



(21)申請案號：108139728

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 23 日

(51)Int. Cl. : C12N5/00 (2006.01)

C12M3/02 (2006.01)

(30)優先權：2014/01/23 日本
 2014/06/16 日本
 2014/08/28 日本
 2014/10/24 日本

2014-010842
 2014-123772
 2014-174574
 2014-217761

(71)申請人：日商日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
 (JP)

日本

(72)發明人：林寿人 HAYASHI, HISATO (JP)；戶村美沙代 TOMURA, MISAYO (JP)；猿橋康一郎 SARUHASHI, KOICHIRO (JP)；西野泰斗 NISHINO, TAITO (JP)；岩間武久 IWAMA, TAKEHISA (JP)；金木達朗 KANAKI, TATSURO (JP)；大谷彩子 OTANI, AYAKO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：2 項 圖式數：40 共 169 頁

(54)名稱

液體組成物

(57)摘要

本發明係提供一種細胞及/或組織的培養方法，其特徵為使用下述培養基組成物，而將細胞及/或組織在浮游狀態下進行培養；前述培養基組成物係將奈米纖維添加至液體培養基中，並使該奈米纖維均勻地分散在該溶液中，藉由在不會實質上提高該溶液的黏度之情形下，實質上保持住細胞及/或組織，而具有防止其沉降之效果。

The present invention provides a cultivating method of cells and/or tissue, which is characterized by using the following culture medium composition to cultivate cells and/or tissue under a suspension state; the above culture medium composition is prepared by adding a nano fiber to a liquid culture medium and dispersing the nano fiber in the solution evenly, and thus substantially holding the cells and/or tissue without substantially enhancing the viscosity of the solution, and having the effect of preventing their sedimentation.

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

液體組成物

LIQUID COMPOSITION

【中文】

本發明係提供一種細胞及/或組織的培養方法，其特徵為使用下述培養基組成物，而將細胞及/或組織在浮游狀態下進行培養；前述培養基組成物係將奈米纖維添加至液體培養基中，並使該奈米纖維均勻地分散在該溶液中，藉由在不實質上提高該溶液的黏度之情形下，實質上保持住細胞及/或組織，而具有防止其沉降之效果。

【英文】

The present invention provides a cultivating method of cells and/or tissue, which is characterized by using the following culture medium composition to cultivate cells and/or tissue under a suspension state; the above culture medium composition is prepared by adding a nano fiber to a liquid culture medium and dispersing the nano fiber in the solution evenly, and thus substantially holding the cells and/or tissue without substantially enhancing the viscosity of the solution, and having the effect of preventing their sedimentation.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

本案之第 1 圖至第 40 圖為實施例所得到之培養狀態照片圖，並不足以代表本案申請專利範圍所請培養基組成物等之內容特徵。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

液體組成物

LIQUID COMPOSITION

【技術領域】

【0001】本發明係關於使用提高對水分散性之多醣類等奈米纖維，用於將動植物細胞及/或組織，特別是以三次元或浮游狀態進行培養之培養基組成物及其用途。

【先前技術】

【0002】近年，用以使在動物或植物體內扮演不同角色之各種各樣的器官、組織、及細胞在活體外增殖或維持之技術正逐漸發展中。將此等器官、組織在活體外予以增殖或維持，係分別稱為器官培養、組織培養，將從器官、組織分離出之細胞在活體外予以增殖、分化或維持係稱為細胞培養。細胞培養係將分離出之細胞在培養基中在活體外予以增殖、分化或維持之技術，且已成為用以詳細解析活體內的各種器官、組織、細胞的機能及構造所不可或缺者。又，藉由該技術所培養之細胞及/或組織，已利用於化學物質、醫藥品等的藥效及毒性評估、或酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質之大量生產、對因疾病或缺陷所缺失之器官、組織、細胞進行修補之再生醫療、植物之品種改良、基因重組作物之作成等各種各樣的領域中。

【0003】來自動物的細胞，從其性狀可大致二分為浮

游細胞及黏著細胞。浮游細胞係在生育/增殖時不需要支架之細胞，黏著細胞係在生育/增殖時需要支架之細胞，而構成生物體之大部分細胞為後者的黏著細胞。黏著細胞的培養方法，係已知有單層培養、分散培養、包埋培養、微載體培養、及球體(sphere)培養等。

【0004】單層培養係以由玻璃或經施行各種表面處理之合成高分子材料所構成之培養容器、或稱為餵養細胞之輔助細胞作為支架而將目標細胞培養成單層狀之方法，一般而言最普及。舉例而言，已開發出使用對聚苯乙烯實施各種表面處理(電漿處理、電暈處理等)者、經塗覆膠原蛋白、纖維蛋白(fibronectin)、聚離胺酸等細胞黏著因子者或預先接種餵養細胞者等之各種形狀或性狀的培養容器之培養方法。然而，單層培養係由於其二次元的培養環境與在活體內的環境完全不同，因而無法長期維持細胞在活體內所具有之特異性機能，無法再構築與活體內同樣的組織，且由於每一固定面積的細胞數有所限制，故不適用於細胞之大量培養等而會造成問題(專利文獻 1)。又，在餵養細胞上培養目標細胞之方法，會有餵養細胞與目標細胞間之分離造成構成問題之情況(非專利文獻 1)。

【0005】分散培養係將細胞接種於培養基中後，在經實施阻礙細胞附著之表面處理之培養容器中，藉由持續攪拌該培養液而阻礙細胞對培養容器之黏著，以浮游狀態培養黏著細胞之方法。然而，利用該方法所培養之黏著細胞由於無法對支架進行黏著，因而無法應用於為了細胞增殖

而必須對支架進行黏著之細胞。又，由於利用剪切力進行持續破碎而無法發揮本來的細胞機能，因而會有無法大量地培養具有機能的細胞之情況(非專利文獻 2)。

【0006】包埋培養係在瓊脂、甲基纖維素、膠原蛋白凝膠、明膠、纖維蛋白、瓊脂糖、海藻酸鹽等固形或半固體的凝膠基材中埋入細胞，使其固定而進行培養之方法。該方法能夠將細胞以近似活體內之形式進行三次元培養，且由於凝膠基材本身亦有促進細胞的增殖或分化之情況，因而相較於單層培養或分散培養而言，能夠在保持細胞的機能之情形下將細胞高密度地進行培養(專利文獻 2、3)。再者，亦已開發出以在此等凝膠基材中埋入細胞之狀態作成大小為 100 至 300 μm 之微膠囊，並一邊使該微膠囊分散、一邊在水溶液培養基中培養細胞之方法(非專利文獻 3)。然而，此等方法具有在凝膠基材不穿透可見光時會無法進行培養細胞的繼時性觀察，因包含凝膠基材的培養基或微膠囊之黏度高而必須進行用以從該培養基中回收細胞之酵素處理(例如，在膠原蛋白凝膠之情況係膠原蛋白酶處理)等繁雜且對細胞賦予障礙之操作，長期培養時所需的培養基交換係較困難等問題。近年，雖然已開發出藉由熱或剪切力等處理而能夠從凝膠基材中進行細胞回收之技術，但熱或剪切力等會對細胞機能造成不良影響，而且關於該凝膠基材對生物體的安全性仍不明確(專利文獻 4、5，非專利文獻 4、5、6、7)。又，雖然在食品領域中已開發出用以使切成小塊的果實或蔬菜等粒狀食品均勻地分散、浮

游並防止其沉澱或上浮的溶膠(sol)狀食品，但該溶膠狀食品並未考慮將經分散之粒狀食品進行回收，亦未探討是否能夠將細胞或組織以浮游狀態進行培養(專利文獻 6)。已知水溶液中之結冷(gellan)係經鈣離子之作用而被膠化，並形成微細結構(非專利文獻 8)。

【0007】微載體培養係在稍微比水重的微粒子(以下，亦稱為微載體)之表面上使細胞增殖成單層，將該微粒子在燒瓶等培養容器內進行攪拌，施行呈浮游狀態之培養。通常，該方法中所使用之微載體係直徑 100 至 300 μm ，面積 3000 至 6000 cm^2/g ，比重 1.03 至 1.05 之球狀粒子，且由葡聚糖、明膠、海藻酸或聚苯乙烯等素材所構成。在微載體之表面，為了使細胞易於附著，亦可賦予膠原蛋白、明膠或二甲基胺基乙基等荷電基。該方法係由於能夠使培養面積極度增大，因而可應用於細胞之大量培養(專利文獻 7、8)。然而，難以使目標細胞大略均勻地附著在所有的微載體，又，因攪拌中的剪切力而使細胞從微載體脫離並使細胞受到障礙等亦會造成問題(非專利文獻 9)。

【0008】球體培養係使目標細胞形成由數十至數百個所構成之凝集塊(以下，亦稱為球體)後，將該凝集塊在培養基中靜置或震盪而培養之方法。已知球體係細胞密度高，可再構築近似活體內環境之細胞-細胞間相互作用及細胞構造體，相較於單層培養、分散培養法而言，能夠在長期維持細胞機能之情形下進行培養(非專利文獻 10、11)。然而，球體培養係由於在球體的尺寸過大之情況下，球體內

部的營養分之供給及老廢物之排出會變得困難，因而無法形成較大的球體。又，所形成之球體由於必須在培養容器之底面以分散狀態進行培養，因而難以增加每一定體積的球體數，不適於大量培養。再者，球體之作成方法，係已知有懸滴培養、在細胞非黏著表面之培養、在微孔板內之培養、旋轉培養、利用細胞的支架之培養、由離心力或超音波、電場/磁場所致之凝集等，但此等方法係操作繁雜，難以回收球體，也難以控制尺寸及大量生產，對細胞之影響不明，需要特殊的專用容器或裝置等而會造成問題(專利文獻 9)。

【0009】另一方面，對於植物，亦可將細胞、經除去細胞壁而得之原生質體、或植物的葉、莖、根、生長點、種子、胚、花粉等器官、組織、癒傷組織(callus)以無菌的狀態進行培養增加。使用此種植物的組織或細胞之培養技術，亦可進行植物的品種改良或有用物質的生產。用以使植物的細胞或組織在短期間大量地增殖之手法，係已知有將植物細胞或組織在液體培養基進行懸浮培養之方法(非專利文獻 12)。為了達成該等良好的增殖，是以充分的氧供給及均勻的混合狀態之維持、進而以防止細胞的破損等係屬重要。對培養液之氧供給及細胞或組織之懸浮，係有組合通氣及機械性攪拌而施行之情況、及僅藉由通氣而施行之情況，但前者會有以由攪拌所致之細胞或組織的破損為原因而導致增殖不良之情況，另一方面，後者雖然細胞或組織的剪切較少，但會有在高密度培養中難以維持均勻

的混合狀態之情況，因而存在有細胞或組織發生沉降而使增殖效率低下等問題。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0010】

[專利文獻 1]日本專利特開 2001-128660 號公報

[專利文獻 2]日本專利特開昭 62-171680 號公報

[專利文獻 3]日本專利特開昭 63-209581 號公報

[專利文獻 4]日本專利特開 2009-29967 號公報

[專利文獻 5]日本專利特開 2005-60570 號公報

[專利文獻 6]日本專利特開平 8-23893 號公報

[專利文獻 7]日本專利特開 2004-236553 號公報

[專利文獻 8]國際專利公開第 2010/059775 号

[專利文獻 9]日本專利特開 2012-65555 號公報

[非專利文獻]

【0011】

[非專利文獻 1] Klimanskaya 等人，Lancet 2005，365：1636-1641

[非專利文獻 2] King 等人，Curr Opin Chem Biol. 2007，11：394-398

[非專利文獻 3] Murua 等人，J. of Controlled Release 2008，132：76-83

[非專利文獻 4] Mendes，Chemical Society Reviews 2008，37：2512-2529

[非專利文獻 5] Moon 等人，Chemical Society Reviews 2012，41：4860-4883

[非專利文獻 6] Pek 等人，Nature Nanotechnol. 2008，3：671-675

[非專利文獻 7] Liu 等人，Soft Matter 2011，7：5430-5436

[非專利文獻 8] Perez-Campo 等人，Food Hydrocolloids 2012，28：291-300

[非專利文獻 9] Leung 等人，Tissue Engineering 2011，17：165-172

[非專利文獻 10] Stahl 等人，Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004，322：684-692

[非專利文獻 11] Lin 等人，Biotechnol J. 2008，3：1172-1184

[非專利文獻 12] Weathers 等人，Appl Microbiol Biotechnol 2010，85：1339-1351

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0012】本發明之目的係提供一種用於解決上述習知技術之問題，將動植物細胞及/或組織特別是以三次元或浮游狀態進行培養之培養基組成物，以及使用該培養基組成物之動植物細胞及/或組織之培養方法。

[解決課題之手段]

【0013】本發明者等人進行深入探討，結果發現藉由將由纖維素(cellulose)或甲殼素(chitin)等多醣類所構成之

奈米纖維混合至液體培養基中，便可在不會實質上提高該液體培養基的黏度之情形下，使動植物細胞及/或組織在靜置狀態下進行浮游培養，並藉由使用此培養基組成物進行培養，而使細胞之增殖活性亢進。另外，發現不僅是纖維素等非水溶性多醣類，脫醯化結冷膠等水溶性多醣類也可在液體培養基中形成纖維狀構造體，其可在不會實質上提高液體培養基的黏度之情形下，使動植物細胞及/或組織在靜置狀態下進行浮游培養。並且，發現可從該等培養基組成物中容易回收所培養之細胞及/或組織。基於上述見識，經更進一步之檢討，遂完成本發明。

【0014】 即，本發明係如下述：

【0015】

[1] 一種培養基組成物，係能夠使細胞或組織浮游而進行培養之培養基組成物，其係含有奈米纖維。

[2] 如[1]所述之培養基組成物，其中，在培養時之培養基組成物的交換處理及培養終了後，可回收細胞或組織。

[3] 如[1]所述之培養基組成物，其中，在回收細胞或組織時，均不需要溫度變化、化學處理、酵素處理、剪切力之任一者。

[4] 如[1]所述之培養基組成物，其黏度為 $8 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下。

[5] 如[1]所述之培養基組成物，其中，前述奈米纖維之平均纖維徑為 0.001 至 $1.00 \mu\text{m}$ ，平均纖維長(L)相對於平均纖維徑(D)之比率(L/D)為 2 至 500。

[6] 如[1]所述之培養基組成物，其中，前述奈米纖維係由

高分子化合物所構成。

[7] 如[6]所述之培養基組成物，其中，前述高分子化合物為多醣類。

[8] 如[7]所述之培養基組成物，其中，前述多醣類係包含：

從由纖維素、甲殼素及殼聚醣(chitosan)所組成之群組中選出之任一種非水溶性多醣；或

從由透明質酸、結冷膠、脫醯化結冷膠(deacylated gellan gum)、鼠李聚糖膠(rhamsan gum)、迪特膠(diutan gum)、黃原膠、鹿角菜膠、三仙膠、己糖醛酸、褐藻多醣、果膠、果膠酸、果膠酯酸、硫酸乙醯肝素、肝素、硫酸類肝素、硫酸角質、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸鼠李聚糖、海藻酸及該等之鹽所組成之群組中選出之水溶性多醣。

[9] 如[8]所述之培養基組成物，其中，前述多醣類係包含纖維素或甲殼素。

[10] 如[9]所述之培養基組成物，其中，前述奈米纖維係藉由粉碎所得者。

[11] 如[1]至[10]中任一項所述之培養基組成物，其係用於細胞培養。

[12] 如[11]所述之培養基組成物，其中，前述細胞為黏著細胞或浮游細胞。

[13] 如[12]所述之培養基組成物，其中，前述黏著細胞為球體。

[14] 一種細胞或組織的培養物，係包含[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物、以及細胞或組織。

[15] 一種細胞或組織的培養方法，係在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將細胞或組織進行培養。

[16] 一種細胞或組織的回收方法，係從[14]所述之培養物中分離出細胞或組織。

[17] 如[16]所述之細胞或組織的回收方法，其中，前述分離為離心分離。

[18] 一種球體的製造方法，係在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將黏著細胞進行培養。

[19] 一種培養基添加劑，係用於調製[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物的培養基添加劑，其係含有該奈米纖維或構成該奈米纖維之水溶性高分子化合物。

[20] 一種培養基組成物的製造方法，係將[19]所述之培養基添加劑與培養基進行混合。

[21] 一種[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物的製造方法，其係將該奈米纖維或構成該奈米纖維之水溶性高分子化合物、與培養基進行混合。

[22] 一種細胞或組織的保存方法，係在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將細胞或組織進行保存。

[23] 一種細胞或組織的輸送方法，係在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將細胞或組織進行輸送。

[24] 一種細胞或組織的增殖方法，係在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將細胞或組織進行培養。

[25] 一種黏著細胞的繼代培養方法，係包含下述步驟：

(1) 在[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中將黏著細

胞進行浮游培養；以及

(2) 不進行從培養容器剝離細胞之操作，而是(i)在由步驟(1)之浮游培養所得的含有黏著細胞之培養物中添加新鮮的[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物，或是(ii)在新鮮的[1]至[13]中任一項所述之培養基組成物中添加由步驟(1)之浮游培養所得的含有黏著細胞之培養物之全部或一部分。

[26] 一種黏著細胞的增殖方法，係包含：在含有甲殼素奈米纖維之培養基組成物中，將黏著細胞在附著於該甲殼素奈米纖維之狀態下進行浮游培養。

[27] 如[26]所述之黏著細胞的增殖方法，其中，培養基組成物中之甲殼素奈米纖維之含量為 0.0001%(重量/容量)以上、0.1%(重量/容量)以下。

[發明之效果]

【0016】 本發明係提供一種含有奈米纖維(尤其是由多醣類所構成之奈米纖維)的培養基組成物。若使用該培養基組成物，則可不伴隨著有會引起細胞或組織之障礙及機能喪失之危險的震盪及旋轉等操作，而將細胞及/或組織在浮游狀態下進行培養。並且，若使用該培養基組成物，則在培養時，不僅可容易交換培養基，還可容易地回收所培養之細胞及/或組織。該培養方法係適用於動物活體或從植物體採取之細胞及/或組織，可使目標細胞及/或組織在不損害其機能之情形下大量予以調製。而且，由該培養方法所得之細胞及/或組織係可在實施化學物質、醫藥品等的藥效及毒性評估、或酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質

之大量生產、對因疾病或缺陷所缺失之器官、組織、細胞進行修補之再生醫療等時加以利用。

【0017】另外，若使用本發明的培養基組成物，則可將細胞或組織維持於接近活體內之環境，故有用於細胞或組織之保存及輸送。例如，當在盤上將細胞予以黏著培養並直接輸送時，雖然會有因輸送中之震動而使細胞從盤剝離等使細胞原本所具有之機能降低之情形，但本發明的培養基組成物會使奈米纖維形成三次元網絡，由此去支撐細胞，而使細胞可保持浮游之狀態，故可避免輸送中之震動所致之從盤剝離等細胞之損傷，並可在使細胞維持原本之機能之狀態下保存及輸送細胞。

【圖式簡單說明】

【0018】

第 1 圖係顯示利用培養基組成物培養 HepG2 細胞的球體，結果球體係均勻地分散，且能夠以浮游狀態進行培養之圖。

第 2 圖係顯示利用培養基組成物培養 HeLa 細胞的球體，結果球體係均勻地分散，且能夠以浮游狀態進行培養之圖。

第 3 圖係顯示利用培養基組成物培養 HeLa 細胞的球體，並對本球體進行顯微鏡觀察，結果相較於既存的培養基而言，球體彼此間的匯集受到抑制之圖。

第 4 圖係顯示利用培養基組成物培養附著有 HepG2 細胞之微載體，結果 HepG2 細胞能夠在微載體上進行增殖之

圖。

第 5 圖係顯示在培養基組成物中添加 HeLa 細胞的球體時，球體係均勻地分散，且呈浮游狀態之圖。

第 6 圖係顯示藉由培養基組成物形成 HeLa 細胞的球體之圖。

第 7 圖係顯示作為構造體之一態樣的薄膜之圖。脫醯化結冷膠對培養基組成物的濃度為 0.02%(重量/容量)。

第 8 圖係顯示藉由培養基組成物形成 HepG2 細胞的球體之圖。

第 9 圖係顯示將附著有 HepG2 細胞之塗覆層黏蛋白(laminin)的 GEM 利用培養基組成物進行培養時之浮游狀態之圖。

第 10 圖係顯示將包埋有 HepG2 細胞之海藻酸珠粒利用培養基組成物進行培養時之浮游狀態之圖。

第 11 圖係顯示將包埋有 HepG2 細胞之膠原蛋白凝膠膠囊利用培養基組成物進行培養時之浮游狀態之圖。

第 12 圖係顯示利用培養基組成物將來自水稻的癒傷組織進行培養時之浮游狀態之圖。

第 13 圖係顯示 25°C 時各培養基組成物之黏度。

第 14 圖係顯示實施例 1 之含有 MNC 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。

第 15 圖係顯示實施例 2 之含有 PNC 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。

第 16 圖係顯示實施例 3 之含有 CT 之培養基組成物的

掃描式電子顯微鏡照片。

第 17 圖係顯示實施例 4 之含有 DAG 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。

第 18 圖係顯示實施例 5 之含有 Car 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。於室溫下乾燥。

第 19 圖係顯示實施例 5 之含有 Car 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。於 110°C 下乾燥。

第 20 圖係顯示比較例 3 之含有 Xan 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。

第 21 圖係顯示比較例 4 之含有 DU 之培養基組成物的掃描式電子顯微鏡照片。

第 22 圖係顯示在實施例 1 之含有 MNC 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 MNC 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 23 圖係顯示在實施例 2 之含有 PNC 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 PNC 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 24 圖係顯示在實施例 3 之含有 CT 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 CT 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 25 圖係顯示在實施例 4 之含有 DAG 之培養基組成

物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 DAG 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 26 圖係顯示在實施例 5 之含有 Car 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 Car 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 27 圖係顯示在實施例 5 之含有 Xan 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 Xan 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 28 圖係顯示在比較例 4 之含有 DU 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 DU 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 29 圖係顯示在比較例 5 之含有 Alg 之培養基組成物中將 HepG2 細胞的球體進行浮游培養 6 天後，對球體之分散狀態的觀察結果。從左到右之 Alg 濃度為 0.01、0.03、0.05、0.07 及 0.1 w/v%。

第 30 圖係顯示將 MCF7 細胞在實施例 1'及比較例 5'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 31 圖係顯示將 MCF7 細胞在實施例 2'及 3'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 32 圖係顯示將 MCF7 細胞在實施例 4'及實施例 5'

之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 33 圖係顯示將 MCF7 細胞在比較例 3'及 4'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 34 圖係顯示將 A375 細胞在實施例 1'及比較例 5'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 35 圖係顯示將 A375 細胞在實施例 2'及 3'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 36 圖係顯示將 A375 細胞在實施例 4'及實施例 5'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 37 圖係顯示將 A375 細胞在比較例 3'及 4'之培養基組成物中開始浮游培養第 6 天時之 RLU 值。

第 38 圖係顯示在開始浮游培養第 2 天時對各培養基組成物中之 MCF7 細胞之分散狀態以顯微鏡觀察之結果。

第 39 圖係顯示在開始浮游培養第 2 天時對各培養基組成物中之 A375 細胞之分散狀態以顯微鏡觀察之結果。

第 40 圖係顯示在開始浮游培養第 4 天時對各培養基組成物中之 MDCK 細胞之分散狀態以顯微鏡觀察之結果。

【實施方式】

【0019】 以下，進一步詳細說明本發明。

針對本說明書中所使用之用語，係如以下所定義。

【0020】 本發明中之細胞係指構成動物或植物之最基本的單位，且在細胞膜的內部保有細胞質及各種細胞小器官作為其要素者。此時，內含 DNA 的核可包含在細胞內部，亦可不包含在細胞內部。舉例而言，本發明中之來自

動物的細胞中，可包含：精子或卵子等生殖細胞、構成生物體之體細胞、幹細胞、前驅細胞、從生物體分離出之癌細胞、從生物體分離出並獲得不死化能力而在體外安定維持之細胞(細胞株)、從生物體分離出並人為地達成基因突變之細胞、從生物體分離出並人為地將核進行交換而成之細胞等。就構成生物體之體細胞之例而言，雖然並不受以下所限定，但可包含：纖維母細胞、骨髓細胞、B 淋巴球、T 淋巴球、嗜中性球、紅血球、血小板、巨噬細胞、單核球、骨細胞、骨髓細胞、周細胞、樹突狀細胞、角質細胞、脂肪細胞、間葉細胞、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、神經膠細胞、神經元、寡樹突細胞、小神經膠質細胞、星狀膠細胞、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)、胰臟 β 細胞、黑色素細胞、造血前驅細胞、及單核細胞等。該體細胞可包含例如從皮膚、腎臟、脾臟、腎上腺、肝臟、肺、卵巢、胰臟、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、腦或神經組織等的任意組織所採取之細胞。幹細胞係指兼具複製自體本身之能力及分化成其他複數種系統的細胞之能力之細胞，就其例而言，雖然並不受以下所限定，但可包含：胚胎幹細胞(ES 細胞)、胚胎腫瘤細胞、胚胎生殖幹細胞、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)、神經幹細胞、造血幹細胞、間葉系統幹細胞、肝幹細胞、胰幹細胞、肌幹

細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛囊幹細胞等。前驅細胞係指處於從前述幹細胞分化成特定的體細胞或生殖細胞之途中的階段之細胞。癌細胞係指從體細胞衍生而獲得無限的增殖能力之細胞。細胞株係指藉由在活體外的人為操作而獲得無限的增殖能力之細胞，就其例而言，雖然並不受以下所限定，但可包含：CHO(中國倉鼠卵巢細胞株)、HCT116、Huh7、HEK293(人類胎兒腎細胞)、HeLa(人類子宮癌細胞株)、HepG2(人類肝癌細胞株)、UT7/ TPO(人類白血病細胞株)、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five(註冊商標)、Vero 等。

【0021】本發明中之來自植物的細胞中，可包含從植物體的各組織分離出之細胞，亦可包含從該細胞以人為方式去除細胞壁而成之原生質體。

【0022】本發明中之組織係指數種具有不同性質或機能之細胞以一定的樣式集合而成之構造單位，動物的組織之例可包含上皮組織、結締組織、肌組織、神經組織等。植物的組織之例可包含分裂組織、表皮組織、同化組織、葉肉組織、通道組織、機械組織、柔軟組織(parenchyma)、脫分化(dedifferentiation)而成之細胞塊(癒傷組織)等。

【0023】培養細胞及/或組織時，所培養之細胞及/或組織可從前述所記載之細胞及/或組織中任意地選擇而進行培養。細胞及/或組織可由動物或植物體直接採取。細胞及/或組織係藉由實施特定的處理而從動物或植物體衍生、成

長，或亦可使其轉形後進行採取。此時，該處理可在活體內，亦可在活體外。作為動物，可列舉例如魚類、兩生類、爬蟲類、鳥類、泛甲殼類、六足類、哺乳類等。作為哺乳動物之例，雖然並無限定，但可列舉大鼠、小鼠、兔、天竺鼠、松鼠、倉鼠、田鼠、鴨嘴獸、海豚、鯨、犬、貓、山羊、牛、馬、綿羊、豬、象、普通狨(common marmoset)、松鼠猴、獼猴、黑猩猩及人類。作為植物，只要是所採取之細胞及/或組織能夠進行液體培養者，並無特別限定。可列舉例如生產生藥類(例如，皂素、生物鹼類、小蘗鹼、莨菪苷、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醣體(例如，花青素、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、染色茜草(*Rubia tinctorum*)、番紅花等)、或生產醫藥品原體之植物等，但不限定於該等。

【0024】本發明中之細胞及/或組織之浮游，係指細胞及/或組織呈現未對培養容器進行黏著之狀態(非黏著)。再者，本發明中，在使細胞及/或組織進行增殖、分化或維持時，在不伴隨著對液體培養基組成物之來自外部的壓力或震動、或在該組成物中的震盪、旋轉操作等之情形下，細胞及/或組織亦在該液體培養基組成物中均勻地分散且呈浮游狀態之狀態係稱為「浮游靜置」，並將以該狀態培養細胞及/或組織稱為「浮游靜置培養」。又，「浮游靜置」中能夠浮游之時間係至少5分鐘以上，較佳為1小時以上、24

小時以上、48 小時以上、6 日以上、21 日以上，但只要能保持浮游狀態，即不限定於此等期間。

【0025】較佳的態樣中，本發明的培養基組成物係可在能夠維持或培養細胞或組織之溫度範圍(例如 0 至 40°C)中之至少 1 點而進行細胞及/或組織的浮游靜置。本發明的培養基組成物係較佳為可在 25 至 37°C 之溫度範圍中之至少 1 點，最佳為在 37°C，進行細胞及/或組織的浮游靜置。

【0026】關於是否可浮游靜置，則可藉由例如使聚苯乙烯珠粒(Size 500-600 μ m, Polysciences Inc.製)均勻分散於評估對象之培養基組成物中並靜置於 25°C，觀察該細胞的浮游狀態是否維持至少 5 分鐘以上(較佳為 24 小時以上、48 小時以上)，而評估之。

【0027】本發明之培養基組成物，係含有能夠使細胞或組織浮游而進行培養(較佳係能夠進行浮游靜置培養)之奈米纖維及培養基之組成物。

該培養基組成物較佳係在培養時之培養基組成物的交換處理及培養終了後能夠進行細胞或組織的回收之組成物，更佳係在細胞或組織的回收時，不需要溫度變化、化學處理、酵素處理、剪切力之任一者之組成物。

【0028】[奈米纖維]

本發明之培養基組成物中所含之奈米纖維，係指在液體培養基中顯示出使細胞及/或組織均勻地浮游之效果者。更詳細而言，由低分子化合物或高分子化合物經由以共價鍵或離子鍵、靜電相互作用或疏水性相互作用、凡得

瓦力等進行集合及自我組織化而在液體培養基中形成奈米纖維者、或是將由高分子化合物所構成之較大的纖維構造體經高壓處理等而微細化所得之奈米纖維等，係可被列舉作為本發明之培養基組成物中所含之奈米纖維。雖不是被理論所拘束，但在本發明之培養基組成物中，奈米纖維係形成三次元網絡，並由其去支撐細胞或組織，藉此而維持細胞或組織的浮游狀態。

【0029】 本案說明書中，奈米纖維係指平均纖維徑(D)為 0.001 至 1.00 μm 之纖維。本發明所用之奈米纖維之平均纖維徑係較佳為 0.005 至 0.50 μm ，更佳為 0.01 至 0.05 μm ，又更佳為 0.01 至 0.02 μm 。平均纖維徑若未達 0.001 μm ，則奈米纖維會太微細，而有無法獲得浮游效果之虞，而有導致使含有該纖維之培養基組成物之特性無法獲得改善的可能性。

【0030】 本發明所用之奈米纖維之長寬比(L/D)係由平均纖維長/平均纖維徑所得，通常為 2 至 500，較佳為 5 至 300，更佳為 10 至 250。長寬比未達 2 時，會缺乏培養基組成物中之分散性，而有無法充分獲得浮游作用之虞。若超過 500，則表示纖維長會變極大，故會有因該組成物之黏度上昇而對培養基交換等繼代操作造成妨礙之虞。此外，培養基組成物會變成難以使可見光透過，故會導致透明性降低，而可能難以經時性地觀察培養細胞，並對使用吸光/螢光/發光等之細胞評估造成妨礙。

【0031】 尚且，本案說明書中，奈米纖維之平均纖維

徑(D)係依以下敘述而求得。首先，將應研商事股份公司製之火棉膠支持膜以日本電子股份公司製之離子清潔機(JIC-410)施行 3 分鐘親水化處理，將評估對象之奈米纖維分散液(以超純水稀釋)低下數滴，於室溫予以乾燥。將其使用日立製作所股份公司製之穿透型電子顯微鏡(TEM, H-8000)(10,000 倍)以加速電壓 200kV 進行觀察，使用所得之圖像，對於樣本數：200 至 250 支之奈米纖維，計測一支一支的纖維徑，將其數平均值作為平均纖維徑(D)。

【0032】另外，平均纖維長(L)係依以下敘述而求得。將評估對象之奈米纖維分散液使用純水以成為 100ppm 之方式稀釋，並使用超音波洗淨機使奈米纖維均勻地分散。將此奈米纖維分散液澆鑄於預先經使用濃硫酸將表面予以親水化處理之矽晶圓上，於 110°C 乾燥 1 小時，而製成試料。將所得之試料以日本電子股份公司製掃描式電子顯微鏡(SEM, JSM-7400F)(2,000 倍)觀察，使用該觀察所得之圖像，對於樣本數：150 至 250 支之奈米纖維，計測一支一支的纖維長，將其數平均值作為平均纖維長(L)。

【0033】本發明所用之奈米纖維，係在與液體培養基進行混合時，會一邊保持其一次纖維徑一邊使該奈米纖維在該液體中均勻地分散，且不會實質上提高該液體的黏度，而實質上保持細胞及/或組織，並具有防止其沉降之效果者。所謂「不會實質上提高液體的黏度」係意指液體的黏度不超過 8mPa·s。此時的該液體的黏度(即，藉由本發明之製造方法所製造之培養基組成物的黏度)為 8mPa·s

以下，較佳為 $4\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以下，更佳為 $2\text{mPa}\cdot\text{s}$ 以下。再者，只要是在使奈米纖維分散於液體培養基中時，不會實質上提高該液體的黏度，且顯示使細胞及/或組織均勻地浮游(較佳係使其浮游靜置)之效果者，關於奈米纖維的化學構造、分子量、物性等並無任何限制。

包含奈米纖維之液體的黏度，係可藉由例如後述之實施例所記載之方法進行測定。具體而言，可在 25°C 條件下使用音叉震動式黏度測定(SV-1A, A&D Company Ltd.)進行評估。

【0034】作為構成奈米纖維之原料的例子，雖然並無特別限制，但可列舉低分子化合物及高分子化合物。

作為本發明中所使用之低分子化合物的較佳具體例，雖然並無特別限制，但可列舉：L-異白胺酸衍生物或 L-纈胺酸衍生物、L-離胺酸衍生物等胺基酸衍生物；反式-1,2-二胺基環己烷二胺衍生物等環己烷二胺衍生物；5-胺基異酞酸衍生物、R-12-羥基硬脂酸、1,3,5-苯三甲醯亞胺、順式-1,3,5-環己烷三甲醯胺、2,4-二亞苄基-D-山梨糖醇、N-月桂醯基-L-麩胺酸- α , γ -雙-正丁基醯胺、脫氫松脂酸鈣等低分子膠化劑。

【0035】作為本發明中所使用之高分子化合物的較佳具體例，雖然並無特別限制，但可列舉多醣類、多肽等。

【0036】多醣類係指由單糖類(例如，三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)聚合 10 個以上而成之糖聚合物。多醣類係包括非水溶性多醣類及水溶性多醣類。

【0037】非水溶性多醣類係可列舉如：纖維素、半纖維素等纖維素類；甲殼素、殼聚醣等，但不限定於此等。

【0038】水溶性多醣類係可列舉如具有陰離子性官能基之酸性多醣類。具有陰離子性官能基之酸性多醣類，雖然並無特別限制，但可列舉如：在其構造中具有糖醛酸(例如，葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸)之多醣類；在構造中具有硫酸或磷酸之多醣類、或持有該兩者的構造之多醣類。更具體而言，可例示由來自透明質酸、結冷膠、脫醯化結冷膠(DAG)、鼠李聚糖膠(rhamsan gum)、迪特膠(diutan gum)、黃原膠、鹿角菜膠、三仙膠、己糖醛酸、褐藻多醣、果膠、果膠酸、果膠酯酸、硫酸乙醯肝素、肝素、硫酸類肝素、硫酸角質、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸鼠李聚糖、海藻酸及該等之鹽所組成之群組中之1種或2種以上所構成者。

作為此處所謂的鹽，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、苄基甲基己基癸基銨、膽鹼等四級銨鹽；與吡啶、三乙基胺、二異丙基胺、乙醇胺、二乙醇胺、胺基丁三醇(tromethamine)、葡甲胺(meglumine)、普魯卡因(procaine)、氯普魯卡因(chloroprocaine)等有機胺所成之鹽；與甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸等胺基酸所成之鹽等。

【0039】作為多肽，係可列舉如在活體內構成纖維之多肽。具體而言，可列舉如膠原蛋白、彈性蛋白、肌凝蛋

白、角蛋白、類澱粉蛋白、絲蛋白、肌動蛋白、微管蛋白等，但不限定於此等。

【0040】作為構成本發明所用之奈米纖維的原料，不僅包括來自天然之物質，也包括由微生物所產生之物質、由基因工程所產生之物質、或使用酵素或化學反應而人工合成之物質。構成本發明所用之奈米纖維的原料係較佳為來自天然之物質(亦即，由天然所萃取之物質)、或將其藉由化學反應或酵素反應進行修飾而得之物質。

【0041】在一態樣中，多醣糖類係以非水溶性多醣類為佳。較佳之非水溶性多醣類可列舉如：纖維素；甲殼素、殼聚醣等甲殼素。若考慮到可使培養基組成物之黏度降低之特點與容易回收細胞或組織之特點，則以纖維素及甲殼素為最佳。

【0042】纖維素係指由屬於葡萄糖之6員環的D-葡萄糖吡喃糖進行 β -1,4-糖苷鏈結而成之天然高分子化合物。原料係可使用例如木材、竹、麻、黃麻、洋麻、棉、農作物/食物殘渣等來自植物之纖維素，或是細菌纖維素、剛毛藻(Cladophora)、灰色植物(灰胞藻(Glaucocystis))、法囊藻(Valonia)、海鞘纖維素等由微生物所產生或由動物所產生之纖維素。來自植物之纖維素係由被稱為微原纖維(microfibril)之非常細的纖維更進一步成束，並形成原纖維、薄層(lamella)、纖維細胞及階段性上為高階之構造。此外，細菌纖維素則是由菌細胞所分泌之纖維素之微原纖維以其原本之粗細直接形成微細之網眼構造。

【0043】 在本發明中，棉或細菌纖維素等高純度之纖維素原料係可直接作為原料使用，但除此以外之來自植物之纖維素等則以使用經分離/精製者為佳。在本發明中，較適用之纖維素為棉纖維素、細菌纖維素、牛皮紙漿纖維素、微結晶纖維素等。尤其是因為具有高之浮游作用，故以牛皮紙漿纖維素為適用。

【0044】 甲殼素質係指從由甲殼素及殼聚醣所組成之群組中選出之 1 種以上之糖質。構成甲殼素及殼聚醣之主要糖單位分別是 N-乙醯基葡萄糖胺及葡萄糖胺，一般而言，N-乙醯基葡萄糖胺之含量多而對酸性水溶液呈難溶性的是甲殼素，葡萄糖胺之含量多而對酸性水溶液呈可溶性的是殼聚醣。在本案說明書中，為了方便，在構成糖分中 N-乙醯基葡萄糖胺所佔比例為 50% 以上者係被稱為甲殼素，未達 50% 者則被稱為殼聚醣。從達成高之浮游作用的觀點來看，在構成甲殼素之糖單位中 N-乙醯基葡萄糖胺所佔比例係以越高越佳。在構成甲殼素之糖單位中 N-乙醯基葡萄糖胺所佔比例較佳為 80% 以上，更佳為 90% 以上，又更佳為 98% 以上，最佳為 100%。

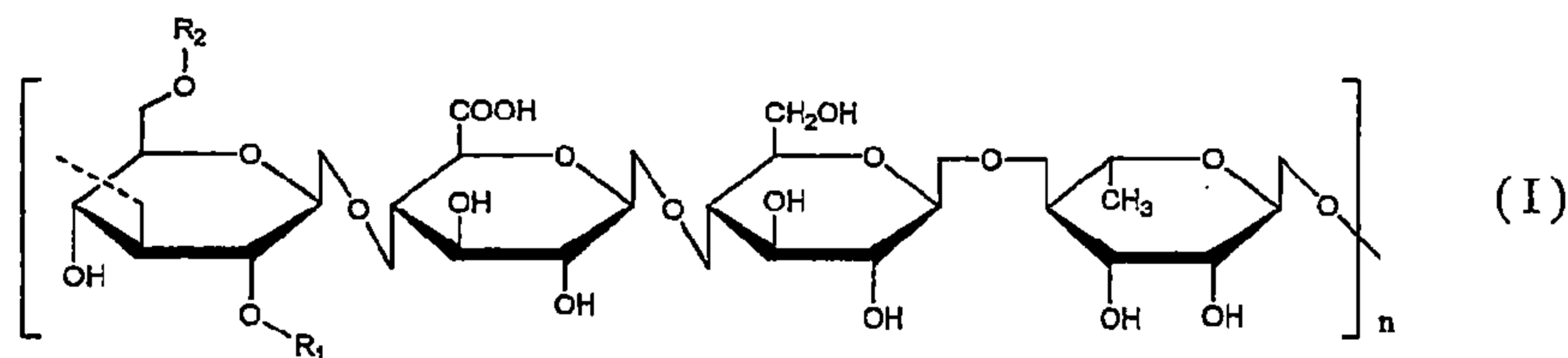
【0045】 甲殼素之原料係可使用例如蝦、蟹、昆蟲、貝、菇類等多種生物資源。本發明所用之甲殼素，係可為來自蟹殼或蝦殼之甲殼素等具有 α 型結晶構造之甲殼素，亦可為來自烏賊骨之甲殼素等具有 β 型結晶構造之甲殼素。蟹或蝦之外殼常被視為產業廢棄物，故從容易獲得且有效利用之觀點來看係適合作為原料，但為了要去除其所

含之屬於雜質之蛋白質及灰分等，而需要脫蛋白步驟及脫灰步驟。因此，在本發明中，係以使用已施行脫基質處理之精製甲殼素為佳。精製甲殼素係已有市售品。

【0046】 在一態樣中，多醣類為水溶性多醣類。較佳之水溶性多醣類可列舉如脫醯化結冷膠、鹿角菜膠等。從達成高之浮游作用的觀點來看，以脫醯化結冷膠為最佳。

【0047】 脫醯化結冷膠，係指以 1-3 鍵結之葡萄糖、1-4 鍵結之葡萄糖醛酸、1-4 鍵結之葡萄糖及 1-4 鍵結之鼠李糖之 4 分子糖作為構成單位之直鏈狀高分子多醣類，且係在以下之通式(I)中， R_1 、 R_2 同時為氫原子， n 為 2 以上之整數所表示之多醣類。惟， R_1 亦可包含甘油基， R_2 亦可包含乙醯基，而乙醯基及甘油基的含量較佳為 10%以下，更佳為 1%以下。

【0048】



【0049】 就結冷膠的製造方法而言，只要利用發酵培養基將生產微生物進行培養，以通常的精製方法將在菌體外生產之黏膜物進行回收、乾燥、粉碎等步驟後，作成粉末狀即可。又，在脫醯化結冷膠之情況，則是利用發酵培養基將生產結冷膠之微生物進行培養，並將在菌體外生產之黏膜物進行回收。此時，只要在將黏膜物實施鹼處理，並將鍵結於 1-3 鍵結之葡萄糖殘基的甘油基及乙醯基予以

脫醯化後進行回收即可。若欲從所回收之黏膜物中將脫醯化結冷膠予以精製，則是例如藉由將利用經由液-液萃取、分別沉澱、結晶化、各種離子交換層析、使用 Sephadex LH-20 等之凝膠過濾層析、活性碳、矽膠等的吸附層析或薄層層析而進行之活性物質的吸脫附處理、或使用逆相管柱之高速液體層析等予以單獨地或依任意順序組合，並且反覆使用，便可實施之。關於結冷膠的生產微生物之例，雖然並不限定於此，但可列舉鞘氨醇單胞菌(*Sphingomonas elodea*)及該微生物的基因發生突變之微生物。

此外，在脫醯化結冷膠之情況，可使用市售者，例如三晶股份公司製「KELCOGEL(CP Kelco 公司的註冊商標)CG-LA」、三榮源 FFI 股份公司製「KELCOGEL(CP Kelco 公司的註冊商標)」等。

【0050】本發明所用之高分子化合物的重量平均分子量較佳為 1,000 至 50,000,000，更佳為 10,000 至 20,000,000，再佳為 100,000 至 10,000,000。舉例而言，該分子量可利用經由凝膠滲透層析(GPC)所進行之聚乙二醇或聚三葡萄糖換算及水溶液之黏度等而估計。

【0051】本發明中，可將上述高分子化合物組合使用複數種(較佳為 2 種)。高分子化合物組合的種類，只要是能夠在培養基組成物中形成奈米纖維、或以奈米纖維之形式分散，且在不曾實質上提高該液體培養基的黏度之情形下，使細胞及/或組織均勻地浮游(較佳係使其浮游靜置)者，則無特別限定，但較佳係該組合至少包含纖維素、甲

殼素、膠原蛋白、或脫醯化結冷膠。即，合適的高分子化合物組合中，係包含：纖維素、甲殼素、膠原蛋白、或脫醯化結冷膠；以及其他之高分子化合物(例如，黃原膠、海藻酸、鹿角菜膠、迪特膠、甲基纖維素、刺槐豆膠或該等之鹽)。

【0052】 [奈米纖維的調製]

本發明之培養基組成物係包含由上述原料所調製之奈米纖維。奈米纖維之調製方法，係依原料是使用非水溶性高分子化合物(例如纖維素、甲殼素等非水溶性多醣類)之情形、及是使用水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)之情形，而有所不同。

【0053】 當奈米纖維之原料為非水溶性高分子化合物(例如纖維素、甲殼素等非水溶性多醣類)時，通常是藉由將該原料予以粉碎而獲得奈米纖維。粉碎方法並無限定，但若欲微細化到符合本發明目的之後述纖維徑・纖維長，則以高壓均質機、磨碎機(石臼)、或珠磨機等介質攪拌研磨機之類的可獲得強剪切力之方法為佳。

【0054】 此等之中，以使用高壓均質機進行微細化為佳，例如日本專利特開 2005-270891 號公報及日本專利第 5232976 號所揭示之使用濕式粉碎法進行微細化(粉碎化)係為較佳。具體而言，係將分散有原料之分散液從一對噴嘴以高壓分別噴射並使其衝突，藉此而使原料粉碎者，例如可使用 Starburst 系統(Sugino Machine 股份公司製之高壓粉碎裝置)及 NanoVater(吉田機械興業股份公司製之高壓

粉碎裝置)進行實施。

【0055】 在使用前述高壓均質機將原料予以微細化(粉碎化)時，微細化及均質化之程度，係依存於高壓均質機之壓送到超高壓腔室之壓力、及通過超高壓腔室之次數(處理次數)、以及水分散液中之原料濃度。壓送壓力(處理壓力)通常為 50 至 250MPa，較佳為 150 至 245MPa。壓送壓力未達 50MPa 時，奈米纖維之微細化為不充分，而有無法獲得由微細化所期待之效果。

【0056】 此外，微細化處理時之水分散液中之原料濃度為 0.1 質量%至 30 質量%，較佳為 1 質量%至 10 質量%。水分散液中之原料之濃度未達 0.1 質量%時，生產性為低，若為高於 30 質量%之濃度，則粉碎效率低，無法獲得所期望之奈米纖維。微細化(粉碎化)之處理次數並無特別限定，係依前述水分散液中之原料之濃度而定，當原料之濃度為 0.1 至 1 質量%時，處理次數則以 10 至 100 次左右即已充分微細化，但當為 1 至 10 質量%時，則需要 10 至 1000 次左右。此外，當為超過 30 質量%之高濃度時，則需要數千次以上之處理次數，且會高黏度化到對操作造成妨礙的程度，從工業性觀點來看是不具現實性的。

【0057】 當奈米纖維之原料是使用水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)時，若將該物質添加至培養基中，則該物質會經由培養基中之金屬陽離子而集合，在培養基中形成奈米纖維，且其會建構三次元網絡，故結果可形成能夠使細胞或組織浮游而進行培養之奈米纖

維。

【0058】本發明中之培養基組成物中之奈米纖維的濃度，係在不會實質上提高培養基的黏度之情形下，且可使細胞及/或組織均勻地浮游(較佳係使其浮游靜置)之範圍內，進行適宜設定，通常為 0.0001%至 1.0%(重量/容量)，例如 0.0005%至 1.0%(重量/容量)，較佳為 0.001%至 0.5%(重量/容量)，更佳為 0.005%至 0.1%(重量/容量)，又更佳為 0.005%至 0.05%(重量/容量)之範圍內。

例如，當為纖維素奈米纖維時，通常只要在培養基中添加 0.0001%至 1.0%(重量/容量)，例如 0.0005%至 1.0%(重量/容量)，較佳為 0.001%至 0.5%(重量/容量)，更佳為 0.01%至 0.1%(重量/容量)，又更佳為 0.01%至 0.05%(重量/容量)即可。

纖維素奈米纖維中，當為紙漿纖維素奈米纖維時，從表現浮游作用之觀點及可浮游靜置培養之觀點來看，其培養基中之濃度之下限值係較佳為 0.01%(重量/容量)以上、0.015%(重量/容量)以上、0.02%(重量/容量)以上、0.025%(重量/容量)以上、或 0.03%(重量/容量)以上。此外，當為紙漿纖維素奈米纖維時，從實質上不提高培養基之黏度之觀點來看，其培養基中之濃度之上限值係較佳為 0.1%(重量/容量)以下、或 0.04%(重量/容量)以下。

當為微結晶纖維素奈米纖維時，從表現浮游作用之觀點來看，培養基中之濃度之下限值係較佳為 0.01%(重量/容量)以上、0.03%(重量/容量)以上、或 0.05%(重量/容量)

以上。從可浮游靜置培養之觀點來看，培養基中之微結晶纖維素奈米纖維濃度之下限值係較佳為 0.03%(重量/容量)以上、或 0.05%(重量/容量)以上。此外，當為微結晶纖維素奈米纖維時，培養基中之濃度之上限值係較佳為 0.1%(重量/容量)以下。

當為甲殼素奈米纖維時，通常只要在培養基中添加 0.0001%至 1.0%(重量/容量)，例如 0.0005%至 1.0%(重量/容量)，較佳為 0.001%至 0.5%(重量/容量)，更佳為 0.01%至 0.1%(重量/容量)，最佳為 0.03%至 0.07%(重量/容量)即可。從表現浮游作用之觀點來看，培養基中之甲殼素奈米纖維濃度之下限值係較佳為 0.0001%(重量/容量)以上、0.0003%(重量/容量)以上、0.0005%(重量/容量)以上、或 0.001%(重量/容量)以上。從可浮游靜置培養之觀點來看，培養基中之甲殼素奈米纖維之下限值係較佳為 0.03%(重量/容量)以上。培養基中之甲殼素奈米纖維濃度之上限值係較佳為 0.1%(重量/容量)以下。

關於纖維素奈米纖維、甲殼素奈米纖維等非水溶性奈米纖維，通常只要是 0.1%(重量/容量)以下之濃度，即不會實質上提高培養基組成物之黏度。

當為鹿角菜膠時，只要在培養基中添加 0.0005%至 1.0%(重量/容量)，較佳為 0.001%至 0.5%(重量/容量)，更佳為 0.01%至 0.1%(重量/容量)，最佳為 0.02%至 0.1%(重量/容量)即可。從表現浮游作用之觀點及可浮游靜置培養之觀點來看，培養基中之鹿角菜膠濃度之下限值係較佳為

0.01%以上。培養基中之鹿角菜膠濃度之上限值係較佳為0.1%(重量/容量)以下。從實質上不會提高培養基之黏度的觀點來看，鹿角菜膠之上限值係又以設為0.04%(重量/容量)以下為佳。

當為脫醯化結冷膠時，通常只要在培養基中添加0.001%至1.0%(重量/容量)，例如0.005%至1.0%(重量/容量)，較佳為0.003%至0.5%(重量/容量)，更佳為0.01%至0.1%(重量/容量)，又更佳為0.01至0.05%(重量/容量)，最佳為0.01%至0.02%(重量/容量)即可。從表現浮游作用之觀點來看，培養基中之脫醯化結冷膠濃度之下限值係較佳為0.005%(重量/容量)以上、或0.01%以上。從可浮游靜置培養之觀點來看，培養基中之脫醯化結冷膠濃度之下限值係較佳為0.01%(重量/容量)以上。從實質上不會提高培養基之黏度的觀點來看，培養基中之脫醯化結冷膠濃度之上限值係0.05%(重量/容量)以下。從實質上不會提高培養基之黏度的觀點來看，脫醯化結冷膠之上限值係又以設為0.04(重量/容量)%以下為佳。

【0059】 [多醣類的併用]

在上述奈米纖維以外，可將多醣類組合使用複數種(較佳為2種)。多醣類的濃度係可在不會實質上提高該液體培養基的黏度之情形下使細胞及/或組織均勻地浮游(較佳係使其浮游靜置)之範圍內，進行適宜設定。例如，當使用奈米纖維與多醣類之組合時，奈米纖維之濃度係例示如0.005至0.1%(重量/容量)，較佳為0.01至0.07%(重量/容量)，多

醣類之濃度則例示如 0.005 至 0.4%(重量/容量), 較佳為 0.1 至 0.4%(重量/容量)。具體的濃度範圍之組合係例示如以下者。

纖維素或甲殼素奈米纖維：0.005 至 0.1%(較佳為 0.01 至 0.07%)(重量/容量)

多醣類

黃原膠：0.1 至 0.4%(重量/容量)

海藻酸鈉：0.1 至 0.4%(重量/容量)(較佳為 0.0001 至 0.4%(重量/容量))

刺槐豆膠：0.1 至 0.4%(重量/容量)

甲基纖維素：0.1 至 0.4%(重量/容量)(較佳為 0.2 至 0.4%(重量/容量))

鹿角菜膠：0.05 至 0.1%(重量/容量)

迪特膠：0.05 至 0.1%(重量/容量)

天然結冷膠：0.0001 至 0.4%(重量/容量)

【0060】 尚且，該濃度可利用以下之式算出。

濃度(%) = 奈米纖維的重量(g)/培養基組成物的容量(ml)×100

【0061】 [金屬陽離子]

在一態樣中，本發明之培養基組成物係含有金屬陽離子，例如 2 價金屬陽離子(鈣離子、鎂離子、鋅離子、鐵離子及銅離子等)，較佳為鈣離子。尤其是當本發明之培養基組成物所含有之奈米纖維係由水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)所構成時，本發明之培養基

組成物係以含有上述金屬陽離子為佳。因包含金屬陽離子，故使該水溶性高分子化合物(例如脫鹽化結冷膠等水溶性多醣類)經由金屬陽離子而集合，於培養基組成物中形成奈米纖維，由其去建構三次元網絡，結果形成能夠使細胞或組織浮游而進行培養之奈米纖維。

【0062】 [培養基]

作為本發明之培養基組成物中所含有之培養基，可列舉例如 Dulbecco 改良 Eagles 培養基(Dulbecco's Modified Eagles's Medium ; DMEM)、Ham F12 培養基(Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12 培養基、McCoy 5A 培養基(McCoy's 5A medium)、Eagles MEM 培養基(Eagles's Minimum Essential Medium ; EMEM)、 α MEM 培養基(alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium ; α MEM)、MEM 培養基(Minimum Essential Medium)、RPMI1640 培養基、Iscove 改良 Dulbecco 培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; IMDM)、MCDB131 培養基、William 培養基 E、IPL41 培養基、Fischer 培養基、StemPro34 (Employer 公司製)、X-VIVO 10(Cambrex 公司製)、X-VIVO 15(Cambrex 公司製)、HPGM(Cambrex 公司製)、StemSpan H3000(Stemcell Technologies 公司製)、StemSpanSFEM(Stemcell Technologies 公司製)、StemlineII (Sigma-Aldrich 公司製)、QBSF-60(Quality Biological 公司製)、StemProhESCSFM (Employer 公司製)、mTeSR1 或 2 培養基(Stemcell Technologies 公司製)、Sf-900II(Employer 公司製)、Opti-Pro(Employer 公司製)等。

【0063】 在細胞及/或組織係來自植物之情況，可列舉通常可用於植物組織培養中之 Murashige-Skoog(MS)培養基、Linsmaier-Skoog(LS)培養基、White 培養基、Gamborg B5 培養基、Nitsch 培養基、Heller 培養基、Moller 培養基等基本培養基，或在將此等培養基成分修正至最適濃度而成之修正培養基(例如，使氮態氮濃度成為一半等)中，以適當濃度添加植物生長激素類及視需要之細胞分裂激素類等植物生長調節物質(植物激素)而成之培養基作為培養基。在此等培養基中，可視需要而進一步補充酪蛋白分解酵素、玉米浸漬液、維生素類等。作為植物生長激素類，可列舉例如 3-吲哚乙酸(IAA)、3-吲哚丁酸(IBA)、1-萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)等，但不限定於該等。植物生長激素類係可例如以約 0.1 至約 10ppm 的濃度添加至培養基中。作為細胞分裂激素類，可列舉例如裂殖素(kinetin)、苄基腺嘌呤(BA)、玉米素(zeatin)等，但不限定於該等。細胞分裂激素類係可例如以約 0.1 至約 10ppm 的濃度添加至培養基中。

【0064】 上述培養基中，熟習該領域技術者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、抗生物質、血清、脂肪酸、糖等。在來自動物的細胞及/或組織培養時，熟習該領域技術者亦可視目的而組合添加一種以上之其他化學成分或生物體成分。作為可添加至來自動物的細胞及/或組織之培養基中之成分，可列舉胎牛血清、人類血清、馬血清、胰島素、運鐵蛋白、乳

鐵蛋白、膽固醇、乙醇胺、亞硒酸鈉、單硫代甘油、2-巯基乙醇、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、各種細胞介素(cytokine)、各種激素、各種增殖因子、各種細胞外基質或各種細胞黏著分子等。作為可添加至培養基中之細胞介素，可列舉例如介白素-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)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、單核球群落刺激因子(M-CSF)、顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、幹細胞因子(SCF)、flk2/flt3配體(FL)、白血病細胞阻礙因子(LIF)、抑瘤素 M(OM)、紅血球生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)等，但不限於此等。

【0065】 作為可添加至培養基中之激素，可列舉褪黑激素、血清素、甲狀腺素、三碘甲狀腺素、腎上腺素、正腎上腺素、多巴胺、抗穆勒氏管激素(anti-Mullerian hormone)、脂聯素、促腎上腺皮質激素(adrenocorticotrophic hormone)、血管收縮素原及血管收縮素、抗利尿激素、心房利尿鈉肽、降鈣素、膽囊收縮素、促腎上腺皮質素釋放激素(corticotropin-releasing hormone)、紅血球生成素、卵泡刺激素、胃泌素、飢餓素、升糖素、促性腺素釋放激素、

生長激素釋放激素、人類絨毛膜性促性腺素、人類胎盤性泌乳素、生長激素、抑制素、胰島素、類胰島素生長因子、瘦體素、黃體形成激素、黑色素細胞刺激激素、催產素、副甲狀腺激素、催乳素、分泌素、體抑素、血小板生成素、甲狀腺刺激激素、促甲狀腺素釋放激素、皮質醇、醛固酮、睪固酮、去氫表雄固酮、雄烯二酮、二氫睪固酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、助孕酮、鈣化三醇、鈣化二醇、前列腺素、白三烯素、前列環素、血栓素、催乳素釋放激素、促脂素、腦利尿鈉肽、神經肽 Y、組織胺、內皮素、胰臟多肽、腎素、及腦啡肽(enkephalin)，但不限於此等。

【0066】作為可添加至培養基中之增殖因子，可列舉：轉形生長因子- α (TGF- α)、轉形生長因子- β (TGF- β)、巨噬細胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)、上皮細胞增殖因子(EGF)、纖維母細胞增殖因子-1、2、3、4、5、6、7、8、或 9(FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神經細胞增殖因子(NGF)、肝細胞增殖因子(HGF)、白血病抑制因子(LIF)、蛋白酶連結素 I、蛋白酶連結素 II、血小板衍生性生長因子(PDGF)、膽鹼激導性分化因子(CDF)、趨化素、Notch 配體(Delta1 等)、Wnt 蛋白、類血管生成素蛋白 2、3、5 或 7 (Angpt 2、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，但不限於此等。

又，亦可添加藉由基因重組技術而使此等細胞介素或增殖因子的胺基酸序列發生人為改變者。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)等。

【0067】 作為各種細胞外基質或各種細胞黏著分子之例，可列舉膠原蛋白 I 至 XIX、纖維蛋白、玻連蛋白、層黏蛋白-1 至 12、巢蛋白、肌腱蛋白、血小板反應蛋白、馮威里氏(von Willebrand)因子、造骨蛋白、纖維蛋白原、各種彈性蛋白、各種蛋白多醣、各種鈣黏蛋白、橋粒芯膠黏蛋白、橋粒芯蛋白、各種整合蛋白、E-選擇蛋白、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白超家族、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、甲殼素、殼聚醣、瓊脂糖、透明質酸、海藻酸凝膠、各種水凝膠，進而此等的切割片段等。

【0068】 作為可添加至培養基中之抗生物質之例，可列舉磺胺製劑、青黴素、苯氧乙基青黴素(phenethicillin)、二甲苯青黴素(methicillin)、苯唑青黴素(oxacillin)、氯苯唑青黴素(cloxacillin)、二氯苯唑青黴素(dicloxacillin)、氟氯苯唑青黴素(flucloxacillin)、乙氧萘青黴素(nafcillin)、胺苄青黴素(ampicillin)、青黴素、胺羧苄青黴素(amoxicillin)、環青黴素(cyclacillin)、羧苄青黴素(carbenicillin)、羧噻吩青黴素(ticarcillin)、氧哌嗪青黴素(piperacillin)、苯咪唑青黴素(azlocillin)、硫苯咪唑青黴素(meclocillin)、甲亞胺青黴素(mecillinam)、氮脘青黴素(amdinocillin)、頭孢菌素(cephalosporin)及其衍生物、歐索林酸(oxolinic acid)、氨氟沙星(amifloxacin)、替馬沙星(temafloxacin)、萘啶酮酸(nalidixic acid)、吡咯嘧啶酸(piromidic acid)、環丙沙星(ciprofloxacin)、西諾沙星(cinoxacin)、諾氟沙星(norfloxacin)、

培氟沙星(perfloxacin)、羅索沙星(rosaxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、依諾沙星(enoxacin)、吡哌酸(pipemidic acid)、舒巴克坦(sulbactam)、克拉維酸(clavulanic acid)、 β -溴青黴烷酸(β -bromopenicillanic acid)、 β -氯青黴烷酸(β -chloropenicillanic acid)、6-乙酰基亞甲基青黴烷酸(6-acetylmethylene penicillanic acid)、頭孢噁唑(cephoxazole)、舒他西林(sultampicillin)、氨卓西林(adinocillin)及舒巴克坦(sulbactam)之甲醛水合物酯、三唑巴坦(tazobactam)、氨曲南(aztreonam)、磺胺菌素(sulfazecin)、異磺胺菌素(isosulfazecin)、諾卡黴素(norcardicin)、間羧基苯基、苯基乙醯胺基磷酸甲酯、氯四環素(chlortetracycline)、羥四環素(oxytetracycline)、四環素(tetracycline)、脫甲氯四環素(demeclocycline)、脫氧羥四環素(doxycycline)、甲烯土黴素(metacycline)、以及米諾環素(minocycline)。

【0069】 [培養基組成物的製造方法]

將上述奈米纖維以不會實質上提高液體培養基的黏度且成為能夠使細胞及/或組織均勻地浮游(較佳係使其浮游靜置)之濃度的方式，與在將細胞及/或組織進行培養時所用之培養基混合，藉此而製造上述本發明之培養基組成物。本發明亦提供該本發明之培養基組成物的製造方法。

【0070】 該奈米纖維的形狀可為諸如粉末、錠劑、丸劑、膠囊劑、顆粒劑等經製劑化之固體、諸如經適切的溶媒及溶解劑溶解之溶液或懸浮液等液體、或使其結合至基板或單體之狀態。作為進行製劑化時之添加物，可列舉：

對羥基苯甲酸酯類等防腐劑；乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇等賦形劑；硬脂酸鎂、滑石等潤滑劑；聚乙烯醇、羥丙基纖維素、明膠等黏合劑；脂肪酸酯等界面活性劑；甘油等可塑劑等。此等添加物並不限定於上述者，只要是熟習該領域技術者可加以利用之物，便可自由地選擇。滅菌方法並無特別限制，可列舉例如放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓釜滅菌、過濾器滅菌等。

【0071】在較佳之態樣中，係藉由將上述奈米纖維的生理性水性溶媒中之分散液與液體培養基進行混合，而調製本發明之培養基組成物。該分散液係可經滅菌(高壓釜、 γ 線滅菌等)。或者，亦可在將該分散液、與將粉末培養基溶於水中所調製之液體培養基(培養基的水溶液)進行混合後，進行滅菌而使用。前述分散液及液體培養基之滅菌亦可在進行混合前，個別地施行。作為水性溶媒之例，可列舉水、二甲基亞砷(DMSO)等，但不限於此等。作為水性溶媒，水係較佳。水性溶媒中，亦可包含適切的緩衝劑或鹽。上述奈米纖維的分散液係有用於作為用以調製本發明之培養基組成物的培養基添加劑。本發明亦提供該培養基添加劑。

【0072】關於混合比率，奈米纖維的分散液：液體培養基(培養基的水溶液)通常為1：99至99：1，較佳為10：90至90：10，更佳為20：80至80：20。

【0073】並且，當奈米纖維係由水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)所構成時，亦可將該

水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)與培養基進行混合，以替代該奈米纖維與培養基之混合，而在該培養基中形成奈米纖維，藉此而製造本發明之培養基組成物。該高分子化合物的形狀可為諸如粉末、錠劑、丸劑、膠囊劑、顆粒劑等經製劑化之固體、諸如經適切的溶媒及溶解劑溶解之溶液或懸浮液等液體、或使其結合至基板或單體之狀態。作為進行製劑化時之添加物，可列舉：對羥基苯甲酸酯類等防腐劑；乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇等賦形劑；硬脂酸鎂、滑石等潤滑劑；聚乙烯醇、羥丙基纖維素、明膠等黏合劑；脂肪酸酯等界面活性劑；甘油等可塑劑等。此等添加物並不限定於上述者，只要是熟習該領域技術者可加以利用之物，便可自由地選擇。

此外，對於上述高分子化合物亦可視需要而施行滅菌處理。滅菌方法並無特別限制，可列舉例如放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓釜滅菌、過濾器滅菌等。

【0074】在較佳之態樣中，水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)之水溶液(將此稱為培養基添加劑 2)係可用於本發明之製造方法中。該水溶液係可藉由將水溶性高分子化合物之固體(例如粉末)溶解於生理性水性溶媒中而獲得。作為水性溶媒之例，可列舉水、二甲基亞砷(DMSO)等，但不限於此等。作為水性溶媒，水係較佳。

【0075】水性溶媒中，亦可包含適切的緩衝劑或鹽。該水性溶媒中，可包含亦可不包含 2 價金屬陽離子，但較

佳態樣中是不包含 2 價金屬陽離子。此乃由於在水性溶媒中不包含 2 價金屬陽離子時，在該水溶液中，水溶性高分子化合物(例如脫醯化結冷膠等水溶性多醣類)係難以形成能夠使細胞或組織浮游而進行培養之奈米纖維，而能夠以溶解於水中之狀態安定地保存。

【0076】上述培養基添加劑中，亦可進一步添加諸如提高奈米纖維的效果且降低使用時的濃度之添加物。作為此種添加劑之例，可將瓜爾膠(guar gum)、羅望子膠(tamarind gum)、海藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠(tara gum)、羅望子膠、甲基纖維素等多醣類混合 1 種以上。

【0077】以下例示本發明之培養基組成物，但本發明不因此而受到限定。將奈米纖維添加至離子交換水或超純水中。然後，於室溫進行攪拌到使整體分散成均勻狀態後，施行滅菌(例如，在 121℃ 於 20 分鐘的高壓釜滅菌)。一邊將靜置培養時所使用之任意的培養基進行攪拌(例如，均質攪拌器等)，一邊在該培養基中添加前述滅菌後之奈米纖維水溶液，以使其均勻之方式與該培養基進行混合。本水溶液與培養基之混合方法並無特別限制，可列舉例如利用吸量(pipetting)等手動之混合、使用磁力攪拌器或機械攪拌器、均質攪拌器、均質機等機器之混合。

【0078】例如，在使用纖維素奈米纖維進行調製培養基組成物時，係以成為 0.0001% 至 5.0%(重量/容量)，較佳為 0.001% 至 1.0% (重量/容量)，更佳為 0.01% 至 0.6%(重量/容量)之方式在離子交換水或超純水中添加纖維素奈米纖

維。然後，於室溫進行攪拌到使整體分散成均勻狀態後，施行滅菌(例如，在 121°C 於 20 分鐘的高壓釜滅菌)。例如一邊將 DMEM 培養基等液體培養基利用均質攪拌器等進行攪拌，一邊將本水溶液以成為所期望的最終濃度之方式添加至該培養基中(例如，在最終濃度為 0.03% 之情況，0.6% 水溶液：培養基之比率為 1：20)，並使其均勻地混合。或者，將 DMEM 培養基等液體培養基以成為所期望的最終濃度之方式利用吸量管添加至本水溶液中(例如，在最終濃度為 0.03% 之情況，0.6% 水溶液：培養基之比率為 1：20)，並利用吸量使其均勻地混合。本水分散液與培養基之混合方法並無特別限制，可列舉例如利用吸量等手動之混合、使用磁力攪拌器或機械攪拌器、均質攪拌器、均質機等機器之混合。

【0079】 [培養方法]

本發明亦提供：使用上述本發明之培養基組成物使細胞或組織增殖之培養方法；將所獲得之細胞或組織藉由例如過濾、離心或磁性分離而進行回收之方法；使用本發明之培養基組成物製造球體之方法。

【0080】 本發明中所使用之奈米纖維，係在將細胞及/或組織在活體外進行培養時，顯示出使該細胞及/或組織在含有奈米纖維之液體中浮游之效果(較佳為使其浮游靜置之效果)者。藉由該浮游效果，相較於單層培養而言，可增加每一定體積的細胞及/或組織而進行培養。又，習知的浮游培養方法中，在伴隨著旋轉或震盪操作之情況下，會有

由於對細胞及/或組織之剪切力發生作用，因而有細胞及/或組織的增殖率或回收率較低，或細胞的機能受損之情況，但若藉由使用本發明之含有奈米纖維之培養基組成物，便可在未施行震盪等操作之情形下就使細胞及/或組織均勻地分散，因此，可在沒有細胞機能的損失之情形下輕易且大量地取得目標之細胞及/或組織。又，在包含習知的凝膠基材之培養基中，在將細胞及/或組織進行浮游培養時，會有細胞及/或組織的觀察或回收係較困難、或是回收時使其機能受損之情況，但若藉由使用本發明之含有奈米纖維之培養基組成物，即可將細胞及/或組織進行浮游培養，且在不使其機能受損之情形下進行觀察、回收。又，包含習知的凝膠基材之培養基會有黏度較高而難以交換培養基之情況，但本發明之含有奈米纖維之培養基組成物則因呈低黏度，故可使用吸量管或泵等而輕易地將培養基進行交換。

【0081】藉由本發明之方法所培養之來自人類的細胞及/或組織，可對具有疾病或障礙之患者以治療目的進行移植。此時，作為治療對象之疾病或障礙的種類、前處置方法及細胞移植方法係可由當事者適宜選擇。對所移植之細胞的接受者之植活及從疾病或障礙之恢復、或伴隨移植之副作用的有無、治療的效果係可藉由移植治療中之一般方法適宜檢查、進行判斷。

【0082】再者，由於細胞及/或組織可效率良好地增殖，故本發明之培養基組成物係可使用於作為細胞的研究

用試劑。舉例而言，當解明調節細胞或組織的分化或增殖之因子時，係對使細胞與目標因子共存而進行培養時之細胞的數目或種類、細胞表面分化標記或表現基因的變化進行解析，而此時若藉由使用本發明之培養基組成物，則不僅可使作為解析對象之細胞的數目效率良好地增幅，亦可效率良好地進行回收。解明作為目標之因子時之培養條件、培養裝置、培養基的種類、本發明奈米纖維的種類、奈米纖維的含量、添加物的種類、添加物的含量、培養時間、培養溫度等可從本說明書中所記載之範圍由當事者適宜選擇。由培養所增殖或出現之細胞係可使用該領域中標準的顯微鏡進行觀察。此時，針對所培養之細胞，亦可使用特異性抗體進行染色。依目標因子而變化之表現基因，係可從所培養之細胞中抽取 RNA(核糖核酸)並藉由北方墨點法、RT-PCR 法等進行檢測。又，細胞表面分化標記可使用特異性抗體藉由 ELISA 或流式細胞儀進行檢測，觀察對由目標因子所致之分化或增殖之效果。

【0083】此外，若使用本發明之培養基組成物，即可使細胞及/或組織以良好效率增殖，故本發明之培養方法係適合做為細胞及/或組織之增殖方法、或是細胞及/或組織之增殖促進方法。當使用本發明之培養基組成物進行細胞及/或組織之培養時，細胞及/或組織係不會黏著於培養容器，也不會僅偏向存在於培養容器之底面，而是以三次元之擴散方式分散，而促進增殖。尤其是當使用甲殼素奈米纖維作為奈米纖維時，細胞會附著於甲殼素奈米纖維並將

其作為支架而強力增殖，結果所增殖之細胞、細胞塊(球體等)及/或組織會成為以葡萄串狀排列於奈米纖維上之狀態。若要此增殖促進效果，只要在培養基組成物中含有足以使細胞及/或組織浮游(亦即，避免細胞或組織黏著於培養容器)之濃度的奈米纖維即可，不一定需要可浮游靜置(亦即，不伴隨著來自外界之壓力、震動、震盪、旋轉操作等，細胞及/或組織成為在液體培養基組成物中均勻地分散且浮游之狀態)。例如，當為甲殼素奈米纖維時，只要是足以表現浮游作用之 0.0001%(重量/容量)以上之濃度，即使是低於可安定地浮游靜置培養之 0.03%(重量/容量)之濃度(例如 0.025%(重量/容量)以下、0.02%(重量/容量)以下)，也會發揮增殖促進效果。當為微結晶纖維素奈米纖維時，只要是足以表現浮游作用之 0.01%(重量/容量)以上，即使是低於可安定地浮游靜置培養之 0.03%(重量/容量)之濃度(例如 0.025%(重量/容量)以下、0.02%(重量/容量)以下)，也會發揮增殖促進效果。當為脫醯化結冷膠時，只要是足以表現浮游作用之 0.005%(重量/容量)以上，即使是低於可安定地浮游靜置培養之 0.01%(重量/容量)之濃度(例如 0.009%(重量/容量)以下、0.008%(重量/容量)以下)，也會發揮增殖促進效果。

【0084】 奈米纖維中，特別以甲殼素奈米纖維之細胞增殖促進效果為優異。

【0085】 在本發明之培養方法中，可使用浮游細胞及黏著細胞之任一種細胞。黏著細胞係在生育/增殖時需要支

架之細胞。浮游細胞係在生育/增殖時不需要支架之細胞。在本發明之培養方法中，較佳使用黏著細胞。在本發明之方法中，若使用黏著細胞，則黏著細胞係不會黏著於培養容器之底面，也不會僅偏向存在於培養容器之底面，而是以三次元之擴散方式分散，而在附著於奈米纖維之狀態或球體之狀態下進行增殖。尤其是當使用甲殼素奈米纖維作為奈米纖維時，細胞會附著於甲殼素奈米纖維並將其作為支架而強力增殖，結果所增殖之細胞或細胞塊(球體等)會成為以葡萄串狀排列於奈米纖維上之狀態。因此，使黏著細胞可進行浮游培養。此外，結果相較於在黏著於培養容器底面之狀態下進行培養之情形而言，促進了黏著細胞之增殖。並且，相較於在黏著於培養容器底面之狀態下進行培養之情形而言，可以高密度將黏著細胞進行培養。

【0086】 在本發明之培養方法中，由於可將黏著細胞進行浮游培養，故在以本發明之培養方法將黏著細胞進行浮游培養後，不需要進行從培養容器剝離細胞之操作，可藉由僅將新鮮之本發明之培養基組成物添加至培養後之培養物中、或是僅將培養後之培養物之全部或一部分添加至新鮮之本發明之培養基組成物中，而將黏著細胞予以繼代。本發明亦提供如此之黏著細胞之繼代培養方法。所以，若藉由使用本發明之繼代培養方法，則不需要進行從培養容器剝離細胞之操作，即可將黏著細胞進行繼代培養。此外，若藉由使用本發明之繼代培養方法，則不需要進行從培養容器剝離細胞之操作，即可將黏著細胞之培養規模予

以擴大。從培養容器剝離細胞之操作，係可列舉如以螯合劑(例如 EDTA)及/或蛋白質分解酵素(例如胰蛋白酶、膠原蛋白酶)進行處理。本發明之繼代培養方法，係有利於對從培養容器剝離細胞之操作為感受性高的黏著細胞(例如因剝離操作而使生存性降低之黏著細胞、因剝離操作而容易改變形質之黏著細胞)之繼代培養。對從培養容器剝離細胞之操作為感受性高的黏著細胞，係可列舉如：人類多能性幹細胞；人類前驅細胞；肝細胞、腎細胞、軟骨細胞、血管細胞及脂肪細胞等從組織所調製之初代細胞；MDCK 細胞、HEK293 細胞及 CHO 細胞等生物醫藥品(醫藥品用蛋白質)之生產細胞等，但不限定於此等。

【0087】若使用本發明之培養基組成物，則可以高密度將黏著細胞進行培養，並可將細胞及/或組織以良好效率進行增殖，所以，本發明之培養方法係有用於以體外細胞培養來產生有用物質。藉由將產生有用物質之細胞在本發明之培養基組成物中進行浮游培養，並從培養物中單離有用物質，即可獲得該有用物質。有用物質係可列舉如抗體、酵素(尿激酶等)、激素(胰島素等)、細胞介素(干擾素、介白素、腫瘤壞死因子、群落刺激因子、成長因子等)、疫苗之抗原、其他生理活性物質(蛋白質、肽等)，但不限定於此等。該產生有用物質之細胞，係包括：皮膚細胞、軟骨細胞、肝細胞、胰臟細胞、腎細胞等非轉形細胞，或是將編碼有用物質的基因及參與有用物質之生合成的基因予以導入而成之轉形細胞。產生有用物質之細胞，係可為黏著

細胞亦可為浮游細胞，但較佳為黏著細胞。產生有用物質之細胞，係較佳為將有用物質分泌至細胞外的細胞。關於產生有用物質之細胞，具體而言，可列舉如將編碼有用物質的基因及參與有用物質之生合成的基因予以導入而成之 HEK293，CHO-K1、BHK-21、MDCK、Vero、HepG2、MCF-7 等，但不限定於此等。用於生產重組蛋白質等有用物質之細胞係熟習該領域技術者所周知，可在本發明之方法中使用該等細胞。在擴大培養規模時，可使用上述本發明之繼代培養方法，不需要進行從培養容器剝離細胞之操作，係將新鮮之本發明之培養基組成物添加至培養後之培養物中，或將培養後之培養物之全部或一部分添加至新鮮之本發明之培養基組成物中。在從培養物中分離有用物質時，雖有必要從培養物中除去細胞，但本發明的培養基組成物係因添加奈米纖維，故實質上不會提高黏度，並且細胞是在培養基組成物中呈浮游，所以可藉由離心分離及過濾處理等簡便方法將細胞除去。此外，培養基組成物中之奈米纖維亦可藉由離心分離及過濾處理等簡便方法而除去。從培養物中單離有用物質之方法係熟習該領域技術者所周知，可適用例如層析法(例如離子交換層析法、疏水性層析法、親和層析法、逆相層析法等層析法)等生理活性物質之生化學性分離精製方法。

【0088】 使用本發明之培養方法將細胞及/或組織進行培養時，可使用一般用於細胞培養中之培養皿、燒瓶、塑膠袋、鐵氟龍(Teflon)(註冊商標)袋、盤皿、培養盤、組

織培養用盤、多盤(multidish)、微板、微孔板、多板、多孔板、腔室玻片、試管、托架、培養袋、滾瓶(roller bottle)等培養器材進行培養。此等培養器材的材質並無特別限制，但可列舉例如玻璃、聚氯乙烯、纖維素系聚合物、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚砜、聚胺基甲酸酯、聚酯、聚醯胺、聚苯乙烯、聚丙烯等塑膠等。又，亦可對此等塑膠實施各種表面處理(例如，電漿處理、電暈處理等)。再者，對此等培養器材，亦可預先塗覆細胞外基質或細胞黏著分子等。作為此種塗覆材料，可列舉膠原蛋白 I 至 XIX、纖連蛋白、玻連蛋白(vitronectin)、層黏蛋白-1 至 12、巢蛋白(nidogen)、肌腱蛋白(tenascin)、血小板反應蛋白(thrombospondin)、馮威里氏(von Willebrand)因子、造骨蛋白(osteopontin)、纖維蛋白原、各種彈性蛋白、各種蛋白多醣、各種鈣黏蛋白、橋粒芯膠黏蛋白(desmocollin)、橋粒芯蛋白(desmoglein)、各種整合蛋白、E-選擇蛋白(E-selectin)、P-選擇蛋白(P-selectin)、L-選擇蛋白(L-selectin)、免疫球蛋白、透明質酸、超家族、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、甲殼素、殼聚醣、瓊脂醣(sepharose)、海藻酸凝膠、水凝膠(hydrogel)，進而此等的切割片段等。此等塗覆材料亦可使用藉由基因重組技術而使胺基酸序列發生人為改變者。又，亦可使用用以阻止對細胞及/或組織的培養器材之黏著的塗覆材料。作為此種塗覆材料，可列舉矽、聚(甲基丙烯酸 2-羥基甲酯)、聚(2-甲基丙烯酸醯氧基乙基磷酸膽鹼)等，但不限於此等。

【0089】細胞及/或組織的培養亦可藉由能夠一邊在機械性控制下於密閉環境下自動地實行細胞接種、培養基交換、細胞影像取得、培養細胞回收並控制 pH 值、溫度、氧濃度等，一邊以高密度進行培養之生物反應器或自動培養裝置施行。作為使用此等裝置在培養途中補給新的培養基並將所要求物質在不會過量或不足之情形下供給至細胞及/或組織之手法，係有流加培養(feeding culture)、連續培養及灌流培養，任一手法皆可用於本發明之培養方法中。

【0090】利用本發明之方法所培養之細胞及/或組織的形態或狀態，係可由熟習該領域技術者任意地選擇。作為其較佳具體例，雖然並無特別限制，但可列舉：細胞及/或組織單獨分散於培養基組成物中之狀態、細胞及/或組織黏著於載體表面上之狀態、細胞及/或組織包埋於載體內部中之狀態、由複數個細胞集合並形成細胞塊(球體)之狀態、或由 2 種以上之細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態等，更佳為細胞及/或組織黏著於載體表面上之狀態、細胞及/或組織包埋於載體內部中之狀態、由複數個細胞集合並形成細胞塊(球體)之狀態、或由 2 種以上之細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態，再佳為細胞及/或組織黏著於載體表面上之狀態、由複數個細胞集合並形成細胞塊(球體)之狀態、或由 2 種以上之細胞集合而形成細胞塊(球體)之狀態。此等狀態之內，由於形成細胞塊(球體)之狀態係可再構築近似活體內環境之細胞-細胞間相互作用及細胞構造體，並能夠在保持長期維持細胞機能之情形下進行培養，

且細胞的回收比較容易，因而可列舉為利用本發明之方法進行培養之最佳狀態。

【0091】 作為使細胞及/或組織載持於表面上之載體，可列舉各種由高分子所構成之微載體或玻璃珠粒、陶瓷珠粒等。作為該高分子之例，可使用乙烯系樹脂、胺基甲酸酯樹脂、環氧樹脂、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯聚酯、聚醯胺、聚醯亞胺、矽樹脂、酚樹脂、三聚氰胺樹脂、脲樹脂、苯胺樹脂、離子聚合物樹脂、聚碳酸酯、膠原蛋白、葡聚糖、明膠、纖維素、海藻酸鹽及此等混合物等。該載體亦可經提高細胞的黏著、或提高來自細胞的物質釋放之化合物所塗覆。作為此種塗覆材料之例，可列舉聚(單硬脂醯基甘油酯共琥珀酸)、聚-D,L-乳酸交酯-共-乙交酯、透明質酸鈉、正異丙基丙烯醯胺、膠原蛋白 I 至 XIX、纖維蛋白、玻連蛋白、層黏蛋白-1 至 12、巢蛋白、肌腱蛋白、血小板反應蛋白、馮威里氏(von Willebrand)因子、造骨蛋白、纖維蛋白原、各種彈性蛋白、各種蛋白多醣、各種鈣黏蛋白、橋粒芯膠黏蛋白、橋粒芯蛋白、各種整合蛋白、E-選擇蛋白、P-選擇蛋白、L-選擇蛋白、免疫球蛋白超家族、基質膠、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、甲殼素、殼聚醣、瓊脂醣、海藻酸凝膠、各種水凝膠，進而此等的切割片段等。此時，亦可組合 2 種以上之塗覆材料。又再者，對於將細胞及/或組織載持於表面上而成之載體的培養所使用之培養基，可混合 1 種以上之瓜爾膠、羅望子膠、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、羅望子膠、甲基纖維素等多醣類。

又，該載體亦可含有磁性體材料，例如肥粒鐵。該載體的直徑為數 $10\ \mu\text{m}$ 至數 $100\ \mu\text{m}$ ，更佳為 $100\ \mu\text{m}$ 至 $200\ \mu\text{m}$ ，其比重較佳係接近於 1，更佳為 0.9 至 1.2，特佳為約 1.0。作為該載體之例，雖然不限於此，但可列舉 Cytodex 1(註冊商標)、Cytodex 3(註冊商標)、Cytoline 1(註冊商標)、Cytoline 2(註冊商標)、Cytopore 1(註冊商標)、Cytopore 2(註冊商標)(以上，GE Healthcare Life Sciences)、Biosilon(註冊商標)(NUNC)、Cultispher-G(註冊商標)、Cultispher-S(註冊商標)(以上，Thermo SCIENTIFIC)、HILLEXCT(註冊商標)、ProNectinF-COATED(註冊商標)、及 HILLEXII(註冊商標)(SoloHill Engineering)等。該載體亦可視需要而實施滅菌處理。滅菌方法並無特別限制，可列舉例如放射線滅菌、環氧乙烷氣體滅菌、高壓釜滅菌及乾熱滅菌等。作為使用該載體將動物細胞進行培養之方法並無特別限制，可使用採用通常的流動層型培養槽或填充層型培養槽之培養方法等。此時，由於使細胞及/或組織載持於表面上而成之載體係可藉由使用本發明之含有奈米纖維的培養基組成物而在未施行震盪等操作之情形下均勻地分散，因而可在無細胞機能損失之情形下將目標細胞及/或組織進行培養。由本法所培養之細胞及/或組織，係可藉由在培養後在使其維持載持於載體之情形下施行離心或過濾處理而予以回收。此時，亦可在添加所使用之液體培養基後，施行離心或過濾處理。舉例而言，進行離心時之重力加速度(G)為 100 至 400G，進行過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 10

μm 至 $100\ \mu\text{m}$ ，但不限制於此等。又，若預先使載體中內含肥粒鐵等具有磁性之材料，則可藉由磁力將所培養之載體進行回收。由本法所培養之細胞及/或組織，係可藉由使用各種螯合劑、熱處理或酵素從載體剝離而進行回收。

【0092】將細胞及/或組織包埋於載體內部中時，可選擇由各種高分子所構成之材料作為該載體。作為此種高分子之例，可列舉膠原蛋白、明膠、海藻酸鹽、殼聚糖、瓊脂糖、聚乙醇酸、聚乳酸、纖維蛋白黏著劑、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物、蛋白多醣、葡糖胺聚糖、聚胺基甲酸酯發泡體等海綿狀物、DseA-3D(註冊商標)、聚 N-取代丙烯醯胺衍生物、聚 N-取代甲基丙烯醯胺衍生物及此等共聚物、聚乙炔基甲基醚、聚環氧丙烷、聚環氧乙烷、聚乙醇醇部分乙醯化物等溫度感受性高分子、聚丙烯醯胺、聚乙醇醇、甲基纖維素、硝基纖維素、丁酸纖維素、聚環氧乙烷、聚(甲基丙烯酸 2-羥基乙酯)/聚己內酯等水凝膠。又，亦可使用 2 種以上之此等高分子而製作用以包埋細胞之載體。再者，該載體中，除了此等高分子以外，亦可具有生理活性物質。作為此生理活性物質之例，可列舉細胞增殖因子、分化誘導因子、細胞黏著因子、抗體、酵素、細胞介素、激素、凝集素(lectin)、或細胞外基質等，亦可含有此等之複數種。又再者，對於在包埋細胞及/或組織而成之載體的培養時所使用之培養基，可混合 1 種以上之瓜爾膠、羅望子膠、海藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、甲基纖維素等增黏劑。

【0093】 使細胞及/或組織包埋於此等載體中之方法並無特別限制，但亦可使用例如將細胞與前述高分子的混液吸引至注射器中並經由 25G 至 19G 左右之注射針滴加至培養基中，或使用微吸量管滴加至培養基中等方法。此處所形成之珠粒狀載體的尺寸係依在滴加細胞與前述高分子混合液時所使用之器具前端的形狀而決定，較佳為數 $10\ \mu\text{m}$ 至數 $1000\ \mu\text{m}$ ，更佳為 $100\ \mu\text{m}$ 至 $2000\ \mu\text{m}$ 。能夠利用珠粒狀載體進行培養之細胞數並無特別限制，但只要配合此珠粒尺寸自由地選擇即可。舉例而言，在直徑約 $2000\ \mu\text{m}$ 之珠粒狀載體之情況，可將直至 500 萬個為止之細胞包埋至此尺寸之珠粒狀載體中。又，細胞在載體內可一個一個地分散，亦可形成由複數個細胞集合而成之細胞塊。此時，由於包埋有細胞及/或組織之載體係可藉由使用本發明之含有奈米纖維的培養基組成物而在未施行攪拌等操作之情形下均勻地分散，因而可在無細胞機能損失之情形下將目標細胞及/或組織進行培養。由本法所培養之細胞及/或組織係可藉由在培養後以包埋於載體中之狀態施行離心或過濾處理而予以回收。此時，亦可在添加所使用之液體培養基後，施行離心或過濾處理。舉例而言，進行離心時之重力加速度(G)為 100 至 400G，進行過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 $10\ \mu\text{m}$ 至 $100\ \mu\text{m}$ ，但不限制於此等。由本法所培養之細胞及/或組織係可藉由使用各種螯合劑、熱或酵素等處理來分解載體而使其分散並進行回收。

【0094】 使細胞凝集塊(球體)形成之方法並無特別限

制，熟習該領域技術者可適宜選擇。作為其例，可列舉使用具有細胞非黏著表面的容器之方法、懸滴法、旋轉培養法、3次元支架法、離心法、使用經由電場或磁場之凝集之方法等。舉例而言，針對使用具有細胞非黏著表面的容器之方法，可將目標細胞在經實施阻礙細胞黏著之表面處理之培養容器中進行培養而使球體形成。在使用此細胞非黏著性培養容器之情況，首先，在採取目標細胞後調製其細胞浮游液，並接種於該培養容器中而進行培養。若持續培養約一週，則細胞會自發性地形成球體。作為此時所使用之細胞非黏著性表面，可使用在一般所使用之培養皿等培養容器之表面塗覆有阻礙細胞黏著的物質者等。作為此種物質，可列舉瓊脂糖、瓊脂、聚-HEMA(聚-(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)、2-甲基丙烯酸鹽氧基乙基磷酸膽鹼與其他單體(例如甲基丙烯酸丁酯等)之共聚物等，但只要沒有細胞毒性，則不限定於此等。

【0095】又，作為使細胞凝集塊(球體)形成之方法，亦可使用 NATURE BIOTECHNOLOGY, VOL.28, NO. 4, APRIL 2010, 361-366、NATURE PROTOCOLS, VOL. 6, NO. 5, 2011, 689-700、NATURE PROTOCOLS, VOL. 6, NO. 5, 2011, 572-579、Stem Cell Research, 7, 2011, 97-111、Stem Cell Rev and Rep, 6, 2010, 248-259 等中所記載之方法。

又，在使球體形成之培養時所使用之培養基中，亦可含有提早球體的形成、或促進其維持之成分。作為具有此種效果之成分之例，可列舉二甲基亞砷、超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase)、血漿銅藍蛋白(ceruloplasmin)、觸酶、過氧化酶、L-抗壞血酸、L-抗壞血酸磷酸酯、生育酚、類黃酮、尿酸、膽紅素、含硒化合物、運鐵蛋白、不飽和脂肪酸、白蛋白、茶鹼、佛司可林(forskolin)、升糖素、二丁醯 cAMP、Y27632、Fasudil (HA1077)、H-1152、Wf-536 等 ROCK 阻礙劑等。作為含硒化合物，可列舉亞硒酸鈉、硒酸鈉、二甲基硒、硒化氫、硒甲硫胺酸、Se-甲基硒半胱胺酸、胱硒醚(selenocystathionine)、硒半胱胺酸、硒高半胱胺酸、腺苷-5'-磷硒酸、Se-腺苷基硒甲硫胺酸。又，為了獲得目標尺寸之均勻的細胞凝集塊，亦可在所使用之細胞非附著性培養容器上，導入與目標細胞凝集塊同一直徑之複數個凹處。只要此等凹處係相互連接，或者在目標細胞凝集塊的直徑之範圍內，則在將細胞進行接種時，所接種之細胞不會在凹處與凹處之間形成細胞凝集塊，而會確實地在凹處之中形成因應其容積的大小之細胞凝集塊，可獲得均勻尺寸之細胞凝集塊集團。作為此時之凹處形狀，半球或圓錐狀係較佳。

【0096】或者，亦可基於具有細胞黏著性之支撐體使球體形成。作為此種支撐體之例，可列舉膠原蛋白、聚輪烷(polyrotaxane)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、水凝膠等。

又，藉由與餵養細胞共同培養，亦可使球體形成。作為用於促進球體形成之餵養細胞，任何黏著性細胞皆可使用，但較合適以因應各種細胞之餵養細胞為宜。雖然並無

限定，但在例如使來自肝臟或軟骨之細胞的球體形成之情況，作為其餵養細胞之例，可列舉 COS-1 細胞或血管內皮細胞作為合適的細胞種。

再者，亦可使用本發明之含有奈米纖維的培養組成物使球體形成。此時，只要以使該奈米纖維的濃度成為可進行細胞之浮游培養(較佳為浮游靜置培養)的溫度之方式，將該奈米纖維添加至球體形成時所用之培養基中即可。例如，以使該奈米纖維的濃度成為通常為 0.0001%至 1.0%(重量/容量)，例如為 0.0005%至 1.0%(重量/容量)，較佳為 0.001%至 0.3% (重量/容量)，更佳為 0.005%至 0.1%(重量/容量)，再佳為 0.01%至 0.05%(重量/容量)之方式，將該奈米纖維添加至球體形成時所使用之培養基中即可。球體可藉由在包含該奈米纖維的培養基中使目標細胞均勻地分散並靜置培養 3 日至 10 日而調製。此處所調製之球體可藉由施行離心或過濾處理而予以回收。舉例而言，進行離心時之重力加速度(G)為 100 至 400G，進行過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 $10\ \mu\text{m}$ 至 $100\ \mu\text{m}$ ，但不限制於此等。又，可使用將特異性結合至目標細胞之抗體塗覆於表面上而成之磁性微粒子，藉由磁力將所培養之球體進行回收。作為此種磁性微粒子之例，可列舉 Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag (Techno Chemical 公司製)等。

【0097】 球體的大小係依細胞種及培養時間而異，並無特別限定，但呈球形狀或橢圓球形狀時係具有 $20\ \mu\text{m}$ 至

1000 μm ，較佳為 40 μm 至 500 μm ，更佳為 50 μm 至 300 μm 的直徑。

此種球體係即便持續保持靜置培養，亦能夠在 10 日以上，較佳為 13 日以上，更佳為 30 日以上之期間保持增殖能力，但若藉由進一步在靜置培養中定期地施行機械性分割，或藉由進一步施行單細胞化處理及凝集，便能夠實質上無期限地保持增殖能力。

球體之培養中所使用之培養容器，只要是一般可進行動物細胞之培養者，則無特別限定，但可列舉例如燒瓶、盤狀物、培養盤、組織培養用盤、多盤、微板、微孔板、多板、多孔板、腔室玻片、培養皿、試管、托架、培養袋、滾瓶等。

球體之靜置培養中所使用之培養基係可包含細胞黏著因子，作為其例，可列舉基質膠、膠原蛋白凝膠、明膠、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、層黏蛋白、纖維連蛋白。此等細胞黏著因子亦可組合添加 2 種以上。又再者，對於球體之培養中所使用之培養基，可進一步混合瓜爾膠、羅望子膠、海藻酸丙二醇酯、刺槐豆膠、阿拉伯膠、塔拉膠、甲基纖維素等增黏劑。

藉由使用本發明之含有奈米纖維的培養基組成物，便可在未施行震盪等操作之情形下均勻地在培養液中進行分散，因而可在無細胞機能損失之情形下將目標細胞及/或組織以球體形式進行培養。由本法所靜置培養之球體係可藉由在培養後施行離心或過濾處理而予以回收。此時，亦可

在添加所使用之液體培養基後，施行離心或過濾處理。舉例而言，進行離心時之重力加速度(G)為 100 至 400G，進行過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 $10\ \mu\text{m}$ 至 $100\ \mu\text{m}$ ，但不限制於此等。又，可使用將特異性結合至目標細胞之抗體塗覆於表面上而成之磁性微粒子，藉由磁力將所培養之球體進行回收。作為此種磁性微粒子之例，可列舉 Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag(Techno Chemical 公司製)等。所回收之球體可進一步藉由使用各種螯合劑、熱、過濾器或酵素等處理來分解而使其以單一細胞形式分散。

【0098】作為將來自植物之細胞及/或組織進行靜置培養時之方法，可培養屬於未進行分化的植物細胞塊之癒傷組織。癒傷組織之衍生係可針對所使用之植物種分別藉由公知的方法施行。舉例而言，將已分化之植物體的一部分組織(例如，根、莖、葉的切片、種子、生長點、胚、花粉等)表面視需要而使用 70%酒精或 1%次氯酸鈉溶液等進行滅菌後，使用刀具等切出適當大小之組織片(例如，約 1 至約 5mm 見方之根切片)，藉由使用無塵實驗台等之無菌操作，將該組織片接種至預先滅菌之癒傷組織衍生培養基中而在適當條件下進行無菌培養。此處所衍生之癒傷組織，可為了立即大量增殖而進行液體培養，或者亦可藉由在繼代用培養基中進行繼代培養而以種株形式維持。繼代培養可使用液體培養基及固形培養基之任一者而施行。

使用本發明之培養基組成物開始靜置培養時所接種之

植物細胞塊的量，係因應目標細胞的增殖速度、培養樣式(批次培養、流加培養、連續培養等)、培養時間等而變動，例如，在培養癒傷組織等植物細胞塊之情況，係以使細胞塊的濕重量相對於本發明之培養基組成物而成為 4 至 8(重量/容積(w/v))%，較佳為 5 至 7(w/v)%之方式接種至本發明之培養基組成物中。培養時之植物細胞塊的粒徑為 3mm 至 40 mm，較佳為 3mm 至 20mm，更佳為 5mm 至 15mm。此處，「粒徑」係例如在植物細胞塊呈球形時是意指其直徑，在呈橢圓球形時則意指其長徑，在其他形狀時亦同樣地意指可取得之最大長度。

【0099】 將細胞及/或組織進行培養時的溫度，若為動物細胞則通常為 25 至 39℃，較佳為 33 至 39℃。CO₂濃度係通常在培養環境中為 4 至 10 體積%，較佳為 4 至 6%體積。培養時間通常為 3 至 35 日，但只要配合培養目的自由地設定即可。植物細胞的培養溫度通常為 20 至 30℃，若光為必要時，則只要在照度 2000 至 8000 米燭光之照度條件下進行培養即可。培養時間通常為 3 至 70 日，但只要配合培養目的自由地設定即可。

【0100】 利用本發明之方法將細胞及/或組織進行培養時，只要對本發明之培養組成物添加另行調製而成之細胞及/或組織，並以可均勻地分散之方式進行混合即可。此時之混合方法並無特別限制，可列舉例如利用吸量等手動之混合、使用攪拌子、旋渦混合器(vortex mixer)、微板混合器、震盪機等機器之混合。混合後可使培養液處於靜置

狀態，亦可視需要而將培養液旋轉、震盪或攪拌。其旋轉數及頻度只要配合熟習該領域技術者之目的而適宜設定即可。又，在靜置培養的期間必須進行培養基組成物之更換時，只要是在藉由施行離心或過濾處理將細胞及/或組織與培養基組成物予以分離後，將新的培養基組成物添加至細胞及/或組織中即可。或者，只要藉由施行離心或過濾處理將細胞及/或組織適宜濃縮後，將新的培養基組成物添加至此濃縮液中即可。舉例而言，進行離心時之重力加速度(G)為 100 至 400G，進行過濾處理時所使用之過濾器的細孔大小為 $10\ \mu\text{m}$ 至 $100\ \mu\text{m}$ ，但不限制於此等。又，可使用將特异性結合至目標細胞之抗體塗覆於表面上而成之磁性微粒子，藉由磁力將所培養之細胞及/或組織進行分離。作為此種磁性微粒子之例，可列舉 Dynabeads(Veritas 公司製)、MACS 微珠粒(Miltenyi Biotec 公司製)、BioMag(Techno Chemical 公司製)等。此等培養基組成物之更換亦可在機械性控制下於密閉環境下藉由可行的生物反應器或自動培養裝置施行。

【0101】 [細胞或組織的保存或輸送方法]

此外，本發明係提供使用上述本發明之培養基組成物而將細胞或組織進行保存之保存方法及輸送方法。本發明之保存或輸送方法中，可藉由使用本發明之培養基組成物，而將細胞或組織在浮游狀態(較佳為浮游靜置狀態)下進行保存或輸送。

【0102】 成為保存或輸送之對象的細胞及組織，係

可列舉如上述使用本發明之培養基組成物進行培養時所可使用之細胞或組織。

【0103】 保存或輸送時所用之本發明之培養基組成物中，除了上述組成以外，亦可包括細胞或組織之在非凍結狀態下之保存時具有細胞延命效果之各種成分。該成分可列舉如：糖類(惟多醣類除外)(例如單糖類、二糖類)、抗氧化劑(例如 SOD、維生素 E 或麩胱甘肽)、親水性聚合物(例如聚乙烯基吡咯啶酮)、螯合劑(例如 EDTA)、糖醇(例如甘露糖醇、山梨糖醇)、甘油等。

【0104】 在本發明之保存或輸送方法中，係將所期望之細胞或組織分散於本發明之培養基組成物中，並放入可密封之容器中。該容器可列舉如燒瓶、塑膠袋、鐵氟龍(註冊商標)袋、管、培養袋等，但不限定於此等。保存或輸送中，為了避免內容物之洩漏或來自外界之細菌等之污染，內裝有細胞或組織之在本發明之培養基組成物中之分散物的容器係以密封為佳。

【0105】 保存或輸送時之溫度係只要維持細胞或組織之生存即可，並無特別限定，但通常為 37°C 以下。雖然溫度較低者係可避免保存或輸送時之細胞或組織之生存性降低，但為了不使細胞或組織凍結，通常是在高於本發明之培養基組成物之融點的溫度進行保存或輸送。因此，保存或輸送時之溫度通常維持為 -5 至 42°C，較佳為 1 至 37°C，更佳為 4 至 32°C，特佳為 18 至 30°C。

【0106】 為了可在浮游靜置狀態下進行細胞或組織

之保存或輸送，則保存或輸送時之溫度係以使本發明之培養基組成物可進行細胞或組織之浮游靜置的溫度為佳。可進行細胞或組織之浮游靜置的溫度，係可依據構成奈米纖維之原料之種類而適宜設定。

【0107】 在一態樣中，本發明之保存或輸送方法所用之構成本發明之培養基組成物中所含有之奈米纖維的原料，係可使用鹿角菜膠(較佳為 κ -鹿角菜膠)。含有由鹿角菜膠所構成之奈米纖維的本發明的培養基組成物，係在 25°C 以下時具有浮游作用，但另一方面，則在 37°C 會失去浮游作用，所以，若在 25°C 以下(較佳為 0 至 25°C)時，將所期望之細胞或組織在浮游靜置狀態進行保存或輸送，並在保存或輸送終了後，使溫度變成 37°C 以上(例如 37 至 40°C，較佳為 37°C)，則原本浮游之細胞或組織會沉降，而可容易地回收細胞或組織。

【0108】 保存或輸送之期間，只要是可在本發明之培養基組成物中使細胞或組織維持生存狀態之範圍內，即無特別限定，但通常為 1 小時以上、10 日以內，較佳為 1 至 8 日，更佳為 1 至 3 日。保存或輸送期間中，細胞或組織較佳係在本發明之培養基組成物中維持浮游靜置狀態。

【0109】 若使用本發明之保存或輸送方法，即可將細胞或組織保持在浮游狀態，故可避免輸送中之震動所導致之從盤剝離、或因沉降而使接觸之細胞或組織彼此凝集而導致細胞或組織損傷，可在維持原本機能之狀態下保存及輸送細胞或組織。

[實施例]

【0110】 以下係藉由具體敘述本發明之培養基組成物之實施例而進一步詳細說明本發明。以下之實施例所示之材料、使用量、比例、處理內容及處理順序，只要不違背本發明之範疇精神，即可予以適宜變更。所以，本發明之範圍不應解釋為以下所示之具體例。

【0111】 [參考例 1：包含經高溫加熱處理之脫醯化結冷膠的培養基之黏度測定及細胞浮游試驗]

[含有脫醯化結冷膠的培養基之調製及黏度測定]

使脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 0.4%(w/v)之方式懸浮於純水中後，在 90°C 加熱攪拌並使其溶解。將本水溶液一邊攪拌、一邊放冷至室溫，在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。在 300mL 高型燒杯中裝入 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)50mL 及滅菌水 47.5mL，在室溫一邊利用均質攪拌器(3000rpm)進行攪拌、一邊添加脫醯化結冷膠水溶液 2.5mL，藉由持續保持攪拌 1 分鐘而調製脫醯化結冷膠最終濃度 0.01%之培養基組成物。同樣地調製以最終濃度成為 0.02、0.03、0.05%(w/v)之方式添加脫醯化結冷膠水溶液之培養基組成物。本培養基組成物的黏度係在 37°C 條件下使用 E 型黏度計(東機產業股份公司製，Viscometer TVE-22L，標準轉子 1°34' ×R24)，以旋轉數 100rpm 測定 5 分鐘。

【0112】 [含有脫醯化結冷膠的培養基之細胞浮游試驗]

將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於包含 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將本懸浮液 10mL 接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)中後，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內培養 3 日。將此處所獲得之球體(直徑 100 至 200 μ m)的懸浮液 10mL 進行離心處理(200G, 5 分鐘)而使球體沉降，藉由去除上清液而調製球體懸浮液 1.0mL。繼而，將上述所調製之含有脫醯化結冷膠的培養基逐步以 1.0mL 裝入至 1.5mL Eppendorf 試管中，並進一步添加 HeLa 細胞球體懸浮液 10 μ L。藉由輕敲使細胞塊分散，在 37°C 進行保溫培養，並以目視觀察 1 小時後之細胞的分散狀態。

【0113】 [表 1]

脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 浮游/沉澱
0.01	液狀	1.31	浮游
0.02	液狀	1.92	浮游
0.03	液狀	2.38	浮游
0.05	液狀	3.34	浮游

【0114】 [參考比較例：含有甲基纖維素、膠原蛋白的培養基之調製]

[含有甲基纖維素的培養基之調製]

在 200mL 茄狀燒瓶中裝入 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)100mL，並添加甲基纖維素(M0387, Aldrich 公司製)

0.1g。一邊以冰浴進行冷卻、一邊攪拌，使甲基纖維素溶解。使用本溶液，調製以使最終濃度成為 0.1、0.3、0.6、1.0%(w/v) 之方式添加甲基纖維素水溶液而成之培養基組成物。

[含有膠原蛋白的培養基之調製]

在 0.3%細胞基質型 I-A(新田明膠公司製)6.5mL 中裝入 10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)1mL、再構成用緩衝液(新田明膠公司製)1mL 及純水 1.5mL，一邊在冰中進行攪拌、一邊調製含有 0.2%之膠原蛋白的培養基。同樣地，調製以使最終濃度成為 0.01、0.05、0.1、0.2%(w/v) 之方式添加膠原蛋白而成之培養基組成物。

針對上述所調製之培養基組成物，亦與含有脫醯化結冷膠的培養基同樣地實施 HeLa 細胞球體之浮游試驗及黏度測定。惟，1.0%(w/v)甲基纖維素的黏度係由裝置的測定範圍以 50rpm 進行測定。

【0115】 [表 2]

甲基纖維素濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 浮游/沉澱
0.1	液狀	2.31	沉澱
0.3	液狀	8.15	沉澱
0.6	液狀	13.0	沉澱
1.0	液狀	48.2	沉澱

【0116】 [表 3]

膠原蛋白濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 浮游/沉澱
0.01	液狀	1.18	沉澱
0.05	液狀/固體 (凝膠)	無法測定	浮游
0.1	固體(凝膠)	無法測定	浮游
0.2	固體(凝膠)	無法測定	浮游

【0117】 [參考試驗例]

以下之參考試驗例中，於 CO₂ 保溫箱中之 CO₂ 的濃度 (%) 係以環境中之 CO₂ 的體積 % 表示。又，PBS 係意指磷酸緩衝生理食鹽水 (Sigma-Aldrich Japan 公司製)，FBS 係意指胎牛血清 (Biological Industries 公司製)。又，(w/v) 係表示每 1 體積的重量。

【0118】 [參考試驗例 1：使單一細胞分散時之細胞增殖試驗]

將脫醯化結冷膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製) 以成為 0.3% (w/v) 之方式懸浮於超純水 (Milli-Q 水) 中後，藉由一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解，將本水溶液在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。使用本溶液，調製在包含 10% (v/v) 胎牛血清及 10ng/mL 之血小板生成素 (WAKO 公司製) 的 IMDM 培養基 (Gibco 公司製) 中添加最終濃度 0.015% (w/v) 之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物。繼而，將人類白血病細胞株 UT7/TPO 以 20000 細胞/mL 之方式接

種至上述已添加有脫醯化結冷膠之培養基組成物中後，以每 1 孔成為 5mL 之方式分注至 6 孔平底微板(Corning 公司製)之孔中。同樣地，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)，以 20000 細胞/mL 之方式，接種至在包含 10%(v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中添加有 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)而成之培養基組成物中後，以每 1 孔成為 5mL 之方式分注至 6 孔平底微板(Corning 公司製)之孔中。將此等細胞懸浮液於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內以靜置狀態進行培養 3 日。然後，將培養液的一部分進行回收，同量添加台盼藍(trypan blue)染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。

【0119】 其結果，確認到 UT7/TPO 細胞及 HeLa 細胞能夠藉由使用上述培養基組成物而以浮游狀態均勻地進行培養，且利用該培養基組成物進行增殖。浮游靜置培養 3 日後之 UT7/TPO 細胞及 HeLa 細胞的細胞數示於表 4。

【0120】 [表 4]

	UT7/TPO 細胞	HeLa 細胞
細胞數(×10000/mL)	38	40

【0121】 [參考試驗例 2：將來自細胞株之球體進行培養時之細胞增殖試驗]

將人類肝癌細胞株 HepG2(DS Pharma Biomedical 公司製)以 250000 個/mL 之方式懸浮於包含 10%(v/v)胎牛血清的

DMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將本懸浮液 10mL 接種至 EZ SPHERE(旭硝子公司製)中後，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內培養 7 日。同樣地，將人類子宮頸癌細胞株 HeLa(DS Pharma Biomedical 公司製)以 250000 個/mL 之方式懸浮於包含 10% (v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將本懸浮液 10mL 接種至 EZ SPHERE(旭硝子公司製)中後，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內培養 7 日。將此處所獲得之各細胞株之球體(直徑 100 至 200 μ m)的懸浮液 2.5mL 進行離心處理(200 G，5 分鐘)，而使球體沉降並去除上清液。繼而，在本球體(約 800 個)中添加上述培養基 10mL 而使其懸浮後，移至平底試管(BM 機器公司製)中。同樣地，使用在上述培養基中添加 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)而成之培養基組成物，作成球體的懸浮液，並移至平底試管(BM 機器公司製)中。尚且，添加有 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物，係可藉由先將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後，一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解，將本水溶液在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌後，以 1/20 稀釋添加至包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基中，而調製之。

【0122】 在 37°C 於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內將上述球體懸浮液靜置培養 3 日後，藉由添加 2 倍容量之培養基並施行離心處理(200G，5 分鐘)而使球體沉降，並去除上清

液。此處，分取球體的一部分，以光學顯微鏡(OLYMPUS 公司製，CK30-F100)觀察其形狀。繼而，所回收之球體以 PBS 10mL 洗淨 1 次後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37℃ 保溫 5 分鐘。添加上述培養基 9mL 後，藉由離心處理(200G，5 分鐘)將細胞進行回收。對此處所獲得之細胞懸浮液 2mL 的一部分，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞及死細胞數。

【0123】 其結果，確認到 HepG2 細胞及 HeLa 細胞的球體能夠藉由使用上述培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確認到該培養基組成物相較於既存的培養基而言，係使細胞增殖時死細胞的比例較少，細胞增殖的促進效果優異。此時，利用既存的培養基所培養之球體係沉降於培養容器的底面。再者，將所培養之球體的形狀以光學顯微鏡觀察，結果在該培養基組成物中未見到球體彼此間的匯集，相對於此，在既存的培養基中則觀察到球體彼此間的匯集。

關於 HepG2 細胞及 HeLa 細胞，將以不含脫醯化結冷膠的培養基進行培養時之細胞數設為 1 時之相對細胞數示於表 5。又，將以不含脫醯化結冷膠的培養基進行培養時之死細胞率(死細胞數/活細胞數)設為 1 時之相對死細胞率示於表 6。又，將以該培養基組成物培養 HepG2 細胞及 HeLa 細胞的球體時之浮游狀態分別示於第 1 圖及第 2 圖。再者，

所培養之 HeLa 細胞的球體之形狀示於第 3 圖。

【0124】 [表 5]

脫醃化結冷膠		HepG2 細胞	HeLa 細胞
無	相對細胞數	1.0	1.0
有	相對細胞數	1.7	1.5

【0125】 [表 6]

脫醃化結冷膠		HepG2 細胞	HeLa 細胞
無	相對死細胞率	1.0	1.0
有	相對死細胞率	0.5	0.5

【0126】 [參考試驗例 3：將附著於微載體上之細胞株進行培養時之細胞增殖試驗]

將微載體 Cytodex(註冊商標)1(GE Healthcare Life Sciences 公司製)以成為 0.02g/mL 之方式懸浮於 PBS 中並靜置 1 晚後，捨棄上清液，並利用新的 PBS 將本微載體洗淨 2 次。然後，再度利用 PBS 以成為 0.02g/mL 之方式使其懸浮，並在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。繼而，將本微載體以 70% 乙醇洗淨 2 次，以 PBS 洗淨 3 次後，以成為 0.02g/mL 之方式懸浮於包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中。使用本微載體懸浮液，調製包含 120mg 之 Cytodex (註冊商標)1 及 4000000 個 HepG2 細胞的 DMEM 培養基(含有 10%(v/v)胎牛血清)20mL，將本細胞懸浮液於預先經矽塗覆劑(旭 Techno Glass 公司製)處理之燒杯中在 37°C 一邊利

用攪拌子進行攪拌(100rpm)、一邊進行培養 6 小時。此處，以顯微鏡確認 HepG2 細胞係黏著於微載體。繼而，將黏著有細胞之微載體以包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基洗淨 2 次，並懸浮於相同培養基 3ml 中。

【0127】 在包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 20mL 或在本培養基中添加 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)而成之培養基組成物中，分別添加上述微載體懸浮液 300 μ L，在 37°C 培養 3 日。此時，不含脫醯化結冷膠的培養液係一邊利用攪拌子進行攪拌(100rpm)、一邊進行培養。培養後，以顯微鏡確認微載體上的細胞之附著狀態後，利用離心處理(200G，5 分鐘)使微載體沉降。利用 PBS 10 mL 將本微載體洗淨後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37°C 保溫 5 分鐘。再者，添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 9mL 後，使用篩網尺寸 70 μ m 之細胞濾網(BD Falcon 公司製)除去微載體。從此處所獲得之濾液中藉由離心處理(200G，5 分鐘)而回收細胞。將本細胞懸浮於 500 μ L 之培養基中，對其一部分同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。其結果，不含脫醯化結冷膠的培養液包含 123,000 個細胞，而包含脫醯化結冷膠的培養液則包含 1,320,000 個細胞。如上述，確認到包含該特定化合物之構造體的培養基組成物係即便使用微載體實施細胞培養，相較於既存的培養基而言，細胞增殖的促進效果仍較

優異。使用包含該特定化合物之構造體的培養基組成物來實施微載體培養 3 日時之 HepG2 細胞之附著狀態示於第 4 圖。

【0128】 [參考試驗例 4：使用來自細胞株之球體之細胞浮游試驗]

將黃原膠(KELTROL CG，三晶股份公司製)以成為 1% (w/v)的濃度之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後，藉由一邊在 90℃ 進行加熱一邊拌而予以溶解。使用本水溶液，調製使黃原膠最終濃度為 0.1、0.15、0.2%(w/v)之 DMEM/F-12 培養基組成物。又，藉由在 90℃ 進行加熱而調製包含 0.2% (w/v)之 κ -鹿角菜膠(GENUGEL WR-80-J，三晶股份公司製)及 0.2%(w/v)之刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J，三晶股份公司製)的水溶液，使用本水溶液，調製包含 0.03、0.04、0.05% (w/v)之 κ -鹿角菜膠及刺槐豆膠的 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)組成物。

【0129】 使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成 HeLa 細胞的球體，在上述所調製之培養基 1mL 中分別添加數 10 個球體後，在 37℃ 靜置 1 小時，以目視觀察球體細胞之浮游狀態。其結果，確認到 HeLa 細胞的球體在所有上述培養基組成物中皆維持於浮游狀態。再者，確認到在本細胞懸浮液中添加等量之培養基後，藉由離心處理(300 至 400G，5 分鐘)，HeLa 細胞的球體便會沉降，即可進行回收。在該培養基組成物中培養 HeLa 細胞的球體時之浮游狀態分別示於第 5 圖。又，利用與分析例 1 同樣的方法所測定

之黏度示於表 7、8。

【0130】 [表 7]

黃原膠濃度 % (w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 浮游 / 沉澱
0.1	液狀	3.69	浮游
0.15	液狀	5.46	浮游
0.2	液狀	7.26	浮游

【0131】 [表 8]

κ -鹿角菜膠、刺槐豆 膠濃度 % (w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)	HeLa 細胞 浮游 / 沉澱
0.03	液狀	1.34	浮游
0.04	液狀	1.55	浮游
0.05	液狀	1.95	浮游

【0132】 [參考試驗例 5：使用被過濾器過濾的培養基組成物之細胞浮游試驗]

使用與參考試驗例 2 同樣的方法調製含有 0.015% 之脫鹽化結冷膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製) 的 DMEM/F-12 培養基組成物。繼而, 將本培養基組成物 1mL 使用 70 μ m、40 μ m 之過濾器 (BD Falcon 公司製)、30 μ m、20 μ m 之過濾器 (As One 公司製)、10 μ m 之過濾器 (Partec 公司製)、5 μ m、1.2 μ m、0.45 μ m、0.2 μ m 之過濾器 (Sartorius Stedim Japan 公司製) 分別進行過濾。對上述濾液添加約數十個經使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成之 HepG2 細胞

的球體後，在 37°C 靜置 1 小時，以目視觀察球體細胞之浮游狀態。其結果，確認到 HepG2 細胞的球體在通過 10 μ m 以上之過濾器的培養基組成物中是維持於浮游狀態，但在通過 5 μ m 以下之過濾器之培養基組成物中會發生沉澱。再者，確認到此處呈浮游狀態之 HepG2 細胞的球體係藉由在室溫實施 300G、5 分鐘之離心處理，或添加等量的培養基後在室溫實施 200G、5 分鐘之離心處理便會發生沉降，即可進行回收。

【0133】 [參考試驗例 6：球體形成試驗]

使用與參考試驗例 2 同樣的方法調製含有 0.01% 之脫鹽化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)及 10% (v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基(WAKO 公司製)之組成物。繼而，將 HeLa 細胞以成為 1000 個/mL 的濃度之方式進行添加後，分注至 24 孔盤(Corning 公司製)中。將本盤在 37 °C 浮游靜置培養 9 日後，以顯微鏡確認球體的形成。再者，藉由 300G、5 分鐘之離心處理使球體細胞沉降，以 PBS 5mL 洗淨 1 次後，添加 100 μ L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，並在 37°C 保溫 5 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液 100 μ L 添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基 100 μ L，對其一部分的細胞懸浮液，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。其結果，確認到 HeLa 細胞增加至 170000 個/mL。在該培養基組成物中形成之 HeLa 細胞的球體示於第 6 圖。

【0134】 [參考試驗例 7：構造體之光學顯微鏡觀察]

使脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)以成為 0.4%(w/v)之方式懸浮於純水中後, 在 90°C 加熱攪拌並使其溶解。在 300mL 高型燒杯中裝入 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製) 95mL, 在室溫一邊以磁力攪拌器進行攪拌、一邊添加脫醯化結冷膠水溶液 5mL, 藉由持續保持 5 分鐘攪拌而調製脫醯化結冷膠最終濃度 0.02% 之培養基組成物。再者, 將該培養基組成物藉由均質攪拌器(3000rpm)攪拌 5 分鐘。藉由光學顯微鏡(KEYENCE 公司, BIOREVO BZ-9000)觀察所調製之培養基組成物。所觀察之構造體示於第 7 圖。

【0135】 [參考試驗例 8：經由粉培養基與 DAG 之混合過熱而進行調製]

將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製) 20mg、及 DMEM/F-12 培養基(Life Technologies 公司製)1.58 g 裝入 200mL 三角燒瓶中, 注入純水 100mL。在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌, 調製脫醯化結冷膠濃度為 0.02% 之 DMEM/F-12 培養基組成物。在所調製之培養基中, 添加葡聚糖珠粒 Cytodex1(尺寸 200 μ m, GE Healthcare Life Sciences 公司製), 以目視確認珠粒之分散狀態。將浮游分散狀態設為○, 一部分沉降/分散狀態設為△, 沉降狀態設為x而進行評估。結果示於表 9。

【0136】 [表 9]

脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	Cytodex1 分散
0.05	液體狀	○
0.02	液體狀	○
0.01	液體狀	○

【0137】 [參考試驗例 9：將多醣類混合而成之培養基組成物之調製]

將黃原膠(KELTROL CG, 三晶股份公司製)以成為 0.5% (w/v)的濃度之方式懸浮於純水中後,藉由一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解。同樣地,針對海藻酸鈉(Duck 海藻酸 NSPM, Food Chemifa 公司製)、刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J, 三晶股份公司製)、 κ -鹿角菜膠(GENUGEL WR-80-J, 三晶股份公司製)、迪特膠(KELCO CRETE DG-F, 三晶股份公司製),製作 0.5%(w/v)的水溶液。

將本水溶液與 0.2 或 0.1%(w/v)脫醯化結冷膠溶液與 10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基進行混合,在 80°C 過熱 30 分鐘。放冷至室溫後,添加 7.5%碳酸氫鈉水溶液,調製含有最終濃度 0.01、0.02%(w/v)之脫醯化結冷膠及最終濃度 0.1、0.2、0.3、0.4%(w/v)之其他多醣的 DMEM/F-12 培養基組成物。又,與前述同樣地調製包含脫醯化結冷膠的培養基後,添加甲基纖維素(cP400, WAKO 股份公司製)的粉末。在冰浴中進行攪拌,使甲基纖維素溶解,調製含有最終濃度 0.01、0.02%(w/v)之脫醯化結冷膠及最終濃度 0.1、0.2、0.3、

0.4%(w/v)之其他甲基纖維素的 DMEM/F-12 培養基組成物。

【0138】 在上述所調製之培養基中，添加聚苯乙烯珠粒(尺寸 500 至 600 μ m，Polysciences Inc.製)，以目視確認珠粒之分散狀態。將浮游分散狀態設為○，一部分沉降/分散狀態設為△，沉降狀態設為x而進行評估。結果示於表 10。

【0139】 [表 10]

脫醯化結 冷膠濃度 %(w/v)	多醣濃度 %(w/v)	黃原膠	海藻酸鈉	刺槐豆膠	甲基 纖維素	κ -鹿角 菜膠	迪特膠
0.01	0.1	○	○	○	x	○	○
	0.2	○	○	○	△/x	固化	未實施
	0.3	○	○	○	△/x	固化	未實施
	0.4	○	○	○	△/x	固化	未實施
0.02	0.1	○	○	○	○/x	○	○
	0.2	○	○	○	○	固化	未實施
	0.3	○	○	○	○	固化	未實施
	0.4	○	○	○	○	固化	未實施

【0140】 [參考試驗例 10：混合有多醣類之培養基組成物之黏度測定]

利用與參考試驗例 9 之多醣混合系統同樣的方法，調製包含最終濃度 0.005、0.01%(w/v)之脫醯化結冷膠及其他多醣的 DMEM/F-12 培養基。多醣係以最終濃度為黃原膠、海藻酸鈉、刺槐豆膠是 0.1%(w/v)，甲基纖維素是 0.2%(w/v)， κ -鹿角菜膠及迪特膠是 0.05%(w/v)之方式調製。各培養基組成物之狀態及以與分析例 1 同樣的方法所測定之

黏度係示於表 11 至 16。

【0141】 [表 11]

黃原膠濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	4.36
0.1	0.010	液體狀	4.59

【0142】 [表 12]

海藻酸鈉濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	1.53
0.1	0.010	液體狀	1.75

【0143】 [表 13]

刺槐豆膠濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	1.92
0.1	0.010	液體狀	2.36

【0144】 [表 14]

甲基纖維素濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.2	0.005	液體狀	3.36
0.2	0.010	液體狀	3.81

【0145】 [表 15]

κ -鹿角菜膠濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.05	0.005	液體狀	1.04
0.05	0.010	液體狀	1.28

【0146】 [表 16]

迪特膠濃度 %(w/v)	脫醃化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	黏度 (mPa · s)
0.1	0.005	液體狀	2.76
0.1	0.010	液體狀	3.04

【0147】 [參考試驗例 11：變更 2 價金屬陽離子濃度而成之培養基組成物之調製]

使用不含氯化鈣、硫酸鎂、氯化鎂的 DMEM/F-12 (D9785, Aldrich 製)，與參考試驗例 8 之方法同樣地調製包含 0.02% (w/v) 之脫醃化結冷膠的 DMEM/F-12 培養基組成物。又，調製以最終濃度成為 DMEM/F-12 培養基的規定量之方式添加氯化鈣或硫酸鎂、氯化鎂而成之 DMEM/F-12 培養基組成物。由 DMEM/F-12 培養基的規定組成，各自之最終濃度係設為氯化鈣 0.116g/L、硫酸鎂 0.049g/L、氯化鎂 0.061 g/L。

在所調製之培養基組成物中添加葡聚糖珠粒 Cytodex1 (GE Healthcare Life Sciences 公司製)，在 2 日後以目視確認珠粒之分散。將浮游分散狀態設為○，一部分沉降/分散狀態設為△，沉降狀態設為×而進行評估。結果示於表 17。

【0148】 [表 17]

脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	氯化鈣	硫酸鎂 氯化鎂	Cytodex1 分散
0.02	+	+	○
0.02	+	-	○
0.02	-	+	△
0.02	-	-	x

【0149】 [參考試驗例 12：後添加 2 價金屬陽離子而成之培養基組成物之調製]

調製使 0.1%(w/v)脫醯化結冷膠溶液及 5 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(不含氯化鈣、硫酸鎂、氯化鎂，D9785，Aldrich 製)、氯化鈣 1167mg、硫酸鎂 489mg、氯化鎂 287mg 溶解於純水 300mL 中而成之鹽溶液。在 200mL 之高型燒杯中裝入脫醯化結冷膠水溶液及純水，使用錨型攪拌葉片以 200rpm 攪拌溶液。添加將培養基液與水進行混合而成之 A 液，保持攪拌 10 分鐘。其次，添加鹽溶液，進而添加 7.5% 碳酸氫鈉水溶液 1.6mL，調製包含最終濃度 0.02% 之脫醯化結冷膠的 DMEM/F-12 培養基組成物。各液之混合量係示於表中。在調製 4 小時後，針對 6 支培養基組成物，施行聚苯乙烯珠粒及 Cytodex1 之分散評估。結果示於表 18、19。

【0150】 [表 18]

	0.1%(w/v) 脫醯化結冷膠 水溶液	純水	A 液		鹽溶液 氯化鈣 氯化鎂 硫酸鎂
			5 倍濃度 DMEM/F-12	純水	
1	20mL	10mL	20mL	50mL	無
2	20mL	10mL	20mL	47mL	3mL
3	20mL	10mL	20mL	40mL	3mL/水 7mL
4	20mL	30mL	20mL	30mL	無
5	20mL	30mL	20mL	27mL	3mL
6	20mL	30mL	20mL	20mL	3mL/水 7mL

【0151】 [表 19]

	脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	鹽溶液	聚苯乙烯珠粒 分散	Cytodex1 分散
1	0.02	-	x	x
2	0.02	+	○	○
3	0.02	+	○	○
4	0.02	-	x	x
5	0.02	+	○	○
6	0.02	+	○	○

【0152】 [參考試驗例 13: 各種培養基組成物之調製]

調製 0.1%(w/v)脫醯化結冷膠溶液及高濃度之培養基液。高濃度之培養基液係調製 10 倍濃度之 MEM(M0268, Aldrich 製)、RPMI-1640(R6504, Aldrich 製)及 5 倍濃度之 DMEM(高壓滅菌對應培養基, Nissui 製)。將 0.1%(w/v)脫醯化結冷膠溶液與各高濃度培養基、濃度調整用純水進行混合, 在 80°C 過熱 30 分鐘。放冷至室溫後, 添加 7.5%碳酸氫鈉水

溶液，分別調製含有最終濃度 0.01、0.02、0.03% (w/v) 之脫醯化結冷膠的培養基組成物。

針對所調製之 6 支培養基組成物，將聚苯乙烯珠粒及葡聚糖珠粒 Cytodex1 之浮游分散狀態設為○，一部分沉降/分散狀態設為△，沉降狀態設為×而進行評估。結果示於表 20、21。

【0153】 [表 20]

MEM 培養基			
脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	聚苯乙烯珠粒 分散	Cytodex1 分散
0.01	液體狀	△	△
0.02	液體狀	○	○
0.03	液體狀	○	○

【0154】 [表 21]

DMEM 培養基			
脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	狀態	聚苯乙烯珠粒 分散	Cytodex1 分散
0.01	液體狀	△	△
0.02	液體狀	○	○
0.03	液體狀	○	○

【0155】 [參考試驗例 14：包含脫醯化結冷膠的培養基組成物之粒度分佈測定]

仿效參考例 1，調製包含 0.038%(w/v)之脫醯化結冷膠的 DMEM/F-12 培養基組成物。培養基係使用均質攪拌器以 3000rpm 及 6000rpm 攪拌 1 分鐘而調製。針對本培養基組成物之粒度分佈，係使用 Beckman Coulter 股份公司製 Multisizer 4(利用庫爾特原理之精密粒度分佈測定裝置)進行測定，求出體積基準粒度分佈之中徑(d50)。結果示於表 22。

【0156】 [表 22]

培養基調製時均質攪拌器旋轉數	d50 (μ m)
3000 rpm	1.709
6000 rpm	1.499

【0157】 [參考試驗例 15：脫醯化結冷膠之磷酸化]

在玻璃製之 100mL 試驗管中，秤取脫醯化結冷膠 1g 及純水 40mL，在 100°C 加熱 30 分鐘，調製懸浮液。在此懸浮液中，添加磷酸水溶液(85%)1g，加熱回流 5 小時。然後，將經一邊攪拌 12 小時一邊放冷至室溫所獲得之白色懸浮液注入至 99%乙醇(500mL)中。將所產生之綿狀白色固體進行過濾後，使其乾燥，而獲得呈脫醯化結冷膠之磷酸化物形式之淡褐色固體(0.4g)。是否有導入磷酸基，係可藉由傅立葉轉換紅外分光分析(島津製作所股份公司製，IR-Prestage 21)進行確認(1700 cm^{-1} ; P-OH, 1296 cm^{-1} , 1265 cm^{-1} ; P=O)。將淡褐色固體藉由微波加熱分解裝置(ETHOS TC, Milestone General 製)予以分解後，藉由感應耦合電漿發光分光分析

裝置(ICP-OES)(SPS 5520, SII Nanotechnology 公司製)測定磷原子的含有率, 結果為 3.5wt%(n=2)。

【0158】 [參考試驗例 16: 包含經磷酸化之脫醯化結冷膠的培養基組成物之調製]

將任意量之經磷酸化之脫醯化結冷膠(30mg)、及 DMEM/F-12 培養基(Life Technologies 公司製) 1.56g 裝入 200mL 三角燒瓶中, 注入純水 100mL。在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌, 調製脫醯化結冷膠濃度為 0.03%之 DMEM/F-12 培養基組成物。在所調製之培養基中, 添加葡聚糖珠粒 Cytodex1(GEHealthcare Bioscience 公司製), 以目視確認珠粒之分散狀態。在 0.03%(w/v)之經磷酸化之脫醯化結冷膠濃度中, 可辨認出珠粒之分散狀態。

【0159】 [參考試驗例 17: 包含脫醯化結冷膠的培養基組成物之調製]

依下表中所示之比例添加脫醯化結冷膠水溶液及培養基溶液而進行混合, 評估調製脫醯化結冷膠濃度為 0.02%之 DMEM/F-12 培養基組成物時之聚苯乙烯珠粒(尺寸 500 至 600 μ m, Polysciences Inc.製)之分散狀態。結果示於表 23、24。藉由靜置 1 日以上, 在所有條件下, 苯乙烯珠粒係分散。

【0160】 [表 23]

脫醯化結冷膠/純水	DMEM/F12 粉培養基/純水	靜置時間
20mg/10mL	1.56g/90mL	5 分鐘
20mg/20mL	1.56g/80mL	5 分鐘
20mg/30mL	1.56g/70mL	5 分鐘
20mg/40mL	1.56g/60mL	6 小時
20mg/50mL	1.56g/50mL	6 小時
20mg/60mL	1.56g/40mL	6 小時
20mg/70mL	1.56g/30mL	6 小時
20mg/80mL	1.56g/20mL	1 日
20mg/90mL	1.56g/10mL	1 日

將「DMEM/F12 粉培養基/純水」添加至「脫醯化結冷膠/純水」中

【0161】 [表 24]

脫醯化結冷膠/純水	DMEM/F12 粉培養基/純水	靜置時間
20mg/10mL	1.56g/90mL	5 分鐘
20mg/20mL	1.56g/80mL	5 分鐘
20mg/30mL	1.56g/70mL	1 小時
20mg/40mL	1.56g/60mL	6 小時
20mg/50mL	1.56g/50mL	6 小時
20mg/60mL	1.56g/40mL	6 小時
20mg/70mL	1.56g/30mL	1 日
20mg/80mL	1.56g/20mL	1 日
20mg/90mL	1.56g/10mL	1 日

將「脫醯化結冷膠/純水」添加至「DMEM/F12 粉培養基/純水」中

【0162】 [參考試驗例 18：使用過濾器的培養基組成

物之調製]

將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)以最終濃度成為 0.02 或 0.04%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後,藉由在 90°C 加熱 30 分鐘或在 121°C 加熱 20 分鐘而予以溶解。再者,將本水溶液 100mL 以孔徑為 0.22 μ m 之聚醚砜製膜片過濾器(Corning 公司製)進行過濾。繼而,將本濾液與 2 至 4 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Sigma- Aldrich 公司製)進行混合後,以輕度混合器(SI-24, Taitech 公司製)震盪 1 小時,分別調製包含最終濃度 0.01 或 0.015% (w/v)之脫醯化結冷膠的培養基組成物(例如,將 0.02%(w/v)脫醯化結冷膠水溶液與 2 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基逐步混合 25mL,調製 0.01%(w/v)之脫醯化結冷膠培養基組成物 50mL)。使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成 HepG2 細胞的球體,在上述所調製之培養基 1mL 中分別添加數 10 個球體後,在 37°C 靜置,以目視觀察 1 小時及 1 晚後之球體細胞之浮游狀態。其結果,確認到 HepG2 細胞的球體在所有上述培養基組成物中皆維持於浮游狀態。再者,確認到在所有培養基組成物中,在添加 2 倍容量之培養基後,藉由將本細胞懸浮液進行離心處理(500G, 5 分鐘),HepG2 細胞的球體便會沉降,細胞係可進行回收。以目視確認 1 晚後之球體之分散狀態時,將浮游分散狀態設為○,一部分沉降/分散狀態設為△,沉降狀態設為×而進行評估。結果示於表 25。

【0163】 [表 25]

脫醯化結冷膠 水溶液濃度(%)	溶解時之 溫度(°C)	培養基組成物之 脫醯化結冷膠濃度 (%)	HepG2 細胞 之浮游效果
0.02	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○
0.04	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○

【0164】 [參考試驗例 19：將來自細胞株之球體進行培養時之細胞增殖試驗]

將人類胎兒腎細胞株 HEK293(DS Pharma Biomedical 公司製)以成為 250000 個/mL 之方式懸浮於包含 10%(v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將本懸浮液 10 mL 接種至 EZ SPHERE (旭硝子公司製)中後，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內培養 2 日。將此處所獲得之 HEK293 細胞的球體(直徑 100 至 200 μ m)的懸浮液 10 mL 進行離心處理(200G，5 分鐘)而使球體沉降並去除上清液後，懸浮於 1mL 中。繼而，在本球體懸浮液 200 μ L(細胞數約 200000 個)中添加上述培養基 10mL 而使其懸浮後，移至平底試管(BM 機器公

司製)中。同樣地，使用在上述培養基中添加 0.015% (w/v) 之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)而成之培養基組成物，作成球體的懸浮液，移至平底試管(BM 機器公司製)中。尚且，添加有 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物，係可藉由先將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後，一邊在 90℃ 進行加熱一邊攪拌而予以溶解，並將本水溶液在 121℃ 進行 20 分鐘高壓釜滅菌後，以 1/20 稀釋之方式添加至包含 10%(v/v)胎牛血清的 EMEM 培養基中，而調製之。

【0165】 在 37℃ 於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內將上述球體懸浮液靜置培養 5 日後，藉由添加 2 倍容量之培養基並施行離心處理(500G，5 分鐘)而使球體沉降，並去除上清液。繼而，將所回收之球體以 PBS 10mL 洗淨 1 次後，添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37℃ 保溫 5 分鐘。添加上述培養基 9mL 後，藉由離心處理(500G，5 分鐘)將細胞進行回收。對此處所獲得之細胞懸浮液 2mL 的一部分，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞及死細胞數。尚且，作成不含脫醯化結冷膠的培養基組成物作為對照，施行同樣的實驗。

【0166】 其結果，確認到 HEK293 細胞的球體係能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確

認到該培養基組成物係相較於不含脫醃化結冷膠的培養基而言，使細胞增殖時死細胞的比例較少，細胞增殖的促進效果優異。此時，利用既存的培養基所培養之球體係沉降於培養容器的底面。

關於 HEK293 細胞，以不含脫醃化結冷膠的培養基進行培養時之細胞數設為 1 時之相對細胞數示於表 26。又，以不含脫醃化結冷膠的培養基進行培養時之死細胞率(死細胞數/活細胞數)設為 1 時之相對死細胞率示於表 27。

【0167】 [表 26]

脫醃化結冷膠		HEK293 細胞
無	相對細胞數	1.0
有	相對細胞數	1.6

【0168】 [表 27]

脫醃化結冷膠		HEK293 細胞
無	相對死細胞率	1.0
有	相對死細胞率	0.3

【0169】 [參考試驗例 20：將昆蟲細胞進行培養時之細胞增殖試驗]

將脫醃化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後，藉由一邊在 90℃ 進行加熱一邊攪拌而予以溶解，將本水溶液在 121℃ 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。使用本溶液，調製在

Sf-900 (註冊商標)IIISFM 培養基(Gibco 公司製)中添加最終濃度 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物。繼而，將來自秋夜盜蛾(*Spodoptera frugiperda*)之 Sf9 細胞(Gibco 公司製)以成為 100000 細胞/mL 之方式接種至上述經添加脫醯化結冷膠而成之培養基組成物中後，以每 1 孔成為 1mL 之方式分注至 24 孔平底微板(Corning 公司製)之孔中。將此等細胞懸浮液於保溫箱內在 25℃ 靜置培養 5 日。然後，回收培養液的一部分，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。尚且，作成不含脫醯化結冷膠的培養基組成物作為對照，施行同樣的實驗。

【0170】 其結果，確認到 Sf9 細胞能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態均勻地進行培養，且利用該培養基組成物進行增殖。再者，確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的培養基而言，使細胞增殖時細胞增殖的促進效果優異。浮游靜置培養 5 日後之 Sf9 細胞的細胞數示於表 28。

【0171】 [表 28]

脫醯化結冷膠	Sf9 細胞數(×10000)
無	33.5
有	47.4

【0172】 [參考試驗例 21：將 CD34 陽性細胞進行培養時之細胞增殖試驗]

將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後, 藉由一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解, 將本水溶液在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。使用本溶液, 調製在 StemSpan SFEM 培養基(StemCell Technologies 公司製)中添加最終濃度 0.015%(w/v)之脫醯化結冷膠、20ng/mL 之血小板生成素(WAKO 公司製)及 100 ng/mL 之幹細胞因子(SCF, WAKO 公司製)而成之培養基組成物。繼而, 來自人類臍帶血之 CD34 陽性細胞(Lonza 公司製)以成為 10000 細胞/mL 之方式接種至上述經添加脫醯化結冷膠而成之培養基組成物中後, 以每 1 孔成為 1mL 之方式分注至 24 孔平底微板(Corning 公司製)之孔中。將此等細胞懸浮液在 37°C 於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置培養 7 日。然後, 回收培養液的一部分, 同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後, 以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。又, 藉由在剩餘的培養液中添加 3 倍容量之培養基並施行離心處理(500G, 5 分鐘)而使所有細胞沉降。尚且, 作成不含脫醯化結冷膠的培養基組成物作為對照, 施行同樣的實驗。

【0173】 其結果, 確認到 CD34 陽性細胞係能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態均勻地進行培養, 且利用該培養基組成物進行增殖。再者, 確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的既存的培養基而言, 具有同等以上之細胞增殖促進效果。又, 確認到藉由離心處理, 細胞便會沉降, 細胞即可進行回收。將以不含脫醯化結冷

膠的培養基進行培養時之細胞數設為 1 時，在浮游靜置培養 7 日後由 CD34 陽性細胞所增殖之細胞之相對細胞數示於表 29。

【0174】 [表 29]

脫醯化結冷膠	相對細胞數
無	1.0
有	1.2

【0175】 [參考試驗例 22：球體形成試驗]

使用與參考試驗例 2 同樣的方法，調製含有 0.015% 之脫醯化結冷膠 (KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製) 及 10% (v/v) 胎牛血清的 DMEM 培養基 (WAKO 公司製) 之組成物。繼而，將 HepG2 細胞以成為 15000 個/mL 的細胞濃度之方式進行添加後，分注 1mL 至 24 孔盤 (Corning 公司製) 中。將本盤在 37°C 浮游靜置培養 7 日後，以顯微鏡確認球體的形成。再者，藉由 400G、5 分鐘之離心處理而使球體細胞沉降，以 PBS 5mL 洗淨 1 次後，添加 100 μ L 之胰蛋白酶-EDTA (乙二胺四醋酸) 溶液 (WAKO 公司製)，在 37°C 保溫 5 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液 100 μ L 添加包含 10% (v/v) 胎牛血清的 DMEM 培養基 100 μ L，對其一部分的細胞懸浮液，同量添加台盼藍染色液 (Invitrogen 公司製) 後，以血球計算板 (ERMA 販賣股份公司製) 測定活細胞數。其結果，確認到 HepG2 細胞係在該培養基組成物中形成球體，且細胞數亦增加至 80800 個/mL。在該培養基組成物中

形成之 HepG2 細胞的球體示於第 8 圖。

【0176】 [參考試驗例 23：使用來自細胞株之球體之細胞浮游試驗]

將迪特膠(KELKO-CRETE DG, 三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)的濃度之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後,藉由一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解。使用本水溶液,調製使迪特膠最終濃度為 0.1%(w/v)之 DMEM/ F-12 培養基組成物。又,藉由在 90°C 進行加熱而調製包含 0.5%(w/v)之天然型結冷膠(KELCOGEL HT, 三榮源 FFI 股份公司製)的水溶液,使用本水溶液調製包含 0.05、0.1% (w/v)之天然型結冷膠的 DMEM/F-12 培養基(Sigma 公司製)組成物。

【0177】 使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成 HeLa 細胞的球體,在上述所調製之培養基 1mL 中分別添加數 10 個球體後,在 37°C 靜置 1 小時,以目視觀察球體細胞之浮游狀態。其結果,確認到 HeLa 細胞的球體在所有上述培養基組成物中皆維持於浮游狀態。再者,確認到藉由將包含 0.1%(w/v)之迪特膠的本細胞懸浮液進行離心處理(200G, 5 分鐘),HeLa 細胞的球體便會沉降,細胞即可進行回收。

【0178】 [參考試驗例 24：使用具有細胞黏著能力的磁性珠粒之細胞浮游試驗 1]

將經層黏蛋白或纖維連蛋白塗覆之 GEM(註冊商標,Global Eukaryotic Microcarrier, GL Sciences 股份公司製)懸浮溶液以每 500 μ L 逐步分注至 1.5mL 容量之微試管(Eppendorf 公

司製)中，使用磁石台架(TA4899N12，多摩川精機股份公司製)從上述 GEM 懸浮溶液中使 GEM 聚集並除去溶媒。再者，藉由含有 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)500 μ L 將 GEM 洗淨 2 次後，懸浮於同上培養基 500 μ L。將本懸浮液每 1 孔分注 50 μ L 至作為細胞低黏著盤之 Sumilon Celltight Plate 24F(住友 Bakelite 股份公司製)中。繼而，以成為 250000 細胞/mL 之方式添加另行調製之 HepG2 細胞，以同上培養基使最終容量成為 500 μ L/孔。將本細胞懸浮液以手動攪拌後，將本盤於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置一晚。以顯微鏡確認在 GEM 上的細胞之黏著後，將細胞懸浮液移至 1.5mL 容量之微試管(Eppendorf 公司製)中，使用上述磁石台架使附著細胞的 GEM 聚集並除去上清液。

【0179】 使用與參考試驗例 2 同樣的方法，調製含有 0.015%之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)及 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)之組成物。分別將本培養基組成物或不含脫醯化結冷膠的同上培養基 1mL 添加至上述所調製之附著有 HepG2 細胞的 GEM (層黏蛋白或纖維連蛋白塗覆)中，使其懸浮後，移至 Sumilon Celltight Plate 24F 中。繼而，將本盤於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置 6 日後，將細胞培養液移至 1.5mL 容量之微試管(Eppendorf 公司製)中，一邊緩慢地吸量至上述磁石台架上、一邊使附著細胞的 GEM 聚集並除去上清液。將本 GEM 以 PBS 1mL 洗淨 1 次，添加 200 μ L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37°C 保溫

10 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液 200 μ L 添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 800 μ L，對其一部分的細胞懸浮液，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。

【0180】 其結果，確認到黏著有 HepG2 細胞之 GEM 能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的既存的培養基而言，細胞增殖的促進效果優異。又，確認到能夠藉由使用磁力而從該培養基組成物中使附著有 HepG2 細胞的 GEM 聚集，進一步可從本 GEM 中回收 HepG2 細胞。

以含有或非含有脫醯化結冷膠的培養基將 HepG2 細胞在 GEM 上培養 6 日時之細胞數示於表 30。又，將附著有 HepG2 細胞之塗覆層黏蛋白的 GEM 利用該培養基組成物進行培養時之浮游狀態示於第 9 圖。

【0181】 [表 30]

脫醯化結冷膠	HepG2 細胞數($\times 10000/\text{mL}$)	
	塗覆層黏蛋白的 GEM	塗覆纖連蛋白的 GEM
無	50.0	54.7
有	112.3	94.0

【0182】 [參考試驗例 25：使用具有細胞黏著能力的磁性珠粒之細胞浮游試驗 2]

與參考試驗例 24 同樣地，將經纖連蛋白塗覆之 GEM

(註冊商標，Global Eukaryotic Microcarrier，GL Sciences 股份公司製)懸浮於 MF-Medium(註冊商標)間葉系幹細胞增殖培養基(東洋紡股份公司製)中。將本懸浮液每 1 孔分注 50 μ L 至作為細胞低黏著盤之 Sumilon Celltight Plate 24F(住友 Bakelite 股份公司製)中。繼而，以成為 250000 細胞/mL 之方式添加另行調製之來自人類骨髓之間葉系幹細胞(Cell Applications 公司製)，與參考試驗例 24 同樣地，使本盤於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置一晚，調製黏著有間葉系幹細胞之 GEM。

【0183】 使用與參考試驗例 2 同樣的方法，調製含有 0.015% 之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)的 MF-Medium(註冊商標)間葉系幹細胞增殖培養基(東洋紡股份公司製)之組成物。分別將本培養基組成物或不含脫醯化結冷膠的同上培養基 1mL 添加至上述所調製之附著有間葉系幹細胞的 GEM(纖維蛋白塗覆)中，使其懸浮後，移至 Sumilon Celltight Plate 24F 中。繼而，將本盤於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置 4 日後，將細胞培養液移至 1.5mL 容量之微試管(Eppendorf 公司製)中，一邊緩慢地吸量至上述磁石台架上、一邊使附著細胞的 GEM 聚集並除去上清液。將本 GEM 以 PBS 1mL 洗淨 1 次，添加 200 μ L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37°C 保溫 10 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液 200 μ L 添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 800 μ L，對其一部分的細胞懸浮液同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，

以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。

【0184】 其結果，確認到黏著有間葉系幹細胞之 GEM 能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的既存的培養基而言，細胞增殖的促進效果優異。又，確認到能夠藉由使用磁力而從該培養基組成物中使附著有間葉系幹細胞的 GEM 聚集，進一步可從本 GEM 中回收間葉系幹細胞。

以含有或非含有脫醯化結冷膠的培養基將間葉系幹細胞在 GEM 上培養 4 日時之細胞數示於表 31。

【0185】 [表 31]

脫醯化結冷膠	間葉系幹細胞細胞數($\times 10000/\text{mL}$)
無	11.3
有	20.9

【0186】 [參考試驗例 26：使用海藻酸珠粒之細胞浮游試驗]

以下試驗係以 PG Research 股份公司製海藻酸三次元培養套組之方法為基準而實施。將另行調製之 HepG2 細胞以成為 400000 細胞/mL 之方式添加至海藻酸鈉溶液(PG Research 股份公司製) 2.5mL 中，進而以成為 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之方式添加人類重組層黏蛋白 511(Veritas 股份公司製)，調製細胞懸浮液。針對本細胞懸浮液，以安裝有探針之 5mL 注

射器(Terumo 股份公司製)進行回收後，於本注射器安裝 22G 注射針(Terumo 股份公司製)。繼而，對分別添加有氯化鈣水溶液(PG Research 股份公司製)2mL 之 24 孔平底微板(PG Research 股份公司製)之孔，各添加本細胞懸浮液 10 滴。在室溫靜置 10 分鐘之後確認海藻酸珠粒之形成後，除去氯化鈣溶液，添加 PBS 2mL 並在室溫靜置 15 分鐘。再者，除去 PBS 後，添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)2mL 並在室溫靜置 15 分鐘。除去培養基後，分別將使用與參考試驗例 2 同樣的方法所調製之含有 0.03%之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)及 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)之培養基組成物或不含脫醯化結冷膠的同上培養基 1mL 添加至各孔中，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內靜置培養 8 日。尚且，培養基更換係在培養第 4 日實施。

【0187】 將所培養之海藻酸珠粒使用 1mL 容量之吸頭移至 1.5mL 容量之微試管(Eppendorf 公司製)中後，將檸檬酸鈉溶液(PG Research 股份公司製)1mL 添加至各試管中，在室溫攪拌 15 分鐘而使海藻酸珠粒溶解。繼而，藉由 300G、3 分鐘之離心處理而使細胞沉降，並除去上清液。對本細胞添加 200 μ L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37℃ 保溫 5 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液 200 μ L 添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 800 μ L，對其一部分的細胞懸浮液，同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣

股份公司製)測定活細胞數。

【0188】 其結果，確認到包埋有 HepG2 細胞之海藻酸珠粒能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的既存的培養基而言，細胞增殖的促進效果優異。

以含有或非含有脫醯化結冷膠的培養基將 HepG2 細胞在海藻酸珠粒內培養 8 日時之細胞數示於表 32。又，將包埋有 HepG2 細胞之海藻酸珠粒利用該培養基組成物進行培養時之浮游狀態示於第 10 圖。

【0189】 [表 32]

脫醯化結冷膠	HepG2 細胞數(×10000/mL)
無	34.9
有	51.8

【0190】 [參考試驗例 27：使用膠原蛋白凝膠膠囊之細胞浮游試驗]

將 A:組織培養用膠原蛋白 Cellmatrix(註冊商標)Type I-A(細胞基質，新田明膠股份公司製)、B:10 倍濃度之 DMEM/F-12 培養基(Aldrich 公司製)、C:再構成用緩衝液(在 0.05N 氫氧化鈉溶液 100mL 中添加碳酸氫鈉 2.2 g、HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌吡乙磺酸)) 4.77 g 並被過濾滅菌者)分別一邊在水中冷卻一邊以成為 A : B : C = 8 : 1 : 1 之方式進行混合。再者，以成為 5 μ g/mL 之方式添加人類重組層黏蛋

白 511(Veritas 股份公司製)，調製膠原蛋白混合溶液 500 μ L。對本混合溶液，以成為 200000 細胞/mL 之方式添加另行調製之 HepG2 細胞，並使用安裝有 25G 注射針(Terumo 股份公司製)之 1.5mL 注射器(Terumo 股份公司製)回收全量。繼而，對預先在 37°C 保溫之添加有含有 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)10mL 之平底試管(BM 機器公司製)，使用上述注射器逐步滴加 1 滴細胞懸浮液。在 37°C 水浴中保溫 10 分鐘，確認直徑 2mm 左右之不定形的膠原蛋白凝膠膠囊之形成後，利用與參考試驗例 2 同樣的方法，以最終濃度成為 0.04%之方式添加脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)，輕輕攪拌而使上述膠囊浮游。繼而，於 CO₂ 保溫箱(5% CO₂)內將本試管靜置培養 5 日。

【0191】 對包含膠原蛋白凝膠膠囊的培養液添加 PBS 25mL，藉由 400G、5 分鐘之離心處理而使膠原蛋白凝膠膠囊沉降，並除去上清液。再度添加 PBS 25mL 並施行離心處理，以殘量成為 5mL 之方式除去上清液。對本液添加 1%(W/V)之膠原蛋白酶 L(新田明膠股份公司製)20 μ L 後，在 37°C 震盪 2 小時。確認膠原蛋白凝膠之溶解後，添加 PBS 10mL，藉由 400G、5 分鐘之離心處理而使細胞沉降，並除去上清液。對本細胞添加 1mL 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37°C 保溫 5 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 4mL，藉由 400G、5 分鐘之離心處理而使細胞沉降，

並除去上清液。將所獲得之細胞懸浮於 2mL 之同上培養基中，對其一部分同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。

【0192】 其結果，確認到包埋有 HepG2 之膠原蛋白凝膠膠囊能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，且利用該培養基組成物，細胞係效率良好地進行增殖。而且，確認到該培養基組成物係相較於不含脫醯化結冷膠的既存的培養基而言，細胞增殖的促進效果優異。

以含有或非含有脫醯化結冷膠的培養基將 HepG2 細胞在膠原蛋白凝膠膠囊內培養 5 日時之細胞數示於表 33。又，將包埋有 HepG2 細胞之膠原蛋白凝膠膠囊利用該培養基組成物進行培養時之浮游狀態示於第 11 圖。

【0193】 [表 33]

脫醯化結冷膠	HepG2 細胞數(×10000/mL)
無	62.4
有	106.0

【0194】 [參考試驗例 28：使用過濾器的球體之回收試驗]

使用與參考試驗例 2 同樣的方法，調製含有 0.015% 之脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)及 10% (v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基(WAKO 公司製)之組成物。又，調製不含脫醯化結冷膠的同上培養基作為對照。使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成 HepG2 細胞的球體，在上

述所調製之培養基 1mL 中分別以成為 86000 個的細胞數之方式添加球體後，在 37°C 靜置 1 小時，以目視觀察球體細胞之浮游狀態。再者，在篩網尺寸為 40 μ m 之細胞濾網 (Becton Dickinson 公司製) 上添加本細胞懸浮液，將球體捕捉至過濾器上。繼而，藉由從過濾器的背面使 PBS 10mL 流入而將球體回收至 15mL 試管中，並以 300G、5 分鐘之離心處理而使球體沉降。除去上清液後，對球體添加 500 μ L 之胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四醋酸)溶液(WAKO 公司製)，在 37°C 保溫 5 分鐘。對此處所獲得之細胞懸浮液添加包含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培養基 1mL，對其一部分同量添加台盼藍染色液(Invitrogen 公司製)後，以血球計算板(ERMA 販賣股份公司製)測定活細胞數。其結果，確認到 HepG2 細胞的球體在上述培養基組成物中是維持於浮游狀態。再者，確認到藉由將包含 0.015%之脫醯化結冷膠的本球體懸浮液進行過濾器處理，使 HepG2 細胞的球體可以與不含脫醯化結冷膠的培養基同等的回收率將細胞進行回收。將使用不含脫醯化結冷膠的培養基並被過濾器回收之 HepG2 細胞數設為 1 時，從包含脫醯化結冷膠的培養基所回收之相對細胞數示於表 34。

【0195】 [表 34]

脫醯化結冷膠	相對 HepG2 細胞數
無	1.0
有	1.1

【0196】 [參考試驗例 29：使用各種多醣類之混合劑的球體之細胞浮游試驗]

使用與參考試驗例 9 同樣的方法，調製將黃原膠 (KELTROL CG，三晶股份公司製)、海藻酸鈉 (Duck 海藻酸 NSPM，Food Chemifa 公司製)、刺槐豆膠 (GENUGUM RL-200-J，三晶股份公司製)、甲基纖維素 (cP400，WAKO 股份公司製)、 κ -鹿角菜膠 (GENUGEL WR-80-J，三晶股份公司製)、果膠 (GENU pectin LM-102AS，三晶股份公司製) 或迪特膠 (KELCO CRETE DG-F，三晶股份公司製) 及脫醯化結冷膠 (KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製) 進行組合並混合而成之 DMEM/F-12 培養基組成物。使用與參考試驗例 2 同樣的方法作成 HepG2 細胞的球體，在上述所調製之培養基 1mL 中分別添加數 10 個球體後，在 37°C 靜置，以目視觀察 1 小時及 1 晚後之球體細胞之浮游狀態。其結果，確認到 HepG2 細胞的球體在所有上述培養基組成物中皆維持於浮游狀態。再者，確認到在所有培養基組成物中，在添加 2 倍容量之培養基後，藉由將本細胞懸浮液進行離心處理 (500G，5 分鐘)，HepG2 細胞的球體便會沉降，細胞即可進行回收。以目視確認 1 晚後之球體之分散狀態時，將浮游分散狀態設為 ○，一部分沉降/分散狀態設為 △，沉降狀態設為 × 而進行評估之結果示於表 35 及表 36。尚且，表中之 - 表示未實施。

【0197】 [表 35]

脫醯化結冷膠濃度 (%)	糖類添加濃度 (%)	甲基纖維素	迪特膠
0.005	0.05	—	△
	0.2	△	—

【0198】 [表 36]

脫醯化結冷膠濃度 (%)	糖類添加濃度 (%)	黃原膠	海藻酸鈉	刺槐豆膠	甲基纖維素	κ -鹿角菜膠	果膠	迪特膠
0.01	0.05	—	—	—	—	○	—	○
	0.1	○	○	○	—	—	△	—
	0.2	—	—	—	○	—	—	—

【0199】 [珠粒與細胞之分散性比較 1]

針對上述(比較例)所調製之含有脫醯化結冷膠的培養基及含有甲基纖維素的培養基，將葡聚糖珠粒 Cytodex(註冊商標)1(GE Healthcare Life Sciences 公司製)與 HeLa 細胞球體之分散狀態進行比較。結果示於表(表 37 及表 38)中。由於 Cytodex1 與 HeLa 細胞球體之分散狀態係極為相關，因而可使用 Cytodex1 作為細胞球體模型。

【0200】 [表 37]

脫醯化結冷膠濃度 %(w/v)	Cytodex1 浮游/沉澱	HeLa 細胞 浮游/沉澱
0.01	浮游/一部分沉澱	浮游
0.02	浮游	浮游
0.03	浮游	浮游
0.05	浮游	浮游

【0201】 [表 38]

甲基纖維素濃度 %(w/v)	Cytodex1 浮游/沉澱	HeLa 細胞 浮游/沉澱
0.1	沉澱	沉澱
0.3	沉澱	沉澱
0.6	沉澱	沉澱
1.0	沉澱	沉澱

【0202】 [珠粒與細胞之分散性比較 2]

針對參考試驗例 9 所調製之含有多醣及脫醯化結冷膠的培養基，將聚苯乙烯珠粒(尺寸 500 至 600 μ m, Polysciences Inc.製)與 HepG2 細胞球體之分散狀態進行比較。將浮游分散狀態設為○，一部分沉降/分散狀態設為△，沉降狀態設為x而進行評估。結果示於表(表 39)中。由於聚苯乙烯珠粒與 HepG2 細胞球體之分散狀態係極為相關，因而可使用聚苯乙烯珠粒作為細胞球體模型。

【0203】 [表 39]

	多醣 濃度	黃原膠		海藻酸鈉		刺槐豆膠		迪特膠	
		聚苯乙 烯珠粒	HepG2 塊	聚苯乙 烯珠粒	HepG2 塊	聚苯乙 烯珠粒	HepG2 塊	聚苯乙 烯珠粒	HepG2 塊
脫鹽化結 冷膠濃度	0.05%							○	○
	0.1%	○	○	○	○	○	○	○	
0.01%(w/v)	0.2%	○		○		○			

【0204】 [參考試驗例 30：來自水稻之植物癒傷組織之浮游培養試驗]

將經鹽水選種所精選之水稻日本晴的完熟種子(由湖東農業協同組合購入)50 粒移至 50mL 聚苯乙烯試管(BD Falcon 公司製)中，以滅菌水 50mL 洗淨後，在 70%乙醇水溶液 30mL 中攪拌 1 分鐘。除去乙醇水溶液後，添加 Kitchen Haiter(花王股份公司製)30mL，攪拌 1 小時。除去 Kitchen Haiter 後，以滅菌水 50mL 洗淨 4 次。將此處經滅菌之種子置床於包含 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 之 2,4-二氯苯氧基乙酸(Sigma-Aldrich 公司製)及瓊脂的 Murashige-Skoog 基礎培養基(M9274，Sigma-Aldrich 公司製)1.5mL/孔(24 孔平底微板(Corning 公司製))上。以 30°C ，16 小時暗處/8 小時暗處之條件培養 3 週，採取在種子的胚盤上所增殖之乳白色的癒傷組織(1 至 2mm)。

【0205】 將脫鹽化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中後，藉由一邊在 90°C 進行加熱一邊攪拌而予以溶解，將本水溶液在 121°C 進行 20 分鐘高壓釜滅菌。使用本溶液，調

製在包含 $2 \mu\text{g/mL}$ 之 2,4-二氯苯氧基乙酸(Sigma-Aldrich 公司製)的 Murashige-Skoog 基礎培養基(M9274, Sigma-Aldrich 公司製)中添加最終濃度 0.03%(w/v)之脫鹽化結冷膠而成之培養基組成物。將上述所調製之癒傷組織 15 個添加至本培養基組成物 10mL/平底試管(BM 機器公司製)中，在 25°C 進行震盪培養 7 日。其結果，確認到來自水稻之癒傷組織係能夠藉由使用該培養基組成物而以浮游狀態進行培養，利用該培養基組成物可維持癒傷組織。將來自水稻之癒傷組織利用該培養基組成物進行培養時之浮游狀態示於第 12 圖。

【0206】 [製造例 1：來自結晶纖維素之纖維素奈米纖維之製造]

將市售的結晶纖維素(旭化成 CHEMICALS 股份公司製 PH-101)4 質量份添加至純水 396 質量份中並使其分散後，使用 Sugino Machine 股份公司製高壓粉碎裝置(Starburst 系統)以 220MPa 進行 100 次粉碎處理，獲得來自結晶纖維素之纖維素奈米纖維之水分散液(MNC)。將所得之分散液以培養皿測取，於 110°C 進行 1 小時乾燥，除去水分並測定殘渣之量，且測定濃度。結果，水中之纖維素濃度(固形份濃度)為 1.0 質量%。將此水分散液進行 121°C 、20 分鐘之高壓釜處理，予以滅菌。

【0207】 [製造例 2：來自紙漿之纖維素奈米纖維之製造]

對於市售之牛皮紙漿(王子 F-TeX 股份公司製 LBKP，固形份 89 質量%)5 質量份添加純水 145 質量份使其分散後，

使用增幸產業股份公司製石臼式粉碎裝置(mass collider)以 1500rpm 進行 9 次粉碎處理，製作紙漿漿液。將前述紙漿漿液使用 Sugino Machine 股份公司製高壓粉碎裝置(Starburst 系統)以 220MPa 進行 300 次處理，而獲得奈米纖維素之水分散液(PNC)。將所得之分散液以培養皿測取，於 110°C 進行 1 小時乾燥，除去水分並測定殘渣之量，且測定濃度。結果，水中之纖維素濃度(固形份濃度)為 1.6 質量%。將此水分散液進行 121°C、20 分鐘之高壓釜處理，予以滅菌。

【0208】 [製造例 3：甲殼素奈米纖維之製造]

對於市售之甲殼素粉末(甲陽 CHEMICAL 股份公司製) 20 質量份添加純水 980 質量份並使其分散後，使用 Sugino Machine 股份公司製高壓粉碎裝置(Starburst 系統)以 245MPa 進行 200 次粉碎處理，獲得甲殼素奈米纖維之水分散液(CT)。將所得之分散液以培養皿測取，於 110°C 進行 1 小時乾燥，除去水分並測定殘渣之量，且測定濃度。結果，水中之甲殼素濃度(固形份濃度)為 2.0 質量%。將此水分散液進行 121°C、20 分鐘之高壓釜處理，予以滅菌。

【0209】 [試驗例 1：平均纖維徑 D 及平均纖維長 L 之測定]

奈米纖維之平均纖維徑(D)係如下所測定。首先，將應研商事股份公司製之火棉膠支持膜以日本電子股份公司製之離子清潔機(JIC-410)施行 3 分鐘親水化處理，將製造例 1 至 3 所製作之奈米纖維分散液(以超純水稀釋)滴下數滴，於室溫予以乾燥。將其使用日立製作所股份公司製之

穿透型電子顯微鏡(TEM, H-8000)(10,000 倍)以加速電壓 200kV 進行觀察，使用所得之圖像，對於樣本數：200 至 250 支之奈米纖維，計測一支一支的纖維徑，將其數平均值作為平均纖維徑(D)。

另外，平均纖維長(L)係將製造例所製作之奈米纖維分散液使用純水以成為 100ppm 之方式稀釋，並使用超音波洗淨機使奈米纖維均勻地分散。將此奈米纖維分散液澆鑄於預先經使用濃硫酸將表面予以親水化處理之矽晶圓上，於 110°C 乾燥 1 小時，而製成試料。將所得之試料以日本電子股份公司製掃描式電子顯微鏡(SEM, JSM-7400F)(2,000 倍)觀察，使用該觀察所得之圖像，對於樣本數：150 至 250 支之奈米纖維，計測一支一支的纖維長，將其數平均值作為平均纖維長(L)。

求出製造例 1 至製造例 3 所得之奈米纖維之平均纖維徑 D 及平均纖維長 L，由此等值求得長寬比 L/D。所得之結果係示於表 40。

【0210】 [表 40]

	平均纖維徑 D [nm]	平均纖維長 L [nm]	長寬比 L/D
製造例 1(MNC)	15	181	12
製造例 2(PNC)	13	2810	222
製造例 3(CT)	12	352	29

【0211】 [實施例 1 至實施例 4]

使用前述製造例 1 至製造例 3 所調製之奈米纖維分散液及脫醯化結冷膠水溶液，而調製下述表 41 所記載之培養基組成物。

首先，對於製造例 1 至製造例 3 所調製之纖維素奈米纖維 MNC、PNC 及甲殼素奈米纖維添加滅菌水，藉此而各自稀釋為 1%(w/v)水分散液。另一方面，對於脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製：DAG)1 質量份添加 99 體積份之滅菌水，進行 121℃、20 分鐘之高壓釜處理而將其溶解及滅菌，調製脫醯化結冷膠 1%(w/v)水溶液。

將前述 1%(w/v)分散液或水溶液 1 體積份取於 50mL 圓錐管，添加 49 體積份之滅菌水，進行吸量直至成為均勻為止。於其中，添加經 0.22 μ m 過濾器所滅菌過濾之 2 倍濃度之 DMEM(high glucose，Aldrich 公司製，含有預定量之碳酸氫鈉)50 體積份，藉由吸量而混合，調整出奈米纖維濃度為 0.01%(w/v)之培養基組成物。

同樣地，以使最終濃度成為 0.01 至 0.1%(w/v)之所期望濃度的方式，調製添加有奈米纖維分散液或脫醯化結冷膠水溶液之培養基組成物。

【0212】 [實施例 5 及比較例 2 至比較例 5]

對於 κ -鹿角菜膠(GENUGEL WR-80-J，三晶股份公司製：Car)(實施例 5)、刺槐豆膠(GENUGUM RL-200-J，三晶股份公司製：LBG)(比較例 2)、黃原膠(KELTROL CG，三晶股份公司製：Xan)(比較例 3)、迪特膠(KELCO CRETE DG-F，三晶股份公司製：DU)(比較例 4)、海藻酸鈉(Duck

海藻酸 NSPM，Food Chemifa 公司製：Alg)(比較例 5)1 質量份添加 99 質量份之滅菌水，進行 121°C、20 分鐘之高壓釜處理，而予以溶解及滅菌。

對於由前述所調製之多醣溶液，藉由與實施例 1 至 4 同樣之操作，調製以使最終濃度成為 0.03、0.05、0.07、0.1%(w/v)之方式添加多醣溶液而成之培養基組成物。

【0213】 [試驗例 2：浮游作用之評估 1]

於實施例 1 至 5 及比較例 2 至 5 之培養基組成物中添加聚苯乙烯珠粒(Polysciences Inc.公司製，200 至 300 μ m)，在確認已藉由旋渦混合攪拌而使珠粒均勻分散於培養基組成物中之後，於室溫(25°C)靜置一日，以目視確認珠粒之分散狀態。將珠粒均勻地浮游於培養基組成物中之狀態作為◎，產生一部分上清液之狀態為○，沉降狀態為x而進行評估。結果示於表 41。

【0214】 結果，實施例 1 至實施例 4 之培養基組成物中係顯示使珠粒浮游之作用。此外，在實施例 5 中，於室溫下雖可見珠粒之浮游作用，但若加溫至 37°C 而會使珠粒沉降，在細胞培養條件下係無法獲得浮游作用。比較例 2 至比較例 5 中之珠粒則完全沉降至底面。

【0215】 [表 41]

			濃度 %(w/v)				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
實施例	1	MNC	x	x	○	○	○
	2	PNC	○	◎	◎	◎	◎
	3	CT	x	○	○	○	○
	4	DAG	◎	◎	◎	◎	◎
	5	Car	x	○*	○*	○*	○*
比較例	2	LBG	x	x	x	x	x
	3	Xan	x	x	x	x	x
	4	DU	x	x	x	x	x
	5	Alg	x	x	x	x	x

【0216】 * 實施例 5 之 κ -鹿角菜膠 (Car) 雖然在 25°C 時可見浮游作用，但在細胞培養條件同等之 37°C 則立刻失去浮游作用而沉降。關於其他培養基，在 37°C 及 25°C 係獲得相同結果。

【0217】 [試驗例 3：浮游作用之評估 2]

與試驗例 2 同樣地，針對實施例 2、4 及 5 以及比較例 2 之培養基組成物，詳細地評估低濃度區域 (0.01 至 0.04%(w/v)) 之浮游作用。添加聚苯乙烯珠粒並靜置 2 日後，以目視確認珠粒之分散狀態。將浮游分散狀態作為 ○，沉降狀態為 x 而進行評估。針對一部分之沉降/分散狀態，依據 10mL 圓錐管內之浮游區域之高度而計算出珠粒浮游率。結果示於表 42。

【0218】 [表 42]

		高分子	濃度 % (w/v)					
			0.015	0.02	0.025	0.03	0.035	0.04
實施例	2	PNC	50*	65*	85*	90*	○	○
	4	DAG	○	○	○	○	○	○
	5	Car	x	x*	x*	x*	x*	x*
比較例	2	LBG	x	x	x	x	x	x

【0219】 ※係表示珠粒浮游率。PNC 係在 0.015%(w/v) 以上之濃度顯示浮游作用，實施例 4 之培養基組成物係在 0.015%(w/v) 以上之濃度顯示浮游作用。實施例 2 之培養基組成物係隨著濃度增加而階段性地提升浮游作用。實施例 5 之培養基組成物係在 0.02% 以上於 25℃ 時顯示浮游作用，但在 37℃ 則立刻失去浮游作用而沉降(*)。關於其他培養基，在 37℃ 及 25℃ 係獲得相同結果。

【0220】 [試驗例 4：培養基組成物之黏度]

在 25℃ 條件下使用音叉震動式黏度測定(SV-1A, A&D Company Ltd.)評估實施例 1 至 5 及比較例 2 至 5 之培養基組成物之黏度。將結果示於第 13 圖。其結果，本發明之培養基組成物中，由於奈米纖維或增黏性多醣之含量極少，故相較於一般之培養基之黏度而言，未見到顯著的黏度增加。與試驗例 2 之結果加以比較，未見到黏度與浮游作用之間有所關連。

【0221】 [試驗例 5：培養基組成物之掃描式電子顯

[微鏡觀察]

將實施例 1 至 5、比較例 3 至 4 所調製之培養基組成物，澆鑄於預先經使用濃硫酸將表面予以親水化處理之矽晶圓上，於 110°C (僅有比較例 1 是室溫)進行 1 小時乾燥後，以純水清洗而除去多餘的鹽分等之後，再度於 110°C 進行 1 小時乾燥，以此狀態作為試料。將前述試料使用日本電子股份公司製之掃描式電子顯微鏡(SEM, JSM-7400F, 10,000 倍)進行觀察。實施例 1 至 4 及比較例 3 至 4 之培養基組成物之觀察結果係示於第 14 圖至第 21 圖。

【0222】 關於觀察之結果，在實施例 1 至 4 及於室溫乾燥之實施例 5 中係觀察到多數之纖維，相對於此，在 110°C 乾燥之實施例 5 及比較例 3 至 4 中則完全未觀察到纖維。並且，觀察圖像中所觀察到為多數之球狀物體，係培養基中之鹽成分所析出者。由此結果可推測，培養基組成物中所含之纖維構造有幫助浮游作用之可能性。

【0223】 [試驗例 7：球體之浮游作用]

將人類肝癌細胞株 HepG2(DS Pharma Biomedical 公司製)以 50000 個/mL 之方式懸浮於含有 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(WAKO 公司製)中，將前述懸浮液 10mL 接種於 EZ SPHERE(旭硝子公司製)後，於 CO₂ 保溫箱(5%CO₂)內培養 2 日。將此處所得之球體之懸浮液 80mL 進行離心處理(800rpm、5 分鐘)而使球體沉降，藉由除去上清液而調製球體懸浮液 4.5mL。繼而，將實施例 1 至 4 及比較例 1、比較例 3 至 5 之培養基組成物以 10mL 逐步加入 15mL 圓錐管

中，更進一步添加 HepG2 細胞之球體懸浮液 100 μ L。藉由吸量而使球體分散，於 37°C 保溫培養 5 日後，以目視觀察培養基組成物中之球體之分散狀態。將球體均勻地浮游於培養基組成物中之狀態作為◎，產生上清液之狀態為○，沉降狀態為x而進行評估。將實施例 1 至 5、比較例 3 至 5 之培養基組成物之觀察結果示於表 43 及第 22 圖至第 29 圖。

【0224】 結果，實施例 1 至實施例 4 中，培養基組成物中在培養 6 日後亦為浮游狀態。另一方面，實施例 5 及比較例 3 至比較例 5 之培養基組成物則所有球體皆沉降，並且球體彼此凝集。

【0225】 [表 43]

		高分子	濃度 % (w/v)				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
實施例	1	MNC	x	○	○	○	○
	2	PNC	○	○	○	○	○
	3	CT	x	○	○	○	○
	4	DAG	○	◎	◎	◎	◎
	5	Car	x	x	x	x	x
比較例	3	Xan	x	x	x	x	x
	4	DU	x	x	x	x	x
	5	Alg	x	x	x	x	x

【0226】 [實施例 1' 至實施例 4']

對於製造例 1 至製造例 3 所調製之纖維素奈米纖維

MNC、PNC 及甲殼素奈米纖維添加滅菌水，而分別調製 1%(w/v)水分散液。另一方面，對於脫醯化結冷膠 (KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製：DAG)1 質量份添加 99 體積份之滅菌水，藉由進行 121°C、20 分鐘之高壓釜處理而予以溶解及滅菌，調製 1%(w/v)水溶液。使用前述所調製之 1%(w/v)纖維分散液或脫醯化結冷膠水溶液，以使最終濃度成為 0.01%、0.03%、0.06%及 0.1%(w/v)之方式添加含有 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(日水製藥公司製，high-glucose)，調製培養基組成物。

【0227】 [實施例 5'、及比較例 3' 至比較例 5']

對於 κ -鹿角菜膠 (GENUGEL WR-80-J，三晶股份公司製：Car)、黃原膠 (KELTROL CG，三晶股份公司製：Xan)、迪特膠 (KELCO CRETE DG-F，三晶股份公司製：DU)、海藻酸鈉 (Duck 海藻酸 NSPM，Food Chemifa 公司製：Alg)1 質量份添加 99 體積份之滅菌水，藉由進行 121°C、20 分鐘之高壓釜處理而予以溶解及滅菌，分別調製 1%(w/v)多醣水溶液。對於前述所調製之各多醣水溶液，藉由與實施例 5 至 8 同樣之操作，在含有 10%(v/v)胎牛血清之 DMEM 培養基(日水製藥公司製)中以使最終濃度成為 0.01%、0.03%、0.06%及 0.1%(w/v)之方式添加多醣水溶液，調製培養基組成物。

【0228】 [試驗例 8：細胞增殖試驗]

將人類乳癌細胞株 MCF-7(DS Pharma Biomedical 公司製)及人類黑色素瘤細胞株 A375(ATCC 製)以成為 33333 細

胞/mL 之方式接種於實施例 1' 至實施例 5' 及比較例 3' 至比較例 5' 所調製之培養基組成物中，並以使每 1 孔成為 150 μ L 之方式分注至 96 孔平底超低黏著表面微盤 (Corning 公司製，# 3474) 之孔中。另外，將在不含有奈米纖維或多醣之同上培養基中懸浮有 MCF7 細胞或 A375 細胞者予以分注，作為陰性對照。繼而，將本盤在 CO₂ 保溫箱 (37°C、5%CO₂) 內以靜置狀態培養最多至 6 日。對於 2 日及 6 日培養後之培養液，添加 ATP 試劑 150 μ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製) 並使其懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3 (Molecular Devices 公司製) 測定發光強度 (RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0229】 結果，確認到在含有 PNC、MNC、奈米甲殼素之該培養基組成物中，細胞凝集塊的尺寸不會變太大，可在均勻分散之狀態下進行培養而有效率地增殖。另一方面，在含有海藻酸鈉之當該培養基組成物中，並未確認到有促進增殖。將 MCF7 細胞之靜置培養 2 日及 6 日後之 RLU 值 (ATP 測定、發光強度) 示於表 44 至表 47，並將其 6 日後之 RLU 值示於第 30 圖至第 33 圖，另將 A375 細胞之結果示於表 48 至表 51，並將其 6 日後之 RLU 值示於第 34 圖至第 37 圖。對培養 2 日之凝集塊進行顯微鏡觀察，將 MCF7 細胞之結果示於第 38 圖，將 A375 細胞之結果示於第 39 圖。

【0230】 [表 44]

MCF7	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 1'	2	9192	14688	15735	17096	17114
	6	7134	18829	21113	22987	22863
比較例 5'	2	9192	10795	11016	11027	11947
	6	7134	9052	8727	7751	10444

【0231】 [表 45]

MCF7	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 2'	2	8324	14836	16139	15188	15292
	6	7213	21391	20795	19498	19912
實施例 3'	2	8324	13563	14601	14760	15125
	6	7213	19340	19997	20439	21883

【0232】 [表 46]

MCF7	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 4'	2	10137	12454	13639	13424	9490
	6	9221	16246	18949	20341	15391
實施例 5'	2	10137	10018	10714	11446	11888
	6	9221	5175	9414	9271	9191

【0233】 [表 47]

MCF7	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
比較例 3'	2	9915	11163	12016	11867	11501
	6	9201	10180	11686	12727	13678
比較例 4'	2	9915	13354	13490	15527	15857
	6	9201	19364	19965	20615	21895

【0234】 [表 48]

A375	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 1'	2	31487	38387	39421	39260	39514
	6	49234	110943	113026	119850	125918
比較例 5'	2	31487	30733	29778	29299	32224
	6	49234	46701	42424	43863	52514

【0235】 [表 49]

A375	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 2'	2	30087	35275	35385	35648	35637
	6	50280	111250	130356	146403	153298
實施例 3'	2	30087	36297	38784	37907	37408
	6	50280	112508	111581	123872	132729

【0236】 [表 50]

A375	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
實施例 4'	2	32553	41656	41349	43184	41347
	6	43620	81160	80734	103404	122478
實施例 5'	2	32553	28039	29995	31168	30212
	6	43620	33578	31297	40548	36972

【0237】 [表 51]

A375	培養日數	高分子濃度% (w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
比較例 3'	2	29361	30417	28822	25348	23952
	6	38820	37202	38083	38340	38566
比較例 4'	2	29361	34219	29473	34592	35261
	6	38820	54749	57507	68100	82009

【0238】 [試驗例 9：使用 3T3-L1 細胞之保存試驗]

將小鼠前驅脂肪細胞株 3T3-L1(ATCC 公司製)使用含有 10%FBS 之 DMEM 培養基而接種於 10cm 聚苯乙烯培養皿上，於設定為 5%CO₂、37℃ 之保溫箱內進行培養。在 3T3-L1 細胞成為匯集(confluent)之狀態下，將培養基予以抽吸除去，並以 D-PBS(和光純藥公司製)除去 FBS，將含有 0.25%Trypsin(胰蛋白酶)及 1mM EDTA 之溶液 1ml(和光純藥公司製)添加至上述聚苯乙烯培養皿中。確認細胞之剝離後，添加含有 10 體積%FBS 之 DMEM 培養基，從培養皿中

回收細胞，移到離心分離管。以 $300\times g$ 進行離心分離後，除去上清液。以約 100×10^4 細胞/mL 之細胞懸浮液的形式，在 1.5mL 微管中添加 $100\ \mu\text{L}$ 之細胞懸浮液，並將預先以含有 10%(v/v)FBS 之方式所調製之實施例 1 至實施例 2、實施例 4 至實施例 5、比較例 3 及比較例 5 之培養基組成物逐步添加 $100\ \mu\text{L}$ ，藉由進行吸量而製作細胞懸浮液。

在密閉狀態於室溫下以靜置狀態保存 10 日，將經過 3 日、10 日後之細胞懸浮液之一部分以含有 10%FBS 之 DMEM 培養基稀釋 1/10，並在經稀釋之細胞懸浮液 $100\ \mu\text{L}$ 中添加 ATP 試劑 $100\ \mu\text{L}$ (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置 15 分鐘後，使用 FlexStation3 (Molecular Devices 公司製)測定發光強度 (RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。陰性對照係僅為不含有多醣之培養基的樣品。

【0239】 結果，陰性對照或比較例 3 及比較例 5 之培養基組成物之各細胞生存率係在 3 至 10 日之室溫保存下使 ATP 值顯著降低，相對於此，實施例 1 至實施例 2 及實施例 4 之培養基組成物則抑制 ATP 值降低並顯示細胞保護效果。將活細胞數之結果示於表 52。

【0240】 [表 52]

		多醣類	濃度	RLU 值 (活細胞數)		
				0 日	3 日後	10 日後
陰性對象		—	0%	106016	34965	13069
實施例	1	MNC	0.03%	—	62627	36046
	2	PNC	0.03%	—	59723	32436
	4	DAG	0.015%	—	75493	49952
比較例	3	Xan	0.03%	—	40667	13441
	5	Alg	0.03%	—	47068	8834

【0241】 [試驗例 10: 使用 CHO-K1 細胞之保存試驗]

將中國倉鼠卵巢株 CHO-K1-hIFN β 細胞(北九州高等專門學校, 由川原教授所讓渡)使用含有 10%FBS 之 F12 培養基接種於 10cm 聚苯乙烯培養皿上, 在設定為 5%CO₂、37°C 之保溫箱內進行培養。在 CHO-K1-hIFN β 細胞成為融合之狀態下, 抽吸除去培養基, 並以 D-PBS(和光純藥公司製)除去 FBS, 將含有 0.25%Trypsin 及 1Mm EDTA 之溶液 1ml(和光純藥公司製)添加至上述聚苯乙烯培養皿中。確認細胞之剝離後, 添加含有 10%FBS 之 F12 培養基, 從培養皿中回收細胞, 移到離心分離管。以 300Xg 進行離心分離後, 除去上清液。以約 5 \times 10⁶ 細胞/mL 之細胞懸浮液的形式, 在 1.5mL 微管中添加 25 μ L 之細胞懸浮液, 並將預先以含有 10%(v/v)FBS 之方式所調製之實施例 2、實施例 4 之培養基組成物逐步添加 25 μ L, 藉由進行吸量而製作細胞懸浮液。將在密閉狀態於室溫下保存 1 日後之細胞懸浮

液之一部分以含有 10%FBS 之 F12 培養基稀釋 1/10，在經稀釋之細胞懸浮液 100 μ L 中添加 ATP 試劑 100 μ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。陰性對照係僅為不含有多醣之培養基的樣品。

【0242】 結果，陰性對照之各細胞生存率係在室溫保存 1 日時之 ATP 值降低，相對於此，實施例 2 及實施例 4 之培養基組成物則顯示接種時程度之 ATP 值，而顯示細胞保護效果。將活細胞數之結果示於表 53。

【0243】 [表 53]

	多醣類	濃度	RLU 值(活細胞數)	
			0 日	1 日後
陰性對照	—	0%	109376	87031
實施例 2	PNC	0.1%	—	108666
實施例 4	DAG	0.03%	—	95028
		0.1%	—	111383

【0244】 [試驗例 11：使用 3T3-L1 細胞之保存試驗，變更多醣類之濃度]

將小鼠前驅脂肪細胞株 3T3-L1(ATCC 公司製)使用含有 10%FBS 之 DMEM 培養基接種於 10cm 聚苯乙烯培養皿上，在設定為 5%CO₂、37℃ 之保溫箱內進行培養。在 3T3-L1

細胞成為 40%匯集之狀態下，抽吸除去培養基，並以 D-PBS(和光純藥公司製)除去 FBS，將含有 0.25%Trypsin(胰蛋白酶)及 1mM EDTA 之溶液 1ml(和光純藥公司製)添加至上述聚苯乙烯培養皿中。在確認細胞之剝離後，添加含有 10 體積%FBS 之 DMEM 培養基，從培養皿中回收細胞，移到離心分離管中。以 300×g 進行離心分離後，除去上清液。以約 100×10^4 細胞/mL 之細胞懸浮液的形式，在 1.5mL 微管中添加 100 μ L 之細胞懸浮液，並將預先以含有 10%(v/v) FBS 之方式所調製之實施例 2 及實施例 4、比較例 5 之多醣類濃度不同之培養基組成物逐步添加 100 μ L，藉由吸量而製作細胞懸浮液。

在密閉狀態於室溫下以靜置狀態保存 8 日，將經過 0 日、5 日、8 日後之細胞懸浮液之一部分以含有 10%FBS 之 DMEM 培養基稀釋 1/5，在經稀釋之細胞懸浮液 100 μ L 中添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置 15 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。陰性對照係僅為不含有多醣之培養基的樣品。

【0245】 結果，陰性對照或比較例 5 之培養基組成物之各細胞生存率係在 5 至 8 日之室溫保存下使 ATP 值顯著降低，相對於此，實施例 2 及實施例 4 之培養基組成物則抑制 ATP 值降低而顯示細胞保護效果。將活細胞數之結果示於表 54。

【0246】 [表 54]

		多醣類	濃度 %	RLU 值(活細胞數)		
				0 日	5 日後	8 日後
陰性對象		—	0	99550	38344	34158
實施例	2	PNC	0.015	—	55431	57008
			0.03	—	76226	72182
			0.05	—	70520	47521
	4	DAG	0.015		67938	61719
			0.03		61126	—
			0.05		65334	55547
比較例	5	Alg	0.015	—	35927	26641
			0.03		43659	40677
			0.05	—	49629	44898

【0247】 [試驗例 12：對於 MDCK 細胞之細胞生存作用的效果]

將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後,藉由一邊於 90°C 加熱一邊攪拌而予以溶解,並將本水溶液於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用本溶液,調製在含有 10%(v/v)胎牛血清之 EMEM 培養基(和光純藥公司製)中添加最終濃度 0.005%(w/v)及 0.015%之脫醯化結冷膠而成的培養基組成物、或是不含有脫醯化結冷膠之未添加培養基組成物。繼而,將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮細胞株

MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式添加上述脫醯化結冷膠而成之培養基組成物中之後，以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製，# 3474)之孔中。各盤係在 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 15 日。對於第 2 日、第 6 日、第 9 日、第 12 日、第 15 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay，Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0248】 結果，可知當使用本發明之培養基組成物將 MDCK 細胞在低黏著盤上進行培養時，會抑制活細胞數減少。各培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 55。

【0249】 [表 55]

培養時間 (日)	未添加	脫醯化結冷膠 (0.005%)	脫醯化結冷膠 (0.015%)
2	23453	25309	26069
6	15839	17643	26602
9	9939	14552	26668
12	9833	12409	26210
15	10374	13152	29512

【0250】 [試驗例 13: 對於 Vero 細胞之細胞生存作用

的效果]

將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA, 三晶股份公司製)以成為 0.3%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後, 藉由一邊於 90°C 加熱一邊攪拌而予以溶解, 並將本水溶液在 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。使用本溶液, 調製在含有 5%(v/v)胎牛血清之 Emedium199 培養基(SIGMA 公司製)中添加最終濃度 0.005%(w/v)及 0.015%之脫醯化結冷膠而成的培養基組成物、或不含有脫醯化結冷膠之未添加培養基組成物。繼而, 將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)猴腎臟上皮細胞株 Vero(DS Pharma Biomedical 公司製), 接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式添加上述脫醯化結冷膠而成之培養基組成物中之後, 以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製, # 3474)之孔中。各盤係在 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養, 繼續 15 日。對於第 2 日、第 6 日、第 9 日、第 12 日、第 15 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮, 於室溫靜置約 10 分鐘後, 使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值), 藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0251】 結果, 可知當使用本發明之培養基組成物將 Vero 細胞在低黏著盤上進行培養時, 會抑制活細胞數減少。各培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 56。

【0252】 [表 56]

培養時間 (日)	未添加	脫醃化結冷膠 (0.005%)	脫醃化結冷膠 (0.015%)
2	17518	17870	16940
6	12970	13298	13472
9	9500	12560	13097
12	8702	10039	14053
15	6934	9207	14910

【0253】 [試驗例 14：各基材對於 MDCK 細胞增殖作用之效果]

將製造例 2 所調製之纖維素奈米纖維(PNC)、甲殼素奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S 2 質量%，Sugino Machine 股份公司)及脫醃化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 1%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後，藉由一邊於 90℃ 加熱一邊攪拌而予以溶解，並將本水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。調製在無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)中添加最終濃度 0.01%(w/v)、0.03%、0.1%之纖維素奈米纖維而成之培養基組成物，在無血清培養基 KBM220 培養基中添加最終濃度 0.01%(w/v)、0.03%、0.1%之甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物，在無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)中添加最終濃度 0.005%(w/v)、0.015%、0.03%、0.06%、0.1%之脫醃化結冷膠而成之培養基組成物，以及不含有上述基材之未添加培養基組成物。繼而，將使用已除去血清

之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮細胞株 MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式而分別添加上述各基材而成之培養基組成物中之後，以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製、# 3474)之孔中。各盤係於 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 14 日。對於第 3 日、第 7 日、第 10 日、第 14 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0254】 結果，當使用屬於本發明之培養基組成物的脫醯化結冷膠、奈米纖維素纖維 PNC、以及甲殼素奈米纖維將 MDCK 細胞於低黏著盤上進行培養時，在所有基材添加皆可見 MDCK 細胞之增殖促進作用。其中，以甲殼素奈米纖維顯示最強效果。各培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 57。

【0255】 [表 57]

	第 3 日	第 7 日	第 10 日	第 14 日
未添加	6945	7388	7611	10225
脫醯化結冷膠 0.005%	7389	9039	10981	16549
脫醯化結冷膠 0.015%	7735	10467	14369	21255
脫醯化結冷膠 0.03%	7943	21459	30706	38572
脫醯化結冷膠 0.06%	7538	17257	31697	44346
脫醯化結冷膠 0.1%	6696	15065	27092	35897
奈米纖維素 PNC 0.01%	7622	14815	22065	34661
奈米纖維素 PNC 0.03%	7795	17250	29732	44805
奈米纖維素 PNC 0.1%	7406	15408	27157	41852
甲殼素奈米纖維 0.01%	8777	21536	42566	54671
甲殼素奈米纖維 0.03%	8886	28311	44933	58338
甲殼素奈米纖維 0.1%	8621	29025	45074	59755

【0256】 [試驗例 15：甲殼素奈米纖維對於 MDCK 增殖作用之效果]

將製造例 1 所調製之纖維素奈米纖維(PNC)、甲殼素奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S 2 質量%，Sugino Machine 股份公司)及脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 1%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後，藉由一邊於 90℃ 加熱一邊攪拌而予以溶解，並將本水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。調製在無血清培養基 KBM220 培養基中添加最終濃度 0.0001%(w/v)、0.0003%、0.001%、0.003%、0.01%、0.02%、0.03%之甲殼

素奈米纖維而成之培養基組成物，在無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)中添加最終濃度 0.005% (w/v)、0.015%、0.03%之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物，以及不含有上述基材之未添加培養基組成物。繼而，將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮細胞株 MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式添加上述脫醯化結冷膠或甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物中之後，以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製，# 3474)之孔中。各盤係於 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 14 日。對於第 5 日、第 9 日、第 12 日、第 15 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值並以 3 點之平均值之形式而測定活細胞數。

【0257】 結果，當使用屬於本發明之培養基組成物的脫醯化結冷膠及甲殼素奈米纖維將 MDCK 細胞於低黏著盤上進行培養時，兩者之基材添加皆確認到有 MDCK 細胞之增殖促進作用。其中，甲殼素奈米纖維係在 0.0001%以上之濃度顯示增殖促進效果，尤其是在 0.001%以上顯示高效果。各培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 58。

【0258】 [表 58]

	第 5 日	第 9 日	第 12 日	第 15 日
未添加	30616	22182	32644	27527
脫醯化結冷膠 0.005%	36600	32749	49935	54224
脫醯化結冷膠 0.015%	44682	54161	71837	85747
脫醯化結冷膠 0.03%	35918	43907	55424	64556
甲殼素奈米纖維 0.0001%	44955	42380	55915	55612
甲殼素奈米纖維 0.0003%	61972	66269	75845	81075
甲殼素奈米纖維 0.001%	72036	93296	114045	122244
甲殼素奈米纖維 0.003%	78232	108468	140210	146761
甲殼素奈米纖維 0.01%	74018	104834	148507	156114
甲殼素奈米纖維 0.02%	84482	113526	160236	168680
甲殼素奈米纖維 0.03%	84062	127656	174498	173008

【0259】 [試驗例 16：甲殼素奈米纖維對於 MDCK 細胞增殖作用之效果]

初次培養：

將製造例 2 所調製之纖維素奈米纖維(PNC)、甲殼素奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S 2 質量%，Sugino Machine 股份公司)以成為 1%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後，藉由一邊於 90℃ 加熱一邊攪拌而予以溶解，並將本水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。調製在無血清培養基 KBM220 培養基中添加最終濃度 0.01%(w/v)之甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物，以及不含有無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)及甲殼素奈米纖維

之未添加培養基組成物。繼而，將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮細胞株 MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 75000 細胞/mL 之方式添加上述甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物中之後，以每 1 燒瓶成為 30mL 之方式分注於三角燒瓶 125ml(Corning 公司製，# 431405)中。燒瓶係在 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 6 日。使第 0 日、第 6 日之培養液藉由吸量而懸浮後，將 100 μL 各分注 3 點，並分別於其中添加 ATP 試劑 100 μL(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3 (Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0260】

繼代培養：

為了確認對於繼代培養之效果，而使用含有 0.01%甲殼素奈米纖維之培養基將 MDCK 細胞培養 6 日而成之細胞懸浮液來進行檢討。由細胞懸浮液 3ml 與未添加培養基組成物 27ml 混合並將甲殼素奈米纖維濃度設為 0.001%之細胞懸浮液，以及由細胞懸浮液 3ml 與經添加最終濃度 0.01%(w/v)之甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物 27ml 混合並將甲殼素奈米纖維濃度設為 0.01%之細胞懸浮液，係分別分注於三角燒瓶 125ml 中。燒瓶係在 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 14 日。將第 0

日、第 7 日、第 14 日之培養液藉由吸量而懸浮後，將 100 μ L 各分注 3 點，並分別於其中添加 ATP 試劑 100 μ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3 (Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值並以 3 點之平均值之形式而測定活細胞數。

【0261】 結果，當使用屬於本發明之培養基組成物的甲殼素奈米纖維將 MDCK 細胞在三角燒瓶上進行培養時，確認到有 MDCK 細胞之增殖促進作用。並且，可知若添補含有甲殼素奈米纖維之培養基，則會確認到 MDCK 細胞之增殖，即使不進行胰蛋白酶等之處理也可簡便地進行繼代培養。將初次培養之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)示於表 59，將繼代培養之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)示於表 60。

【0262】 [表 59]

	第 0 日	第 6 日
甲殼素奈米纖維 0.01%	12853	28826

【0263】 [表 60]

	第 0 日	第 7 日	第 14 日
甲殼素奈米纖維 0.001%	2428	11461	18641
甲殼素奈米纖維 0.01%	2553	13981	34397

【0264】 [試驗例 17：各培養基中之甲殼素奈米纖維之 MDCK 細胞之增殖促進作用的比較]

將製造例 1 所調製之纖維素奈米纖維(PNC)、甲殼素奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S 2 質量%，Sugino Machine 股份公司)及脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA，三晶股份公司製)以成為 1%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)中之後，藉由一邊於 90℃ 加熱一邊攪拌而予以溶解，並將本水溶液於 121℃ 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。調製在無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)或 Cosmedium 012 培養基(Cosmo Bio 公司製)中添加最終濃度 0.001% (w/v)、0.01% 之甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物，在無血清培養基 KBM220 培養基或 Cosmedium 012 培養基中添加最終濃度 0.015%(w/v)、0.03% 之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物，以及不含有上述基材之未添加培養基組成物。繼而，將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮細胞株 MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式添加上述脫醯化結冷膠或甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物中之後，以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製，# 3474)之孔中。各盤係在 CO₂ 保溫箱(37℃、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 12 日。對於第 4 日、第 8 日、第 12 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay，Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用

FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值),藉由僅減去培養基之發光值並以 3 點之平均值之形式而測定活細胞數。

【0265】 結果,當使用屬於本發明之培養基組成物的脫醯化結冷膠及甲殼素奈米纖維將 MDCK 細胞在低黏著盤上進行培養時,在兩者之基材添加皆確認到有 MDCK 細胞之增殖促進作用。其中,甲殼素奈米纖維係即使在 0.001%之濃度以上使用 Cosmedium012 培養基之條件下也顯示高之增殖能力。以顯微鏡觀察第 4 日之細胞狀態時,在使用脫醯化結冷膠之培養基條件下,細胞凝集塊(球體)僅為分散,但在使用甲殼素奈米纖維之培養基條件下,則觀察到球體及細胞以葡萄串狀增殖的樣子。使用 KBM220 培養基之培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 61,使用 Cosmedium012 培養基之培養下之 RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 62。培養 4 日之顯微鏡觀察結果係示於第 40 圖。

【0266】 [表 61]

	第 4 日	第 8 日	第 12 日
未添加	23542	23441	30472
脫醯化結冷膠 0.015%	28314	35649	57595
脫醯化結冷膠 0.03%	27360	33025	53464
甲殼素奈米纖維 0.001%	49998	63869	120492
甲殼素奈米纖維 0.01%	55646	70073	131614

【0267】 [表 62]

	第 4 日	第 8 日	第 12 日
未添加	23373	23709	27167
脫醯化結冷膠 0.015%	27412	29959	51690
脫醯化結冷膠 0.03%	25382	27227	44496
甲殼素奈米纖維 0.001%	45617	62417	102726
甲殼素奈米纖維 0.01%	57318	69040	118593

【0268】 [試驗例 18：殼聚醣奈米纖維與甲殼素奈米纖維之 MDCK 細胞增殖作用之比較]

將殼聚醣奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S, 1 質量%, Sugino Machine 股份公司)、與甲殼素奈米纖維(生物質奈米纖維 BiNFi-S 2 質量%, Sugino Machine 股份公司)、以及與參考例 1 同樣地進行操作而將脫醯化結冷膠(KELCOGEL CG-LA、三晶股份公司製)以成為 1%(w/v)之方式懸浮於超純水(Milli-Q 水)後一邊於 90°C 攪拌一邊調製之水溶液, 分別於 121°C 進行 20 分鐘之高壓釜滅菌。調製在無血清培養基 KBM220 培養基(Kohjin Bio 公司製)中添加最終濃度 0.001%(w/v)、0.003%、0.01%、0.03%之殼聚醣奈米纖維或甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物, 在無血清培養基 KBM220 培養基中添加最終濃度 0.015%(w/v)、0.03%之脫醯化結冷膠而成之培養基組成物, 以及不含有上述基材之未添加培養基組成物。繼而, 將使用已除去血清之培養基進行培養 1 晝夜而成的(飢餓處理)犬腎臟腎小管上皮

細胞株 MDCK(DS Pharma Biomedical 公司製)，接種於經以成為 100000 細胞/mL 之方式添加上述脫醯化結冷膠、殼聚醣奈米纖維或甲殼素奈米纖維而成之培養基組成物中之後，以每 1 孔成為 100 μ L 之方式分注於 96 孔平底超低黏著表面微盤(Corning 公司製，# 3474)之孔中。各盤係在 CO₂ 保溫箱(37°C、5%CO₂)內以靜置狀態進行培養，持續 12 日。對於第 7 日、第 11 日之培養液添加 ATP 試劑 100 μ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)而使懸浮，於室溫靜置約 10 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)，藉由僅減去培養基之發光值並以 3 點之平均值之形式而測定活細胞數。

【0269】 結果，當使用屬於本發明之培養基組成物的殼聚醣奈米纖維及甲殼素奈米纖維將 MDCK 細胞在低黏著盤上進行培養時，確認到比脫醯化結冷膠還高之增殖促進作用。此外，甲殼素奈米纖維係在 0.001% 之濃度條件下也會顯示高之增殖能力，但殼聚醣奈米纖維則是從 0.01% 之濃度才開始顯示高之增殖能力。RLU 值(ATP 測定、發光強度)係示於表 63。

【0270】 [表 63]

	第 7 日	第 11 日
未添加	30653	27078
脫醯化結冷膠 0.015%	51436	63794
脫醯化結冷膠 0.03%	41146	51356
甲殼素奈米纖維 0.001%	83013	93642
甲殼素奈米纖維 0.003%	92611	102669
甲殼素奈米纖維 0.01%	91771	106490
甲殼素奈米纖維 0.03%	115710	126305
殼聚醣奈米纖維 0.001%	46009	50525
殼聚醣奈米纖維 0.003%	46103	48083
殼聚醣奈米纖維 0.01%	85922	93831
殼聚醣奈米纖維 0.03%	119566	126395

【0271】 [試驗例 19：新鮮食蟹獼猴初代肝細胞之保存試驗]

使用製造例 2 所調製之纖維素奈米纖維(PNC)、及與實施例 5 進行同樣操作而製作之 κ -鹿角菜膠(GENUGEL WR-80-J，三晶股份公司製：Car)1 質量%(w/v)水溶液。調製在含有 10%FBS 之 Williams'E 培養基(Life Technology 公司製)中添加最終濃度 0.03%(w/v)、0.1%之 PNC 或鹿角菜膠而成之培養基組成物，以及不含有上述基材之未添加培養基組成物。繼而，將新鮮食蟹獼猴初代肝細胞(Ina Research 股份公司製)，混合至以成為 2,500,000 細胞/mL 之方式添加上述 PNC 或鹿角菜膠而成之培養基組成物中之後，分注

至細胞凍結用 Cryogenic vial(Thermo Scientific 公司製)中。另外，將在不含有基材之同上培養基中懸浮有食蟹獼猴初代肝細胞者予以分注。實施 2 批上述操作。繼而，將本管於冷藏(約 4°C)中以靜置狀態輸送 2 日。在以 2 日冷藏條件下輸送後，對於細胞懸浮液使用台盼藍試劑(Life Technology 公司製)而測定懸浮液中之細胞生存率。

【0272】 結果，當使用屬於本發明之培養基組成物的 PNC 將新鮮猴初代肝細胞在冷藏下輸送時，顯示比未添加條件更高之生存率。另一方面，對於鹿角菜膠則未確認到如此之作用。生存率係示於表 10。

【0273】 [表 64]

	第 1 批	第 2 批
	生存率(%)	生存率(%)
未添加	48	41
PNC 0.03%	62	48
PNC 0.1%	62	56
鹿角菜膠 0.03%	37	35
鹿角菜膠 0.1%	42	23

【0274】 [試驗例 20：再接再種後之增殖性評估]

將小鼠前驅脂肪細胞株 3T3-L1(ATCC 公司製)使用含有 10%FBS 之 DMEM 培養基而接種於 10cm 聚苯乙烯培養皿上，並在設定為 5%CO₂、37°C 之保溫箱內進行培養。在 3T3-L1 細胞成為融合之狀態下，抽吸除去培養基，並使用 D-PBS(和光純藥公司製)除去 FBS，將含有 0.25%Trypsin 及

1mM EDTA 之溶液 1ml(和光純藥公司製)添加至上述聚苯乙烯培養皿中。確認細胞之剝離後，添加含有 10 體積%FBS 之 DMEM 培養基，從培養皿中回收細胞，移到離心分離管中。以 $300\times g$ 進行離心分離後，除去上清液。以約 200×10^4 細胞/mL 之細胞懸浮液的形式，在 1.5mL 微管中添加 $150\ \mu\text{L}$ 之細胞懸浮液，將預先以含有 10%(v/v)FBS 之方式所調製之實施例 2(PNC 濃度 0.06%)至實施例 4(DAG 濃度 0.03%)、比較例 5(A1g 濃度 0.03%)之培養基組成物及作為陰性對照之含有 10 體積%FBS 之 DMEM 培養基逐步添加 $150\ \mu\text{L}$ ，藉由吸量而製作細胞懸浮液(約 100×10^4 細胞/mL)。

【0275】 在密閉狀態於室溫下以靜置狀態保存 7 日後，將細胞懸浮液之一部分以含有 10%FBS 之 DMEM 培養基稀釋，以 7 日保存前之接種濃度作為基準，調製約 10×10^4 細胞/mL 之細胞懸浮液。在 96 穴多盤(Corning 公司製)上逐步接種 $100\ \mu\text{L}$ 之細胞懸浮液，在接種當天、1 日後及 2 日後添加 ATP 試劑 $100\ \mu\text{L}$ (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 公司製)並於室溫靜置 15 分鐘後，使用 FlexStation3(Molecular Devices 公司製)測定發光強度(RLU 值)(n=5)，藉由僅減去培養基之發光值而測定活細胞數。

【0276】 結果，7 日保存後之再接種當天之陰性對照或比較例 5 之培養基組成物之活細胞數(RLU 值)，相較於實施例 2 至實施例 4 之培養基組成物而言，係為明顯較低之結果。再接種一日後之活細胞數(RLU 值)係實施例 2 及

實施例 4 分別相較於再接種當天而言，而為增加，保存後之細胞亦保持增殖性。活細胞數之結果係示於表 65。

【0277】 [表 65]

		多醣類	濃度	RLU 值(活細胞數)	
				再接種當天	1 日後
陰性對象		—	0%	1749	6845
實施例	2	PNC	0.03%	13717	20282
	4	DAG	0.015%	14770	22588
比較例	5	Alg	0.03%	7466	14407

[產業上之可利用性]

【0278】 本發明之培養基組成物係顯示優異之細胞及/或組織浮遊效果，係在使來自動植物之細胞及/或組織一邊保持其機能一邊進行大量培養時為有用。此外，由本發明之方法所培養之細胞及/或組織係在化學物質、醫藥品等的藥效及毒性評估、或酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質之大量生產、對因疾病或缺陷所缺失之器官、組織、細胞進行修補之再生醫療等領域中為極有用。

【0279】 包含此處所述之專利及專利申請案說明書之所有刊物中所記載之內容係皆引用於本文中，藉此，以與其全部內容所明示者為相同程度地併入本說明書中。

【0280】 本申請案係以在日本申請之日本專利特願 2014-010842(申請日：2014 年 1 月 23 日)、日本專利特願 2014-123772(申請日：2014 年 6 月 16 日)、日本專利特願

2014-174574(申請日：2014年8月28日)以及日本專利特願
2014-217761(申請日：2014年10月24日)為基礎，其內容
係全部包含在本說明書中。

【符號說明】

無。

申請專利範圍

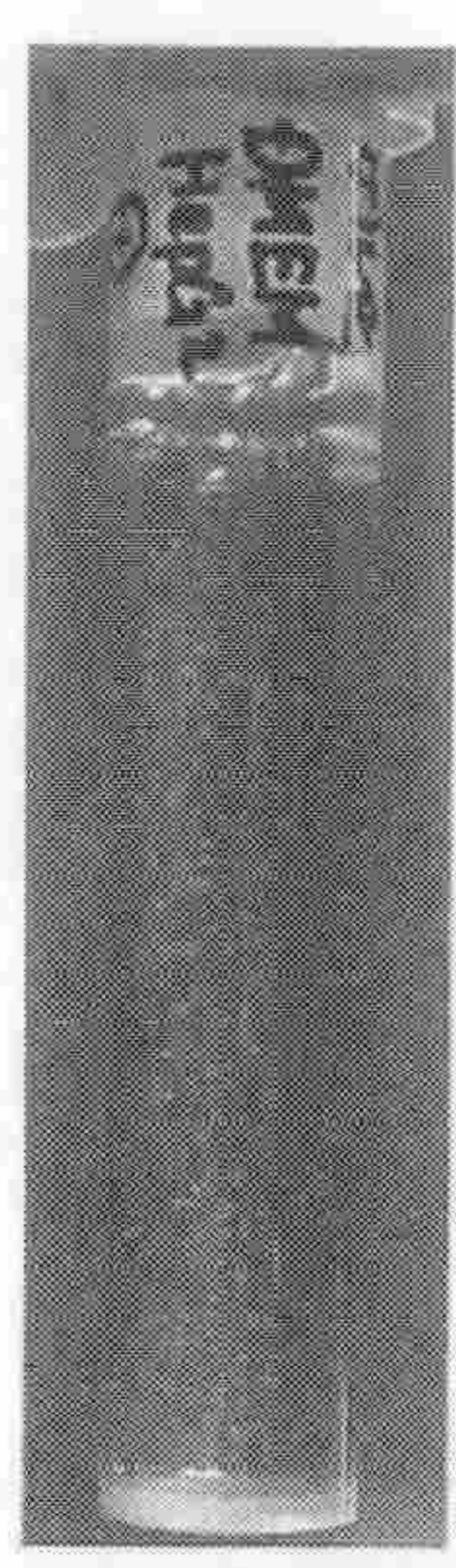
1. 一種液體組成物，係包括：

- (1) 培養基，
- (2) 黏著細胞，及
- (3) 甲殼素奈米纖維；

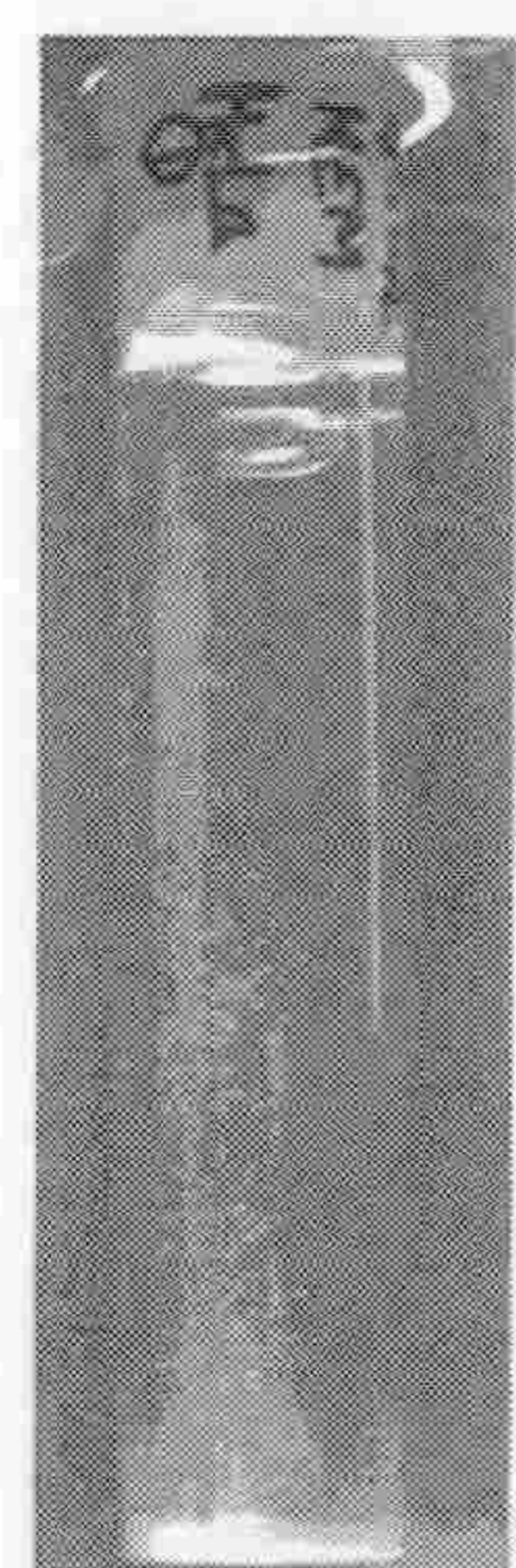
其中，前述甲殼素奈米纖維係分散在前述培養基中並在前述培養基中形成三次元網絡，以使前述黏著細胞可以在做三次元擴散的同時進行分散，並以附著於前述甲殼素奈米纖維的狀態下增殖。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之液體組成物，其中，前述液體組成物具有 0.001%(重量/容量)至 0.1%(重量/容量)之甲殼素奈米纖維含量。

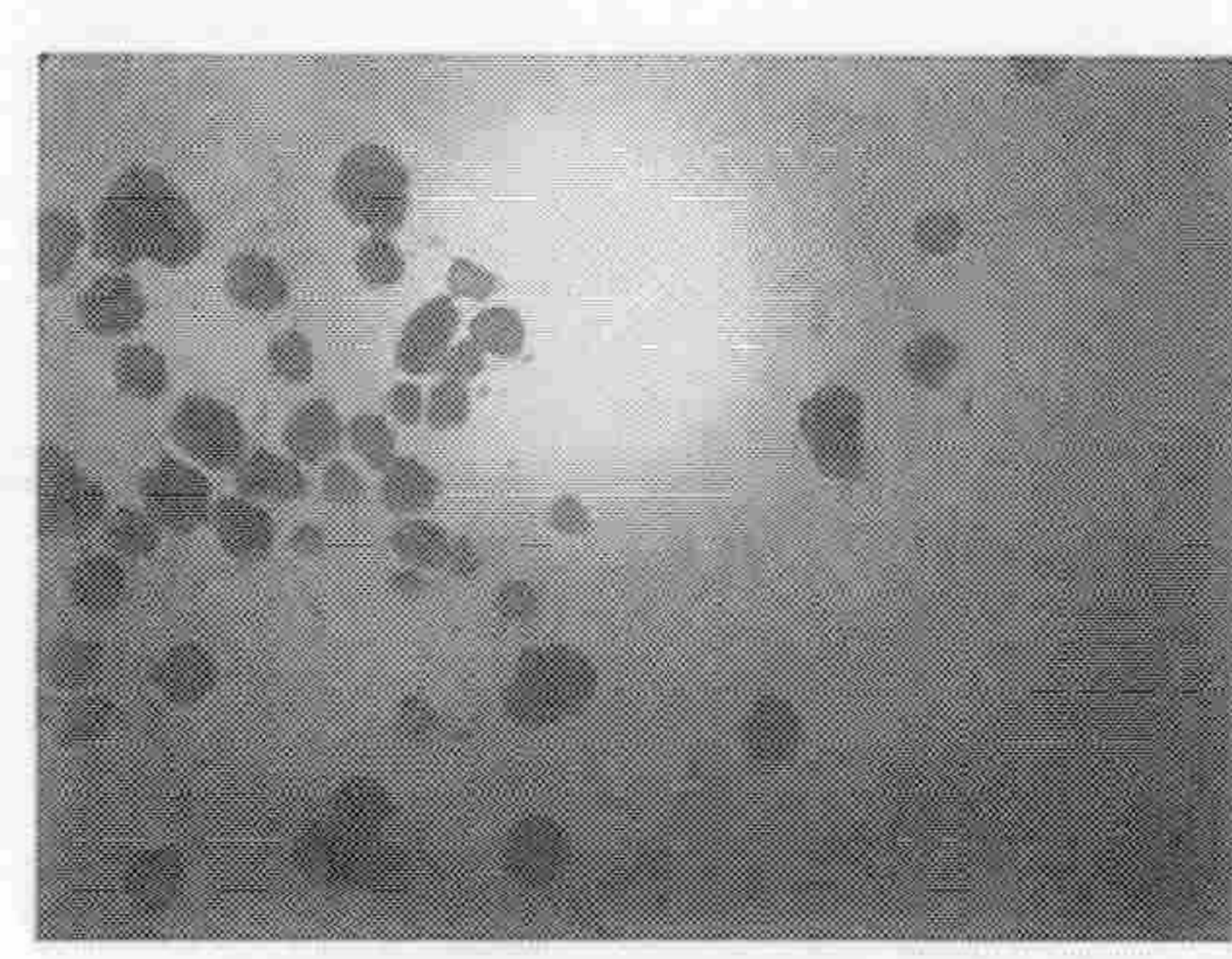
【發明圖式】



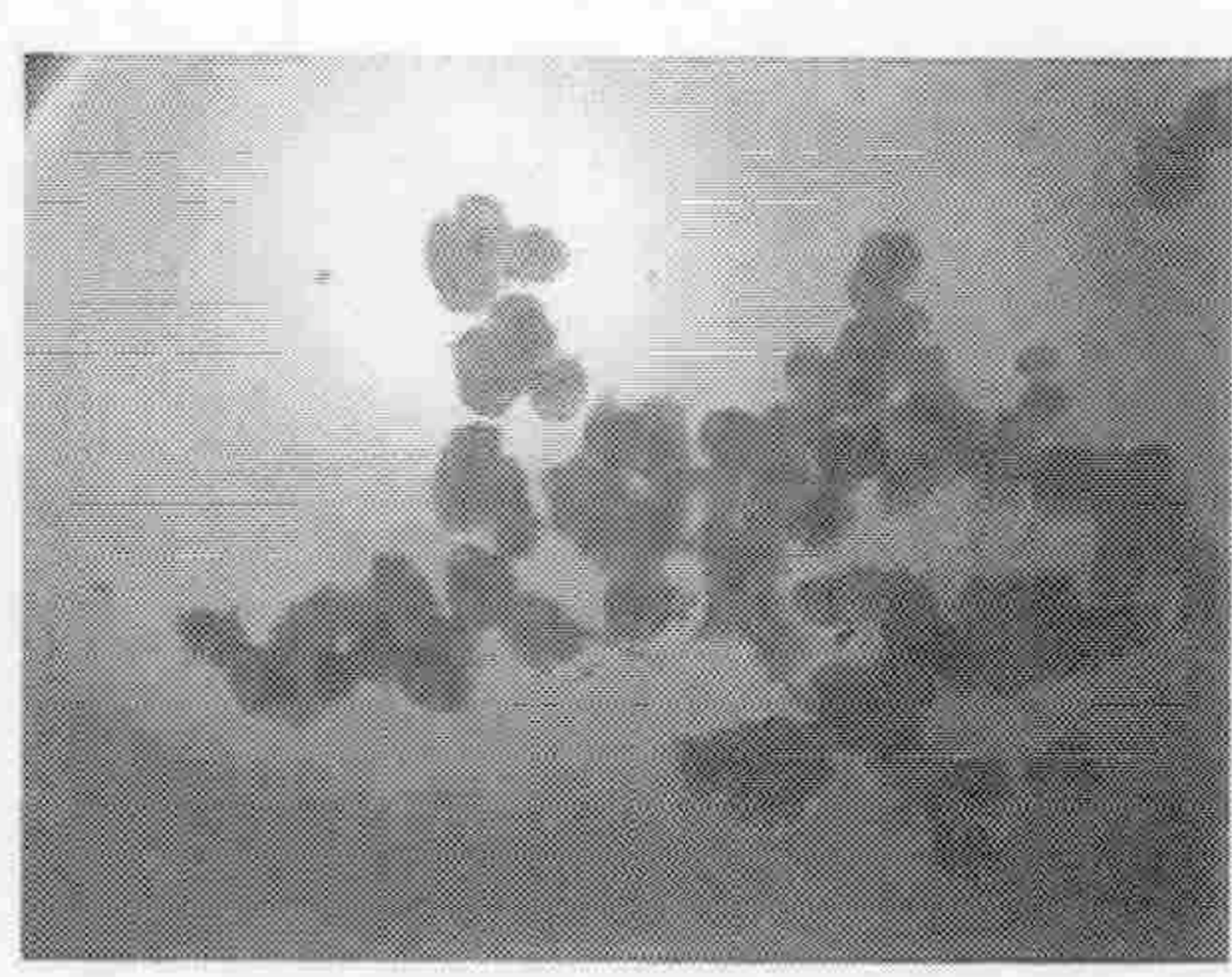
【第1圖】



【第2圖】

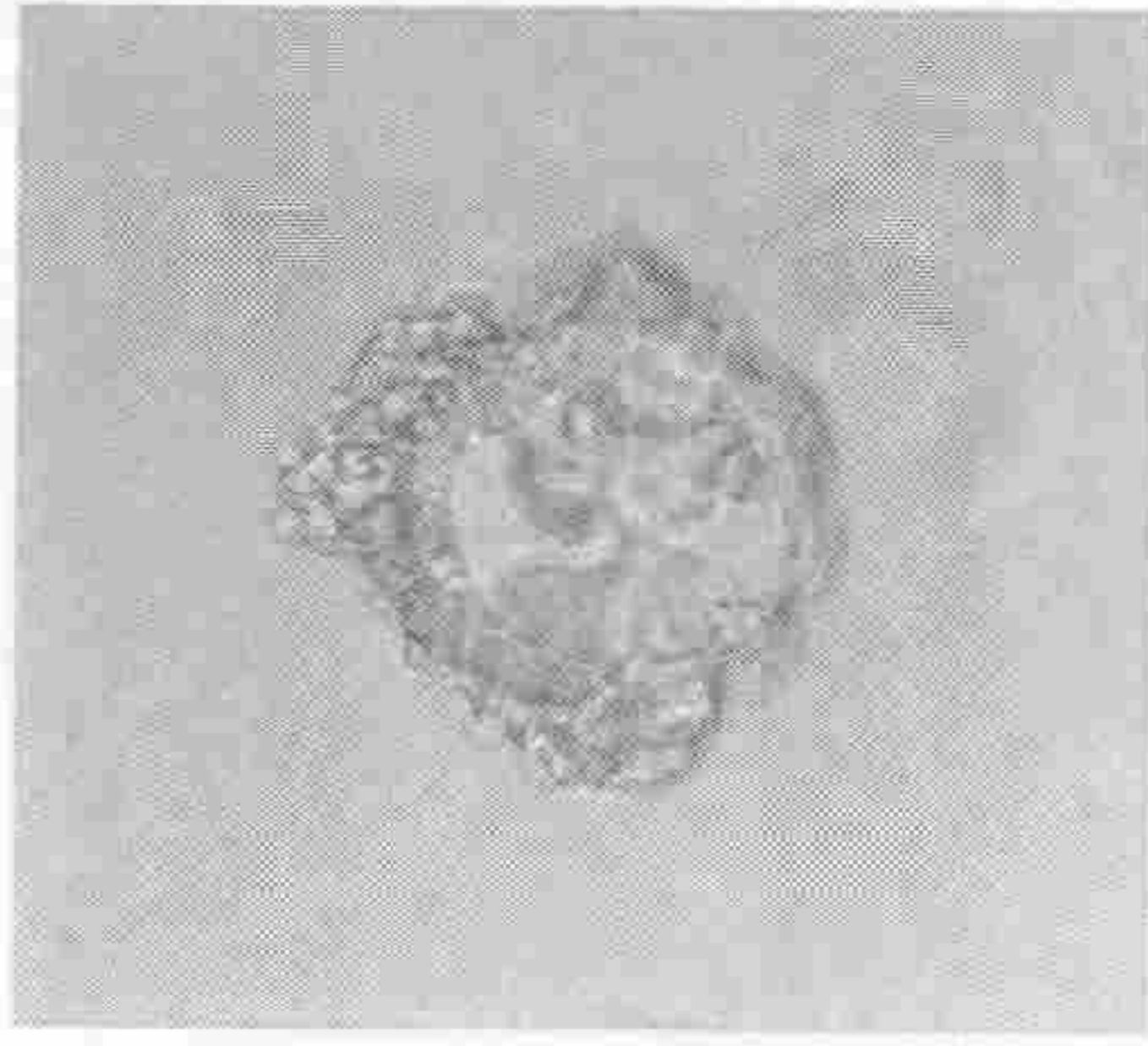


有脫醯化結冷膠

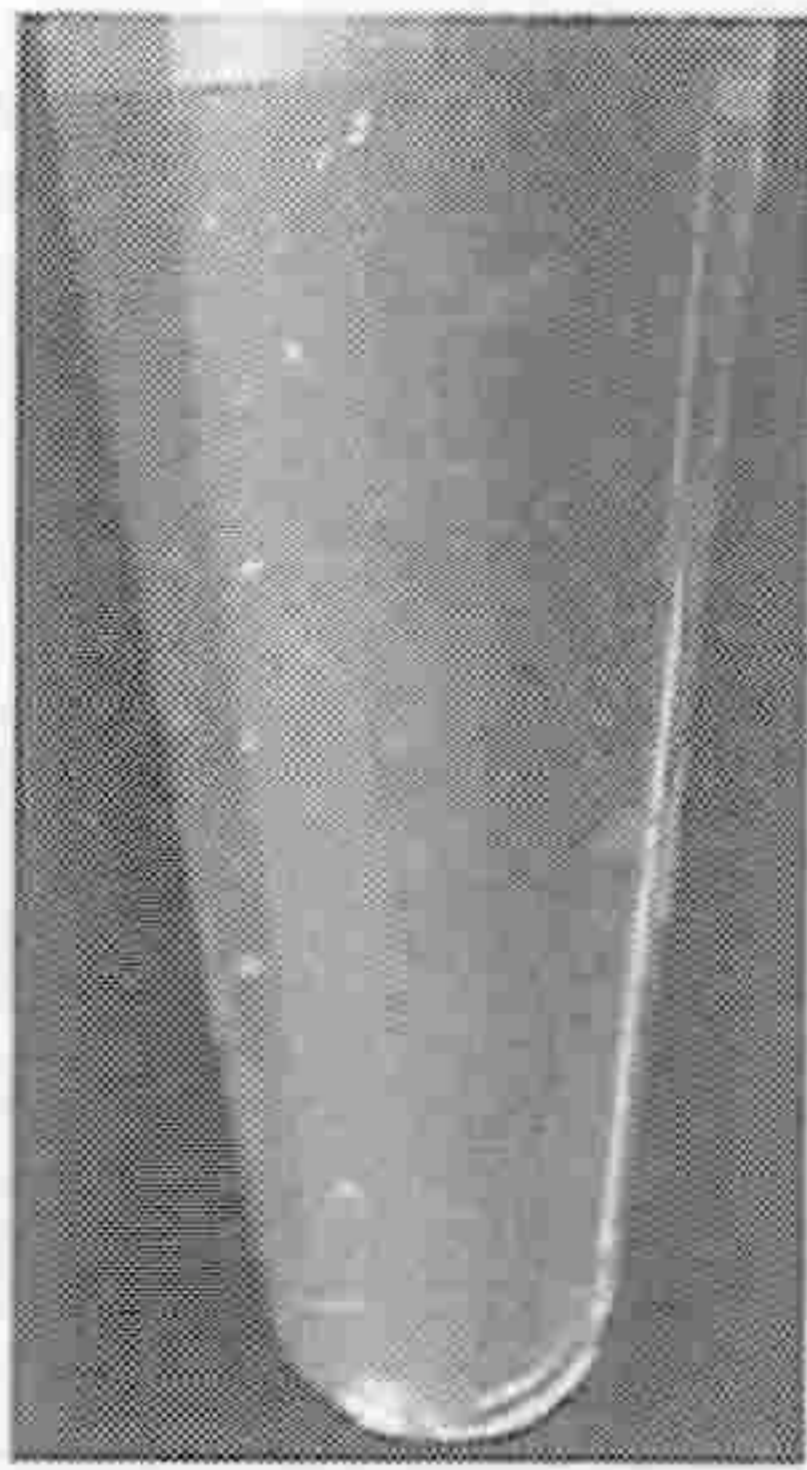


無脫醯化結冷膠

【第3圖】



【第4圖】

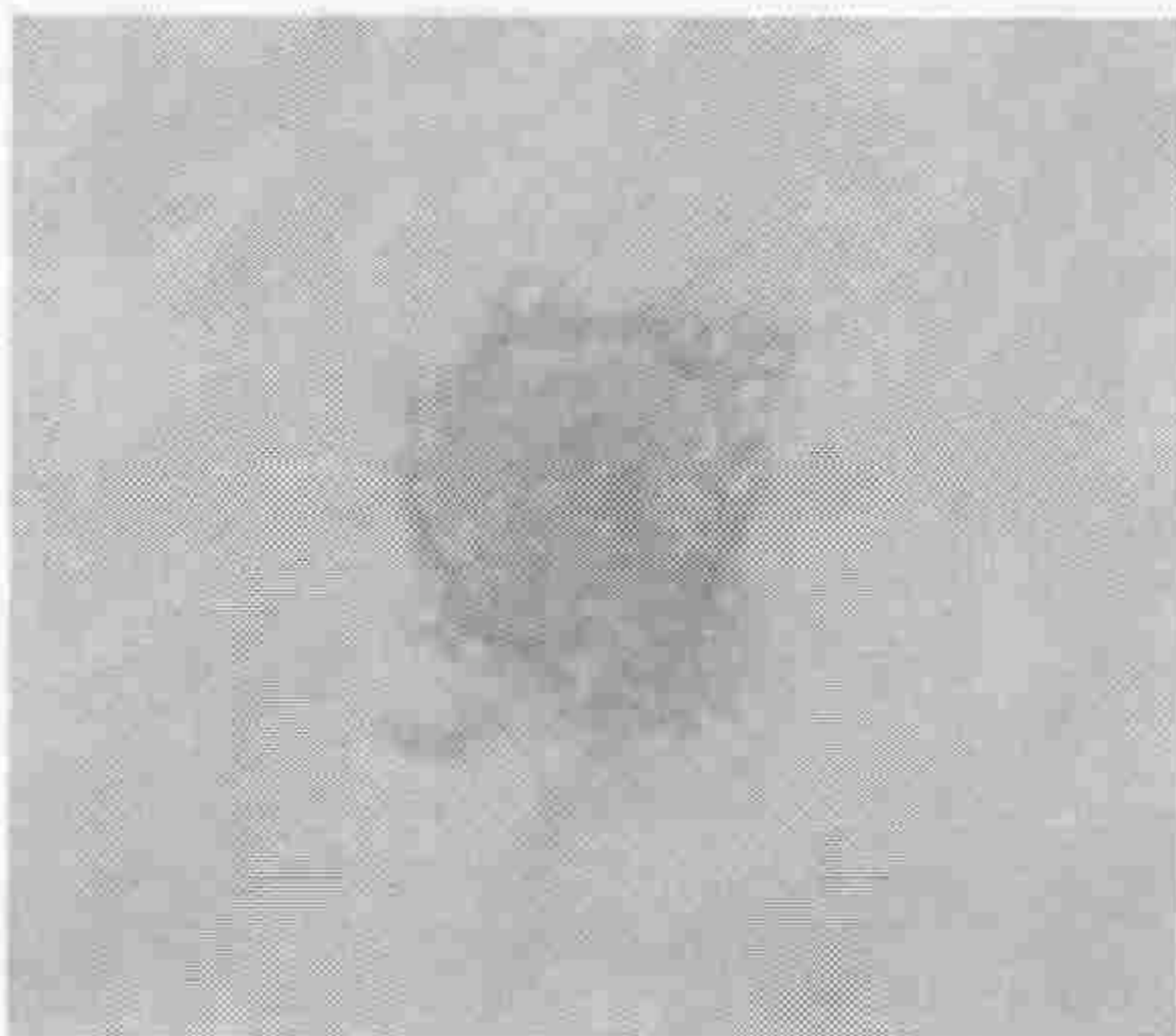


黃原膠
(0.15%)

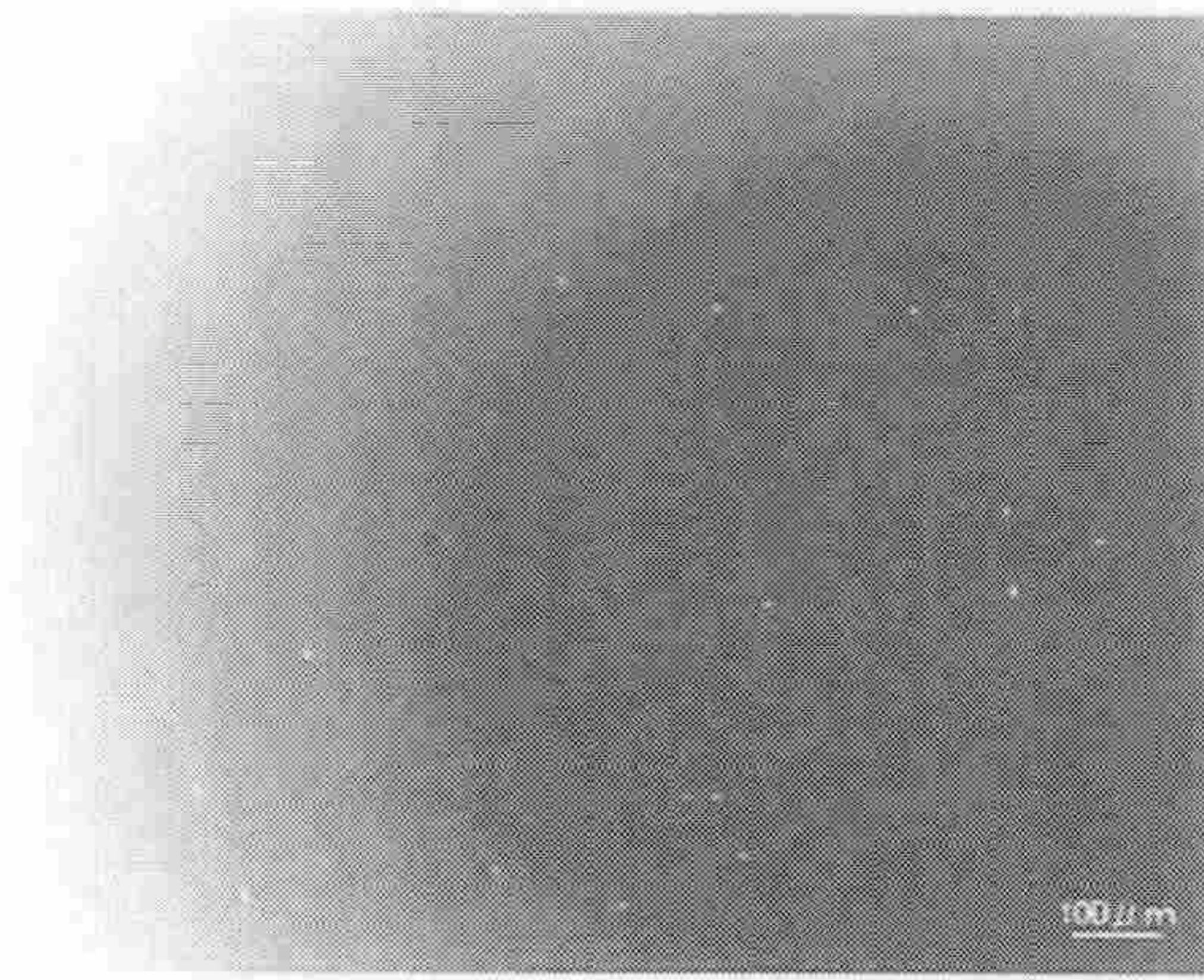


κ -鹿角菜膠+刺槐豆膠
(0.05%) + (0.05%)

【第5圖】

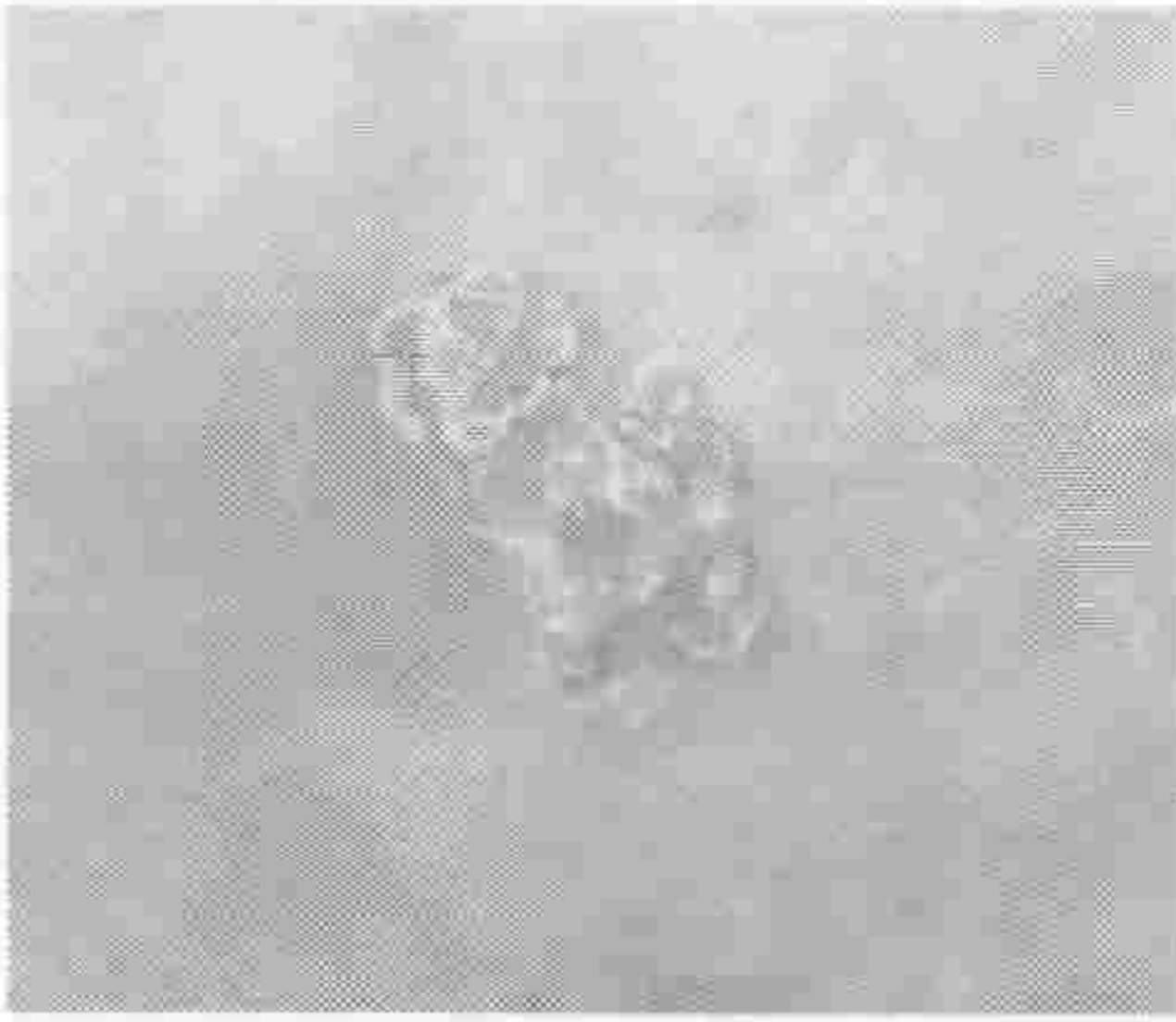


【第6圖】



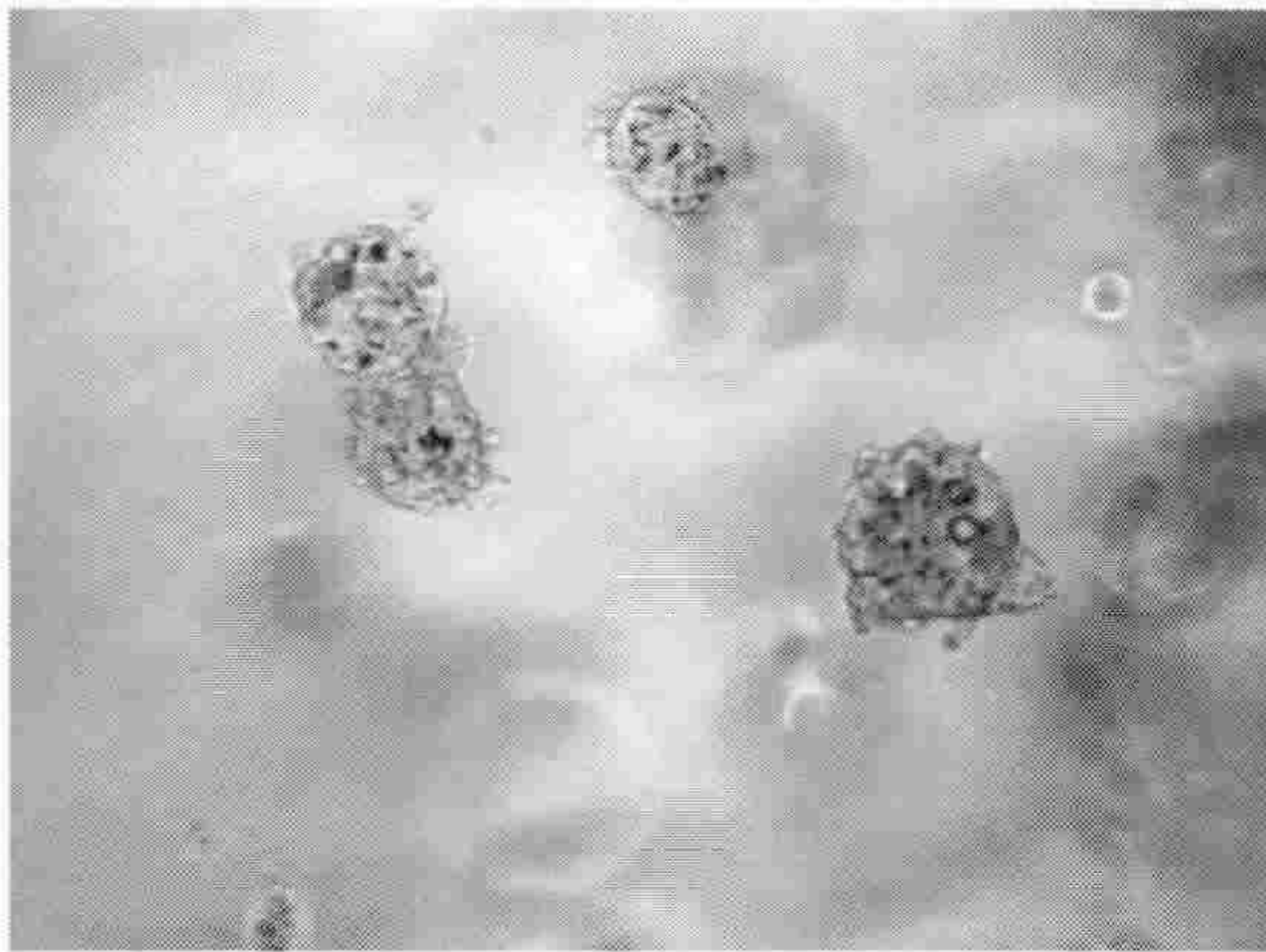
【第7圖】

HepG2球體



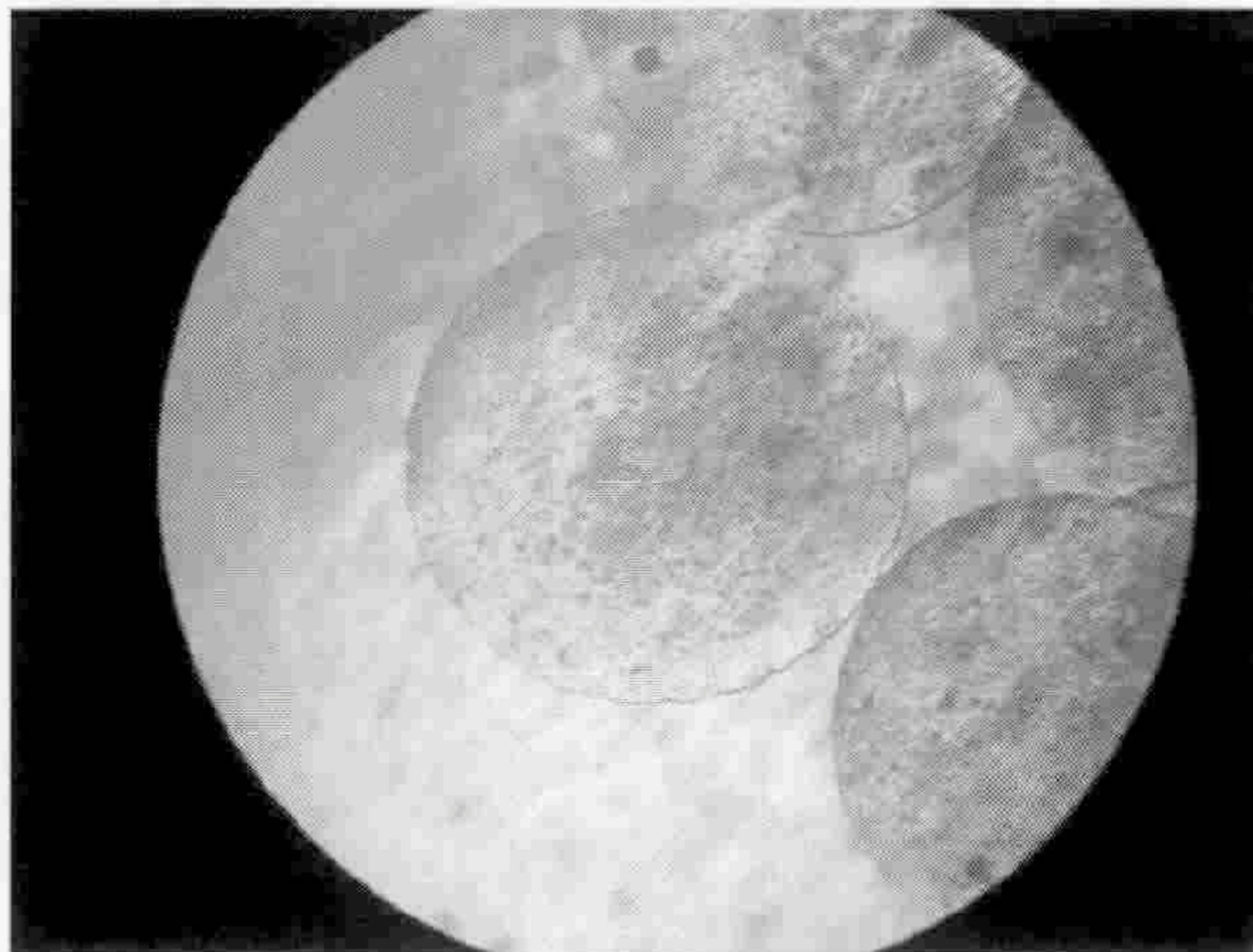
【第8圖】

塗覆層黏蛋白GEM



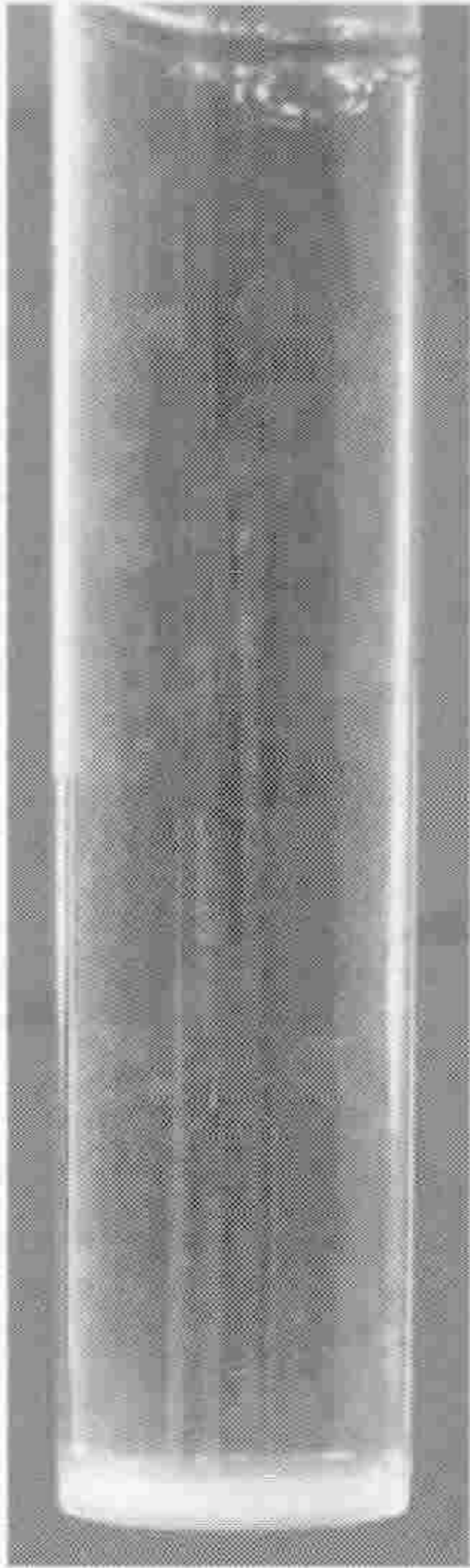
【第9圖】

海藻酸珠粒



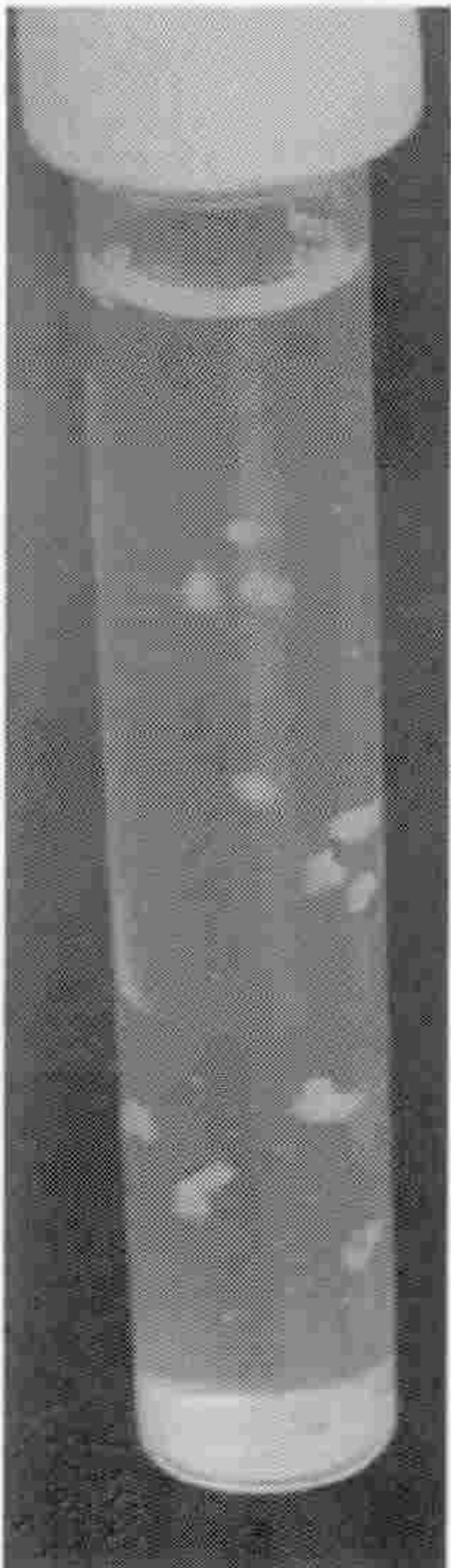
【第10圖】

膠原蛋白凝膠膠囊

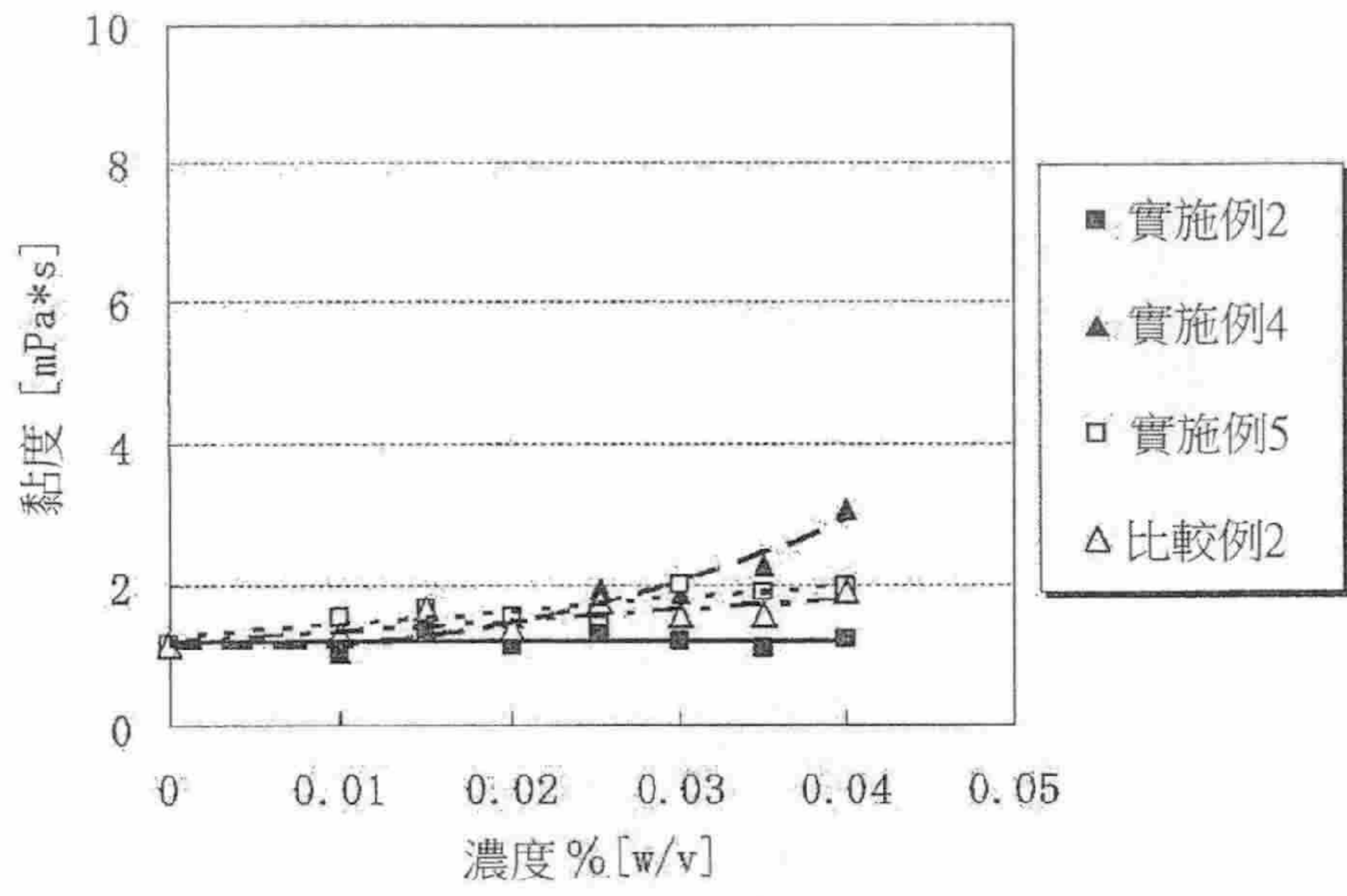


【第11圖】

水稻癒傷組織的浮游培養

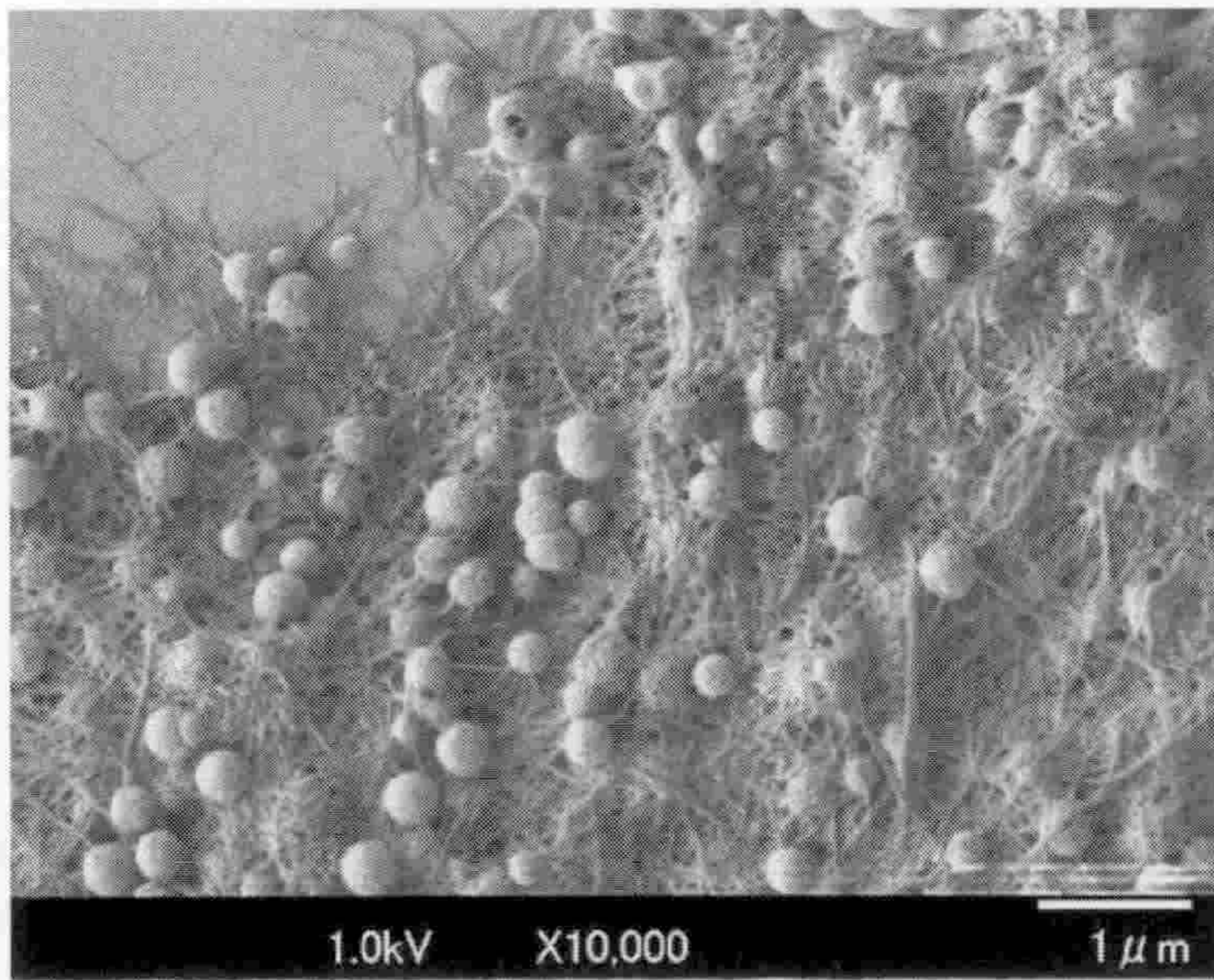


【第12圖】



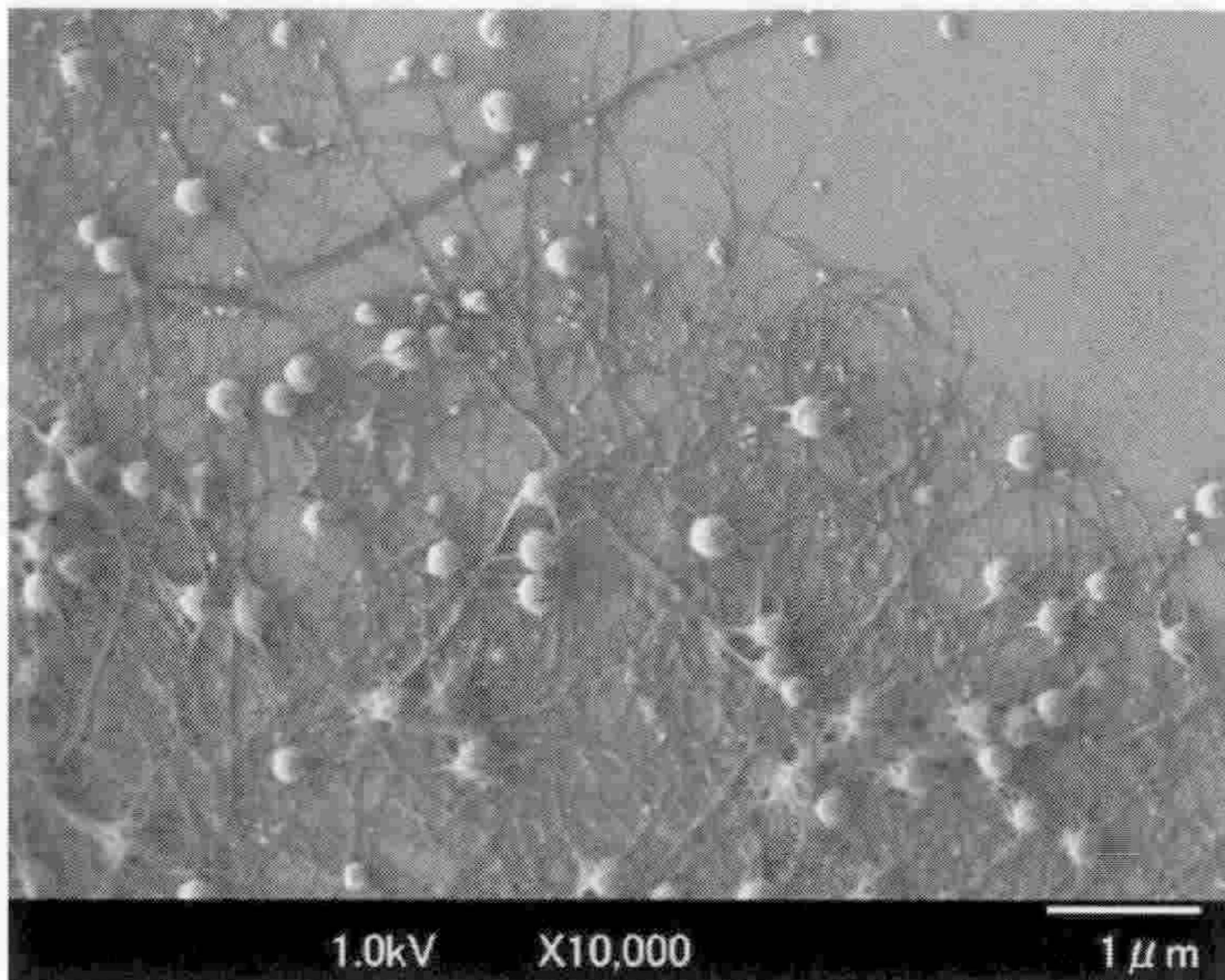
【第13圖】

MNC



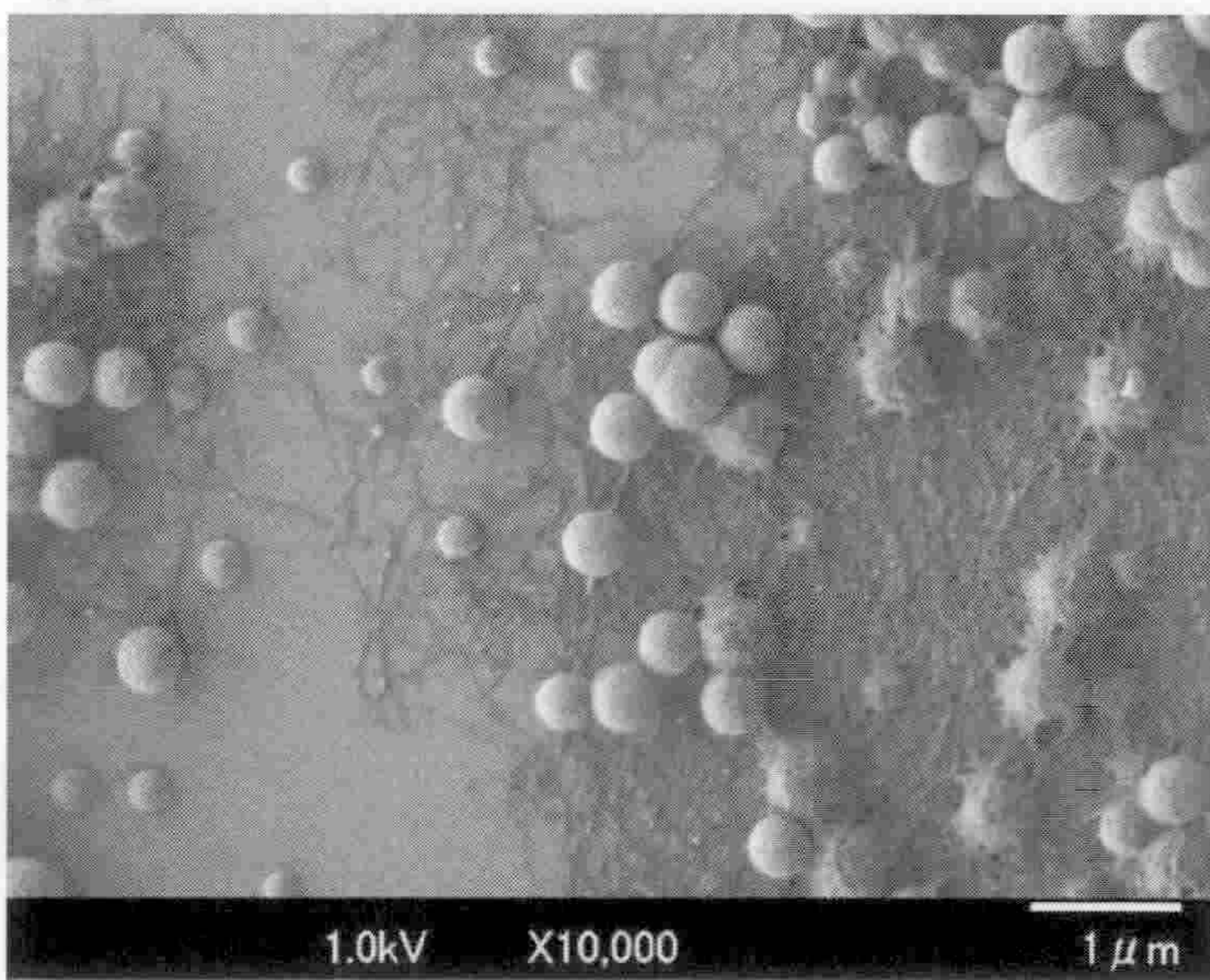
【第14圖】

PNC



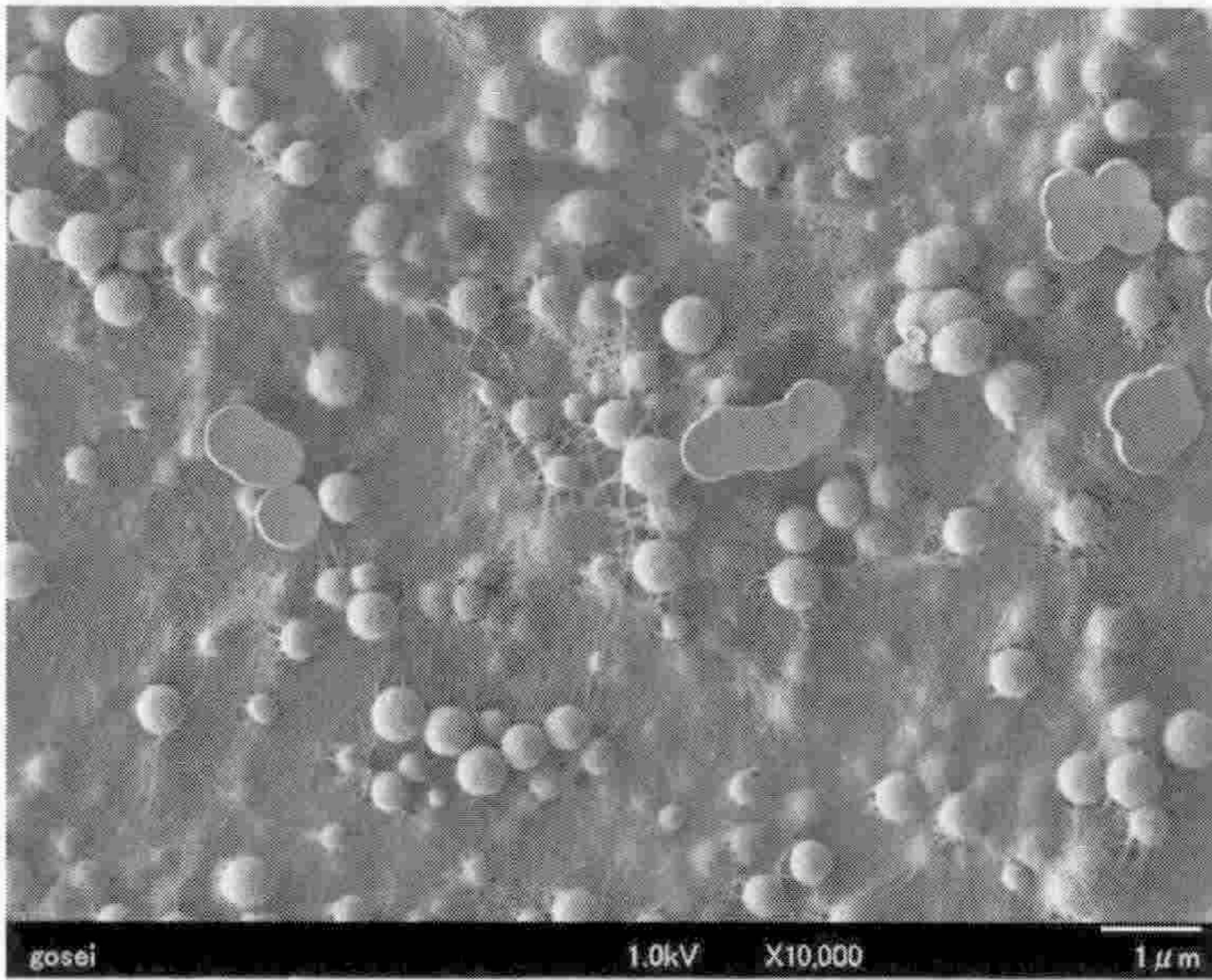
【第15圖】

CT



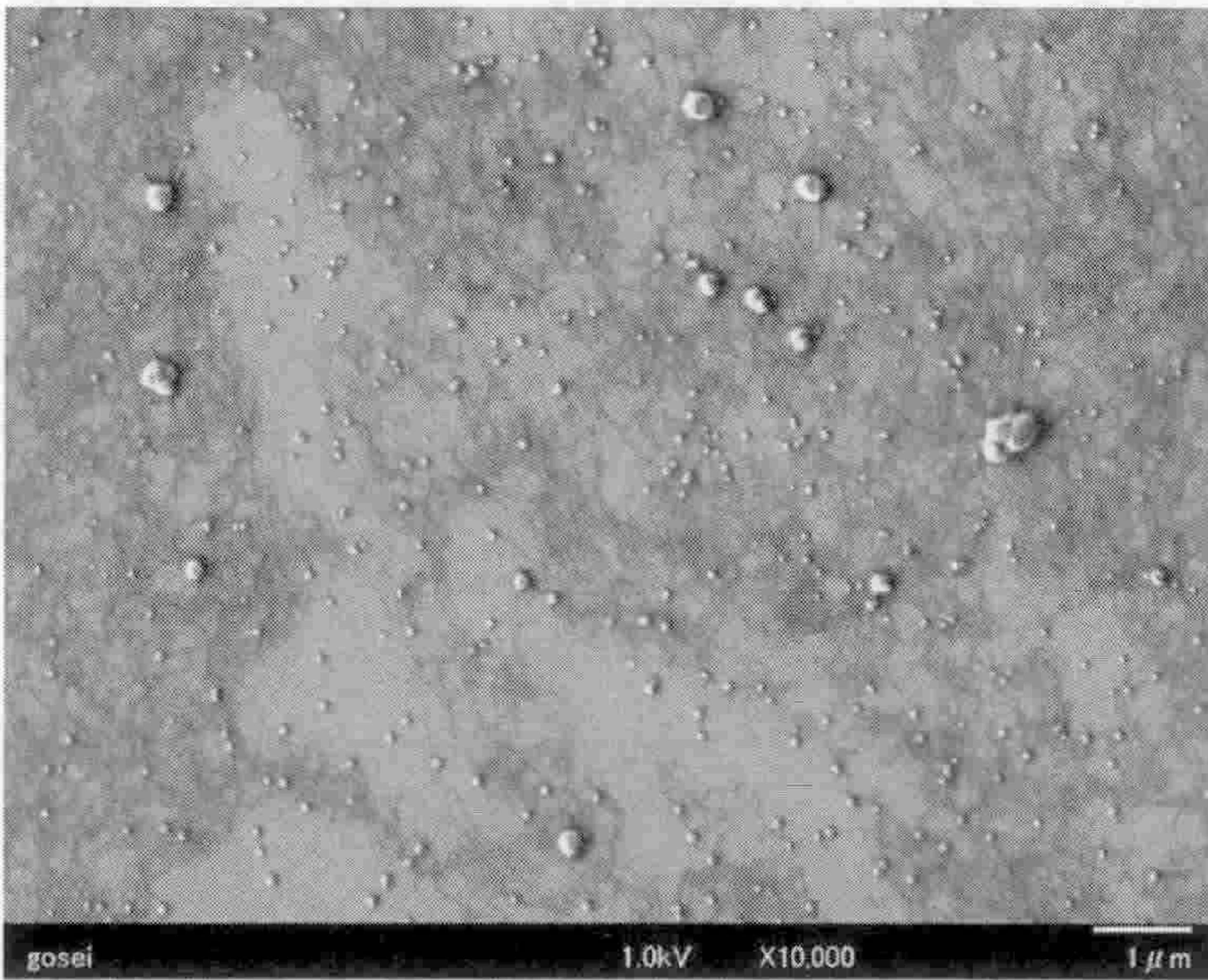
【第16圖】

DAG



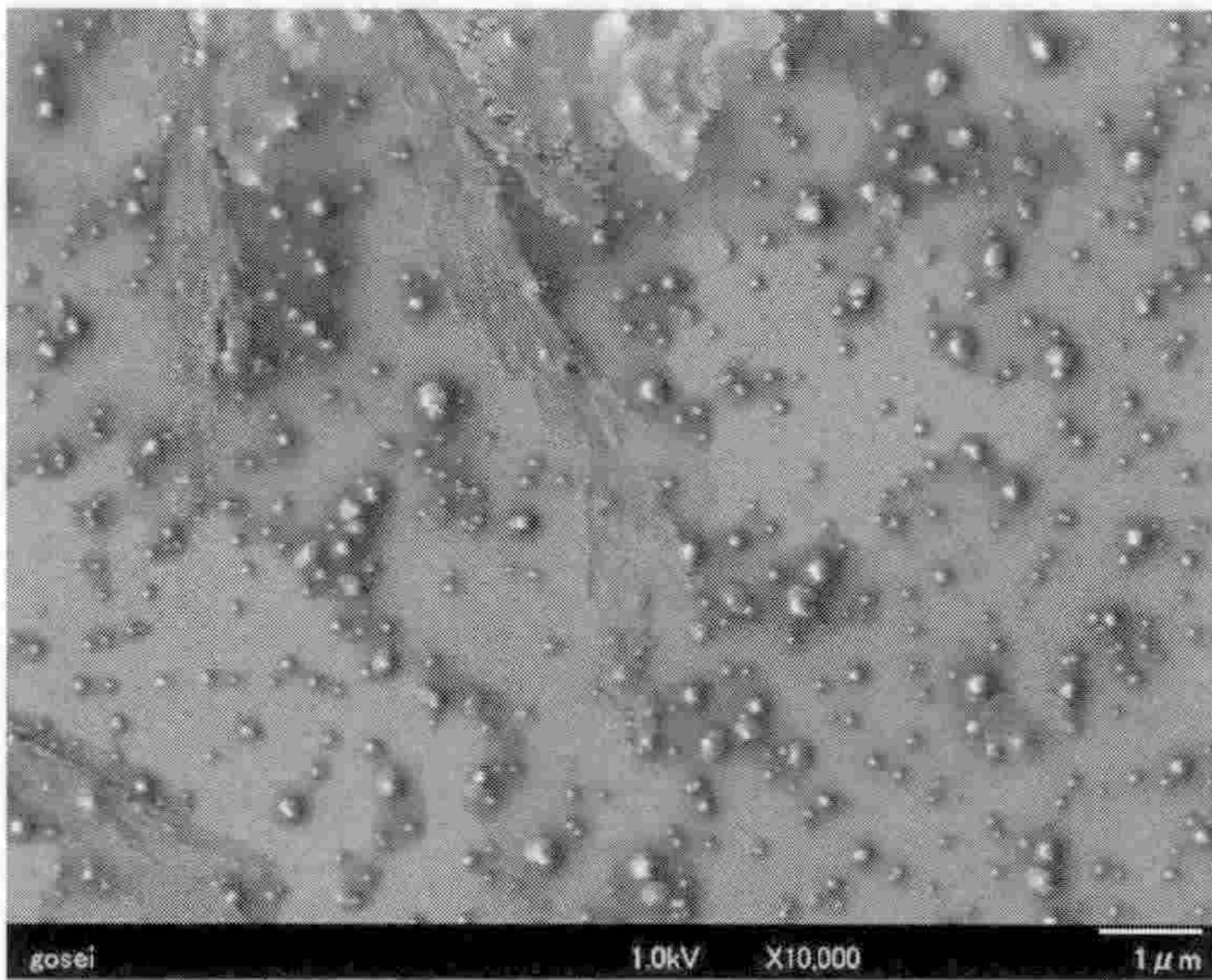
【第17圖】

Car 於室溫乾燥



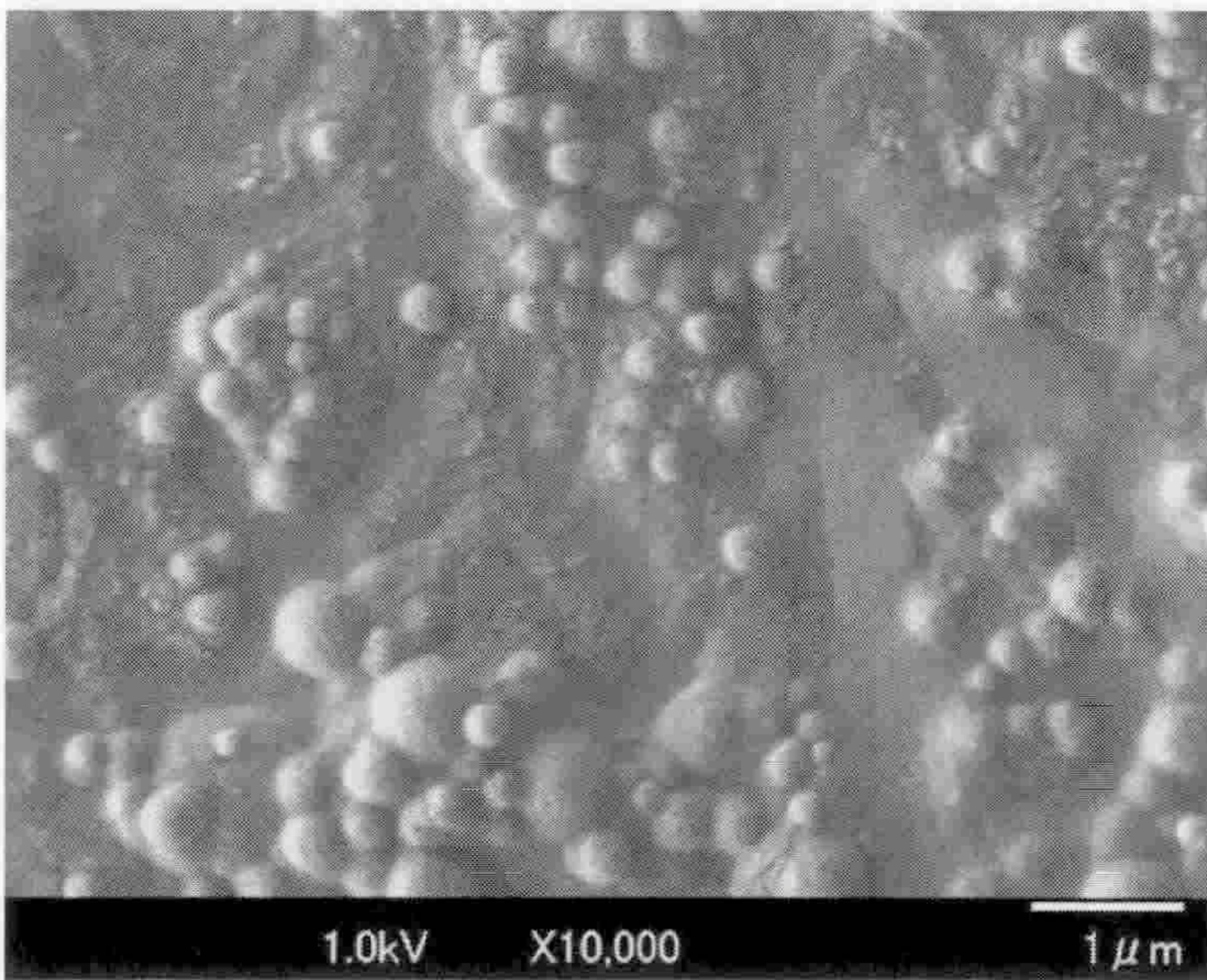
【第18圖】

Car 於110°C乾燥



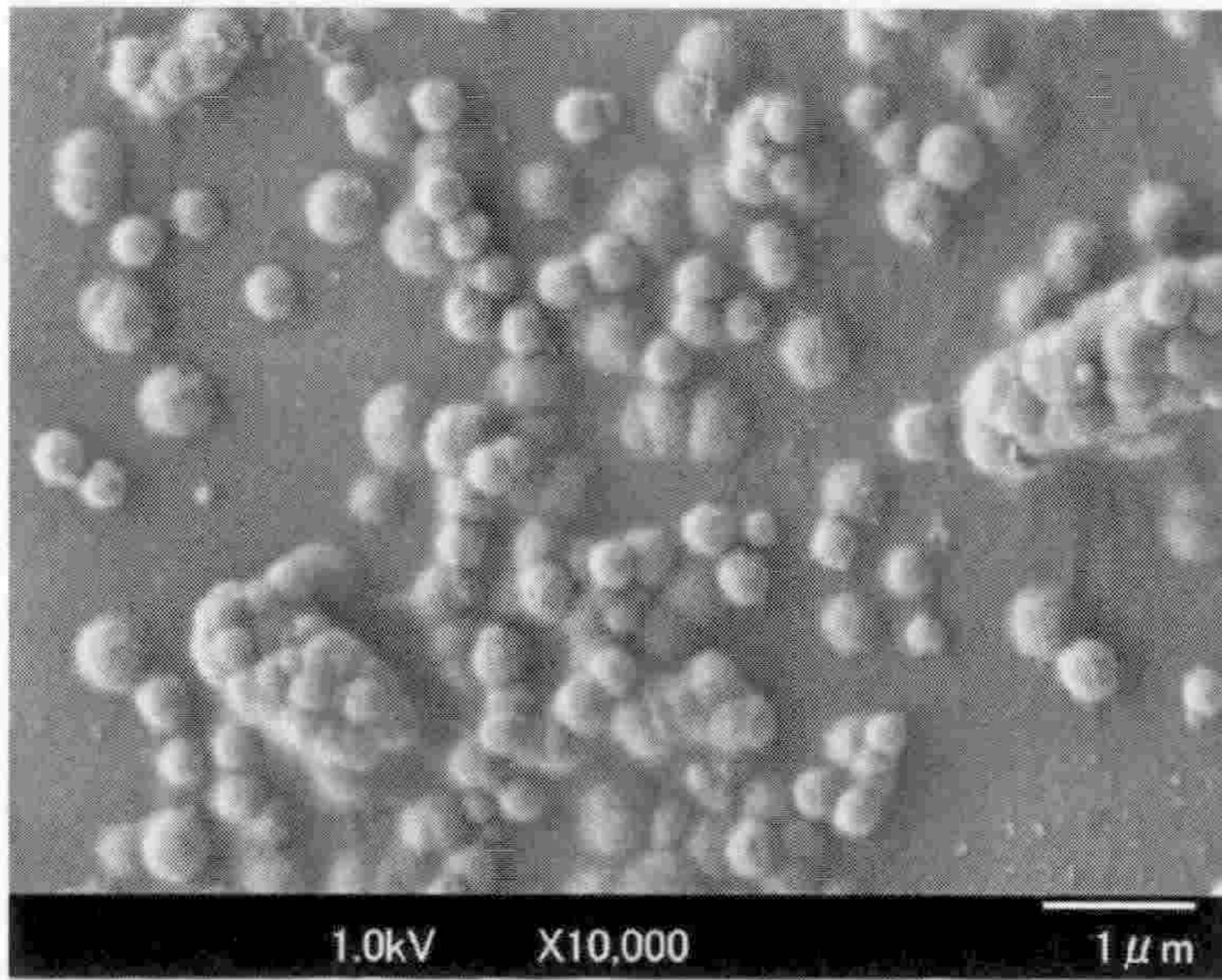
【第19圖】

Xan



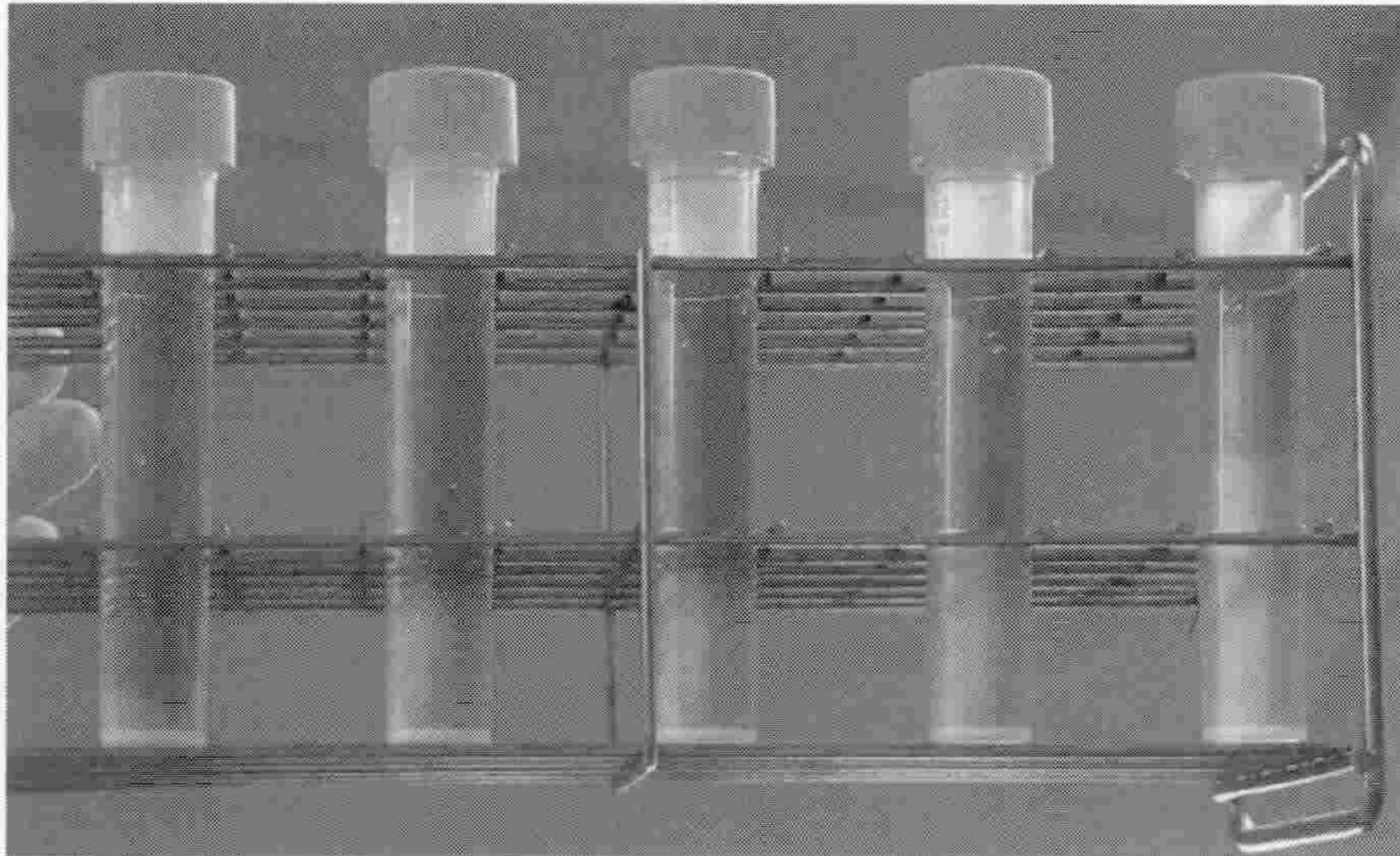
【第20圖】

DU



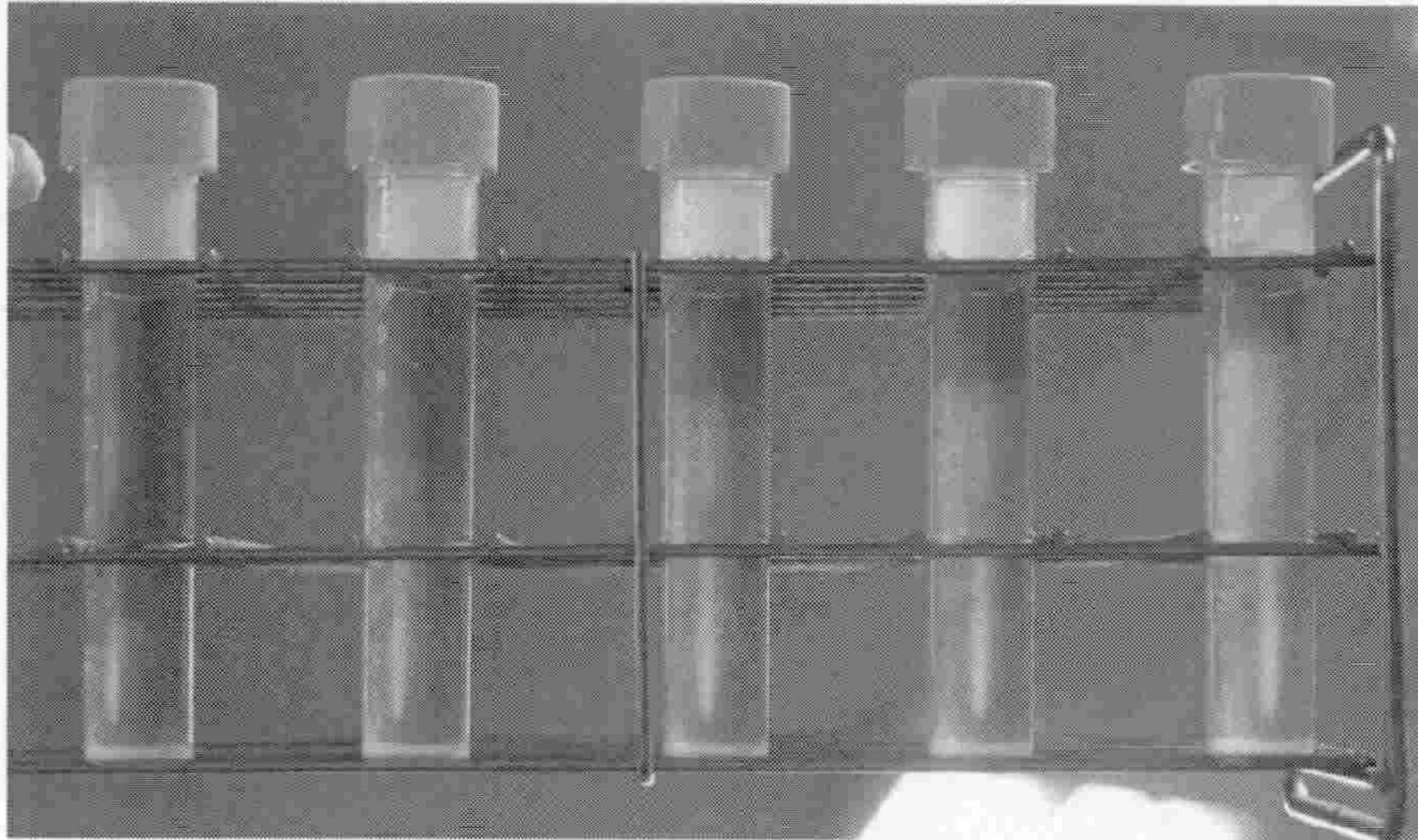
【第21圖】

MNC



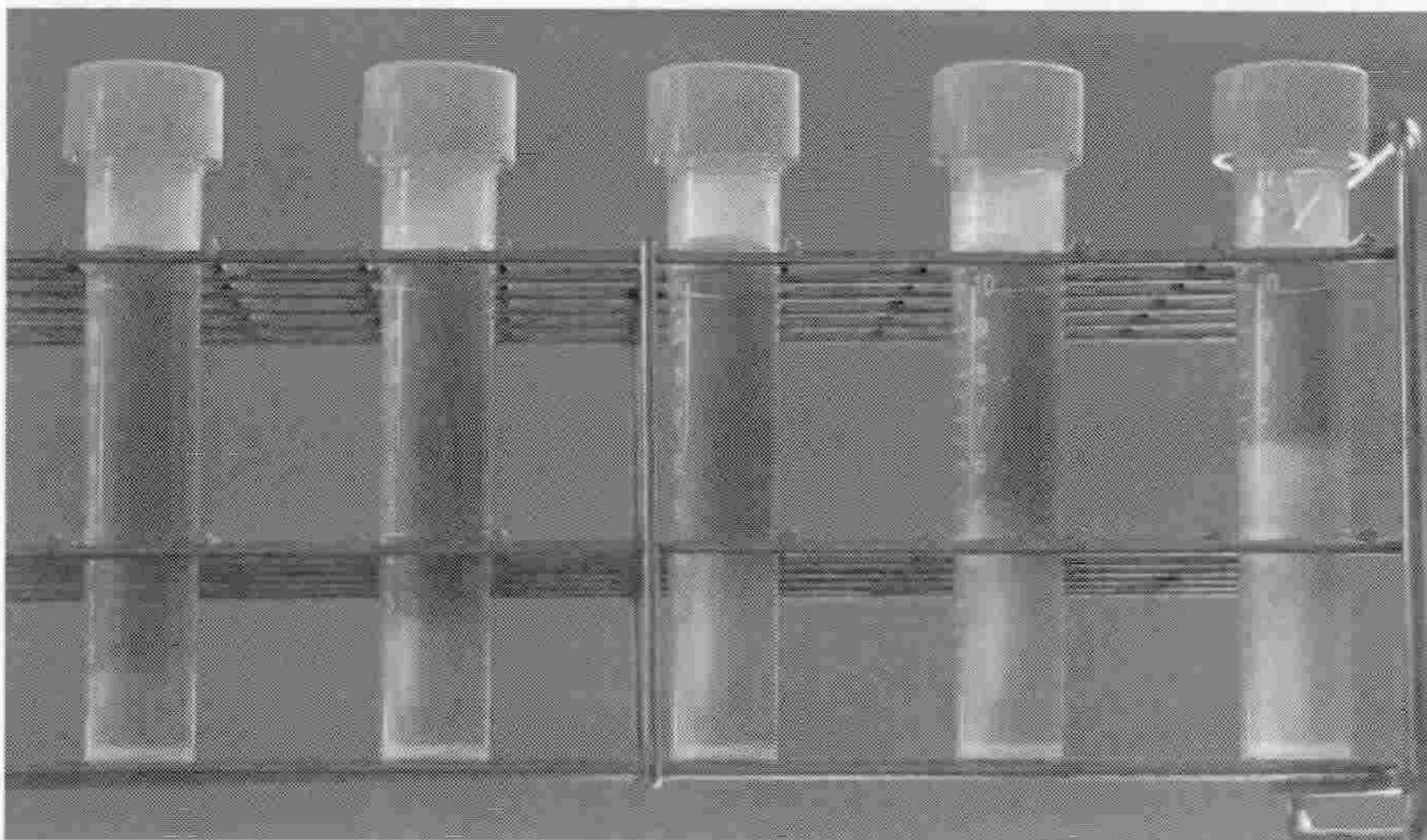
【第22圖】

PNC



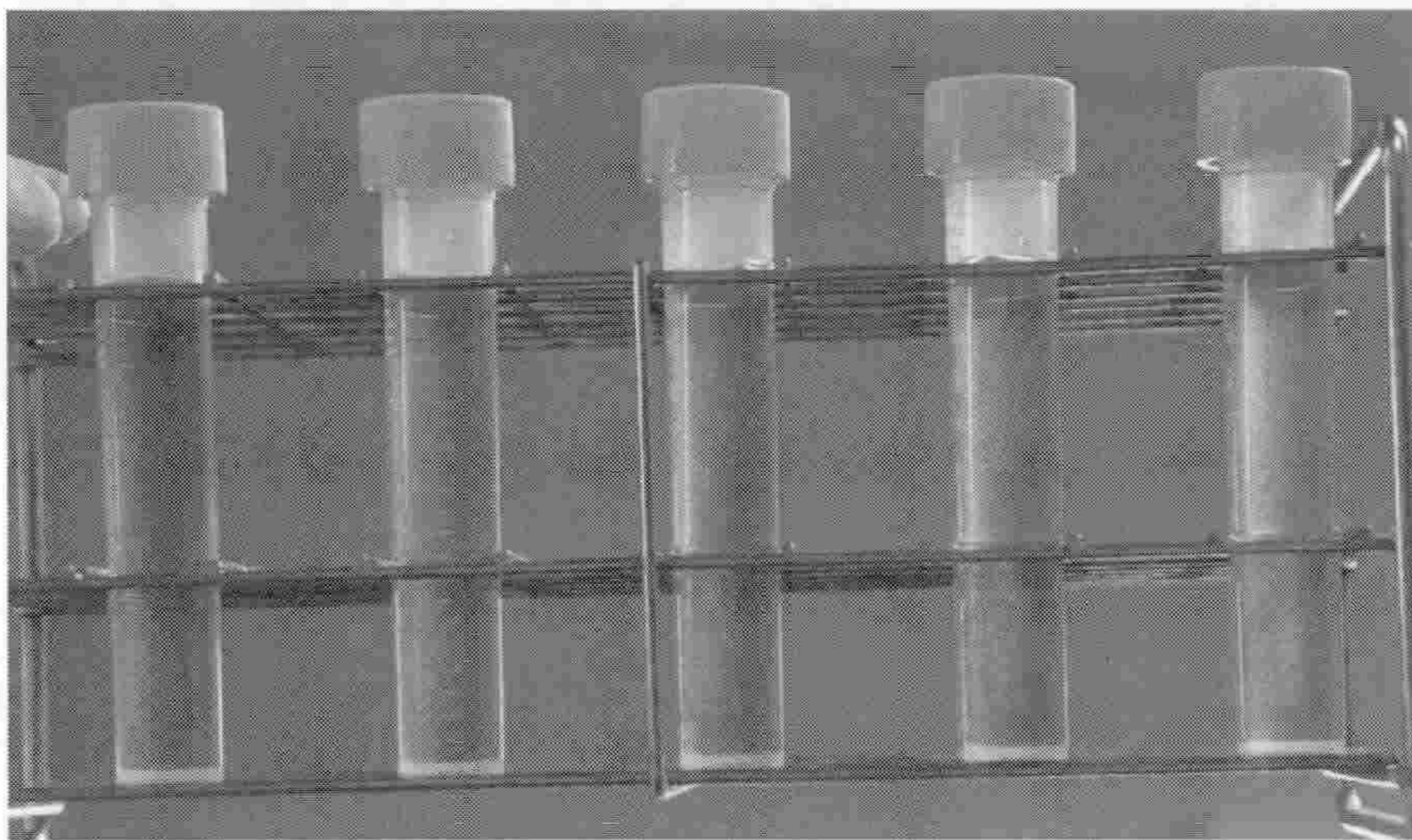
【第23圖】

CT



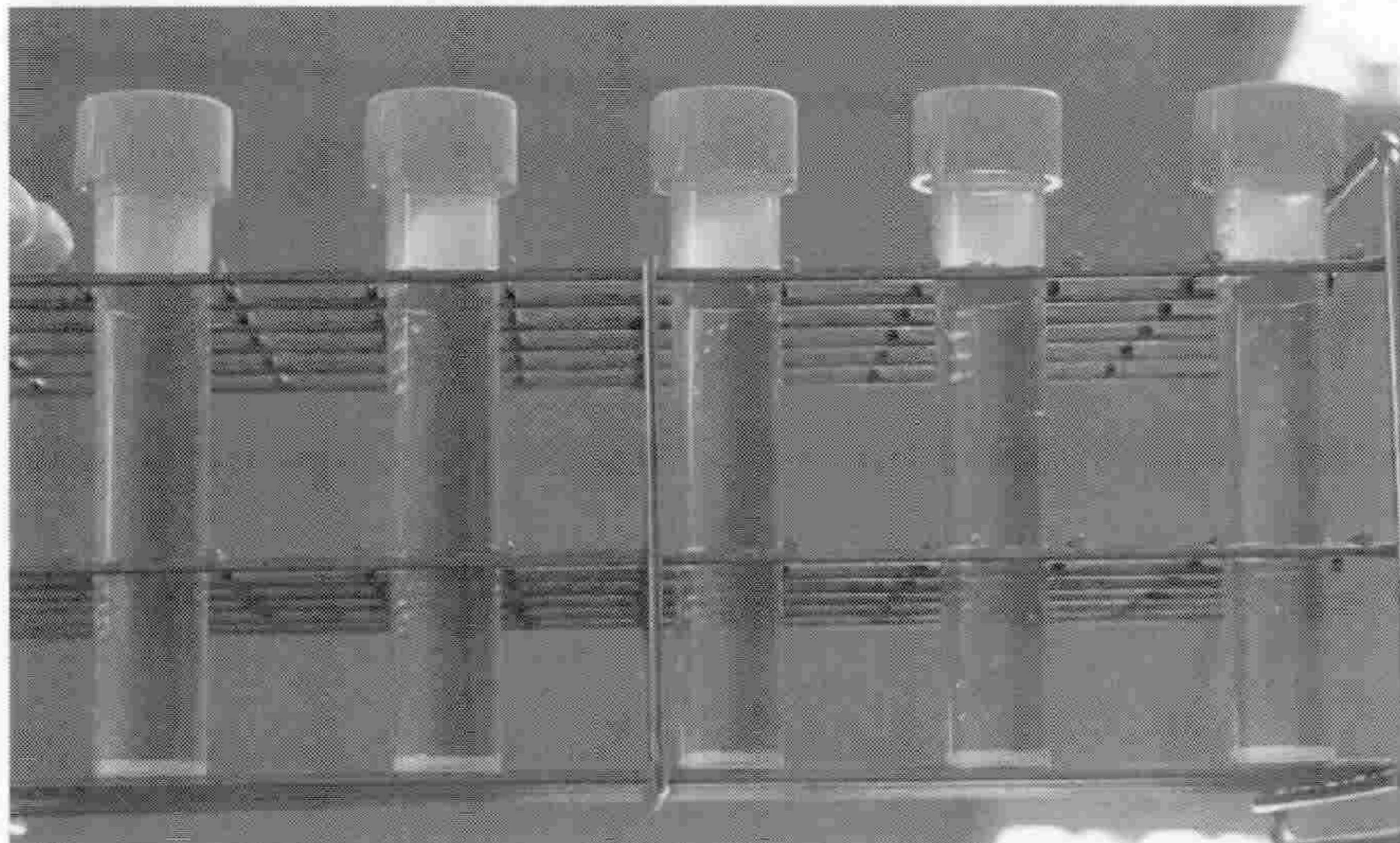
【第24圖】

DAG



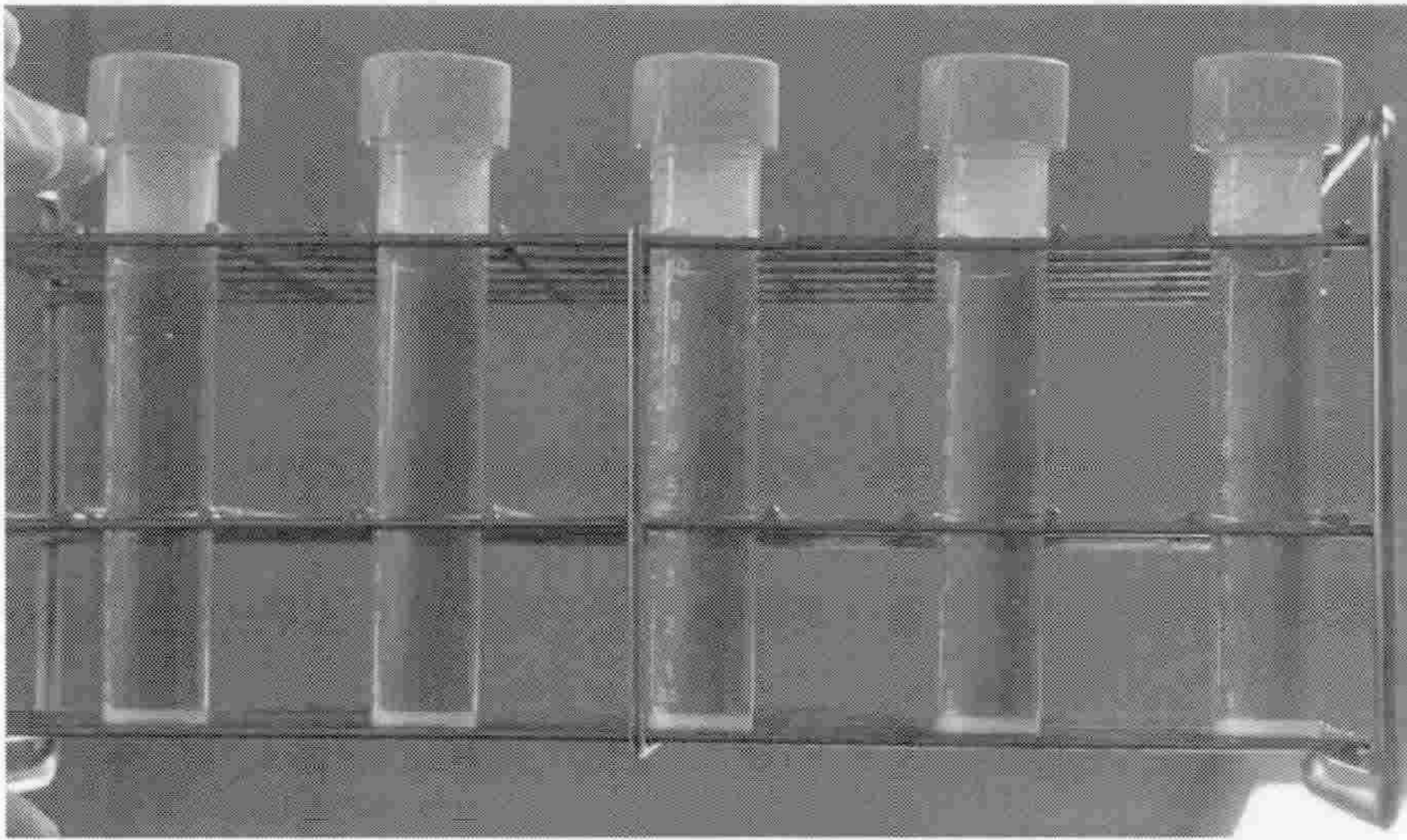
【第25圖】

Car



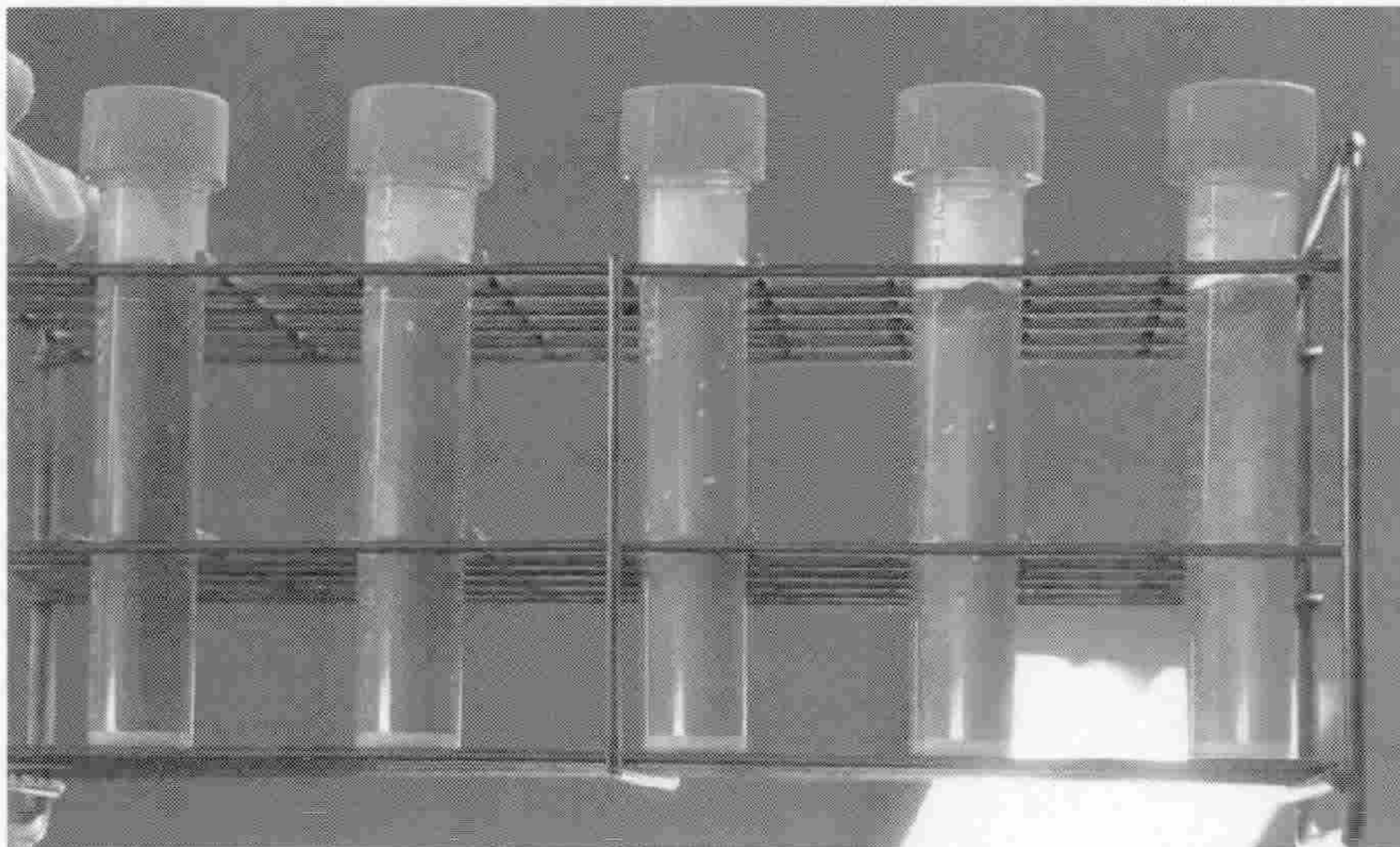
【第26圖】

Xan

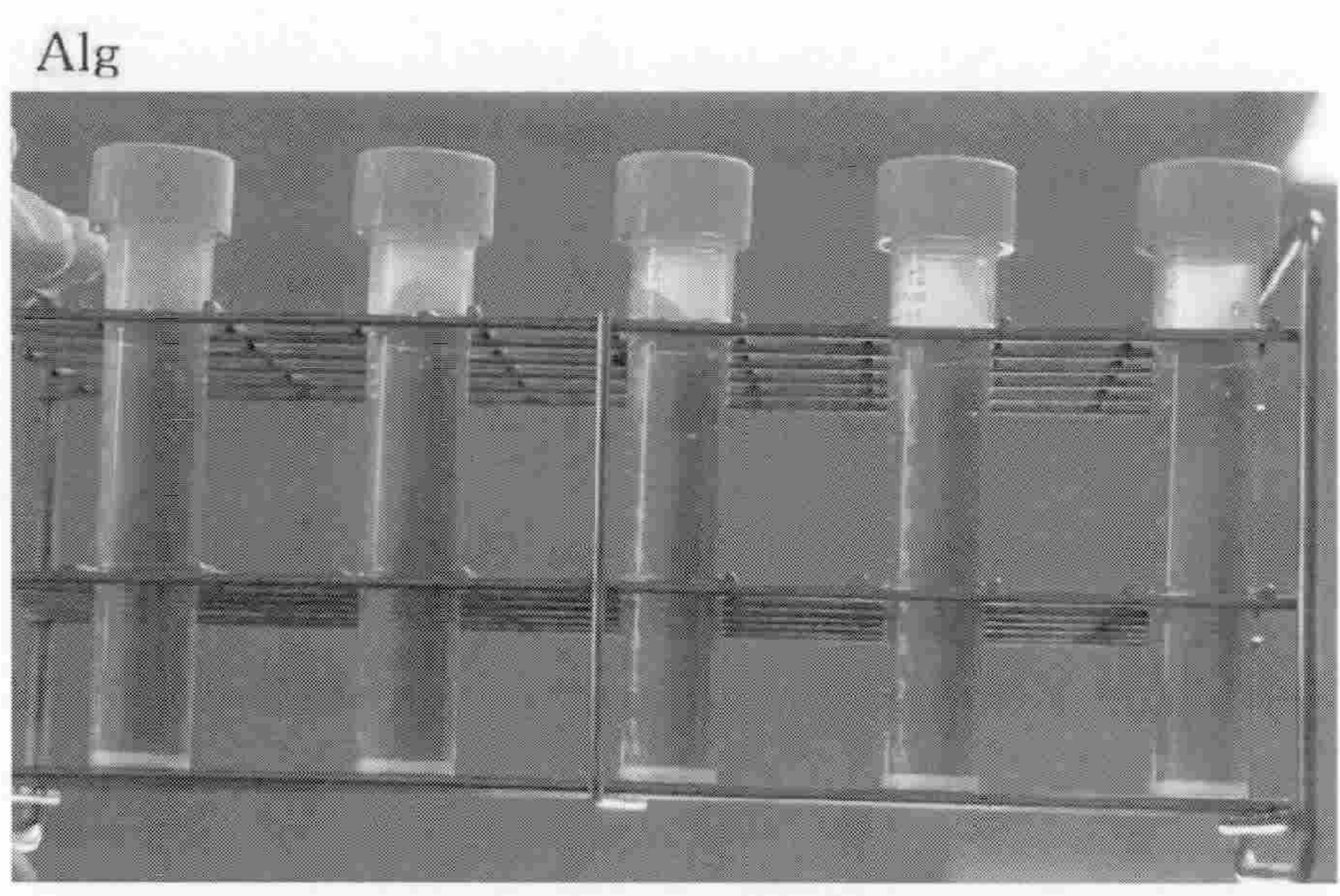


【第27圖】

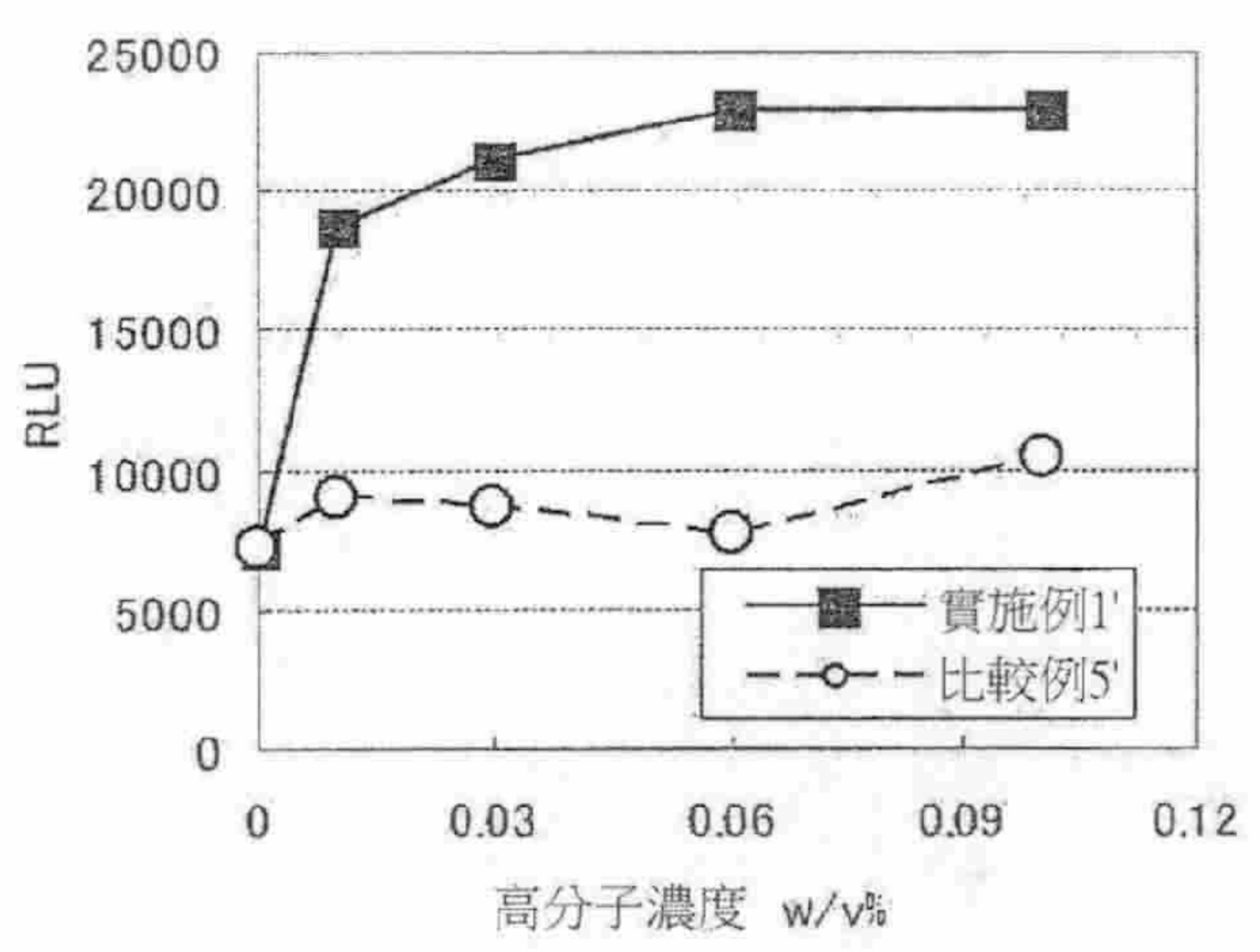
DU



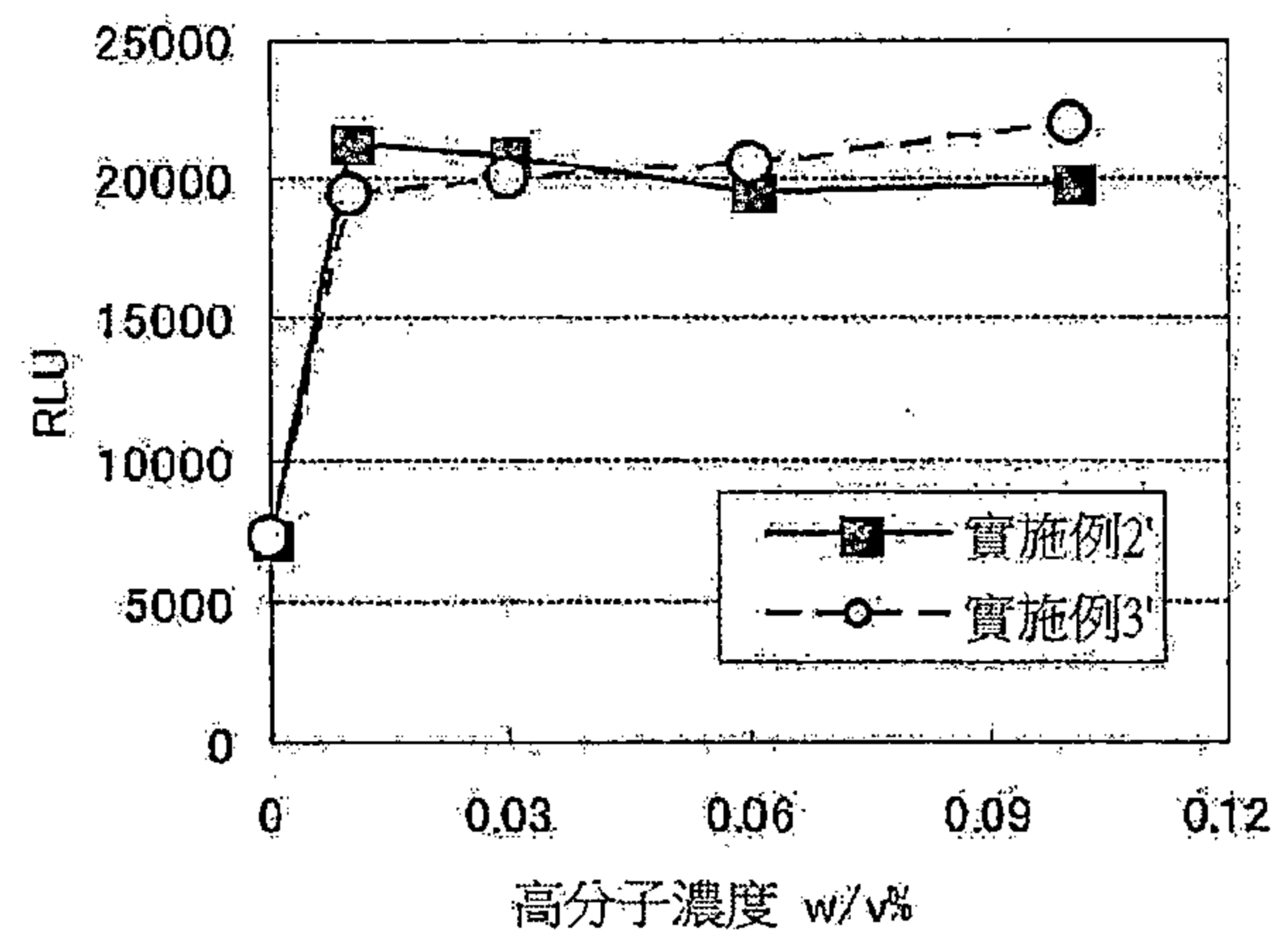
【第28圖】



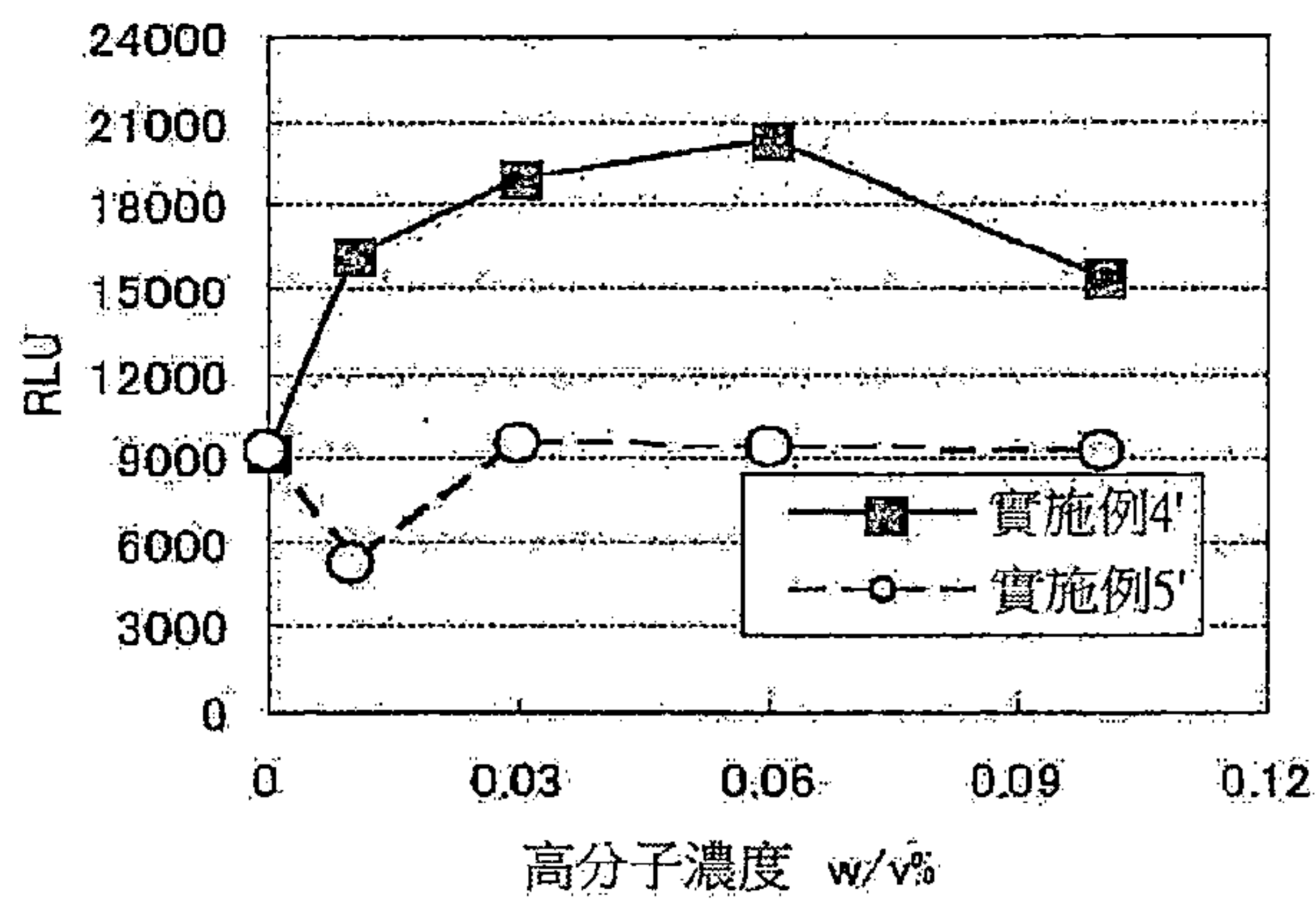
【第29圖】



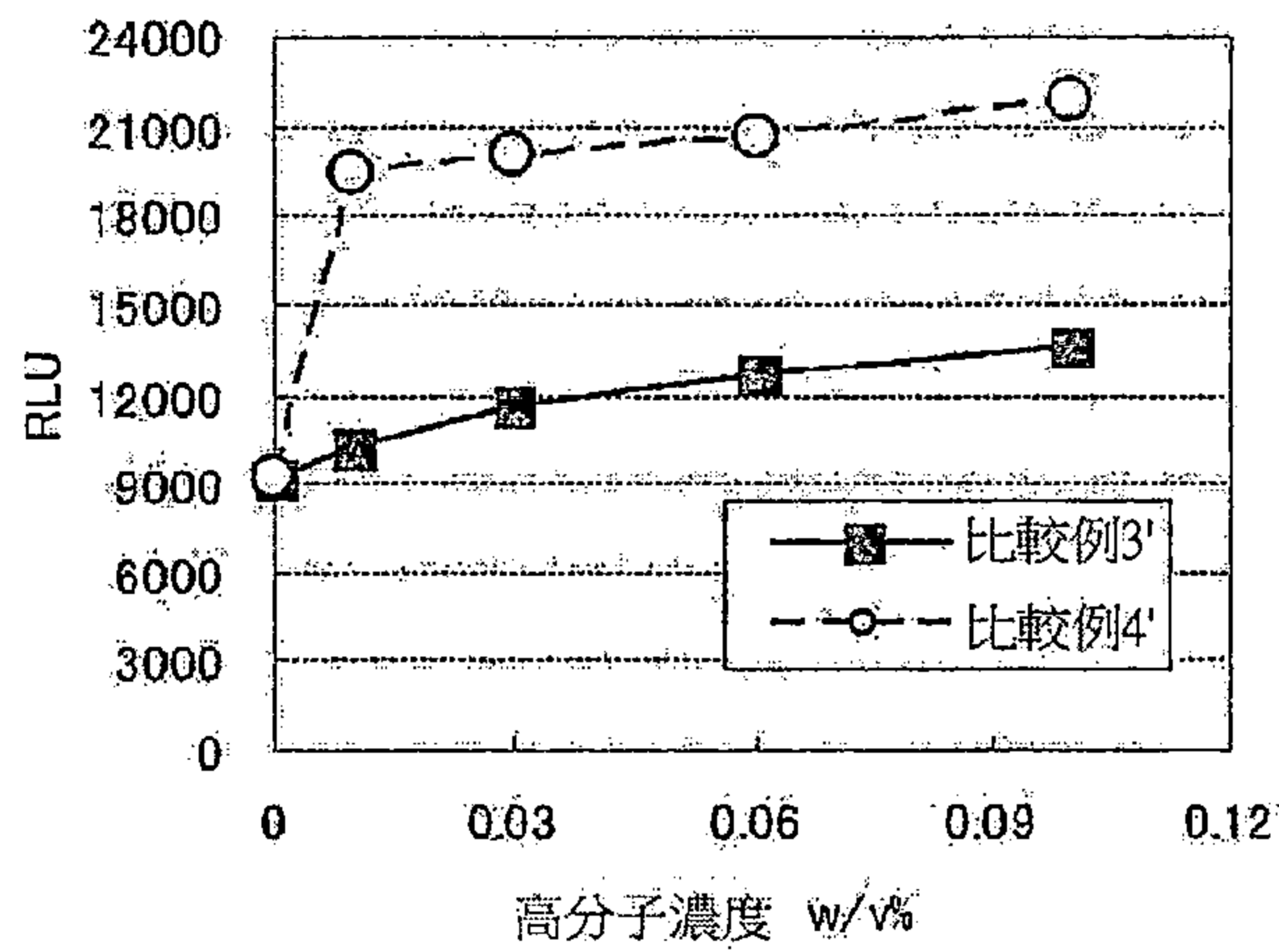
【第30圖】



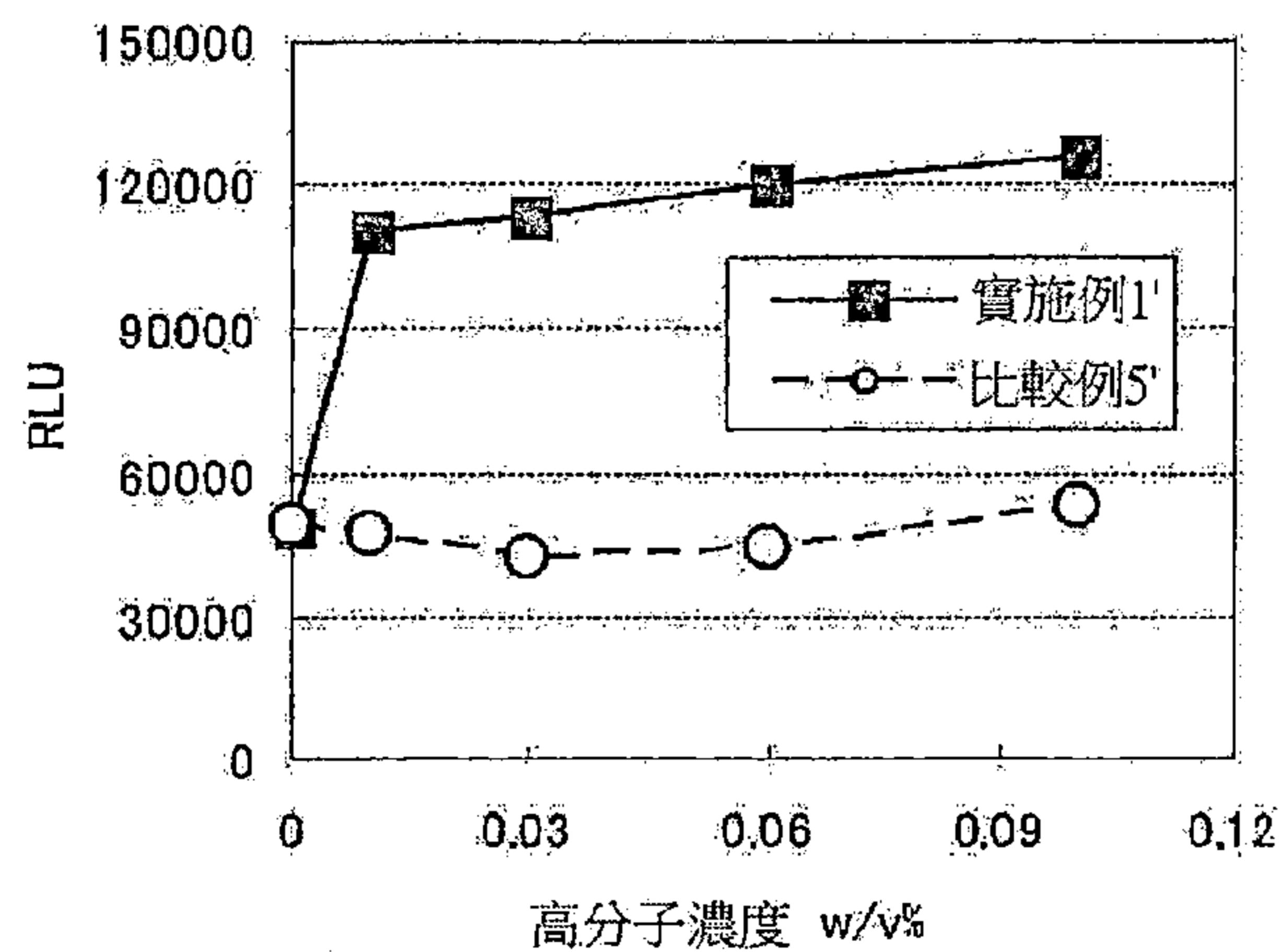
【第31圖】



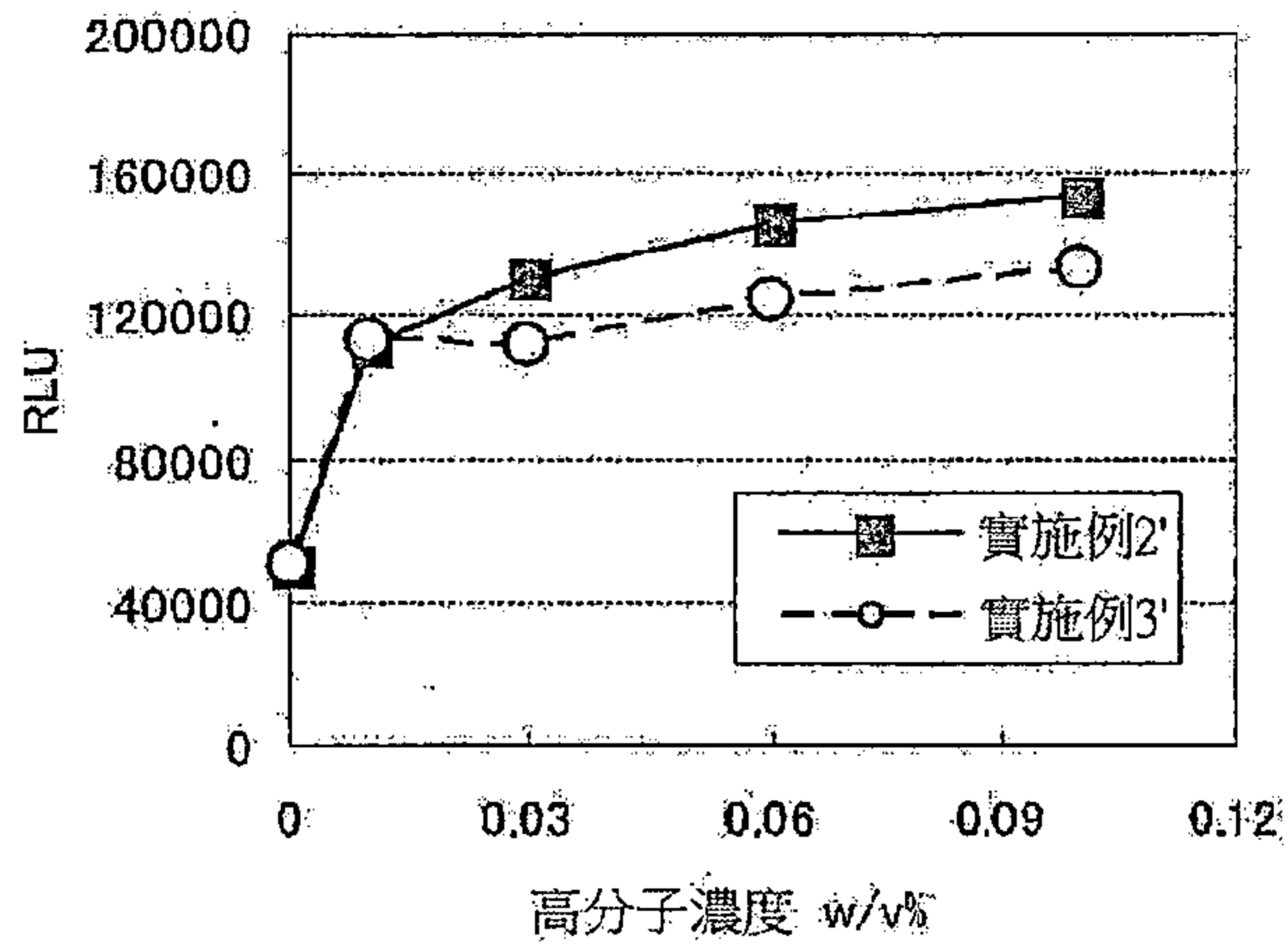
【第32圖】



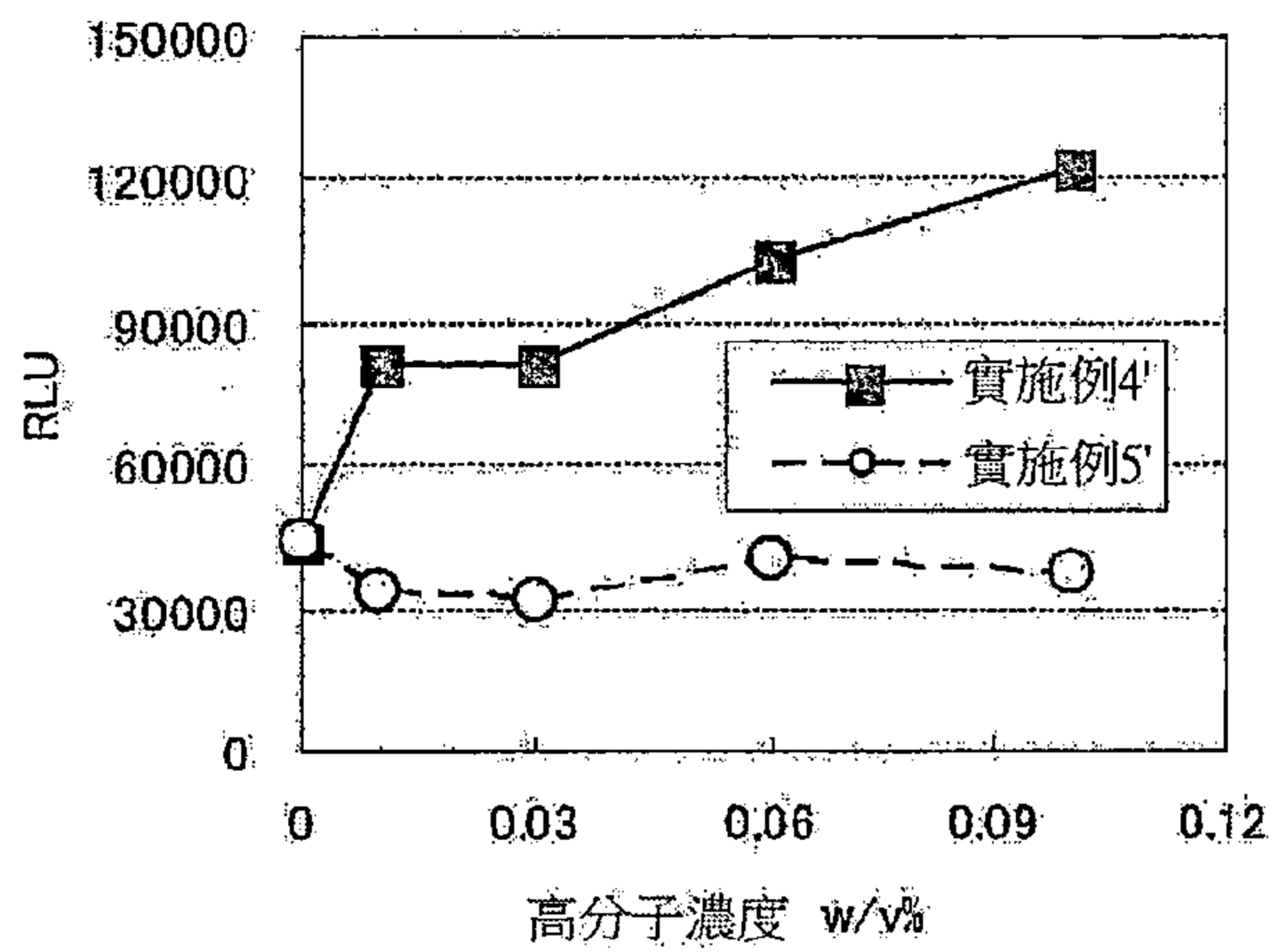
【第33圖】



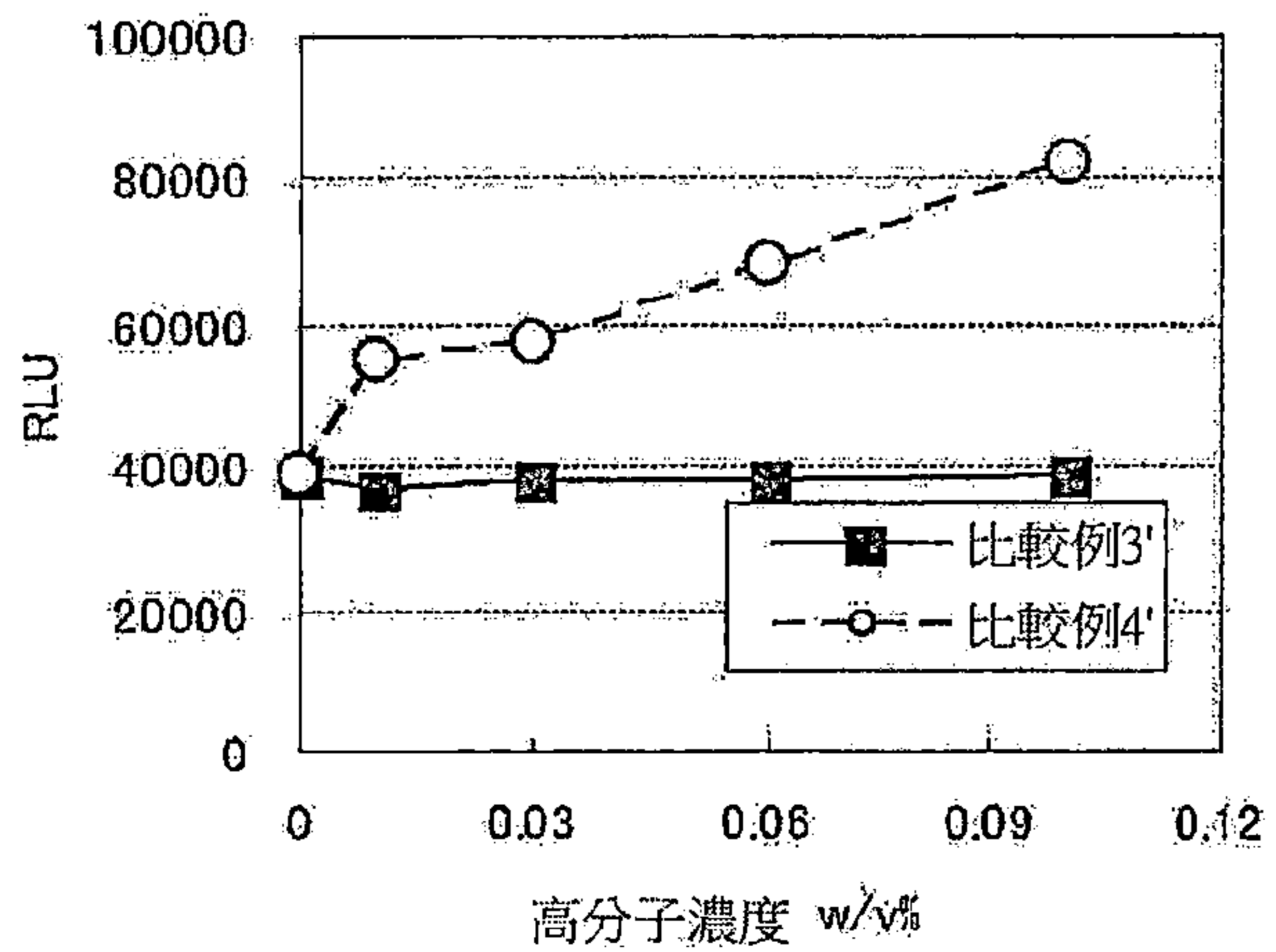
【第34圖】



【第35圖】




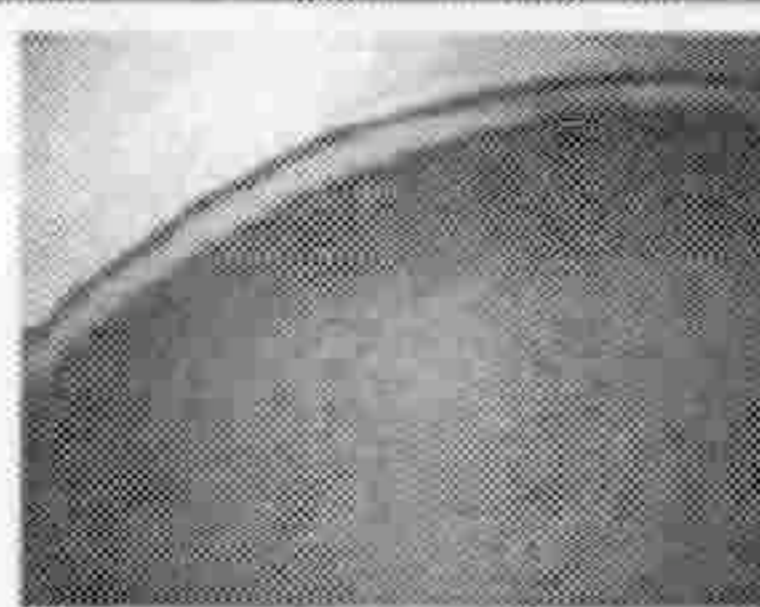
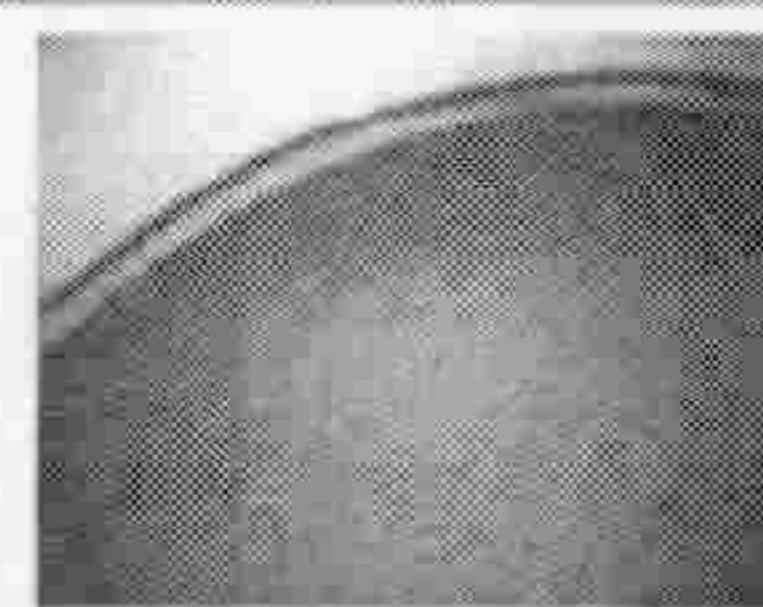


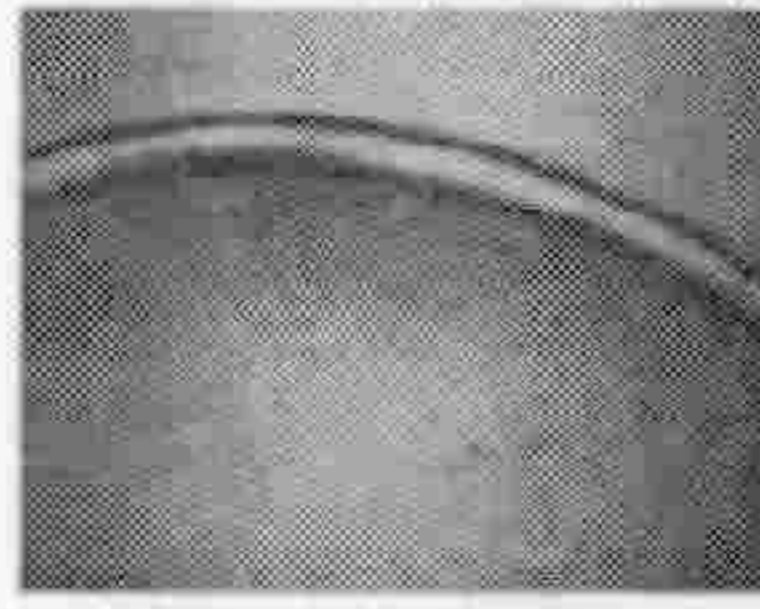
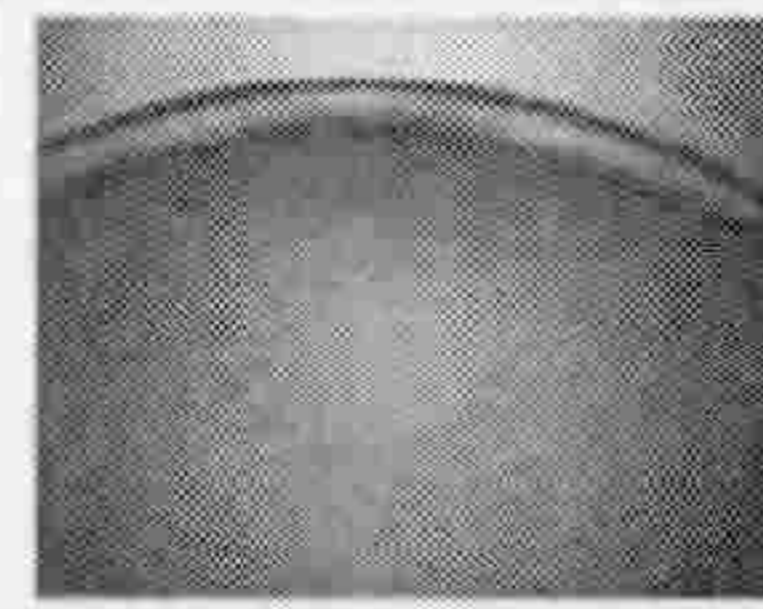
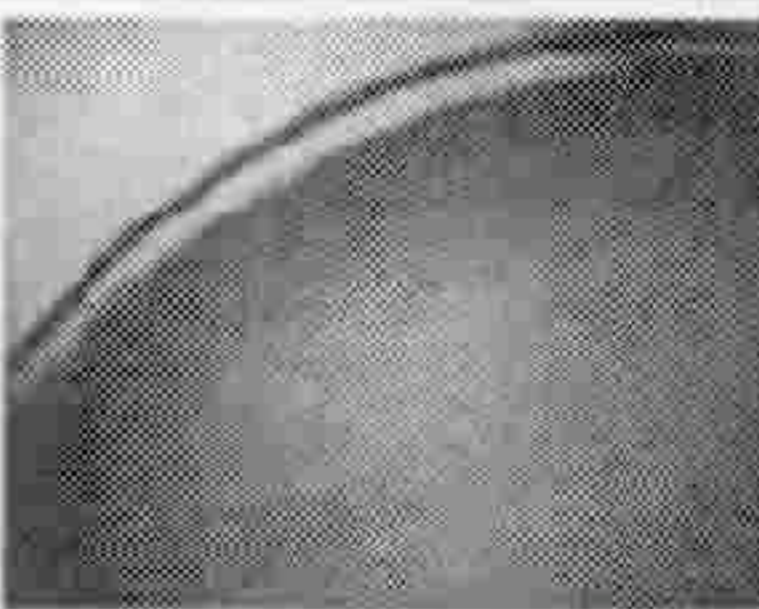
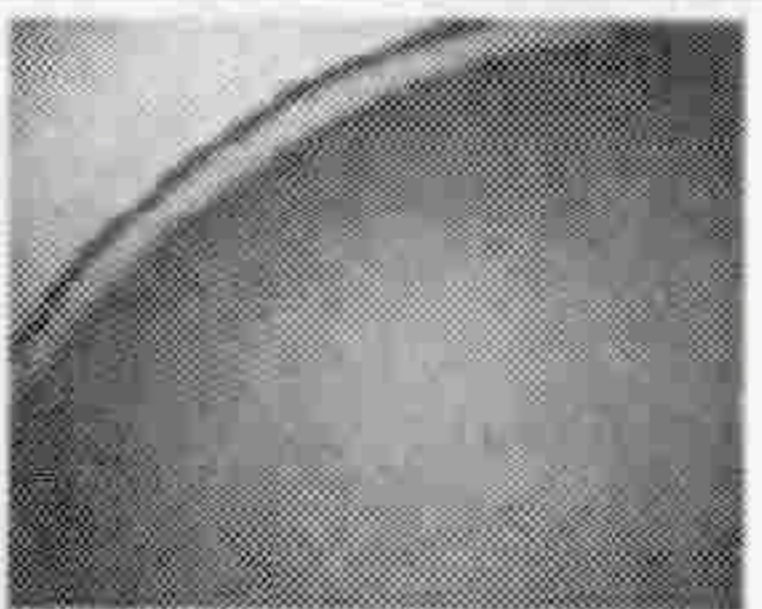
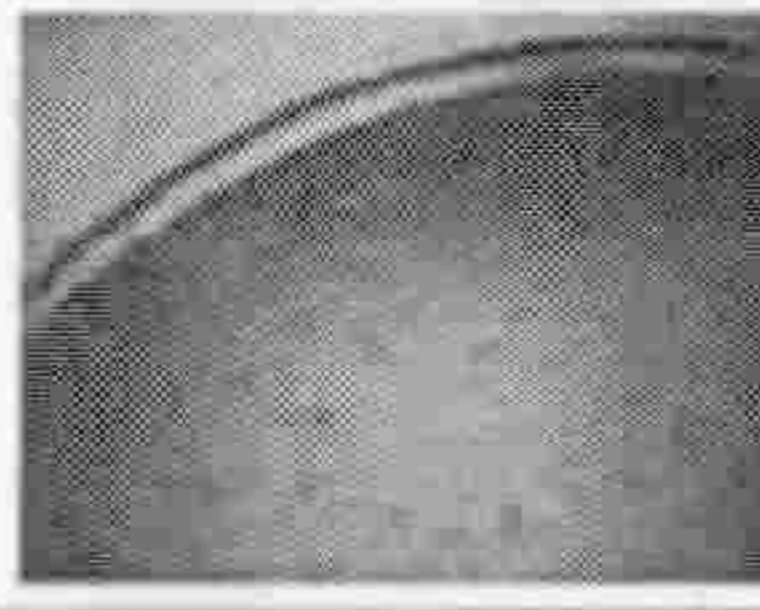
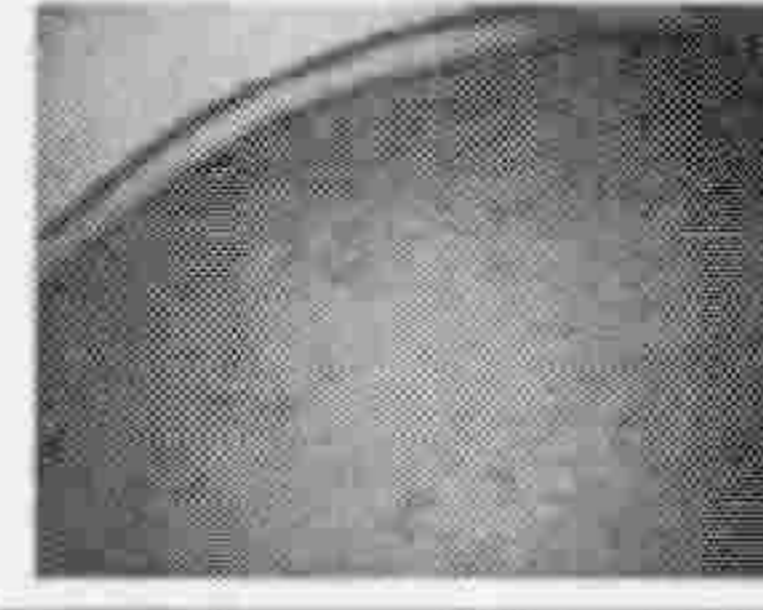
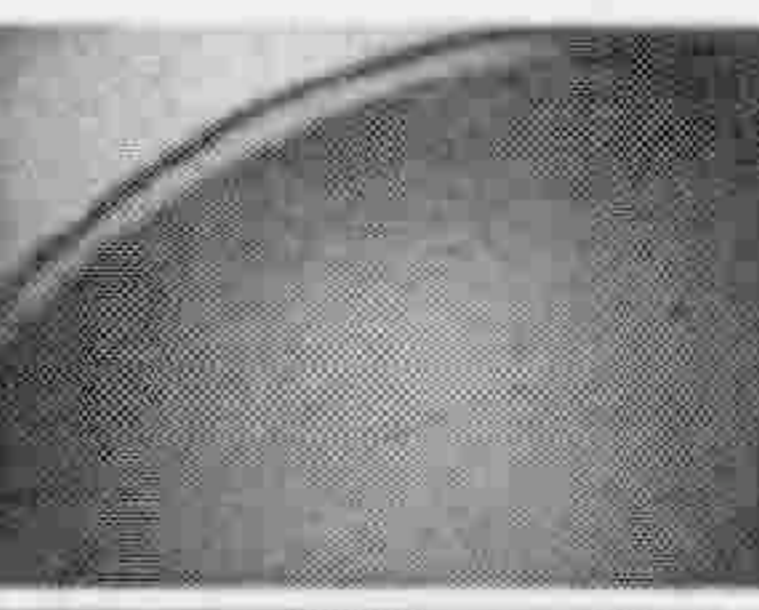
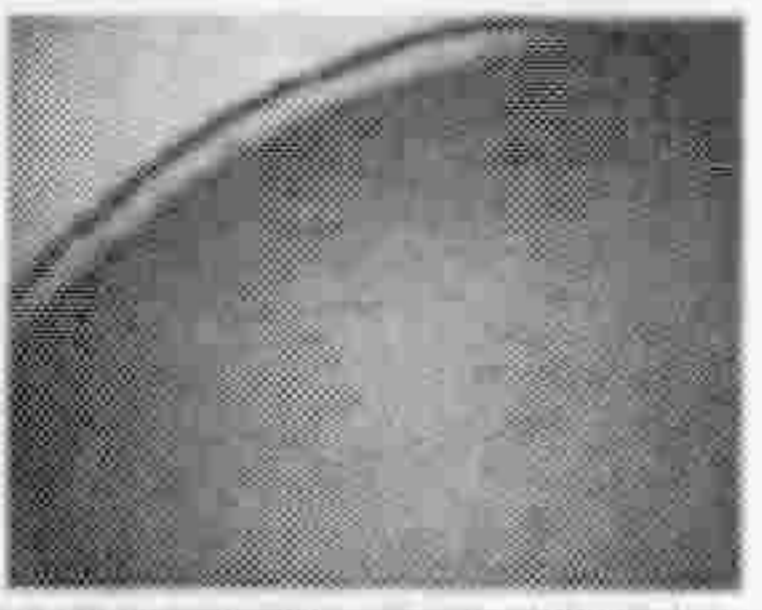

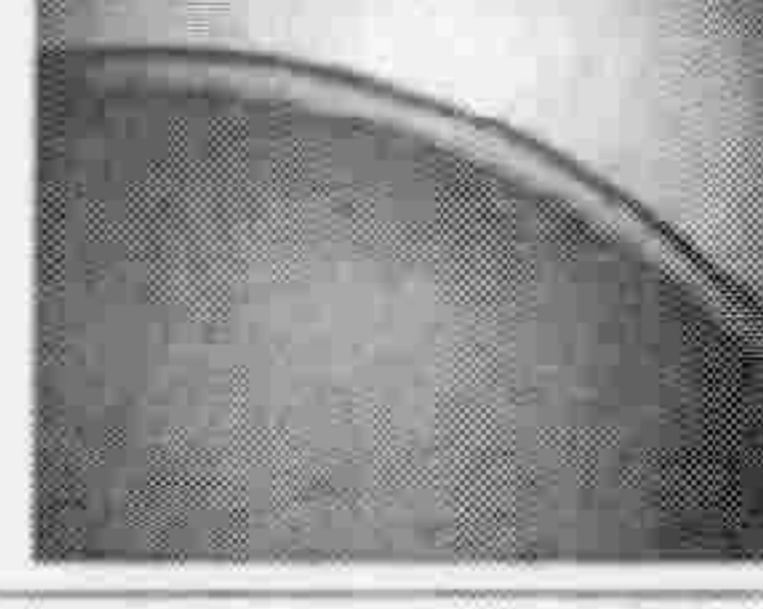

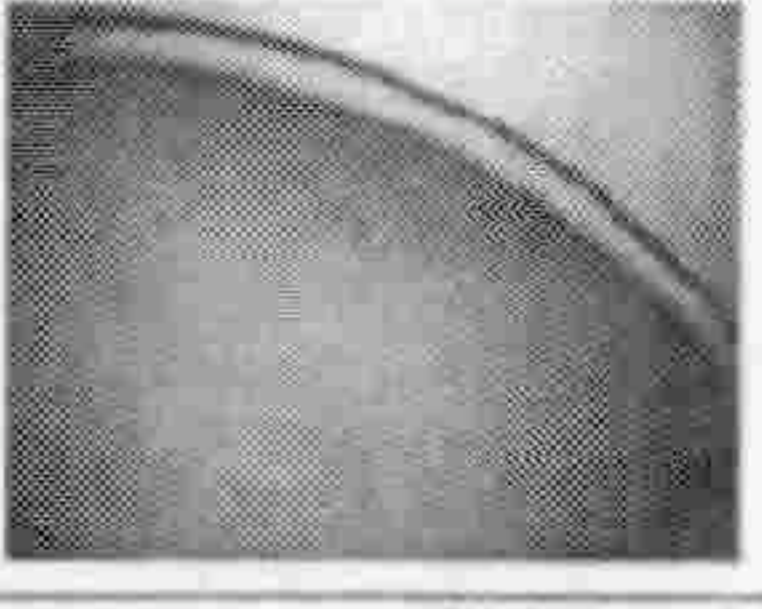


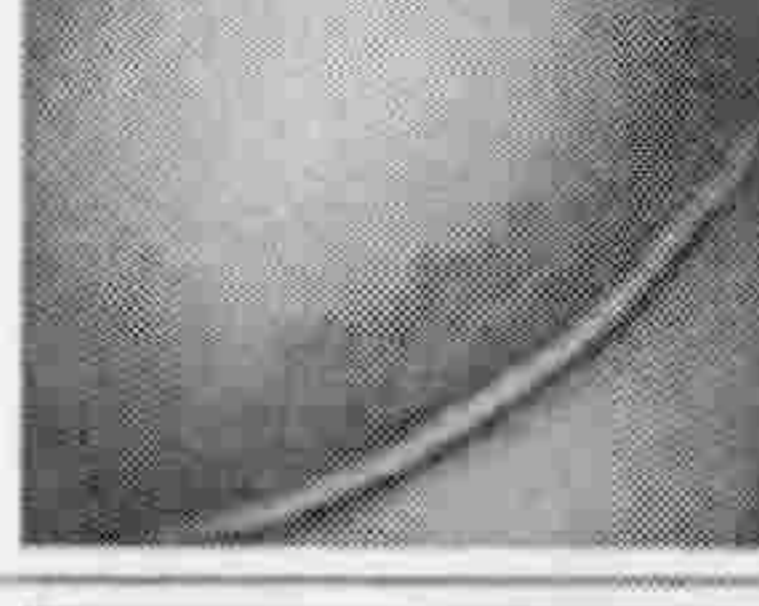






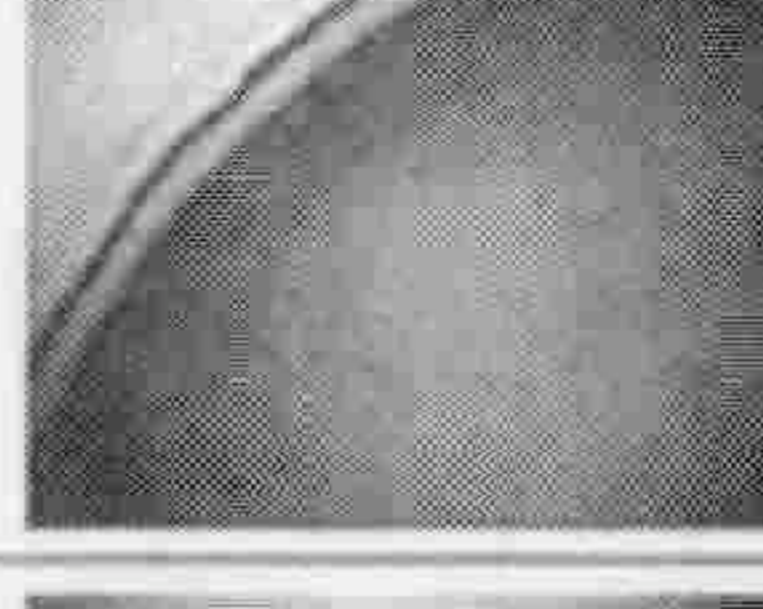



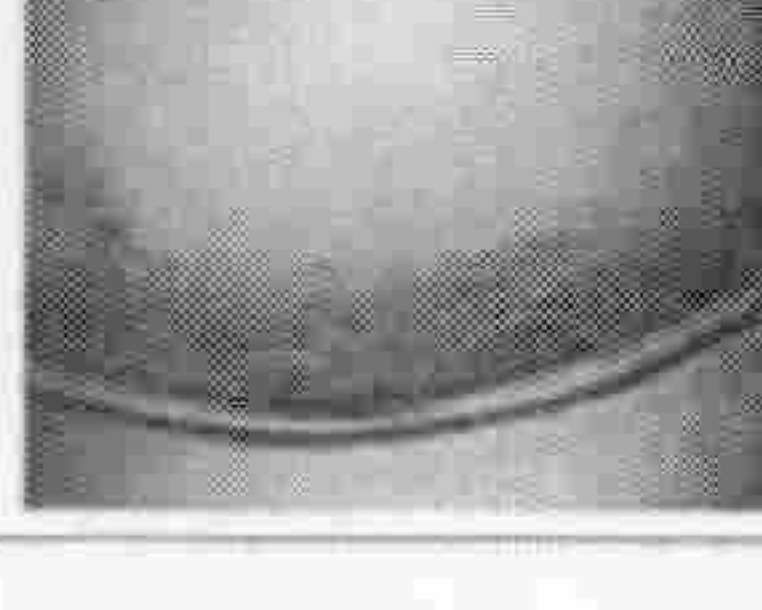


【第36圖】



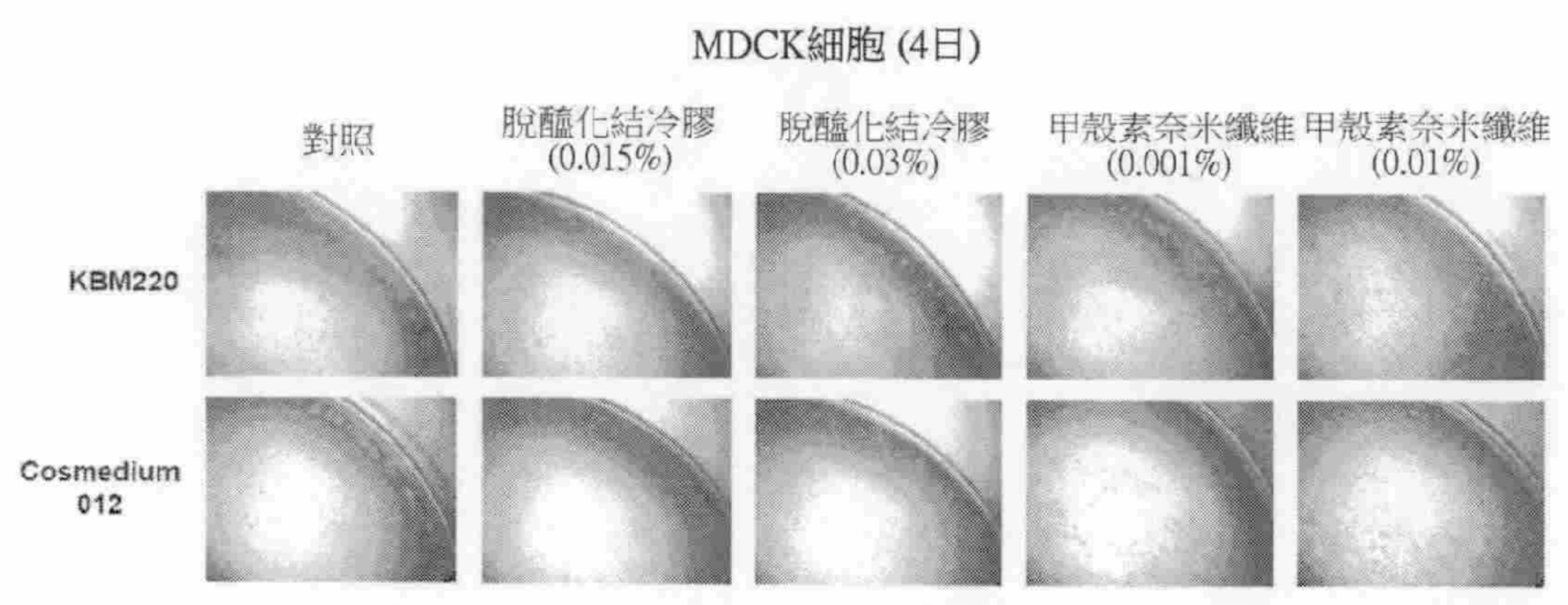
【第37圖】

陰性對照 (0 w/v%)				
濃度	0.01 w/v%	0.03 w/v%	0.06 w/v%	0.1 w/v%
實施例 1' MC				
實施例 2' PC				
實施例 3' CT				
實施例 4' DAG				
實施例 5' Car				
比較例 3' Xan				
比較例 4' DU				
比較例 5' Alg				

【第38圖】

陰性對照 (0 w/v%)				
濃度	0.01 w/v%	0.03 w/v%	0.06 w/v%	0.1 w/v%
實施例 1' MC				
實施例 2' PC				
實施例 3' CT				
實施例 4' DAG				
實施例 5' Car				
比較例 3' Xan				
比較例 4' DU				
比較例 5' Alg				

【第39圖】



【第40圖】