

## 明 細 書

発明の名称：

間葉系幹細胞由来エキソソーム含有液の生産方法及びエキソソーム含有液を含む医薬品

### 技術分野

[0001] 間葉系幹細胞由来エキソソーム含有液の生産方法及びエキソソーム含有液を含む医薬品に関する。

### 背景技術

[0002] 間葉系幹細胞は、自己増殖能があり、軟骨細胞、骨細胞、筋細胞、脂肪細胞などを含む様々な細胞へと分化することができる。最近では間葉系幹細胞自体の分化能よりも、間葉系幹細胞が分泌する様々な因子（パラクライン因子）に注目が集まっている。間葉系幹細胞は炎症抑制効果や血管新生促進効果、細胞増殖促進効果を有するサイトカインやケモカイン、成長因子やエキソソームを分泌し、パラクライン効果を介して組織修復を促すことが分かっている（例えば、非特許文献1参照）。

[0003] エキソソーム（「Exosome」、「エクソソーム」ともいう。）は、脂質二重層から構成される小胞（vesicle）であって、細胞（起源細胞）が細胞外に分泌する物質である。エキソソームは、各種の蛋白質、脂質、mRNAs、microRNAs及び起源細胞由来の生物学的機能を反映する細胞特異的構成成分などを内包している。エキソソームは起源細胞から離れた細胞と融合して内包物を放出することができるため、細胞－細胞間のコミュニケーション（cell-cell communication）及び細胞性免疫を仲裁する機能的な役割を担うとされる。そのため、近年、様々な疾患に対するエキソソームを用いての治療効果が研究されている。例えば、様々な治療薬を標的細胞へ送達するための薬物伝達システムへの活用が検討されていたり（例えば、非特許文献2及び3参照）、アルツハイマーなどの神経疾患のバイオマーカーとしての活用が研究されていたりする（例えば、非特許文献4参照）。

[0004] エキソソームの性質は起源細胞種によって異なる。特に間葉系幹細胞由来のエキソソームは、幹細胞が有する再生医学的治療効果を示すことが知られており、創傷や骨折の治癒、再生医療の分野においてエキソソームを用いた治療に関する研究が活発に行われている。

[0005] エキソソームを臨床や研究で用いるためには、大量且つ良質のエキソソームを生産する必要がある。エキソソームを大量に生産する方法として、特定の化合物を含む細胞培養培地で幹細胞を培養することで幹細胞由来エキソソームの数を増加させる「幹細胞由来エクソソーム生成促進用組成物」を使用する方法（例えば、特許文献1参照）や、間葉系幹細胞の前駆細胞を含む細胞集団において、80%以上の細胞がCD73<sup>+</sup>などの特定のマーカータンパク質である細胞集団を用いる方法（例えば、特許文献2参照）が挙げられる。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特表2022-533277号公報

特許文献2：特表2022-542158号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J., “Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.” Stem Cells. 25 (2007) 2739-2749

非特許文献2：Emmanouilidou E. et al., “Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival”, J Neurosci. 2010 May 19;30 (20) : 6838-51

非特許文献3：Ian Fyfe, “Exosomes can spread toxic AD pathology” Nat Rev Neurol. 2018 Aug;14(8) : 451

非特許文献4：Yamayoshi A., et al., “Development of Novel Drug Delivery System Targeting Exosomal microRNA” The Pharmaceutical Society of Japan, Vol. 140, No.5, 625-631 (2020)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] エキソソームは、それが由来する細胞の種類や生産時の条件が品質に影響する。そのため、添加剤や試薬などは加えない方が好ましいが、特許文献1に記載された技術では、エキセンジン-4などの生体内にない化合物を添加してエキソソームを生産するため、細胞やエキソソームにどの程度の悪影響を及ぼすのかは不明である。加えて、前記添加剤を洗浄すべく洗浄工程が必要であり、作業が手間であるという課題があった。また、特許文献2に記載された技術では、間葉系幹細胞の前駆細胞が必須であり、前記前駆細胞の製造方法には、時間及び手間がかかるという課題があった。

[0009] したがって、本発明は、エキソソーム生成促進剤など人工的な化合物を加えずに、大量且つ簡便に高濃度のエキソソーム含有液を生産する方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決すべく、本発明者らは、間葉系幹細胞に着目し、細胞を破碎することにより大量且つ簡便に高濃度のエキソソーム含有液を生産することができることを究明し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下の構成を有する。

[1] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞由来エキソソーム含有液の生産方法：

(1) 間葉系幹細胞を破碎する工程、

(2) 工程(1)で得られた破碎液を、攪拌子又はボルテックスミキサーを用いて攪拌処理する工程、

(3) 前記攪拌処理後の破碎液を、フィルター濾過する工程。

[2] 前記間葉系幹細胞が脂肪組織由来間葉系幹細胞である、[1]に記載のエキソソーム含有液の生産方法。

[3] 前記工程(1)を凍結融解又は超音波によって行う、[1]又は[2]に記載のエキソソーム含有液の生産方法。

〔４〕前記工程（２）において、  
破砕液を、ボルテックスミキサーを用いて100～3,500rpmで、1～30分攪拌する、〔１〕又は〔２〕に記載のエキソソーム含有液の生産方法。

〔５〕〔１〕又は〔２〕に記載の方法を用いて生産されたエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品。

〔６〕〔５〕に記載の医薬品が静脈注射により投与される、疲労回復促進方法。

〔７〕〔１〕又は〔２〕に記載の方法を用いて生産されたエキソソーム含有液を有効成分として含む、非ヒト哺乳動物用サプリメント。

### 発明の効果

〔0012〕 本発明の生産方法によれば、大量に且つ簡便に高濃度のエキソソーム含有液を生産することができる。超遠心分離機などの高額な機械を必要としないため、生産コストを減らすこともできる。また、生産には生細胞ではなく、細胞断片を用いるため、得られるエキソソーム含有液はセルフリー（cell free）である。そのため、本発明のエキソソーム含有液は細胞由来の感染リスクや発がんリスクが少なく、医薬品として投与した際に、微細血管に閉塞を起こす恐れもない。また、生細胞のように使用するタイミングを見計らって細胞培養を行う必要もなく、調製や取扱いが容易であり、凍結による長期保存も可能である。さらに本発明によれば、エキソソーム生成促進剤などの添加剤を加える必要もない。添加剤によるエキソソームへの影響を危惧する必要がないため、研究上や臨床上的利点が極めて大きい。また本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品やサプリメントは、疲労回復促進効果が期待できる。

### 図面の簡単な説明

〔0013〕〔図1〕エキソソーム含有液中のエキソソーム量の測定結果

### 発明を実施するための形態

〔0014〕＜エキソソーム＞

本発明において「エキソソーム」とは、細胞から細胞外に分泌される脂質

二重層から構成される小胞体であり、脂質二重膜内には、蛋白質、脂質、核酸（miRNA、mRNA、DNAなど）などが含まれている。

[0015] エキソソームは細胞から細胞外に分泌される小胞体である。エキソソームの形成は、エンドサイトーシスによって、細胞膜に存在する受容体を巻き込みながら初期エンドソームが形成されるところから始まる。初期エンドソームが後期エンドソームへと移行し、後期エンドソームが内側に陥入して腔内膜小胞（intraluminal membrane vesicle：ILV）を形成する。ILVを多く含むエンドソーム（multivesicular body：MVB）が最終的に細胞膜と融合し、細胞から放出される。

[0016] 本発明者らはエキソソームを分泌する間葉系幹細胞そのものに着目し、細胞を破碎することで分泌されたエキソソームに加えて分泌される前の細胞内に含まれるエキソソームを抽出することに成功した。

[0017] <間葉系幹細胞>

[0018] 本発明においてエキソソームが分泌される間葉系幹細胞は、間葉系に属する細胞であり、多分化能及び自己複製能を有し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの結合組織細胞や、神経細胞や心筋細胞への分化能を有することが知られている。

[0019] 間葉系幹細胞を含む組織としては、例えば、脂肪組織、臍帯、骨髓、臍帯血、子宮内膜、胎盤、羊膜、絨毛膜、脱落膜、真皮、骨格筋、骨膜、歯小囊、歯根膜、歯髓、歯胚などが挙げられるが、脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、又は歯髓由来間葉系幹細胞が好ましく、中でも容易に採取することができる点で、脂肪組織由来間葉系幹細胞が好ましい。

[0020] 脂肪組織由来間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、及び歯髓由来間葉系幹細胞の調製は常法に従う。ここでは、好ましい細胞である脂肪組織由来間葉系幹細胞の調製方法について具体的に説明する。

[0021] なお、本発明における間葉系幹細胞の生物由来は特に限定されず、ヒトの

ほかヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばサル、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラクダ、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなど）を含む。本発明のエキソソーム含有液を医薬品として投与する場合は、投与対象（レシピエント）と同一の固体から間葉系細胞を採取すること（自家）が好ましい。ただし、同種の動物の間葉系幹細胞（他家）又は異種動物の間葉系幹細胞の使用を妨げるものではない。

＜脂肪組織由来間葉系幹細胞＞

- [0022] 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ADSC (ASC)、Adipose-derived regeneration cells: ADRC、Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: AT-MSC、AD-MSCなどと呼ばれる。以下、単に「ADSC」ということがある。) は、体性幹細胞の一種であり、脂肪組織に含まれる幹細胞である。脂肪組織由来間葉系幹細胞も、自己複製能及び多分化能を有しており、脂肪だけではなく、骨、軟骨、神経、筋肉、心筋、血管、肝細胞、膵島細胞など、多様な細胞に分化することが可能であることが知られている。

＜脂肪組織由来間葉系幹細胞の調製方法＞

- [0023] 本発明においてADSCは、多能性を維持している限りにおいて、当該体性幹細胞の培養（継代培養を含む）により得られる細胞もADSCに該当するものとする。通常ADSCは、生体から分離された脂肪組織を出発材料とし、細胞集団（脂肪組織に由来するADSC以外の細胞を含む）を構成する細胞として「単離された状態」に調製される。ここでの「単離された状態」とは、その本来の環境（即ち生体の一部を構成した状態）から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。
- [0024] なお、本発明におけるADSCの調製は常法に従えば良い。ADSCは各種用途に広く用いられているため、当業者であれば文献や成書を参考にして調製することもできる。公的な細胞バンクから分譲された細胞や市販の細胞などを用いることにしても良い。以下、細胞の調製方法の例として、脂肪組織由来間

葉系幹細胞の調製法（一例）を説明する。

- [0025] ADSCは、脂肪基質からの幹細胞の分離、洗浄、濃縮、培養などの工程を経て調製される。ADSCの調製法は特に限定されない。例えば公知の方法（Fraser JK et al.(2006)、Fat tissue: an under appreciated source of stem cells for biotechnology, Trends in Biotechnology; Apr; 24(4): 150-4, Epub 2006 Feb 20. Review.; Zuk PA et al.(2002)、Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, Molecular Biology of the Cell; Dec;13(12):4279-95.; Zuk PA et al.(2001)、Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, Tissue Engineering; Apr; 7(2): 211-28.などが参考になる。）に従ってADSCを調製することができる。また、脂肪組織からADSCを調製するための装置（例えば、Celution（登録商標）装置（サイトリ・セラピューティクス社、米国、サンディエゴ））も市販されており、当該装置を利用してADSCを調製することにしても良い。当該装置を利用すると、脂肪組織より、ADSCを含む細胞集団を分離できる（K. Lin, Et al. Cytotherapy(2008)Vol. 10, No.4, 417-426）。以下、ADSCの調製法の具体例を示す。

（１）脂肪組織からの細胞集団の調製

- [0026] 脂肪組織はヒト及び非ヒト哺乳動物から切除、吸引などの手段で採取される。非ヒト哺乳動物は先述した動物であればよく、ペット動物、家畜、実験動物は問わない。また、生物の年齢、性別は特に限定されない。なお、ヒトにおいては、美容整形の際の脂肪吸引手術により吸引される組織片や、外科手術などの際に生体から切除される組織に含まれる切除脂肪組織から、ADSCを調製することもできる。ADSCは太い血管の周囲に存在するため脂肪吸引液よりも切除脂肪組織から多く得ることができる。一方、脂肪吸引液から幹細胞を調製したほうが、手術跡が小さく済みドナーの負担が小さい。
- [0027] 脂肪組織として皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉内脂肪、筋肉間脂肪を例示できる。この中でも皮下脂肪は局所麻酔下で非常に簡単に採取できるため、採取の際のドナーへの負担が少なく、好ましい細胞源といえる。通常は一種類の

脂肪組織を用いるが、二種類以上の脂肪組織を併用することも可能である。  
また、複数回に分けて採取した脂肪組織（同種の脂肪組織でなくても良い）  
を混合し、以降の操作に使用しても良い。

[0028] 脂肪組織の採取量は、ドナーの種類や組織の種類、或いは必要とされるADSCの量を考慮して定めることができ、例えば0.5～500g程度である。但し、ドナーへの負担を考慮して一度に採取する量を約3～20g以下にすることが好ましい。採取した脂肪組織は、必要に応じてそれに付着した血液成分の除去及び細片化を経た後、以下の酵素処理に供される。なお、脂肪組織を適当な緩衝液や培養液中で洗浄することによって血液成分を除去することができる。

[0029] 酵素処理は、脂肪組織をコラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼなどの酵素によって消化することにより行う。このような酵素処理は当業者に既知の手法及び条件により実施すれば良い（例えば、R. I. Freshney、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、4th Edition、A John Wiley & Sons Inc.、Publication参照）。以上の酵素処理によって得られた細胞集団は、多能性幹細胞、内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、及び／又はこれらの前駆細胞などを含む。細胞集団を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類に依存する。

（2）沈降細胞集団（SVF画分：stromal vascular fractions）の取得

[0030] 細胞集団は続いて遠心処理に供される。遠心処理による沈渣を沈降細胞集団（本明細書では「SVF画分」ともいう）として回収する。遠心処理の条件は、細胞の種類や量によって異なるが、例えば1～10分間、800～1,500rpmである。なお、遠心処理に先立ち、酵素処理後の細胞集団を濾過などに供し、その中に含まれる酵素未消化組織などを除去しておくことが好ましい。ここで得られた「SVF画分」はADSCを含む。なお、SVF画分を構成する細胞の種類や比率などは、使用した脂肪組織の由来や種類、酵素処理の条件などに依存する。また、国際公開第2006/006692A1号パンフレットにはSVF画分の特徴が示されている。

（3）接着性細胞（ADSC）の選択培養及び細胞の回収

[0031] SVF画分にはADSCの他、他の細胞成分（内皮細胞、間質細胞、血球系細胞、これらの前駆細胞など）が含まれる。そこで本発明の一態様では以下の選択培養を行い、SVF画分から不要な細胞成分を除去する。そして、その結果得られた細胞をADSCとして本発明に用いる。まず、SVF画分を適当な培地に懸濁した後、培養皿に播種し、一晚培養する。培地交換によって浮遊細胞（非接着性細胞）を除去する。その後、適宜培地交換（例えば2～4日に一度）をしながら培養を継続する。必要に応じて継代培養を行う。継代数は特に限定されないが、多能性と増殖能力の維持の観点から過度に継代を繰り返すことは好ましくない（6継代程度までに留めておくことが好ましい）。なお、培養用の培地には、通常の動物細胞培養用の培地を使用することができる。例えば、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)（日水製薬株式会社など）、 $\alpha$ -MEM(大日本製薬株式会社など)、DMEM:Ham'sF12混合培地(1:1)(大日本製薬株式会社など)、Ham'sF12medium(大日本製薬株式会社など)、MCDB201培地(機能性ペプチド研究所)などを使用することができる。血清（ウシ胎仔血清、ヒト血清、羊血清など）又は血清代替物（Knockout serum replacement(KSR)など）を添加した培地を使用することにしても良い。血清又は血清代替物の添加量は例えば5～30%(v/v)の範囲内で設定可能である。

[0032] 以上の操作によって接着性細胞が選択的に生存・増殖する。続いて、増殖した細胞を回収する。回収操作は常法に従えばよく、例えば酵素処理（トリプシンやディスパーゼ処理）後の細胞をセルスクレイパーやピペットなどで剥離することによって容易に回収することができる。また、市販の温度感受性培養皿などを用いてシート培養した場合は、酵素処理をせずにそのままシート状に細胞を回収することも可能である。このようにして回収した細胞（ADSC）を用いることにより、ADSCを高純度で含有する細胞集団を調製することができる。

#### （４）低血清培養（低血清培地での選択的培養）及び細胞の回収

[0033] 本発明の一態様では、上記（３）の操作の代わりに又は上記（３）の操作の後に以下の低血清培養を行う。そして、その結果得られた細胞をADSCとし

て本発明に用いる。低血清培養では、SVF画分（（３）の後にこの工程を実施する場合には（３）で回収した細胞を用いる）を低血清条件下で培養し、目的の多能性幹細胞（即ちADSC）を選択的に増殖させる。低血清培養法では用いる血清が少量で済むことから、本発明の方法で得られたADSCを治療目的に使用する場合、対象（患者）自身の血清を使用することが可能となる。即ち、自己血清を用いた培養が可能となる。ここでの「低血清条件下」とは5%(v/v)以下の血清を培地中に含む条件である。好ましくは2%(v/v)以下の血清を含む培養液中で細胞培養する。更に好ましくは、2%(v/v)以下の血清と1~100ng/mLの線維芽細胞増殖因子-2 (bFGF) を含有する培養液中で細胞培養する。無血清培地を用いても良い。

[0034] 血清はウシ胎仔血清に限られるものではなく、ヒト血清や羊血清などを用いることができる。本発明の方法で得られた活性化精子をヒトの治療に使用する場合には、好ましくはヒト血清、更に好ましくは治療対象の血清（即ち自己血清）を用いる。培地は、使用の際に含有する血清量が低いことを条件として、通常の動物細胞培養用の培地を使用することができる。例えば、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)（日水製薬株式会社など）、 $\alpha$ -MEM（大日本製薬株式会社など）、DMEM: Ham's F12混合培地(1:1)(大日本製薬株式会社など)、Ham's F12 medium(大日本製薬株式会社など)、MCDB201培地(機能性ペプチド研究所)などを使用することができる。

[0035] 以上の方法で培養することによって、ADSCを選択的に増殖させることができる。また、上記の培養条件で増殖するADSCは高い増殖活性を持つので、継代培養によって、本発明に必要とされる数の細胞を容易に調製することができる。なお、国際公開第2006/006692A1号パンフレットには、SVF画分を低血清培養することによって選択的に増殖する細胞の特徴が示されている。続いて、上記の低血清培養によって選択的に増殖した細胞を回収する。回収操作は上記（３）の場合と同様に行えば良い。回収したADSCを用いることにより、ADSCを高純度で含有する細胞集団を得ることができる。

[0036] 以上の方法では、SVF画分を低血清培養して増殖した細胞が利用に供される

ことになるが、脂肪組織から得た細胞集団を直接（SVF画分を得るための遠心処理を介することなく）低血清培養することによって増殖した細胞をADSCとして用いることにしても良い。即ち本発明の一態様では、脂肪組織から得た細胞集団を低血清培養したときに増殖した細胞をADSCとして用いる。また、選択的培養（上記（3）及び（4））によって得られる多能性幹細胞ではなく、SVF画分（脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する）をそのまま用いることにしても良い。なお、ここでの「そのまま用いて」とは、選択的培養を経ることなく本発明に用いること、を意味する。

#### <エキソソーム含有液の調製方法>

（工程（1）：ADSCを破碎する工程）

[0037] ADSCの破碎は、一般的な細胞破碎方法を用いることができる。例えば、凍結融解（凍結した後融解する処理）、超音波、フレンチプレス、乳鉢、ホモジナイザー、ガラスビーズなどを用いた処理方法を利用することができる。また、破碎処理に供する細胞として、生細胞に限らず、死細胞や障害を受けた細胞を用いることにしても良い。上記破碎処理の中でも凍結融解処理及び超音波処理が好ましい。特に凍結融解処理は簡便であり、また、機械と細胞の接触による汚染を回避でき、衛生的である点から特に好ましい。凍結融解にて破碎する場合は、後述する好ましい条件を用いることができる。超音波処理にて破碎する場合は、凍結していない細胞を用いて破碎処理することが好ましいが、機器から発せられる熱の影響により、しばしばタンパク質の変性や凝集が引き起こされるため、細胞懸濁液を氷中で冷却しながら短時間の処理を繰り返し行うことが好ましい。具体的には、200W～300Wの出力で5～15秒間の破碎と、10～30秒間の休止を複数回繰り返すことが好ましい。

[0038] なお、凍結融解は、凍結過程で細胞が膨張し氷晶が形成され、その氷晶が細胞を破壊することで解凍時に溶解されるため、十分に溶解させるためには繰り返し行うことが好ましい。具体的には、凍結融解処理を1～5回繰り返すことが好ましい。2～4回繰り返すことが更に好ましい。凍結手段としては、例えば、冷凍庫（フリーザー）、ディープフリーザー、液体窒素などに供す

ることなどが挙げられる。凍結融解処理における凍結の温度は、細胞集団全体を凍結させることができる温度であれば特に限定されず、 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-196^{\circ}\text{C}$ が好ましいが、より詳しくは上限は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下が好ましく、 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下が更に好ましく、 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下でより好ましい。

[0039] 細胞集団全体を凍結させることができれば冷却時間は特に限定されないが、冷凍庫やフリーザーを用いる場合は1時間以上、好ましくは10時間以上庫内に置いて、十分冷却することが好ましい。冷却時間の上限は特に限定されないが72時間以内が好ましく、48時間以内が更に好ましく、12時間以内がより好ましい。帰宅前に冷蔵庫やフリーザーに入れ、一晩冷却して翌日に作業すると効率的である。液体窒素を用いる場合は、細胞を含む容器を直接又は細胞を凍結保存容器に収納し、係る容器を液体窒素の中に浸けて冷却すれば良い。

[0040] 凍結した細胞の解凍は、任意の手段により行うことができる。例えば、凍結した細胞を凍結温度より高い温度のウォーターバスやインキュベーター、冷蔵庫や恒温槽などに供することができる。具体的には、 $5^{\circ}\text{C}$ 以下の冷蔵庫にて一晩おくことでの融解、湯煎（例えば $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ ）での融解、室温での融解などを採用することができる。破碎に用いる細胞懸濁液濃度は、ADSCが $1\times 10^4\sim 1\times 10^8$  cells/mLが好ましい。ADSCが $10\times 10^4\sim 1000\times 10^4$  cells/mLが更に好ましく、 $10\times 10^4\sim 500\times 10^4$  cells/mLがより好ましい。作業しやすい濃度であり、1回の作業で十分量のエキソソーム含有液を取ることができる。

（工程（2）：破碎液を攪拌処理する工程）

[0041] 破碎液は試験管など容器に入れ、攪拌子（スターラー）や、ボルテックスミキサーを用いて攪拌する。攪拌子を用いると、その後攪拌子の洗浄などの作業が必要となり、また、攪拌子への破碎液の付着によるエキソソームのロスも懸念されるため、生産効率を上げるためにはボルテックスミキサーによる攪拌処理が好ましい。高濃度のエキソソーム含有液を得るためのボルテックスミキサーによる回転数は100 rpm～3,500 rpmが好ましく、1,500 rpm～2,700 rpmがより好ましい。攪拌時間は1分～30分が好ましく、3分～25分がより

好ましい。効率良く高濃度のエキソソームを得ることができるという点では、短時間の攪拌が好ましく1秒～2分が好ましい。

[0042] ボルテックスミキサーで容器の底部を高速回転して攪拌することで、破碎された細胞から効率良くエキソソームを抽出することができるため、高濃度のエキソソーム含有液の生産に繋がると推測される。なお、攪拌処理時の温度は特に限定されない。

[0043] なお、攪拌処理後の破碎液を遠心処理し、その上清を次の工程（フィルター処理）に用いても良い。攪拌処理後の破碎液を遠心処理すると、その上清からは核などが取り除かれフィルターの目詰まりを防ぐことができるため、効率良くフィルター処理をすることが可能となる。遠心処理する場合は、 $100 \sim 1,500 \times g$ で3～10分間遠心することが好ましい。また、遠心処理時の温度は特に限定されない。

（工程（3）：攪拌処理後の破碎液又は遠心処理後の上清をフィルター処理する工程）

[0044] 攪拌処理後の破碎液又は遠心処理して得られた上清をフィルター濾過する。フィルター濾過によって不要成分を除去することができる。また、適切な孔径のフィルターを使用すれば、不要成分の除去と滅菌濾過を同時に行うことができる。フィルター処理に使用するフィルターの材質は特に限定されないが、タンパク質が吸着しにくいセルロースアセテート、金属製のフィルターが好ましい。特にセルロースアセテートが好ましい。フィルター孔径は $0.1 \sim 0.45 \mu m$ が好ましい。 $0.15 \sim 0.3 \mu m$ が更に好ましい。滅菌濾過も同時に行う場合は $0.2 \mu m$ の孔径が好ましい。なお、本発明の「フィルター濾過」とは、重力の力を借りて不要成分を除去する物理的分離方法である。遠心力を用いて、遠心加速度や粘度、粒子と流体間の密度差などを利用して沈殿物と上澄み液を分離する遠心分離とはその原理も分離される成分も異なる。

[0045] 濾液をすぐに治療に使わない場合は、使用時まで凍結保存することができる。 $-100 \sim -60^{\circ}C$ で保存することが好ましい。一般的に、細胞の凍結融解を繰り返すと、細胞の活性が落ちたり、死細胞が増えたりする傾向にあるが、本

発明のエキソソーム含有液は、幹細胞を含まないため、冷凍保存と融解を何度繰り返してもその品質は変わらない。

[0046] 本発明のエキソソーム含有液はエキソソームを分離することなく、その液自体を原料として使用することができるが、エキソソームを分離して使用することもできる。本発明のエキソソーム含有液からエキソソームを分離する方法には制限がなく、例えば、フィルター濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、電気泳動などの方法及びこれらの組合せを利用して分離することができる。なお、機械が高額とはなるが超遠心分離機を用いてエキソソーム含有液からエキソソームを分離しても良い。

[0047] 本発明で得られたエキソソームが目的のものであることの確認は、透過型電子顕微鏡による形態観察、PCRを利用した遺伝子解析、免疫学的手法（ELISA、FACSなど）、ウエスタンブロットなどにより行うことができる。

＜本発明のエキソソーム含有液＞

[0048] 本発明のエキソソーム含有液は、 $1 \times 10^6$  cells/mLの細胞懸濁液をもとに、コスモ・バイオ社製ヒト由来エクソソーム定量用CD9×CD63ELISAキットにてCD63のタンパク量として測定した際に、エキソソームが10～10,000 pg/mL含まれていることが好ましく、50～7,500 pg/mL含まれていることが更に好ましい。75～5,000 pg/mLがより好ましく、100～3,000pg/mL含まれていることが更に好ましい。

[0049] 本発明の生産方法によれば、細胞外に分泌されたエキソソームに加え、細胞内に含まれているエキソソームも効率良く抽出することができる。よって高濃度のエキソソーム含有液を生産することができる。また、超遠心分離機のように高額な機械も不要で操作も非常に簡便であることから、生産コストを抑えることもできる。

[0050] また本発明のエキソソーム含有液は生細胞を含まないため、発がんなどの生細胞によるリスクが少なく、移植拒否反応の問題がないだけでなく、医薬品として投与した際に微細血管に閉塞を起こす恐れがない。調製や取扱も容易であり、凍結による長期保存も可能である。さらに、本発明のエキソソーム

ム含有液は、エキソソームを多量に含有するだけでなく、細胞内に含まれていた様々な成長因子なども多量に含有している。

＜本発明のエキソソーム含有液の用途＞

[0051] 本発明の生産方法で得られたエキソソーム含有液は、後述する医薬品やサプリメント、化粧品や食品など様々な用途に利用することができる。エキソソーム含有液として利用することもできるし、含有液からエキソソームを分離して利用することもできる。さらには、エキソソーム含有液と賦形剤などを混合することにより、組成物の形態で利用することもできる。

[0052] 例えば医薬品として用いる場合は、本発明の生産方法により得られたエキソソーム含有液又は分離したエキソソームを有効成分として含む医薬品が挙げられる。

エキソソームの内部にはDNA、mRNA、miRNA、タンパク質など細胞内の成分が詰め込まれており、様々な生理機能を有すると言われている。特に本発明のエキソソーム含有液はエキソソームを多量に含有するだけでなく、多様な成長因子も多量に含有していると推測されるため、組織再生に有効である。

[0053] 具体的には、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞後遺症などの中枢神経系疾患、間質性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患、心筋梗塞、心不全などの心臓疾患、腎炎（慢性腎炎を含む）、ネフローゼ症候群などの腎疾患、糖尿病、膵炎などの膵臓疾患、炎症性腸疾患やクローン病などの炎症性腸疾患の治療剤として用いることができる。

また、リウマチや変形性膝関節症、ヘルニアや体のバランスがとりにくくなる疾患、筋萎縮性側索硬化症などの筋力の低下が認められる疾患など、整形／運動機能に障害が生じる疾患の治療剤として用いることもできる。

また、本発明のエキソソーム含有液には、卵丘細胞を顕著に豊潤化、活性酸素諸種（ROS）の優位な減少、ミトコンドリア分布や活性の改善、卵母細胞における初期アポトーシスの減少、核成熟状況や体外受精状況の改善、体外受精卵の発生能の改善、胚盤胞期胚の品質改善などの効果を奏すると推測される。また精子の運動性を向上させるとも言われているため、卵子や精子の機

能低下に起因する不妊症や、精子減少症や子宮内膜症などの治療や改善、体外受精の成功率向上や、家畜の繁殖や、育種・種の維持（例えば絶滅危惧種の維持、ペットの系統の維持又は交雑）等に利用することもできる。

また、エキソソームはその脂質二重層構造により、皮膚真皮層にまで浸透して皮膚構成細胞である線維芽細胞の増殖と活性化による皮膚再生及び抗老化効果、コラーゲン合成促進効果を奏すると言われているため、アンチエイジングや美容用途に用いることもできる。

[0054] あるいは、エキソソームは様々な組織へと取り込まれ、機能が低下している組織の回復効果も見込まれるため、疲労回復促進剤としての使用も有効である。疲労は活動効率の低下を引き起こす。さらに、疲労の蓄積が常態化すれば、疾患を誘発する要因にもなり得る。そのため、本発明の医薬品は疾患の発症をさせない予防薬としても有効である。

[0055] あるいは、本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む、非ヒト哺乳動物用サプリメントとして用いることが好ましい。ここでサプリメントとは、通常の食餌を補うことを目的とした、栄養学的または生理学的効果を持つ栄養素または他の物質の濃縮供給源のことであり、健康の保持や疲労回復のために役立つ機能を有する。

[0056] 本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品は、非毒性で不活性の医薬的に許容される賦形剤、例えば固体状、半固体状もしくは液状の希釈剤、分散剤、充填剤及び担体を含んでも良い。さらに本発明の効果を損なわない範囲において、安定剤、保存剤、pH調整剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料防腐剤、抗菌薬、媒質、生理食塩水、抗菌剤、別な薬効を有する薬剤が添加剤として含んでも良い。

[0057] なかでも、本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品は、抗菌剤を含有することが好ましい。抗菌剤とは、抗菌作用のある化合物などを指し、具体的には、Antibiotic-Antimycotic Solution、イソプロピルメチルフェノールやショウジ油、チモール、塩酸クロルヘキシジン又は塩化セチ

ルピリジニウム等があげられる。これら抗菌剤は、抗菌作用を発揮するために有効な量を含有されることが好ましい。本発明の医薬品が抗菌剤を含むことで、感染菌の増殖を抑え、一定の保存期間の安全性が担保される。

[0058] 本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品の剤形は特に限定されるものではなく、液状でも固体状でも良く、凍結及び／又は乾燥させて粉末状に加工されていても良く、使用目的によって様々な剤形化することができる。剤形としては、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、注射剤、点滴、吸入剤、軟膏、点眼剤、点鼻剤、経皮吸収剤であっても良い。

[0059] 本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品の投与方法は、特に限定されず、局所投与でも、全身投与でも良い。例えば、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、リンパ節内注射、静脈注射、動脈注射、腹腔内注射、胸腔内注射、局所への直接注射、直接貼付などが挙げられる。特に静脈注射は、薬剤が直ちに血流にのって全身に運ばれ高い血中濃度を示すため、即効性を要する場合は、本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品を静脈注射により投与することが好ましい。

[0060] 本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品の投与量は、治療効果が得られるようであれば良く、有効量を投与する。その水準は、固体種類や重症度、年齢や性別、疾患の種類などによる。また投与頻度は、本発明の医薬品を投与した場合に、疾患に対して治療効果を得ることができるような頻度である。また投与期間は、本発明の医薬品を投与した場合に、疾患に対して治療効果を得ることができるような期間である。

[0061] ここで本発明の投与対象は治療が望まれる又は必要とされるヒト及び非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物とは例えばサル、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラクダ、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどであり、ペット動物、家畜、実験動物を含む。

## 実施例

[0062] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

(1) エキソソーム含有液の調製

＜ADSC破碎濾液（凍結融解）の調製1＞

[0063] ヒト（ヒトA）の脂肪幹細胞を用いて、本明細書で述べた方法により濾液を調製した。具体的には、前記ヒト脂肪幹細胞を用いてメッセンプロRS培地で培養しADSCを増殖させた。なお、細胞は2日おきに培地交換をしながら、 $5 \times 10^6$  cellsが得られるまで6継代培養した。PBSを用いて濃度調製し、 $1 \times 10^6$  cells/mLの細胞懸濁液を調製した。それらを $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1日、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで12時間凍結させた。液体窒素（ $-196^{\circ}\text{C}$ ）は瞬時に凍らすことができるが、ここでは細胞懸濁液を入れた容器を、測定開始まで30分液体窒素に漬けた。

[0064] その後凍結した細胞液を $4^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に置き、目視確認で融解を確認するまで融解させた。このようにして細胞を破碎後、表1に記載の撹拌時間でボルテックスミキサーを用いて撹拌処理をした。なお、回転数は2,500 rpmであった。次に撹拌処理後の液をセルロースアセテート膜のフィルター（ポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$ ）で濾過し、エキソソーム含有液とした。コントロールとして、無血清培地（KBM ADSC-5、コージンバイオ株式会社）を用いた。

＜ELISAによるエキソソームの定量分析＞

[0065] 上記で調製したエキソソーム含有液、培養上清及び無血清培地におけるエキソソームの量を、コスモ・バイオ社製ヒト由来エキソソーム定量用CD9×CD63ELISAキットにてCD63のタンパク量として測定した。測定方法はキット製造者のプロトコルに従った。その結果を表1及び図1に示す。図1は表1の結果をグラフにしたものである。

[0066] 表1及び図1から明らかなように、凍結融解したサンプルをボルテックスで撹拌し、フィルター濾過することで得られたエキソソーム含有液には、高濃度のエキソソームが含まれていた。凍結温度が低いほど効果は顕著であった。特に、コントロール（培養上清）と比較すると、実施例3-3には約30倍もの多量のエキソソームが含まれていた。

[0067] このように、本発明の生産方法によれば、大量に且つ簡便に高濃度のエキ

ソソーム含有液を生産することができる。エキソソームの各種用途への使用が期待される。

[表1]

| サンプル名      | 凍結条件      | ボルテックスの有無及び条件 | エキソソーム含有液中に含まれるエキソソーム量(pg/ml) |
|------------|-----------|---------------|-------------------------------|
| 実施例1-1     | 冷凍庫       | —             | 26.8                          |
| 実施例1-2     | 冷凍庫       | 5分            | 70.1                          |
| 実施例1-3     | 冷凍庫       | 20分           | 79.1                          |
| 実施例2-1     | ディープフリーザー | —             | 35.1                          |
| 実施例2-2     | ディープフリーザー | 5分            | 168.1                         |
| 実施例2-3     | ディープフリーザー | 20分           | 160.1                         |
| 実施例3-1     | 液体窒素      | —             | 50.2                          |
| 実施例3-2     | 液体窒素      | 5分            | 198.1                         |
| 実施例3-3     | 液体窒素      | 20分           | 237.7                         |
| 培養上清 2days | —         | —             | 8.3                           |
| 培地 CMS     | —         | —             | —                             |
| PBS(—)     | —         | —             | —                             |

#### <ADSC破碎濾液（凍結融解）の調製2>

[0068] ヒト（ヒトB）の脂肪幹細胞を用いて、メッセンプロRS培地で培養しADSCを増殖させた。なお、細胞は2日おきに培地交換をしながら、 $5 \times 10^6$  cellsが得られるまで6継代培養した。PBSを用いて濃度調製し、 $1 \times 10^6$  cells/mLの細胞懸濁液を調製した。その後は、操作条件（凍結条件、凍結融解の回数、ボルテックスの時間）を変えながら、<ADSC破碎濾液（凍結融解）の調整1>と同様の操作を行った。操作条件及び結果を表2に示す。攪拌時間が1分以下の場合、より高濃度のエキソソーム含有液が得られた。短時間の攪拌作業は操作性に優れるため好ましいといえる。

[表2]

| サンプル名  | 凍結条件  | 凍結融解の回数(回) | ボルテックスの時間 | エキソソーム含有液中に含まれるエキソソーム量(pg/ml) |
|--------|-------|------------|-----------|-------------------------------|
| 実施例4-1 | -20℃  | 3          | 5秒        | 1748.4                        |
| 実施例4-2 | -20℃  | 3          | 10秒       | 2097.9                        |
| 実施例4-3 | -20℃  | 3          | 30秒       | 2208.9                        |
| 実施例4-4 | -20℃  | 3          | 1分        | 2105.9                        |
| 実施例4-5 | -20℃  | 3          | 5分        | 1741.9                        |
| 実施例4-6 | -20℃  | 3          | 10分       | 1492.4                        |
| 実施例5-1 | -80℃  | 3          | 5秒        | 2170.9                        |
| 実施例5-2 | -80℃  | 3          | 10秒       | 2178.9                        |
| 実施例5-3 | -80℃  | 3          | 30秒       | 2410.9                        |
| 実施例5-4 | -80℃  | 3          | 1分        | 2015.4                        |
| 実施例5-5 | -80℃  | 3          | 5分        | 1810.4                        |
| 実施例5-6 | -80℃  | 3          | 10分       | 1315.9                        |
| 実施例6-1 | -196℃ | 3          | 5秒        | 2455.4                        |
| 実施例6-2 | -196℃ | 3          | 10秒       | 2485.9                        |
| 実施例6-3 | -196℃ | 3          | 30秒       | 2544.9                        |
| 実施例6-4 | -196℃ | 3          | 1分        | 2320.4                        |
| 実施例6-5 | -196℃ | 3          | 5分        | 1828.9                        |
| 実施例6-6 | -196℃ | 3          | 10分       | 1151.9                        |

[0069] (2) イヌにおけるエキソソーム含有液の評価（慢性腎炎に対する効果）

イヌ間葉系幹細胞（ビーグル、3歳オス）を用いて、ヒト脂肪幹細胞と同様にエキソソーム含有液を調製した。なお、次の要件を満たすイヌの細胞を用いた。

- ・ 混合ワクチン接種、フィラリア予防および狂犬病予防接種を毎年受けていること、
- ・ 過去に輸血を受けていないこと、
- ・ 全身性の感染性皮膚疾患がないこと、
- ・ これまでに血液媒介性の感染症に罹患または罹患した疑いがないこと（バベシア症や犬ブルセラ症など）、
- ・ 重篤な代謝、内分泌疾患が無いこと、
- ・ 遺伝性疾患に罹患していないこと、
- ・ 悪性腫瘍に罹患していないこと、

上記要件を満たすイヌのADSCを採取し増殖させ、6継代培養し、 $1 \times 10^6$  cells/mLの細胞懸濁液を調製した。 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで12時間凍結させた。その後、凍結した細胞液を $4^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に置き、目視確認で融解を確認するまで融解させた。その後この作業をもう一度繰り返した。ボルテックスミキサーで2,500rpmで5分攪拌し、攪拌処理後の液をセルロースアセテート膜のフィルター（ポアサイズ $0.2\mu\text{m}$ ）で濾過し、エキソソーム含有液（イヌ用）とした。

[0070] 慢性腎炎を患っているイヌ（ミニチュアダックスフンド、18歳メス）に、先述したエキソソーム含有液（イヌ用）を、約2ヶ月おきに合計4回静脈に注射した。その結果、表3に示すように、本発明のエキソソーム含有液を投与することにより、尿中のクレアチニン及びBUN（尿素窒素）の値が低下したことを確認した。クレアチニン及びBUNの濃度は、動物用臨床化学分析装置「富士ドライケム NX700V」を用いて測定した。

[表3]

| 血液化学検査        | 参考基準値           | 2023/04/28<br>(投与前) | 2023/12/30<br>(4回投与後) |
|---------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| BUN (尿素窒素)    | 9.2~29.2 mg/dL  | 57.6                | 45.2                  |
| Crea (クレアチニン) | 0.40~1.40 mg/dL | 2.17                | 0.60                  |

[0071] (3) イヌにおけるエキソソーム含有液の評価（ヘルニアに対する効果）

椎間板ヘルニアとは、背骨の腰部の椎骨と椎骨の間でクッションの役割を果たしている軟骨（椎間板）が変性し、組織の一部が飛びだす疾患であり、腰痛を引き起こしたり、お尻や足にしびれや痛みを生じさせたりする。イヌにおいては、椎間板ヘルニアが起こると、歩くときにふらついたり、足先がひっくり返ったり、麻痺が強くなると立ち上がることができなくなるといった症状がある。

ここでは、ポメラニアン（約1年前に腰椎椎間板ヘルニアを発症）及びミニチュアダックスフンド（約3年前に椎間板ヘルニアを発症）に1週間おきに4回、前記エキソソーム含有液（イヌ用）をそれぞれの静脈に注射した。

[0072] 本発明のエキソソーム含有液の投与前と投与後のイヌの様子を観察したところ、表4に示すように、歩行が改善したり痛みが消失したり、活動性（元気さ）が向上したりしたことを確認した。なお、表4に示す評価は、観察者（観察者及び／又は治療を施す者）が直接見て判断した動物の様子や活動状態である。The HHHHHMM Scaleという、動物の生活の質を測定するスケールも評価に用いた。

[0073]

[表4]

|                                                      | ボメラニアン<br>(6 歳オス)                                    |                                                     | ミニチュアダックスフンド<br>(12 歳メス)   |                                |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
|                                                      | 投与前                                                  | 投与後                                                 | 投与前                        | 投与後                            |
| 歩行困難性                                                | 歩行困難<br>ジャンプ×<br>歩行困難／腰部<br>および左右方向<br>速度の低下<br>歩様異常 | スムーズな歩行<br>歩行距離も伸<br>び、ジャンプ力も<br>回復<br>歩行改善<br>歩様改善 | —                          | —                              |
| 痛みの有無                                                | 痛みあり<br>(抱くとキャンと鳴く)                                  | 痛みなし<br>(抱いてもキャンと鳴かない)                              | 痛みあり<br>(抱くとキャンと鳴く、背中を丸める) | 痛みなし<br>(抱いてもキャンと鳴かない、背中を丸めない) |
| 活動性<br>(元気さ)                                         | 元気がない<br>(動かない、飼い<br>主の動きにわず<br>かに反応する)<br>元気消失      | 元気がある<br>(よく動く)<br>改善                               | —                          | —                              |
| 下痢症状                                                 | —                                                    | —                                                   | 下痢症状あり                     | 下痢症状なし<br>下痢症状改善               |
| Quality of<br>Life Scale<br>(The<br>HHHHMM<br>Scale) | HURT5                                                | HURT0                                               | HURT6                      | HURT1                          |

## [0074] (4) イヌにおけるエキソソーム含有液の評価(活動性向上効果)

下記症状を有するビーグル犬(メス12～13歳)に、1週間おきに4回、先述したエキソソーム含有液(イヌ用)を静脈に注射した。

[0075] 本発明のエキソソーム含有液の投与前と投与後のイヌの様子を観察したところ、表5に示すように、歩行が改善したり、活動性(元気さ)が向上したりしたことを確認した。なお、こちらも、表4同様、観察者(観察者及び／又は治療を施す者)が直接見て判断した動物の様子や活動状態である。この改善は、エキソソームの活性酸素除去作用や、細胞レベルでの炎症や疼痛を抑えたりする作用が効いているものと推測される。

[0076]

[表5]

| 投与前の状態                                                                                                                        | 投与後の状態                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| (診断結果不明)<br>・動きたがらない<br>・ふらつき<br>・跛行<br>・ベタ足(直角に曲がった手首や踵がベタッと地面につくこと)<br>・Quality of Life Scale (The HHHHHMM Scale)=Mobility7 | ・軽快に走り回る<br>・Quality of Life Scale (The HHHHHMM Scale)=Mobility0 |

(5) ウマにおけるエキソソーム含有液の評価

エキソソーム含有液の効果 ウマについても評価した。評価に用いたエキソソーム含有液は、 $5\times10^6$ cells/mLの細胞懸濁液を用いた以外は、先述したイヌ用の試験に用いたエキソソーム含有液と同様に調整した。競走馬にエキソソーム含有液1mLを静脈注射し、投与1週間後のウマのコンディションを評価した。評価は獣医師が行い、以下の基準に従って行った。

[表6]

| 評価基準 | 毛艶    | 筋肉のハリ(硬さ) | 気性      |
|------|-------|-----------|---------|
| 1    | 極めて悪い | 極めて悪い     | 極めて荒い   |
| 2    | かなり悪い | かなり悪い     | かなり荒い   |
| 3    | 悪い    | 悪い        | 荒い      |
| 4    | やや悪い  | やや悪い      | やや粗い    |
| 5    | 普通    | 普通        | 普通      |
| 6    | やや良い  | やや良い      | やや大人しい  |
| 7    | 良好    | 良好        | 大人しい    |
| 8    | かなり良好 | かなり良好     | かなり大人しい |
| 9    | 極めて良好 | 極めて良好     | 極めて大人しい |

[0077] 評価の結果を表7に示す。その結果から、本発明のエキソソーム含有液を投与すると、ウマのボディコンディションが向上し、精神面で安定させる効果があることも明らかとなった。競走馬は輸送やトレーニング、出走によるストレスが多く、毛艶や筋肉のハリ、気性などにストレスの影響が表れやすいが、本発明のエキソソーム含有液を投与したところ、ボディコンディションや気性が劇的に改善した。

[表7]

|     | 毛鰭<br>投与前→投与後 | 筋肉のハリ(硬さ)<br>投与前→投与後 | 気性<br>投与前→投与後 |
|-----|---------------|----------------------|---------------|
| ウマ1 | 5→9           | 5→9                  | 5→8           |
| ウマ2 | 5→9           | 5→9                  | 5→9           |
| ウマ3 | 5→8           | 5→9                  | 5→7           |
| ウマ4 | 5→9           | 5→9                  | 5→9           |
| ウマ5 | 5→9           | 5→9                  | 5→9           |
| ウマ6 | 5→8           | 5→8                  | 5→9           |

産業上の利用可能性

[0078] 本発明の生産方法によれば、大量に且つ簡便に高濃度のエキソソーム含有液を生産することができる。また本発明のエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品やサプリメントは、疲労回復促進剤としての効果を奏する。

### 請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞由来エキソソーム含有液の生産方法：
- (1) 間葉系幹細胞を破碎する工程、
  - (2) 工程(1)で得られた破碎液を、攪拌子又はボルテックスミキサーを用いて攪拌処理する工程、
  - (3) 前記攪拌処理後の破碎液を、フィルター濾過する工程。
- [請求項2] 前記間葉系幹細胞が脂肪組織由来間葉系幹細胞である、請求項1に記載のエキソソーム含有液の生産方法。
- [請求項3] 前記工程(1)を凍結融解又は超音波によって行う、請求項1又は2に記載のエキソソーム含有液の生産方法。
- [請求項4] 前記工程(2)において、  
破碎液を、ボルテックスミキサーを用いて100～3,500rpmで、1～30分攪拌する、請求項1又は2に記載のエキソソーム含有液の生産方法。
- [請求項5] 請求項1又は2に記載の方法を用いて生産されたエキソソーム含有液を有効成分として含む医薬品。
- [請求項6] 請求項5に記載の医薬品が静脈注射により投与される、疲労回復促進方法。
- [請求項7] 請求項1又は2に記載の方法を用いて生産されたエキソソーム含有液を有効成分として含む、非ヒト哺乳動物用サプリメント。