再び1mLのPBSに浮遊させた後、サンプリングして細胞数をカウントした。なお、総反応時間は1時間以内であった。

【0032】

実施例2 間質細胞の生成量分析

【0033】

実施例1で分離した脂肪間質細胞のサンプルから20µLを採取し、20µLのトリパンブルー (Trypan blue) を加えて均一に混合・染色した後に、セルカウンターに滴下して生存細胞 (非染色細胞) をカウントした。

【0034】

図2は、SDラットの大腿内側の皮下から5グラムの脂肪組織を採取し、異なる濃度の酵素配合比率で1時間以内に分離した間質細胞数を示している。結果から明らかなように、3% (w/v) のコラゲナーゼタイプI (type collagenase)、0.1% (w/v) のトリプシン (Trypsin) 及び0.02% (w/v) のEDTAからなる酵素配合 (符号G) で1時間以内に抽出された単一細胞数が最も多く、約 9×10^6 cells/mL の間質細胞を分離可能であった。

【0035】

図3は、モルモットの大腿内側の皮下から5グラムの脂肪組織を採取し、異なる濃度の

10

20

30

40

50

酵素配合比率で1時間以内に分離した間質細胞数を示している。結果から明らかなように、3～4% (w/v)のコラゲナーゼタイプI、0.1% (w/v)のトリプシン (Trypsin) 及び0.02% (w/v)のEDTAからなる酵素配合 (符号G, H) で1時間以内に抽出された単一細胞数が最も多く、約 $8 \times 10^6 \sim 8.5 \times 10^6$ cells/mLの間質細胞を分離可能であった。

【0036】

実施例3 選別後の脂肪幹細胞の分化能

【0037】

国際間葉系幹細胞協会が2006年に発表した間葉系幹細胞の定義によれば、間葉系幹細胞には次の3つの特徴がある。

1. 細胞が細胞培養皿に付着可能であること。
2. 表面抗原として、CD45、CD34、CD14又はCD11b、CD79a又はCD19、或いはHLA-DRを発現することなく、CD105、CD73又はCD90を発現すること。
3. 誘導によって脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨細胞へ分化する特性を有すること。

【0038】

実施例1で分離した脂肪間質細胞を選択培地 (Keratinocyte-SFM、品番: 10724-001、GIBCO、ニューヨーク、USA) (間葉系幹細胞を選択的に残し、非間葉系幹細胞は死滅させた) で1週間培養したところ、脂肪間葉系幹細胞を選別可能となった。ここで、図4の(a)に示したように、分離された脂肪間葉系幹細胞は付着型の細胞であった。また、フローサイトメーターで当該分離された脂肪間質細胞を分析したところ、図5に示したように、細胞表面のCD271、CD73及びCD90の発現量がコントロール群の値よりも明らかに高く、CD34の発現量がコントロール群の値よりも低いことがわかった。これらより、当該分離された脂肪間質細胞が間葉系幹細胞に属することが明らかとなった。そこで、当該間葉系幹細胞の誘導による脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨細胞への分化能について更に測定した。

【0039】

前記の分離された脂肪間葉系幹細胞を継代した後、別々の分化誘導培地で2週間培養した (Adipo-medium: 脂肪細胞への分化誘導培地、Osteo-medium: 骨芽細胞への分化誘導培地、及びChondro-medium: 軟骨細胞への分化誘導培地。Adipo-medium: DMEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、10%のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン (penicillin/streptomycin)、500 μ Mの3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、1 μ Mのデキサメタゾン (dexamethasone)、1 μ Mのインドメタシン (indomethacin)、10 μ g/mLのインシュリン (insulin)。Chondro-medium: DMEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、10%のウシ胎児血清 (FBS)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、50 nMのL-アスコルビン酸-2-リン酸塩 (L-Ascorbate-2-phosphate)、6.25 μ g/mLのインシュリン、10 ng/mLのTGF- α 。Osteo-medium: DMEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、10%のウシ胎児血清 (FBS)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、50 μ MのL-アスコルビン酸-2-リン酸塩 (L-Ascorbate-2-phosphate)、0.1 μ Mのデキサメタゾン、10 mMの β -グリセロリン酸塩 (β -glycerophosphate)。

【0040】

グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, 略称GAG) を用いた測定により、間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化能を評価した。なお、当該GAGによる測定は、アルシアンブルー (Alcian blue) 染色により実施した。Chondr

10

20

30

40

50

o - m e d i u m で 2 週 間 培 養 し た 後 に 旧 培 地 を 除 去 し、10% の ホ ル マ リ ン (f o r m a l i n) 又 は 4 % の パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド (p a r a f o r m a l d e h y d e) を 加 え て 10 分 間 固 定 し た。次 に、蒸 留 水 (3 m L) で 2 度 洗 浄 し て か ら、3 % の 酢 酸 (A c e t i c a c i d) (3 m L) を 用 い て 5 分 間 振 動 さ せ た。全 て の 液 体 を 除 去 し た 後、シ ャ ー レ に ア ル シ ア ン ブ ル ー (1 %) を 加 え て 15 分 間 振 動 さ せ、染 色 剤 を 除 去 し て か ら 蒸 留 水 (3 m L) で 2 ~ 3 度 洗 浄 し、記 録 の た め 撮 影 を 行 っ た。

【 0 0 4 1 】

図 4 の (b) に 示 す よ う に、ア ル シ ア ン ブ ル ー に よ り 細 胞 外 基 質 の G A G が 染 色 さ れ、当 該 G A G の ブ ル ー へ の 染 色 及 び 細 胞 の 集 中 に よ っ て 軟 骨 細 胞 の 特 性 が 示 さ れ た。

【 0 0 4 2 】

オ イ ル レ ッ ド O (O i l R e d O) を 用 い た 脂 肪 細 胞 の 油 滴 染 色 に よ っ て、間 葉 系 幹 細 胞 の 脂 肪 細 胞 へ の 分 化 能 を 評 価 し た。A d i p o - m e d i u m で 2 週 間 培 養 し た 後 に 旧 培 地 を 除 去 し、10% の ホ ル マ リ ン 又 は 4 % の パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド を 加 え て 10 分 間 固 定 し た。次 に、蒸 留 水 (3 m L) で 2 度 洗 浄 し て か ら 全 て の 液 体 を 除 去 し、シ ャ ー レ に オ イ ル レ ッ ド O (0 . 5 %) を 加 え て 15 分 間 振 動 し た。そ し て、染 色 剤 を 除 去 し て か ら 蒸 留 水 (3 m L) で 2 ~ 3 度 洗 浄 し、蒸 留 水 を 加 え て 記 録 の た め 撮 影 を 行 っ た。

【 0 0 4 3 】

図 4 の (c) に 示 す よ う に、当 該 染 色 細 胞 の 油 滴 が 赤 色 の 点 状 と な り、脂 肪 細 胞 の 特 性 を 示 し た。

【 0 0 4 4 】

分 離 さ れ た 脂 肪 間 葉 系 幹 細 胞 に よ る 骨 形 成 誘 導 作 用 の 効 果 を、ア リ ザ リ ン レ ッ ド (A l i z a r i n - r e d) 染 色 に よ り 検 出 し た。O s t e o - m e d i u m で 2 週 間 培 養 し た 後 に 旧 培 地 を 除 去 し、4 % の ホ ル マ リ ン を 加 え て 15 分 間 固 定 し た。次 に、蒸 留 水 (3 m L) で 2 度 洗 浄 し て か ら 全 て の 液 体 を 除 去 し、シ ャ ー レ に 2 % の ア リ ザ リ ン レ ッ ド を 加 え て 常 温 で 20 分 間 反 応 さ せ た。そ し て、染 色 剤 を 除 去 し て か ら 蒸 留 水 (3 m L) で 2 ~ 3 度 洗 浄 し た 後、記 録 の た め 撮 影 を 行 っ た。

【 0 0 4 5 】

図 4 の (d) に 示 す よ う に、当 該 染 色 細 胞 に よ る カ ル シ ウ ム 析 出 が 赤 色 の 点 状 で 現 れ、骨 芽 細 胞 の 特 性 を 示 し た。

【 0 0 4 6 】

実 施 例 4 酵 素 配 合 濃 度 の 違 い に よ る 間 質 細 胞 の 生 存 へ の 影 響

【 0 0 4 7 】

実 施 例 1 で 分 離 し た 脂 肪 間 質 細 胞 を、選 択 培 地 (K e r a t i n o c y t r - S F M、品 番：10724-001、G I B C O) (間 葉 系 幹 細 胞 を 選 択 的 に 残 し、非 間 葉 系 幹 細 胞 は 死 滅 さ せ た) で 1 週 間 培 養 し た と ころ、脂 肪 間 葉 系 幹 細 胞 を 選 別 可 能 と な っ た。そ こ で、実 施 例 1 で 提 示 し た 好 ま し い 脂 肪 間 質 細 胞 の 分 離 生 成 量 と な る 以 下 3 種 類 の 酵 素 配 合 で、細 胞 毒 性 試 験 を 実 施 し た。

1 . 2 . 5 % (w / v) の コ ラ ゲ ナ ー ゼ タ イ プ I、0 . 1 % (w / v) の ト リ プ シ ン (T r y p s i n)、及 び 0 . 0 2 % (w / v) の E D T A か ら な る 酵 素 配 合。

2 . 3 % (w / v) の コ ラ ゲ ナ ー ゼ タ イ プ I、0 . 1 % (w / v) の ト リ プ シ ン (T r y p s i n)、及 び 0 . 0 2 % (w / v) の E D T A か ら な る 酵 素 配 合。

3 . 4 % (w / v) の コ ラ ゲ ナ ー ゼ タ イ プ I、0 . 1 % (w / v) の ト リ プ シ ン (T r y p s i n)、及 び 0 . 0 2 % (w / v) の E D T A か ら な る 酵 素 配 合。

【 0 0 4 8 】

105 個 の 脂 肪 間 葉 系 幹 細 胞 を 上 記 酵 素 配 合 に 投 入 し、0 . 5 時 間、1 時 間、2 時 間 培 養 し た。そ し て、0 . 5 時 間、1 時 間、2 時 間 培 養 し た 後 に 細 胞 を 取 り 出 し、実 施 例 2 の ト リ パ ン ブ ル ー 染 色 を 実 施 し て 細 胞 生 存 率 を カ ウ ン ト し た と ころ、図 6 に 示 す よ う に、上 記 配 合 で は 明 ら か な 細 胞 毒 性 現 象 は 認 め ら れ な か っ た。

【 0 0 4 9 】

実 施 例 5 別 種 の 酵 素 に よ る 代 替 比 較

10

20

30

40

50

【0050】

2% (w/v)のコラゲナーゼタイプIV、0.1% (w/v)のトリプシン (Trypsin)、0.02% (w/v)のEDTAと、2.5%のコラゲナーゼタイプIV、0.1%のトリプシン、0.02%のEDTAと、3%のコラゲナーゼタイプIV、0.1%のトリプシン、0.02%のEDTAと、3.5%のコラゲナーゼタイプIV、0.1%のトリプシン、0.02%のEDTAと、4%のコラゲナーゼタイプIV、0.1%のトリプシン、0.02%のEDTA、というように、同様の配合濃度で本発明で使用したものと類似する別の酵素に置き換え、実施例1で教示した脂肪間質細胞の分離操作を実施した。その結果、図7に示すように、本実施例の配合では、3% (w/v)のコラゲナーゼタイプI、0.1% (w/v)のトリプシン、及び0.02% (w/v)のEDTAからなる酵素配合に近似する細胞数は得られなかった。即ち、3% (w/v)のコラゲナーゼタイプI、0.1% (w/v)のトリプシン、及び0.02% (w/v) EDTAからなる酵素配合は、脂肪間質細胞の急速分離において代替不可能であった。

10

【0051】

以上の内容では、本発明を十分に理解可能なように多くの具体的詳細事項について述べたが、本発明はここで述べたもの以外のその他の実施形態で実施することも可能である。当業者であれば、本発明の内容を逸脱することなく類似の展開が可能なることから、本発明は上記で開示した具体的実施例に制限されない。

【符号の説明】

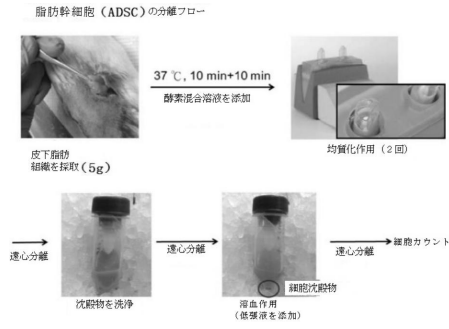
【0052】

20

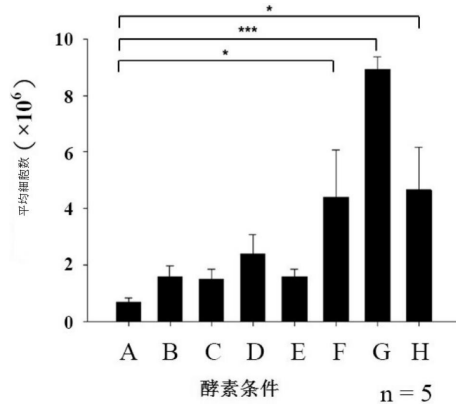
- A 0.5%のコラゲナーゼタイプI + 0.05%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- B 0.5%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- C 0.5%のコラゲナーゼタイプI + 0.2%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- D 1%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- E 2%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- F 2.5%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- G 3%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- H 4%のコラゲナーゼタイプI + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- E' 2%のコラゲナーゼタイプIV + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- F' 2.5%のコラゲナーゼタイプIV + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- G' 3%のコラゲナーゼタイプIV + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- I' 3.5%のコラゲナーゼタイプIV + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA
- H' 4%のコラゲナーゼタイプIV + 0.1%のトリプシン + 0.02%のEDTA

30

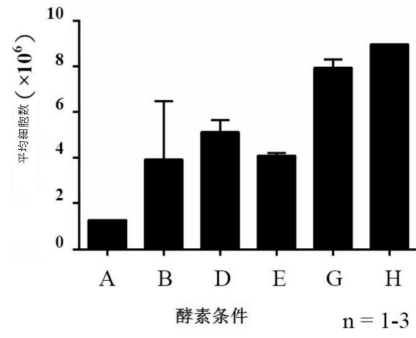
【図1】



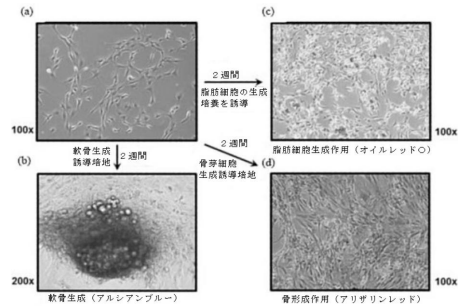
【図2】



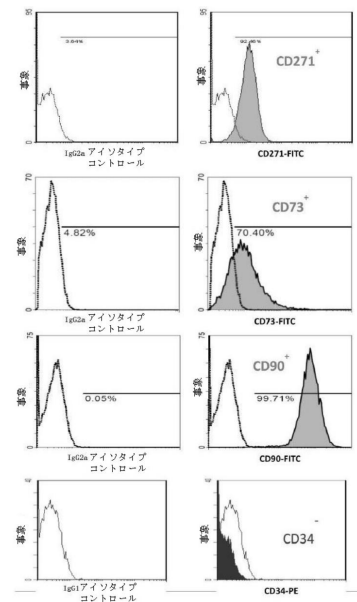
【図3】



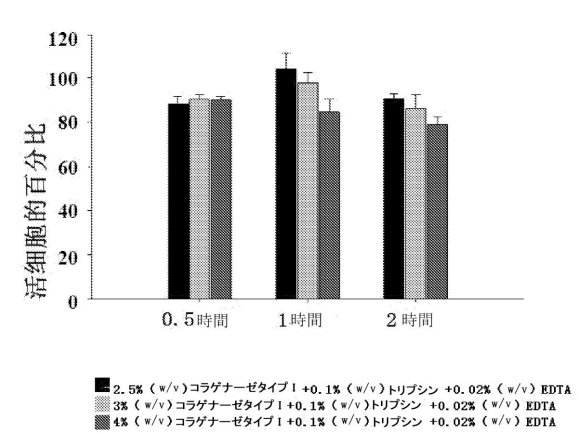
【図4】



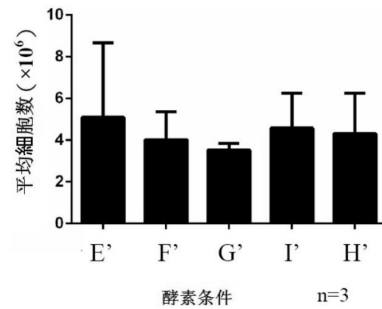
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 陳崇桓

台湾 801 高雄市前金区光復三街130号

(72)発明者 何美 リン

台湾 813 高雄市左営区南屏路268巷44号11楼之1

(72)発明者 張瑞根

台湾 807 高雄市三民区博愛一路303号

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特表2010-529851(JP,A)

特表2009-537137(JP,A)

中国特許出願公開第104164403(CN,A)

中国特許出願公開第102274491(CN,A)

中国特許出願公開第104560868(CN,A)

特表2012-505665(JP,A)

Methods, 2008年, Vol.45, No.2, p.115-120

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/0775

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)