

明 細 書

発明の名称：経鼻投与用医薬組成物

技術分野

[0001] 本開示は、中枢神経疾患治療に用いられる経鼻投与用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 脳は、心停止、心筋梗塞、窒息、各種ショックなどで深刻なダメージを受けると障害をきたし、低酸素脳症を招来する。低酸素脳症の治療においては、単に血圧を維持するだけではなく、全身の臓器および末梢組織への血流を維持することが重要であるが、生存率は日本で14%、米国で20～30%と低く、社会復帰率に至るのは日本で7%、米国で9%と僅かである（非特許文献1、2）。現状、低酸素脳症に対しては、低低温療法といった、ダメージが進行しないようにする対処療法しかないのが実情である。

[0003] エクソソームは細胞外小胞（Extracellular vesicle）の一種であり、細胞から分泌される直径50-200nmの粒状の物質である。その表面は細胞膜由来の脂質、タンパク質を含み、内部には核酸（miRNA、mRNA、DNAなど）やタンパク質等の細胞内物質を含んでおり、細胞間の情報伝達の役割を担っていると考えられている。

[0004] エクソソームは、癌、神経変性疾患等の様々な疾病に関与することが報告されている。疾病によって、エクソソームに内包される又はエクソソーム膜に存在する機能性分子の種類や量の変動することから、疾病の検出又は予後予測、若しくは治療標的としての応用等が期待されている。

[0005] また、エクソソームは、リポソームなどの人工物とは異なる、天然のDDSとしても期待されており、siRNA、miRNA又は低分子化合物等を目的の細胞へ送達する試みが行われている。エクソソームの膜表面には様々な細胞接着分子や糖鎖が発現しており、その発現様式によって、エクソソームがどの細胞と親和性があるかが報告されている。更に、エクソソームの特性を改変・応用

することによる新規DDSの開発も行われている。

- [0006] エクソソームや細胞外小胞については、多くの研究開発が行われている一方で、その製造、分離のための標準的、効率的な技術は未だ発展途上である。細胞外小胞を含む生物学的試料には、多くのタンパク質、及び細胞外小胞と同様の物理的及び化学的な特性を持つ細胞が共存しており、細胞外小胞の分離は本質的に複雑である。
- [0007] 現在用いられている主な分離方法は、細胞外小胞の密度や大きさ、特定の表面マーカーの違いを用いる方法であり、具体的には、超遠心法、沈殿法、ろ過法、サイズ排除クロマトグラフィー法、イムノアフィニティ法が挙げられる。
- [0008] 超遠心法は、細胞、EVs、タンパク質間の密度と大きさの違いを利用する分離法であり、細胞外小胞の典型的な分離方法として用いられる（非特許文献3）。しかしながら、超遠心法は、細胞外小胞の回収に長時間を要し、スループット性が悪く、タンパク質の凝集体が共沈するという欠点がある。
- [0009] 沈殿法は、回収時間及びスループット性に問題がある超遠心分離を用いない方法として開発されたものであり、細胞外小胞・エクソソーム単離キットが販売されるに至っている。
- [0010] ろ過法は、市販のメンブレンフィルター（例えば、PVDF又はポリカーボネート製の、細孔径約50～450nmのフィルター）を用いて、生物学的サンプル中の細胞や細胞外小胞といった比較的大きな小胞成分を分離する方法であり、通常、さらにタンパク質から細胞外小胞やエクソソームを分離する超遠心法を組み合わせる必要がある。（非特許文献4、5、6）
- [0011] サイズ排除クロマトグラフィー法は、細胞外小胞やエクソソームをタンパク質凝集体から分離するために使用されている。通常、最初に、細胞や細胞外小胞といった比較的大きな小胞成分を除去するために、遠心分離やろ過を行った後、市販のサイズ排除カラムを使用してエクソソーム等の細胞外小胞を分離する。（非特許文献4、7、8、9、10）
- [0012] イムノアフィニティ分離法は、エクソソーム等の細胞外小胞の特定の表面

マーカーの違いを用いて分離する方法である。一般に、大量の生物学的サンプルから細胞外小胞やエクソソームを分離する場合には適していない。（非特許文献 1 1）

- [0013] これらの従来の分離方法は、専用の実験装置あるいは実験試薬や多段階の作業工程を必要とし、臨床現場でのルーチン診断ツールとしてエクソソーム等の細胞外小胞を解析することは多くの困難を伴っているのが実情である（非特許文献 1 2）。

先行技術文献

非特許文献

- [0014] 非特許文献1 : Neurotherapeutics. 2020 Apr; 17(2): 539-562.
- 非特許文献2 : The Lancet Journal volume 369, issue 9577, P1925, 2007
- 非特許文献3 : Biol.Chem. 394, no. 10 (2013) : 1253-1262. DOI : 10.1515/hsz-2013-0141.
- 非特許文献4 : Kidney Int. 82, no. 9 (2012) : 1024-1032. DOI : 10.1038/ki.2012.256.
- 非特許文献5 : Nat. Biotechnol. 32, no. 5, 490-495 (2014) . DOI : 10.1038/nbt.2886
- 非特許文献6 : Cancer 119 (2013) : 1159-1167. DOI : 10.1002/cncr.27895.
- 非特許文献7 : Nanomedicine 11, no. 4 (2015) : 879-883. doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.003.
- 非特許文献8 : J. Immunol. Methods 411 (2014) : 55-65. DOI : 10.1016/j.jim.2014.06.007.
- 非特許文献9 : PLoS One 10 (2015) : e0145686
- 非特許文献10 : J. Extracell. Vesicles 3 (2014) : 23430. DOI : 10.3402/jev.v3.23430.
- 非特許文献11 : Biol. Chem. 394, no. 10 (2013) : 1253-1262. DOI : 10.1515/hsz-2013-0141.
- 非特許文献12 : CRDS 国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略セン

ター 俯瞰報告書 ライフサイエンス・臨床医学分野（2021）499-519

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 低酸素脳症などの中枢神経疾患に対する治療効果は未だ改善の余地があり、このような中枢神経疾患に対する有効性を向上させる新たな医薬組成物の創出が望まれる。また、エクソソームと疾患との関係性に関して研究されているものの、エクソソーム等の細胞外小胞の分離方法は、その効率性を向上させることに主眼が置かれてきたため、所定の治療用途において有効性の高い精製物を得るための製法については検討されてこなかった。

[0016] 本開示は、中枢神経疾患治療に対する治療効果に優れた医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者は、鋭意検討の結果、独自の製造方法により得られる細胞外小胞精製物を経鼻投与用組成物として調製することによって、中枢神経疾患治療に対して優れた治療効果が得られることを見出した。本開示はこの知見に基づいてさらに検討を重ねることにより完成したものである。

[0018] 即ち、本開示は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 細胞外小胞精製物を含み、中枢神経疾患治療に用いられる経鼻投与用医薬組成物であり、

前記細胞外小胞精製物が、以下の(i)精製工程及び(ii)膜ろ過工程を含む細胞外小胞精製物の製造方法によって得られるものである、経鼻投与用医薬組成物：

(i) 細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液を、排除及び陰イオン交換担体に接触させ、前記細胞外小胞を含む処理液を得る精製工程、及び

(ii) 前記処理液を膜ろ過に供し、前記細胞外小胞の濃縮液を得る膜ろ過工程。

項2. 前記中枢神経疾患が低酸素脳症である、項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 3. 前記低酸素脳症が全脳虚血である、項 2 に記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 4. 細胞外小胞を 1×10^3 個/ μL 以上含む、項 2 又は 3 に記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 5. 前記被処理液が、前記細胞外小胞を分泌する細胞又はその組織の培養上清である、項 1 ～ 4 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 6. 前記排除及び陰イオン交換担体が、細孔内部が正に荷電されている多孔質担体である、項 1 ～ 5 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 7. 前記膜ろ過に用いられる膜の分画分子量が 10 万～100 万である、項 1 ～ 6 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 8. 前記膜ろ過に用いられる膜の γ グロブリン透過率が、10～80% である、項 1 ～ 7 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 9. 前記膜ろ過に用いられる膜の 0.1 MPa における純水透過流量が、500～1500 L/ m^2 /Hr である、項 1 ～ 8 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 10. 前記膜ろ過に用いられる膜がセルロース系親水性膜である、項 1 ～ 9 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 11. 前記膜ろ過に用いられる膜が中空糸膜である、項 1 ～ 10 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 12. 前記膜ろ過がタンジェンシャルフローろ過である、項 1 ～ 11 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 13. 前記膜ろ過における膜面速度が 0.3 m/秒～2 m/秒である、項 1 ～ 12 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 14. 前記細胞外小胞の濃縮液に含まれる前記細胞外小胞の濃度が、前記処理液に含まれる前記細胞外小胞の濃度の 10 倍以上である、項 1 ～ 13 のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 15. 前記細胞外小胞の濃縮液に含まれる総タンパク質の濃度が、前記被処理液に含まれる総タンパク質の濃度の 0.3 倍以下である、項 1 ～ 14

のいずれかに記載の経鼻投与用医薬組成物。

項 16. (i) 細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液を、排除及び陰イオン交換担体に接触させ、前記細胞外小胞を含む処理液を得る精製工程と、(ii) 前記処理液を膜ろ過に供し、前記細胞外小胞の濃縮液を得る膜ろ過工程と、を含む、全脳虚血治療用の経鼻投与用医薬組成物の製造方法。

発明の効果

[0019] 本開示によれば、中枢神経疾患治療に対する治療効果に優れた医薬組成物が提供される。また、本開示によれば、中枢神経疾患治療に対する治療効果に優れた医薬組成物を迅速に得ることができるため、特に、全脳虚血のように治療の開始に一刻を争う臨床現場において、治療に必要な濃度及び量の細胞外小胞を迅速に確保することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]試験例1で製造した細胞外小胞精製物の製造方法の、膜ろ過工程を行うための装置の概略を示す。

[図2]膜ろ過工程で用いた中空糸膜のγグロブリン透過率を測定するための装置の概略を示す。

[図3]低酸素脳症モデルラットに、試験例3で製造した細胞外小胞精製物を含む経鼻投与医薬組成物を経鼻投与した2日後の脳組織断面を示す。

[図4]試験例4で製造した細胞外小胞精製物（エクソソーム精製濃縮液A）によるマイクログリア細胞の生存率又は増殖率向上効果を示す。

[図5]試験例4で製造した細胞外小胞精製物（エクソソーム精製濃縮液A）による炎症性サイトカインの分泌の抑制効果を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本開示の医薬組成物は、細胞外小胞精製物を含み、中枢神経疾患治療に用いられる経鼻投与用医薬組成物であり、細胞外小胞精製物が、所定の製造方法によって得られるものであることを特徴とする。

[0022] 1. 所定の製造方法

所定の製造方法は、以下の(i)精製工程及び(ii)膜ろ過工程を含む。当

該所定の製造方法により得られる細胞外小胞精製物は、中枢神経疾患治療に対する治療効果に優れる。さらに、当該所定の製造方法は、治療に必要な濃度及び量の細胞外小胞精製物の調製を迅速に行うことが可能であるため、中枢神経疾患治療の開始を迅速化することもできる。

(i) 細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液を、排除及び陰イオン交換担体に接触させ、前記細胞外小胞を含む処理液を得る精製工程

(ii) 前記処理液を膜ろ過に供し、前記細胞外小胞の濃縮液を得る膜ろ過工程

[0023] 1-1. 被処理液

所定の製造方法の材料となる被処理液は、細胞外小胞と夾雑物とを含む。

[0024] 細胞外小胞の種類としては、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等が挙げられ、これらの中でも、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくはエクソソームが挙げられる。

[0025] 細胞外小胞の由来生物としては特に限定されず、例えば、マウス、ウシ、ヒト等の哺乳類が挙げられる。

[0026] 細胞外小胞が由来する組織又は細胞若しくは体液としては特に限定されず、例えば、組織又は細胞の例として、骨髓、歯髄、脂肪、羊膜、臍帯、骨膜、軟骨膜、これらの細胞等が挙げられ、体液の例として、血液、臍帯血、血漿、血清、唾液、尿、涙液、汗、母乳、羊水、脳脊髄液、骨髓液、胸水、腹水、関節液、眼房水、硝子体等が挙げられる。

[0027] 細胞外小胞が由来する細胞の種類としては特に限定されず、生殖細胞、体細胞、幹細胞のいずれであってもよいが、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは幹細胞が挙げられる。なお、当該細胞は、中枢神経疾患治療に対して自家細胞及び他家細胞のいずれであってもよい。また、幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞等が挙げられるが、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは間葉系幹細胞が挙げられる。また、間葉系幹細胞の由来としては特に限定されず、例えば、骨髓、歯髄、血液、脂肪、羊膜、臍帯

、臍帯血、骨膜、軟骨膜等が挙げられる。

[0028] 被処理液は、細胞外小胞と夾雑物とを含む生物学的サンプルであれば特に限定されない。生物学的サンプルとは、細胞又は組織の培養物、もしくは、生物から採取された検体をいい、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは細胞又は組織の培養物、さらに好ましくは細胞の培養物が挙げられる。

[0029] 夾雑物は、当該生物学的サンプルの調製において細胞外小胞に伴って混入した成分であり、例えば、培地成分、培養により産生された成分、採取元の組織又は細胞若しくは体液等に含まれていた成分等が挙げられ、タンパク質をはじめ、多種多様な成分を包含する。

[0030] 本開示において、医薬組成物の治療効果をより高める観点から特に好ましい被処理液としては、当該細胞外小胞を分泌する細胞又はその組織の培養上清が挙げられ、最も好ましくは、間葉系幹細胞の培養上清が挙げられる。

[0031] 1－2. 排除及び陰イオン交換担体

被処理液は、排除及び陰イオン交換担体に接触させられ、これにより、細胞外小胞を含む処理液が得られる。

[0032] 排除及び陰イオン交換担体は、サイズ排除と陰イオン交換との両方が可能な担体をいう。サイズ排除を可能にするには、細孔を有する担体を用いればよい。排除サイズとしては、例えば400kDa以上、好ましくは500kDa以上、より好ましくは600kDa以上、さらに好ましくは650kDa以上が挙げられる。また、陰イオン交換を可能にするには、正に帯電した担体を用いればよい。排除及び陰イオン交換担体は、サイズ排除と陰イオン交換とのうちサイズ排除のみが可能な担体と陰イオン交換のみが可能な担体との組み合わせであってもよいし、サイズ排除と陰イオン交換との両方が可能な担体であってもよい。

[0033] 本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、排除及び陰イオン交換担体は、サイズ排除と陰イオン交換との両方が可能な担体であることが好ましく、細孔内部が正に荷電されている多孔質担体であることがより好ま

しい。細孔内部が正に荷電されている多孔質担体は、より好ましくは、細孔内部が正に荷電され、細孔以外の部分は正に帯電されていない粒子が挙げられ、さらに好ましくは、正に帯電したリガンドで修飾された内側層と、当該リガンドで修飾されていない多孔質シェル層とを持つ複層粒子が挙げられる。

[0034] 排除及び陰イオン交換担体の形状としては特に限定されないが、好ましくは粒子状が挙げられる。粒子状の排除及び陰イオン交換担体の平均粒子径としては、例えば $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、 $10 \sim 500 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 300 \mu\text{m}$ 、又は $20 \sim 150 \mu\text{m}$ が挙げられる。なお、平均粒子径とは、レーザー回折・散乱法によって求めた体積基準の粒度分布における積算値50%での粒径(D50、メジアン径)を意味する。

[0035] 排除及び陰イオン交換担体の材質としては特に限定されず、例えば、セルロース、アガロース、デンプン、アミロース、デキストラン、プルラン、グルコマンナン等の多糖類；ポリアクリル酸及びその誘導体、ポリビニルアルコール、ナイロン、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等の合成有機高分子、ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、ヒドロキシアパタイト等の無機高分子が挙げられ、好ましくは多糖類が挙げられ、より好ましくはアガロース、シリカゲルが挙げられる。

[0036] なお、排除及び陰イオン交換担体を用いた精製は、クロマトグラフィー法によって行われてもよいし、バッチ法によって行われてもよい。

[0037] 精製工程((i)工程)により得られる処理液中の細胞外小胞の濃度としては、当該工程に供された被処理液中の細胞外小胞の濃度の例えば0.65倍以上(重量に基づく)が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.70倍以上、より好ましくは0.75倍以上、さらに好ましくは0.80倍以上、一層好ましくは0.9倍以上、より一層好ましくは0.92倍以上又は0.94倍以上が挙げられる。当該処理液中の細胞外小胞の濃度の上限としては、被処理液中の細胞外小胞の濃度の1

倍以下が挙げられる。

[0038] 精製工程（（i）工程）により得られる処理液中の総タンパク質の濃度は、当該工程に供された被処理液中の総タンパク質の濃度の、例えば0.5倍以下（重量に基づく）が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.4倍以下、より好ましくは0.3倍以下、さらに好ましくは0.2以下、一層好ましくは0.15倍以下が挙げられる。処理液中の総タンパク質の濃度の下限としては特に限定されないが、被処理液中の総タンパク質の濃度の、例えば0.05倍以上、0.08倍以上、又は0.1倍以上が挙げられる。

[0039] 1-3. 膜ろ過

膜ろ過に用いられる膜の分画分子量としては特に限定されないが、例えば10万～100万が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは15～80万、より好ましくは20～60万、さらに好ましくは23～40万、一層好ましくは25～35万が挙げられる。

[0040] 膜ろ過に用いられる膜の γ グロブリン透過率としては特に限定されないが、例えば5%～95%が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは10～80%、より好ましくは20～70%、さらに好ましくは30～60%、一層好ましくは40～50%が挙げられる。 γ グロブリン透過率は、 γ グロブリン水溶液を中空糸膜にろ過圧力0.1 MPaで膜ろ過させた場合、次の式：
$$\left(\frac{\text{透過液中の}\gamma\text{グロブリン濃度}}{\text{水溶液中の}\gamma\text{グロブリン濃度}} \times 100 \right)$$
によって導出される値（%）である。

[0041] 膜ろ過に用いられる膜の、0.1 MPaにおける純水透過流量としては、例えば500～1500 L/m²/Hrが挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは600～1300 L/m²/Hr、より好ましくは800～1100 L/m²/Hrが挙げられる。

[0042] 膜ろ過に用いられる膜の材質としては特に限定されないが、例えば、ポリエーテルスルホン膜、ポリスルホン膜等の疎水性膜、及びセルロース系膜等の親水性膜が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点か

ら、好ましくはセルロース系膜等の親水性膜が挙げられる。当該セルロース系膜の具体例としては、再生セルロース膜、セルロースエステル膜（具体的には、酢酸セルロース膜、セルロースプロピオネート膜、セルロースブチレート膜、セルロースベンゾエート膜等）が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、より好ましくはセルロースエステル膜が挙げられ、特に好ましくは酢酸セルロース膜が挙げられる。

[0043] 膜ろ過に用いられる膜の形状としては特に限定されないが、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは中空糸膜が挙げられる。中空糸膜の内径としては、例えば0.2 mm～1.4 mmが挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.4 mm～1.2 mm、より好ましくは0.6 mm～1.0 mm、さらに好ましくは0.7～0.9 mmが挙げられる。

[0044] 膜ろ過に用いられる膜の形態としては、特に中空糸膜が用いられる場合、好ましくは、複数本（例えば10～500本、10～200本、20～1000本、50～1000本、60～90本、又は70～80本）の中空糸膜の束が挙げられる。

[0045] 膜ろ過の方式としては、デッドエンドろ過及びタンジェンシャルフロー（クロスフロー）ろ過のいずれであってもよいが、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくはタンジェンシャルフローろ過が挙げられる。

[0046] 膜ろ過における膜面速度（膜面流速）としては、例えば0.3 m/秒～2 m/秒が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.4 m/秒～1.5 m/秒、より好ましくは0.5 m/秒～1.3 m/秒、さらに好ましくは0.6 m/秒～1.2 m/秒、一層好ましくは0.8～1.2 m/秒が挙げられる。

[0047] 膜ろ過における入口圧力としては、例えば0.01 MPa～0.2 MPaが挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.015 MPa～0.12 MPa、より好ましくは0.02 MPa～

0.07 MPa が挙げられる。

[0048] 膜ろ過工程（(ii) 工程）により得られる細胞外小胞の濃縮液中の細胞外小胞の濃度としては、当該工程に供された処理液中の細胞外小胞の濃度の、例えば10倍以上（重量に基づく）が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは20倍以上、より好ましくは30倍以上、さらに好ましくは40倍以上、一層好ましくは45倍以上、50倍以上、80倍以上、又は100倍以上が挙げられる。当該濃縮液中の細胞外小胞の濃度の上限としては特に限定されないが、処理液中の細胞外小胞の濃度の例えば60倍以下、又は55倍以下が挙げられる。

[0049] 膜ろ過工程（(ii) 工程）により得られる細胞外小胞の濃縮液中の総タンパク質の濃度としては、精製工程（(i) 工程）に供された被処理液中の総タンパク質の濃度の、例えば0.3倍以下（重量に基づく）が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.25倍以下、より好ましくは0.2倍以下が挙げられる。細胞外小胞の濃縮液中の総タンパク質の濃度の下限としては特に限定されないが、被処理液中の総タンパク質の濃度の、例えば0.0001倍以上、0.0005倍以上、又は0.001倍以上、0.05倍以上、0.1倍以上、又は0.15倍以上が挙げられる。

[0050] 膜ろ過工程（(ii) 工程）により得られる細胞外小胞の濃縮液中の総タンパク質の量としては、当該工程（(ii) 工程）に供された処理液中の総タンパク質の量の、例えば2倍以下（重量に基づく）が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは1.8倍以下、より好ましくは1.6倍以下が挙げられる。細胞外小胞の濃縮液中の総タンパク質の濃度の下限としては特に限定されないが、処理液中の総タンパク質の量の、例えば0.4倍以上、0.7倍以上、又は1倍以上が挙げられる。

[0051] 膜ろ過工程（(ii) 工程）により得られる細胞外小胞の濃縮液の体積は、精製工程（(i) 工程）に供された被処理液の例えば10%（体積に基づく）以下が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好

ましくは5%以下、より好ましくは3%以下、さらに好ましくは2%以下又は1%以下が挙げられる。膜ろ過工程（(ii)工程）により得られる細胞外小胞の濃縮液の体積の0.005%以上、0.001%、0.01%以上、0.1%以上、0.5%以上、又は1%以上が挙げられる。

[0052] 2. 細胞外小胞精製物

本開示の医薬組成物に含まれる細胞外小胞精製物は、上記所定の製造方法によって得られるものである。細胞外小胞精製物の具体的形態としては、上記所定の製造方法によって得られる細胞外小胞の濃縮液、当該濃縮液からさらに水分を除去して得られる超濃縮液又は乾燥物が挙げられ、当該乾燥物を得る方法としては、凍結乾燥、スプレードライ、送風乾燥等が挙げられる。

[0053] 細胞外小胞精製物に含まれる細胞外小胞の種類としては、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等が挙げられ、これらが1種単独で含まれていてもよいし、複数種の組み合わせで含まれていてもよい。これら細胞外小胞の中でも、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくはエクソソームが挙げられる。

[0054] 細胞外小胞精製物に含まれる細胞外小胞のサイズについては、細胞外小胞の平均粒子径として、例えば15～250nmが挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは40～200nm、より好ましくは50～190nm、55～170nm、さらに好ましくは65～150nm、一層好ましくは75～130nm、より一層好ましくは80～120nm、110～120nm、又は100～120nmが挙げられる。なお、本開示において、平均粒子径は、レーザー回折・散乱法によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値（ D_{50} ）をいう。細胞外小胞精製物に含まれる細胞外小胞のモード径としては、例えば10～200nmが挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは30～190nm、30～180nm、より好ましくは50～160nm、さらに好ましくは60～140nm、一層好ましくは70～120nm、より一層好ましくは76～115nm、85～116nm、又は9

3～115 nmが挙げられる。また、粒度分布幅 ($(D_{90}-D_{10})/D_{50}$) としては、例えば0.1～1.6が挙げられ、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは0.2～1.4、より好ましくは0.3～1.2、さらに好ましくは0.4～0.95、一層好ましくは0.5～0.85、より一層好ましくは0.6～0.9、0.65～0.85、又は0.7～0.79が挙げられる。

[0055] 本開示の医薬組成物中、細胞外小胞精製物の含有量としては、経鼻投与用組成物において許容され、且つ、中枢神経疾患治療に有効な用量を投与できる限度において特に制限されないが、細胞外小胞の量で、例えば 1×10^3 個/ μL 以上、好ましくは 1×10^4 個/ μL 以上、より好ましくは 1×10^5 個/ μL 以上が挙げられる。本開示の医薬組成物中の細胞外小胞精製物の含有量の上限は特に限定されないが、細胞外小胞の量で、例えば 1×10^{13} 個/ μL 以下、 1×10^{12} 個/ μL 以下、 1×10^{11} 個/ μL 以下、又は 1×10^{10} 個/ μL 以下が挙げられる。

[0056] また、本開示の医薬組成物中の細胞外小胞精製物の含有量は、細胞外小胞の量で、例えば、1～100,000 $\mu\text{g/mL}$ 、4～10,000 $\mu\text{g/mL}$ 、又は8～5,600 $\mu\text{g/mL}$ であってもよい。

[0057] 3. 他の成分

本開示の医薬組成物は、上記の細胞外小胞精製物を有効成分として含むとともに、他の成分として、経鼻投与用組成物において許容される薬理学的に許容される基剤及び／又は添加物が適宜配合されていてよいし、配合されていなくてもよい。

[0058] 薬理学的に許容される基剤及び／又は添加物としては、例えば賦形剤、粘稠剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、安定化剤、保存剤（防腐剤）、pH調整剤、清涼化剤、抗酸化剤、湿潤化剤、粘着剤、矯臭剤等が挙げられる。これらの基剤及び添加物は、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。

[0059] 4. 製剤形態

本開示の医薬組成物は、経鼻投与用組成物において許容される液剤、粉末剤のいずれであってもよく、好ましくは液剤が挙げられる。液剤を調製する場合には、細胞外小胞精製物と、必要により溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、及び／又は無痛化剤等とを混合し、溶解、懸濁または乳化することにより製造することができる。さらに粘稠剤を加えて粘性を高め、滞留性を付与してもよい。粉末剤を調製する場合は、細胞外小胞精製物と、必要により賦形剤、結合剤、崩壊剤及び／又はその他の適当な添加剤とを混合し、さらに必要に応じて乾燥させることによって製造することができる。

[0060] 本開示の医薬組成物は、経鼻投与用の容器に充填されることができる。経鼻投与用の容器としては、適宜市販のものを使用することができる。

[0061] 5. 用途

本開示の医薬組成物は、中枢神経疾患治療に用いられる。中枢神経疾患としては、例えば、虚血性脳血管障害及び神経変性疾患が挙げられる。虚血性脳血管障害としては、例えば、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症、術後脊髄虚血等が挙げられる。神経変性疾患としては、アルツハイマー型認知症、レビー小体型認知症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等が挙げられる。これらの中枢神経疾患の中でも、本開示の医薬組成物の治療効果をより高める観点から、好ましくは虚血性脳血管障害が挙げられ、より好ましくは低酸素脳症が挙げられる。また、本開示の医薬組成物を得る製造方法が、治療に必要な濃度及び量の細胞外小胞精製物の調製を迅速に行うことが可能であることから、中枢神経疾患としては、治療の開始に一刻を争う緊急性の高い症状である全脳虚血が特に好ましい。

[0062] 本開示の医薬組成物は、経鼻投与に用いられる。本開示の医薬組成物のヒトへの投与量としては、適用疾患及び症状のレベル等に応じて適宜決定され

得るが、細胞外小胞の量で、例えば 1×10^4 個 / k g 以上、好ましくは 1×10^5 個 / k g 以上、より好ましくは 1×10^6 個 / k g 以上、さらに好ましくは 1×10^7 個 / k g 以上、一層好ましくは 5×10^7 個 / k g 以上が挙げられる。本開示の医薬組成物の投与量の上限として、細胞外小胞の量で、例えば 1×10^{11} 個 / k g 以下、 1×10^{10} 個 / k g 以下、 1×10^9 個 / k g 以下、又は 1×10^8 個 / k g 以下が挙げられる。

[0063] 本明細書に開示された各々の態様は、本明細書に開示された他のいかなる特徴とも組み合わせることができる。

実施例

[0064] 以下に実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は、一例であって、本発明の主旨から逸脱しない範囲内で、適宜、構成の付加、省略、置換、及びその他の変更が可能である。本開示は、実施形態によって限定されることはなく、クレームの範囲によってのみ限定される。

[0065] 試験例 1

(I) 間葉系幹細胞の培養上清（細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液）の調製

ヒト由来間葉系幹細胞（骨髓液 5.6 mL から、単核球分離及び播種を経て得られたもの）を細胞培養液（MEM α + 5 % 他家由来血小板融解物（Platelet lysates ; PL）+ 1 % 抗生物質（ペニシリンストレプトマイシン ; P/S））を用いて培養した。培養期間は 21 日で途中で培養上清 3.5 L を取得した。

[0066] (II) 精製工程（工程（i））

上記（I）で得られた培養上清 3.5 L のうち 250 mL（Bradford 法による総タンパク質の量 470.5 mg）に、50 mM Tris-HCl（pH 7.2）溶液で平衡化した担体（細孔内部が正に荷電されている多孔質粒状物であり、細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できる吸着剤）を 50 mL 添加し、50 mL チューブに分注後、口

ーターを用いて10分間室温にて10rpmの回転速度で転倒混和した。その後、室温にて10,000×gで2分遠心し、さらに上清をステリカップ0.22μmフィルトレーションユニット (S2GPU11RE, MerckMillipore)を用いてろ過することで担体を除去し、細胞外小胞を含む処理液を得た。得られた処理液中のBradford法による総タンパク質の量は195.3mgであり、精製工程前の42%まで低下していた。

[0067] (111) 膜ろ過工程 (工程 (ii))

上記(11)で得られた処理液250mLを、図1に示す膜ろ過装置1を用いて膜ろ過した。

[0068] 図1に示す膜ろ過装置1は、

- ・中空糸膜モジュール30と、
- ・中空糸膜モジュール30の両端にそれぞれ液体連通する第1タンク10及び第2タンク20と、
- ・第1タンク10に、開閉バルブ46付き緩衝液送液ライン45で開閉可能に液体連通する緩衝液タンク40と、
- ・第1タンク10にガス連通する第1タンクガス供給ライン53と、
- ・第2タンク20にガス連通する第2タンクガス供給ライン54と、
- ・圧力計51付きガス供給ライン52を、第1タンクガス供給ライン53又は第2タンクガス供給ライン54へ開閉可能にガス連通させる三方弁61と、
- ・
- ・第1タンク10に開閉可能にガス連通する、開閉バルブ62付き第1ガス抜きライン55と、
- ・第2タンク20に開閉可能にガス連通する、開閉バルブ63付き第2ガス抜きライン56と、を含む。

[0069] 膜ろ過装置1のそれぞれの構成部の詳細は以下の通りである。

- ・第1タンク10および第2タンク20

材質：アクリル酸エステル樹脂

サイズ：長さ25 cm、内径0.25 cm、容量120 cm³

・緩衝液タンク40

容量：1.6 L

・中空糸膜モジュール30

中空糸サイズ：内径0.8 mm、外径1.3 mm、長さ17 cm

材質：酢酸セルロース（CA）

分画分子量：30万

以下の測定法によるγグロブリン透過率：54%

0.1 MPaにおける純水透過流量：980 L/m²/Hr

形態：酢酸セルロース（CA）中空糸膜（ダイセン・メンブレン・システムズ（株）製）15本を束ねた中空糸膜束を、ポリカーボネート製の筒状容器に収容、膜面積0.0062 m²

<γグロブリン透過率測定>

図2のγグロブリン透過率測定装置300を用いて、以下の操作でγグロブリン透過率を測定した。

1) タンク302にγグロブリン水溶液（γグロブリン濃度100 ppm）を仕込んだ。

2) 中空糸膜303を流路305に接続した。

3) バルブV-1から窒素ガスを注入して、タンク302に0.1 MPaの圧力をかけた。中空糸膜303の内表面から外表面に向かって前記水溶液をろ過し、ろ過液は容器307に廃棄し、透過液を容器306に回収した。なお、初期の透過液（約100 mL）は廃棄し、その後に排出された透過液を透過率測定用サンプルとした。

装置300で透過液のサンプルを作成した後、以下の方法でγグロブリン透過率を測定した。

4) 分光光度計（（株）島津製作所製、製品名「UV2450」）を用いて、γグロブリン水溶液（100 ppm）の280 nmの吸光度（A1）と、透過液の280 nmの吸光度（A2）を測定し、計算式（A2/A1×

100)によりγ-グロブリン透過率(%)を算出した。

[0070] 膜ろ過は、約20℃の条件下で、以下の手順で行った。

(1) 上記(11)で得られた処理液を第1タンク10内に入れた。

(2) 第1タンク10の上部空間に窒素ガスを圧力0.04MPaで供給し、第1タンク10の中の処理液の希釈液を中空糸膜モジュール30に通過させることでタンジェンシャルフローろ過を行った。この際、第2タンク20は、開閉バルブ63を開にして大気開放されており、圧力はゼロであった。また、中空糸膜モジュール30を流れる膜面線速は1.0m/sであった。なお、膜面線速は、第2タンク20での濃縮液量の増加速度から算出した。中空糸膜モジュール30の透過液は透過液タンク35に貯め、濃縮液は第2タンク20内に移行させた。これにより、第1タンク10中の処理液の希釈液を中空糸膜モジュール30を通過して膜ろ過した。

(3) 第1タンク10中の処理液の大部分を膜ろ過したとき、三方弁61の切り替えによって、窒素ガスを第2タンク20に圧力0.04MPaで供給し、同時に開閉バルブ62の開放によって第1タンク10の圧力を開放した。これによって、第2タンク20の中の濃縮液を中空糸膜モジュール30に通過させることで、上記(2)と反対方向のタンジェンシャルフローろ過を行った。透過液は透過液タンク35に貯め、濃縮液は第1タンク10内に移行させた。これにより、第2タンク20中の濃縮液を中空糸膜モジュール30を通過して膜ろ過した。

(4) 第1タンク10内に移行した濃縮液を、さらに、上記(2)及び(3)に示したように、第1タンク10側から第2タンク20側へのタンジェンシャルフローろ過と第2タンク20側から第1タンク10側へのタンジェンシャルフローろ過とを、濃縮液の液量が10mLになるまで交互に繰り返して行った。逆洗浄を行うため、図示しないタンクから、90mLのリン酸緩衝液(PBS)を中空糸膜モジュール30に供給し、その後、交互タンジェンシャルフローろ過と、90mLのリン酸緩衝液の供給とをさらに2回繰り返した後、交互タンジェンシャルフローろ過によって11.2mLの精製濃

縮液（細胞外小胞精製物）を得た。

[0071] 最終的に得られたエクソソームの精製濃縮液（細胞外小胞精製物）の総タンパク質濃度は22.5 mgであり、精製工程及び膜ろ過工程によりタンパク質が4.8%まで低下していた。

[0072] (I V) OGD実験

凍結保存されている神経芽細胞腫のCell Line (SH-SY5Y、ATCC) をSY5Y専用培地 (eMEM: 45%, F12: 45%, FBS: 10%, P/S: 1%) を用いて培養し、24wellディッシュ (Falcon) に 1.2×10^5 /well条件で播種した。その後、低酸素チャンバー (Invivo2 300) 内で、酸素1%/CO₂5%/窒素94%雰囲気下、グルコース不含DMEM培養液に培地交換し、低酸素・低グルコース負荷 (OGD) を24時間与えた。OGD終了後、細胞を通常インキュベーター (酸素21%) に戻し、培養液はDMEM high glucose (FBS無し) 培地に置換した。

[0073] 培地交換時、上記 (I I I) で得られたエクソソームの精製濃縮液（細胞外小胞精製物）を、エクソソームが 1.7×10^{10} 個/ $10 \mu\text{L}$ /wellとなるように培養液に添加した。コントロールとしてエクソソームを添加しないwellを同時に設定した。72時間培養後に培地を吸引し、各wellに剥離用液（トリプルセレクト、GIBCO）を $500 \mu\text{L}$ 添加し、5分程度37℃でインキュベートし、上記培地を $500 \mu\text{L}$ 加えて中和した。遠心し得られたペレットを1 mlの培地で希釈し、細胞数及び生存率等を、Luna (Logos Biosystems社) を用いて測定した。結果を下記表1に示す。

[0074] [表1]

	細胞総数 (個/mL)	生存率 (%)
コントロール	16550	85
細胞外小胞 1.7×10^{10} 個	87200	90.5

[0075] 表1に示す通り、工程(i)及び工程(ii)を経て得られた細胞外小胞精製物によれば、低酸素・低グルコース負荷(OGD)における神経芽細胞の増殖率を顕著に向上させた。さらに、当該細胞外小胞精製物によれば、総細胞数だけでなくOGDにおける生細胞の比率(生存率)も向上したため、生細胞の数が格段顕著に向上したことが判った。

[0076] 試験例2

試験例1で得られたエクソソームの精製濃縮液(細胞外小胞精製物)について、ナノ粒子マルチアナライザーqNano(IZON)を用いて粒径解析を行った。平均粒子径(レーザー回折・散乱法によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値(D_{50}))は84nm、モード径は79nm、粒度分布幅($(D_{90}-D_{10})/D_{50}$)は、0.68、粒子数は 1.7×10^{12} 個/mLであった。

[0077] 試験例3

(I) 骨髄由来間葉系幹細胞の培養上清(細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液)の調製

ラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)をDMEM+10%FBS+1%P/Sで培養し、80%コンフルになった時点で、培養液をFBS無しに変換し、24時間培養した。上清を回収し、0.45 μ mのフィルターを通した。

[0078] (II) 精製工程(工程(i))

上記(I)で得られた培養上清150mL(Bradford法による総タンパク質の量350.6mg)に、50mM Tris-HCl(pH7.2)溶液で平衡化した担体(細孔内部が正に荷電されている多孔質粒状物であり、細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できる吸着剤)を30mL添加し、50mLチューブに分注後、ローテーターを用いて10分間室温にて10rpmの回転速度で転倒混和した。その後、室温にて10,000 $\times$ gで2分遠心し、さらに上清をステリカップ0.22 μ mフィルトレーションユニット(S2GPU11RE, MerckMilli

i p o r e) を用いてろ過することで担体を除去し、細胞外小胞を含む処理液を得た。得られた処理液中の B r a d f o r d 法による総タンパク質の量は 1 5 9 . 3 m g であり、精製工程前の 4 5 % まで低下していた。

[0079] (I I I) 膜ろ過工程 (工程 (i i))

上記 (I I) で得られた処理液を、試験例 1 (I I I) と同様の膜ろ過に供した。最終的に得られたエクソソームの精製濃縮液 (細胞外小胞精製物) の総タンパク質の量は 4 . 8 m g であり、精製工程及び膜ろ過工程によりタンパク質の量が 1 . 4 % まで低下していた。また、得られたエクソソームの精製濃縮液 (細胞外小胞精製物) について、ナノ粒子マルチアナライザー q N a n o (I Z O N) を用いて粒径解析を行った。平均粒子径 (レーザー回折・散乱法によって測定された体積基準の粒度分布から求められる 5 0 % 積算値 (D_{50})) は 1 1 3 n m 、モード径は 1 0 5 n m 、粒度分布幅 ($(D_{90} - D_{10}) / D_{50}$) は、0 . 7 0 、粒子数は $1 . 6 \times 10^{10}$ 個 / m L であった。

[0080] (I V) 動物実験

ラット (SD ラット、3 7 9 g , 3 9 2 g (約 1 0 週齢)、オス) の両側椎骨動脈を電気凝固及び切断にて完全閉塞した。次の日にラットの両側内頸動脈をクリップを用いて 3 0 分間一時遮断し、その後遮断解除しすぐに、(I I I) で得られたエクソソームの精製濃縮液 (細胞外小胞精製物) を、エクソソームが $3 . 2 \times 10^6$ 個 / $5 \mu L$ / 片鼻腔 (両鼻腔で $6 . 2 \times 10^6$ 個 / $10 \mu L$) の用量となるように、又は、コントロールとして P B S を、 $5 \mu L$ / 片鼻腔 (両鼻腔で $10 \mu L$) を経鼻投与した。この用量は、ヒトに対する 8×10^7 個 / k g に相当する。当該ヒト用量への換算は、脳の重量 (ラットで 2 g 、ヒトで 1 3 0 0 g と設定) 及びヒトの体重 (5 0 k g と設定) に基づいて合理的に導出される。

[0081] 投与 2 日後にラット脳のパラフィン切片を作成し、A p o p t a g (M e r c k) でアポトーシス細胞を蛍光染色・観察 (K e y e n c e B Z - X) した。結果を図 3 に示す。図 3 では、海馬付近の組織の拡大図も併せて表示している。図 3 に示される通り、海馬の死細胞が、コントロール (P B S

）に比べて、エクソソーム投与ラット（Exosome）で劇的に減少した。

[0082] 試験例4

（1）エクソソームの精製濃縮液A（細胞外小胞精製物）の調製

ヒト羊膜由来間葉系幹細胞（AMSC）の培養上清を用い、試験例1と同様にして処理液を調製した。

[0083] 得られた処理液約3,185mL（BCA法によって測定した総タンパク質量5,159.7mg、ELISA法によって測定したCD9／CD63陽性エクソソーム量512.8ng（検量線に用いたCD9／CD63融合標準タンパク質換算））をステリカップ0.22μmフィルトレーションユニット（S2GPU11RE, MerckMillipore）を用いてろ過し、試験例1と同様の膜ろ過に供した。ただし、中空糸膜モジュールは以下の仕様のものである。

[0084] 中空糸サイズ：内径0.8mm，外径1.3mm，長さ17cm

材質：酢酸セルロース（CA）

分画分子量：30万

以下の測定法によるγグロブリン透過率：54%

0.1MPaにおける純水透過流量：980L／m²／Hr

形態：酢酸セルロース（CA）中空糸膜（ダイセン・メンブレン・システムズ（株）製）125本を束ねた中空糸膜束を、ポリカーボネート製の筒状容器に収容、膜面積0.05m²

[0085] 最終的に得られたエクソソームの精製濃縮液A（細胞外小胞精製物）26mLの総タンパク質の量は35.1mgであり、タンパク質の量が0.7%まで低下していた。また、エクソソーム量は372.2ngであり、回収率は73%であった。さらに、得られたエクソソーム精製濃縮液をナノ粒子イメージングアナライザーVIDEO DROPで解析したところ、平均粒子径（レーザー回折・散乱法によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値（D₅₀））は187nm、モード径は185nm、粒度分布

幅 $((D_{90} - D_{10}) / D_{50})$ は、1.14、粒子数は 5.2×10^{10} 個/mL であった。

[0086] (2) 超遠心法による比較用エクソソーム精製濃縮液Bの調製

上記(1)で用いたヒト羊膜由来間葉系幹細胞(AMSC)の培養上清を遠心分離し、上清を回収する作業を2回行った(遠心分離1回目の条件: 2000g、10分、4℃; 遠心分離1回目の条件: 10000g、30分、4℃)。得られた上清を用い、以下の条件で超遠心分離した(超遠心分離の条件: 100000g、70分、4℃)。上清を廃棄し、チューブ内の水分を可能な限りふき取り除去し、チューブ内壁に張り付いたエクソソーム沈殿物を得た。これを約200μlのPBSに懸濁することで、比較用エクソソーム精製濃縮液Bを得た。

[0087] 最終的に得られた比較用エクソソーム精製濃縮液Bの、総タンパク質の量は140.4μgであり、ナノ粒子イメージングアナライザーVIDEO DROPで解析したところ、平均粒子径(レーザー回折・散乱法によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値(D_{50}))は137nm、モード径は135nm、粒度分布幅 $((D_{90} - D_{10}) / D_{50})$ は、1.08、粒子数は 2.3×10^{11} 個/mLであった。

[0088] (3) マイクログリア細胞の生存率又は増殖率の向上効果

マイクログリア細胞株BV2(Elabscience)を96wellディッシュ(Falcon)に 2.0×10^4 /well となるように培地(MEMα, P/S: 1%)で希釈し、播種した。1日後、1,000ng/well となるように大腸菌O26:B6由来リポ多糖(L8274, Sigma-Aldrich)を加えると同時に、 2.8×10^9 個/well となるように、上記(1)で得られたエクソソームの精製濃縮液A又は上記(2)で得られた比較用エクソソーム精製濃縮液Bを添加し、さらに1日培養した後、生細胞数をカウントした。生細胞数のカウントにはCK04 Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所社)を用い、450nmの吸光度を生細胞数として計測した。一方、リポ多糖及びエクソソーム

を添加せずPBS溶液を加えたことを除いて同様の操作を行った（コントロール－１）。また、エクソソームを添加しなかった（リポ多糖は添加した）ことを除いて同様の操作を行った（コントロール－２）。結果を図４に示す。

[0089] 図４に示す通り、上記（１）で得られたエクソソームの精製濃縮液Ａを添加することにより、マイクログリア細胞の生存率又は増殖率を向上させることができ、その効果は、上記（２）で得られた比較用エクソソーム精製濃縮液Ｂを添加した場合よりも高いことが明らかとなった。

[0090] マイクログリア細胞は、病態時に活性型となり細胞特性を激変させ、病変部に集積及び増殖し、損傷した神経細胞を貪食して排除する。エクソソームの精製濃縮液Ａの添加により確認された、マイクログリア細胞の生存率又は増殖率を向上させた効果から、エクソソームの精製濃縮液Ａのように（i）精製工程及び（ii）膜ろ過工程により得られる細胞外小胞精製物は、比較用エクソソーム精製濃縮液Ｂのように超遠心により得られる細胞外小胞精製物に比べ、損傷した神経細胞の貪食及び排除をより促進できることが合理的に類推できる。

[0091] （４）炎症性サイトカインの分泌抑制効果

マイクログリア細胞株BV2（E l a b s c i e n c e）を96w e l l ディッシュ（F a l c o n）に $2.0 \times 10^4 / w e l l$ となるように培地（MEM α ，P／S：1％）で希釈し、播種した。１日後、 $10ng / w e l l$ となるように大腸菌O26：B6由来リポ多糖（L8274，S i g m a－A l d r i c h）を加えると同時に、 2.8×10^9 個／w e l lとなるように、上記（１）で得られたエクソソームの精製濃縮液Ａ又は上記（２）で得られた比較用エクソソーム精製濃縮液Ｂを添加した。さらに１日培養した後、培養上清を回収し、上清中に含まれる炎症性サイトカインTNF α 及びIL－6量をELISA法で定量した（M o u s e T N F－a l p h a Q u a n t i k i n e E L I S A K i t、及びM o u s e I L－6 Q u a n t i k i n e E L I S A K i t（いずれもR&D s y s t e

m s 製) を用いた。)。一方、リポ多糖及びエクソソームを添加せず P B S 溶液を加えたことを除いて同様の操作を行った (コントロール 1)。また、エクソソームを添加しなかった (リポ多糖は添加した) ことを除いて同様の操作を行った (コントロール 2)。結果を図 5 に示す。

[0092] 図 5 に示す通り、上記 (1) で得られたエクソソームの精製濃縮液 A を添加することにより、炎症性サイトカインの分泌を抑制することができ、その効果は、上記 (2) で得られた比較用エクソソーム精製濃縮液 B を添加した場合よりも高いことが明らかとなった。

[0093] 脳がダメージを受けると、マイクログリア細胞は活性化し、TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインを放出し、炎症反応を引き起す。炎症反応は、多発性硬化症、脳卒中、アルツハイマー病などの神経疾患、うつ病、統合失調症、自閉症などの精神疾患を悪化させると考えられている。エクソソームの精製濃縮液 A の添加により確認された、マイクログリアの TNF- α 及び IL-6 の分泌抑制効果から、エクソソームの精製濃縮液 A のように (i) 精製工程及び (ii) 膜ろ過工程により得られる細胞外小胞精製物は、比較用エクソソーム精製濃縮液 B のように超遠心により得られる細胞外小胞精製物に比べ、炎症性サイトカインの分泌をより抑制することで、神経疾患又は精神疾患の悪化をより抑制できることが合理的に類推できる。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞外小胞精製物を含み、中枢神経疾患治療に用いられる経鼻投与用医薬組成物であり、
- 前記細胞外小胞精製物が、以下の (i) 精製工程及び (ii) 膜ろ過工程を含む細胞外小胞精製物の製造方法によって得られるものである、経鼻投与用医薬組成物：
- (i) 細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液を、排除及び陰イオン交換担体に接触させ、前記細胞外小胞を含む処理液を得る精製工程、及び
- (ii) 前記処理液を膜ろ過に供し、前記細胞外小胞の濃縮液を得る膜ろ過工程。
- [請求項2] 前記中枢神経疾患が低酸素脳症である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項3] 前記低酸素脳症が全脳虚血である、請求項2に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項4] 細胞外小胞を 1×10^3 個/ μL 以上含む、請求項2に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項5] 前記被処理液が、前記細胞外小胞を分泌する細胞又はその組織の培養上清である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項6] 前記排除及び陰イオン担体が、細孔内部が正に荷電されている多孔質担体である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項7] 前記膜ろ過に用いられる膜の分画分子量が10万～100万である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項8] 前記膜ろ過に用いられる膜の γ グロブリン透過率が10～80%である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項9] 前記膜ろ過に用いられる膜の0.1MPaにおける純水透過流量が、500～1500L/ m^2/Hr である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。

- [請求項10] 前記膜ろ過に用いられる膜がセルロース系親水性膜である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項11] 前記膜ろ過に用いられる膜が中空糸膜である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項12] 前記膜ろ過がタンジェンシャルフローろ過である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項13] 前記膜ろ過における膜面速度が0.3 m/秒～2 m/秒である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項14] 前記細胞外小胞の濃縮液に含まれる前記細胞外小胞の濃度が、前記処理液に含まれる前記細胞外小胞の濃度の10倍以上である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項15] 前記細胞外小胞の濃縮液に含まれる総タンパク質の濃度が、前記被処理液に含まれる総タンパク質の濃度の0.3倍以下である、請求項1に記載の経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項16] (i) 細胞外小胞と夾雑物とを含む被処理液を、排除及び陰イオン交換担体に接触させ、前記細胞外小胞を含む処理液を得る精製工程と、(ii) 前記処理液を膜ろ過に供し、前記細胞外小胞の濃縮液を得る膜ろ過工程と、を含む、全脳虚血治療用の経鼻投与用医薬組成物の製造方法。