



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202024320 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 01 日

(21) 申請案號：108131377

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 30 日

(51) Int. Cl. : C12N5/0775 (2010.01)

C12P1/00 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

C12P21/00 (2006.01)

(30) 優先權：2018/08/31 日本

2018-164042

2019/07/19 日本

2019-134058

(71) 申請人：日商日產化學有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL CORPORATION (JP)

日本

(72) 發明人：金木達朗 KANAKI, TATSURO (JP)；木田克彥 KIDA, KATSUHIKO (JP)；南昌

孝 MINAMI, MASATAKA (JP)；畑中大輔 HATANAKA, DAISUKE (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：4 共 87 頁

(54) 名稱

附著性細胞之浮游培養用培養基組合物

(57) 摘要

本發明提供一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含(1)甲殼素奈米纖維；及(2)聚葡萄糖奈米纖維或多糖類。



202024320

【發明摘要】

【中文發明名稱】

附著性細胞之浮游培養用培養基組合物

【中文】

本發明提供一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含(1)甲殼素奈米纖維；及(2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

附著性細胞之浮游培養用培養基組合物

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物、及附著性細胞之浮游培養方法。更詳細而言，本發明係關於一種包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之附著性細胞之浮游培養用培養基組合物、及使用該培養基組合物之附著性細胞之浮游培養方法。

【先前技術】

【0002】 於再生醫療之領域中，對使用iPS細胞(induced pluripotent stem cell，誘導性多能幹細胞)或ES細胞(embryonic stem cell，胚胎幹細胞)等多能性幹細胞之器官再生方法之構建進行了銳意研究。然而，ES細胞之建立伴有倫理性問題，又，認為iPS細胞有致癌風險或培養期間較長之問題。因此，同時亦對使用致癌風險相對較低之間葉系幹細胞或神經幹細胞等體性幹細胞、分化誘導期間相對較短之前驅脂肪細胞或前驅心肌細胞等前驅細胞、或者軟骨細胞等之方法之可能性進行了摸索。

【0003】 關於使用體性幹細胞等之治療方法，由於需要大量高品質之相應細胞，故而要求可高效率地製備高品質之細胞之培養方法。例如已知間葉系幹細胞可於皮氏培養皿中藉由單層培養(亦稱為二維(2D)培養等)而使之相對容易地增生。

【0004】 然而，一個培養皿中可培養之細胞數有限，因此於使用該方法來大量地培養細胞之情形時，需要研究將多個培養皿進行積層等，因

此此種培養方法就大量生產之觀點而言並不適合。又，於最近之報告中，利用培養皿之二維培養法有可能使間葉系幹細胞之未分化能力或增生能力降低，此外，亦有使包括導向作用在內之趨化能力或抗炎症作用等間葉系幹細胞所具有之功能降低之擔憂。因此，利用培養皿之二維培養法就生產高品質之細胞之觀點而言亦不適合。

【0005】 另一方面，作為大量地培養附著性細胞之方法，報告有將細胞以附著於微載體之狀態進行培養並使之增生之裝置(專利文獻1)。然而，現在一般能夠獲取之微載體於靜置條件下會在培養液中沈澱，因此需要於培養時進行攪拌。指出於該攪拌時因載體彼此之衝突等而引起細胞死亡之課題。進而，以培養基更換或培養之規模擴大等為目的，而需要於自微載體回收細胞時將細胞彼此或細胞與載體進行剝離，但細胞會因該剝離處理所使用之胰蛋白酶等蛋白質分解酶而受到損傷，作為其結果，導致細胞之存活率降低，此亦成為一個課題。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】 [專利文獻1]日本專利第3275411號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0007】 根據上述背景，本發明之課題在於提供一種新穎之培養方法，其可解決由攪拌時之微載體之衝突引起之細胞死亡、繼代培養時之蛋白質分解酶處理對於細胞之損傷等先前使用微載體之附著細胞之浮游培養中的複數個課題。

【0008】 本發明人等為了解決上述課題而反覆銳意研究，結果發

現，藉由將甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或特定之多糖類以特定之比率調配於液體培養基中，而(1)該液體培養基可對附著性細胞進行浮游培養，且由於無需攪拌，故而可高效率地使附著性細胞增生；(2)該液體培養基可藉由緩慢地攪拌而使載體及附於載體之附著性細胞容易地再分散，進而若將其進行靜置，則可連續地進行再次浮游培養；(3)藉由該液體培養基而增生之幹細胞(例如間葉系幹細胞)以非常高之等級維持分化能力或趨化能力；(4)若使用該液體培養基，則可於低血清條件下長期維持培養細胞，而可高效率地生產細胞分泌物；(5)若使用該液體培養基，則可長期維持球體(sphere)之分散性等，基於此見解進一步進行研究，藉此以至完成本發明。即，本發明係如下所述。

【0009】 [1]一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含：

- (1)甲殼素奈米纖維；及
- (2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類。

[2]如[1]記載之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維，且甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維=1：0.5~20。

[3]如[1]記載之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

[4]如[1]至[3]中任一項記載之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

[5]如[1]至[4]中任一項記載之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為幹細胞。

[6]如[5]記載之浮游培養用培養基組合物，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[7]如[5]或[6]記載之浮游培養用培養基組合物，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[8]一種附著性細胞之培養方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含

(1)甲殼素奈米纖維；及

(2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類

之培養基組合物中進行浮游培養。

[9]如[8]記載之培養方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維，且培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1：0.5～20。

[10]如[8]記載之培養方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

[11]如[8]至[10]中任一項記載之培養方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

[12]如[8]至[11]中任一項記載之培養方法，其中附著性細胞為幹細胞。

[13]如[12]記載之培養方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[14]如[12]或[13]記載之培養方法，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[15]如[8]至[14]中任一項記載之培養方法，其進而包括以下之步

驟：

(1)不進行將經浮游培養之細胞自甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類剝離之處理，進而添加如[1]至[7]中任一項記載之浮游培養用培養基組合物；及

(2)將步驟(1)中所獲得之混合物供於浮游培養。

[16]一種生產細胞分泌物之方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含

(1)甲殼素奈米纖維；及

(2)聚葡萄糖奈米纖維或多糖類

之培養基組合物中進行浮游培養。

[17]如[16]記載之方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維，且培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖奈米纖維=1：0.5~20。

[18]如[16]記載之方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

[19]如[16]至[18]中任一項記載之方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

[20]如[16]至[19]中任一項記載之方法，其中附著性細胞為幹細胞。

[21]如[20]記載之方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[22]如[16]至[21]中任一項記載之方法，其中培養基組合物中之血清之濃度為2%以下。

[23]如[16]至[22]中任一項記載之方法，其中細胞分泌物為選自由低

分子化合物、蛋白質、核酸、及細胞分泌囊泡所組成之群中之至少一者。

[24]一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含如下奈米纖維，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

[25]如[24]記載之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

[26]如[24]或[25]記載之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

[27]如[24]至[26]中任一項記載之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為幹細胞。

[28]如[27]記載之浮游培養用培養基組合物，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[29]如[27]或[28]記載之浮游培養用培養基組合物，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[30]一種附著性細胞之培養方法，其包括將附著性細胞於包含如下奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養之步驟，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

[31]如[30]記載之培養方法，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

[32]如[30]或[31]記載之培養方法，其中附著性細胞為於浮游培養下

自凝集者。

[33]如[30]至[32]中任一項記載之培養方法，其中附著性細胞為幹細胞。

[34]如[33]記載之培養方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[35]如[33]或[34]記載之培養方法，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[36]如[30]至[35]中任一項記載之培養方法，其進而包括以下之步驟：

(1)不進行將經浮游培養之細胞自具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維剝離之處理，進而添加如[24]至[29]中任一項記載之浮游培養用培養基組合物；及

(2)將步驟(1)中所獲得之混合物供於浮游培養。

[37]一種用以生產細胞分泌物之方法，其包括將附著性細胞於包含如下奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養之步驟，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

[38]如[37]記載之方法，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

[39]如[37]或[38]記載之方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

[40]如[37]至[39]中任一項記載之方法，其中附著性細胞為幹細胞。

[41]如[40]記載之方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[42]如[37]至[41]中任一項記載之方法，其中培養基組合物中之血清之濃度為2%以下。

[43]如[37]至[42]中任一項記載之方法，其中細胞分泌物為選自由低分子化合物、蛋白質、核酸、及細胞分泌囊泡所組成之群中之至少一者。

【0010】 又，於一態樣中，本發明係如下所述。

[1']一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維。

[2']如[1']記載之浮游培養用培養基組合物，其中甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1：0.5～20。

[3']如[1']或[2']記載之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為幹細胞。

[4']如[3']記載之浮游培養用培養基組合物，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[5']如[4']記載之浮游培養用培養基組合物，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[6']一種附著性細胞之培養方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養。

[7']如[6']記載之培養方法，其中培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1：0.5～20。

[8']如[6']或[7']記載之培養方法，其中附著性細胞為幹細胞。

[9']如[8']記載之培養方法，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

[10']如[9']記載之培養方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

[11']如[6']至[10']中任一項記載之培養方法，其進而包括以下之步驟：

(1)不進行將經浮游培養之細胞自甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維剝離之處理，進而添加如[1']至[5']中任一項記載之浮游培養用培養基組合物；及

(2)將步驟(1)中所獲得之混合物供於浮游培養。

[12']一種用以生產細胞分泌物之方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養。

[13']如[12']記載之方法，其中培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖奈米纖維 = 1：0.5~20。

[14']如[12']或[13']記載之方法，其中培養基組合物中之血清之濃度為2%以下。

[15']如[12']至[14']中任一項記載之方法，其中附著性細胞為間葉系幹細胞。

[16']如[12']至[15']中任一項記載之方法，其中細胞分泌物為選自由低分子化合物、蛋白質、核酸、及細胞分泌囊泡所組成之群中之至少一者。

[發明之效果]

【0011】 根據本發明，藉由將附著性細胞以附著於包含非水溶性多糖類之奈米纖維之狀態進行培養，而無需有引起細胞之損傷或功能喪失之風險之振盪或旋轉等操作，可於靜置之狀態下進行浮游培養。又，於使用本發明所培養之附著性細胞為幹細胞之情形時，可高效率地製備以較高等級維持了作為幹細胞之特性(例如，間葉系幹細胞之分化能力或趨化、導向能力等)之高品質之幹細胞。進而，根據本發明，不進行使用胰蛋白酶等蛋白質分解酶之載體與附著於其之細胞之剝離操作，而僅藉由由移液等引起之緩慢攪拌及新鮮之培養基之追加，而能夠簡單地實施培養之規模擴大。其結果為，亦可高效率地生產有用之細胞分泌物。

【圖式簡單說明】

【0012】

圖1係表示使用添加有樣品1(甲殼素奈米纖維)、樣品6(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物)、樣品14(藉由同時解纖而製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維)、或樣品15(N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維(N乙醯基葡萄糖胺量：50%))之培養基組合物將HEK293-IFN β 細胞進行21天浮游培養後之經時性活細胞數之圖。各樣品之4個直條圖自左起分別表示第0天、第7天、第14天、第21天之時間點之活細胞數。

圖2係表示使用添加有各奈米纖維之培養基組合物將HEK293-IFN β 細胞進行浮游培養後之細胞之球體狀態(第8天)的照片。

圖3係表示使用添加有各奈米纖維之培養基組合物將HEK293-IFN β 細胞進行浮游培養後之細胞之球體狀態(第15天)的照片。

圖4係表示使用添加有各奈米纖維之培養基組合物將HEK293-IFN β 細胞進行浮游培養後之細胞之球體狀態(第21天)的照片。

【實施方式】

【0013】 以下，對本發明進行詳述。

【0014】**1.附著性細胞之浮游培養用培養基組合物**

本發明提供一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物(以下，有時稱為「本發明之培養基組合物」)，其包含(1)甲殼素奈米纖維；及(2)聚葡萄糖奈米纖維或多糖類。本發明之培養基組合物藉由含有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類，可不進行攪拌或振盪等操作而將附著性細胞進行浮游培養。

【0015】 本發明中所使用之附著性細胞係存活或增生時需要容器壁等支架之細胞。

【0016】 作為本發明中所使用之附著性細胞，並無特別限定，例如可列舉：幹細胞、前驅細胞、體性非幹細胞、原生培養細胞、細胞株、癌細胞等。所謂幹細胞，係兼具複製自身之能力及分化成其他複數個系統之細胞之能力的細胞。作為附著性之幹細胞之例，雖不限定於以下，但例如可列舉：間葉系幹細胞、神經幹細胞、造血幹細胞、肝臟幹細胞、胰臟幹細胞、肌肉幹細胞、生殖幹細胞、腸道幹細胞、癌幹細胞、毛囊幹細胞等體性幹細胞等。所謂間葉系幹細胞，係具有向骨細胞、軟骨細胞及脂肪細胞全部或幾個之分化能力之幹細胞。間葉系幹細胞於骨髓、末梢血、臍帶血、脂肪組織等組織中以低頻度存在，可自該等組織中利用公知之方法進行單離。所謂前驅細胞，係處於自上述幹細胞向特定之體細胞或生殖細胞分化之中途階段的細胞。作為附著性之前驅細胞之例，雖不限定於以下，但例如可列舉：前驅脂肪細胞、前驅心肌細胞、前驅內皮細胞、神經前驅

細胞、肝前驅細胞、胰腺前驅細胞、腎臟前驅細胞等。作為附著性之體性非幹細胞之例，雖不限定於以下，但例如包含纖維母細胞、骨細胞、骨外被細胞、角質形成細胞、脂肪細胞、間質細胞、上皮細胞、表皮細胞、內皮細胞、血管內皮細胞、肝實質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神經系統細胞、神經膠質細胞、神經元、寡樹突膠細胞、微神經膠質細胞、星形膠質細胞、心臟細胞、食道細胞、肌肉細胞(例如，平滑肌細胞或骨骼肌細胞)、胰腺 β 細胞、黑色素細胞等。所謂原生培養細胞，係指處於接種自活體分離出之細胞或組織並進行第1次繼代之前之培養狀態的細胞。原生培養細胞例如可為自皮膚、腎臟、脾臟、腎上腺、肝臟、肺、卵巢、胰腺、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、脾臟、膀胱、前列腺、睪丸、胸腺、肌肉、結締組織、骨、軟骨、血管組織、血液、心臟、眼、腦或神經組織等任意組織中採取之細胞。所謂細胞株，係指藉由活體外之人為操作而獲得了無限之增生能力之細胞。本發明中所使用之附著性細胞較佳為幹細胞或前驅細胞，更佳為間葉系幹細胞。

【0017】 本發明所使用之附著性細胞之來源並無特別限定，可為源自動物及植物之任一者之細胞。作為動物，並無限定，例如可列舉：魚類、兩栖類、爬蟲類、鳥類、泛甲殼類、六足類、哺乳類等，適宜為哺乳類。作為哺乳類之例，並無限定，可列舉：大鼠、小鼠、兔、豚鼠、松鼠、倉鼠、田鼠、鴨嘴獸、海豚、鯨魚、狗、貓、山羊、牛、馬、綿羊、豬、象、普通狨、松鼠猴、獼猴、黑猩猩、人類等。作為植物，只要所採取之細胞能夠進行液體培養，則無特別限定。例如可列舉：生產天然藥類(例如，皂苷、生物鹼類、小檗鹼、東莨菪苷(Scopolin)、植物固醇等)之植物(例如，藥用人參、長春花、莨菪、黃連、顛茄等)；或生產成為化妝

品、食品原料之色素或多糖體(例如，花青苷、紅花色素、茜草色素、番紅花色素、黃酮類等)之植物(例如，藍莓、紅花、西洋茜草、番紅花等)；或生產醫藥品原料之植物等，並不限定於其等。於本發明中，可適宜地使用哺乳類之附著性細胞。

【0018】 於一態樣中，附著性細胞可為於浮游培養下自凝集者。於浮游培養下自凝集之附著性細胞包含於浮游培養下形成球體之細胞。作為於浮游培養下自凝集之附著性細胞，例如作為體細胞，可列舉HEK293細胞、HeLa細胞、A549細胞等，作為幹細胞，可列舉間葉系幹細胞、前驅脂肪細胞、iPS細胞等。於本發明之一態樣中，關於在浮游培養下自凝集之附著性細胞，作為體細胞，較佳為HEK293細胞、HeLa細胞，作為幹細胞，較佳為間葉系幹細胞、iPS細胞。

【0019】 本發明中所使用之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類係分散於液體培養基中，顯示使附著於該奈米纖維或多糖類之附著性細胞於該液體培養基中浮游之效果。

【0020】 本發明中所使用之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類具有如下效果：與液體培養基混合時，保持一次纖維徑並且該奈米纖維於該液體中分散，實質上不會提高該液體之黏度，而實質上保持附著於奈米纖維之細胞，防止沈澱而附著於培養容器。所謂實質上不會提高液體之黏度，意指液體之黏度不會高於8 mPa·s。此時之該液體之黏度(即，下述本發明之培養基組合物之黏度)為8 mPa·s以下，較佳為4 mPa·s以下，更佳為2 mPa·s以下。包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類之液體之黏度例如可於25°C條件下使用音叉振動式黏度測定(SV-1A、A & D Company Ltd.)進行評價。

【0021】本發明中所使用之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維係包含作為非水溶性多糖類之甲殼素及聚葡萄糖胺糖(即，幾丁質)者。所謂糖類，意指10個以上之單糖類(例如，三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)聚合而成之糖聚合物。

【0022】所謂幾丁質，係指選自由甲殼素及聚葡萄糖胺糖所組成之群中之1種以上之糖類。構成甲殼素及聚葡萄糖胺糖之主要之糖單元分別為N-乙醯基葡萄糖胺及葡萄糖胺，一般而言，將N-乙醯基葡萄糖胺之含量較多且對於酸性水溶液為難溶性者視為甲殼素，將葡萄糖胺之含量較多且對於酸性水溶液為可溶性者視為聚葡萄糖胺糖。本說明書中，為了方便起見，將N-乙醯基葡萄糖胺占構成糖之比例為50%以上者稱為甲殼素，將未達50%者稱為聚葡萄糖胺糖。於一態樣中，N-乙醯基葡萄糖胺占構成甲殼素之糖單元中之比例可為80%以上、90%以上、98%以上、或100%。又，於一態樣中，N-乙醯基葡萄糖胺占構成聚葡萄糖胺糖之糖單元中之比例可為40%以下、30%以下、20%以下、或10%以下。

【0023】作為甲殼素之原料，例如可使用蝦、蟹、昆蟲、貝、蘑菇等多種生物資源。本發明所使用之甲殼素可為源自蟹殼或蝦殼之甲殼素等具有 α 型晶體結構之甲殼素，亦可為源自墨魚殼之甲殼素等具有 β 型晶體結構之甲殼素。蟹或蝦之外殼大多作為產業廢棄物來處理，就獲取容易而且有效利用之觀點而言，作為原料較佳，但為了去除作為雜質所包含之蛋白質或灰分等，需要脫蛋白質步驟及去灰分步驟。因此，於本發明中，較佳為使用已經實施過脫基質處理之純化甲殼素。純化甲殼素係市售。作為本發明所使用之甲殼素奈米纖維之原料，可為具有 α 型及 β 型之任一晶體結構之甲殼素，較佳為 α 型甲殼素。

【0024】 又，聚葡萄糖胺糖可藉由利用將甲殼素於濃鹼(例如，濃NaOH水溶液等)中進行煮沸處理等來進行脫乙酰化而製造。又，聚葡萄糖胺糖亦只要使用市售者即可。

【0025】 藉由將上述甲殼素及聚葡萄糖胺糖進行粉碎(有時亦稱為奈米纖維化或解纖)，可獲得甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維。粉碎方法並無限定，為了微細化至與本發明之目的匹配之纖維徑、纖維長度，較佳為高壓均質機、磨碎機器(石臼)、或者珠磨機等介質攪拌磨機等可獲得較強剪力之方法。本發明中所使用之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物可藉由將分別解纖過之甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維進行混合而製備，亦可藉由將甲殼素粉末與聚葡萄糖胺糖粉末進行混合，將該混合物同時進行解纖而製備。

【0026】 其等中，較佳為使用高壓均質機進行微細化，例如較理想為使用如日本專利特開2005-270891號公報或日本專利第5232976號所揭示之濕式粉碎法進行微細化(粉碎化)。具體而言，係自一對噴嘴以高壓分別噴射分散有原料之分散液以使其等衝突，藉此將原料進行粉碎，例如可藉由使用StarBurst(SUGINO MACHINE(股)製造之高壓粉碎裝置)或NanoVater(吉田機械興業(股)之高壓粉碎裝置)而實施。

【0027】 使用上述高壓均質機將原料進行微細化(粉碎化)時，微細化或均質化之程度係依存於高壓均質機之向超高壓腔室壓送之壓力、通過超高壓腔室之次數(處理次數)、及水分散液中之原料之濃度。壓送壓力(處理壓力)並無特別限定，通常為50~250 MPa，較佳為100~200 MPa。

【0028】 又，微細化處理時之水分散液中之原料之濃度並無特別限

定，通常為0.1質量%~30質量%，較佳為1質量%~10質量%。微細化(粉碎化)之處理次數並無特別限定，雖亦取決於上述水分散液中之原料之濃度，但於原料之濃度為0.1~1質量%之情形時，雖於處理次數為10~100次左右時得到充分微細化，但若為1~10質量%，則有需要10~1000次左右之情形。

【0029】 上述微細化處理時之水分散液之黏度並無特別限制，例如於 α 甲殼素之情形時，該水分散液之黏度之範圍為1~100 mPa·S，較佳為1~85 mPa·S(基於25°C條件下之音叉振動式黏度測定(SV-1A、A & D Company Ltd.)所得)。又，於聚葡萄糖胺糖之情形時，該水分散液之黏度之範圍為0.7~30 mPa·S，較佳為0.7~10 mPa·S(基於25°C條件下之音叉振動式黏度測定(SV-1A、A & D Company Ltd.))。又，微細化處理時之水分散液中之甲殼素或聚葡萄糖胺糖之粒徑亦無特別限制，例如於 α 甲殼素之情形時，該水分散液中之 α 甲殼素之平均粒徑之範圍為0.5~200 μm ，較佳為30~150 μm (基於雷射繞射/散射式粒徑分佈測定裝置LA-960(堀場製作所))。又，於聚葡萄糖胺糖之情形時，該水分散液中之聚葡萄糖胺糖之平均粒徑之範圍為0.5~300 μm ，較佳為50~100 μm (基於雷射繞射/散射式粒徑分佈測定裝置LA-960(堀場製作所))。

【0030】 關於奈米纖維之製備方法，係記載於WO2015/111686A1等中。

【0031】 於本發明之培養基組合物中可添加多糖類。於本說明書中，所謂多糖類，意指10個以上之單糖類(例如，三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)聚合而成之糖聚合物。

【0032】 作為非水溶性多糖類，可列舉纖維素、半纖維素等纖維素

類；甲殼素、聚葡萄糖等幾丁質等，但並不限定於其等。

【0033】 作為水溶性多糖類，可列舉具有陰離子性之官能基之酸性多糖類。作為具有陰離子性之官能基之酸性多糖類，並無特別限制，例如可列舉：於結構中具有糖醛酸(例如，葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸)之多糖類；於結構中具有硫酸或磷酸之多糖類、或具有該兩種結構之多糖類等。更具體而言，例示包含選自由玻尿酸、結冷膠、脫醯化結冷膠、鼠李聚糖膠(rhamsan gum)、迪特膠(diutan gum)、三仙膠、鹿角菜膠、黃原膠、己醣醛酸、褐藻糖膠、果膠、果膠酸、果膠酯酸、硫酸乙醯肝素、肝素、硫酸類肝素(heparitin sulfate)、硫酸角質、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸鼠李聚糖(rhamnan sulfate)、海藻酸及其等之鹽所組成之群中之1種或2種以上者。

【0034】 作為此處所指之鹽，可列舉：鋰、鈉、鉀等鹼金屬之鹽；鈣、鋇、鎂等鹼土金屬之鹽；鋁、鋅、銅、鐵等之鹽；銨鹽；四乙基銨、四丁基銨、甲基三丁基銨、鯨蠟基三甲基銨、苜基甲基己基癸基銨、膽鹼等四級銨鹽；與吡啶、三乙胺、二異丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、胺丁三醇、葡甲胺、普魯卡因、氯普魯卡因等有機胺之鹽；與甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸等胺基酸之鹽等。

【0035】 於一態樣中，作為多糖類，可較佳地使用甲基纖維素、脫醯化結冷膠、海藻酸、三仙膠、鹿角菜膠、迪特膠(diutan gum)、刺槐豆膠、羅望子膠、果膠、及羧甲基纖維素或其等之鹽。

【0036】 為了於本發明之培養基組合物中發揮所需之效果，甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之調配比例可能重要。首先，將甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維以比率(重量)計甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖

糖奈米纖維 = 1 : 0.5 ~ 20(較佳為甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1 : 0.5 ~ 10、更佳為甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1 : 0.7 ~ 9、進而較佳為甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1 : 1 ~ 8、進而更佳為甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1 : 2 ~ 7、尤佳為甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維 = 1 : 3 ~ 6)進行摻合。可將所獲得之甲殼素奈米纖維/聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物以培養基組合物中所含有之總奈米纖維(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維)之濃度成為通常0.0001 ~ 0.2%(w/v)、較佳為0.0005 ~ 0.1%(w/v)、進而較佳為0.001 ~ 0.05%(w/v)、尤佳為0.006 ~ 0.05%(w/v)之方式調配於液體培養基中。或者，亦可藉由於液體培養基中分別添加所需量之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維並充分進行攪拌而製備本發明之培養基組合物。於一態樣中，本發明之培養基組合物關於奈米纖維之濃度，滿足以下之條件：

(1)培養基組合物中所含有之總奈米纖維(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維)之濃度為0.0001 ~ 0.2%(w/v)，且該培養基組合物中所含有之甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維之重量比為1 : 0.5 ~ 20(較佳為1 : 0.5 ~ 10、1 : 0.7 ~ 9、1 : 1 ~ 8、1 : 2 ~ 7、或1 : 3 ~ 6)；

(2)培養基組合物中所含有之總奈米纖維(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維)之濃度為0.0005 ~ 0.1%(w/v)，且該培養基組合物中所含有之甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維之重量比為1 : 0.5 ~ 20(較佳為1 : 0.5 ~ 10、1 : 0.7 ~ 9、1 : 1 ~ 8、1 : 2 ~ 7、或1 : 3 ~ 6)；

(3)培養基組合物中所含有之總奈米纖維(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維)之濃度為0.001 ~ 0.05%(w/v)，且該培養基組合物中所含有之甲殼素奈米纖維 : 聚葡萄糖胺糖奈米纖維之重量比為1 : 0.5 ~ 20(較佳為1 :

0.5~10、1：0.7~9、1：1~8、1：2~7、或1：3~6)；

或者

(4)培養基組合物中所含有之總奈米纖維(甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維)之濃度為0.006~0.05%(w/v)，且該培養基組合物中所含有之甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維之重量比為1：0.5~20(較佳為1：0.5~10、1：0.7~9、1：1~8、1：2~7、或1：3~6)。

【0037】又，於使用甲殼素奈米纖維與多糖類之情形時，可例示以下之濃度，但並不限定於其等：

甲殼素奈米纖維：甲基纖維素 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0004~0.4(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.04%(w/v))

甲殼素奈米纖維：脫醯化結冷膠 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0001~0.1(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.01%(w/v))

甲殼素奈米纖維：海藻酸鈉 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0004~0.4(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.04%(w/v))

甲殼素奈米纖維：羅望子膠 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0004~0.4%(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.04%(w/v))

甲殼素奈米纖維：果膠 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0004~0.4%(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.04%(w/v))

甲殼素奈米纖維：羧甲基纖維素 = 0.0005~0.1%(w/v)：0.0004~0.4%(w/v)(更佳為0.001~0.05%(w/v)：0.001~0.04%(w/v))

【0038】又，認為為了獲得本發明之所需效果，甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之調配比例較為重要這一事實提示了甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維中之經乙醯化之葡萄糖胺之總量較為重要，但不希

望受限於理論。因此，於本發明之一態樣中，亦能夠代替使用甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之2種奈米纖維之混合物，而使用由具有與該2種奈米纖維混合物中之乙醯基數對應之乙醯基數之乙醯化度得到最佳化之單一聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺所製備的奈米纖維(以下，有時稱為「N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維」等)。因此，本發明於一態樣中，亦提供一種包含具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維之附著性細胞之浮游培養用培養基。作為該聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺之特定之乙醯化度，可為通常5~70%、較佳為9~70%、更佳為11~55%、進而較佳為14~50%、進而較佳為16~50%、尤佳為22~33%，但只要可獲得所需之效果，則並不限定於其等。

【0039】 如上所述之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺可藉由本身公知之方法進行製造。作為一例，可列舉如下方法：藉由將乙醯化之比例相對較高(例如90%以上)之甲殼素於鹼(例如濃NaOH水溶液等)中進行煮沸處理等而進行脫乙醯化，藉此製造具有所需之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺，但並不限定於此方法。

【0040】 將如此獲得之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺藉由上述方法進行微細化(有時亦稱為奈米纖維化或解纖)，藉此可製備具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維。

【0041】 於本發明之一態樣中，可將N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維添加至液體培養基組合物中。關於N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維於液體培養基組合物中之濃度，可以培養基組合物中所含有之該奈米纖維之濃度成為通常0.0001~0.2%(w/v)、較佳為0.0005~

0.1%(w/v)、進而較佳為0.001~0.1%(w/v)、尤佳為0.006~0.06%(w/v)之方式添加至液體培養基中，但只要可獲得所需之效果，則並不限定於其等。

【0042】本發明之培養基組合物中所包含之培養基能夠根據所使用之附著性細胞之種類等而適當選擇，例如於以哺乳類之附著性細胞之培養為目的之情形時，可使用哺乳類細胞之培養一般所使用之培養基作為本發明之培養基組合物所含有之培養基。作為哺乳類細胞用之培養基，例如可列舉：達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium；DMEM)、Ham's F12培養基(Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培養基、McCoy's 5A培養基(McCoy's 5A medium)、伊格爾MEM培養基(Eagle's Minimum Essential Medium(伊格爾最低必需培養基)；EMEM)、 α MEM培養基(alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium(α 改良伊格爾最低必需培養基)； α MEM)、MEM培養基(Minimum Essential Medium，最低必需培養基)、RPMI1640培養基、伊斯科夫改良達爾伯克培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium；IMDM)、MCDB131培養基、威廉培養基E、IPL41培養基、Fischer's培養基、StemPro34(Invitrogen公司製造)、X-VIVO 10(Cambrex公司製造)、X-VIVO 15(Cambrex公司製造)、HPGM(Cambrex公司製造)、StemSpan H3000(STEMCELL Technologies公司製造)、StemSpanSFEM(STEMCELL Technologies公司製造)、StemlineII(Sigma-Aldrich公司製造)、QBSF-60(Quality Biological公司製造)、StemProhESCSFM(Invitrogen公司製造)、mTeSR1或2培養基(STEMCELL Technologies公司製造)、Sf-900II(Invitrogen公司製造)、

Opti-Pro(Invitrogen公司製造)等。

【0043】於上述培養基中，業者亦可視目的而自由地添加鈉、鉀、鈣、鎂、磷、氯、各種胺基酸、各種維生素、抗生素、血清、脂肪酸、糖等。於培養哺乳類細胞時，業者亦可視目的而將一種以上之其他化學成分或生物成分組合來添加。作為可添加於哺乳類細胞用之培養基中之成分，可列舉：胎牛血清、人類血清、馬血清、胰島素、轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、膽固醇、乙醇胺、亞硒酸鈉、單硫甘油、2-巰基乙醇、牛血清白蛋白、丙酮酸鈉、聚乙二醇、各種維生素、各種胺基酸、瓊脂、瓊脂糖、膠原蛋白、甲基纖維素、各種細胞激素、各種激素、各種生長因子、各種細胞外基質或各種細胞附著分子等。作為可添加於培養基中之細胞激素，例如可列舉：介白素-1(IL-1)、介白素-2(IL-2)、介白素-3(IL-3)、介白素-4(IL-4)、介白素-5(IL-5)、介白素-6(IL-6)、介白素-7(IL-7)、介白素-8(IL-8)、介白素-9(IL-9)、介白素-10(IL-10)、介白素-11(IL-11)、介白素-12(IL-12)、介白素-13(IL-13)、介白素-14(IL-14)、介白素-15(IL-15)、介白素-18(IL-18)、介白素-21(IL-21)、干擾素- α (IFN- α)、干擾素- β (IFN- β)、干擾素- γ (IFN- γ)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、單核球群落刺激因子(M-CSF)、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、幹細胞因子(SCF)、flk2/flt3配體(FL)、白血病細胞阻害因子(LIF)、腫瘤抑制素M(OM)、紅血球生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)等，但並不限於其等。

【0044】作為可添加於培養基中之激素，可列舉：抑黑素(melatonin)、血清素、甲狀腺素、三碘甲狀腺素(triiodothyronine)、腎上腺素、去甲腎上腺素、多巴胺、抗苗勒氏管激素(anti-

mullerianhormone)、脂聯素、腎上腺皮質刺激激素、血管收縮素原及血管緊張素、抗利尿激素、心房利尿鈉肽、抑鈣素、膽囊收縮素、促腎上腺皮質釋放激素、紅血球生成素、卵胞刺激激素、胃泌素、饑餓素、胰高血糖素、激性腺素釋放素、生長素釋放素、人類絨毛膜激性腺素、人類胎盤生乳素、生長激素、抑制素、胰島素、類胰島素生長因子、瘦體素、促黃體素、促黑素細胞素、催產素、副甲狀腺激素、泌乳素、胰泌素、生長抑素、血小板生成素、促甲狀腺素、促甲狀腺素釋放素、皮質醇、醛固酮、睪固酮、去氫表雄固酮、雄固烯二酮、二氫睪固酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、黃體素、促鈣三醇、促鈣二醇、前列腺素、白三烯、前列腺環素、凝血脂素、促泌乳素釋放素、促脂素、腦利尿鈉肽、神經肽Y、組織胺、內皮素、胰多肽、腎素、及腦啡肽，但並不限於其等。

【0045】 作為可添加於培養基中之生長因子，可列舉：轉化生長因子- α (TGF- α)、轉化生長因子- β (TGF- β)、巨噬細胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)、上皮細胞生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子-1、2、3、4、5、6、7、8、或9(FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神經細胞生長因子(NGF)、肝細胞生長因子(HGF)、白血病抑制因子(LIF)、蛋白酶連結素I、蛋白酶連結素II、血小板源性生長因子(PDGF)、膽鹼能分化因子(CDF)、趨化因子、Notch配體(Delta1等)、Wnt蛋白、血管生成素樣蛋白2、3、5或7(Angpt2、3、5、7)、類胰島素生長因子(IGF)、類胰島素生長因子結合蛋白(IGFBP)、多效生長因子(Pleiotrophin)等，但並不限於其等。

【0046】 又，亦可添加藉由基因重組技術而人為地修飾該等細胞激素或生長因子之胺基酸序列而成者。作為其例，可列舉：IL-6/可溶性IL-

6受體複合體或Hyper IL-6(IL-6與可溶性IL-6受體之融合蛋白質)等。

【0047】 作為各種細胞外基質或各種細胞附著分子之例，可列舉：膠原蛋白I至XIX、纖維黏連蛋白、層黏連蛋白-1至12、氮(nitrogen)、肌腱蛋白、血小板反應素(thrombospondin)、血管性血友病(von Willebrand)因子、骨調素、血纖維蛋白原、各種彈力蛋白、各種蛋白多糖、各種鈣黏素、橋粒芯膠蛋白、橋粒芯糖蛋白、各種整合素、E-選擇素、P-選擇素、L-選擇素、免疫球蛋白超家族、基質膠(matrigel)、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、甲殼素、聚葡萄糖胺糖、瓊脂糖凝膠(sepharose)、玻尿酸、海藻酸凝膠、各種水凝膠、進而其等之斷裂片段等。

【0048】 作為可添加於培養基中之抗生素之例，可列舉：磺胺製劑、青黴素、非奈西林、二甲氧苯青黴素、苯唑西林、氯唑西林、雙氯西林、氟氯西林、乙氧萘青黴素、安比西林、青黴素、阿莫西林、環己西林、羧苄青黴素、替卡西林、哌拉西林、阿洛西林、美洛西林、美西林、Andinocillin、頭孢菌素及其衍生物、歐索林酸、氨氟沙星、替馬沙星、萘啶酸、吡咯酸、環丙沙星、西諾沙星、諾氟沙星、培氟沙星(perfloxacin)、rosaxacin、氟嗟酸、依諾沙星、吡哌酸、舒巴坦、克拉維酸、 β -溴代青黴烷酸、 β -氯代青黴烷酸、6-乙醯基亞甲基-青黴烷酸、頭孢噁唑、Sultampicillin、adinocillin及舒巴坦之甲醛水合酯(formaldehyde hydrate ester)、他唑巴坦、氨曲南、磺醯胺菌素、異磺醯胺菌素、諾卡殺菌素、苯基乙醯胺磷酸甲酯、氯四環素、氧四環素、四環素、去甲金黴素、多西環素、美他環素、以及二甲胺四環素。

【0049】 再者，如上所述，於本發明之培養基組合物中亦可添加血清及/或血清代替物，但只要使用本發明之培養基組合物，則即便將培養

基中之血清及/或血清代替物設為較通常使用之濃度(例、10重量%)低之濃度，亦能夠實現細胞之維持及/或擴大。添加於本發明之培養基組合物中之血清之濃度只要根據細胞之種類、培養條件、培養目的等而適宜設定即可，作為一態樣，本發明之培養基組合物中之血清(及/或血清代替物)之濃度可設為15重量%以下、10重量%以下、9重量%以下、8重量%以下、7重量%以下、6重量%以下、5重量%以下、4重量%以下、3重量%以下、2重量%以下、1重量%以下、0.9重量%以下、0.8重量%以下、0.7重量%以下、0.6重量%以下、0.5重量%以下、0.4重量%以下、或0.3重量%以下。再者，血清之濃度於培養期間中可設為一定之濃度，亦可視需要於培養基更換時等增減濃度。

【0050】 於一態樣中，於細胞培養之目的為再生醫療用之細胞分泌物之生產等的情形時，有為了降低血清風險，較佳為將本發明之培養基組合物中之血清濃度設定為較低之情形。於該態樣中，本發明之培養基組合物中之血清之濃度例如可設為2重量%以下、1重量%以下、0.9重量%以下、0.8重量%以下、0.7重量%以下、0.6重量%以下、0.5重量%以下、0.4重量%以下、或0.3重量%以下。

於另一態樣中，於在低血清濃度下使維持、擴大培養之細胞數最大化之情形時，血清濃度可設為通常0.05~2.0重量%、較佳為0.1~2.0重量%、進而較佳為0.2~2.0重量%、尤佳為0.2~1.0重量%。

【0051】 又，於另一態樣中，作為使細胞分泌物之產量最大化之情形時之血清濃度之範圍，可設為通常0.05~2.0重量%、較佳為0.1~1.5重量%、進而較佳為0.2~0.9重量%、尤佳為0.4~1.0重量%。

【0052】 再者，關於在低血清培養基中對細胞進行維持培養及/或擴

大培養之期間，只要視細胞之種類、培養條件、或培養目的而適宜設定即可，例如可設為1天以上、3天以上、5天以上、7天以上、9天以上、11天以上、13天以上、15天以上、20天以上、25天以上、30天以上、40天以上、50天以上、60天以上、80天以上、或100天以上。

於一態樣中，培養期間可設為1~200天、1~100天、1~80天、1~60天、1~50天、1~40天、1~30天、1~25天、1~20天、1~15天、1~13天、1~11天、1~9天、1~7天、1~5天、或1~3天。於更佳之一態樣中，培養期間可設為較佳為10~60天、更佳為15~50天、進而較佳為20天~50天、尤佳為25天~40天。

【0053】 於使用該培養基組合物將附著性細胞供於浮游培養之情形時，以成為可使該附著性細胞浮游(較佳為浮游靜置)之濃度之方式將上述甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類與適當之液體培養基加以混合，藉此可製造上述本發明之培養基組合物。

【0054】 於較佳之態樣中，藉由將上述甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類之於水性溶劑中之分散液、與液體培養基加以混合，可製備本發明之培養基組合物。該分散液亦可經殺菌(高壓釜、伽瑪射線殺菌等)。或者，亦可於將該分散液、與使粉末培養基溶解於水中所製備之液體培養基(培養基之水溶液)加以混合後，進行殺菌來使用。該分散液與液體培養基之殺菌亦可於混合之前分開進行。作為水性溶劑之例，可列舉水、二甲基亞砷(DMSO)等，但並不限於其等。作為水性溶劑，較佳為水。於水性溶劑中亦可含有適當之緩衝劑或鹽。上述奈米纖維之分散液係作為用以製備本發明之培養基組合物之培養基添加劑有用。

【0055】 混合比率並無特別限定，奈米纖維之分散液：液體培養基

(培養基之水溶液)(體積比)係通常1：99～99：1、較佳為10：90～90：10、更佳為20：80～80：20。

【0056】於本發明中，所謂細胞之浮游，係指細胞未附著於培養容器之狀態(非附著)，不管細胞是否沈澱。進而，於本發明中，將培養細胞時不伴有對於液體培養基組合物之來自外部之壓力或振動或者於該組合物中之振盪、旋轉操作等，細胞於該液體培養基組合物中分散而且處於浮游狀態的狀態稱為「浮游靜置」，將於該狀態下對細胞及/或組織進行培養稱為「浮游靜置培養」。作為「浮游靜置」中可浮游之期間，為至少5分鐘以上、較佳為1小時以上、24小時以上、48小時以上、6天以上、21天以上，但只要保持浮游狀態，則並不限定於該等期間。

【0057】於較佳之態樣中，本發明之培養基組合物於能夠實現細胞培養之溫度範圍(例如0～40℃)之至少一個溫度下，能夠實現細胞之浮游靜置。本發明之培養基組合物於較佳為25～37℃之溫度範圍之至少1個溫度下、最佳為於37℃下能夠實現細胞之浮游靜置。

【0058】藉由將附著性細胞於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行培養，可對附著性細胞進行浮游培養。該浮游培養可藉由於上述本發明之培養基組合物中對附著性細胞進行培養而實施。甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類顯示出使附著於該奈米纖維或多糖類之細胞於培養基中浮游之效果(較佳為浮游靜置之效果)。於本發明之培養基組合物中，甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類既不會溶解，亦不會附著於培養容器而分散，因此若於該培養基組合物中培養附著性細胞，則附著性細胞附著於該奈米纖維或多糖類而於該培養基組合物中浮游。藉由該浮游效果，與單層培養相比，能夠增加

每一定體積之細胞數而培養。又，於先前伴隨旋轉或振盪操作之浮游培養中，由於對於細胞之剪力發揮作用，故而有細胞之增生率或回收率較低、或有損細胞之功能之情形，但藉由使用本發明之培養基組合物，可無需振盪等操作而將細胞以分散之狀態進行培養，因此可期待將目標之附著性細胞於無細胞功能損失之情況下容易且大量地進行浮游培養。又，於先前包含凝膠基材之培養基中對細胞進行浮游培養時，有細胞之觀察或回收困難、或於回收時細胞功能有損之情形，但藉由使用本發明之培養基組合物，可期待對經浮游培養之細胞於無細胞功能損失之情況下進行觀察並回收。又，先前包含凝膠基材之培養基有黏度較高而培養基之更換困難之情形，但本發明之培養基組合物為低黏度，因此可期待使用移液管或泵等而容易地更換培養基。

【0059】 於使用甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類對附著性細胞進行浮游培養之情形時，只要對於本發明之培養基組合物添加另外製備之附著性細胞並均一地進行混合即可。此時之混合方法並無特別限制，例如可列舉：移液等手動之混合；使用攪拌器、VORTEX攪拌器、微量盤攪拌器、振盪器等機器之混合。混合後，可將所獲得之細胞懸浮液於靜置狀態下進行培養，亦可視需要一面進行旋轉、振盪或攪拌一面進行培養。其轉數及頻度只要視業者之目的而適宜設定即可。例如，將附著性細胞繼代培養後進行回收，使用適當之細胞解離液進行分散直至單一細胞、或接近其之狀態，使分散之附著性細胞於本發明之培養基組合物中懸浮，將其供於浮游培養(較佳為浮游靜置培養)。

【0060】 關於培養細胞時之溫度，若為動物細胞，則為通常25~39℃、較佳為33~39℃(例如37℃)。CO₂濃度通常於培養之氛圍中為4~10

體積%，較佳為4~6體積%。培養期間只要視培養之目的而適宜設定即可。

【0061】於本發明之培養基組合物中之附著性細胞之培養可使用細胞培養一般所使用之培養皿、燒瓶、塑膠袋、鐵氟龍(註冊商標)袋、皿、陪替氏培養皿、組織培養用皿、Multidish、微量盤、微孔培養盤、多培養盤(multiplate)、多孔培養盤(multi well plate)、腔室載玻片(Chamber Slide)、管、托盤、培養袋、旋轉瓶等培養容器來實施。該等培養容器較理想為細胞低附著性，即附著於奈米纖維之附著性細胞不會附著於培養容器。作為細胞低附著性之培養容器，可使用培養容器之表面未以提高與細胞之附著性為目的而經人工處理(例如，利用細胞外基質等之塗佈處理)者、或者培養容器之表面以降低與細胞之附著性為目的而經人工處理者。

【0062】於需要培養基更換時，藉由進行離心或過濾處理將細胞分離後，向該細胞添加新鮮之培養基或本發明之培養基組合物即可。或者，藉由進行離心或過濾處理將細胞適宜濃縮後，將新鮮之培養基或本發明之培養基組合物添加於該濃縮液中即可。例如，離心時之重力加速度(G)為100至400 G，進行過濾處理時所使用之過濾器之細孔之大小為10 μm 至100 μm ，但並不限於其等。

【0063】附著性細胞之培養亦可於機械控制下在閉鎖環境下自動執行細胞接種、培養基更換、細胞圖像取得、培養細胞回收，一面控制pH值、溫度、氧濃度等，一面藉由能夠以高密度進行培養之生物反應器或自動培養裝置來進行。

【0064】若將附著性細胞於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行浮游培養，則附著性細胞高效率地增生，因

此該浮游培養作為附著性細胞之增生方法優異。若將附著性細胞於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行浮游培養，則附著性細胞不會僅偏集存在於培養容器之底面，而立體擴散地分散從而增生得到促進。其結果為，增生之細胞成為於奈米纖維或多糖類上連成葡萄串之狀態。關於該增生促進效果，為了使附著性細胞浮游(即，避免附著性細胞附著於培養容器)，只要於培養基組合物中含有充分濃度之奈米纖維即可，並非必須能夠實現浮游靜置(即，不伴有來自外部之壓力、振動、振盪、旋轉操作等而細胞於液體培養基組合物中均一地分散而且處於浮游狀態)。

【0065】 於將附著性細胞於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行浮游培養而使該細胞增生之情形時，作為該浮游培養所使用之本發明之培養基組合物中所含有之培養基，使用可一面維持該附著性細胞之形質一面使該細胞增生之培養基。關於該培養基，若為業者，則可視附著性細胞之種類而適宜地選擇。

【0066】 於一態樣中，藉由將哺乳動物之幹細胞(例如間葉系幹細胞)於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行浮游培養而使該細胞增生。藉由該浮游培養，可一面使哺乳動物之幹細胞(例如間葉系幹細胞)增生一面維持其分化能力或導向、趨化能力。因此，若使用本發明之培養基組合物，則可製備高品質之幹細胞。再者，幹細胞是否維持分化能力或趨化能力等特性可藉由本身公知之方法來辨別。簡單來說，可藉由以mRNA等級及/或蛋白質量等來確定幹細胞中之與未分化性相關之細胞標記物(例如OCT4基因、SOX2基因、NANOG基因等)、或與趨化性相關之細胞標記物(例如CXCR4基因等)之表現量而容易

地辨別。

【0067】 於將附著性細胞於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類之狀態下進行浮游培養之情形時，無需自培養容器剝離細胞之操作，而僅將新鮮之培養基或本發明之培養基組合物添加於該浮游培養物中，或者僅向新鮮之培養基或本發明之培養基組合物添加該浮游培養物之全部或一部，藉此能夠將附著性細胞繼代。藉由使用該繼代培養方法，可不進行自培養容器剝離細胞之操作而將附著性細胞進行繼代培養。又，藉由使用該繼代培養方法，可不進行自培養容器剝離細胞之操作而擴大附著性細胞之培養規模。作為自培養容器剝離細胞之操作，可列舉：利用螯合劑(例如EDTA)及/或蛋白質分解酶(例如胰蛋白酶、膠原酶)之處理。上述繼代培養方法係有利於對於自培養容器剝離細胞之操作敏感性較高之附著性細胞(例如，藉由剝離操作而存活性降低之附著性細胞、藉由剝離操作而容易轉形之附著性細胞)之繼代培養。作為對於自培養容器剝離細胞之操作敏感性較高之附著性細胞，可列舉幹細胞(例如間葉系幹細胞)、前驅細胞(例如前驅脂肪細胞)、原生培養細胞等，但並不限定於其等。

【0068】 使用本發明之培養基組合物所增生之附著性細胞可藉由使用殼質酶、殼二糖酶、殼聚糖酶、 β -1,3-葡聚糖酶等分解酶之1種以上使甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維分解，而使該奈米纖維與附著性細胞剝離後進行回收。再者，Yatalase(Takara-bio)係包含殼質酶、殼二糖酶、殼聚糖酶、及 β -1,3-葡聚糖酶之混合物，可適宜地用作甲殼素及聚葡萄糖之分解酶。

【0069】 例如，對於附著於甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維

之附著性細胞之懸浮液，添加甲殼素及聚葡萄糖胺糖之分解酶，將混合物保溫對於附著性細胞之剝離而言充分之時間。利用甲殼素及聚葡萄糖胺糖之分解酶之培養溫度通常為 $20^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 。培養時間亦取決於酶之種類等，但通常為5～60分鐘。

【0070】 奈米纖維分解而附著性細胞自奈米纖維剝離後，將懸浮液供於離心分離，藉此可回收剝離之附著性細胞。

【0071】 如此回收之附著性細胞由於損傷被抑制為最小限度，故而可適宜地用於功能分析、或移植等。

【0072】

2.附著性細胞之培養方法

又，本發明提供一種附著性細胞之培養方法(以下，有時稱為「本發明之培養方法」)，其包括將附著性細胞於含有(1)甲殼素奈米纖維；及(2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類之培養基組合物中進行浮游培養之步驟。

【0073】 本發明之培養方法之特徵在於：使用上述本發明之培養基組合物對附著性細胞進行培養。因此，本發明之培養方法中之培養基組合物、附著性細胞、培養條件等係與本發明之培養基組合物中所說明者相同。再者，如上所述，使用甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之態樣亦可使用N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維代替上述2種奈米纖維。

【0074】

3.生產細胞分泌物之方法

又，本發明提供一種生產細胞分泌物之方法(以下，有時稱為「本發明之生產方法」)，其包括將附著性細胞於含有(1)甲殼素奈米纖維；及(2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類之培養基組合物中進行浮游培養之步驟。再

者，如上所述，使用甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之態樣亦可使用N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維代替上述2種奈米纖維。

【0075】 本發明之生產方法之特徵在於：使用上述本發明之培養基組合物對附著性細胞進行培養。因此，本發明之培養方法中之培養基組合物、附著性細胞、培養條件等係與本發明之培養基組合物中所說明者相同。

【0076】 本發明之生產方法中所使用之附著性細胞只要為生產細胞分泌物者，則無特別限定，於一態樣中，附著性細胞可為間葉系幹細胞。再者，該間葉系幹細胞之來源可為骨髓、脂肪細胞、臍帶、及齒髓等之任一者。

【0077】 本發明之生產方法中之細胞分泌物可包含低分子化合物、蛋白質、核酸(miRNA或mRNA等)、及細胞分泌囊泡(參照以下)等細胞所分泌之所有物質。

【0078】 關於藉由本發明之生產方法所生產之細胞分泌物，例如可列舉：前列腺素E2(PGE2)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、腫瘤壞死因子誘導基因6(Tumor necrosis factor-stimulated gene-6, TSG-6)、血管內皮生長因子(VEGF)、吲哚胺-2,3-雙加氧酶(IDO)、轉化生長因子 β (TGF- β)、肝細胞生長因子(HGF)、類胰島素生長因子(IGF)、腦源性神經營養因數(BDNF)、神經生長因子(NGF)、血管生成素-1等，但並不限定於其等。

【0079】 於本說明書中，所謂細胞分泌囊泡，典型而言，意指自細胞釋出之具有可藉由電子顯微鏡進行確認之尺寸之囊泡。該細胞分泌囊泡之尺寸以平均粒徑計，可為1~1,000 nm、10~500 nm、或30~200

nm。此處，所謂平均粒徑，係基於利用動態光散射法或電子顯微鏡之測定之各粒子之直徑的平均值。該細胞分泌囊泡可包含包圍生物分子之脂質雙層。

【0080】 作為該細胞分泌囊泡之具體例，例如可列舉：膜粒子、膜囊泡、微囊泡、奈米囊泡、微小囊泡體(microvesicles，平均粒徑30~1,000 nm)、外泌體樣囊泡、外泌體(exosome，平均粒徑30~200 nm)、核外粒體樣囊泡、核外粒體(ectosome)或exovesicle等，但並不限定於其等。於本發明之生產方法之較佳一態樣中，細胞分泌囊泡為外泌體。

【0081】 再者，於本發明之生產方法之一態樣中，亦可添加用以開始及/或促進細胞分泌物之生產之化合物。用以開始及/或促進細胞分泌物之生產之化合物只要依照欲生產之細胞分泌物而選擇公知者即可。於該化合物中包含TNF- α 、IFN- γ 、及介白素-1 β (IL-1 β)，但並不限定於其等。作為一例，於細胞分泌物為PGE2或TSG-6之情形時，可適宜地將TNF- α 添加於培養基組合物中。又，於細胞分泌物為PGE2或IDO之情形時，可適宜地將IFN- γ 添加於培養基組合物中。再者，關於用以開始及/或促進細胞分泌物之生產之化合物向培養基組合物之添加濃度，只要可獲得所需之效果，則無特別限定，只要基於欲生產之細胞分泌物與該化合物之組合等而適宜決定即可。

又，於本發明之生產方法之另一態樣中，為了增加細胞分泌物之生產量，亦可適當地使本發明之生產方法中所使用之細胞或培養條件最佳化。作為一例，有適宜將於低氧條件下暴露過之附著細胞(例如間葉系幹細胞)用於本發明之製造方法之情形(參照J Cell Mol Med. 2018 Mar; 22(3): 1428-1442)。細胞及/或培養條件之上述最佳化亦可使用本身公知之

任意技術。

【0082】於以下之實施例中對本發明進一步具體地進行說明，但本發明並不受該等例任何限定。

實施例

【0083】

(試驗例1：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之3D培養中之源自人類脂肪組織之間葉系幹細胞的增生)

使依據WO2015/111686所揭示之製造方法所製備之 α 甲殼素奈米纖維(N-乙醯基葡萄糖胺之比例：95%以上)或聚葡萄糖胺糖奈米纖維(N-乙醯基葡萄糖胺之比例：20%以下)(生質奈米纖維BiNFi-S 2質量%，SUGINO MACHINE股份有限公司)以成為1%(w/v)之方式於超純水(Milli-Q水)中懸浮後，藉由倒置溶混進行分散，將本水溶液於121°C下進行20分鐘高壓釜殺菌。所使用之 α 甲殼素奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之 α 甲殼素奈米纖維(樣品1)。又，聚葡萄糖胺糖奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之聚葡萄糖胺糖奈米纖維(樣品2)。進而，以樣品1與樣品2之比率(體積)成為50%：50%(樣品3)、33%：67%(樣品4)、25%：75%(樣品5)、20%：80%(樣品6)、15%：85%(樣品7)、10%：90%(樣品8)、5%：95%(樣品9)、1%：99%(樣品10)之方式將樣品1與樣品2進行混合，而獲得甲殼素奈米纖維/聚葡萄糖胺糖奈米纖維混合物(樣品3~10)。

【0084】製備將上述中所獲得之樣品1~10以各種最終濃度(最終濃度：0.0006%(w/v)、0.002%(w/v)、0.006%(w/v)、0.02%(w/v))添加於作為血清培養基之間葉系幹細胞增生培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製

造)中而成之培養基組合物、以及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品11)。接下來，使所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為13333細胞/mL之方式於上述各培養基組合物中懸浮後，以150 μ L/孔接種至96孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3474)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養10天。對於接種後第4天、第8天之時間點之培養液，添加ATP試劑150 μ L(CellTiter-Glo™ 發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(3點之平均值)。

【0085】其結果為，若使用包含 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之培養基組合物，將源自人類脂肪之間葉系幹細胞於96孔平底超低附著表面微量盤中進行培養，則當培養基組合物中所含有之 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之總量中 α 甲殼素奈米纖維為5重量%以上時，顯示出細胞增生促進效果。又，於培養基組合物中所含有之 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之總量中 α 甲殼素奈米纖維為25重量%以上之情形時，與單獨添加 α 甲殼素奈米纖維之情形相比，顯示出同等等級之細胞增生促進效果。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表1、表2及表3。

【0086】 [表1]

	添加濃度 (%(w/v))	α 甲殼素奈 米纖維 (%(w/v))	聚葡萄糖奈 米纖維 (%(w/v))	第4天 (細胞數)	第8天 (細胞數)
未添加 (樣品11)	0	0	0	4497	4645
樣品1	0.0006	0.0006	0	7199	11322
樣品1	0.002	0.002	0	8576	17237

樣品1	0.006	0.006	0	8621	17967
樣品1	0.02	0.02	0	8253	16248
樣品3	0.0006	0.0003	0.0003	7826	11783
樣品3	0.002	0.001	0.001	8840	15982
樣品3	0.006	0.003	0.003	9106	18086
樣品3	0.02	0.01	0.01	8965	14807
樣品4	0.0006	0.0002	0.0004	8521	13091
樣品4	0.002	0.00066	0.00134	8128	15131
樣品4	0.006	0.002	0.004	9281	16592
樣品4	0.02	0.0066	0.0134	8681	15563
樣品5	0.0006	0.00015	0.00045	8091	11637
樣品5	0.002	0.0005	0.0015	8305	15511
樣品5	0.006	0.0015	0.0045	8660	15877
樣品5	0.02	0.005	0.015	8831	14308

【0087】 [表2]

	添加濃度 (%(w/v))	α 甲殼素奈米 纖維 (%(w/v))	聚葡萄糖奈米 纖維 (%(w/v))	第4天 (細胞數)	第8天 (細胞數)
未添加 (樣品11)	0	0	0	5310	5172
樣品1	0.0006	0.0006	0	8323	11133
樣品1	0.002	0.002	0	8971	17892
樣品1	0.006	0.006	0	9431	18533
樣品1	0.02	0.02	0	9033	16561
樣品6	0.0006	0.00012	0.00048	8197	10659
樣品6	0.002	0.0004	0.0016	8565	13953
樣品6	0.006	0.0012	0.0048	9511	16357
樣品6	0.02	0.004	0.016	9191	14821
樣品7	0.0006	0.00009	0.00051	8233	11726
樣品7	0.002	0.0003	0.0017	9083	13067
樣品7	0.006	0.0009	0.0051	8994	15627
樣品7	0.02	0.003	0.017	9273	13158
樣品8	0.0006	0.00006	0.00054	8487	12210
樣品8	0.002	0.0002	0.0018	8415	12155
樣品8	0.006	0.0006	0.0054	9114	14262
樣品8	0.02	0.002	0.018	8838	12877

【0088】 [表3]

	添加濃度 (%(w/v))	α 甲殼素奈米 纖維 (%(w/v))	聚葡萄糖奈米 纖維 (%(w/v))	第4天 (細胞數)	第8天 (細胞數)
未添加 (樣品11)	0	0	0	4217	5202
樣品1	0.0006	0.0006	0	8067	14232

樣品1	0.002	0.002	0	9146	18102
樣品1	0.006	0.006	0	8790	17444
樣品1	0.02	0.02	0	8456	13679
樣品9	0.0006	0.00003	0.00057	7451	9347
樣品9	0.002	0.0001	0.0019	7528	10821
樣品9	0.006	0.0003	0.0057	7591	11740
樣品9	0.02	0.001	0.019	8106	11778
樣品10	0.0006	0.000006	0.000594	7587	8802
樣品10	0.002	0.00002	0.0018	7494	7568
樣品10	0.006	0.00006	0.00594	7198	8508
樣品10	0.02	0.0002	0.018	7169	9057
樣品2	0.0006	0	0.0006	7144	8280
樣品2	0.002	0	0.002	6953	7554
樣品2	0.006	0	0.006	7247	8666
樣品2	0.02	0	0.02	7018	8246

【0089】

(試驗例2：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖糖奈米纖維之混合物之3D培養中之源自人類骨髓組織之間葉系幹細胞的增生)

使依據WO2015/111686所製備之 α 甲殼素奈米纖維或聚葡萄糖糖奈米纖維(生質奈米纖維BiNF_i-S 2質量%，SUGINO MACHINE股份有限公司)以成為1%(w/v)之方式於超純水(Milli-Q水)中懸浮後，藉由倒置溶混而分散，將本水溶液於121°C下進行20分鐘高壓釜殺菌。所使用之 α 甲殼素奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之 α 甲殼素奈米纖維(樣品1)。又，聚葡萄糖糖奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之聚葡萄糖糖奈米纖維(樣品2)。進而，以樣品1與樣品2之比率(體積)成為50%：50%(樣品3)、33%：67%(樣品4)、20%：80%(樣品6)之方式將樣品1與樣品2進行混合，獲得甲殼素奈米纖維/聚葡萄糖糖奈米纖維混合物(樣品3、4、6)。

【0090】製備將上述中所獲得之樣品1~4、6以各種最終濃度(最終濃度：0.0006%(w/v)、0.002%(w/v)、0.006%(w/v)、0.02%(w/v))添加於作為血清培養基之間葉系幹細胞增生培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製

造)中而成之培養基組合物、以及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品11)。接下來，使所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為13333細胞/mL之方式於上述各培養基組合物中懸浮後，以150 μ L/孔接種至96孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3474)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養10天。對於第7天之培養液，添加ATP試劑150 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(3點之平均值)。

【0091】其結果為，若使用包含 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之培養基組合物將源自人類骨髓之間葉系幹細胞於96孔平底超低附著表面微量盤中進行培養，則培養基組合物中所含有之 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之總量中，若 α 甲殼素奈米纖維為20重量%以上，則與僅 α 甲殼素奈米纖維之情形(即，樣品1)相比，顯示出同等之細胞增生促進效果。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表4。

【0092】 [表4]

	添加濃度 (%(w/v))	α 甲殼素奈米 纖維 (%(w/v))	聚葡萄糖奈 米纖維 (%(w/v))	第7天 (細胞數)
未添加 (樣品11)	0	0	0	2147
樣品1	0.0006	0.0006	0	5808
樣品1	0.002	0.002	0	8421
樣品1	0.006	0.006	0	7826
樣品1	0.02	0.02	0	5658
樣品3	0.0006	0.0003	0.0003	5399
樣品3	0.002	0.001	0.001	7566
樣品3	0.006	0.003	0.003	8771

樣品3	0.02	0.01	0.01	7249
樣品4	0.0006	0.0002	0.0004	5218
樣品4	0.002	0.00066	0.00134	7169
樣品4	0.006	0.002	0.004	8174
樣品4	0.02	0.0066	0.0134	6833
樣品6	0.0006	0.00012	0.00048	5074
樣品6	0.002	0.0004	0.0016	7368
樣品6	0.006	0.0012	0.0048	8294
樣品6	0.02	0.004	0.016	6506

【0093】

(試驗例3：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之3D培養中之源自人類脂肪組織之間葉系幹細胞的連續擴大培養)

使依據WO2015/111686所製備之 α 甲殼素奈米纖維或聚葡萄糖奈米纖維(生質奈米纖維BiNF_i-S 2質量%，SUGINOMACHINE股份有限公司)以成為1%(w/v)之方式於超純水(Milli-Q水)中懸浮後，藉由倒置溶混進行分散，將本水溶液於121°C下進行20分鐘高壓釜殺菌。用於摻合的係在200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之 α 甲殼素奈米纖維(樣品1)及在200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之聚葡萄糖奈米纖維(樣品2)。進而，以樣品1與樣品2之比率(體積)成為50%：50%(樣品3)、25%：75%(樣品4)、20%：80%(樣品6)、15%：85%(樣品7)之方式將樣品1與樣品2進行混合，而獲得甲殼素奈米纖維/聚葡萄糖奈米纖維混合物(樣品3、4、6、7)。

【0094】製備將上述中所獲得之樣品1~4、6、7以成為0.006%(w/v)之最終濃度之方式添加於作為血清培養基之間葉系幹細胞增生培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物。再者，所製備之培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及/或聚葡萄糖奈米纖維之最終濃度係如下所示：

(1)添加有樣品1之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.006%(w/v)，聚

第40頁(發明說明書)

葡萄糖胺糖奈米纖維：0%(w/v))

(2)添加有樣品2之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.006%(w/v))

(3)添加有樣品3之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.003%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.003%(w/v))

(4)添加有樣品4之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.0015%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.0045%(w/v))

(5)添加有樣品6之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.0012%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.0048%(w/v))

(6)添加有樣品7之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.0009%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.0051%(w/v))

【0095】 接下來，使所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為13333細胞/mL之方式於上述各培養基組合物中懸浮後，以150 μ L/孔接種至96孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3474)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養5天。對於接種時(第0天)及接種後第5天之培養液，添加ATP試劑150 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，而算出活細胞之數量(3點之平均值)。

【0096】 於接種後第5天，利用移液使附著有細胞之奈米纖維分散，將其懸浮液自96孔平底超低附著表面微量盤中分別進行回收，利用移液混合至新的包含各樣品(0.006%)之間葉系幹細胞增生培養基600 μ L

中，以總量/孔接種至24孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3473)(24孔微量盤接種第0天)。24孔微量盤接種後第5天與第10天之細胞培養液係分別回收至1.5 mL管中，以2800 g、3分鐘進行離心，藉此使細胞、奈米纖維部分沈澱。對於細胞、奈米纖維之顆粒，添加間葉系幹細胞增生培養基150 μ L及ATP試劑150 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(3點之平均值)。

【0097】 於24孔微量盤接種後第10天，利用移液使附著有細胞之奈米纖維分散，將其懸浮液自24孔平底超低附著表面微量盤中分別進行回收，利用移液混合至新的包含各樣品(0.006%)之間葉系幹細胞增生培養基3000 μ L中，以總量/孔接種至6孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3471)(6孔微量盤接種第0天)。

【0098】 6孔微量盤接種後第8天之細胞培養液係藉由移液而懸浮，亦考慮蒸發量而添加間葉系幹細胞增生培養基，藉此使總量合計為3500 μ L。添加500 μ L之細胞培養液與ATP試劑500 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(3點之平均值)。又，最終之ATP值係以成為總量之3500 μ L之方式換算所得。

【0099】 其結果為，若使用培養基組合物中所含有之 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之總量中 α 甲殼素奈米纖維為15重量%~50重量%的含有 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物來對

源自人類脂肪之間葉系幹細胞進行培養，則能夠實現纖維彼此之緩慢凝集及反覆進行利用移液之分散。又，藉由添加新鮮之含有 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物，能夠不使用胰蛋白酶而實現擴大培養。尤其是於培養基組合物中所含有之 α 甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之總量中 α 甲殼素奈米纖維為15重量%~20重量%之情形時，連續擴大培養時由奈米纖維上之源自人類脂肪之間葉系幹細胞凝集化引起之細胞增生速度降低難以發生，即便於6孔培養盤中亦顯示出良好之增生促進作用。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表5。

【0100】 [表5]

	第0天 (96孔)	第5天 (96孔)	第5天 (24孔)	第10天 (24孔)	第8天 (6孔)換算
樣品3	1761	8188	16690	91054	126474
樣品4	1823	8176	18165	73453	162159
樣品6	1755	7159	16400	71173	201973
樣品7	1823	6305	17364	65044	210427

【0101】

(試驗例4：使用聚葡萄糖胺糖奈米纖維或甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之3D培養中之源自人類脂肪之間葉系幹細胞的幹細胞標記物表現變動)

使依據WO2015/111686所製備之 α 甲殼素奈米纖維或聚葡萄糖胺糖奈米纖維(生質奈米纖維BiNF_i-S 2質量%，SUGINO MACHINE股份有限公司)以成為1%(w/v)之方式於超純水(Milli-Q水)中懸浮後，藉由倒置溶混而分散，將本水溶液於121℃下進行20分鐘高壓釜殺菌。所使用之 α 甲殼素奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之 α 甲殼素奈米纖維(樣品1)。又，聚葡萄糖胺糖奈米纖維係於200 MPa、道次5次條件下經奈米纖維化之聚葡萄糖胺糖奈米纖維(樣品2)。進而，以樣品1與樣品2之比率(體

積)成為50%：50%(樣品3)、33%：67%(樣品4)、25%：75%(樣品5)之方式將樣品1與樣品2進行混合，而獲得甲殼素奈米纖維/聚葡萄糖胺糖奈米纖維混合物(樣品3~5)。製備將上述中所獲得之樣品1~5以成為0.015%(w/v)之最終濃度之方式添加於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物、以及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品11)。再者，所製備之培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及/或聚葡萄糖胺糖奈米纖維之最終濃度係如下所示：

(1)添加有樣品1之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.015%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0%(w/v))

(2)添加有樣品2之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.015%(w/v))

(3)添加有樣品3之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.0075%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.0075%(w/v))

(4)添加有樣品4之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.005%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.01%(w/v))

(5)添加有樣品5之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.00375%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.01125%(w/v))

【0102】 接下來，將所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為50000細胞/mL之方式接種至添加有上述甲殼素及/或聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，以每孔成為2 mL之方式分注至6孔平底超低附著表面微量盤(#3471，康寧公司製造)之孔中。又，作為比較對象，將25000細胞/mL接種至未添加培養基組合物中後，以每孔成為2 mL之方式分注至6孔平底

附著表面微量盤(#3516, 康寧公司製造)之孔中(樣品12)。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養, 並繼續6天。於第6天回收細胞, 添加RLT溶液350 μL(RNeasy迷你套組(QIAGEN公司製造, #74106), 而製成RNA提取溶液。於RNA提取溶液中添加70%乙醇350 μL後, 添加至RNeasy旋轉柱, 以8000×g進行15秒鐘離心。繼而, 向RNeasy旋轉柱添加700 μL之RW1溶液, 以8000×g進行15秒鐘離心。繼而, 添加500 μL之RPE溶液, 以8000×g進行15秒鐘離心。進而添加500 μL之RPE溶液, 以8000×g進行2分鐘離心。向存在於RNeasy旋轉柱中之RNA添加無RNase溶液而使之溶出。繼而, 自所獲得之RNA使用PrimeScript RT試劑套組(完全即時)(塔卡拉生物公司製造, #RR037A)而合成cDNA。使用所合成之cDNA及Premix EX Taq(完全即時)(塔卡拉生物公司製造, #RR039A)、Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)而進行即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)。作為Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造), OCT4係使用Hs04260367_gH, SOX2係使用Hs01053049_s1, NANOG係使用Hs04399610_g1, CXCR4係使用Hs00607978_s1, GAPDH係使用Hs99999905_m1。機器係使用即時聚合酶鏈鎖反應7500。分析係算出利用GAPDH之值修正各目標基因之值所得之相對值而進行比較。

【0103】 其結果為, 藉由使用包含聚葡萄糖奈米纖維及α甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之培養基組合物將源自人類脂肪之間葉系幹細胞於6孔平底超低附著表面微量盤中進行培養, 而發現了顯示未分化性之OCT4、SOX2、NANOG基因、及顯示與導向相關之趨化性之CXCR4基因之相對表現量的上升。另一方面, 於在附著培養盤中單層

培養之條件、或僅使用甲殼素奈米纖維而於低附著培養盤中3D培養之條件下，未發現該等基因之明顯之表現量之增加。將各基因表現之相對值示於表6。

【0104】 [表6]

		SOX2	OCT4	NANOG	CXCR4
低附著培養盤	未添加 (樣品11)	0.04	0.05	0.05	0.4
	樣品1	0.04	0.05	0.05	0.4
	樣品2	1.04	0.79	0.87	10.7
	樣品3	0.21	0.22	0.2	2.4
	樣品4	0.12	0.23	0.19	2.6
	樣品5	0.22	0.36	0.26	5.7
附著培養盤	未添加 (樣品12)	0.03	0.05	0.05	0.7

【0105】 再者，將試驗例1~4(及下述之試驗例5、6、7)中所使用之在各種解纖條件(壓力、壓碎次數)下所製備之 α 甲殼素奈米纖維分散液及聚葡萄糖胺糖奈米纖維分散液的物性值(α 甲殼素或聚葡萄糖胺糖之實測濃度、黏度、中值粒徑、平均粒徑等)示於表7。

【0106】 [表7]

奈米纖維原料	壓力 (MPa)	壓碎次數 (Pass)	實測濃度 %(w/v)	黏度 mPa·s (0-20°C)	雷射繞射 平均粒徑 (μm)	雷射繞射中 值粒徑 (μm)
甲殼素	200	5	1.05%	6.73	80.7	65
聚葡萄糖胺糖	200	5	0.94%	3.95	51.2	44.3

【0107】

(試驗例5：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之3D培養中之源自人類臍帶之間葉系幹細胞的連續擴大培養)

製備將上述中所獲得之樣品6以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於作為血清培養基之間葉系幹細胞增生培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物(以下，有時將此處所製備之培養基組合物

稱為「含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基」)。再者，所製備之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維的最終濃度係如下所示：甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)、聚葡萄糖奈米纖維：0.04%(w/v)。

【0108】 接下來，使所培養之源自人類臍帶之間葉系幹細胞(C-12971，塔卡拉生物公司製造)以成為15000細胞/mL之方式於上述含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基中懸浮後，以10 mL/孔接種至6孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3471)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養3天。培養時，附著於奈米纖維之細胞沈澱至培養孔之底部，但與培養孔之表面之附著未產生。第3天，將實質上不含有奈米纖維/細胞之沈澱物之孔中之培養基上清液約5 mL去除，添加新鮮之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基5 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第7天。對於接種時(第0天)與接種後第7天之培養液300 μL，添加ATP試劑300 μL(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(2點之平均值)。

【0109】 於接種後第7天，藉由移液而使附著有細胞之奈米纖維分散，自6孔平底超低附著表面微量盤回收其懸浮液，利用移液混合至新鮮之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基(40 mL)中，以總量/燒瓶接種至125 mL燒瓶(Thermo Scientific公司製造，4115-0125)。於第10天去除燒瓶中之培養基約25 mL，添加新鮮之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至接種後第14天。對於

125 mL燒瓶擴大後第7天之細胞培養液500 μ L，添加ATP試劑500 μ L(CellTiter-Glo™ 發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(2點之平均值)。又，燒瓶中之最終之ATP值係使用自6孔向燒瓶之擴大比率(5倍)換算所得。

【0110】 其結果為，若使用含有 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物對源自人類臍帶之間葉系幹細胞進行培養，則能夠實現纖維彼此之緩慢凝集及反覆進行利用移液之分散。又，藉由添加新鮮之含有 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物，能夠不使用胰蛋白酶而實現擴大培養。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表8。

【0111】 [表8]

	第0天 (6孔)	第7天 (6孔)	第14天 (125 mL燒瓶)
樣品6	1935	21036	73764

【0112】

(試驗例6：使用含有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物之源自人類臍帶之間葉系幹細胞的於低血清濃度下之浮游培養、及連續之細胞分泌物之回收1)

於試驗例5中，使用利用含有 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物(即，含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基)對源自人類臍帶之間葉系幹細胞進行培養的第14天之125 mL燒瓶培養液。於第14天去除燒瓶中之實質上不含有奈米纖維/細胞之沈澱物之培養基上清液約25 mL，添加新鮮之DMEM培養基(044-29765，Fuji Film Wako Pure

Chemical股份有限公司，不含有奈米纖維及血清)25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第17天。進而，於第17天回收燒瓶中之實質上不含有奈米纖維/細胞之沈澱物之培養基上清液約25 mL，向孔中添加新鮮之DMEM培養基(044-29765，Fuji Film Wako Pure Chemical股份有限公司，不含有奈米纖維及血清)25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第21天。其後，於第24、28、31、35天回收燒瓶中之培養基上清液約25 mL，向孔中添加新鮮之DMEM培養基：間葉系幹細胞增生培養基(3：1)(所有培養基均不含有奈米纖維)25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第35天。

【0113】 於第21、24、28、31、35天回收之培養基上清液係於離心(400 g、3分鐘)後回收培養上清液。所回收之培養上清液係於-80°C下保管直至使用時為止。又，離心後之顆粒(奈米纖維/細胞等)係放回至細胞培養中之燒瓶中，繼續基於燒瓶之培養。即，經過上述全部步驟，培養基中之奈米纖維濃度始終一定。

【0114】 於第14、21、28、35天，對於125 mL燒瓶之細胞培養液500 μ L添加ATP試劑500 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量(2點之平均值)。

【0115】

[利用酶標抗體法之外泌體產生量之測定]

使用酶標抗體法(ELISA；enzyme-linked immunosorbent assay)對各培養上清液中(第17、21、24、28、31、35天)之外泌體產生量進行測定。測

定時使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit(和光純藥公司製造，#297-79201)。將向外泌體捕獲96孔培養盤以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將經10倍稀釋之培養上清液以100 μL/孔進行分注，使用微量盤振盪器於室溫下反應2小時。反應結束後，捨棄反應液，將向各孔以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將檢測用對照抗CD63抗體反應液以100 μL/孔進行分注，使用微量盤振盪器於室溫下反應1小時。反應結束後，捨棄反應液，將向各孔以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將檢測用2次抗體反應液以100 μL/孔進行分注，使用微量盤振盪器於室溫下反應1小時。反應結束後，捨棄反應液，將向各孔以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆5次。將TMB(Tetramethylbenzidine，四甲基聯苯胺)溶液以100 μL/孔進行分注，於室溫下反應30分鐘。反應後，將停止溶液以100 μL/孔進行添加，測定450 nm及620 nm之吸光度。各樣品之吸光度值係設為自450 nm之吸光度減去620 nm之吸光度所得之值(Δ Abs)。

【0116】其結果為，於含有 α 甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物上所增生之源自人類臍帶之間葉系幹細胞即便於間葉系幹細胞培養基的比率為25%之低血清培養基中，在第35天活細胞數量亦得到維持。又，關於各培養上清液中之CD63值(外泌體)，相較於間葉系幹細胞培養基之比率為50%時，使間葉系幹細胞培養基之比率為25%時之生產量較高。又，越於25%之低血清培養基中繼續培養，生產量越增加。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表9，將基於CD63之 Δ Abs值示於表10。

【0117】 [表9]

	第14天	第21天	第28天	第35天
樣品6	14753	14934	16439	15320

【0118】 [表10]

	14~17天回收	17~21天回收	21~24天回收
間葉系幹細胞增生培養基比率(%)	50	25	25
血清濃度(%)	1	0.5	0.5
樣品6	1.19	1.24	1.77

	24~28天回收	28~31天回收	31~35天回收
間葉系幹細胞增生培養基比率(%)	25	25	25
血清濃度(%)	0.5	0.5	0.5
樣品6	1.99	1.87	2.5

培養基	緩衝液
0.12	0.12

【0119】

(試驗例7：使用含有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物之源自人類臍帶之間葉系幹細胞的階段性低血清化中之浮游培養、及細胞分泌物之回收2)

製備將上述中所獲得之樣品3及6以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於作為血清培養基之間葉系幹細胞增生培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物(以下，有時將此處所製備之培養基組合物稱為「含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基」)。再者，所製備之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維的最終濃度係如下所示：

(1)添加有樣品3之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.025%(w/v)，聚葡萄糖奈米纖維：0.025%(w/v))

(2)添加有樣品6之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)，聚葡萄糖奈米纖維：0.04%(w/v))

【0120】 接下來，使所培養之源自人類臍帶之間葉系幹細胞(C-12971，塔卡拉生物公司製造)以成為15000細胞/mL之方式於上述含有奈

米纖維之間葉系幹細胞增生培養基中懸浮後，1.2 mL/孔接種至24孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3473)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養3天。培養時，附著於奈米纖維之細胞係沈澱至培養孔之底部，但與培養孔之表面之附著未產生。於第3天，去除孔中之實質上不含有奈米纖維/細胞之沈澱物之培養基上清液約0.6 mL，添加間葉系幹細胞增生培養基0.6 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第6天。於接種後第6天，藉由移液而使附著有細胞之奈米纖維分散，自24孔平底超低附著表面微量盤回收其懸浮液，利用移液混合至新鮮之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基(8.4 mL)中，以9.6 mL/孔接種至6孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3473)。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養4天。於第10天，去除孔中之培養基上清液約5 mL，添加間葉系幹細胞增生培養基(不含有奈米纖維)5 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第14天。於接種後第14天，藉由移液使附著有細胞之奈米纖維分散，自6孔平底超低附著表面微量盤回收其懸浮液，利用移液混合至新鮮之含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基(約40 mL)中，以總量/燒瓶接種至125 mL燒瓶(Thermo Scientific公司製造，4115-0125)中，並進行培養。於第17天，去除燒瓶中之培養基上清液約25 mL，添加新鮮之間葉系幹細胞增生培養基(不含有奈米纖維)25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至接種後第20天。

【0121】於第20天，去除燒瓶中之培養基上清液約25 mL，添加新鮮之DMEM培養基(044-29765，Fuji Film Wako Pure Chemical股份有限公司，不含有奈米纖維及血清)25 mL，藉由移液管進行懸浮，繼續培養直至第23天。進而於第23天，回收燒瓶中之培養基上清液約25 mL，向孔

中添加新鮮之DMEM培養基(044-29765, Fuji Film Wako Pure Chemical 股份有限公司, 不含有奈米纖維及血清)25 mL, 藉由移液管進行懸浮, 繼續培養直至第26天。其後, 於第29、32、35天回收燒瓶中之培養基上清液約25 mL, 向孔中添加新鮮之DMEM培養基(不含有奈米纖維及血清)25 mL, 藉由移液管進行懸浮, 繼續培養直至第35天。

【0122】 於第26、29、32、35天所回收之培養基係於離心(400 g、3分鐘)後回收培養上清液。所回收之培養上清液係於-80°C下保管直至使用時為止。又, 離心後之顆粒(奈米纖維/細胞等)係放回至細胞培養中之燒瓶中, 繼續利用燒瓶之培養。即, 經過上述全部步驟, 培養基中之奈米纖維濃度始終一定。

【0123】 於第26、29、32、35天, 對於125 mL燒瓶之細胞培養液500 μ L添加ATP試劑500 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒, Promega公司製造), 進行懸浮, 於室溫下靜置約10分鐘後, 利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值), 減去僅培養基之發光值, 算出活細胞之數量(2點之平均值)。

【0124】

[利用酶標抗體法之外泌體產生量之測定]

使用酶標抗體法(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)對各培養上清液中(第26、29、32、35天)之外泌體產生量進行測定。測定時使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit(和光純藥公司製造, #297-79201)。將向外泌體捕獲96孔培養盤以300 μ L/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將經10倍稀釋之培養上清液以100 μ L/孔進行分注, 使用微量盤振盪器於室溫下反應2小時。反應結束後, 捨棄反應液, 將向各孔以300

μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將檢測用對照抗CD63抗體反應液以100 μL/孔進行分注，使用微量盤振盪器於室溫下反應1小時。反應結束後，捨棄反應液，將向各孔以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆3次。將檢測用2次抗體反應液以100 μL/孔進行分注，使用微量盤振盪器於室溫下反應1小時。反應結束後，捨棄反應液，將向各孔以300 μL/孔添加反應/洗淨液之操作反覆5次。將TMB(Tetramethylbenzidine，四甲基聯苯胺)溶液以100 μL/孔進行分注，於室溫下反應30分鐘。反應後，將停止溶液以100 μL/孔進行添加，測定450 nm及620 nm之吸光度。各樣品之吸光度值係設為自450 nm之吸光度減去620 nm之吸光度所得之值(ΔAbs)。

【0125】其結果為，若藉由對於在含有α甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物上所增生之源自人類臍帶之間葉系幹細胞，階段性地添加DMEM培養基而製成低血清培養基，則當包含血清之間葉系幹細胞培養基之比率成為6.25%時，活細胞數量降低。另一方面，關於各培養上清液中之CD63值(外泌體)，越低血清化，則生產量越減少，間葉系幹細胞培養基之比率為25%(即，血清濃度為0.5重量%)之條件時，生產量最高。將各培養中之RLU值(ATP測定，發光強度)示於表11，將基於CD63之ΔAbs值示於表12。

【0126】 [表11]

	第26天	第29天	第32天	第35天
樣品3	894900	886450	568208	441348
樣品6	527673	750692	410465	437438

【0127】 [表12]

	23~26天回收	26~29天回收	29~32天回收
間葉系幹細胞增生培養基比率(%)	25	12.5	6.25
血清濃度(%)	0.5	0.25	0.125
樣品3	1.64	1.11	0.99
樣品6	1.03	1.01	0.93

	32~35天回收
間葉系幹細胞增生培養基比率(%)	3.13
血清濃度(%)	0.063
樣品3	0.36
樣品6	0.51

【0128】

(試驗例8：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之源自人類骨髓及源自人類臍帶之間葉系幹細胞於3D培養中的PGE2產生量)

製備於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中添加甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維而成之培養基組合物(最終濃度：0.05%(w/v))(樣品6)、及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品12)。接下來，將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，塔卡拉生物公司製造)以成為40000細胞/mL之方式、且將源自人類臍帶之間葉系幹細胞(C-12971，塔卡拉生物公司製造)以成為80000細胞/mL之方式接種至上述添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，將添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔。又，作為比較對象，以每孔成為1 mL或2 mL之方式分注至24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)或6孔平底附著表面微量盤(#3516，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續2天。於第2天，自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，回收培養上清液。去除培養上清液後，將1 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基或含有最終濃度10 ng/mL之TNF-α(#210-TA，R&D systems公司製造)之間葉系幹細胞增生培養基2培養基添加至15 mL管中，且使添加有甲殼素

及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物回到24孔平底超低附著表面微量盤(#3473, 康寧公司製造)之孔中。對於24孔平底附著表面微量盤(#3526, 康寧公司製造), 於去除培養基後, 添加1 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基或含有最終濃度10 ng/mL之TNF- α 之間葉系幹細胞增生培養基2培養基。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養並持續1天。於第1天, 自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中, 以300×g進行3分鐘離心後, 回收培養上清液。此時為了進行細胞數之評價, 將ATP試劑1 mL(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒, Promega公司製造)添加至培養上清液回收後之各樣品中, 進行懸浮, 於室溫下靜置10分鐘後, 利用Enspire(Perkin Elmer公司製造)測定發光強度(RLU值), 減去僅培養基之發光值, 藉此測定活細胞之數量。繼而, 關於所回收之培養上清液中所含有之PGE2, 使用PGE2 ELISA套組(#ADI-900-001, Enzo Life Science公司製造)進行定量。將使用檢測緩衝液(Assay Buffer)所稀釋之標準品(standard)及培養上清液100 μ L添加至套組所附帶之96孔培養盤之各孔中。繼而, 將50 μ L之藍色複合物(blue conjugate)添加至各孔中。進而將50 μ L之黃色抗體(yellow antibody)添加至各孔中, 於室溫條件下振盪2小時。接下來, 捨棄溶液, 以400 μ L/孔添加洗液後, 捨棄溶液。將上述操作反覆3次。將200 μ L之pNpp(對硝基苯磷酸二鈉)顯色劑添加至各孔中, 於室溫條件下振盪45分鐘。最後添加50 μ L之停止溶液而使反應停止, 測定405 nm之吸光度。各樣品中所含有之PGE2濃度係根據校準曲線之4參數邏輯斯回歸而算出。為了算出每單位細胞數之分泌量, 而算出用所算出之PGE2量除以發光強度所得之相對值。

【0129】其結果為，於將添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物與低附著培養盤組合之3D培養時，相較於藉由未添加培養基組合物與附著培養盤進行單層培養之情形，PGE2分泌量之相對值增加。又，即便於對TNF- α 處理進行比較之情形時，將添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物與低附著培養盤組合之3D培養亦多於藉由未添加培養基組合物與附著培養盤進行單層培養之情形。將源自人類骨髓及源自人類臍帶之間葉系幹細胞於各樣品中之相對值示於表13及表14。

【0130】 [表13]

源自人類骨髓之間葉系幹細胞			相對值(PGE2/Celltiter glo)
附著培養盤	未添加 (樣品12)	對照	1.59E-08
		TNF- α 10 ng/mL	1.19E-07
低附著培養盤	樣品6	對照	5.87E-06
		TNF- α 10 ng/mL	1.12E-05

【0131】 [表14]

源自人類臍帶之間葉系幹細胞			相對值(PGE2/Celltiter glo)
附著培養盤	未添加 (樣品12)	對照	4.19E-06
		TNF- α 20 ng/mL	1.91E-05
低附著培養盤	樣品6	對照	0.00252
		TNF- α 20 ng/mL	0.00424

【0132】

(試驗例9：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之源自人類骨髓及源自人類脂肪之間葉系幹細胞之於3D培養中的bFGF產生量)

製備於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中添加甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維而成之培養基組合物(最終濃度：0.05%(w/v))(樣品6)、及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品12)。接下來，將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，塔卡拉生物公司製造)以成為80000細胞/mL之方式、又將源自人

類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為100000細胞/mL之方式接種至上述添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。又，作為比較對象，以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續2天。於第2天，將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物自各孔移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，去除培養上清液。繼而添加1 mL之含有17%FBS之MEMα培養基，且使添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物回到24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。關於未添加培養基組合物，於將間葉系幹細胞增生培養基2培養基去除後，將1 mL之含有17%FBS之MEMα培養基添加至24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續1天。於第1天，自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，回收培養上清液。此時為了進行細胞數之評價，將ATP試劑1 mL(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)添加至培養上清液回收後之各樣品中，進行懸浮，於室溫下靜置10分鐘後，利用Enspire(Perkin Elmer公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，藉此測定活細胞之數量。繼而，關於所回收之培養上清液中所含有之bFGF，使用bFGF ELISA套組(#ELH-bFGF-1，

RayBiotech公司製造)進行定量。將100 μL 之標準品(standard)或樣品溶液添加至孔中，於室溫下振盪2.5小時。接下來，捨棄溶液，添加300 μL 之1 \times 洗液後去除。將上述操作反覆4次。添加100 μL 之1 \times 檢測抗體，於室溫下振盪1小時。捨棄溶液，添加300 μL 之1 \times 洗液後去除。將上述操作反覆4次。添加100 μL 之HRP-抗生蛋白鏈菌素溶液(Streptavidin solution)，於室溫下振盪45分鐘。繼而，捨棄溶液，添加300 μL 之1 \times 洗液後去除。將上述操作反覆4次。添加100 μL 之TMB一步顯色劑，於室溫下在暗處振盪30分鐘。最後添加50 μL 之停止溶液，測定450 nm之吸光度。各樣品中所含有之bFGF濃度係根據校準曲線之4參數邏輯斯回歸而算出。為了算出每單位細胞數之分泌量，而算出用所算出之bFGF量除以發光強度所得之相對值。

【0133】其結果為，無論是源自人類骨髓之間葉系幹細胞亦或是源自人類脂肪之間葉系幹細胞，於將添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物與低附著培養盤組合之3D培養時，與藉由未添加培養基組合物及附著培養盤進行單層培養之情形相比，均bFGF分泌量之相對值得到增加。將源自人類骨髓之間葉系幹細胞或源自人類脂肪之間葉系幹細胞中之相對值示於表15及表16。

【0134】 [表15]

源自人類骨髓之間葉系幹細胞		相對值(bFGF/Celltiter glo)
附著培養盤	未添加(樣品12)	0.00013
低附著培養盤	樣品6	0.00381

【0135】 [表16]

源自人類脂肪之間葉系幹細胞		相對值(bFGF/Celltiter glo)
附著培養盤	未添加(樣品12)	8.99E-05
低附著培養盤	樣品6	0.00077

【0136】

(試驗例10：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之源自人類骨髓及源自人類臍帶之間葉系幹細胞於3D培養中的TSG-6產生量)

製備於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中添加甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維而成之培養基組合物(最終濃度：0.05%(w/v))(樣品6)、及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品12)。接下來，將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，塔卡拉生物公司製造)以成為80000細胞/mL之方式、又將源自人類臍帶之間葉系幹細胞(C-12971，塔卡拉生物公司製造)以成為40000細胞/mL之方式接種至上述添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，將添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。又，作為比較對象，以每孔成為1 mL之方式分注至6孔平底附著表面微量盤(#3516，康寧公司製造)或24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續2天。於第2天，將添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物自各孔移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，去除培養上清液。去除培養上清液後，將1 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基或含有最終濃度10 ng/mL或20 ng/mL之TNF-α(#210-TA，R&D systems公司製造)之間葉系幹細胞增生培養基2培養基添加至15 mL管中，並使添加有甲殼素及聚葡萄糖奈米纖維之培養基組合物回到24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。對於24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)，於去除培養基後，添加1 mL之間葉系幹細胞增生

培養基2培養基或含有最終濃度10 ng/mL或20 ng/mL之TNF- α 之間葉系幹細胞增生培養基2培養基。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續1天。於第1天，自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，回收培養上清液。此時為了進行細胞數之評價，將ATP試劑1 mL(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)添加至培養上清液回收後之各樣品中，進行懸浮，於室溫下靜置10分鐘後，利用Enspire(Perkin Elmer公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，藉此測定活細胞之數量。繼而，關於所回收之培養上清液中所含有之TSG-6，使用ELISA進行定量。將經0.2M碳酸-碳酸氫鹽緩衝液(pH值9.2)稀釋至10 μ g/mL之TSG-6抗體(#sc-65886，Santacruz公司製造)以50 μ L/孔添加至Maxisorp flat bottom(#44-2404-21，Thermo Fisher Scientific公司製造)，於4°C下靜置24小時。24小時後，添加將Tween-20(#P7949，Sigma-Aldrich公司製造)以成為最終濃度0.05%(v/v)之方式添加至D-PBS(-)(#043-29791，Fuji Film Wako Pure Chemical股份有限公司製造)中而成之PBST溶液300 μ L後將之去除。將本操作反覆3次。添加含有BSA(#A2153，Sigma-Aldrich公司製造)5%之PBST溶液100 μ L，於室溫下靜置30分鐘。將溶液廢棄後，添加300 μ L之PBST溶液後將之去除。將本操作反覆3次。繼而，將校準曲線用所製備之TSG-6(#2104-TS，R&D Systems公司製造)及評價樣品50 μ L添加至各孔中，於室溫下靜置2小時。將溶液廢棄後，添加300 μ L之PBST溶液後將之去除。將本操作反覆3次。添加經PBST稀釋至5 μ g/mL之生物素標記抗人類TSG-6抗體(#BAF2104，R&D Systems

公司製造)之溶液50 μL ，於室溫下靜置120分鐘。將溶液廢棄後，添加300 μL 之PBST溶液後將之去除。將本操作反覆3次。添加經PBST溶液稀釋至200 ng/mL之抗生蛋白鏈菌素-HRP(# ab7403，Abcam公司製造)之溶液50 μL ，於室溫下靜置30分鐘。將溶液廢棄後，添加300 μL 之PBST溶液後將之去除。將本操作反覆3次。添加100 μL 之顯色劑(# 52-00-03、KPL公司製造)，於室溫下靜置15分鐘。最後添加100 μL 之停止溶液(# 50-85-06，KPL公司製造)，測定450 nm之吸光度。各樣品中所含有之TSG-6濃度係根據校準曲線之4參數邏輯斯回歸而算出。為了算出每單位細胞數之分泌量，而算出用所算出之TSG-6量除以發光強度所得之相對值。

【0137】其結果為，將添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物與低附著培養盤組合之3D培養時，相較於藉由未添加培養基組合物與附著培養盤進行單層培養之情形，TSG-6分泌量之相對值增加。又，關於將TNF- α 處理與各樣品之對照比較時之增加率，將添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物與低附著培養盤組合之3D培養亦多於藉由未添加培養基組合物與附著培養盤進行單層培養之情形。將源自人類骨髓之間葉系幹細胞及源自人類臍帶之間葉系幹細胞之各樣品中之相對值示於表17及表18。

【0138】 [表17]

源自人類骨髓之間葉系幹細胞		相對值(TSG-6/Celltiter glo)	增加率	
附著培養盤	未添加(樣品12)	對照	1.04E-06	1
		TNF- α 10 ng/ml	2.95E-06	2.8
低附著培養盤	樣品6	對照	4.73E-06	1
		TNF- α 10 ng/mL	3.09E-05	6.5

【0139】 [表18]

源自人類臍帶之間葉系幹細胞		相對值(TSG-6/Celltiter glo)	增加率	
附著培養盤	未添加(樣品12)	對照	2.98E-06	1
		TNF- α 20 ng/inL	7.32E-06	2.5
低附著培養盤	樣品6	對照	7.59E-06	1
		TNF- α 20 ng/mL	3.22E-05	4.2

【0140】

(試驗例11：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之源自人類骨髓之3D培養中的VEGF產生量)

製備於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中添加甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維而成之培養基組合物(最終濃度：0.05%(w/v))(樣品6)、及不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品12)。接下來，將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，塔卡拉生物公司製造)以成為100000細胞/mL之方式接種至上述添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)中，將未添加培養基組合物以每孔成為1 mL之方式分注至24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續2天。於第2天，自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，去除培養上清液。繼而，添加1 mL之含有17%FBS之MEM α 培養基，並使添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物回到24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。關於未添加培養基組合物，將間葉系幹細胞增生培養基2培養基去除後，將1 mL之含有17%FBS之MEM α 培養基添加至24孔平底附著表面微量盤(#3526，康寧公司製造)中。各培養盤係於CO₂培養

箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續1天。第1天，自各孔將添加有甲殼素及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及未添加培養基組合物移至15 mL管中，以300×g進行3分鐘離心後，回收培養上清液。此時為了進行細胞數之評價，將ATP試劑1 mL(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)添加至培養上清液回收後之各樣品中，進行懸浮，於室溫下靜置10分鐘後，利用Enspire(Perkin Elmer公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，藉此測定活細胞之數量。繼而，關於所回收之培養上清液中所含有之VEGF，使用VEGF165 ELISA套組, Human(#ENZ-KIT156-0001，Enzo Life Science公司製造)進行定量。將100 μL之標準品(standard)或樣品溶液添加至孔中，於室溫下振盪60分鐘。接下來，捨棄溶液，添加300 μL之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆3次。添加100 μL之VEGF檢測抗體，於室溫下振盪30分鐘。捨棄溶液，添加300 μL之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆3次。添加100 μL之VEGF共軛物(藍色)，於室溫下振盪30分鐘。繼而，捨棄溶液，添加300 μL之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆4次。添加100 μL之TMB溶液，於室溫下振盪30分鐘。最後添加100 μL之停止溶液2，測定450 nm之吸光度。各樣品中所含有之VEGF濃度係藉由校準曲線之4參數邏輯斯回歸而算出。為了算出每單位細胞數之分泌量，而算出用所算出之VEGF量除以發光強度所得之相對值。

【0141】 其結果為，於添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物中進行培養之情形與在未添加培養基組合物中進行培養之情形相比，每個細胞之VEGF產生量增加。將各樣品中之相對值示於表19。

【0142】 [表19]

		相對值(VEGF/Celltiter glo)
附著培養盤	未添加(樣品12)	0.00049
低附著培養盤	樣品6	0.00115

【0143】

(試驗例12：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物或微載體之3D培養中之源自人類臍帶之間葉系幹細胞的幹細胞標記物表現變動)

製備將上述中所獲得之樣品6以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物。又，稱量康寧低濃度SynthemaxII微載體(康寧公司製造，3781)360 mg，利用殺菌純化水進行水合後，將之浸漬於10 mL之乙醇中30分鐘。其後，去除乙醇，利用30 mL之PBS(-)洗淨2次，最後利用10 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基進行洗淨。作為比較對照，製備將上述微載體添加於10 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基中而成之培養基組合物(樣品13)。接下來，使所培養之源自人類臍帶之間葉系幹細胞(C-12971，塔卡拉生物公司製造)600000細胞於上述含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基40 mL中懸浮，填充至用作培養袋之抗體固相化袋A(Nipro公司製造，87-362)中後，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養3天。又，使所培養之源自人類臍帶之間葉系幹細胞600000細胞於含有微載體之間葉系幹細胞增生培養基15 mL中懸浮後，移至康寧125 mL拋棄式旋轉燒瓶中，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養1天。於1天後，使用Micro-Stir低速磁力攪拌器(WHEATON公司製造，W900701-B)，以30 rpm進行15分鐘振盪，其後進行2小時靜置，藉由該方法進而培養2天。3天後，對抗體固相化袋A及拋棄式旋轉燒瓶中所培養之細胞進行半量培養基更換，進而在與上述相同之條件下培養4天。4天

後，自40 mL中取出1 mL並移至1.5 mL管中，以300×g進行3分鐘離心。將上清液去除後，添加350 μL之RLT溶液(RNeasy迷你套組，QIAGEN公司製造，#74106)而製成RNA提取溶液。接下來，向RNA提取溶液添加70%乙醇350 μL後，添加至RNeasy旋轉柱中，以8000×g進行15秒鐘離心。繼而，向RNeasy旋轉柱添加700 μL之RW1溶液，以8000×g進行15秒鐘離心。繼而，添加500 μL之RPE溶液，以8000×g進行15秒鐘離心。進而添加500 μL之RPE溶液，以8000×g進行2分鐘離心。向存在於RNeasy旋轉柱中之RNA添加無RNase溶液，使之溶出。繼而，自所獲得之RNA使用PrimeScript RT試劑套組(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR037A)而合成cDNA。使用合成之cDNA及Premix EX Taq(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR039A)、Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)進行即時聚合酶鏈鎖反應。作為Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)，OCT4係使用Hs04260367_gH，SOX2係使用Hs01053049_s1，NANOG係使用Hs04399610_g1，CXCR4係使用Hs00607978_s1，GAPDH係使用Hs99999905_m1。機器係使用即時聚合酶鏈鎖反應7500。分析係算出利用GAPDH之值修正各目標基因之值所得之相對值而進行比較。

【0144】 其結果為，藉由使用包含甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物之培養基組合物，將源自人類臍帶之間葉系幹細胞於培養袋中進行培養，發現了顯示未分化性之OCT4、SOX2、NANOG基因、及顯示與導向相關之趨化性之CXCR4基因之相對表現量之上升。另一方面，若於利用康寧低濃度SynthemaxII微載體進行培養之條件下，則未發現該等基因之明顯之表現量之增加。將各基因表現之相對值示於表20。

【0145】 [表20]

		SOX2	OCT4	NANOG	CXCR4
第0天		1.3	1.9	1.5	2
第7天	樣品13	0.1	0.2	0.4	0.3
	樣品6	383.9	418.3	376.1	338.4

【0146】

(試驗例13：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖奈米纖維之混合物或微載體之源自人類脂肪之間葉系幹細胞之3D培養中的bFGF產生量)

製備將上述中所獲得之樣品6以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物。又，稱量康寧低濃度SynthemaxII微載體(康寧公司製造，3781)360 mg，利用殺菌純化水水合後，使之浸漬於10 mL之乙醇中30分鐘。其後，將乙醇去除，利用30 mL之PBS(-)洗淨2次，最後利用10 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基洗淨。作為比較對照，製備將上述微載體添加於10 mL之間葉系幹細胞增生培養基2培養基中而成之培養基組合物(樣品13)。接下來，使所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)600000細胞於上述含有奈米纖維之間葉系幹細胞增生培養基40 mL中懸浮，填充至用作培養袋之抗體固相化袋A(Nipro公司製造，87-362)中後，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養3天。又，使所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞600000細胞於含有微載體之間葉系幹細胞增生培養基15 mL中懸浮後，移至康寧125 mL拋棄式旋轉燒瓶中，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養1天。1天後使用Micro-Stir慢速磁力攪拌器(WHEATON公司製造，W900701-B)，以30 rpm進行15分鐘振盪，其後進行2小時靜置，藉由該方法進而培養2天。3天後，自培養袋及旋轉燒瓶中之40 mL中取出1 mL並

移至1.5 mL管中，以300×g進行3分鐘離心。離心後，去除上清液，添加2 mL之PBS(-)並洗淨。洗淨後，以300×g進行3分鐘離心，去除PBS(-)後，於含有17%FBS之MEM α 培養基(Fuji Film Wako Pure Chemical公司製造，135-15175)1 mL中懸浮後，添加至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)中，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養1天。1天後取出培養液並移至1.5 mL管中後，以300×g進行3分鐘離心，將培養上清液回收至新的1.5 mL管中。此時為了進行細胞數之評價，將ATP試劑1 mL(CellTiter-Glo(註冊商標)發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)添加至培養上清液回收後之各樣品中，進行懸浮，於室溫靜置10分鐘後，利用Enspire(Perkin Elmer公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，藉此測定活細胞之數量。繼而，關於所回收之培養上清液中所含有之bFGF，使用bFGF ELISA套組(#ELH-bFGF-1，RayBiotech公司製造)進行定量。將100 μ L之標準品(standard)或樣品溶液添加至孔中，於室溫下振盪2.5小時。接下來，捨棄溶液，添加300 μ L之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆4次。添加100 μ L之1×檢測抗體，於室溫下振盪1小時。捨棄溶液，添加300 μ L之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆4次。添加100 μ L之HRP-抗生蛋白鏈菌素溶液(Streptavidin solution)，於室溫下振盪45分鐘。繼而，捨棄溶液，添加300 μ L之1×洗液後將之去除。將上述操作反覆4次。添加100 μ L之TMB一步顯色劑，室溫下在暗處振盪30分鐘。最後添加50 μ L之停止溶液，測定450 nm之吸光度。各樣品中所含有之bFGF濃度係根據校準曲線之4參數邏輯斯回歸而算出。為了算出每單位細胞數之分泌量，而算出用所算出之bFGF量除以發光強度所得之相對值。

【0147】 其結果為，將源自人類脂肪之間葉系幹細胞於添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物中所實施之3D培養與在添加有微載體之培養基組合物中實施之3D培養相比，bFGF分泌量之相對值增加。將結果示於表21。

【0148】 [表21]

	相對值 (bFGF/Celltiter glo)
樣品13	0.0004
樣品6	0.0118

【0149】

(試驗例14：使用藉由同時解纖所製造之甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物或具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的3D培養中之源自人類脂肪之間葉系幹細胞的幹細胞標記物表現變動)

將甲殼素粉末及聚葡萄糖胺糖粉末以重量比1：4進行混合，將該混合物於200 MPa、道次5次條件下進行奈米纖維化，藉此製備α甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維(以下，有時將藉由本方法所製造之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物成為「藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維」等)。又，具有特定之乙醯化度(本試驗例中為約50%)之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維(以下，有時稱為「N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維」等)係藉由如下方式製備：將聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺於30%氫氧化鈉水溶液中進行4小時加熱回流處理，藉此將N-乙醯基葡萄糖胺量調節至約50%，進而將其於200 MPa、道次5次條件下進行奈米纖維化。如此獲得之藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維與N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維分別以成為1%(w/w)

之方式經注射用水(大塚蒸餾水)稀釋後，藉由倒置溶混進行分散，將本水懸浮液於121°C下進行20分鐘高壓釜殺菌處理(分別為樣品14及樣品15)。製備將上述中所獲得之樣品14或樣品15以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物。

【0150】 (1)添加有樣品14之培養基組合物(藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.05%(w/v))

(2)添加有樣品15之培養基組合物(N-乙酰基葡萄糖胺量調節(50%)奈米纖維：0.05%(w/v))

【0151】 接下來，使所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)於培養皿中藉由2D培養來增生，以成為50000細胞/mL之方式接種至上述添加有奈米纖維之培養基組合物或未添加培養基組合物中後，以每孔成為1.2 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續13天。接種時，於第8天及第13天回收細胞，添加RLT溶液300 μL(RNeasy迷你套組(QIAGEN公司製造，#74106)而製成RNA提取溶液。向RNA提取溶液添加70%乙醇300 μL後，添加至RNeasy旋轉柱中，以8000×g進行15秒鐘離心。繼而，向RNeasy旋轉柱添加600 μL之RW1溶液，以8000×g進行15秒鐘離心。繼而，添加500 μL之RPE溶液，以8000×g進行15秒鐘離心。繼而添加500 μL之RPE溶液，以8000×g進行2分鐘離心。向存在於RNeasy旋轉柱中之RNA添加無RNase溶液並使之溶出。繼而，自所獲得之RNA使用PrimeScript RT試劑套組(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR037A)合

成cDNA。使用所合成之cDNA及Premix EX Taq(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR039A)、Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)進行即時聚合酶鏈鎖反應。作為Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)，OCT4係使用Hs04260367_gH，NANOG係使用Hs04399610_g1，PPIA係使用Hs99999904_m1。機器係使用即時聚合酶鏈鎖反應7500。分析係算出利用PPIA之值修正各目標基因之值所得之相對值而進行比較。

【0152】其結果為，與接種時之2D培養條件相比，藉由使用包含藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維或N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維之培養基組合物，將源自人類脂肪之間葉系幹細胞於24孔平底超低附著表面微量盤中進行3D培養，而發現了顯示未分化性之NANOG及OCT4基因之相對表現量之上升。將NANOG基因表現之相對值示於表22，將OCT4基因表現之相對值示於表23。

【0153】 [表22]

NANOG/PPIA	接種時	第8天 (24孔)	第13天 (24孔)
樣品14	0.07	3.9	2.24
樣品15	0.07	9.41	1.91

【0154】 [表23]

OCT4/PPIA	接種時	第8天 (24孔)	第13天 (24孔)
樣品14	0.13	3.08	1.68
樣品15	0.13	8.38	2.37

【0155】

(試驗例15：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物或甲殼素奈米纖維與其他多糖類之混合物的3D培養中之源自人類脂肪之間葉系幹細胞之增生及幹細胞標記物表現變動)

將甲基纖維素粉末(1.0 g)添加於水(100 mL)中，進行攪拌而懸浮

後，進行高壓釜殺菌處理(121°C、20分鐘)，藉此獲得1.0%(w/v)之甲基纖維素水溶液，向該甲基纖維素水溶液(8 mL)中添加樣品1(2 mL)，藉由移液進行混合，藉此製備0.2%(w/v)甲殼素奈米纖維與0.8%(w/v)甲基纖維素之混合物(樣品16)。

【0156】將脫醯化結冷膠粉末(0.8 g)添加於水(100 mL)中，進行攪拌而溶解後，進行高壓釜殺菌處理(121°C、20分鐘)，藉此獲得0.8%(w/v)之脫醯化結冷膠水溶液。使用培養基製作套組(日產化學FCeM(註冊商標)系列製劑套組)，將該脫醯化結冷膠水溶液(12.5 mL)混合於D-PBS(+)(含有Ca、Mg)(27.5 mL)中，藉此獲得0.25%(w/v)之脫醯化結冷膠2價陽離子交聯結構體分散液，向該分散液(8 mL)添加樣品1(2 mL)，藉由移液進行混合，藉此製備0.2%(w/v)甲殼素奈米纖維與0.2%(w/v)脫醯化結冷膠之混合物(樣品17)。

【0157】將海藻酸鈉粉末(1.0 g)添加於水(50 mL)中，進行攪拌而溶解後，進行高壓釜殺菌處理(121°C、20分鐘)，藉此獲得2.0%(w/v)之海藻酸鈉水溶液。使用培養基製作套組(日產化學FCeM(註冊商標)系列製劑套組)，將該海藻酸鈉水溶液(10 mL)混合於D-PBS(+)(含有Ca、Mg)(10 mL)中，藉此獲得1.0%(w/v)海藻酸2價陽離子交聯結構體分散液，向該分散液(8 mL)添加樣品1(2 mL)，藉由移液進行混合，藉此製備0.2%(w/v)甲殼素奈米纖維與0.8%(w/v)海藻酸之混合物(樣品18)。

【0158】繼而，製備將上述中所獲得之樣品6、16、17及18以成為0.05%(w/v)之最終濃度之方式添加於間葉系幹細胞增生培養基2培養基(C-28009，塔卡拉生物公司製造)中而成之培養基組合物。再者，所製備之培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄胺糖奈米纖維或者其他多糖類

(甲基纖維素、脫醯化結冷膠、海藻酸)之最終濃度係如下所示：

【0159】 (1)添加有樣品6之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.04%(w/v))

(2)添加有樣品16之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)，甲基纖維素：0.04%(w/v))

(3)添加有樣品17之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)，脫醯化結冷膠：0.04%(w/v))

(4)添加有樣品18之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.01%(w/v)，海藻酸：0.04%(w/v))

【0160】 接下來，將所培養之源自人類脂肪之間葉系幹細胞(C-12977，塔卡拉生物公司製造)以成為13333細胞/mL之方式接種至上述於甲殼素奈米纖維中添加聚葡萄糖胺糖奈米纖維或其他多糖類(甲基纖維素、脫醯化結冷膠、海藻酸)而成之培養基組合物中後，以每孔成為1.2 mL之方式分注至24孔平底超低附著表面微量盤(#3473，康寧公司製造)之孔中。各培養盤係於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養並持續14天。於接種時(第0天)及接種後第7、14天，示各培養液懸浮，分注300 μL，進而添加ATP試劑300 μL(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量。

【0161】 於第7天及第14天回收細胞，添加RLT溶液300 μL(RNeasy迷你套組(QIAGEN公司製造，#74106)而製成RNA提取溶液。向RNA提取溶液添加70%乙醇300 μL後，添加於RNeasy旋轉柱中，以8000×g進行

15秒鐘離心。繼而，向RNeasy旋轉柱添加600 μ L之RW1溶液，以8000 \times g進行15秒鐘離心。繼而，添加500 μ L之RPE溶液，以8000 \times g進行15秒鐘離心。進而添加500 μ L之RPE溶液，以8000 \times g進行2分鐘離心。向存在於RNeasy旋轉柱中之RNA添加無RNase溶液而使之溶出。繼而，自所獲得之RNA使用PrimeScript RT試劑套組(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR037A)而合成cDNA。使用所合成之cDNA及Premix EX Taq(完全即時)(塔卡拉生物公司製造，#RR039A)、Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)進行即時聚合酶鏈鎖反應。作為Taq man探針(Applied Bio Systems公司製造)，OCT4係使用Hs04260367_gH，NANOG係使用Hs04399610_g1，PPIA係使用Hs99999904_m1。機器係使用即時聚合酶鏈鎖反應7500。分析係算出利用PPIA之值修正各目標基因之值所得之相對值而進行比較。

【0162】 其結果為，在與 α 甲殼素奈米纖維組合之多糖類中，包含與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物之培養基組合物之源自人類脂肪之間葉系幹細胞的增生能力最高，且顯示未分化性之OCT4基因及NANOG基因之表現能力較高。包含甲殼素奈米纖維、與甲基纖維素、脫醯化結冷膠、海藻酸之任一種多糖類之混合物之培養基組合物亦使源自人類脂肪之間葉系幹細胞增生，且發現了OCT4基因及NANOG基因之表現亢進作用，但相較於與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物較弱。將活細胞數量之結果示於表24，將NANOG基因表現之結果示於表25，將OCT4基因表現之結果示於表26。

【0163】 [表24]

細胞數	接種時	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
樣品6	1129	2754	9943
樣品16	1129	154	1849
樣品17	1129	834	3764
樣品18	1129	3625	7157

【0164】 [表25]

NANOG/PPIA	接種時	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
樣品6	0.5	5.18	2.62
樣品16	0.5	1.24	1.18
樣品17	0.5	0,75	0.5
樣品18	0.5	2.12	0.57

【0165】 [表26]

OCT4/PPIA	接種時	第7天 (24孔)	第14天 (24孔)
樣品6	0.52	4.43	3.44
樣品16	0.52	1.7	0.93
樣品17	0.52	1	0.56
樣品18	0.52	2.27	0.74

【0166】

(試驗例16：使用甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物、藉由同時解纖所製造之甲殼素奈米纖維與聚葡萄糖胺糖奈米纖維之混合物、或具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的3D培養中之HEK293-IFNβ細胞之增生、存活維持、細胞凝集塊之分散性)

【0167】 製備將上述中所獲得之樣品1以成為0.02%(w/v)或0.1%(w/v)之最終濃度之方式添加於包含10%(v/v)胎牛血清之EMEM培養基(和光純藥公司製造)中而成之培養基組合物。又，製備將樣品6、14或15以成為0.02%(w/v)之最終濃度之方式添加於包含10%(v/v)胎牛血清之EMEM培養基(和光純藥公司製造)中而成之培養基組合物。進而，製備不含有上述基材之未添加培養基組合物(樣品12)。再者，所製備之含有奈米纖維之包含10%(v/v)胎牛血清之EMEM培養基中的各奈米纖維之最終濃度

係如下所示：

【0168】 (1)添加有樣品1之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.02%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0%(w/v))

(2)添加有樣品1之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.1%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0%(w/v))

(3)添加有樣品6之培養基組合物(甲殼素奈米纖維：0.02%(w/v)，聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.08%(w/v))

(4)添加有樣品14之培養基組合物(藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維：0.1%(w/v))

(5)添加有樣品15之培養基組合物(N-乙醯基葡萄糖胺量調節(50%)奈米纖維：0.1%(w/v))

【0169】 接下來，將所培養之穩定地產生人類IFM β 之HEK293-IFM β 細胞以成為約200000細胞/mL之方式於上述各培養基組合物中懸浮後，以1.2 mL/孔接種至24孔平底超低附著表面微量盤(康寧公司製造，#3473)中。將細胞於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態培養最大21天，培養基更換係每隔1天或2天實施。於接種時(第0天)與接種後第7、14、21天，使各培養液懸浮，分注300 μ L，進而添加ATP試劑300 μ L(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒，Promega公司製造)，進行懸浮，於室溫下靜置約10分鐘後，利用FlexStation3(Molecular Devices公司製造)測定發光強度(RLU值)，減去僅培養基之發光值，算出活細胞之數量。又，於接種後第8天、第15天、第21天實施照片攝影，確認細胞球體塊之分散性。

【0170】 其結果為，與未添加之條件相比，於添加有各基材之所有

條件下發現了增生及存活維持效果。又，若使用包含藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維或N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維之培養基組合物，則顯示出較甲殼素奈米纖維單獨時高之細胞密度。又，藉由連續性之觀察，於未添加時，於第8天發現較大之細胞凝集塊，且於甲殼素奈米纖維單獨(樣品1)時，細胞凝集體亦慢慢地變大，且凝集體之數量減少。認為於該等條件下，會產生細胞凝集體彼此之進一步凝集化。另一方面，若使用添加有甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物及包含藉由同時解纖所製備之甲殼素/聚葡萄糖胺糖奈米纖維之培養基組合物，則細胞凝集體彼此之凝集化得到抑制。尤其是若使用包含N-乙醯基葡萄糖胺量經調節之奈米纖維之培養基組合物，則即便於第21天之時間點，亦維持小細胞凝集體分散之傾向。將活細胞數之結果示於圖1，將照片觀察之結果示於圖2(第8天)、圖3(第15天)、圖4(第21天)。

[產業上之可利用性]

【0171】 根據本發明，能夠高效率地生產高品質之附著性細胞(例如間葉系幹細胞)。於藉由本發明所獲得之細胞為幹細胞之情形時，其等係以較佳之狀態維持未分化性或趨化性等特性之非常高品質之幹細胞。因此，藉由本發明所獲得之幹細胞(例如間葉系幹細胞)能夠良好地用於彌補因疾病等而失去之器官或組織。進而，藉由本發明所獲得之細胞分泌物亦可用於各種疾病之治療。因此，認為本發明例如於再生醫療領域中極為有用。

【0172】 本申請案係以於日本提出申請之日本專利特願2018-164042(申請日：2018年8月31日)及日本專利特願2019-134058(申請日：2019年7月19日)為基準，且其內容全部包含於本說明書中。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含：

- (1)甲殼素奈米纖維；及
- (2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類。

【第2項】

如請求項1之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維，且甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維=1：0.5~20。

【第3項】

如請求項1之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為幹細胞。

【第6項】

如請求項5之浮游培養用培養基組合物，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

【第7項】

如請求項5或6之浮游培養用培養基組合物，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

【第8項】

一種附著性細胞之培養方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含

(1)甲殼素奈米纖維；及

(2)聚葡萄糖胺糖奈米纖維或多糖類

之培養基組合物中進行浮游培養。

【第9項】

如請求項8之培養方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維，且培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖胺糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖胺糖奈米纖維=1：0.5~20。

【第10項】

如請求項8之培養方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

【第11項】

如請求項8至10中任一項之培養方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

【第12項】

如請求項8至11中任一項之培養方法，其中附著性細胞為幹細胞。

【第13項】

如請求項12之培養方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

【第14項】

如請求項12或13之培養方法，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

【第15項】

如請求項8至14中任一項之培養方法，其進而包括以下之步驟：

(1)不進行將經浮游培養之細胞自甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維或多糖類剝離之處理，進而添加如請求項1至7中任一項之浮游培養用培養基組合物；及

(2)將步驟(1)中所獲得之混合物供於浮游培養。

【第16項】

一種生產細胞分泌物之方法，其包括如下步驟：將附著性細胞於包含

(1)甲殼素奈米纖維；及

(2)聚葡萄糖奈米纖維或多糖類

之培養基組合物中進行浮游培養。

【第17項】

如請求項16之方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維，且培養基組合物中之甲殼素奈米纖維及聚葡萄糖奈米纖維之比率為甲殼素奈米纖維：聚葡萄糖奈米纖維 = 1：0.5～20。

【第18項】

如請求項16之方法，其中培養基組合物包含甲殼素奈米纖維及多糖類，且多糖類選自由甲基纖維素、脫醯化結冷膠、及海藻酸鈉所組成之群。

【第19項】

如請求項16至18中任一項之方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

【第20項】

如請求項16至19中任一項之方法，其中附著性細胞為幹細胞。

【第21項】

如請求項20之方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

【第22項】

如請求項16至21中任一項之方法，其中培養基組合物中之血清之濃度為2%以下。

【第23項】

如請求項16至22中任一項之方法，其中細胞分泌物為選自由低分子化合物、蛋白質、核酸、及細胞分泌囊泡所組成之群中之至少一者。

【第24項】

一種附著性細胞之浮游培養用培養基組合物，其包含如下奈米纖維，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

【第25項】

如請求項24之浮游培養用培養基組合物，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

【第26項】

如請求項24或25之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為於

浮游培養下自凝集者。

【第27項】

如請求項24至26中任一項之浮游培養用培養基組合物，其中附著性細胞為幹細胞。

【第28項】

如請求項27之浮游培養用培養基組合物，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

【第29項】

如請求項27或28之浮游培養用培養基組合物，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

【第30項】

一種附著性細胞之培養方法，其包括將附著性細胞於包含如下奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養之步驟，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

【第31項】

如請求項30之培養方法，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基-β-D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

【第32項】

如請求項30或31之培養方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

【第33項】

如請求項30至32中任一項之培養方法，其中附著性細胞為幹細胞。

【第34項】

如請求項33之培養方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

【第35項】

如請求項33或34之培養方法，其中浮游培養為用於使幹細胞增生且維持幹細胞之多能性及趨化性者。

【第36項】

如請求項30至35中任一項之培養方法，其進而包括以下之步驟：

(1)不進行將經浮游培養之細胞自具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維剝離之處理，進而添加如請求項24至29中任一項之浮游培養用培養基組合物；及

(2)將步驟(1)中所獲得之混合物供於浮游培養。

【第37項】

一種用以生產細胞分泌物之方法，其包括將附著性細胞於包含如下奈米纖維之培養基組合物中進行浮游培養之步驟，該奈米纖維係具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維，且該特定之乙醯化度為5~70%。

【第38項】

如請求項37之方法，其中培養基組合物中之具有特定之乙醯化度之聚(1,4)-N-乙醯基- β -D-葡萄糖胺奈米纖維的濃度為0.0001~0.2%(w/v)。

【第39項】

如請求項37或38之方法，其中附著性細胞為於浮游培養下自凝集者。

【第40項】

如請求項37至39中任一項之方法，其中附著性細胞為幹細胞。

【第41項】

如請求項40之方法，其中幹細胞為間葉系幹細胞。

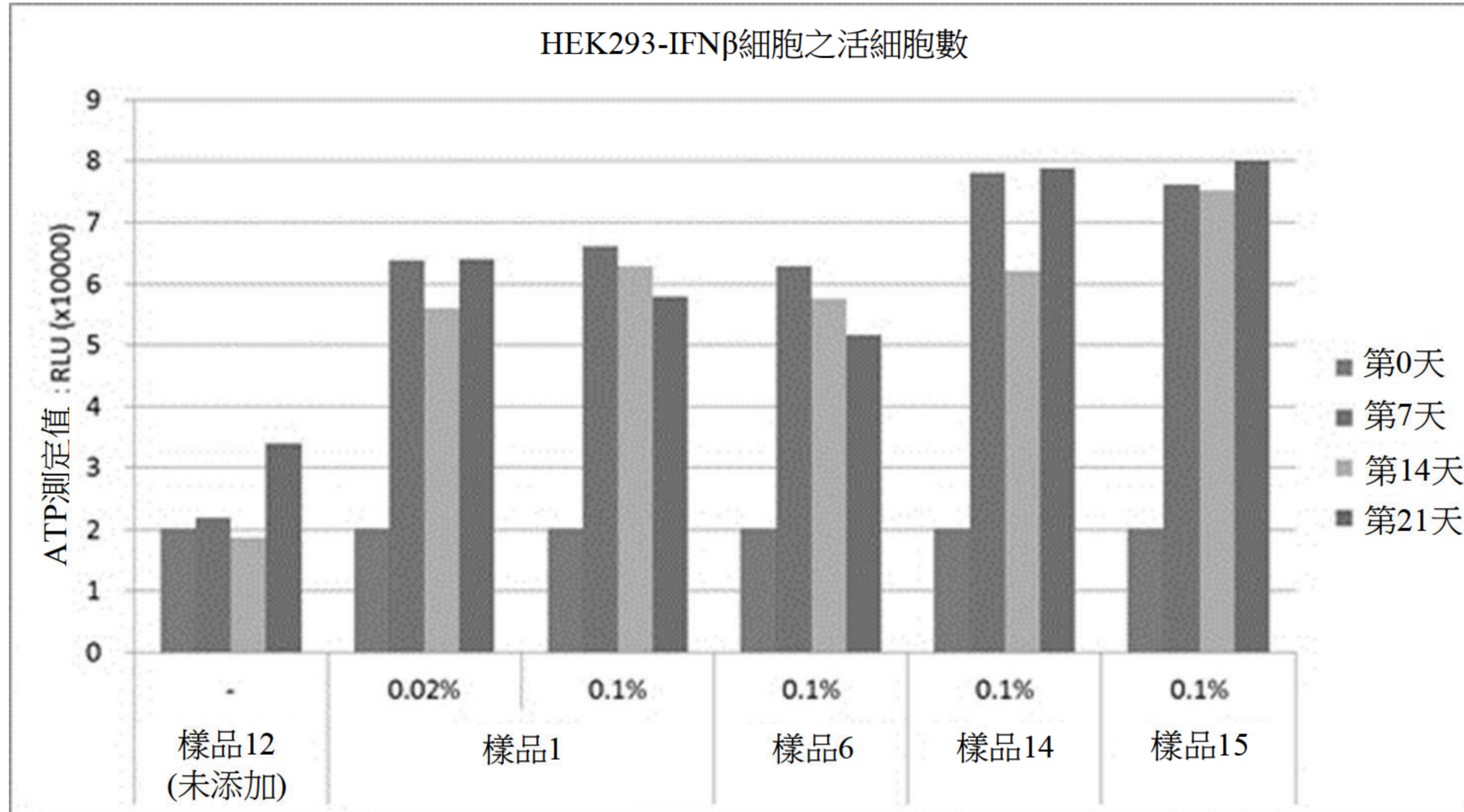
【第42項】

如請求項37至41中任一項之方法，其中培養基組合物中之血清之濃度為2%以下。

【第43項】

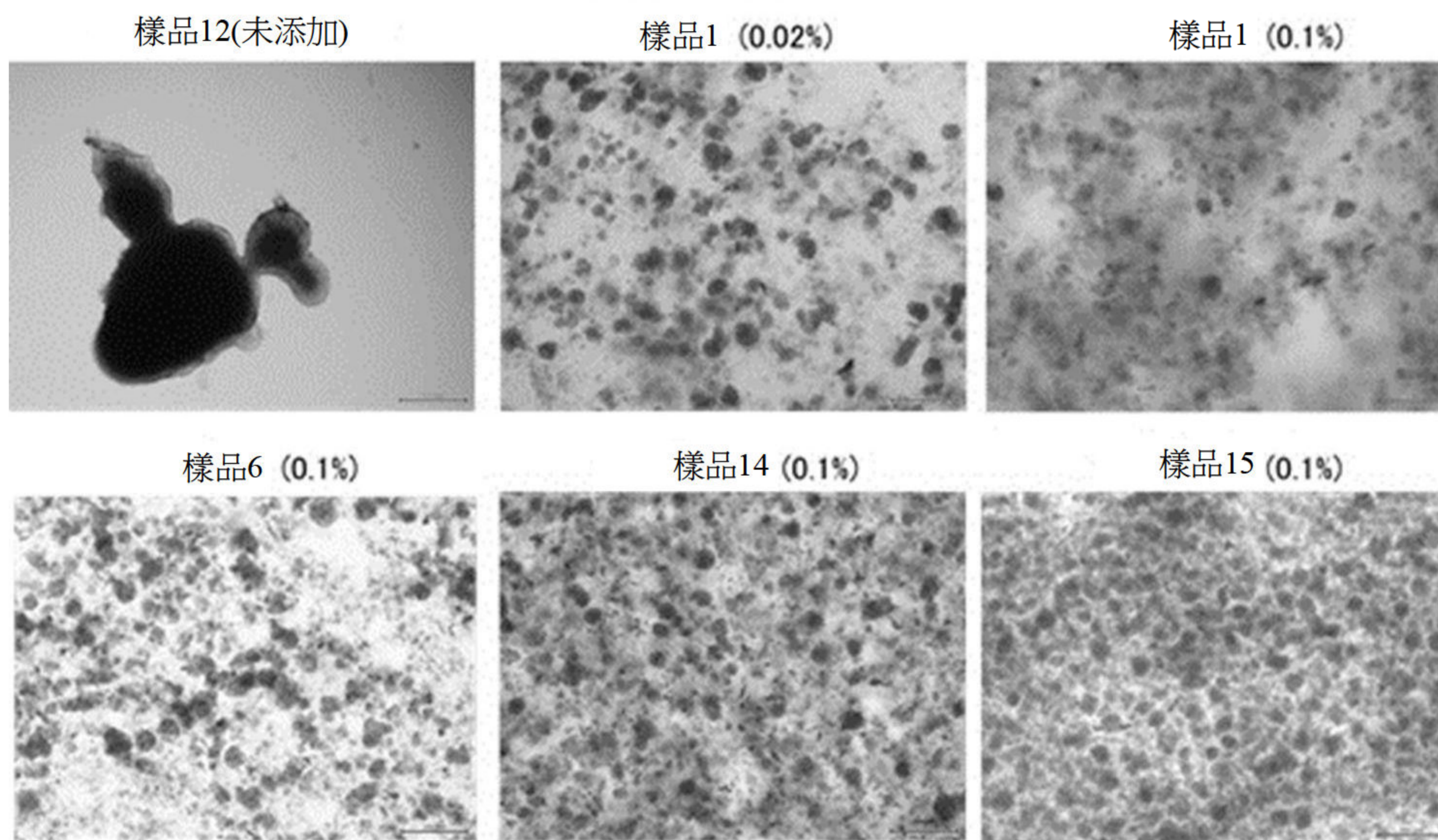
如請求項37至42中任一項之方法，其中細胞分泌物為選自由低分子化合物、蛋白質、核酸、及細胞分泌囊泡所組成之群中之至少一者。

【發明圖式】



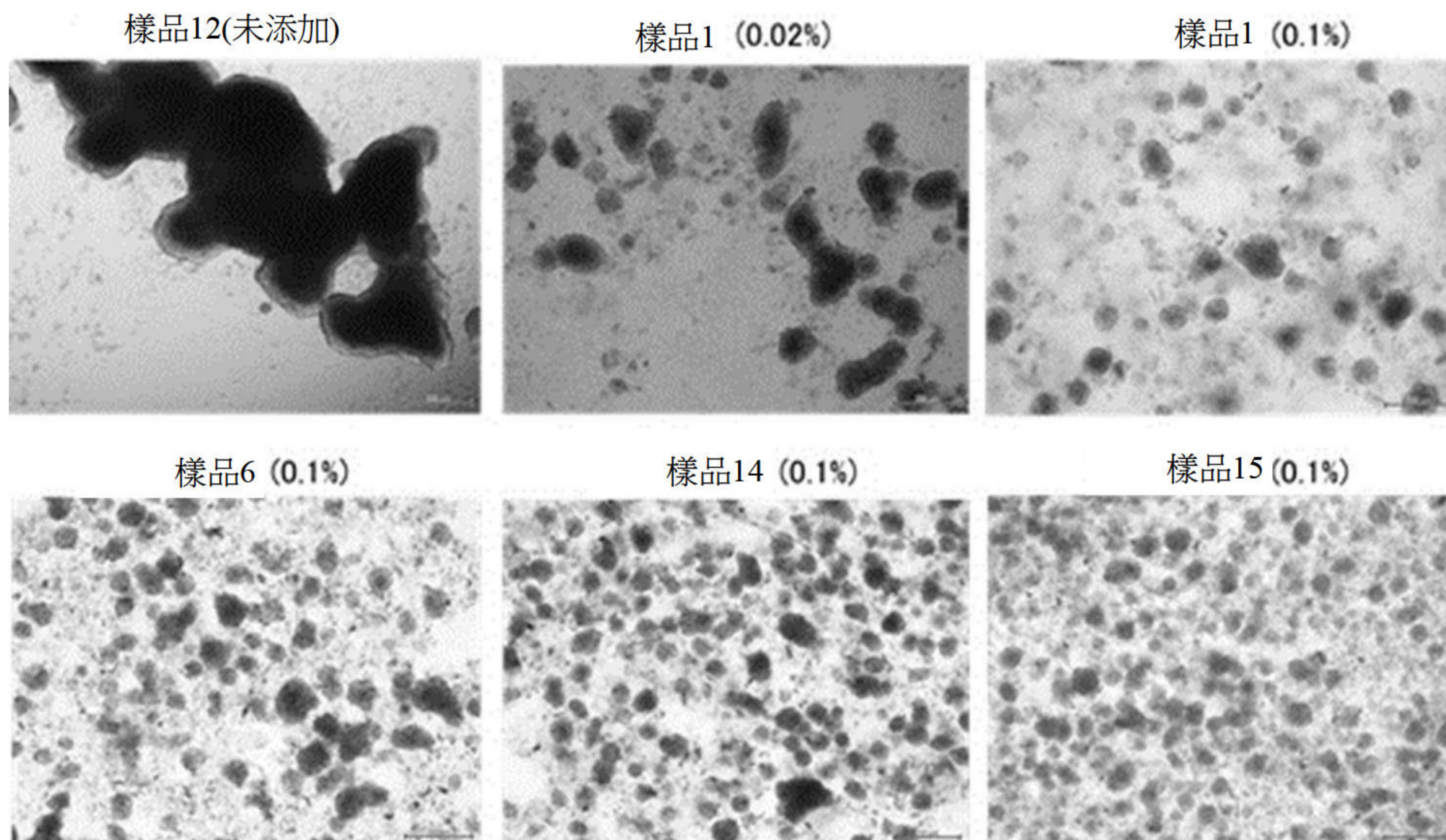
【圖1】

第8天(照片拍攝)



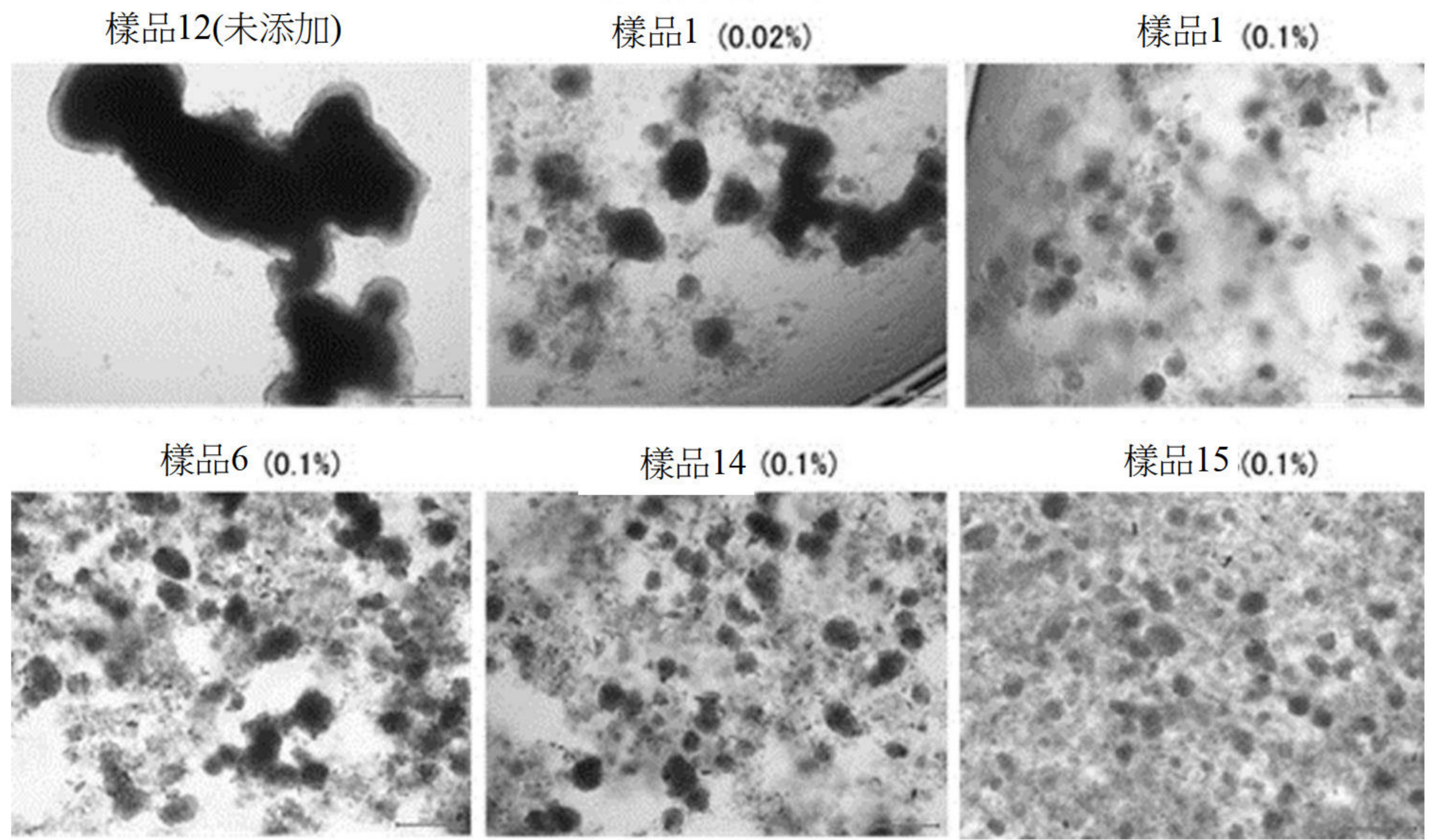
【圖2】

第15天(照片拍攝)



【圖3】

第21天(照片拍攝)



【圖4】