

明 細 書

発明の名称：

頭皮若しくは皮膚の改質、創傷治癒、または毛髪 of 改質に用いられるための医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、頭皮若しくは皮膚の改質、創傷治癒、または毛髪 of 改質に用いられるための医薬組成物および方法に関する。

背景技術

[0002] 脂肪幹細胞から抽出された脂肪由来幹細胞分泌物には、毛母細胞を刺激する作用と増毛効果を有することが開示されている（非特許文献1）。また、男性ホルモンを抑制することによる増毛剤も開発されている。しかし、これらの治療は、治療している期間は増毛効果があるが、治療を終了すると増毛効果が消失する。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Byung-Soon Park et al., Biomedical Research, 31(1): 27-34, 2010

発明の概要

[0004] 本発明者は、脂肪幹細胞からの分泌物（以下、「ASC-CM」と呼ぶ）を特定の用量で皮膚に投与すると、皮膚の再生を促進すること、皮膚の改質を促進すること、皮膚の創傷を治癒できること、または皮膚の若返りを促進することを見出した。本発明者はまた、ASC-CMを特定の用量で頭皮に投与すると、頭皮の再生を促進すること、頭皮の改質を促進すること、または頭皮の若返りを促進することを見出した。本発明者はさらに、ASC-CMを特定の用量で頭皮に投与すると、毛髪 of 改質（キューティクルの改質、白髪 of 改善、毛髪伸長速度の増加、毛髪 of 太さ of 増加等）を促進することを見出した。

[0005] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、頭皮または皮膚を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、頭皮または皮膚1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.6 μg の前記分泌物が投与される、医薬組成物。

(2) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、創傷を治療することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、創傷部位1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.6 μg の前記分泌物が投与される、医薬組成物。

(3) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、毛髪を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、頭皮または皮膚1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.6 μg の前記分泌物が投与される、医薬組成物。

(4) 毛髪の改質が、白髪の減少である、上記(3)に記載の医薬組成物。

(5) 毛髪の改質が、毛髪のキューティクルの荒れの改善である、上記(3)に記載の医薬組成物。

(6) 毛髪の改質が、毛髪の太さまたは伸長速度の改善である、上記(3)に記載の医薬組成物。

(7) 頭皮または皮膚の表面の1 cm^2 ～4 cm^2 に1箇所の割合で投与される、上記(1)～(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

(8) 1箇所当り10～30 μL の溶液量で投与される、上記(1)～(7)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 投与間隔が、月に2回から6月に1回である、上記(1)～(8)のいずれかに記載の医薬組成物。

[0006] 本発明によれば、治療終了後も継続的に効果を発揮し得る医薬組成物、または治療法が提供される点で有利である。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図1は、ASC-CMの投与による毛髪のキューティクルに対する影響

を示す写真である。

[図2]図2は、ASC-CMの投与により、白髪が根元部分において黒色に変化していることを示す図である。

[図3]図3は、ASC-CMの投与と皮膚の脂肪層の厚みとの関係を示す図である。＃1～＃5はそれぞれ、治療1～5ヶ月後であることを示す。

[図4A]図4Aは、頭部の9分割の模式図である。

[図4B]図4Bは、ASC-CM 0.1 μ g 投与群における9分割された頭皮それぞれに対する増毛効果の評点の平均値（初回、治療開始6～9ヶ月後、治療終了後である治療開始2年1ヶ月～3年後）を示す。

[図4C]図4Cは、ASC-CM 0.4 μ g 投与群における9分割された頭皮それぞれに対する増毛効果の評点の平均値（初回、治療開始6～9ヶ月後、治療終了後である治療開始2年1ヶ月～3年後）を示す。

[図5A]図5Aは、治療前後における皮膚組織中のコラーゲンの組織染色を示す。

[図5B]図5Bは、治療前後における皮膚組織中のコラーゲンの組織染色を示す。

[図5C]図5Cは、脂肪細胞の大きさに対するASC-CM投与の用量依存性を示す図である。

[図6]図6は、創傷に対するASC-CM投与用量と治癒効果の関係を示す。

[図7]図7は、ASC-CM 0.4 μ g 投与群における頭皮脂肪層の免疫組織学的染色（CD68陽性マクロファージの染色、CD163陽性マクロファージの染色およびPPAR γ 陽性脂肪細胞の染色）の結果を示す。

[図8A]図8Aは、ASC-CM 0.4 μ g 投与群における毛髪の伸長速度とその伸長速度の総和を示す。図8Aは、患者Cの結果である。

[図8B]図8Bは、上記図8Aの方法で計測した3名の患者の治療前後の毛髪の長さの総和を示すグラフである。図8Bでは、左から順に患者Aのデータ、患者Bのデータ、患者Cのデータが示されている。

発明の具体的な説明

- [0008] 本明細書では、「対象」とは、哺乳動物を意味する。哺乳動物としては、例えば、ヒト（男性および女性）が挙げられる。
- [0009] 本明細書では、「脂肪幹細胞」とは、脂肪組織に存在する細胞であり、幹細胞としての性質を有し、骨および脂肪のいずれにも分化する能力を有する細胞を意味する。脂肪幹細胞は、例えば、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD166から選択される1以上、例えば全てが陽性であり得る。脂肪幹細胞は、CD14、CD31およびCD45から選択される1以上、例えば全てが陰性であり得る。
- [0010] 本明細書では、「脂肪幹細胞からの分泌物」とは、脂肪幹細胞を溶液中で培養した際に脂肪幹細胞から培養液中に分泌される物質を意味する。本明細書では、脂肪幹細胞からの分泌物をASC-CMと呼ぶことがある。細胞からの分泌物には、細胞間の様々な伝達物質が含まれると考えられ、例えば、エクソソームなどの細胞外小胞、mRNAおよびサイトカインなどのタンパク質などが含まれ得る。
- [0011] 本明細書では、「タンパク質量換算」とは、含まれるタンパク質の質量を基準として決定されることを意味する。
- [0012] 本明細書では、「頭皮」とは、頭部の皮膚のうち、頭頂部を含み、顔面、顎、および首（耳を含む）以外の領域をいう。本明細書では、「皮膚」は、頭皮および頭皮以外の皮膚を含む意味で用いられる。
- [0013] 本明細書では、「改質」とは、その質を改良すること、改善すること、向上させること、または、良くすることを意味する。本明細書では、「改善」とは、現在の状況よりも良くなること、および悪い部分がより良くなることを含む意味で用いられる。
- [0014] 本明細書では、「毛髪」とは、皮膚に生える毛を意味する。本明細書では「頭髮」とは、頭皮に生える毛を意味する。
- [0015] 本明細書では、「白髪」とは、毛髪、特に頭髮から、ユウメラニン（または真性メラニン）および／またはフェオメラニンなどの色素が欠乏し、白色を呈する毛髪を意味する。本明細書では、「黒髪」とは、ユウメラニンを含

み黒色を呈する毛髪を意味する。

[0016] 本明細書では、「キューティクル」とは、毛髪の表面を覆う構造であり、毛髪の最外層に存在する構造である。キューティクルは、毛髪を外部からの刺激から保護する役割、および内部のコアテックスからの水分または成分の外部への損失を防ぐ役割を担っている。キューティクルは、根元から毛先に対してうろこ状に毛髪を覆う。

[0017] 本明細書では、「創傷」とは、組織の物理的損傷を意味する。創傷には、体表の創傷が含まれる。

[0018] 本発明のある態様では、

(i) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、組織（例えば、頭皮または皮膚）を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物；

(ii) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、創傷を治療することに用いるための局所投与用医薬組成物；および

(iii) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、毛髪を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物

が提供される。本発明のある態様では、上記 (i) ～ (iii) に記載の医薬組成物は、頭皮または皮膚 1 箇所当りにタンパク質量換算で 0.3 ～ 0.6 μ g の前記分泌物が投与され得る。

[0019] 本発明のある態様では、

(A) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、組織（例えば、頭皮または皮膚）を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、頭皮または皮膚 1 箇所当りにタンパク質量換算で 0.3 ～ 0.6 μ g の前記分泌物が投与される、医薬組成物；

(B) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、創傷を治療することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、創傷部位 1 箇所当りにタンパク質量換算で 0.3 ～ 0.6 μ g の前記分泌物が投与される、医薬組成物；および

(C) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、毛髪を改質するこ

とに用いるための局所投与用医薬組成物であって、頭皮または皮膚1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.6 μ gの前記分泌物が投与される、医薬組成物が提供される。

[0020] 本発明のある態様では、頭皮または皮膚1箇所当りに投与される分泌物の量は、タンパク質量換算で、0.3～0.6 μ g、0.35～0.5 μ g、0.35～0.45 μ g、または約0.4 μ gであり得る。本発明のある態様では、上記ASC-CMに、増殖因子等の追加のタンパク質成分を添加して用いてもよいが、その場合であっても、ASC-CMの投与量は、タンパク質量換算で、0.3～0.6 μ g、0.35～0.5 μ g、0.35～0.45 μ g、または約0.4 μ gであり得る。

[0021] 本発明のある態様では、脂肪幹細胞からの分泌物は、脂肪幹細胞を培地中で培養することにより培養上清中に得られる。本発明のある態様では、脂肪幹細胞からの分泌物は、脂肪細胞を無血清培地中で培養することにより培養上清中に得られる。本発明のある態様では、脂肪幹細胞からの分泌物は、脂肪幹細胞を培地（例えば、無血清培地）中で低酸素条件下で培養することにより培養上清中に得られる。脂肪幹細胞の培地は、脂肪幹細胞の培養に適した培地、例えば、DMEM、F12、DMEM/F12などの培地、または例えば、化学的に定義された培地で培養し得る。低酸素条件としては、酸素濃度が例えば、15%以下、10%以下、または5%以下の大気下の条件（例えば、1.5%～4%、例えば、約2%または3%）が挙げられる。

本発明のある態様では、脂肪幹細胞からの分泌物は、脂肪幹細胞をDMEM/F12培地中で低酸素環境下（例えば、2%O₂、5%CO₂、93%N₂雰囲気下）で37℃で72時間培養して得られ得る。

[0022] 脂肪幹細胞は、当業者であれば脂肪組織から容易に取得できる。脂肪幹細胞は例えば、腹部の脂肪組織から得られ得る。腹部の脂肪組織は、腹部脂肪吸引によって得られ得る。脂肪幹細胞の脂肪組織からの精製は例えば以下のように行うことができる。脂肪組織を洗浄し、I型コラゲナーゼで細胞塊を

単一細胞に解離させ、フィルターでろ過して細胞以外の組織断片等を除去する。必要に応じて洗浄（例えば、生理食塩水や培地への懸濁と遠心による洗浄）する。その後、脂肪幹細胞を細胞の密度（比重）により分離する。例えば、 1.077g/cm^3 の比重を有するフィコール溶液（例えば、Histopaque-1077）で遠心し、浮かぶ細胞として脂肪幹細胞を分離できる。得られた脂肪幹細胞は、脂肪幹細胞のマーカーの発現で確認しうる。脂肪幹細胞のマーカーとしては、例えば、CD 13、CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105およびCD 166から選択される1以上、例えば全てが挙げられる。また、脂肪幹細胞は、特定のマーカーが発現していないことで確認しうる。そのようなマーカーとしては、例えば、CD 14、CD 31およびCD 45から選択される1以上、例えば全てが挙げられる。また、得られた脂肪幹細胞は、骨への分化能および脂肪への分化能を指標として、その両方を有するものとして確認しうる。

[0023] 脂肪幹細胞からの分泌物は、タンパク質含量によって用量を決定することができる。タンパク質含量は、当業者であれば常法（例えば、ピロガロールレッド法およびブラッドフォード法などの方法）に従って決定することができる。

[0024] 脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物は、投与後は、頭皮は投与部分近辺から改善され、その効果は時間をかけて徐々に周囲に伝播する。従って、頭皮または皮膚上に点在させて時間をかけて周囲にも発明の効果を伝播させることもできるし、密集させて伝播に必要な時間を短縮することもできる。本発明のある態様では、分泌物は、特に限定されないが例えば、 $1\text{cm}^2 \sim 10\text{cm}^2$ 、 $1\text{cm}^2 \sim 5\text{cm}^2$ 、 $1\text{cm}^2 \sim 4\text{cm}^2$ 、 $1\text{cm}^2 \sim 3\text{cm}^2$ 、 $1\text{cm}^2 \sim 2\text{cm}^2$ 、 $0.5\text{cm}^2 \sim 2\text{cm}^2$ 、 $0.7\text{cm}^2 \sim 1.5\text{cm}^2$ に対して1箇所とすることができる。本発明のある態様では、分泌物は、例えば、 0.5cm^2 に1箇所以下、 0.6cm^2 に1箇所以下、 0.7cm^2 に1箇所以下、 0.8cm^2 に1箇所以下、 0.9cm^2 に1箇所以下、または 1cm^2 に1箇所に1箇所以下の投与密度で投与することができる。本発

明のある態様では、脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物は、例えば、皮下直下、又は真皮層から脂肪層上層に局所投与することができる。投与は、例えば、注射により行うことができる。

[0025] また、例えば、1箇所当り $10\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、 $15\mu\text{L}\sim 30\mu\text{L}$ 、 $15\mu\text{L}\sim 25\mu\text{L}$ 、または約 $20\mu\text{L}$ の溶液（但し、溶液は上記で指定された量の有効成分を含む）を投与することができる。

[0026] 投与部位は、適宜選択できるが、例えば、頭皮全体に投与することもできるし、または、頭皮全体のうち他と比較して不良な部分に投与することができる。

[0027] また、驚くべきことに本発明者らは、頭皮全体のうち比較的良好な部位に投与すると、その効果は周囲に伝播しやすいことを見出している。良好な部分は、本発明の医薬組成物に対する応答性が高く、その効果は伝播して当該投与箇所の周辺にも及ぶ。伝播による改善効果は、投与箇所により近いところで強く表れるが、投与箇所から数cmの範囲（例えば、 $1\text{cm}\sim 4\text{cm}$ ）に及ぶ。従って、頭皮のうち、比較的良好な部位に対して投与することができる。また、比較的不良な部位は良好な部位から改善効果が伝播するので、比較的良好な部位に対して投与するだけでも不良な部位への治療効果は得られ得る。

従って、頭皮のうち、比較的良好な部位に対して投与し、伝播の効果により不良な部分の改善を試みても良い。また、比較的不良な部位において改善が得られると本発明の医薬組成物に対する応答性が高まる。従って、頭皮のうち、比較的良好な部位に対して投与し、伝播の効果により不良な部分の改善が進んできたら、その後で当該不良であった部分に本発明の医薬組成物を投与してもよい。

ASC-CMを投与する毎に、投与部位における、組織刺激、マクロファージの活性や幼若脂肪細胞の活性があがり修復機能が上昇すると考えられる。患者の症状(状況)と改善度合いを診て投与することが望まれる。

[0028] ある態様では、タンパク質量換算で $15\mu\text{g}/\text{mL}\sim 25\mu\text{g}/\text{mL}$ （例

例えば、約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$) の ASC-CM を 1 箇所 $15 \mu\text{L} \sim 25 \mu\text{L}$ (例えば、約 $20 \mu\text{L}$) の量で頭皮に局所投与することができる。ある態様では、上記局所投与は、成人の頭皮当り 150 箇所 $\sim$ 250 箇所 (例えば、約 200 箇所)、または 250 箇所 $\sim$ 800 箇所にすることができ、投与箇所数は、必要に応じて決定することができる。ここで用語「約」とは、この用語に続く数値の $\pm 10\%$ または $\pm 5\%$ の数値範囲を含むことを意味する。

[0029] 脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物は、特に限定されないが例えば、1 月に 2 回から 6 月に 1 回、1 月に 2 回から 5 月に 1 回、1 月に 2 回から 4 月に 1 回、1 月に 2 回から 3 月に 1 回、1 月に 2 回から 2 月に 1 回、1 月に 1.5 回から 1.5 月に 1 回、または 1 月に 1.2 回から 1.2 月に 1 回、例えば、約月 1 回の投与間隔で投与することができる。

[0030] 脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物は、1 回投与するだけでも頭皮や皮膚の改質効果を有し、この効果は持続しうる。従って、投与は 1 回でもよいし、複数回でもよい。脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物は、継続的に治療が完了するまで、または患者が満足するまで継続的に投与することもできる。特に本発明によれば、頭皮や皮膚の改質効果は、状態の良い部分から表れ、状態の悪い部分では遅れて表れる。従って、頭皮や皮膚の状態に応じて治療期間は変動しうる。脂肪幹細胞からの分泌物またはこれを含む医薬組成物による治療期間は、例えば、最短で 1 回の治療 $\sim$ 3 年間、最短で 1 回の治療 $\sim$ 2 年間、最短で 1 回の治療 $\sim$ 1.5 年間、最短で 1 回の治療 $\sim$ 1 年間、最短で 1 回の治療 $\sim$ 8 ヶ月、最短で 1 回の治療 $\sim$ 6 ヶ月、または最短で 1 回の治療 $\sim$ 4 ヶ月とすることができる。

[0031] 本発明のある態様では、上記 (A) に記載の医薬組成物は、頭皮または皮膚の若返りまたは若返りの促進のための医薬組成物であり得る。本発明のある態様では、上記 (A) に記載の医薬組成物は、頭皮または皮膚の再生または再生の促進のための医薬組成物であり得る。本発明のある態様では、上記 (A) に記載の医薬組成物は、頭皮または皮膚の活性化のための医薬組成物であり得る。本発明のある態様では、上記 (A) に記載の医薬組成物は、増

毛剤や育毛剤と併用することができる。

[0032] 本発明のある態様では、上記（B）に記載の医薬組成物は、創傷を治療することに用い得る。本発明では、創傷の治療は、創傷の治癒、創傷の治癒の促進、または創傷の治癒の早期化であり得る。

[0033] 頭皮を改善することにより、その効果は毛髪そのものにも及ぶ。そして、後述する実施例において示されるように、毛髪の改善効果としては、白髪の減少、白髪部分の重さの減少、および白髪の割合の減少、白髪の割合の減少、キューティクルの荒れの改善、毛髪の太さおよび伸長速度の改善が挙げられる。従って、本発明のある態様では、上記（C）に記載の医薬組成物は、白髪を減少させることに用いるための医薬組成物であり得る。白髪の減少としては、白髪の本数の減少、白髪部分の重さの減少、および白髪の割合の減少が挙げられる。白髪の減少は、各種メラニンにより着色した髪の本数の増加、そのような髪の部分の重さの増加、およびそのような髪の割合の増加を伴い得る。本発明のある態様では、上記（C）に記載の医薬組成物は、毛髪のキューティクルの荒れを改善することに用いるための医薬組成物であり得る。髪の毛のキューティクルの荒れを改善することとしては、キューティクルの整列の程度を高めること、およびキューティクルの乱れた領域を減らすことが挙げられる。本発明のある態様では、上記（C）に記載の医薬組成物は、毛髪の太さまたは伸長速度を改善することに用いるための医薬組成物であり得る。毛髪の太さの改善としては、毛髪を太くすること、太い毛髪の本数を増加させること、および太い毛髪の割合を増加させることが挙げられる。伸長速度の改善としては、例えば、月10mm以上、11mm以上、12mm以上、13mm以上、14mm以上、15mm以上、16mm以上、17mm以上、18mm以上、19mm以上、20mm以上、または21mm以上の伸長速度を有する毛髪の本数若しくは割合を増加させることが挙げられる。

[0034] 本発明のある側面では、
（a）頭皮または皮膚をその必要のある対象（またはその必要のある部位

）において改質する方法であって、頭皮または皮膚 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ の脂肪幹細胞からの分泌物を局所投与することを含む方法；

（b）創傷をその必要のある対象において治療する方法であって、創傷部位 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ の脂肪幹細胞からの分泌物を局所投与することを含む方法；および

（c）毛髪をその必要のある対象において改質する方法であって、頭皮または皮膚 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ の脂肪幹細胞からの分泌物を局所投与することを含む方法
が提供される。

[0035] 本発明のある側面では、

（α）頭皮または皮膚を改質することに用いるための局所投与用医薬製剤の製造における脂肪幹細胞からの分泌物の使用 {ここで、当該分泌物は、頭皮または皮膚 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ 投与される} ；

（β）創傷を治療することに用いるための局所投与用医薬製剤の製造における脂肪幹細胞からの分泌物の使用 {ここで、当該分泌物は、創傷部位 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ 投与される} ；および

（γ）毛髪を改質することに用いるための局所投与用医薬製剤の製造における脂肪幹細胞からの分泌物の使用 {ここで、当該分泌物は、頭皮または皮膚 1 箇所当たりタンパク質量換算で $0.3 \mu\text{g} \sim 0.6 \mu\text{g}$ 投与される}
が提供される。

[0036] 本発明のある態様では、医薬組成物は、脂肪幹細胞からの分泌物に加えて賦形剤（例えば、溶媒、共溶媒、可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤、増粘剤、乳化剤、キレート剤、緩衝液、pH調整剤、抗酸化剤、還元剤、抗菌剤、保存剤、充填剤、保護剤、または等張剤）を含み得る。本発明のある態様では、医薬組成物は、注射剤の形態であり得る。本発明のある態様では、医薬組成物は、局所投与、例えば、皮内投与または皮下投与され得る。

実施例

[0037] 実施例 1 : 脂肪幹細胞分泌物質による増毛効果

(1) 脂肪幹細胞の分泌物質 (以下「ASC-CM」ともよぶ) の調製

脂肪幹細胞の分泌物質は、以下のように調製した。

血液検査によりウイルスチェック (HIV, HBV, HCV) を行った健康な成人女性ドナー (5人、年齢20-21歳) から腹部脂肪吸引によって脂肪組織を採取し、以下の方法で脂肪由来幹細胞 (ADSCs) を分離した。300g×10分の遠沈の後0.075% type I コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich, USA) を添加し、37℃で45分処理した。リン酸緩衝液 (PBS) を加え、70 μ m 加えのフィルターを通して濾過した。その後 α -modified Eagle medium (Invitrogen, USA) を少量添加して300g×10分の遠沈の後、PBSを加え70 μ mのフィルターを通して濾過した。histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) を用いて840g×10分の遠沈を行い、上澄を廃棄しhistopaque-1077に浮かぶ細胞を集めADSCsを得た。

FDA (米国の医薬食品局)、およびKFDA (韓国の医薬食品局) のガイドラインに則り、脂肪組織と洗浄した細胞のウイルス検査、細菌培養検査を行い雑菌の感染を排除した。Dulbecco 査を行い雑菌の感染を排除した。ダルベッコ 改変イーグル培地 (DMEM)、ニュージーランド種10%ウシ血清培地 (FBS)、100単位/mlペニシリン、100単位/mlストレプトマイシンを含む培地を用い37℃の5%二酸化炭素の環境下で3-5日培養した。この行程をさらに4回繰り返し、100mm²あたり4×10⁵個のADSCs (脂肪細胞由来幹細胞) を得た。ADSCsはPBSにより洗浄され、新鮮DMEM /F12 無血清培地 (Invitrogen-Gibco-BRL, USA) を加えた。ADSCsの分泌を促すため72時間低酸素環境 (2%O₂、5%CO₂, 93%N₂) に保った。その後300g×5分の遠沈ののち0.22 μ mのシリンジフィルターを用いてろ過し、脂肪由来幹細胞の培養上清を取得した。この時点で再度、ウイルス検査、細菌培養検査を行い、細菌・ウイルスの感染を排除した。最後に3-kDa molecular-weight cut-off Centricon tubes (Millipore Corp, USA) を用いて分泌された成分を精製してASC-CMを得た。ASC-CMのタンパク質含量は、ブラッドフォード法、およびピロガロールレッド法により確認され

た。

[0038] (2) 薄毛患者に対する、ASC-CMの投与

薄毛患者(25歳~72歳の男性21名および女性16名)の頭皮(右半分、左半分または両方)に1箇所あたりタンパク質量換算で $0.1\mu\text{g}$ ($n=14$)、 $0.2\mu\text{g}$ ($n=3$)、 $0.4\mu\text{g}$ ($n=9$)、 $0.6\mu\text{g}$ ($n=9$)、 $0.8\mu\text{g}$ ($n=4$)のASC-CMを注射器を用いて皮下投与した。2名は、頭皮右半分と左半分とで異なる用量でASC-CMを投与した。この際、上記の用量となる濃度で1箇所あたり $20\mu\text{L}$ を頭皮の200箇所に投与した。頭皮の半分を治療する際にはそれぞれの濃度を100箇所に投与した。この際、頭皮に $1\text{cm}^2\sim4\text{cm}^2$ の投与密度で投与した。投与は、例外的な場合を除いて1月1回の頻度で行い、投与期間は6~10ヶ月間であった(平均的には8ヶ月)。観察はいずれのケースでも投与終了1ヶ月後に行った。皮膚表面1箇所あたりタンパク質量換算で $X\mu\text{g}$ 投与した群を実施例全体にわたって「 $X\mu\text{g}$ 投与群」または「 $X\mu\text{g}/1$ 箇所投与」等という。以下、ASC-CMの投与量について $0.4\mu\text{g}$ と述べたときには例外なくタンパク質換算量で $0.4\mu\text{g}$ 投与されたことを意味する。

初回投与時の毛髪の本数に対する、治療後の毛髪本数の経時的変化を目視により観察した。治療前、および治療の段階毎でのトリコグラムによる撮影に同意を得た。患者の両側の目尻を頭側に延長し、両耳と頭頂を結ぶ線と交差する2点に墨汁で刺青をし、マーキングを中心に2cmの範囲を投与の3日前のタイミングで毎月剃毛した。トリコグラムは、毎回マーキングを中心に撮影(Canon Power Shot A520, Tokyo, Japan)した。この時ガラス板を頭皮に押しつけ毛を寝かせた状態にして毛の長さがわかるようにして撮影した。撮影範囲に含まれる入れ墨を中心とした直径11mmの円(面積 95mm^2)内の毛髪を目視で計量することによって行った。

[0039] 結果は、表1に示される通りであった。

[0040]

[表1]

表1：ASC-CM投与の用量依存性

用量	6ヶ月後	8ヶ月後	10ヶ月後
0.1 μ g 投与群	+4%	+5%	ND
0.2 μ g 投与群	-3%	-15%	-13%
0.4 μ g 投与群	+1%	-6%	-8%
0.6 μ g 投与群	+1%	-10%	-16%
0.8 μ g 投与群	+3%	-2%	-7%

ND：有効数のデータを取得していない

[0041] 表1に示されるように、1箇所あたりタンパク質量換算で0.1 μ g（5 μ g/mLを20 μ L）投与した群（0.1 μ g 投与群）では、初回投与時に対して毛髪本数の増加効果が確認されたが、これに対して、0.2 μ g 投与群、0.4 μ g 投与群、0.6 μ g 投与群および0.8 μ g 投与群では、毛髪本数の目立った増加効果は観察されず、8ヶ月または10ヶ月後ではむしろ毛髪本数の減少が観察された。但し、ASC-CM成分のみの投与では、上記の様に結果が安定せず、毛髪の本数による評価では、決定的な結論を出すことは難しいと考えられた。

[0042] このように、薄毛の処置において、用量依存性は観察されず、1箇所あたりタンパク質量換算で0.2 μ g以上の高用量の投与は却って毛髪本数を増加させないことが明らかとなった。これらの結果から、薄毛患者の処置には、1箇所あたりタンパク質量換算で0.1 μ gを投与する必要があると考えられた。

この結果は、発明者らによる既報の結果（全て0.1 μ g/1箇所を実施した）と一貫するデータであった（Fukuoka et al., The American Journal of Cosmetic Surgery, 29(4):273-282, 2012）。

[0043] 実施例2：髪質の変化

本実施例では、髪のキューティクルについて処置前後で改善がみられたかを調べた。

[0044] ASC-CM 0.4 μ g 投与群（月1回投与）の毛髪を採取し、（患者の毛髪の伸長速度を考慮して、治療前2ヶ月に相当する部位と治療開始から3.5

ヶ月目の部位を)採取日、若しくはその翌日に検査部位の毛髪を固定板にレジジンで接着固定させる。その翌日若しくは翌々日に炭素固定し、同日に常法により走査電子顕微鏡により髪のキューティクルの状態を観察した。陰性対象として、同一患者の処置されなかった部分の毛髪を用いた。そして、毛髪の新しく伸びた部分(根元側)と、既存の部分(先端側)とで比較した。代表的な例を図1に示す。

[0045] その結果、治療した毛髪については、先端側ではキューティクルが荒れているのに対して、新しく伸びた部分である根元側ではキューティクルが整っている様子が観察され、髪質の差が明らかに改善していた。これに対して、陰性対象の処置されなかった部分の毛髪では、根元も先端側もキューティクルの荒れが観察され、処置されなかった部分ではその質の改善効果は認められなかった。

[0046] より多くの患者(3名)に対して同様の評価を実施した(ASC-CMO、 $4\mu\text{g}$ 、月1回投与、3~5ヶ月投与)。評価は、最後の投与から1ヶ月後に、電子顕微鏡画像に基づいて下記の評点に基づいて行った。評価は、医療従事者である医師等7名により行った。評点の平均値を求めた。

[0047] 髪質評価の評点表

5点: キューティクルが整っており、荒れが見当たらない。

4点: 平均よりもキューティクルが整っているが、多少の荒れが認められる。

3点: キューティクルの整い方が平均的である。

2点: 平均よりもキューティクルが荒れており、多少の剥がれが認められる。

1点: キューティクルが全体的に荒れており、全体的に剥がれが認められる。

[0048] 結果は、表2に示される通りであった。

[0049]

[表2]

表2：治療部位と未治療部位との髪質の変化

	治療部位	未治療部位
患者1	3. 7 1	3
患者2	3	2. 1 4

[0050] 患者3については、本実施例の前にすでに治療が開始されていた。しかし、本実施例による観察を開始し、4ヶ月後には同様の髪質変化が確認された。

[0051] 上述の通り、0. 4 μ g 投与群では、投与後に髪質の変化が認められた。他方で、0. 1 μ g 投与群では、陰性対象同様に髪質の改善効果は観察されなかった。

患者3では、本実施例前に治療が開始されていたが、ASC-CMの0. 4 μ g 投与により明確に髪質の改善が認められた。

[0052] 実施例3：髪質の変化

本実施例では、髪の色（白髪）に着目し、処置前後でその改善効果を調べた。

[0053] ASC-CMの0. 4 μ g 投与群（n=5、54歳～61歳男性）において、治療開始から6ヶ月～16ヶ月（平均9. 4ヶ月；治療は平均9. 2回）後に白髪の面積を調べ、治療前と比較した。その結果、表3に示されるように、面積比で平均約38%の減少が認められた。

[0054] [表3]

表3：ASC-CM投与による白髪面積の減少効果

ID	年代	初回(cm ²)	M(cm ²)	増減(%)	経過年数
1	60代男性	289.1	156.8	-46%	12ヵ月
2	50代男性	240.1	205.8	-14%	1年4ヵ月
3	60代男性	142.1	102.9	-28%	6ヵ月
4	60代男性	142.1	53.9	-62%	6ヵ月
5	60代男性	127.4	68.6	-46%	7ヵ月
		188.16	117.6	-38%	

[0055] 図2では、ASC-CMO、 $4\mu\text{g}$ 投与群（67歳女性、5回治療、治療開始から6ヶ月、および61歳男性、8回治療、4ヶ月の経過観察をし、治療開始から12ヶ月）治療後に、白髪の根元部分が黒色になった様子を示す。図2で示されるように、既に白髪となっている部分については白色のままであるが、治療後に新しく伸びた部分については、黒色となっていることが示されている。

[0056] 実施例4：頭皮の改質効果の検証

毛髪の改質が上記により示されたが、頭皮のどのような改質に基づくものであるのかを検証した。

[0057] 10MHzのプロブを用いたエコー検査により、頭皮の皮下組織の脂肪層の厚みの変化を観察した。この検査では、皮脂腺領域から下方部分の領域が測定され、概ね真皮層までの領域の厚みが測定されると考えられる（但し、真皮層は測定値に含まれない）。結果は、図3で示される通りであった。図3では、ASC-CMO、 $4\mu\text{g}/1$ 箇所を月1回投与した患者の測定値が示されている。図3中の「#n」は、治療nヶ月後であることを示す。

[0058] 結果、図3に示されるように治療開始後5ヶ月では脂肪層の厚みに有意な変化は認められなかった。

[0059] また、ASC-CMO、 $1\mu\text{g}$ 投与群では、頭皮の改質が生じていないのに対して、ASC-CMO、 $4\mu\text{g}$ 投与群では、頭皮の改質が生じていることが明らかとなった。これまでの研究によるASC-CMO、 $1\mu\text{g}$ 投与では、短期間での毛髪本数の増加効果は認められたが、頭皮の改質効果は認められなかった。一方、より高用量（ $0.4\mu\text{g}/1$ 箇所）におけるASC-CM投与では、短期間での毛髪本数の増加効果は弱かったものの、頭皮の改質効果が高いことが明らかとなった。一見して高容量の投与群では短期間での毛髪本数の増加効果は弱かったが、頭皮の改質を通して髪質の改善（白髪から黒髪への変化や、キューティクルの荒れの改善）が生じていた。また、長期的には、頭皮の改質を通して増毛効果も期待できることが示唆された。

[0060] 実施例5：部位別の頭皮改質効果

本実施例では、頭皮を上部から9つの領域に分けて治療による効果を観察した。これは、それぞれの患者毎に良い部分（毛の多い部分）と悪い部分（毛の少ない部分）とが混在するため、治療効果を検討する上で、良い部分に対する影響と悪い部分に対する影響を分けて評価することでより精度の高い評価を実現するためであった。また、これまでの実施例から、高用量投与では頭皮の改質が生じるが、改質には時間がかかることから長期の観察期間が必要であると考えられたので、長期の観察期間を設定した。

特に、頭皮の改質によって治療終了後も増毛効果が生じるかを検討した。この目的で、治療期間は概ね8ヶ月とし、そこで治療を終了して、その後は治療せずに増毛効果のみを観察した。

[0061] 9つの領域は、以下の基準に従って設定した。具体的には、頭頂部側から撮影した頭部画像を、楕円に見立て、長軸を3等分し、短軸を3等分して9つの領域に区分けた。図4 Aには、頭部の9つの区画をどのように分けたかが分かるように模式図を示す。

[0062] 薄毛患者（ $n = 12$ ）に対して、ASC-CMを1箇所あたり $0.1 \mu\text{g}$ （ $0.1 \mu\text{g}$ 投与群； $n = 4$ ）または $0.4 \mu\text{g}$ （ $0.4 \mu\text{g}$ 投与群； $n = 8$ ）を、月1回6ヶ月（ $n = 1$ ）、8ヶ月（ $n = 10$ ）、および10ヶ月（ $n = 1$ ）投与して、治療を終了させた。増毛効果の観察および評価は、その後3年にわたり実施した。なお、増毛効果は、医師7名を含む計10名の医療従事者により評価した。評点を以下の評点表に基づいて各評価者により採点し、平均値を算出した。

[0063] 増毛効果の評点

5点：ほぼ正常

4点：透け度合いが20%以下

3点：透け度合いが40%以下

2点：透け度合いが60%以下

1点：透け度合いが80%以下

[0064] 結果は、図4 BおよびCに示される通りであった。図4 BおよびCには、

9つの領域に分けたそれぞれの区画の評点の平均点を示す。

[0065] 図4Bに示されるように、0.1 μ g投与群では、全体的に高い増毛効果が早くから観察されたものの、治療を停止するとその効果も直ぐに消えた。

これに対して、0.4 μ g投与群では、図4Cに示されるように、早期の増毛効果は限定的であったが、治療開始8ヶ月後に治療を停止した後も、増毛効果が持続し、最終的には非常に満足度の高い増毛が達成された。

このことは、0.1 μ g投与群では、根本治療にはならなかったのに対して、0.4 μ g投与群では、頭皮の実質的改善効果が奏されたために、増毛の根本治療に近づいたことを示唆する。

[0066] さらに、0.4 μ g投与群では、まずスコアの高いところ（頭皮の状態がよいところ）から先に増毛効果が表われ、スコアの低いところ（頭皮の状態が悪いところ）では、遅れて増毛効果が表われた。これは、頭皮の改善には時間が必要であるが、頭皮が改善すると増毛効果が表われる、という頭皮の仕組みが影響していると考えられた。

[0067] 実施例6：改善効果と頭皮の組織像

本実施例では、頭皮が改善するに従ってどのような組織像の変化が認められるかを検討した。本実施例では、コラーゲンの増減および脂肪細胞の若返りを観察した。

[0068] (1) コラーゲン像の変化

まず、III型以外のコラーゲンおよびIII型コラーゲンの増減を観察した。具体的には、頭皮の組織（表皮から頭蓋骨に向かう面）の切片を作製し、Picrosirius Red Stain Kit試薬(Polysciences, Inc., Cat#: 24901-250)を用いて製造者による説明書に従ってI型コラーゲンおよびIII型コラーゲンを染色した。I型コラーゲンは、黄色系に染色され、III型コラーゲンは緑色系に染色された。また、III型以外のコラーゲンは、黄色～赤系で染色される。観察像はグレースケールでデジタル画像として保存し、Photoshop（商標）により黄色～赤色系と緑色系をそれぞれ選択して画像として抽出し、その後、各ピクセルの明度からコラーゲン量（III型以外のコラーゲンとIII型コラーゲン

)を推定した。

[0069] その結果、ヒト検体 (n=3) では、治療前には組織中にIII型コラーゲンが見出され、ASC-CMO、4 μ g 投与 (月1回) の治療が進むに従ってIII型コラーゲンが減少する傾向が認められた。また治療に伴って、全体的にIII型以外のコラーゲンが増加する傾向が認められた。

[0070] 染色像の代表例 (2名) を図5Aおよび5Bに示す。図5Aおよび5Bには、カラー写真とともに、黄色～赤色 (III型以外のコラーゲン) 画像および緑色系 (III型コラーゲン量) 画像それぞれを、明度を基準としてグレースケール化した画像を示す。図5Aは、治療開始4ヶ月後の患者の頭皮組織、図5Bは、治療開始6ヶ月後の患者の頭皮組織をそれぞれ示す。いずれのケースでも未治療側ではIII型以外のコラーゲンとIII型コラーゲンとが両方発現しているが、治療側ではIII型コラーゲンの量が減少した (約66%に減少)。III型以外のコラーゲンが増加していること (約113%に増加) が分かる。

[0071] (2) 脂肪細胞の若返り

次に、脂肪細胞の若返りを観察した。脂肪細胞は成長すると共に細胞質のほとんどが脂肪滴となって細胞質に脂肪を蓄え、肥大化する。従って、大きな細胞は成熟した古い細胞を意味し、小さな細胞は幼弱な新しい細胞であるとされている。より具体的には、ASC-CMを1回投与したウイスターラット (n=3) の背部皮膚の組織切片を観察して脂肪層における脂肪細胞の大きさの変化を確認した。脂肪細胞の画像を円に近似し、その直径に基づいてS、M、またはLに分類した。その直径が25 μ m以下の細胞を「S」とし、25 μ mを超え36 μ m以下の細胞を「M」とし、36 μ mを超える細胞を「L」として集計した。結果は、図5Cに示される通りであった。

[0072] 図5Cに示されるように、ASC-CMO、4 μ g 投与群では、治療4週間後において「S」の脂肪細胞の「L」に対する割合が顕著に増大していた。ASC-O、1 μ g 投与群では、脂肪層における脂肪細胞の大きさに投与による変化は認められなかった。

[0073] III型コラーゲンの減少、III型以外のコラーゲンの増加および小さな脂肪

細胞の増加は、組織がASC-CMにより再生している可能性を示唆する結果である。

[0074] 実施例7：創傷治癒に対する効果

これまでの実施例により特定用量のASC-CMの投与により皮膚組織が再生する可能性が示唆された。本実施例では、ASC-CMを創傷部位に局所投与することによりASC-CMの組織修復能を検証した。

[0075] 創傷の作成：12週齢ウィスターラット（ $n=3$ ）の背部をバリカンで剃毛し、直径8ミリの円状皮膚全層欠損を頭側、尾側の左右にそれぞれ1つずつ作成し、1体に4つの皮膚全層欠損を作成した。

ASC-CMの投与方法：創部辺縁から4ミリ離れた場所（傷の上下左右）4箇所タンパク質量換算で0.1 μg 、0.2 μg 、0.4 μg または0.8 μg のASC-CMを含む0.02 mlを皮下注入した。

[0076] 創傷治癒の評点

5点：治癒

4点：創傷部位の面積の縮小率が70%以上

3点：創傷部位の面積の縮小率が50%以上70%未満

2点：創傷部位の面積の縮小率が20%以上50%未満

1点：創傷部位の面積の縮小率が20%未満

[0077] 結果は、上記評点を生理食塩水の評点で割って求めた。図6に示される通りであった。図6に示されるように、創傷治癒に関しては、ASC-CM 0.4 μg 投与群において顕著であった。また、ASC-CM 0.1 μg 投与群や0.8 μg 投与群では、創傷治癒の効果は、生理食塩水と同等であった。

[0078] このことから、ASC-CMは、高用量で皮膚の改質効果を有すること、およびその効果はそれぞれ0.4 μg 投与群において特に効果が高いことが明らかになった。また、皮膚の改質効果は、増毛や毛質の改善のみならず、創傷治癒の改善に対しても有益であった。頭皮の改質が生じると考えられた濃度と、創傷治癒効果が高い濃度とが一致したことはとても興味深い結果で

あった。

[0079] 実施例 8 : A S C - C M 投与後の頭皮組織における組織常在型 M 2 様マクロファージおよび P P A R γ 陽性脂肪細胞の検出

末梢組織（特に皮膚や頭皮）において組織再生が生じる際に組織常在型 M 2 様マクロファージの増加、または P P A R γ 陽性脂肪細胞の増加が生じることが報告されている (Festa E et al., Cell, 146: 761-71, 2011)。そこで、本実施例では、A S C - C M 投与後の頭皮組織において、組織常在型 M 2 様マクロファージの増加、または P P A R γ 陽性脂肪細胞の増加が生じているかを調べた。また、頭皮における細胞増殖の活性化マーカーとして K i 6 7 陽性細胞の増加が生じているかを確認した。組織常在型 M 2 様マクロファージは、C D 6 8 陽性細胞または C D 1 6 3 陽性細胞として検出した。

[0080] 複数の成人の A S C - C M 0. 4 μ g 投与群（月 1 回投与）の頭皮の組織切片（頭皮表面から頭蓋骨骨膜上までを含む直径 3 m m パンチの切片）を常法により固定し免疫組織学的染色を行った。経時的变化もみるため治療 4 ヶ月後および治療 6 ヶ月後に採取した。また、本実施例で染色に用いた一次抗体および二次抗体は以下の通りであった。

[0081] [表4]

表 4 : 免疫組織学的染色に用いられた一次抗体および二次抗体

CD68	名称	品番	ロット	メーカー情報	
一次	CD68 Mouse monoclonal antibody	NCL-CD68-KP1	211710	NOVOCASTRA	英国
二次	EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	K4001	-	DaKo	デンマーク
CD163	名称	品番	ロット	メーカー情報	
一次	抗ヒト マクロファージ表面抗原モノクローナル抗体	KT013	TG201213	Trans Genic Inc.	日本
二次	EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	K4001	-	DaKo	デンマーク
PPAR γ	名称	品番	ロット	メーカー情報	
一次	PPAR γ (C26H12) Rabbit mAb	#2435	No.4	Cell Signaling Technology	米国
二次	EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	K4003	-	DaKo	デンマーク

[0082] また、免疫組織学的染色の結果、C D 6 8 陽性細胞に関しては、未治療では 3 m m パンチの切片全体で平均 1 8. 5 個(n=2)であったのに対して、治療開始 4 ヶ月後では 2 4 個(n=1)、治療 6 ヶ月後では平均 7 6 個(n=2)となり、いずれの患者でも C D 6 8 陽性細胞の増加が観察された。更には C D 1 6 3 陽性細胞に関しては、未治療では 3 m m パンチの切片全体で平均 3 6 個(n=2)

であったのに対して、治療6ヶ月後では平均69.5個(n=2)となり、いずれの患者でもCD163陽性細胞の増加が観察された。また、PPAR γ 陽性細胞に関しては、未治療では3mmパンチの切片全体で平均33.5個(n=2)であったのに対し、治療6ヶ月後では平均88.5個(n=2)となり、いずれの患者でもPPAR γ 陽性細胞の増加が観察された。

代表的な免疫組織学的染色の結果を図7に示す。図7では、茶色で示される陽性染色箇所に対して視認性を高める目的でそれぞれ矢尻を付した。

[0083] 組織常在型M2様マクロファージは、脂肪細胞や脂肪組織のメンテナンスを行っている細胞として報告された細胞である(Satoh T. et al., Nature, 495, 524-528, 2013)。この細胞の増加は、脂肪細胞のメンテナンスが活発化したことを示すと考えられる。また、PPAR γ は、脂肪細胞の前駆細胞に多く発現し、幼弱な脂肪細胞が産生されていることを示す。従って、PPAR γ 陽性脂肪細胞の増加と組織常在型M2様マクロファージの増加は、脂肪細胞の若返りとそのメンテナンスが活発化したことを意味し、組織の若返り(組織再生)を示唆するものとなる。

[0084] 驚くべきことに、組織常在型M2様マクロファージの増加およびPPAR γ 陽性脂肪細胞の増加は、治療側での増加に遅れて、未治療側でも観察された。例えば、図7の一番下のパネルは、未治療側(頭部右半分)の免疫組織学的染色の結果である。図7の一番下のパネルでは、治療前の頭部右半分と比較して、組織常在型M2様マクロファージの増加およびPPAR γ 陽性脂肪細胞の増加が認められ、治療の効果が治療しなかった領域にまで伝播することが分かる。また、治療側から離れた箇所でも上記増加は観察されたが、離れるほど増加は遅れて生じた。頭皮の改善効果は、治療した箇所において開始され、これが周囲に伝播し、周囲の頭皮改善効果に繋がることが示唆された。

[0085] 実施例9：頭皮の改善と髪質の改善効果との関係

上記実施例1では、毛髪本数の経時的変化を目視により観察したが、有意な効果を検出するには至らなかった。上記実施例2～7によれば、ASC-

CMO. 4 μ g 投与群では、頭皮や皮膚の再生と改質が生じ、これにより髪質が向上する効果を生じたことが明らかとなった。

本実施例では、上記実施例の結果から、伸びる速度の速い髪の毛に着目し、ASC-CMO. 4 μ g 投与群における治療効果を評価した。具体的には、3日で0.9 mm以上伸びる毛髪を頭皮画像から抽出し、伸びた長さの総和を算出した。なお、成人の毛髪では1ヶ月で約10 mmの割合（すなわち、3日で約1 mmの割合）で伸びることが知られている。

この目的のために、ASC-CMO. 4 μ g / 1箇所を5回投与（月1回投与）した複数の成人の頭皮の一部を剃毛し、3日後に剃毛した部位の画像を撮影し、画像解析した。剃毛後、毛髪は平均的に0.4 mmの長さを有していた。以下では、剃毛3日後に1.4 mm以上の長さを有する毛髪について、長さの総和を算出した。3名の患者（患者A～C）で計測を実施した。代表例として患者Cの計数結果を図8Aに示す。

[0086] また、3名の患者それぞれのデータを図8Bに示す。図8Bでは治療前と治療6ヶ月後（6M後）とが比較されている。図8Bではまた、剃毛3日後に1.4 mm以上の長さを有する毛髪の長さの総和（1.4 mm以上）と、剃毛3日後の1.4 mm未満の毛髪を含む全ての毛髪の長さの総和（全体）とがそれぞれ示されている。図8Bに示されるように、患者Aでは、3日後に1.4 mm以上の長さを有する毛髪についての長さの総和が、治療前に161.0であったのが、治療後6ヶ月で182.4に増加した。患者Bでは、3日後に1.4 mm以上の長さを有する毛髪についての長さの総和が、治療前に34.8であったのが、治療後6ヶ月で59.6に増加した。患者Cでは、3日後に1.4 mm以上の長さを有する毛髪についての長さの総和が、治療前に129.1であったのが、治療後6ヶ月で142.0に増加した。

なお、図8Bに示されるように、剃毛3日後の全毛髪の長さの総和が、患者Aでは、治療前に227.0であったのが、治療後6ヶ月で272.3に増加した。患者Bでは、治療前に76.9であったのが、治療後6ヶ月で1

21.8に増加した。患者Cでは、治療前に219.1であったのが、治療後6ヶ月で272.2に増加した。

このように、ASC-CMO. 4 μ g投与では、頭皮改質とそれによる毛髪の伸長速度の改善が認められた。実施例1の結果と合わせて考察すると、ASC-CMO. 4 μ g投与の効果は、毛髪の本数よりも毛髪の伸長速度により強く表れたことが分かる。また、患者AおよびCと比較して患者Bでは毛髪の伸長速度が全体的に低く、頭皮の状態がより悪いと考えられた。図8Bによれば、そのような悪い頭皮状態の患者に対しても、ASC-CMO. 4 μ g投与は、頭皮の改質効果を発揮したことが明らかである。

[0087] また、3日後に1.4 mm以上の長さの毛髪を調べると、伸びる速度が遅い毛髪（3日後に1.4 mm未満の長さの毛髪）と比較して太いことが画像解析より明らかとなった。具体的には、剃毛3日後の長さが2.1～2.2 mmの毛髪の太さは、2名の患者の平均で97.42 μ mであったのに対して、伸びが1.4 mm未満の毛髪の太さは、上記2名の患者の平均で75.39 μ mであった。この結果から、ASC-CMO. 4 μ g投与では、伸長速度が速く、太い毛髪が増加することが明らかとなった。

ASC-CMO. 4 μ g投与では、毛髪のハリやコシの改善が観察された（毛髪のハリやコシが向上し、毛髪のボリューム増が観察された）が、このことと太い毛髪が増加することとは一貫する結果であった。

このように、頭皮の改質は、毛髪の伸長速度の改善と、太くコシとハリのある毛髪の増加に繋がっていた。