



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110475856 A

(43)申请公布日 2019. 11. 19

(21)申请号 201880023523.4

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22)申请日 2018.03.30

代理人 杨宏军 唐峥

(30)优先权数据

2017-068377 2017.03.30 JP

2017-174237 2017.09.11 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/013977 2018.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/182016 JA 2018.10.04

(71)申请人 日产化学株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 金木达朗 木田克彦 林寿人

南昌孝

(51)Int.Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

C12N 5/077(2010.01)

C12N 5/02(2006.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/38(2006.01)

A61L 27/40(2006.01)

A61L 27/58(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

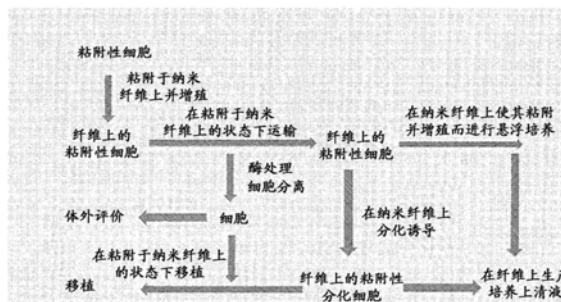
权利要求书1页 说明书32页 附图6页

(54)发明名称

使用纳米纤维的细胞培养

(57)摘要

本发明提供:细胞的载体,其包含由非水溶性多糖类形成的纳米纤维、优选甲壳质纳米纤维或壳聚糖纳米纤维,且能成为粘附性细胞的i)悬浮培养、ii)分化诱导、iii)非冷冻条件下的运输、保存、iv)移植、v)生理活性物质从培养上清液的回收等各种操作中的共通的载体;粘附性细胞的选自i)悬浮培养、ii)分化诱导、iii)非冷冻条件下的运输、保存、iv)移植、v)生理活性物质从培养上清液的回收中的多种操作的连续性实施,其中使用了上述载体。



1. 载体,其包含由非水溶性多糖类形成的纳米纤维,其用于将粘附性细胞连续性地供于选自由以下(1)~(3)组成的组中的2种以上处理:

- (1) 悬浮培养;
- (2) 非冷冻状态下的保存及/或运输;以及
- (3) 移植。

2. 如权利要求1所述的载体,其中,悬浮培养用于粘附性细胞的维持或增殖、粘附性细胞的分化诱导、及/或利用粘附性细胞的体液因子生产。

3. 如权利要求1或2所述的载体,其用于将粘附性细胞连续性地供于(1)~(3)的处理。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的载体,其中,粘附性细胞为干细胞或祖细胞。

5. 如权利要求1~3中任一项所述的载体,其中,粘附性细胞为间充质干细胞或前体脂肪细胞。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的载体,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖。

7. 粘附性细胞的处理方法,其包括下述步骤:将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下连续性地供于选自由以下(1)~(3)组成的组中的2种以上处理:

- (1) 悬浮培养;
- (2) 非冷冻状态下的保存及/或运输;以及
- (3) 移植。

8. 如权利要求7所述的方法,其中,悬浮培养用于粘附性细胞的维持或增殖、粘附性细胞的分化诱导、及/或利用粘附性细胞的体液因子生产。

9. 如权利要求7或8所述的方法,其中,将粘附性细胞连续性地供于(1)~(3)的处理。

10. 如权利要求7~9中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞或祖细胞。

11. 如权利要求7~9中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为间充质干细胞或前体脂肪细胞。

12. 如权利要求7~11中任一项所述的方法,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖。

13. 如权利要求7~12中任一项所述的方法,其还包括下述步骤:将附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞用所述非水溶性多糖类的分解酶进行处理,由此分解所述纳米纤维,将所述粘附性细胞从所述纳米纤维剥离,回收所述粘附性细胞。

14. 从附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞回收所述粘附性细胞的方法,其包括下述步骤:将附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞用所述非水溶性多糖类的分解酶进行处理,由此分解所述纳米纤维,将所述粘附性细胞从所述纳米纤维剥离。

15. 如权利要求14所述的方法,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖。

16. 如权利要求15所述的方法,其中,分解酶为甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶或 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。

## 使用纳米纤维的细胞培养

### 技术领域

[0001] 本发明涉及由非水溶性多糖类形成的纳米纤维在细胞的培养、保存、运输或移植中作为载体的用途。

### 背景技术

[0002] 近年来,在再生医疗的领域中,广泛进行了培养iPS细胞、ES细胞等多能干细胞并诱导其向目标器官细胞样的分化、移植所得细胞的研究。然而,ES细胞的建立存在伦理性问题,iPS细胞中癌化的风险成为课题。另外,关于从iPS细胞向构成目标器官的细胞的分化,报道了存在最终的分化诱导度低的情况、需要长期培养以得到高度分化的细胞的情况,凸显出成本方面的课题。鉴于如上所述的课题,癌化风险低的间充质干细胞、神经干细胞等成体干细胞、能缩短分化诱导时间的前体脂肪细胞、前体心肌细胞等祖细胞再次受到瞩目。特别地,具有容易分化为脂肪、软骨等的性质的间充质干细胞、前体脂肪细胞还具有容易获得的优点,因此被用于各种研究。

[0003] 此外,除了成体干细胞、祖细胞以外,使用从组织直接分取的原代培养细胞的需求也高。例如,通过将人肝脏制备的原代肝细胞在分取后接种于细胞用板进行运输、或作为冷冻细胞进行贮存、或者使用该细胞实施试验,从而大大有助于医药品的药物代谢研究。另外,将从癌患者分离的癌组织利用酶处理消化而制备的原代癌细胞也不仅用于癌研究,还用于抗癌剂敏感性试验等,存在较大的需求。

[0004] 间充质干细胞中,除了从骨髓分离的间充质干细胞以外,还包括来源于牙髓的间充质干细胞、来源于在脂肪抽吸时与脂肪细胞一同被分离的脂肪组织的间充质干细胞等。这些间充质干细胞能够通过培养皿中进行单层培养而容易地增殖,并能够使其进一步分化为脂肪、软骨、骨。另外,最近还确认到这些间充质干细胞能分化为构成肝脏、胰脏等的细胞。另外,除了从间充质干细胞分化而成的细胞的移植以外,也开始研究间充质干细胞自身的移植。此外,最近,着眼于该间充质干细胞自身分泌至细胞外的细胞因子、外泌体等,对使间充质干细胞粘附于微载体来进行培养、分离被分泌至培养上清液中的生理活性物质而应用于医药品、化妆品等的尝试也进行了研究。

[0005] 前体脂肪细胞是在抽吸脂肪时混杂于脂肪细胞中而被分离的细胞,与前述的来源于脂肪组织的间充质干细胞同样地,能够容易地从生物体大量分取。前体脂肪细胞也具有不仅能分化为脂肪细胞、还能分化为软骨细胞等的性质,不仅研究了向脂肪细胞移植的应用,还研究了向关节部的软骨移植等的应用。另外,报道了在脂肪细胞的培养上清液中包含对皮肤具有保护效果的成分,对从该培养上清液中分离的生理活性物质在医药品、化妆品等中的用途等也进行了研究。另外,脂肪细胞自身由于增殖能力低而不易癌化,并且具有能移植至皮下等容易移植的部位的优点,因此,通过将导入正常基因而得到的脂肪细胞移植至基因突变患者的皮下,能够治疗由该基因突变所导致的疾病。

[0006] 在如上所述的情况下,在研究间充质干细胞、前体脂肪细胞、将该细胞应用至移植治疗、从该细胞的培养上清液分离生理活性物质等时,在各步骤中存在各种课题。目前,通

常是将间充质干细胞、前体脂肪细胞等从单一个体大量制备后进行冷冻,将经冷冻保存的细胞供于各种用途。然而,对于未来可期的细胞库系统(其运作自体移植体制,管理并保管许多异体细胞的库存)而言,利用以细胞的冷冻为前提的现有运输技术时,难以大量且稳定地供给适于移植的状态的细胞。即,在移植时,需要在将经冷冻保存的细胞融化、培养并根据需要使其分化为目标细胞的基础上,大量提供良好状态的细胞,但在必须将细胞以冷冻的状态运输的情况下,移植实施设施不得不从保存·管理细胞的细胞库订购冷冻细胞,于该设施内自行大量培养。因此,移植实施设施必须具备细胞的大量培养设备(例如,细胞处理中心(CPC)),在不具有该设备的设施中,难以实施移植医疗。另一方面,细胞库通常具有大量培养细胞的技术、设备,因此,如果在细胞库侧能够在大量制备适于移植的良好状态的细胞的基础上、将得到的细胞在维持为良好状态的情况下迅速供给至移植实施设施,则即使是不具有细胞的大量培养设备的设施,也能够实施移植医疗。为了解决该课题,不进行冷冻而将大量的细胞在维持为良好状态的情况下运输的技术是不可或缺的。

[0007] 对将间充质干细胞等在粘附于微载体的状态下培养而使其增殖、移植所得细胞、或回收释放至培养上清液中的生理活性物质的技术进行了研究。然而,目前通常能获得的微载体在静置条件下会在培养液中沉降,因此,培养时需要进行搅拌。已指出了由于该搅拌时载体之间的碰撞等引起细胞死亡的课题。此外,从微载体回收细胞时,需要利用胰蛋白酶等蛋白水解酶来解除细胞之间、细胞与基材的粘附,但由该蛋白水解酶导致的细胞的损伤、存活降低也成为课题。另外,通常能获得的微载体不是生物降解性的,因此,为了将培养的细胞用于移植,需要从微载体剥离并回收细胞,还需根据需要而将细胞保持于不同的生物降解性的载体。这些细胞处理是繁杂的,并且成本高。

[0008] 本申请的发明人使用提高了在水中的分散性的多糖类等的纳米纤维,开发了用于在悬浮状态下培养动植物细胞及/或组织的培养基组合物(专利文献1)。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:W0 2015/111686 A1

## 发明内容

[0012] 发明所要解决的课题

[0013] 本发明的课题在于提供于非冷冻条件下将间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞在维持良好状态的同时进行大量运输的技术。另外,本发明的课题在于提供能够解决使用以往的微载体悬浮培养粘附细胞时的各种课题(由搅拌时的微载体的碰撞导致的细胞死亡、由传代时的蛋白水解酶处理导致的细胞损伤、将微载体上的细胞供于移植时需要的繁杂的细胞处理等)的新型载体。

[0014] 用于解决课题的手段

[0015] 本申请的发明人为了解决上述课题而反复进行了深入研究,结果发现,通过使用由甲壳质(chitin)等多糖类形成的纳米纤维作为载体,能够一次性解决上述的各种课题,所述纳米纤维在培养基中为不溶性,在培养基中悬浮,具有使细胞粘附的活性,为生物降解性,且能够不需要蛋白水解酶而进行酶消化。通过将由多糖类形成的纳米纤维混合至液体培养基中,将间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞在粘附于该纳米纤维的状态下进

行培养,从而能够在静置状态下悬浮培养该细胞。在悬浮培养条件下,粘附于纳米纤维的细胞显示了长期的存活性。间充质干细胞、前体脂肪细胞在维持了其性状的同时在纳米纤维上良好地增殖。还发现在分化诱导培养基中培养时,粘附于纳米纤维上的前体脂肪细胞分化为脂肪细胞,因此在纳米纤维上的细胞的分化诱导是可能的。通过使用构成纳米纤维的多糖类(例如甲壳质)的分解酶进行处理,能够不使用蛋白水解酶、在将对细胞的损伤抑制为最小限度的同时回收粘附于纳米纤维上的细胞。由多糖类形成的纳米纤维是生物降解性的,因此,能够将粘附于纳米纤维的细胞保持粘附状态而与纳米纤维一同形成容易移植的片状。粘附于纳米纤维的细胞可通过离心操作等容易地沉降,因此,能够从粘附于纳米纤维的细胞的培养物中容易地回收培养上清液。即,发现了由多糖类形成的纳米纤维可用作用于间充质干细胞、前体脂肪细胞、原代细胞等中需求的在非冷冻条件下的细胞运输、培养、分化诱导、移植及生理活性物质生产的载体,通过使用该载体,能够连续性地实施选自由细胞培养、分化诱导、细胞运输、移植及生理活性物质生产组成的组中的多种操作。

[0016] 本申请的发明人基于上述见解进一步进行研究,从而完成了本发明。

[0017] 即,本发明如下所述。

[0018] [1]载体,其包含由非水溶性多糖类形成的纳米纤维,其用于将粘附性细胞连续性地供于选自由以下(1)~(3)组成的组中的2种以上处理:

[0019] (1) 悬浮培养;

[0020] (2) 非冷冻状态下的保存及/或运输;以及

[0021] (3) 移植。

[0022] [2]如[1]所述的载体,其中,悬浮培养用于粘附性细胞的维持或增殖、粘附性细胞的分化诱导、及/或利用粘附性细胞的体液因子生产。

[0023] [3]如[1]或[2]所述的载体,其用于将粘附性细胞连续性地供于(1)~(3)的处理。

[0024] [4]如[1]~[3]中任一项所述的载体,其中,粘附性细胞为干细胞或祖细胞。

[0025] [5]如[1]~[3]中任一项所述的载体,其中,粘附性细胞为间充质干细胞或前体脂肪细胞。

[0026] [6]如[1]~[5]中任一项所述的载体,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖(chitosan)。

[0027] [7]粘附性细胞的处理方法,其包括下述步骤:将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下连续性地供于选自由以下(1)~(3)组成的组中的2种以上处理:

[0028] (1) 悬浮培养;

[0029] (2) 非冷冻状态下的保存及/或运输;以及

[0030] (3) 移植。

[0031] [8]如[7]所述的方法,其中,悬浮培养用于粘附性细胞的维持或增殖、粘附性细胞的分化诱导、及/或利用粘附性细胞的体液因子生产。

[0032] [9]如[7]或[8]所述的方法,其中,将粘附性细胞连续性地供于(1)~(3)的处理。

[0033] [10]如[7]~[9]中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为干细胞或祖细胞。

[0034] [11]如[7]~[9]中任一项所述的方法,其中,粘附性细胞为间充质干细胞或前体脂肪细胞。

[0035] [12]如[7]~[11]中任一项所述的方法,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖。

[0036] [13]如[7]~[12]中任一项所述的方法,其还包括下述步骤:将附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞用所述非水溶性多糖类的分解酶进行处理,由此分解所述纳米纤维,将所述粘附性细胞从所述纳米纤维剥离,回收所述粘附性细胞。

[0037] [14]从附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞回收所述粘附性细胞的方法,其包括下述步骤:将附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞用所述非水溶性多糖类的分解酶进行处理,由此分解所述纳米纤维,将所述粘附性细胞从所述纳米纤维剥离。

[0038] [15]如[14]所述的方法,其中,非水溶性多糖类为甲壳质或壳聚糖。

[0039] [16]如[15]所述的方法,其中,分解酶为甲壳质酶、壳二糖酶(chitobiase)、壳聚糖酶或 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。

[0040] 发明效果

[0041] 根据本发明,通过将间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞在粘附于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行培养,能够无需存在引起细胞损伤、功能丧失的风险的振荡、旋转等操作而在静置状态下悬浮培养。由于能够进行粘附性细胞的悬浮培养(三维(3D)培养),因此,较之单层培养(二维(2D)培养)而言,能够以少量的培养基来培养大量的细胞。

[0042] 在使用本发明的培养基组合物的培养中,可进行间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞的维持性培养,也可在维持其性状的情况下使其增殖。或者,也可以通过在特定的分化条件下进行培养,从而使间充质干细胞、前体脂肪细胞等未分化的细胞向特定的细胞分化。

[0043] 另外,在使用本发明的培养基组合物的培养中,由于细胞在粘附于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养,因此,能够通过离心操作等容易地除去粘附于纳米纤维的细胞,回收培养上清液。另外,如上所述,较之单层培养而言,悬浮培养中,能够以少量的培养基来培养大量的细胞,因此能够使细胞所释放的有用的生理活性物质以高浓度蓄积于培养上清液中。因此,本发明的培养基组合物可用于对间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞释放至培养液中的有用的生理活性物质进行回收、纯化。

[0044] 另外,在使用本发明的培养基组合物的培养中,通过使用构成纳米纤维的非水溶性多糖类(例如甲壳质)的分解酶(例如甲壳质酶)进行处理,能够在不使用动物来源的蛋白水解酶的情况下回收粘附于纳米纤维上的细胞。因此,本发明中,能够在将由蛋白水解酶导致的对细胞的损伤、由动物成分的夹杂导致的感染风险等抑制为最小限度的同时,进行间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞的传代操作,或从纳米纤维剥离、回收附着于纳米纤维的细胞。

[0045] 间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞在粘附于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下显示出长期、良好的存活性。因此,本发明的培养基组合物可用于将上述的粘附性细胞在非冷冻条件下保存、运输。例如,在板上粘附培养细胞、将其保持原状运输的情况下,存在细胞由于运输中的振动而从板剥离等、细胞所具有的原本的功能降低的情况,但对于本发明的培养基组合物而言,由于粘附于纳米纤维的细胞能够保持为悬浮的状态,

因此,能够避免由运输中的振动导致的从板剥离等所造成的细胞损伤,以维持了细胞原本的功能的状态在非冷冻条件下保存及运输细胞。另外,较之在单层培养的状态下保存、运输的情况而言,能够以少量的培养基及空间来保存、运输大量的细胞。

[0046] 由非水溶性多糖类形成的纳米纤维是生物降解性的,因此,能够将粘附于纳米纤维的细胞保持粘附状态而与纳米纤维一同向生物体内移植。因此,将间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞在本发明的培养基组合中进行培养而使其分化至所期望的分化阶段后,能够将所得细胞在不从纳米纤维剥离的情况下与纳米纤维一同向生物体内移植。因此,能够避免由细胞剥离操作导致的细胞损伤、功能丧失的风险,将良好状态的细胞供于移植。

[0047] 如上所述,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维可作为间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞的i)培养、ii)分化诱导、iii)非冷冻条件下的运输、保存、iv)移植、v)生理活性物质从培养上清液的回收等各种操作中的共通的载体使用,因此,通过使用该载体,从而能够连续性地实施选自上述的i)培养、ii)分化诱导、iii)非冷冻条件下的运输、保存、iv)移植、v)生理活性物质从培养上清液的回收中的多种操作(图1)。

#### 附图说明

[0048] [图1]为表示使用由非水溶性多糖类形成的纳米纤维作为共通的载体,对粘附性细胞连续性地进行的i)培养、ii)分化诱导、iii)非冷冻条件下的运输、保存、iv)移植、v)生理活性物质从培养上清液的回收等多种操作的一个方式的示意图。

[0049] [图2]为通过Yatalase处理而分散为单细胞的人前体脂肪细胞的照片。

[0050] [图3]示出了在甲壳质纳米纤维上于37℃或25℃维持了7天的人前体脂肪细胞的迁移能力及增殖能力。

[0051] [图4]示出了从在甲壳质纳米纤维上于37℃或25℃维持了7天的人前体脂肪细胞分化的脂肪细胞。

[0052] [图5]示出了在甲壳质纳米纤维上于37℃或25℃维持了7天的来源于人脂肪的间充质干细胞的迁移能力及增殖能力。

[0053] [图6]示出了从在甲壳质纳米纤维上于37℃或25℃维持了7天的来源于人脂肪的间充质干细胞分化的脂肪细胞。

[0054] [图7]示出了使用甲壳质纳米纤维的细胞运输法的概念图。

[0055] [图8]示出了在甲壳质纳米纤维上于37℃培养10天而制成的人前体脂肪细胞片的状态。

#### 具体实施方式

[0056] 本发明提供由非水溶性多糖类形成的纳米纤维在粘附性细胞的各种培养方法论中作为载体的用途。可对粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行(1)悬浮培养、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、(3)移植等各种处理。因此,本发明也涵盖粘附性细胞的处理方法,所述处理方法包括将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下供于(1)悬浮培养、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、(3)移植等处理。

[0057] [粘附性细胞]

[0058] 所谓细胞,是构成动物或者植物的最基本的单元,其在细胞膜的内部具有细胞质和各种细胞器作为其要素。此时,包封DNA的核可以包含在细胞内部、也可以不包含在细胞内部。

[0059] 作为动物,没有限定,可举出例如鱼类、两栖动物类、爬行动物类、鸟类、泛甲壳动物类、六足类(Hexapoda)、哺乳类等,优选为哺乳类。作为哺乳类的例子,没有限定,可举出大鼠、小鼠、兔、豚鼠、松鼠、仓鼠、田鼠、鸭嘴兽、海豚、鲸、犬、猫、山羊、牛、马、绵羊、猪、大象、普通狨、松鼠猴、猕猴、黑猩猩、人等。作为植物,只要所采集的细胞可进行液体培养即可,没有特别限定。可举出例如生产生药类(例如皂角苷、生物碱类、小檗碱、东莨菪苷、植物甾醇等)的植物(例如药用人参、长春花、莨菪、黄连、颠茄等);生产用作化妆品·食品原料的色素、多糖体(例如花青色素、红花色素、茜草色素、藏红花色素、黄酮类等)的植物(例如蓝莓、红花、茜草、藏红花等);或产生医药品原材料的植物等,但不限于此。本发明中优选使用哺乳类的细胞。

[0060] 本发明的一实施方式中,使用粘附性细胞。所谓粘附性细胞,是指存活、增殖需要容器壁等支承物的细胞。本发明中,通过使粘附性细胞附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维,可达成该细胞的良好悬浮培养、非冷冻状态下的保存及/或运输、移植等处理。

[0061] 本发明中,作为使用的粘附性细胞,没有特别限定,可举出例如干细胞、祖细胞、成体非干细胞、原代培养细胞、细胞株、癌细胞等。所谓干细胞,是兼具自体自身复制能力和分化为其他多个系统的细胞的能力的细胞。作为粘附性的干细胞的例子,不限于以下,可举出例如间充质干细胞、神经干细胞、造血干细胞、肝干细胞、胰脏干细胞、肌干细胞、生殖干细胞、肠干细胞、癌症干细胞、毛囊干细胞等成体干细胞等。所谓间充质干细胞,是指具有向骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞中的全部或几种分化的能力的干细胞。间充质干细胞在骨髓、末梢血、脐带血、脂肪组织等组织中以低频率存在,可使用已知的方法从这些组织中分离。所谓祖细胞,是指处于从上述干细胞分化为特定的体细胞、生殖细胞的中途阶段的细胞。作为粘附性的祖细胞的例子,不限于以下,可举出例如前体脂肪细胞、前体心肌细胞、前体内皮细胞、神经祖细胞、肝祖细胞、胰脏祖细胞、肾脏祖细胞等。作为粘附性的成体非干细胞的例子,不限于以下,包括例如成纤维细胞、骨细胞、骨周细胞、角质形成细胞、脂肪细胞、间质细胞、上皮细胞、表皮细胞、内皮细胞、血管内皮细胞、肝实质细胞、软骨细胞、卵丘细胞、神经系统细胞、神经胶质细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞、心脏细胞、食道细胞、肌肉细胞(例如平滑肌细胞或骨骼肌细胞)、胰脏 $\beta$ 细胞、黑色素细胞等。所谓原代培养细胞,是指处于将从生物体分离的细胞、组织接种、到进行第一次传代之前的培养的状态的细胞。原代培养细胞可以从例如皮肤、肾脏、脾脏、肾上腺、肝脏、肺、卵巢、胰脏、子宫、胃、结肠、小肠、大肠、脾脏、膀胱、前列腺、精巢、胸腺、肌肉、结缔组织、骨、软骨、血管组织、血液、心脏、眼、脑或神经组织等任意的组织采集的细胞。所谓细胞株,是指通过在生物体外的人工操作而获得了无限的增殖能力的细胞。本发明中使用的粘附性细胞优选为干细胞或祖细胞,更优选为间充质干细胞或前体脂肪细胞。

[0062] [纳米纤维]

[0063] 本发明中使用的纳米纤维显示出在液体培养基中分散、使附着于纳米纤维的细胞(优选为粘附性细胞)悬浮于该液体培养基中的效果。

[0064] 本说明书中,所谓纳米纤维,是指平均纤维直径(D)为0.001至1.00 $\mu\text{m}$ 的纤维。本发明中使用的纳米纤维的平均纤维直径优选为0.005至0.50 $\mu\text{m}$ ,更优选为0.01至0.05 $\mu\text{m}$ ,进一步优选为0.01至0.02 $\mu\text{m}$ 。

[0065] 本发明中使用的纳米纤维的纵横比(L/D)是通过平均纤维长度/平均纤维直径得到的,没有特别限定,通常为2~500,优选为5~300,更优选为10~250。

[0066] 本说明书中,纳米纤维的平均纤维直径(D)可如下求出。首先使用日本电子(株)制离子清洗机(JIC-410)对应研商事(株)制火棉胶支承膜施以3分钟亲水化处理,滴落数滴作为评价对象的纳米纤维分散液(用超纯水稀释),于室温干燥。使用(株)天立制作所制透射电子显微镜(TEM,H-8000)(10,000倍)以加速电压200kV对其进行观察,使用得到的图像针对标本数:200~250根的纳米纤维一根一根地测量纤维直径,将其算术平均值作为平均纤维直径(D)。

[0067] 另外,平均纤维长度(L)可如下求出。将作为评价对象的纳米纤维分散液利用纯水以成为100ppm的方式稀释,使用超声波清洗机使纳米纤维均匀地分散。将该纳米纤维分散液流延至预先使用浓硫酸对表面进行亲水化处理而得到的硅晶片上,使其于110 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1小时,制成试样。使用日本电子(株)制扫描电子显微镜(SEM,JSM-7400F)(2,000倍)对得到的试样进行观察,使用得到的图像针对标本数:150~250根的纳米纤维一根一根地测量纤维长度,将其算术平均值作为平均纤维长度(L)。

[0068] 优选方式中,本发明中使用的纳米纤维具有下述效果:在与液体培养基混合时,该纳米纤维在保持一次纤维直径的同时均匀地分散于该液体中,不会实质性地提高该液体的粘度,实质性地保持附着于纳米纤维的细胞,防止其沉降。所谓不会实质性地提高液体的粘度,表示液体的粘度不超过8mPa $\cdot$ s。此时的该液体的粘度(即,下述的本发明的培养基组合物的粘度)为8mPa $\cdot$ s以下,优选为4mPa $\cdot$ s以下,更优选为2mPa $\cdot$ s以下。包含纳米纤维的液体的粘度可例如在25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用音叉振动式粘度测定(SV-1A,A&D Company Ltd.)进行评价。

[0069] 本发明中使用的纳米纤维是由非水溶性多糖类构成的。所谓糖类,表示单糖类(例如三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖、七碳糖等)以10个以上聚合而成的糖聚合物。

[0070] 作为非水溶性多糖类,可举出纤维素、半纤维素等纤维素类;甲壳质、壳聚糖等甲壳质类物质等,但不限于这些。非水溶性多糖类优选为甲壳质或壳聚糖,更优选为甲壳质。

[0071] 所谓纤维素,是指葡萄糖的6元环即D-吡喃葡萄糖以 $\beta$ -1,4糖苷键键合而成的天然高分子化合物。作为原料,可使用例如来源于木材、竹、麻、黄麻、大麻槿、棉、农作物·食物残渣等植物的纤维素、或细菌纤维素、刚毛藻属(Cladophora)、灰色植物(灰胞藻属)、法囊藻属、海鞘纤维素等微生物产生或动物产生的纤维素。对于来源于植物的纤维素而言,被称为微纤丝的非常细的纤维进一步成束而阶段性地形成原纤、薄层(lamellar)、纤维细胞这样的高级结构。另外,对于细菌纤维素而言,作为从菌细胞分泌的纤维素的微纤丝以其原本的粗细度形成微细的网状结构。

[0072] 本发明中,棉、细菌纤维素等高纯度的纤维素原料可直接作为原料使用,来源于除此以外的植物的纤维素等优选使用经过分离·纯化的纤维素。本发明中优选使用的纤维素为棉纤维素、细菌纤维素、牛皮纸浆纤维素、微晶纤维素等。

[0073] 所谓甲壳质类物质,是指选自由甲壳质及壳聚糖组成的组中的1种以上糖类。构成

甲壳质及壳聚糖的主要的糖单元分别为N-乙酰氨基葡萄糖及氨基葡萄糖,一般而言,N-乙酰氨基葡萄糖的含量多、对于酸性水溶液为难溶性的甲壳质类物质为甲壳质,氨基葡萄糖的含量多、对于酸性水溶液为可溶性的甲壳质类物质为壳聚糖。本说明书中,出于方便起见,将N-乙酰氨基葡萄糖在构成糖中所占的比例为50%以上的称为甲壳质,将小于50%的称为壳聚糖。从达成高悬浮作用的观点考虑,N-乙酰氨基葡萄糖在构成甲壳质的糖单元中所占比例越高则越理想。N-乙酰氨基葡萄糖在构成甲壳质的糖单元中所占比例优选为80%以上,更优选为90%以上,进一步优选为98%以上,最优选为100%。

[0074] 作为甲壳质的原料,可使用例如虾、蟹、昆虫、贝、蘑菇等多种生物资源。本发明中使用的甲壳质可以是来源于蟹壳、虾壳的甲壳质等具有 $\alpha$ 型晶体结构的甲壳质,也可以是来源于海螵蛸(cuttlebone)的甲壳质等具有 $\beta$ 型晶体结构的甲壳质。蟹、虾的外壳被作为产业废弃物处理的情况较多,从容易获得且有效利用的观点考虑,其作为原料是优选的,但为了除去作为杂质包含的蛋白质、灰分等而需要脱蛋白工序及脱灰工序。因此,本发明中,优选使用已经施以脱基质处理的纯化甲壳质。纯化甲壳质已有贩售。

[0075] 通过粉碎上述的含有非水溶性多糖类的原料,能够得到由该非水溶性多糖类构成的纳米纤维。粉碎方法没有限定,为了微细化至实现符合本发明目的的后述的纤维直径·纤维长度,优选高压均化器、磨床(石臼)、或者珠磨机等介质搅拌磨等能够得到强剪切力的方法。

[0076] 其中,优选使用高压均化器进行微细化,期望使用例如日本特开2005-270891号公报、日本专利第5232976号中公开的那样的湿式粉碎法进行微细化(粉碎化)。具体而言,可使用通过将原料分散而成的分散液从一对喷嘴以高压分别喷射并使其碰撞来将原料粉碎的装置、例如Starburst System(Sugino Machine Limited制的高压粉碎装置)、NanoVater(吉田机械兴业(株)的高压粉碎装置)来实施。

[0077] 使用前述的高压均化器将原料微细化(粉碎化)时,微细化、均质化的程度取决于向高压均化器的超高压腔室压送的压力、通过超高压腔室的次数(处理次数)、及水分散液中的原料的浓度。压送压力(处理压力)没有特别限定,通常为50~250MPa,优选为150~245MPa。

[0078] 另外,微细化处理时的水分散液中的原料的浓度没有特别限定,通常为0.1质量%~30质量%,优选为1质量%~10质量%。微细化(粉碎化)的处理次数没有特别限定,取决于前述水分散液中的原料的浓度,原料的浓度为0.1~1质量%时,处理次数为10~100次左右可充分地进行微细化,但为1~10质量%时,存在处理次数需要为10~1000次左右的情况。

[0079] 前述微细化处理时的水分散液的粘度没有特别限定,例如,非水溶性多糖类为 $\alpha$ 甲壳质的情况下,该水分散液的粘度的范围为1~100mPa·S,优选为1~85mPa·S(利用25℃条件下的音叉振动式粘度测定(SV-1A、A&D Company Ltd.))。另外,微细化处理时的水分散液中的非水溶性多糖类的粒径也没有特别限定,例如,非水溶性多糖类为 $\alpha$ 甲壳质的情况下,该水分散液中的 $\alpha$ 甲壳质的平均粒径的范围为0.5~200 $\mu$ m,优选为30~150 $\mu$ m(利用激光衍射/散射式粒径分布测定装置LA-960(堀场制作所))。

[0080] 关于纳米纤维的制备方法,记载于W0 2015/111686A1等。

[0081] [包含纳米纤维的培养基组合物]

[0082] 本发明中,在以粘附性细胞附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态将该细胞供于悬浮培养、或者非冷冻状态下的保存及/或运输的情况下,可使用包含该纳米纤维的液状的培养基组合物(本说明书中也称为本发明的培养基组合物)。

[0083] 优选方式中,在本发明的培养基组合物中,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维均匀地分散,使附着于纳米纤维的粘附性细胞悬浮于该液体培养基中。

[0084] 本发明中,所谓细胞的悬浮,是指细胞未粘附于培养容器的状态(非粘附)。此外,本发明中,将下述状态称为“悬浮静置”:对细胞进行培养、保存、或运输时,在不伴有针对液体培养基组合物的来自外部的压力、振动或者该组合物中的振荡、旋转操作等的情况下,细胞在该液体培养基组合物中均匀地分散且处于悬浮状态;将在该状态下培养细胞及/或组织的情况称为“悬浮静置培养”。作为在“悬浮静置”中能够悬浮的时间,为至少5分钟以上,优选为1小时以上、24小时以上、48小时以上、6天以上、21天以上,但只要保持悬浮状态则不限于这些时间。

[0085] 优选方式中,本发明的培养基组合物可于能够培养、保存或运输细胞的温度范围(例如,0~40℃)中的至少1点实现细胞的悬浮静置。本发明的培养基组合物优选于25~37℃的温度范围中的至少1点、最优选于37℃实现细胞的悬浮静置。

[0086] 能否悬浮静置可通过例如下述方法来评价:使聚苯乙烯珠(大小:500~600 $\mu\text{m}$ , Polysciences Inc.制)均匀地分散于作为评价对象的培养基组合物中,于25℃静置至少5分钟以上(优选24小时以上、48小时以上),观察是否维持该细胞的悬浮状态。

[0087] 本发明的培养基组合物中的由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的浓度可进行适当设定,从而使用该培养基组合物将粘附性细胞供于悬浮培养、非冷冻状态下的保存或运输时,能够提高该粘附性细胞的存活性,或者,能够使该粘附性细胞悬浮(优选使其悬浮静置)。例如,甲壳质纳米纤维的情况下,培养基组合物中的甲壳质纳米纤维浓度为例如0.0001%(重量/容量)以上,优选为0.001%(重量/容量)以上。培养基组合物中的甲壳质纳米纤维浓度的上限值为例如1.0%(重量/容量)以下,优选为0.1%(重量/容量)以下。

[0088] 本发明的培养基组合物中所含的培养基可根据使用的粘附性细胞的种类等而适当选择,例如,以哺乳类的粘附性细胞的培养、保存或运输为目标的情况下,可使用通常用于哺乳类细胞的培养的培养基作为本发明的培养基组合物所含的培养基。作为哺乳类细胞用的培养基,可举出例如杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagles's Medium; DMEM)、Ham F12培养基(Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培养基、McCoy 5A培养基(McCoy's 5A medium)、Eagles MEM培养基(Eagles's Minimum Essential Medium;EMEM)、 $\alpha$ MEM培养基(alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium; $\alpha$ MEM)、MEM培养基(Minimum Essential Medium)、RPMI1640培养基、伊思柯夫改良杜氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium;IMDM)、MCDB131培养基、William培养基E、IPL41培养基、Fischer's培养基、StemPro34(Invitrogen公司制)、X-VIVO 10(Cambrex公司制)、X-VIVO 15(Cambrex公司制)、HPGM(Cambrex公司制)、StemSpan H3000(STEMCELL Technologies公司制)、StemSpanSFEM(STEMCELL Technologies公司制)、StemlineII(Sigma Aldrich公司制)、QBSF-60(Qualitybiological公司制)、StemProhESCSFM(Invitrogen公司制)、mTeSR1或mTeSR2培养基(STEMCELL Technologies公司制)、Sf-900II(Invitrogen公司制)、Opti-Pro(Invitrogen公司制)等。

[0089] 本领域技术人员可以根据目的在上述培养基中自由地添加钠、钾、钙、镁、磷、氯、各种氨基酸、各种维生素、抗生素、血清、脂肪酸、糖等。在培养、保存或运输哺乳类细胞时，本领域技术人员也可根据目的组合添加一种以上的其他化学成分或生物体成分。作为可添加至哺乳类细胞用的培养基的成分，可举出胎牛血清、人血清、马血清、胰岛素、转铁蛋白、乳铁蛋白、胆固醇、乙醇胺、亚硒酸钠、硫代甘油、2-巯基乙醇、牛血清白蛋白、丙酮酸钠、聚乙二醇、各种维生素、各种氨基酸、琼脂、琼脂糖、胶原蛋白、甲基纤维素、各种细胞因子、各种激素、各种生长因子、各种胞外基质、各种细胞粘附分子等。作为可添加至培养基中的细胞因子，可举出例如白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-7 (IL-7)、白细胞介素-8 (IL-8)、白细胞介素-9 (IL-9)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-11 (IL-11)、白细胞介素-12 (IL-12)、白细胞介素-13 (IL-13)、白细胞介素-14 (IL-14)、白细胞介素-15 (IL-15)、白细胞介素-18 (IL-18)、白细胞介素-21 (IL-21)、干扰素 $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、干扰素 $\beta$  (IFN- $\beta$ )、干扰素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、单核细胞集落刺激因子 (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干细胞因子 (SCF)、f1k2/f1t3配体 (FL)、白血病细胞抑制因子 (LIF)、制瘤素M (OM)、促红细胞生成素 (EPO)、促血小板生成素 (TPO) 等，但不限于这些。

[0090] 作为可添加至培养基中的激素，可举出褪黑素、5-羟色胺、甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、抗穆勒氏管激素、脂联素、促肾上腺皮质激素、血管紧张素原及血管紧张素、抗利尿激素、心房钠尿肽、降钙素、缩胆囊素、促肾上腺皮质激素释放激素、促红细胞生成素、促卵泡激素、胃泌素、胃饥饿素 (ghrelin)、胰高血糖素、促性腺激素释放激素、生长激素释放激素、人绒毛膜促性腺激素、人胎盘催乳素、生长激素、抑制素、胰岛素、胰岛素样生长因子、瘦素、促黄体生成素、黑色素细胞刺激素、催产素、甲状旁腺激素、催乳素、促胰液素、促生长素抑制素、血小板生成素 (thrombopoietin)、促甲状腺激素、促甲状腺激素释放激素、皮质醇、醛固酮、睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮、双氢睾酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、孕酮、骨化三醇、骨化二醇、前列腺素、白三烯、前列环素、血栓素、催乳激素释放激素、促脂素 (lipotropin)、脑尿钠肽、神经肽Y、组胺、内皮素、胰多肽、肾素及脑啡肽，但不限于这些。

[0091] 作为可添加至培养基的生长因子，可举出转化生长因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )、上皮细胞生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子-1、2、3、4、5、6、7、8、或9 (FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神经细胞生长因子 (NGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、白血病抑制因子 (LIF)、蛋白酶连接蛋白I、蛋白酶连接蛋白II、血小板源生长因子 (PDGF)、胆碱能分化因子 (CDF)、趋化因子、Notch配体 (Delta1等)、Wnt蛋白、血管生成素样蛋白2、3、5或7 (Angpt2、3、5、7)、胰岛素样生长因子 (IGF)、胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP)、多效蛋白 (Pleiotrophin) 等，但不限于这些。

[0092] 另外，也可添加通过基因重组技术人工改变这些细胞因子、生长因子的氨基酸序列而得到的物质。作为其例子，可举出IL-6/可溶性IL-6受体复合体或者Hyper IL-6 (IL-6与可溶性IL-6受体的融合蛋白) 等。

[0093] 作为各种胞外基质、各种细胞粘附分子的例子，可举出胶原蛋白I至XIX、纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白-1至12、Nitogen、腱生蛋白、血小板反应蛋白、血管性血友病 (von

Willebrand) 因子、骨桥蛋白、纤维蛋白原、各种弹性蛋白、各种蛋白多糖、各种钙粘蛋白、桥粒糖蛋白 (desmocollin)、桥粒芯糖蛋白 (desmogleins)、各种整合素、E-选择蛋白、P-选择蛋白、L-选择蛋白、免疫球蛋白超家族、基质胶、多聚D-赖氨酸、多聚L-赖氨酸、甲壳质、壳聚糖、琼脂糖、透明质酸、海藻酸凝胶、各种水凝胶、以及它们的切割片段等。

[0094] 作为可添加至培养基中的抗生素的例子,可举出磺胺类制剂、青霉素、非奈西林、甲氧西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、萘夫西林、氨苄青霉素、青霉素、阿莫西林、环青霉素、羧苄青霉素、替卡西林、哌拉西林、阿洛西林、美洛西林、美西林、阿德诺西林 (andinocillin)、头孢菌素及其衍生物、噁唑酸、氨氟沙星、替马沙星、萘啶酸、吡咯米酸、环丙沙星、西诺沙星、诺氟沙星、甲氟哌酸、Rosaxacin、氧氟沙星、依诺沙星、吡哌酸、舒巴坦、克拉维酸、 $\beta$ -溴青霉烷酸 ( $\beta$ -bromopenicillanic acid)、 $\beta$ -氯青霉烷酸 ( $\beta$ -chloropenicillanic acid)、6-乙酰基亚甲基-青霉烷酸、头孢噁唑、舒他西林、Adinoshirin及舒巴坦的甲醛合物·完全无水物酯 (sulbactam formaldehyde hydrate ester)、他佐巴坦、氨曲南 (aztreonam)、磺胺泽辛 (sulfazethin)、异磺胺泽辛 (isosulfazethin)、Norcardicin、间羧基苯、苯乙酰氨基膦酸甲酯 (phenylacetamidophosphonic acid methyl)、氯四环素、土霉素、四环素、地美环素、多西环素、美他环素、以及米诺环素。

[0095] 以在使用该培养基组合物将粘附性细胞供于悬浮培养、非冷冻状态下的保存或运输时能够提高该粘附性细胞的存活性的方式,或者,以成为能够使该粘附性细胞悬浮(优选使其悬浮静置)的浓度的方式,将上述由非水溶性多糖类形成的纳米纤维与合适的液体培养基混合,从而可制造上述本发明的培养基组合物。

[0096] 优选方式中,通过将上述由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的生理性水性溶剂中的分散液与液体培养基混合,制备本发明的培养基组合物。该分散液可进行灭菌(高压釜、伽马射线灭菌等)。或者,也可在将该分散液与将粉末培养基溶解于水制成的液体培养基(培养基的水溶液)混合后,灭菌进行使用。该分散液和液体培养基的灭菌也可在混合前分别进行。作为水性溶剂的例子,可举出水、二甲基亚砷 (DMSO) 等,但不限于这些。作为水性溶剂,优选水。水性溶剂中可含有适当的缓冲剂、盐。上述纳米纤维的分散液可用作用于制备本发明的培养基组合物的培养基添加剂。

[0097] 混合比率没有特别限定,纳米纤维的分散液:液体培养基(培养基的水溶液)(体积比)通常为1:99~99:1,优选为10:90~90:10,更优选为20:80~80:20。

[0098] [使用了由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的处理]

[0099] 本发明提供由非水溶性多糖类形成的纳米纤维在粘附性细胞的各种培养方法中作为载体的用途。可将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下供于(1)悬浮培养、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、(3)移植等各种处理。因此,本发明也涵盖粘附性细胞的处理方法,所述处理方法包括将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下供于(1)悬浮培养、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、(3)移植等处理。

[0100] (1) 悬浮培养

[0101] 通过将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行培养,能够悬浮培养粘附性细胞。该悬浮培养可通过在上述本发明的培养基组合物中培养粘

附性细胞来实施。由非水溶性多糖类形成的纳米纤维显示出使附着于该纳米纤维的细胞在培养基中悬浮的效果(优选使其悬浮静置的效果)。本发明的培养基组合中,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维均匀地分散,因此,在该培养基组合中培养粘附性细胞时,粘附性细胞附着于该纳米纤维,悬浮于该培养基组合中。基于该悬浮效果,能够较之单层培养增加每一定体积内的细胞数量而进行培养。另外,在以往的伴有旋转、振荡操作的悬浮培养中,针对细胞的剪切力发挥作用,因此,存在细胞的增殖率、回收率低、或者细胞的功能受损的情况,但通过使用本发明的培养基组合,能够无需振荡等操作而将细胞在分散的状态下培养,因此,可期待不损失细胞功能、容易且大量地悬浮培养目标粘附性细胞。另外,在以往的含有凝胶基材的培养基中悬浮培养细胞时,存在细胞的观察、回收困难、或回收时损害其功能的情况,但通过使用本发明的培养基组合,可期待对悬浮培养的细胞在不损害其功能的情况下进行观察、回收。另外,以往的含有凝胶基材的培养基存在粘度高、培养基更换困难的情况,但本发明的培养基组合由于为低粘度,因此可期待使用移液器、泵等容易地更换培养基。

[0102] 使用由非水溶性多糖类形成的纳米纤维悬浮培养粘附性细胞的情况下,向本发明的培养基组合中添加另外制备的粘附性细胞、将其均匀地分散的方式混合即可。这时的混合方法没有特别限定,可举出例如吹吸等采用手动进行的混合、使用磁力搅拌器、旋涡混合器(Vortex Mixer)、微孔板混合器、振荡机等设备的混合。混合后,可在静置状态下培养得到的细胞悬浮液,也可根据需要一边旋转、振荡或者搅拌一边进行培养。其转速及频率可以根据本领域技术人员的目的适当地设定。例如,将粘附性细胞从传代培养回收,使用合适的细胞解离液分散至单一细胞或接近单一细胞的状态,将被分散的粘附性细胞悬浮于本发明的培养基组合中,对其进行悬浮培养(优选悬浮静置培养)。

[0103] 对于培养细胞时的温度而言,为动物细胞时通常为25℃至39℃,优选为33℃至39℃(例如37℃)。对于CO<sub>2</sub>浓度而言,通常在培养的气氛中为4体积%至10体积%,优选为4体积%至6体积%。培养时间根据培养的目的适当设定即可。

[0104] 本发明的培养基组合中的粘附性细胞的培养可使用通常用于细胞的培养的培养皿、烧瓶、塑料袋、Teflon(注册商标)袋、皿、陪替氏培养皿、组织培养用皿、多皿、微量板、微孔板、多板、多孔板、腔室载玻片、管、盘、培养袋、滚瓶等培养容器实施。期望这些培养容器为细胞低粘附性,从而附着于纳米纤维的粘附性细胞不向培养容器粘附。作为细胞低粘附性的培养容器,可使用培养容器的表面未基于提高与细胞的粘附性的目的进行人工处理(例如,利用细胞外基体等的包被处理)的培养容器,或者培养容器的表面基于降低与细胞的粘附性的目的进行了人工处理的培养容器。

[0105] 需要更换培养基时,在通过进行离心、过滤处理分离细胞后,将新鲜的培养基或本发明的培养基组合添加至该细胞即可。或者,通过进行离心、过滤处理将细胞适当浓缩后,将新鲜的培养基或本发明的培养基组合添加至该浓缩液即可。例如,离心时的重力加速度(G)为100G至400G,进行过滤处理时使用的过滤器的微孔的大小为10μm至100μm,但不限于此。

[0106] 粘附性细胞的培养可利用能够在机械控制下且于封闭环境中自动执行接种细胞、更换培养基、获取细胞图像、回收培养细胞、控制pH、温度、氧浓度等、同时可实现高密度培养的生物反应器、自动培养装置进行。

[0107] (1-1) 粘附性细胞的维持或增殖

[0108] 将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养时,由于可高效地增殖粘附性细胞,因此,该悬浮培养作为粘附性细胞的维持或增殖方法是优异的。将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养时,粘附性细胞未仅局部存在于培养容器的底面,而是以三维性地扩展的方式分散,促进增殖。尤其使用甲壳质纳米纤维作为纳米纤维时,粘附性细胞附着于甲壳质纳米纤维,以此处作为支承物强效地增殖,结果,增殖的细胞成为以葡萄串状连结于纳米纤维上的状态。对于该增殖促进效果而言,只要在培养基组合中包含对于使粘附性细胞悬浮(即,避免向粘附性细胞的培养容器的粘附)而言充分的浓度的纳米纤维即可,并非必须实现悬浮静置(即,在不伴有来自外部的压力、振动、振荡、旋转操作等的情况下,细胞在液体培养基组合中均匀地分散且处于悬浮状态)。例如,甲壳质纳米纤维的情况下,只要为对于发挥悬浮作用而言充分的0.0001% (重量/容量)以上的浓度,则即使是低于可实现稳定的悬浮静置培养的0.03% (重量/容量)的浓度(例如0.025% (重量/容量)以下、0.02% (重量/容量)以下),仍然可起到增殖促进效果。另外,将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下悬浮培养时,较之使该细胞粘附至培养容器的底面而进行单层培养的情况而言,能够以高密度维持并使其增殖。

[0109] 将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下悬浮培养、维持或增殖该细胞的情况下,作为该悬浮培养中使用的本发明的培养基组合中所含的培养基,可使用能够在维持该粘附性细胞的性状的同时维持或增殖该细胞的培养基。根据该培养基粘附性细胞的种类,本领域技术人员可进行适当选择。

[0110] 一个方式中,通过将哺乳动物的干细胞(例如间充质干细胞)或祖细胞(例如前体脂肪细胞)在附着于甲壳质纳米纤维的状态下进行悬浮培养,维持该细胞或使其增殖。通过该悬浮培养,能够在维持哺乳动物的干细胞(例如间充质干细胞)或祖细胞(例如前体脂肪细胞)的性状(例如分化能力)的同时维持所述细胞或使其增殖。

[0111] 将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养的情况下,不需要从培养容器剥离细胞的操作,仅通过将新鲜的培养基或本发明的培养基组合物仅仅添加至该悬浮培养物、或者向新鲜的培养基或本发明的培养基组合物添加该悬浮培养物的全部或一部分,即能够将粘附性细胞传代。通过使用该传代培养方法,能够在不进行从培养容器剥离细胞的操作的情况下传代培养粘附性细胞。另外,通过使用该传代培养方法,能够在不进行从培养容器剥离细胞的操作的情况下,扩大粘附性细胞的培养规模。作为从培养容器剥离细胞的操作,可举出利用螯合剂(例如EDTA)及/或蛋白水解酶(例如胰蛋白酶、胶原酶)的处理。上述传代培养方法有利于对于从培养容器剥离细胞的操作敏感性高的粘附性细胞(例如,由于剥离操作导致存活性降低的粘附性细胞、由于剥离操作导致性状容易变化的粘附性细胞)的传代培养。作为对于从培养容器剥离细胞的操作敏感性高的粘附性细胞,可举出干细胞(例如间充质干细胞)、祖细胞(例如前体脂肪细胞)、原代培养细胞等,但不限于这些。

[0112] (1-2) 粘附性细胞的分化诱导

[0113] 将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养时,通过在合适的分化诱导条件下进行该悬浮培养,从而能够诱导该粘附性细胞向所期

望的细胞的良好分化。如上所述,将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养时,可促进其增殖,因此,通过在合适的分化诱导条件下进行该悬浮培养,可期待该粘附细胞向所期望的细胞的良好分化诱导。

[0114] 分化诱导条件可根据粘附性细胞、所期望的分化细胞的种类适当设定。本领域技术人员可通过将各种已知的分化诱导条件应用于上述悬浮培养,从而使特定的粘附性细胞向所期望的细胞分化。例如,通过将特定的分化诱导因子添加至上述本发明的培养基组合物中,在该分化诱导因子的存在下进行粘附性细胞的悬浮培养,从而能够诱导向所期望的细胞的分化。

[0115] 作为能够应用于本发明的分化诱导条件,没有特别限定,可举出例如以下。

[0116] • 间充质干细胞向脂肪细胞的分化:使用异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松、胰岛素及吡哆美辛作为脂肪细胞分化诱导因子,在这些因子的存在下培养间充质干细胞。

[0117] • 间充质干细胞向骨细胞的分化:使用地塞米松、抗坏血酸及 $\beta$ 甘油磷酸作为骨细胞分化诱导因子,在这些因子的存在下培养间充质干细胞。

[0118] • 间充质干细胞向软骨细胞的分化:使用胰岛素、TGF- $\beta$ 3及抗坏血酸作为软骨细胞分化诱导因子,在这些因子的存在下培养间充质干细胞。

[0119] 关于间充质干细胞的脂肪细胞分化、骨细胞分化或软骨细胞分化的条件,记载于例如以下的论文。

[0120] [1]da Silva Meirelles L,Caplan AI,NardiNB.,Stem Cells 2008;26(9):2287-99.

[0121] [2]Crisan M,Yap S,CasteillaL等,Cell Stem Cell 2008;(3):301-13.

[0122] [3]Dominici M,Le Blanc K,Mueller I,Slaper-Cortenbach I等,Cytother2006;8(4):315-7.

[0123] [4]Caplan AI.,Cell Stem Cell 2008;3(3):229-30.

[0124] • 前体脂肪细胞向脂肪细胞的分化:使用异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松、胰岛素及吡哆美辛作为脂肪细胞分化诱导因子,在这些因子的存在下培养前体脂肪细胞。

[0125] 关于前体脂肪细胞向脂肪细胞的分化的条件,记载于例如以下的论文。

[0126] [5]Hutley LJ,Newell FM等,Eur J ClinInvest.2003;33(7):574-81.

[0127] [6]Yin Y,Yuan H等,Mol Endocrinol.2006;20(2):268-78.

[0128] [7]Rival Y,StennevinA等,J Pharmacol Exp Ther.2004;311(2):467-75.

[0129] 除此以外,以下的分化诱导条件是已知的,可应用于本发明。

[0130] • 从前体脂肪细胞向骨细胞的分化:

[0131] [8]Shirakawa K,Maeda S等,Mol Cell Biol.2006;26(16):6105-16.

[0132] 分化诱导条件下的粘附性细胞的悬浮培养进行至所期望的分化细胞出现为止。所期望的分化细胞的出现可通过调查该细胞的分化标志物的表达等来进行确认。该悬浮培养的结果可在将所期望的分化细胞附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下得到。

[0133] 一个方式中,将哺乳动物的间充质干细胞以附着于壳聚糖纳米纤维的状态、在向脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞的分化诱导条件下进行悬浮培养。进行悬浮培养直到脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞出现为止,从而得到脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞。脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞可在附着于壳聚糖纳米纤维的状态下得到。

[0134] 一个方式中,将哺乳动物的前体脂肪细胞以附着于壳聚糖纳米纤维的状态、在向脂肪细胞的分化诱导条件下进行悬浮培养。进行悬浮培养直到脂肪细胞出现为止,从而得到脂肪细胞。脂肪细胞可在附着于壳聚糖纳米纤维的状态下得到。

[0135] (1-3) 利用粘附性细胞的体液因子生产

[0136] 将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养时,由于能够以高密度培养粘附性细胞、并且高效地增殖粘附性细胞,因此,该悬浮培养可用于利用体外细胞培养的体液因子的生产。对产生所期望的体液因子的粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下进行悬浮培养,从培养物(例如培养上清液)中分离目标体液因子,从而能够得到该体液因子。作为体液因子,可举出抗体、酶(尿酸酶等)、激素(胰岛素等)、细胞因子(干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子、集落刺激因子、生长因子等)、疫苗的抗原、其他生理活性物质(蛋白质、肽等),但不限于这些。产生体液因子的细胞包括皮肤细胞、软骨细胞、肝细胞、胰脏细胞、肾细胞、间充质干细胞、脂肪细胞等非转化细胞、导入了编码该体液因子的基因、与有用物质的生物合成相关的基因而得到的转化细胞。产生所期望的体液因子的细胞优选为向细胞外分泌该体液因子的细胞。作为产生体液因子的细胞,具体而言,可举出导入编码该体液因子的基因、与该体液因子的生物合成相关的基因而得到的HEK293、CHO-K1、BHK-21、MDCK、Vero、HepG2、MCF-7等,但不限于这些。用于生产重组蛋白质等体液因子的细胞是本领域技术人员已知的,可在本发明的方法中使用这些细胞。培养规模的扩大可使用上述(1-1)中记载的粘附性细胞的维持或增殖方法进行。将体液因子从培养物中分离时,需要从培养物中除去细胞,使用上述悬浮培养时,由于粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下悬浮于培养基组合中,因此,可通过离心分离、过滤处理等简便的方法除去细胞。另外,培养基组合中的纳米纤维也可通过离心分离、过滤处理等简便的方法除去。将体液因子从培养物中分离的方法是本领域技术人员已知的,可应用例如色谱(例如离子交换色谱、疏水色谱、亲和色谱、反相色谱等色谱)等生理活性物质的生化分离纯化方法。

[0137] 一个方式中,对哺乳动物的间充质干细胞、前体脂肪细胞、或脂肪细胞在附着于壳聚糖纳米纤维的状态下进行悬浮培养,从得到的培养上清液中分离这些细胞分泌至细胞外的细胞因子或外泌体等有用物质。脂肪细胞可以是利用上述(1-2)的方法从哺乳动物的间充质干细胞或前体脂肪细胞诱导而得到的。

[0138] (2) 非冷冻状态下的保存及/或运输

[0139] 粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下显示出高存活性。另外,可在不将粘附性细胞从支承物切离的情况下以高密度进行浓缩。因此,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维可作为用于将粘附性细胞在非冷冻状态下进行保存及/或运输的载体使用。使用该纳米纤维的粘附性细胞的非冷冻状态下的保存及/或运输可通过使用上述本发明的培养基组合将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下、以悬浮于该培养基组合物中的状态(优选悬浮静置状态)进行保存及/或运输来实施。

[0140] 用于保存及/或运输的本发明的培养基组合物中,除了上述的组成以外,可含有具有在细胞、组织的非冷冻状态下的保存时延长细胞生命的效果的各种成分。作为该成分,可举出糖类(但不包括多糖类)(例如单糖类、二糖类)、抗氧化剂(例如SOD、维生素E或谷胱甘肽)、亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮)、螯合剂(例如EDTA)、糖醇(例如甘露糖醇、山梨

糖醇)、甘油等。

[0141] 保存及/或运输时,例如,将所期望的粘附性细胞分散于本发明的培养基组合物中,使粘附性细胞附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维,得到附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的悬浮液。也可对上述(1)的悬浮培养的结果所得到的、包含附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的培养物直接进行保存及/或运输。另外,也可通过对上述(1)的悬浮培养的结果所得到的培养物进行离心分离等来回收附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞,将其悬浮于合适的液体培养基中,从而得到附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的悬浮液。悬浮液中的粘附性细胞的浓度没有特别限定,通常为 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL,优选为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL。

[0142] 保存及/或运输时,将上述粘附性细胞的悬浮液装入能够密封的容器中。作为该容器,可举出烧瓶、塑料袋、Teflon(注册商标)袋、管、培养袋等,但不限于这些。在保存或运输中,为了避免内容物的泄漏、来自外界的细菌等污染,装有粘附性细胞的悬浮液的容器优选进行密封。

[0143] 对于保存及/或运输中的温度而言,只要可维持粘附性细胞的存活则没有特别限定,通常为 $37^\circ\text{C}$ 以下。温度低时能够避免保存及/或运输中的细胞的存活性的降低,但通常于高于本发明的培养基组合物的熔点的温度进行保存及/或运输,使得细胞不会冷冻。因此,保存及/或运输中的温度通常维持为 $-5^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ ,优选为 $1^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ ,更优选为 $4^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$ ,进一步优选为 $18^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 。

[0144] 对于保存及/或运输的时间而言,只要是能够将作为对象的粘附性细胞维持为存活状态的范围内即可,没有特别限定,通常为1小时以上且10天以内,优选为1~8天,更优选为1~3天。在保存及/或运输期间,优选将粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下于本发明的培养基组合物中维持悬浮静置状态。

[0145] 使用本发明的保存或运输方法时,能够将粘附性细胞不从支承物脱离、以非冷冻状态在维持悬浮状态的情况下进行保存及/或运输。因此,能够将由细胞的冷冻、粘附性细胞从支承物的剥离、由于沉降而接触的细胞之间的凝聚等导致的损伤抑制为最小限度。在维持原本的功能的状态下保存及/或运输粘附性细胞。

[0146] 一个方式中,将哺乳动物的间充质干细胞、前体脂肪细胞、脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞在附着于壳聚糖纳米纤维的状态下以非冷冻状态进行保存及/或运输。脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞可以是利用上述(1-2)的方法从哺乳动物的间充质干细胞或前体脂肪细胞诱导而得到的。

[0147] 在回收保存及/或运输的粘附性细胞时,可将粘附性细胞用螯合剂(例如EDTA)及/或蛋白水解酶(例如胰蛋白酶、胶原酶)进行处理,将粘附性细胞从纳米纤维剥离,另外,也可利用后述的本发明的回收方法,用合适的分解酶分解纳米纤维,将粘附性细胞从纳米纤维剥离。也可在将在附着于纳米纤维的状态下保存及/或运输的粘附性细胞使用上述(1-1)中记载的方法悬浮培养后,进行回收操作。或者,将附着于纳米纤维的粘附性细胞移至细胞粘附性的培养器,继续进行培养。细胞粘附性的培养器可以是基于提高培养器的表面与细胞的粘附性的目的而使用胞外基质(ECM)等任意的细胞支承用基质进行包被而得到的。作为细胞支承用基质,可举出胶原蛋白、明胶、多聚L-赖氨酸、多聚D-赖氨酸、层粘连蛋白、及

纤连蛋白以及它们的混合物、例如基质胶等,但不限于这些。在细胞粘附性的培养器中培养附着于纳米纤维的粘附性细胞时,粘附性细胞从纳米纤维向细胞粘附性培养器的表面移动,在粘附于该培养器的表面的状态下增殖。也可对粘附于该培养器的表面的细胞使用螯合剂(例如EDTA)及/或蛋白水解酶(例如胰蛋白酶、胶原酶)进行处理,从表面剥离、回收。

[0148] (3) 移植

[0149] 如上所述,粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下显示出高存活性。另外,可在不将粘附性细胞从支承物切离的情况下维持良好的功能而以高密度进行浓缩。此外,甲壳质等非水溶性多糖类是生物降解性的,因此,移植至体内后被分解而消失。因此,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维可作为用于将粘附性细胞移植至生物体内的载体使用。通过将有效量的粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下移植至需要利用该粘附性细胞的治疗的患者,能够治疗该患者的疾病、障碍。该疾病或障碍可以是由该粘附性细胞的缺失、不足、或功能障碍导致的。例如,通过将有效量的人粘附性细胞在附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的状态下移植至需要利用该粘附性细胞的治疗的病人,能够治疗该病人的疾病、障碍。进行移植的粘附性细胞可以通过上述(1)的悬浮培养、或上述(2)的非冷冻状态下的保存及/或运输而获得的。

[0150] 一个方式中,通过将哺乳动物的间充质干细胞、前体脂肪细胞、脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞在附着于壳聚糖纳米纤维的状态下移植至需要利用间充质干细胞、前体脂肪细胞、脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞的治疗的哺乳动物患者,能够治疗该患者的疾病、障碍。该疾病或障碍可以是由间充质干细胞、前体脂肪细胞、脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞的缺失、不足、或功能障碍导致的。哺乳动物优选为人。进行移植的间充质干细胞或前体脂肪细胞可以是利用上述(1-1)的方法进行维持或增殖而得到的。脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞可以是利用上述(1-2)的方法从哺乳动物的间充质干细胞或前体脂肪细胞诱导而得到的。

[0151] [连续性处理]

[0152] 如上所述,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维可用作间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞的(1)悬浮培养(维持或增殖、分化诱导、或体液因子生产)、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、以及(3)移植等各种操作中的共通的载体,因此,通过使用由非水溶性多糖类形成的纳米纤维,能够连续性地实施选自(1)悬浮培养((1-1)维持或增殖、(1-2)分化诱导、或(1-3)体液因子生产)、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输、以及(3)移植中的多种处理。所谓“连续性”,表示将通过特定的操作得到的附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞在维持该附着状态的情况下供于下一操作。通过在不将粘附性细胞从支承物剥离的情况下连续性地多种操作,能够以良好的状态维持粘附性细胞的存活性及功能。

[0153] 处理的组合及其顺序没有特别限定,可根据目的适当设定。另外,可连续性地相同的处理、或非连续性地多次进行相同的处理。以下示出处理的组合及其顺序的例子,但不限于这些。

[0154] (a) (1-1) → (2)

[0155] (b) (1-1) → (2) → (1-1)

[0156] (c) (1-1) → (2) → (1-2)

[0157] (d) (1-1) → (2) → (1-1) → (1-2)

- [0158] (e) (1-1) → (2) → (1-2) → (1-1)
- [0159] (f) (1-1) → (2) → (1-1) → (1-2) → (1-1)
- [0160] (g) (1-1) → (1-2) → (2)
- [0161] (h) (1-1) → (1-2) → (1-1) → (2)
- [0162] (i) (1-1) → (1-2) → (2) → (1-1)
- [0163] (j) (1-1) → (1-2) → (1-1) → (2) → (1-1)
- [0164] (k) (1-1) → (1-2)
- [0165] (l) (1-1) → (1-2) → (1-1)
- [0166] (m) 在前述 (a) ~ (l) 中任一者的操作 (例如, (a)、(b)、(c) 或 (k)) 后连续性地实施 (3)
- [0167] (n) 在前述 (a) ~ (l) 中任一者的操作 (例如, (a)、(b)、(c) 或 (k)) 后连续性地实施 (1-3)
- [0168] 上述组合中,由非水溶性多糖类形成的纳米纤维优选为甲壳质纳米纤维。上述 (a) 及 (b) 中的操作 (1-1) 中,进行维持或增殖的粘附性细胞优选为哺乳动物的间充质干细胞、前体脂肪细胞、脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞。上述 (c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k) 及 (l) 中,在操作 (1-2) 之前进行的操作 (1-1) 中,所维持或增殖的粘附性细胞优选为哺乳动物的间充质干细胞或前体脂肪细胞。上述 (e)、(f)、(h)、(i)、(j) 及 (l) 中,在操作 (1-2) 之后进行的操作 (1-1) 中,所维持或增殖的粘附性细胞为脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞。上述组合中,操作 (1-2) 优选为从哺乳动物的间充质干细胞或前体脂肪细胞向脂肪细胞、骨细胞或软骨细胞的分化诱导。

[0169] [附着于纳米纤维的粘附性细胞的回收]

[0170] 本发明提供从附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞回收该粘附性细胞的方法,所述方法包括下述步骤:将附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞用该非水溶性多糖类的分解酶进行处理,由此分解该纳米纤维,将该粘附性细胞从该纳米纤维剥离。

[0171] 一般而言,在将附着于培养容器等的粘附性细胞剥离并回收的情况下,进行利用螯合剂 (例如EDTA) 及/或蛋白水解酶 (例如胰蛋白酶、胶原酶) 的处理,但进行该处理时,存在粘附性细胞的胞外基质的结构被破坏、或由于螯合剂、蛋白水解酶对于粘附性细胞的直接作用而导致粘附性细胞受到损伤、其存活性、功能受损的情况。另外,使用螯合剂、蛋白水解酶回收细胞的情况下,为了除去培养基中所含的二价离子、蛋白质等,需要除去培养基、用PBS等洗涤细胞,存在该洗涤操作对细胞造成损伤的情况。特别地,干细胞 (例如间充质干细胞)、祖细胞 (例如前体脂肪细胞)、原代培养细胞等对于使用上述这样的螯合剂、蛋白水解酶的剥离操作的敏感性高。与此相对,本发明的回收方法中,将构成粘附性细胞所附着的纳米纤维的非水溶性多糖类分解。因此,粘附性细胞的胞外基质的结构的破坏被限制为最小限度。另外,哺乳动物等的细胞通常不含有非水溶性多糖类作为其构成成分,因此,即使用非水溶性多糖类的分解酶处理该细胞,对该细胞的直接影响也被限制为最小限度。此外,哺乳动物等的培养基通常不含有非水溶性多糖类,因此,不需要利用PBS等的洗涤操作。因此,根据本发明的回收方法,能够在将对粘附性细胞的损伤抑制为最小限度的同时将粘附性细胞从纳米纤维剥离、回收。

[0172] 本发明的回收方法中,根据非水溶性多糖类的种类,适当选择其分解酶。例如,使用甲壳质或壳聚糖作为非水溶性多糖类的情况下,作为其分解酶,可使用甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等。使用纤维素作为非水溶性多糖类的情况下,作为其分解酶,可使用纤维素酶(内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4) (“EG”)、外切葡聚糖酶或纤维二糖水解酶(EC 3.2.1.91) (“CBH”)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $[\beta]$ -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶;EC 3.2.1.21) (“BG”)。纤维素原料中含有较多半纤维素的情况下,优选除了纤维素酶以外还添加木聚糖酶、甘露聚糖酶作为用于分解半纤维素的酶。也可将多种分解酶组合使用。例如,使用甲壳质或壳聚糖作为非水溶性多糖类的情况下,作为其分解酶,可使用选自甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶、及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶组成的组中的2种、3种或4种酶的混合物。Yatalase (Takara Bio Inc.)是包含甲壳质酶、壳二糖酶、壳聚糖酶、及 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的混合物,可优选作为甲壳质或壳聚糖的分解酶而用于本发明的回收方法。

[0173] 例如,向附着于由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的悬浮液中添加该非水溶性多糖类的分解酶,将混合物孵育对于粘附性细胞的剥离而言充分的时间。如上所述,该剥离不需要螯合剂(EDTA)、蛋白水解酶(胰蛋白酶、胶原酶),因此,一个方式中,向悬浮液中不添加螯合剂(EDTA)及/或蛋白水解酶(例如胰蛋白酶、胶原酶),而是添加非水溶性多糖类的分解酶。另外,由于不需要利用PBS等的洗涤操作,因此,一个方式中,不进行用于将悬浮粘附性细胞的介质中的二价离子及/或蛋白质除去(例如,使浓度为1/10以下)的洗涤操作,而向该介质中添加非水溶性多糖类的分解酶。利用非水溶性多糖类的分解酶的孵育温度通常为20℃~37℃。孵育时间也取决于酶的种类等,通常为5~60分钟。

[0174] 在纳米纤维分解、粘附性细胞从纳米纤维剥离后,可通过对悬浮液进行离心分离来回收剥离的粘附性细胞。

[0175] 如此回收的粘附性细胞的损伤被抑制为最小限度,因此,可优选用于功能分析、移植等。

[0176] 例如,上述的使用由非水溶性多糖类形成的纳米纤维的粘附性细胞的处理中,可在进行了(1)悬浮培养((1-1)维持或增殖、(1-2)分化诱导)、(2)非冷冻状态下的保存及/或运输的操作后,利用本发明的回收方法,从纳米纤维将粘附性细胞剥离、回收。也可在进行了上述连续操作(例如,(a)~(1))后,利用本发明的回收方法,从纳米纤维将粘附性细胞剥离、回收。

[0177] 以下,通过具体描述本发明的培养基组合物的实施例来对本发明进行更详细的说明,但本发明不限于这些。

#### [0178] 实施例

[0179] (试验例1:使用了甲壳质纳米纤维的3D培养中的人前体脂肪细胞的增殖)

[0180] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%, Sugino Machine Limited,批号GG30-G30)及脱酰基结冷胶(DAG)(KELCOGEL CG-LA,三晶株式会社制)以成为1%(w/v)的方式分别悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。制备在人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500,东洋纺公司制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.003%(w/v)、0.01%(w/v)、0.03%(w/v))、添加有脱酰基结冷胶的培养基组合物(最终浓度:0.015%(w/v)、0.03%(w/v))、及不含上述基材的未添加培养基组合物。接着,将经培养的

人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a,东洋纺公司制)以成为33333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合中后,以150 $\mu$ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养10天。向第3、7、10天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L(CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay,Promega公司制)使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,算出活细胞的数量(4个点的平均值)。

[0181] 结果,使用添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物培养人前体脂肪细胞时,于0.003% (w/v) 以上的浓度确认到细胞增殖作用。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表1。

[0182] [表1]

|                          | 第 0 天 | 第 3 天 | 第 7 天 | 第 10 天 |
|--------------------------|-------|-------|-------|--------|
| 未添加                      | 13140 | 13061 | 4673  | 2395   |
| DAG<br>0.015%            | 13722 | 14974 | 8762  | 7560   |
| DAG<br>0.003%            | 13620 | 14468 | 8221  | 7125   |
| [0183] 甲壳质纳米纤维<br>0.003% | 14284 | 18541 | 20253 | 20114  |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.01%         | 13760 | 18914 | 19413 | 21967  |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.03%         | 13538 | 18517 | 19550 | 22909  |

[0184] (试验例2:使用了甲壳质纳米纤维的3D培养中的来源于人脂肪组织的间充质干细胞的增殖)

[0185] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%,Sugino Machine Limited,批号GG30-G30)以成为1% (w/v) 的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90 $^{\circ}$ C加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121 $^{\circ}$ C高压釜灭菌20分钟。制备在作为低血清培养基的间充质干细胞增殖培养基(C-28009,Takara Bio Inc.制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.001% (w/v)、0.003% (w/v)、0.01% (w/v)、0.03% (w/v))、及不含上述基材的未添加培养基组合物。接着,将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞(C-12977,Takara Bio Inc.制)以成为13333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后,以150 $\mu$ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养10天。向第3、7、10天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L(CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay,Promega公司制)使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,算出活细胞的数量(4个点的平均值)。

[0186] 结果,使用添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物培养来源于人脂肪组织的间充质干细胞时,于0.001% (w/v) 以上的浓度确认到促进细胞增殖的作用。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表2。

[0187] [表2]

|        | 第 0 天 | 第 3 天 | 第 7 天 | 第 10 天 |
|--------|-------|-------|-------|--------|
|        | 1562  | 2646  | 3049  | 3954   |
|        | 1488  | 3278  | 5721  | 6276   |
| [0188] | 1455  | 3071  | 3759  | 4868   |
|        | 1646  | 5150  | 15716 | 15162  |
|        | 1744  | 5106  | 15434 | 15386  |

[0189] (试验例3:粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞的回收)

[0190] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%, Sugino Machine Limited, 批号GG30-G30)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。制备在人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500, 东洋纺公司制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.03% (w/v))。接着,将经培养的人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a, 东洋纺公司制)以成为33333个细胞/mL的方式悬浮于上述的培养基组合物中后,以150μL/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5% CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养3天,使细胞粘附于甲壳质纳米纤维。

[0191] 培养3天后,将包含甲壳质分解酶的Yatalase(Takara Bio Inc.制,T017)以最终浓度成为0.1% (w/v)或0.25% (w/v)的方式添加至各孔,于37℃静置约1小时。然后,将包含甲壳质纳米纤维分解产物、人前体脂肪细胞的4孔份量的细胞悬浮液回收至15mL管中,以1500rpm进行离心。离心后,除去上清液的培养基成分,将沉降的人前体脂肪细胞悬浮于600μL的人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500, 东洋纺公司制)中,以150μL/孔再次接种于96孔平底微量板(康宁公司制,#3585),实施照片拍摄。

[0192] 结果可知,在添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物中培养人前体脂肪细胞时,人前体脂肪细胞粘附于甲壳质纳米纤维,若使用Yatalase将甲壳质纳米纤维消化,则能够以单细胞样分离粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞。Yatalase处理后的细胞的照片示于图2。

[0193] (试验例4:粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞的回收和再次接种)

[0194] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%, Sugino Machine Limited, 批号GG30-G30)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。制备在人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500, 东洋纺公司制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.03% (w/v))。接着,将经培养的人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a, 东洋纺公司制)以成为33333个细胞/mL的方式悬浮于上述的培养基组合物中,以150μL/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5% CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养3天,使细胞粘附于甲壳质纳米纤维。

[0195] 培养3天后,将包含甲壳质分解酶的Yatalase(Takara Bio Inc.制,T017)以最终浓度成为0.1% (w/v)或0.25% (w/v)的方式添加至各孔,于37℃静置约1小时。然后,将包含甲壳质纳米纤维分解产物、人前体脂肪细胞的4孔份量的细胞悬浮液回收至15mL管中,以

1500rpm进行离心。离心后,除去上清液的培养基成分,将沉降的人前体脂肪细胞悬浮于600  $\mu$ L的人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500,东洋纺公司制)中,以150 $\mu$ L/孔再次接种于96孔平底微量板(康宁公司制,#3585),评价细胞增殖和向脂肪细胞的分化诱导的程度。

[0196] 细胞增殖的评价使用ATP值的测定法进行。再次接种后,将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养至最长7天。向再次接种后第0、3、7天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L(CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay,Promega公司制),于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,算出活细胞的数量(4个点的平均值)。

[0197] 向脂肪细胞的分化使用脂肪细胞标志物的mRNA表达值进行评价。再次接种细胞,于CO<sub>2</sub>孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养3天。确认细胞向96孔平底微量板的粘附,除去培养基,更换为150 $\mu$ L/孔的人脂肪细胞分化培养基(#CAS11D250,东洋纺公司制),进而将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养10天。

[0198] 在更换为分化培养基时(第0天)和第10天,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN公司制)从粘附的细胞中提取总RNA。使用PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix(Takara Bio Inc.制),在GeneAmp 9700型PCR系统(Applied Biosystems公司制)上进行逆转录反应,从总RNA合成cDNA。将得到的各cDNA试样用灭菌水稀释为1/10,用作PCR的模板。另外,将分注并混合得到的cDNA用作标准曲线制作用试样。标准曲线设定为以3倍公比从1/3稀释至1/243的定量范围。PCR使用各cDNA试样、标准试样、Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(Takara Bio Inc.制)及各种Taqman探针(Applied Biosystems公司制),利用7500型实时PCR系统(Applied Biosystems公司制)实施。以PPIA(亲环蛋白B)的mRNA作为内源性对照,PPAR gamma mRNA或者脂蛋白脂肪酶(LPL)mRNA的表达使用PPIA的值进行了校正。使用的探针(Applied Biosystems公司制)如下所示。

[0199] PPIA:HS99999904

[0200] PPAR gamma:HS011155134

[0201] LPL:HS00173425

[0202] 结果可知,在添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物中培养人前体脂肪细胞时,人前体脂肪细胞粘附于甲壳质纳米纤维,若使用Yatalase将甲壳质纳米纤维消化,则能够以单细胞样分离粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞。另外,被分离的细胞保持了在96孔平底微量板上的增殖能力和向脂肪细胞的分化能力。涉及细胞增殖评价的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表3,涉及脂肪细胞分化评价的PPAR gamma和LPL的mRNA表达值分别示于表4及表5。

[0203] [表3]

|                      | 第0天   | 第3天   | 第7天   |
|----------------------|-------|-------|-------|
| [0204] Yatalase 0.1% | 9304  | 21547 | 57172 |
| Yatalase 0.25%       | 15017 | 16919 | 53602 |

[0205] [表4]

|        | PPAR gamma<br>(PPIA 校正值) | 第 0 天 | 第 10 天 |
|--------|--------------------------|-------|--------|
| [0206] | Yatalase<br>0.1%         | 0.12  | 1.28   |
|        | Yatalasa<br>0.25%        | 0.10  | 1.08   |

[0207] [表5]

|        | LPL gamma<br>(PPIA 校正值) | 第 0 天 | 第 10 天 |
|--------|-------------------------|-------|--------|
| [0208] | Yatalase<br>0.1%        | 0     | 1.40   |
|        | Yatalase<br>0.25%       | 0     | 1.28   |

[0209] (试验例5:粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞的分化诱导)

[0210] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%, Sugino Machine Limited, 批号GG30-G30)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用该溶液制备在人脂肪细胞分化培养基(#CAS11D250, 东洋纺公司制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.03% (w/v))。接着,将经培养的人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a, 东洋纺公司制)以成为33333个细胞/mL的方式悬浮于上述的培养基组合物中,以150μL/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5% CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养最长14天。

[0211] 细胞存活性的评价使用ATP值的测定法进行。向第0、4、8、14天的培养液中添加ATP试剂150μL (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega公司制),于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3 (Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,算出活细胞的数量(4个点的平均值)。

[0212] 向脂肪细胞的分化使用脂肪细胞标志物的mRNA表达值进行评价。在将人前体脂肪细胞接种至上述培养基组合物时(第0天)和第4、8及14天,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN公司制)从细胞悬浮液中提取总RNA。使用PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio Inc. 制),在GeneAmp 9700型PCR系统 (Applied Biosystems公司制)上进行逆转录反应,从总RNA合成cDNA。将得到的各cDNA试样用灭菌水稀释为1/10,用作PCR的模板。另外,将分注并混合得到的cDNA用作标准曲线制作用试样。标准曲线设定为以3倍公比从1/3稀释至1/243的定量范围。PCR使用各cDNA试样、标准试样、Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc. 制)及各种Taqman探针 (Applied Biosystems公司制),利用7500型实时PCR系统 (Applied Biosystems公司制)实施。使用的探针 (Applied Biosystems公司制)如下所示。

[0213] PPIA:HS99999904

[0214] PPAR gamma:HS011155134

[0215] LPL:HS00173425

[0216] FABP4:HS01086177

[0217] 结果表明,在向培养基组合物中添加有甲壳质纳米纤维的条件下进行向脂肪细胞的分化诱导时,能够在保持细胞的存活性的同时,从人前体脂肪细胞分化诱导为脂肪细胞

样。关于细胞存活性的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表6。显示为将第0天的值设为100%时的相对值。涉及脂肪细胞分化评价的PPAR  $\gamma$ 、LPL、及FABP4的mRNA表达示于表7、表8及表9。

[0218] [表6]

|                  | % | 第4天  | 第8天   | 第14天 |
|------------------|---|------|-------|------|
| [0219] 未添加       |   | 68.3 | 67.4  | 57.6 |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.01% |   | 95.9 | 102.5 | 93.0 |

[0220] [表7]

[0221]

| PPAR $\gamma$<br>(PPIA 校正值) | 第0天  | 第4天  | 第8天  | 第14天 |
|-----------------------------|------|------|------|------|
| 未添加                         | 0.15 | 1.19 | 2.11 | 2.16 |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.01%            | 0.27 | 1.03 | 1.76 | 1.88 |

[0222] [表8]

[0223]

| LPL<br>(PPIA 校正值) | 第0天 | 第4天  | 第8天  | 第14天  |
|-------------------|-----|------|------|-------|
| 未添加               | 0   | 1.32 | 7.03 | 9.48  |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.01%  | 0   | 1.76 | 6.01 | 10.96 |

[0224] [表9]

[0225]

| FABP4<br>(PPIA 校正值) | 第0天 | 第4天  | 第8天  | 第14天 |
|---------------------|-----|------|------|------|
| 未添加                 | 0   | 0.83 | 1.99 | 1.85 |
| 甲壳质纳米纤维<br>0.01%    | 0   | 1.03 | 1.54 | 1.86 |

[0226] (试验例6:粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞的运输试验)

[0227] 将甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%, Sugino Machine Limited, 批号GG30-G30)以成为1% (w/v)的方式分别悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液(或悬浮液)于121℃高压釜灭菌20分钟。制备在人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500, 东洋纺公司制)或者含有10%FBS(#35-015-CV, 康宁公司制)的DMEM培养基(#044-29765, 和光纯药制)中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物(最终浓度:0.01% (w/v))、及不含甲壳质纳米纤维的未添加培养基组合物。接着,将经培养的人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a, 东洋纺公司制)以成为90000个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后,以5mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板(#3471, 康宁公司制)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养3天。培养后,将粘附有人前体脂肪细胞的甲壳质纳米纤维回收至50mL管中,离心后,向已成为沉淀的粘附有人前体脂肪细胞的甲壳质纳米纤维中添加新的人前体脂肪细胞增殖培养基(#

CAS11K500, 东洋纺公司制) 或者含有10%FBS (#35-015-CV, 康宁公司制) 的DMEM培养基 (#044-29765, 和光纯药制) 而使其悬浮, 移至6孔平底超低粘附表面微量板 (康宁公司制, #3471) 或者15mL管中。6孔平底超低粘附表面微量板于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下培养7天, 15mL管于25°C孵育器内静置7天。

[0228] 将于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内或者25°C孵育器内维持了7天的、粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞连同培养基再次接种于100mm培养皿 (#430167, 康宁公司制), 于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下进一步培养7天, 用显微镜观察从甲壳质纳米纤维迁移·增殖的人前体脂肪细胞 (图3)。

[0229] 用显微镜进行确认后, 除去培养基, 将粘附于皿的人前体脂肪细胞和甲壳质纳米纤维用PBS (-) (#045-29795, 和光纯药制) 洗涤后, 添加胰蛋白酶 (#CA090K, 东洋纺公司制), 从而仅回收人前体脂肪细胞。将回收的人前体脂肪细胞用人前体脂肪细胞增殖培养基 (#CAS11K500, 东洋纺公司制) 或者含有10%FBS (#35-015-CV, 康宁公司制) 的DMEM培养基 (#044-29765, 和光纯药制) 悬浮, 以5mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板 (康宁公司制, #3471), 培养5天。培养5天后, 将培养基更换为脂肪细胞分化培养基 (#CA811D250, 东洋纺公司制), 进而持续培养17天, 用显微镜观察向脂肪细胞的分化诱导 (图4)。

[0230] 结果, 粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞在CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内或25°C孵育器内的任一种条件下, 均在静置7天后具有从甲壳质纳米纤维迁移的能力及增殖能力 (图3), 保持了向脂肪细胞的分化能力 (图4)。使用人前体脂肪细胞增殖培养基 (#CAS11K500, 东洋纺公司制) 及含有10%FBS (#35-015-CV, 康宁公司制) 的DMEM培养基 (#044-29765, 和光纯药制) 中的任一种培养基的情况下, 均得到了同样的结果。

[0231] (试验例7: 粘附于甲壳质纳米纤维的来源于人脂肪的间充质干细胞的运输试验)

[0232] 将甲壳质纳米纤维 (生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%, Sugino Machine Limited, 批号GG30-G30) 以成为1% (w/v) 的方式分别悬浮于超纯水 (Milli-Q水) 中后, 通过一边于90°C加热一边搅拌而分散, 将该水溶液 (或悬浮液) 于121°C高压釜灭菌20分钟。制备在ADSC培养基 (#C-28009, Takara Bio Inc. 制) 或者含有10%FBS (#35-015-CV, 康宁公司制) 的DMEM培养基 (#044-29765, 和光纯药制) 中添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物 (最终浓度: 0.01% (w/v))、及不含甲壳质纳米纤维的未添加培养基组合物。接着, 将经培养的来源于人脂肪组织的间充质干细胞 (#C-12977, Takara Bio Inc. 制) 以成为90000个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后, 以5mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板 (康宁公司制, #3471)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下培养3天。培养后, 将粘附有来源于人脂肪的间充质干细胞的甲壳质纳米纤维回收至50mL管中, 离心后, 向已成为沉淀的粘附有来源于人脂肪的间充质干细胞的甲壳质纳米纤维中添加新的ADSC培养基 (#C-28009, Takara Bio Inc. 制) 或含有10%FBS (#35-015-CV, 康宁公司制) 的DMEM培养基 (#044-29765, 和光纯药制) 而使其悬浮, 移至6孔平底超低粘附表面微量板 (康宁公司制, #3471) 或15mL管中。6孔平底超低粘附表面微量板于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下孵育7天, 15mL管于25°C孵育器内静置7天。

[0233] 将于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内或者25°C孵育器内维持了7天的、粘附于甲壳质纳米纤维的来源于人脂肪的间充质干细胞连同培养基再次接种于100mm培养皿 (#430167, 康宁公司制), 于CO<sub>2</sub>孵育器 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下进一步培养7天, 用显微镜观察从甲

壳质纳米纤维迁移·增殖的来源于人脂肪的间充质干细胞(图5)。

[0234] 用显微镜进行确认后,除去培养基,将粘附于皿的来源于人脂肪的间充质干细胞和甲壳质纳米纤维用PBS(-)(#045-29795,和光纯药制)洗涤后,添加胰蛋白酶(#C-41210, Takara Bio Inc.制),从而仅回收来源于人脂肪的间充质干细胞。将回收的来源于人脂肪的间充质干细胞用ADSC培养基(#C-28009, Takara Bio Inc.制)或含有10%FBS(#35-015-CV,康宁公司制)的DMEM培养基(#044-29765,和光纯药制)悬浮,以5mL/孔接种于6孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3471),培养2天。培养2天后,将培养基更换为脂肪细胞分化培养基(#C-28016, Takara Bio Inc.制),进而持续培养8天,用显微镜观察向脂肪细胞的分化诱导(图6)。

[0235] 结果,粘附于甲壳质纳米纤维的来源于人脂肪的间充质干细胞在CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内或25℃孵育器内的任一种条件下,均在静置7天后具有从甲壳质纳米纤维迁移的能力及增殖能力(图5),保持了向脂肪细胞的分化能力(图6)。使用ADSC培养基(#C-28009, Takara Bio Inc.制)及含有10%FBS(#35-015-CV,康宁公司制)的DMEM培养基(#044-29765,和光纯药制)中的任一种培养基的情况下,均得到了同样的结果。

[0236] 根据以上的结果,确立了下述非冷冻条件下的新的细胞运输法:在粘附于甲壳质纳米纤维的状态下运输细胞,直接将细胞再次接种于皿,使细胞在皿上迁移·增殖,用胰蛋白酶等回收。模型示于图7。

[0237] (试验例8:使用了α甲壳质纳米纤维、β甲壳质纳米纤维、壳聚糖纳米纤维的3D培养中的MDCK细胞增殖效果)

[0238] 将按照WO 2015/111686A1制备的α甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%, Sugino Machine Limited)以成为1%(w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。进而,将壳聚糖纳米纤维及β甲壳质纳米纤维以成为1%(w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的纳米纤维为:在200MPa、循环(pass)10次的解纤度条件下纳米纤维化而得到的α甲壳质纳米纤维(试样1);在200MPa、循环1次的解纤度条件下纳米纤维化而得到的α甲壳质纳米纤维(试样2);在200MPa、循环10次的解纤度条件下纳米纤维化而得到的壳聚糖纳米纤维(试样3);在200MPa、循环10次的解纤度条件下纳米纤维化而得到的β甲壳质纳米纤维(试样4)。

[0239] 制备在无血清培养基KBM220培养基(Kohjin Bio Co.,Ltd.制)中添加有最终浓度为0.03%(w/v)的各纳米纤维试样(1~4)的培养基组合物。接着,将经培养的狗肾小管上皮细胞株MDCK(DS Pharma Biomedical Co.,Ltd.制)以成为66666个细胞/mL的方式接种于添加有上述的各纳米纤维试样(1~4)的培养基组合物后,以成为30mL的方式分注至125mL烧瓶(Thermo Scientific,4115-0125)中。各烧瓶于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内在振荡状态(cfg50rpm)下进行培养,持续6天。另外,在第6天,将各纳米纤维试样(1~4)及粘附于纳米纤维的MDCK细胞回收至50mL管中,离心后(cfg1000rpm、3分钟)仅除去培养基。向残留的各纳米纤维试样及MDCK细胞中添加新的KBM220培养基使其悬浮后,将悬浮液全部移回原来的125mL烧瓶中,在振荡状态(cfg50rpm)下继续培养。在第9天和第13天也实施了以上的更换培养基的操作。

[0240] 通过吹吸将第0、6、13、17天的培养液悬浮,向该细胞悬浮液100μL中添加ATP试剂

100 $\mu$ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega公司制) 使其反应, 于室温静置约10分钟后, 使用FlexStation3 (Molecular Devices公司制) 测定发光强度 (RLU值), 减去仅培养基时的发光值, 以4个点的平均值的形式测定活细胞的数量。

[0241] 结果, 确认到使用包含各纳米纤维试样 (1~4) 的培养基组合物在125mL烧瓶中培养MDCK细胞时, 由添加试样2的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维所带来的细胞增殖促进作用最强。另外, 对于试样1的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维和试样3的壳聚糖纳米纤维, 也确认到细胞增殖促进效果。另一方面, 试样4的 $\beta$ 甲壳质纳米纤维的细胞增殖促进作用弱。各培养中的RLU值 (ATP测定, 发光强度) 示于表10。

[0242] [表10]

[0243]

| 试样 | 纳米纤维               | 第0天  | 第6天   | 第13天  | 第17天  |
|----|--------------------|------|-------|-------|-------|
| 1  | $\alpha$ 甲壳质 (试样1) | 7307 | 10351 | 18945 | 25889 |
| 2  | $\alpha$ 甲壳质 (试样2) | 6985 | 17469 | 38108 | 47912 |
| 3  | 壳聚糖 (试样3)          | 6905 | 12058 | 21853 | 25649 |
| 4  | $\beta$ 甲壳质 (试样4)  | 6566 | 10663 | 10093 | 9916  |

[0244] (试验例9: 使用了各解纤度条件下的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维的3D培养中的MDCK细胞增殖效果)

[0245] 将按照WO 2015/111686A1制备的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (生物质纳米纤维BiNFi-S 2质量%, Sugino Machine Limited) 以成为1% (w/v) 的方式悬浮于超纯水 (Milli-Q水) 中后, 通过一边于90 $^{\circ}$ C加热一边搅拌而分散, 将该水溶液于121 $^{\circ}$ C高压釜灭菌20分钟。使用的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维为: 在200MPa、循环10次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样1); 在200MPa、循环1次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样2); 在100MPa、循环1次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样5); 在200MPa、循环3次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样6); 在100MPa、循环5次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样7);  $\alpha$ 甲壳质原料 (试样8)。

[0246] 制备在无血清培养基KBM220培养基 (Kohjin Bio Co., Ltd. 制) 中添加有最终浓度为0.03% (w/v) 的各纳米纤维试样 (1、2、5~8) 的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物 (试样9)。接着, 将经培养的狗肾小管上皮细胞株MDCK (DS Pharma Biomedical Co., Ltd. 制) 以成为66666个细胞/mL的方式接种于添加有上述的各纳米纤维试样 (1、2、5~8) 的培养基组合物后, 以成为30mL的方式分注至125mL烧瓶 (Thermo Scientific, 4115-0125) 中。各烧瓶于CO<sub>2</sub>孵育器 (37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>) 内在振荡状态 (cfg50rpm) 下进行培养, 持续7天。

[0247] 通过吹吸将第0、3、7天的培养液悬浮, 向该细胞悬浮液100 $\mu$ L中添加ATP试剂100 $\mu$ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega公司制) 使其反应, 于室温静置约10分钟后, 使用FlexStation3 (Molecular Devices公司制) 测定发光强度 (RLU值), 减去仅培养基时的发光值, 以4个点的平均值的形式测定活细胞的数量。

[0248] 结果, 确认到使用包含各纳米纤维试样 (1、2、5~8) 的培养基组合物在125mL烧瓶中培养MDCK细胞时, 由添加试样5及试样6的低解纤度 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维所带来的细胞增殖促进作用最强。另一方面, 未确认到试样8的 $\alpha$ 甲壳质原料的细胞增殖促进作用。各培养中的

RLU值(ATP测定,发光强度)示于表11。

[0249] [表11]

[0250]

| 试样 | 纳米纤维(解纤度)           | 第0天  | 第3天   | 第7天   |
|----|---------------------|------|-------|-------|
| 1  | $\alpha$ 甲壳质(试样1)   | 7884 | 17483 | 27007 |
| 2  | $\alpha$ 甲壳质(试样2)   | 8146 | 32372 | 42390 |
| 5  | $\alpha$ 甲壳质(试样5)   | 8058 | 23258 | 35941 |
| 6  | $\alpha$ 甲壳质(试样6)   | 8328 | 23941 | 50496 |
| 7  | $\alpha$ 甲壳质(试样7)   | 8143 | 29171 | 55898 |
| 8  | $\alpha$ 甲壳质原料(试样8) | 7619 | 2401  | 4507  |
| 9  | 未添加(试样9)            | 8096 | 5374  | 2947  |

[0251] (试验例10:使用了各解纤度条件下的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维的3D培养中的来源于人脂肪的间充质干细胞的增殖作用)

[0252] 将按照WO 2015/111686A1制备的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%,Sugino Machine Limited)以成为1%(w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维为:在200MPa、循环10次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样1);在200MPa、循环1次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样2);在200MPa、循环5次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样10)。

[0253] 制备在间充质干细胞增殖培养基2号培养基(Takara Bio Inc.制)中添加有最终浓度为0.001%(w/v)、0.003%、0.01%的各纳米纤维试样(1、2、10)的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样9)。接着,将经培养的来源于人骨髓的间充质干细胞(C-12974,Takara Bio Inc.制)以成为20000个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,以成为每孔为150 $\mu$ L的方式分注至96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)的孔中。各板于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养,持续10天。向第3、7、10天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay,Promega公司制)使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,以4个点的平均值的形式测定活细胞的数量。

[0254] 结果,确认到使用包含各纳米纤维试样(1、2、10)的培养基组合物在96孔平底超低粘附表面微量板中培养人骨髓间充质细胞时,较之试样1而言,由添加试样2及试样10的低解纤度 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维所带来的细胞增殖促进作用最强。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表12。

[0255] [表12]

[0256]

|                 | 第 0 天 | 第 3 天 | 第 7 天 | 第 10 天 |
|-----------------|-------|-------|-------|--------|
| 未添加 (试样 9)      | 4067  | 4178  | 2875  | 4391   |
| 试样 1<br>0.001%  | 4664  | 5752  | 3790  | 6212   |
| 试样 1<br>0.003%  | 4516  | 5366  | 5865  | 7210   |
| 试样 1<br>0.01%   | 4125  | 6005  | 7964  | 10299  |
| 试样 2<br>0.001%  | 4092  | 5094  | 6877  | 7319   |
| 试样 2<br>0.003%  | 4193  | 5499  | 9676  | 13407  |
| 试样 2<br>0.01%   | 3872  | 5564  | 8894  | 15736  |
| 试样 10<br>0.001% | 4029  | 4769  | 6820  | 7898   |
| 试样 10<br>0.003% | 4494  | 6419  | 11462 | 14588  |
| 试样 10<br>0.01%  | 3249  | 5204  | 10485 | 15105  |

[0257] (试验例11:使用了高解纤度条件下的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维的3D培养中的MDCK细胞的增殖作用)

[0258] 将按照WO 2015/111686A1制备的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNF<sub>i</sub>-S 2质量%,Sugino Machine Limited)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维为:在200MPa、循环1次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样2);在200MPa、循环20次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样11);在200MPa、循环50次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样12);在200MPa、循环100次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样13);在200MPa、循环200次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(试样14)。

[0259] 制备在无血清培养基KBM220培养基(Kohjin Bio Co.,Ltd.制)中添加有最终浓度为0.006% (w/v)、0.02%、0.06%的各纳米纤维试样(2、11~14)的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物(试样9)。接着,将狗肾小管上皮细胞株MDCK(DS Pharma Biomedical Co.,Ltd.制)以成为33333个细胞/mL的方式接种于添加有上述的甲壳质纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,以成为每孔为150 $\mu$ L的方式分注至96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)的孔中。各板于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养,持续6天。向第3、6天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay,Promega公司制)而使其悬浮,于室温静置约10分钟后,使用FlexStation3(Molecular Devices公司制)测定发光强度(RLU值),减去仅培养基时的发光值,以4个点的平均值的形式测定活细胞的数量。

[0260] 结果,使用包含各纳米纤维试样(2、11~14)的培养基组合物在96孔平底超低粘附

表面微量板中培养MDCK细胞时,较之试样2而言,由添加试样11即高解纤度 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维所带来的细胞增殖促进作用弱。进一步提高了解纤度的试样(12~14)仅显示出更弱的促进作用。各培养中的RLU值(ATP测定,发光强度)示于表13。

[0261] [表13]

[0262]

|              | 第3天   | 第6天   |
|--------------|-------|-------|
| 未添加(试样9)     | 7241  | 8361  |
| 试样2(0.006%)  | 17882 | 47095 |
| 试样2(0.02%)   | 16804 | 53055 |
| 试样2(0.06%)   | 16134 | 56368 |
| 试样11(0.006%) | 14312 | 36919 |
| 试样11(0.02%)  | 15382 | 39506 |
| 试样11(0.06%)  | 14744 | 41891 |
| 试样12(0.006%) | 13896 | 28671 |
| 试样12(0.02%)  | 14692 | 31694 |
| 试样12(0.06%)  | 15321 | 36274 |
| 试样13(0.006%) | 13889 | 29671 |
| 试样13(0.02%)  | 13754 | 30630 |
| 试样13(0.06%)  | 15345 | 32912 |
| 试样14(0.006%) | 13509 | 27234 |
| 试样14(0.02%)  | 14106 | 33868 |
| 试样14(0.06%)  | 14106 | 33868 |

[0263] (试验例12:粘附于甲壳质纳米纤维的人前体脂肪细胞片的制备)

[0264] 将制造例1中制备的甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S2质量%, Sugino Machine Limited,批号GG30-G30)以成为1% (w/v)的方式悬浮于超纯水(Milli-Q水)中后,通过一边于90℃加热一边搅拌而分散,将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。制备在人前体脂肪细胞增殖培养基(#CAS11K500,东洋纺公司制)中添加有最终浓度为0.01% (w/v)的甲壳质纳米纤维的培养基组合物、及不含上述基材的未添加培养基组合物。接着,将经培养的人前体脂肪细胞(来源于皮下,#CAS02s05a,东洋纺公司制)以成为33333个细胞/mL的方式接种于上述的添加有甲壳质纳米纤维的培养基组合物或者未添加培养基组合物后,以成为每孔为150 $\mu$ L的方式分注至96孔平底超低粘附表面微量板(康宁公司制,#3474)的孔中。各板于CO<sub>2</sub>孵育器(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内在静置状态下培养,持续10天。在第10天观察人前体脂肪细胞,实施照片拍摄。

[0265] 结果表明,使用作为本发明的培养基组合物的甲壳质纳米纤维将人前体脂肪细胞在96孔平底超低粘附表面微量板上培养10天时,如图8中所示,形成甲壳质纳米纤维与人前体脂肪细胞融合的细胞片状。

[0266] (试验例13:使用了甲壳质纳米纤维的3D培养中的来源于人脂肪组织的间充质干细胞的增殖)

[0267] 将按照WO 2015/111686A1制备的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维(生物质纳米纤维BiNFi-S 2质

量%, Sugino Machine Limited) 以成为1% (w/v) 的方式悬浮于超纯水 (Milli-Q水) 中后, 通过一边于90℃加热一边搅拌而分散, 将该水溶液于121℃高压釜灭菌20分钟。使用的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维为: 在200MPa、循环5次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样15); 在200MPa、循环20次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样11); 在200MPa、循环50次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样12); 在200MPa、循环100次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样13); 在200MPa、循环200次的条件下纳米纤维化而得到的 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样14)。制备在作为低血清培养基的间充质干细胞增殖培养基 (C-28009, Takara Bio Inc. 制) 中添加有各甲壳质纳米纤维的培养基组合物 (最终浓度: 0.002% (w/v)、0.006% (w/v)、0.02% (w/v))、及不含上述基材的未添加培养基组合物 (试样9)。接着, 将经培养的来源于人脂肪的间充质干细胞 (C-12977, Takara Bio Inc. 制) 以成为13333个细胞/mL的方式悬浮于上述的各培养基组合物中后, 以150 $\mu$ L/孔接种于96孔平底超低粘附表面微量板 (康宁公司制, #3474)。将细胞于CO<sub>2</sub>孵育器 (37℃、5% CO<sub>2</sub>) 内在静置状态下培养10天。向第4、8、11天的培养液中添加ATP试剂150 $\mu$ L (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega公司制) 而使其悬浮, 于室温静置约10分钟后, 使用FlexStation3 (Molecular Devices公司制) 测定发光强度 (RLU值), 减去仅培养基时的发光值, 算出活细胞的数量 (4个点的平均值)。

[0268] 结果, 使用包含各纳米纤维试样 (15、11~14) 的培养基组合物在96孔平底超低粘附表面微量板中培养来源于人脂肪的间充质干细胞时, 较之试样15而言, 由添加高解纤度 $\alpha$ 甲壳质纳米纤维 (试样11) 所带来的细胞增殖促进作用弱。进一步提高了解纤度的试样 (12~14) 未显示明显的增殖促进作用。各培养中的RLU值 (ATP测定, 发光强度) 示于表14及表15。

[0269] [表14]

[0270]

|               | 第4天   | 第8天   | 第11天  |
|---------------|-------|-------|-------|
| 未添加 (试样9)     | 4972  | 8512  | 6938  |
| 试样15 (0.002%) | 10481 | 18950 | 19409 |
| 试样15 (0.006%) | 9906  | 17758 | 23314 |
| 试样15 (0.02%)  | 9861  | 16065 | 21629 |
| 试样11 (0.002%) | 9170  | 13776 | 14939 |
| 试样11 (0.006%) | 9684  | 13790 | 18219 |
| 试样11 (0.02%)  | 9250  | 12270 | 16744 |
| 试样12 (0.002%) | 8491  | 10658 | 11137 |
| 试样12 (0.006%) | 8083  | 8902  | 10370 |
| 试样12 (0.02%)  | 7706  | 7436  | 8271  |

[0271] [表15]

[0272]

|               | 第4天   | 第8天   | 第11天  |
|---------------|-------|-------|-------|
| 未添加 (试样9)     | 4648  | 3960  | 5375  |
| 试样15 (0.002%) | 10298 | 18656 | 16750 |

|               |       |       |       |
|---------------|-------|-------|-------|
| 试样15 (0.006%) | 10042 | 17958 | 21934 |
| 试样15 (0.02%)  | 10020 | 15931 | 24792 |
| 试样13 (0.002%) | 8765  | 10499 | 12185 |
| 试样13 (0.006%) | 8631  | 9168  | 11430 |
| 试样13 (0.02%)  | 7341  | 7715  | 8381  |
| 试样14 (0.002%) | 8258  | 11109 | 12561 |
| 试样14 (0.006%) | 8504  | 9727  | 10712 |
| 试样14 (0.02%)  | 7500  | 7327  | 8287  |

[0273] 需要说明的是, 试验例8~13中使用的在各种解纤条件(压力·撕碎次数)下制备的 $\alpha$ 甲壳质分散液的物性值( $\alpha$ 甲壳质的实测浓度、粘度、中值粒径、平均粒径)示于表16。

[0274] [表16]

[0275]

| 压力<br>MPa | 撕碎<br>次数<br>循环 | 实测浓度<br>% (w/v) | 粘度 mPa·S<br>(22.3-26.2°C) | 激光衍射<br>中值粒径<br>$\mu\text{m}$ | 激光衍射<br>平均粒径<br>$\mu\text{m}$ |
|-----------|----------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 200       | 1              | 0.77%           | 1.02                      | 55.9                          | 80                            |
|           |                | 0.99%           | 2.10                      | 58.5                          | 68.6                          |
| 200       | 3              | 1.15%           | 4.23                      | 104.6                         | 132.2                         |
| 200       | 5              | 1.19%           | 6.75                      | 68.3                          | 83.5                          |
|           |                | 1.05%           | 6.73                      | 65                            | 80.7                          |
| 200       | 10             | 1.17%           | 71.90                     | 29.8                          | 40.8                          |
| 200       | 20             | 0.96%           | 58.30                     | 38.2                          | 52.8                          |
|           |                | 0.96%           | 53.00                     | 34.3                          | 40.8                          |
| 200       | 50             | 1.05%           | 82.10                     | 0.6                           | 0.93                          |
| 200       | 100            | 1.12%           | 58.50                     | 0.53                          | 0.8                           |
| 200       | 200            | 1.14%           | 32.70                     | 0.67                          | 0.84                          |
| 100       | 5              | 0.84%           | 8.37                      | 96.2                          | 116.1                         |

[0276] 产业上的可利用性

[0277] 由非水溶性多糖类形成的纳米纤维可作为间充质干细胞、前体脂肪细胞等粘附性细胞的i) 培养、ii) 分化诱导、iii) 非冷冻条件下的运输、保存、iv) 移植、v) 生理活性物质从培养上清液的回收等各种操作中的共通的载体使用, 因此, 通过使用本发明的载体, 能够连续性地实施选自上述的i) 培养、ii) 分化诱导、iii) 非冷冻条件下的运输、保存、iv) 移植、v) 生理活性物质从培养上清液的回收中的多种操作。

[0278] 本文提及的全部出版物(包括专利及专利申请说明书在内)中所记载的内容通过引用而与明确记载其全部内容相同程度地并入本说明书中。

[0279] (相关申请的标明)

[0280] 本申请以2017年3月30日在日本提出申请的日本特愿2017-68377及2017年9月11日在日本提出申请的日本特愿2017-174237作为基础, 通过在此处提及, 其内容全部包含于本说明书中。

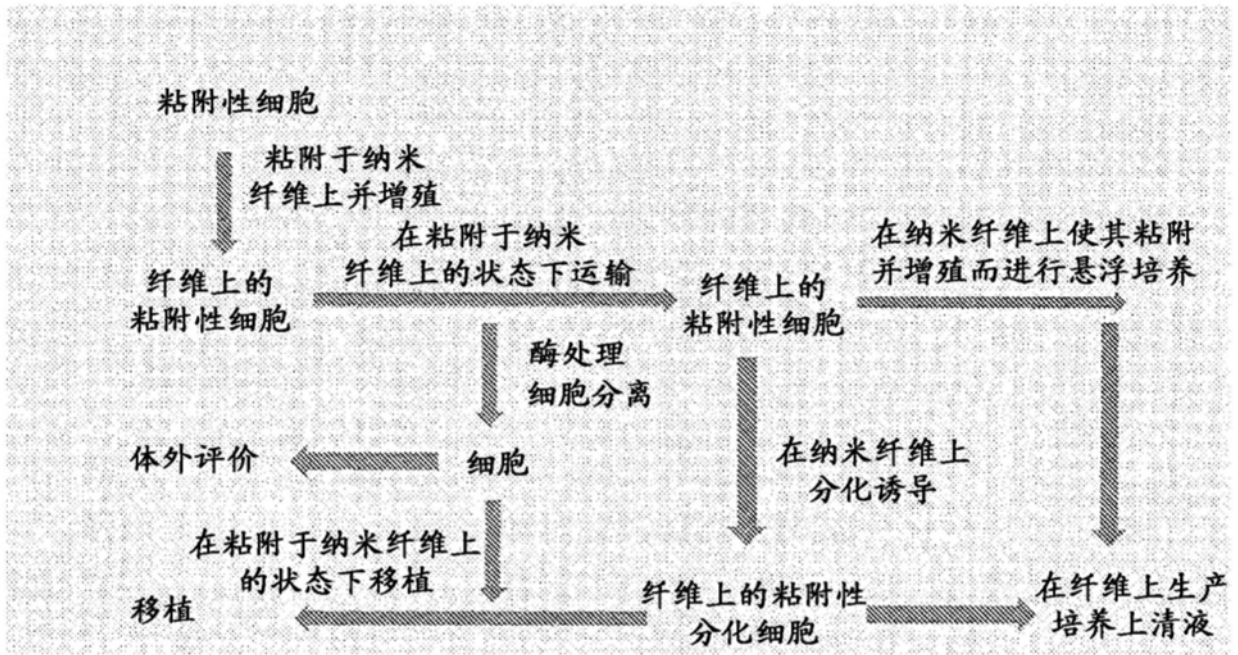


图1

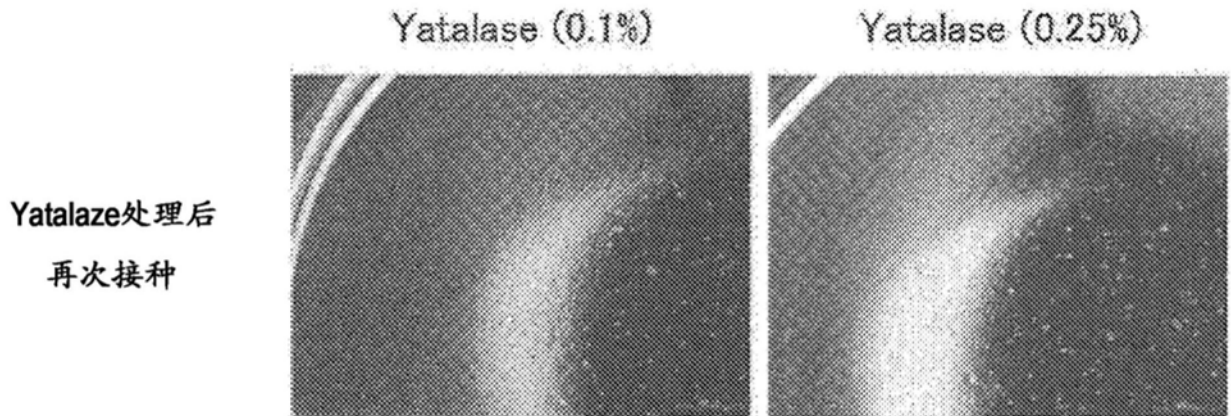
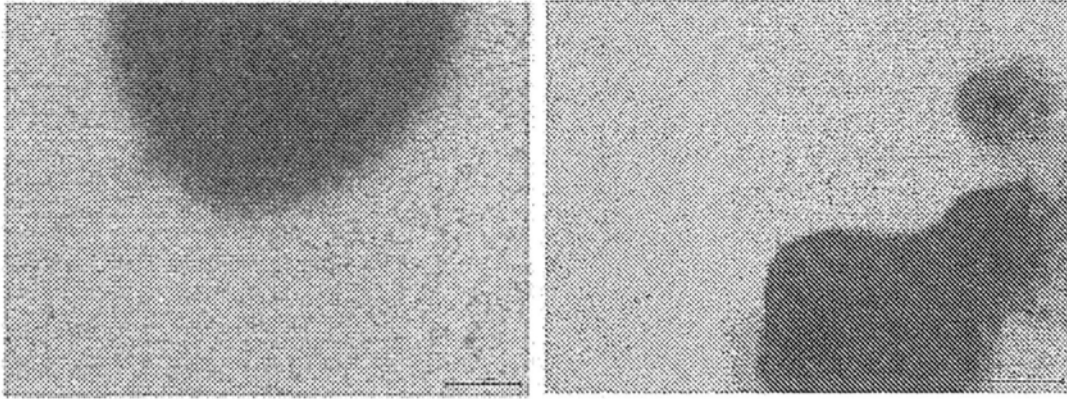


图2

3D (37°C) ⇒ 3D (37°C) ⇒ 2D 再次接种

人前体脂肪细胞增殖培养基

10%FBS-DMEM



3D (37°C) ⇒ 3D (25°C 于管中) ⇒ 2D 再次接种

人前体脂肪细胞增殖培养基

10%FBS-DMEM

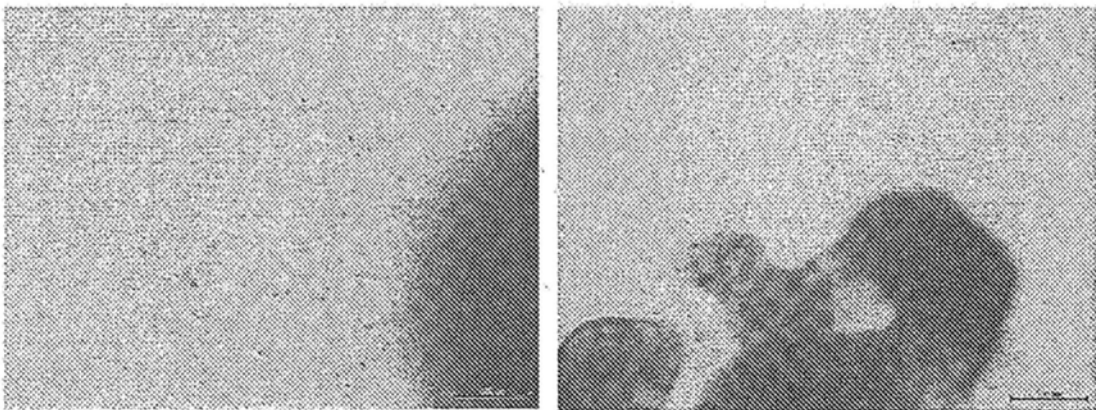
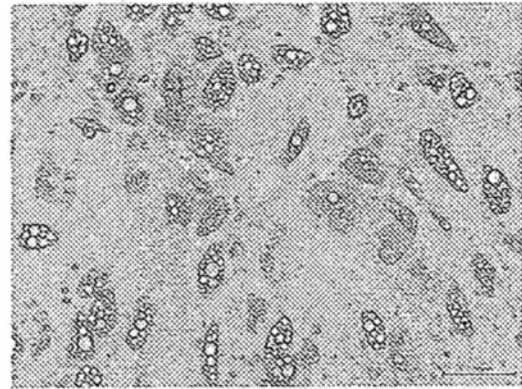
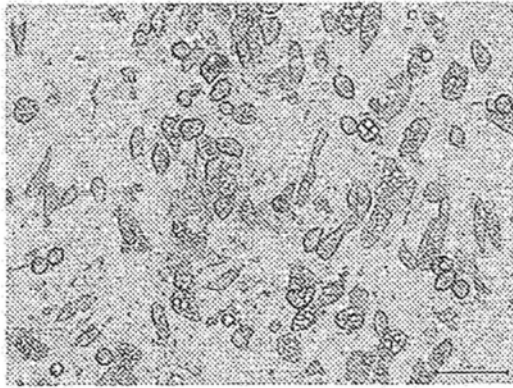


图3

3D (37°C) ⇒ 3D (37°C) ⇒ 2D 再次接种  
⇒ 生长 ⇒ 脂肪细胞分化 (17天)

人前体脂肪细胞增殖培养基

10%FBS-DMEM



3D (37°C) ⇒ 3D (25°C 于管中) ⇒ 2D 再次接种  
⇒ 生长 ⇒ 脂肪细胞分化 (17天)

人前体脂肪细胞增殖培养基

10%FBS-DMEM

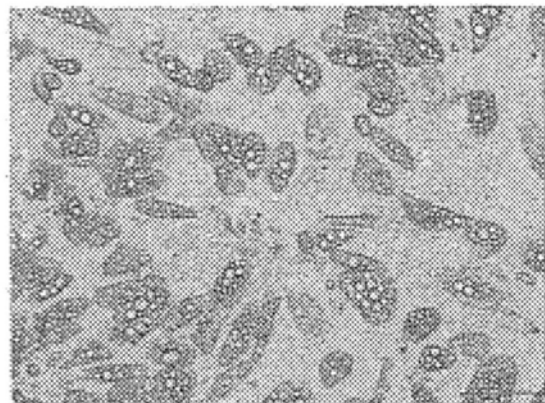
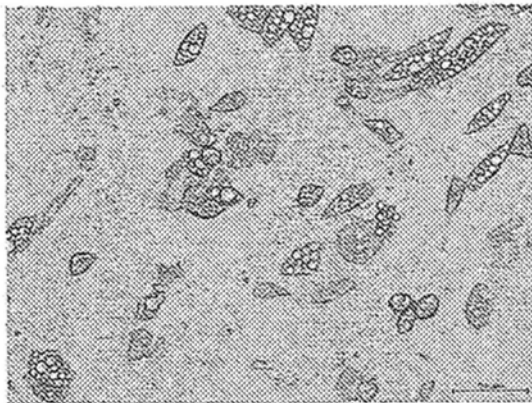
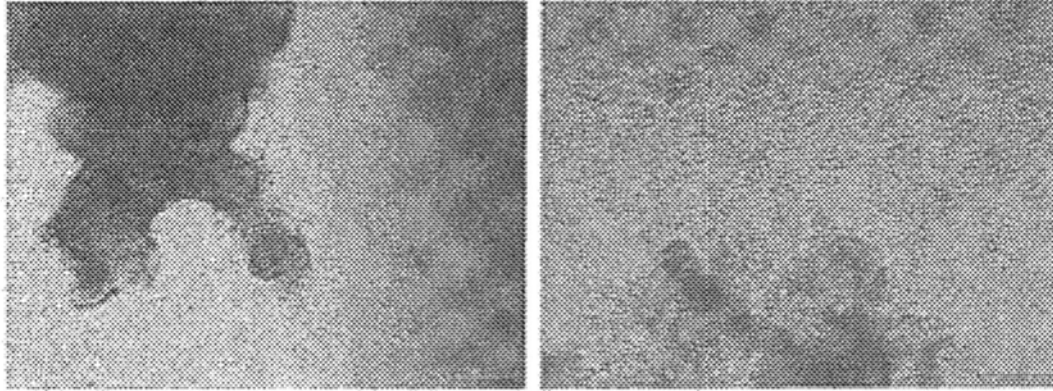


图4

3D (37°C) ⇒ 3D (37°C) ⇒ 2D 再次接种

来源于人脂肪的间充质增殖培养基

10%FBS-DMEM



3D (37°C) ⇒ 3D (25°C 于管中) ⇒ 2D 再次接种

来源于人脂肪的间充质增殖培养基

10%FBS-DMEM

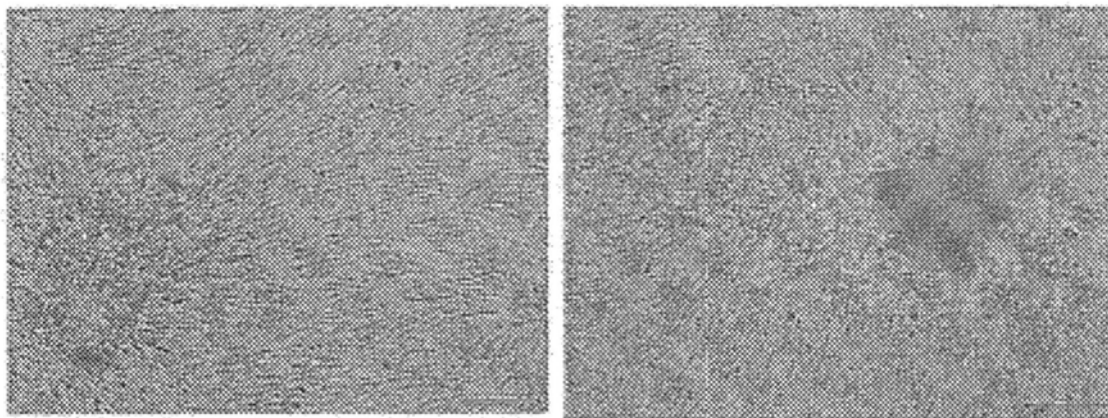
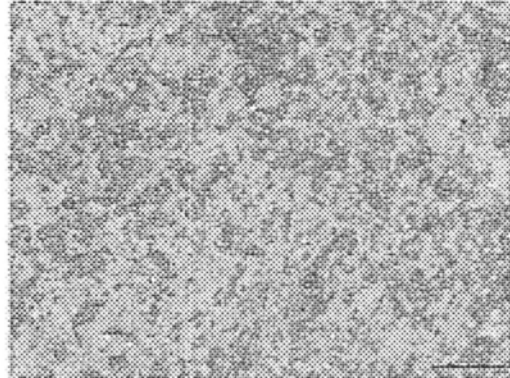
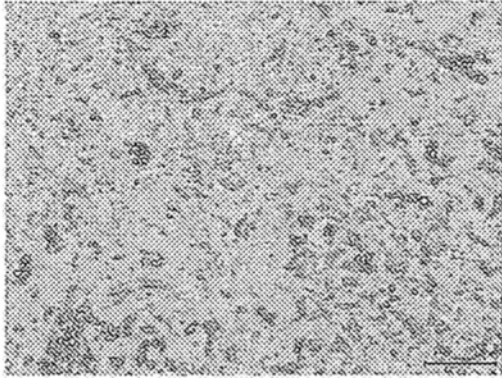


图5

3D (37°C) ⇒ 3D (37°C) ⇒ 2D 再次接种  
⇒ 生长 ⇒ 脂肪细胞分化 (8天)

来源于人脂肪的间充质增殖培养基

10%FBS-DMEM



3D (37°C) ⇒ 3D (25°C 于管中) ⇒ 2D 再次接种  
⇒ 生长 ⇒ 脂肪细胞分化 (8天)

来源于人脂肪的间充质增殖培养基

10%FBS-DMEM

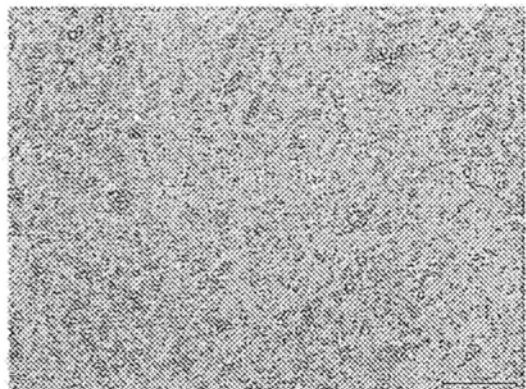
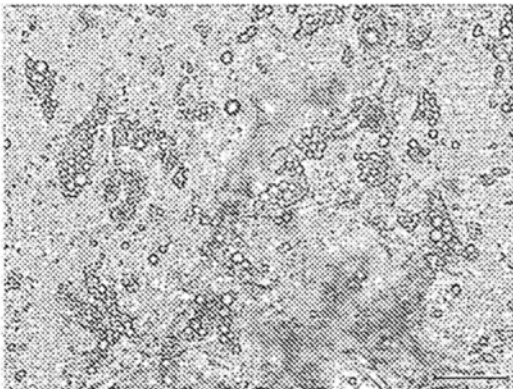


图6

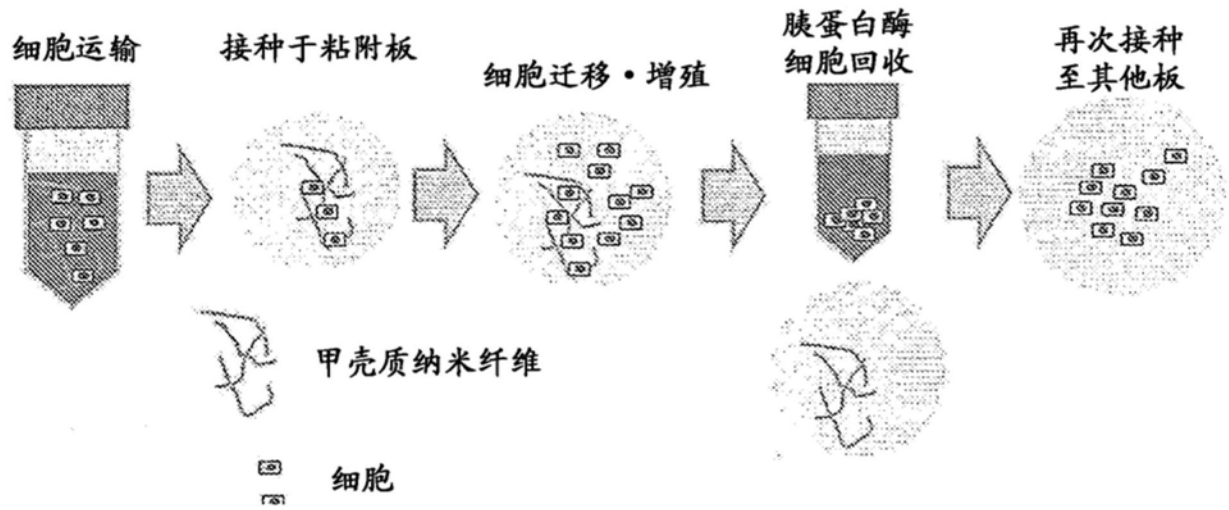


图7

人前体脂肪细胞  
照片 (10天)

未添加

甲壳质纳米纤维 (0.01%)

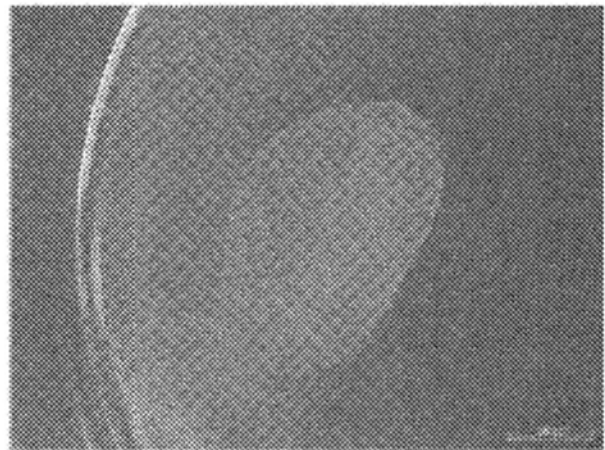
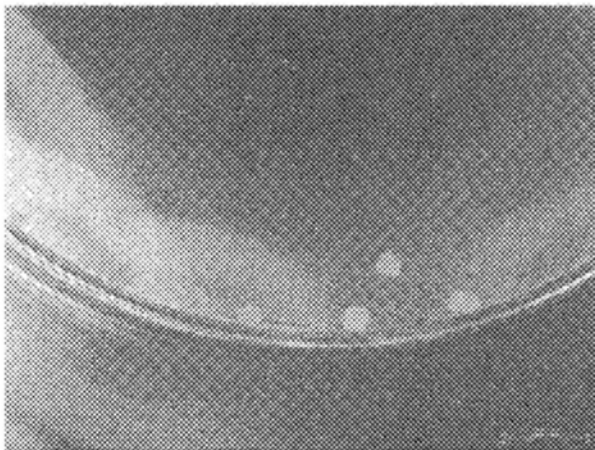


图8