



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I555847 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：102127874

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 02 日

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

(71)申請人：翔宇生醫科技股份有限公司(中華民國) (TW)

臺北市內湖區行愛路 77 巷 65 號 6 樓

蔡嘉樺(中華民國) (TW)

臺北市內湖區行愛路 77 巷 65 號 6 樓

(72)發明人：蔡嘉樺(TW)

(74)代理人：洪堯順

(56)參考文獻：

CN 1346403A

Kim WS et al., Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2007 Oct;48(1):15-24.

Salgado AJ et al., Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. Curr Stem Cell Res Ther. 2010 Jun;5(2):103-10.

Bhang SH et al., Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. Molecular Therapy. Epub 2013 Jan 13.

Xie Y et al., Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. Tissue Eng. 2006 Dec;12(12):3535-43.

Fröhlich M et al., Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. Tissue Eng Part A. 2010 Jan;16(1):179-89.

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：7 共 22 頁

(54)名稱

脂肪幹細胞及其幹細胞分泌物之培養與量產方法

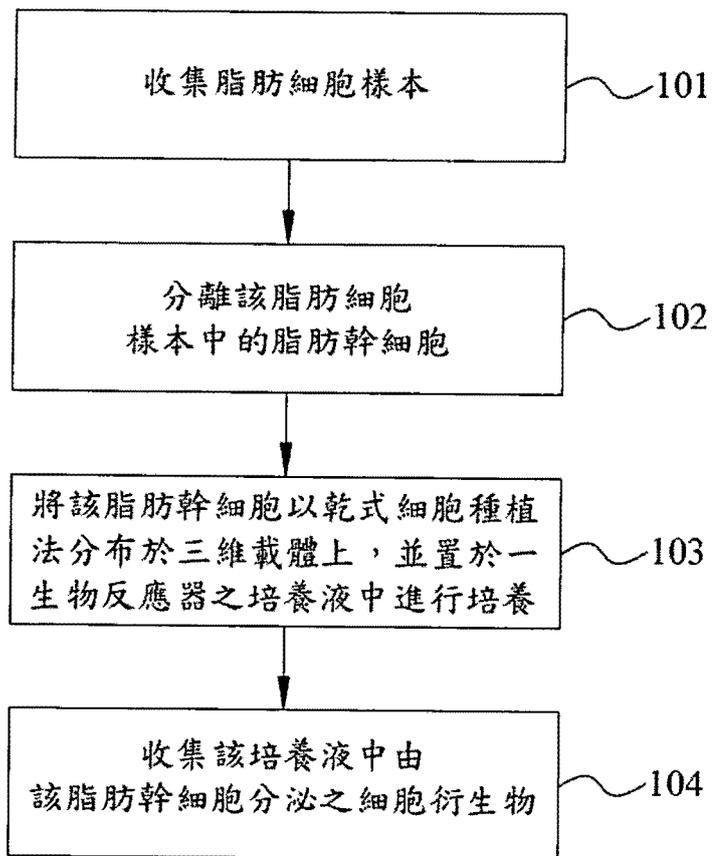
(57)摘要

一種脂肪幹細胞培養及其幹細胞分泌物的量產方法，其步驟包括：(A)收集脂肪細胞樣本；(B)分離該脂肪細胞樣本中的脂肪幹細胞；(C)將該脂肪幹細胞種植於三維載體上，並置於一生物反應器中進行培養；(D)收集由該脂肪幹細胞分泌之幹細胞分泌物；其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子、肝細胞生長因子、介白素-6 及第一型膠原蛋白。藉此，可省去繁複操作步驟與人力、設備等經濟成本，並可快速大量培養脂肪幹細胞及生產其幹細胞分泌物，未來可應用於疾病治療、細胞修復及再生醫學領域。

指定代表圖：

符號簡單說明：

101~104 . . . 步驟



第一圖

發 明 摘 要

※ 申請案號：102127874

※ 申請日：102.8.2

※IPC 分類：A21N5/0775

【發明名稱】（中文/英文）

脂肪幹細胞及其幹細胞分泌物之培養與量產方法

【中文】

一種脂肪幹細胞培養及其幹細胞分泌物的量產方法，其步驟包括：(A)收集脂肪細胞樣本；(B)分離該脂肪細胞樣本中的脂肪幹細胞；(C)將該脂肪幹細胞種植於三維載體上，並置於一生物反應器中進行培養；(D)收集由該脂肪幹細胞分泌之幹細胞分泌物；其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子、肝細胞生長因子、介白素-6 及第一型膠原蛋白。藉此，可省去繁複操作步驟與人力、設備等經濟成本，並可快速大量培養脂肪幹細胞及生產其幹細胞分泌物，未來可應用於疾病治療、細胞修復及再生醫學領域。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（一）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

101~104 步驟

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

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)

脂肪幹細胞及其幹細胞分泌物之培養與量產方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種幹細胞及其幹細胞分泌物之培養與量產方法，特別是關於一種脂肪幹細胞之培養及量產其幹細胞分泌物的方法。

【先前技術】

【0002】 基於近年來生技與醫療技術蓬勃發展，幹細胞因其特有的分化、增生及組織修復潛能，使其在生醫產業日趨重要。無論是全球幹細胞相關公司數量、市值的大幅成長，或是美國食品藥物管理局(FDA)接受以幹細胞申請的臨床案件之逐年上升等情況來看，皆顯示出幹細胞治療已成為國際生技產業重點發展項目。

【0003】 然而，幹細胞的快速分化能力常使其在第3至4次繼代後，逐漸失去其幹細胞特性，以致後續實驗往往無法符合臨床預期。縱使是初代培養的幹細胞，以傳統培養法的幹細胞其特性亦與臨床表現不同。此外，有異於骨髓幹細胞，臍帶血幹細胞及胚胎幹細胞等檢體來源取得較不易，而脂肪為相對容易之檢體取得來源，且檢體取得過程對捐贈者產生的不適感較其他來源輕緩。

【0004】 此外，除了幹細胞本身的醫療應用之外，越來越多針對幹細胞分泌物的研究顯示，幹細胞分泌物的複合組成因子對於再生醫學也有良好表現。歐美均有研究報導，以幹細胞分泌物培養受損之肝臟細胞或其他

哺乳類動物組織，均有細胞增生與組織修復之成果。

【0005】 因此，現階段研究之首要目的即在於延緩幹細胞分化、維持其幹細胞特性並同時大量培養幹細胞及其幹細胞分泌物，以利後續研究。如何藉由改良傳統幹細胞培養方法，進而製造生產大量幹細胞與其幹細胞分泌物以符合當下細胞生物學界之需求，已成了亟待解決之一課題。

【發明內容】

【0006】 基於上述習知問題及需求，本發明主要以異於傳統細胞培養方式之創新3D培養法延緩細胞分化並維持幹細胞特性，同時搭配定時灌流系統以刺激幹細胞分泌物產生。由於3D立體環境培養法對幹細胞特性的維持與其分泌物的組成分之影響，皆可應用於再生醫學且作為其他醫療領域的發展潛能。因此本發明以立體培養法製造生產大量幹細胞與其幹細胞分泌物符合當下細胞生物學界之需求。

【0007】 本發明之一目的為提供一種脂肪幹細胞培養及量產其幹細胞分泌物的方法，利用創新研發之3D培養技術大量培育脂肪幹細胞且量產並收集其幹細胞分泌物以利後期研究發展出個人化幹細胞產品。

【0008】 上述脂肪幹細胞之培養方法之步驟包括：(A)收集脂肪細胞樣本；(B)分離該脂肪細胞樣本中的脂肪幹細胞；(C)將該脂肪幹細胞以乾式細胞種植法分布於三維載體上，並置於一生物反應器中，以定時定量培養液灌流與細胞定時斷食法進行培養；(E)收集由該脂肪幹細胞分泌之幹細胞分泌物；其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、介白素-6(Interleukin-6, IL-6)及第一型膠原蛋白(collagen type I)。

【0009】 在上述方法中，較佳地，步驟(C)更包括以定時定量培養液灌流與細胞定時斷食法進行培養；每個生物反應器裝載之三維載體之數目係介於100~1500個；培養獲取之脂肪幹細胞總數量為 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個/培養瓶。幹細胞分泌物之血管內皮生長因子之濃度可介於593.5~2090 pg/ml、肝細胞生長因子之濃度可介於656.4~1780 pg/ml、介白素-6之濃度可介於151.9~523 pg/ml及第一型膠原蛋白之濃度可介於23.41~42 ng/ml，且脂肪幹細胞於三維載體上之貼覆率較佳地可達到90%。

● 【0010】 本發明相較於傳統細胞培養法有下列優勢：

● 【0011】 藉由三維培養脂肪幹細胞之方法，可省去繁複操作步驟與人力、減少設備空間、量產幹細胞分泌物以及節省細胞培養液之經濟成本。此外，乾式細胞植入技術可改善以往3D培養法細胞貼覆率較差之瓶頸、並以定時定量培養液灌流與細胞定時斷食法，改變幹細胞分泌物之組成及生產量，且在經濟效益方面可節約8至10倍的培養耗材用量與支出。藉由本發明揭露內容，可快速大量培養脂肪幹細胞及大量生產其幹細胞分泌物，以提供疾病治療、細胞修復及再生醫學等領域之研究應用。獨創之細胞培養系統亦可做為其他種類細胞培養之研究開發應用。

【圖式簡單說明】

【0012】 第一圖顯示本發明脂肪幹細胞之培養方法之步驟流程圖；

【0013】 第二圖為脂肪幹細胞之純化步驟流程圖；

【0014】 第三圖為脂肪幹細胞之培養以及幹細胞分泌物之生產步驟流程圖；

【0015】 第四圖顯示經純化培養後之脂肪幹細胞存活率；

【0016】 第五圖顯示以乾式細胞種植法將細胞液均勻分布於培養瓶中的三維載體後的細胞貼覆率；

【0017】 第六圖顯示本發明之方法與習知培養液中的葡萄糖含量比較結果；

【0018】 第七A~七D圖顯示各種幹細胞分泌物之濃度比較。

【實施方式】

● 【0019】 參閱第一圖，其顯示本發明脂肪幹細胞培養及量產其幹細胞分泌物的方法之步驟流程圖。本發明主要提供一種脂肪幹細胞及其幹細胞分泌物之培養與量產方法，步驟包括：收集脂肪細胞樣本(步驟101)；分離該脂肪細胞樣本中的脂肪幹細胞(步驟102)；將該脂肪幹細胞以乾式細胞種植法分布於三維載體上，並置於一生物反應器中進行培養(步驟103)；收集該培養液中由該脂肪幹細胞分泌之幹細胞分泌物(步驟104)。其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、介白素-6(Interleukin-6, IL-6)及第一型膠原蛋白(collagen type I)。

● 【0020】 在上述方法中，較佳地，幹細胞分泌物之血管內皮生長因子之濃度介於593.5~2090 pg/ml，肝細胞生長因子之濃度介於656.4~1780 pg/ml、介白素-6之濃度介於151.9~523 pg/ml及第一型膠原蛋白之濃度介於23.41~42 ng/ml，培養獲取之脂肪幹細胞總數量為 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個/培養瓶，且脂肪幹細胞於三維載體上之貼覆率較佳地可達到90%，每個生物反應器裝載之三維載體之數目係介於100~1500。上述內容僅是先行簡述各步

驟，具體實施方式將詳述如后。

脂肪幹細胞之分離及純化

【0021】 參閱第二圖，其顯示脂肪幹細胞之純化步驟流程圖。如圖所示，步驟201~208分別為：清洗脂肪，待脂肪分層後去掉下方血水廢液(步驟201)，將脂肪移至離心管中離心(步驟202)，將脂肪塊倒入盤中剪碎後移至離心管中(步驟203)，加入膠原蛋白酶後放入培養箱，並慢速轉動以混合均勻(步驟204)，將混合液過濾至離心管內離心(步驟205)，離心後取出細胞沉澱物清洗，然後再次離心(步驟206)，將細胞沉澱物以dPBS分散，然後再過濾離心(步驟207)，取離心之上清液並送檢驗部門進行無菌檢驗、黴漿菌及內毒素含量測試(步驟208)，離心後所得之脂肪幹細胞再於傳統培養瓶中培養。由於步驟201~208之脂肪檢體收集及幹細胞分離與習知技術相同，在此不針對細節部份進行說明。

高效能脂肪幹細胞培養及其幹細胞分泌物之收集

【0022】 完成上述脂肪幹細胞之分離及純化步驟後，先進行第一次放大培養，其存活率如第四圖所示。接著進行後續之高效能脂肪幹細胞培養及其幹細胞分泌物之收集，其分別為步驟301~310，如第三圖所示。

【0023】 將培養盤中之細胞懸浮於容器中(步驟301)。

【0024】 以乾式細胞種植法將細胞液均勻分布於培養瓶中的三維載體上(步驟302)。三維載體數量較佳為100~1,500個，其材質可以是玻璃纖維、PET或其他具有孔隙、孔洞，以及適用於脂肪細胞貼覆培養、兼具生物相容性材質。習知的濕式細胞種植法是將三維載體、培養液和細胞置於離心管中，讓細胞自行貼附於載體上，唯此法需靜置擺放且需定時進行搖晃，

步驟較繁瑣且所需時間較長。而在此採用的乾式細胞種植法和習知濕式細胞種植法不同之處在於，乾式細胞種植法是將含有特定數量的細胞液直接分布在乾燥的三維載體上，節省了上述靜置擺放、搖晃等步驟及所需時間，且藉此種改良之乾式種植法大幅提高了細胞於載體上的貼覆率。

【0025】 參閱第五圖，在經過約200分鐘後，以乾式細胞種植法所得之細胞貼覆率可達到約90%，確實地改善習知脂肪幹細胞培養技術貼覆率不高之缺點。乾式細胞種植法之步驟係如下所示：

● 【0026】 前置作業

【0027】 a. 以細胞培養技術於傳統培養瓶將脂肪幹細胞放大培養。

【0028】 b. 於操作前準備100~1500個三維載體。

● 【0029】 操作步驟

【0030】 1. 移除培養盤中的舊培養液。2. 以dPBS(杜式磷酸緩衝液)清洗細胞2次。3. 加入適量胰蛋白酶-EDTA溶液，使所有細胞懸浮。4. 以適量培養液將細胞懸浮液中和後離心300-500g/3-10分鐘。5. 去除上清液，保留管底細胞，以培養液將細胞沖散懸浮至每毫升約1千萬至1千5百萬顆細胞。6. 將細胞懸浮液均勻分布於生物反應器專用瓶中的三維載體上。此步驟較佳為使用上述之乾式細胞種植法，可獲得較好的細胞貼覆率。7. 將生物反應器專用瓶置於37°C，5% CO₂培養箱中靜置60-120分鐘(步驟303)。

【0031】 培養液倒入生物反應器專用瓶中後置於培養箱中培養(步驟304)。在此使用之培養液成分包括培養液(DMEM、DMEM/F12、F12、StemPro...等任何一種)、胎牛血清(FBS)、抗生素(gentamicin、penicillin...等)，與習知培養皿法相似，在此不再贅述。惟在進行細胞植入以及細胞數

目放大時使用含有動物來源的添加物，例如FBS，須為CTS等級或是狂牛症非疫區之來源。

【0032】 串接生物反應器專用瓶與含培養液的血清瓶(步驟305)。

【0033】 再將串接管線裝於蠕動幫浦上(步驟306)。

【0034】 定時定量灌流細胞培養液(步驟307)。在此步驟可配合給予特定次數及特定時間長度的斷食，以刺激幹細胞調整其幹細胞分泌物之組成比例及產量。

● 【0035】 培養數十小時後即可收集含高濃度生長因子之幹細胞分泌物(步驟308)。進行幹細胞分泌物收集時，不可使用動物血清，以無動物來源(xeno-free)、無抗生素的培養液或是基礎培養液進行，以避免因為成品中含有非人類成分而造成使用者過敏。以下為脂肪幹細胞於生物反應器中培養並收集幹細胞分泌物之詳細步驟，以使該上述步驟更為明確：

【0036】 1. 將脂肪幹細胞培養於三維載體上，於生物反應器中進行培養，培養液為含10%胎牛血清之DMEM/F12。

● 【0037】 2. 培養時將生物反應器專用瓶裝置於生物反應器上。

【0038】 3. 培養期間每2-3日以緩衝液清洗並更換培養液。緩衝液可為dPBS或PBS。

【0039】 4. 培養7~10日後即可開始收集脂肪幹細胞分泌物。

【0040】 5. 去除舊培養液後以約1-2公升緩衝液清洗含有三維載體之生物反應器專用瓶。緩衝液可為dPBS或PBS。

【0041】 6. 加入培養液DMEM/F12。使用的培養液可為DMEM、DMEM/F12、F12、StemPro...等任何一種，並非僅限於在此所述之

DMEM/F12。

【0042】 7. 以灌流管線串連血清瓶與生物反應器專用瓶，並搭載蠕動幫浦以調控流速及流量，藉此達成定時定量及細胞定時斷食之目的。

【0043】 8. 培養48~72小時後收集細胞培養液中之脂肪幹細胞分泌物。

【0044】 細胞可繼續進行培養與收集幹細胞分泌物(步驟309)。

【0045】 收集之幹細胞分泌物以恆溫恆濕保存(步驟310)。

【0046】 就習知利用培養皿之培養方法而言，10-cm 培養皿所能培養的人類脂肪幹細胞約為 1×10^6 個，所能獲取的培養液體積約為10~15 ml；T-175培養角瓶所能培養的人類脂肪幹細胞約為 2.5×10^6 個，所能獲取的培養液體積約為40~100 ml，而本方法之脂肪幹細胞總數量較佳可達到 1×10^9 個/培養瓶，而一次所能獲取之細胞培養液最多為12 L。

細胞分化程度比較

【0047】 參閱第六圖，其顯示本發明之方法與習知培養液中的葡萄糖含量比較結果。由於過去研究發現幹細胞對葡萄糖利用率與細胞分化程度有關，細胞分化程度越大時，對葡萄糖的利用率越高，透過分析傳統法與本發明之三維培養法的培養液中葡萄糖含量可發現，三維培養法的培養液葡萄糖含量顯著高於傳統法，顯示脂肪幹細胞在三維立體環境下培養較能維持幹細胞之特性。

幹細胞分泌物濃度比較

【0048】 經由上述步驟收集得到的幹細胞分泌物，其中包括了多種幹細胞分泌物，其中至少包含有血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth

factor, VEGF)、肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、介白素-6(Interleukin-6, IL-6)及第一型膠原蛋白(collagen type I)。除上述幾種因子外,培養所得之幹細胞尚可能含有其他多種細胞激素(cytokine)與細胞外基質(ECM);例如:生長因子(Growth Factor)、細胞介素(Interlukin)及細胞骨架(cytoskeleton)等等,在此僅以血管內皮生長因子、肝細胞生長因子、介白素-6及第一型膠原蛋白之檢測為例,並非僅限於此。

● **【0049】** 將本發明方法與傳統培養盤之結果作比較,以上述因子的濃度作為比較基準。請參閱第七A~七D圖,並同時參閱表1。創新法即為本發明揭露之培養方法,在培養時培養瓶內含1000片三維載體,黑、白、灰色bar分別代表以500 mL、2700 mL及6000 mL培養液灌流48~50小時後收取,並以ELISA kit分別偵測VEGF、HGF、LI-6及Collagen type I濃度。傳統法為使用T75培養瓶,以 34mL DMEM/F12 培養液培養48~50小時後收取,並以ELISA kit分別偵測VEGF、HGF、LI-6及Collagen type I濃度。

● **【0050】** 在相同細胞來源、培養液條件、溫度和二氧化碳濃度的培養狀況下,以T75培養瓶所獲取培養液中所測得VEGF濃度為 246.78 ± 58.64 pg/ml,而本發明培養方法為 1987.18 ± 103.25 pg/ml。以T75培養瓶所獲取培養液中所測得HGF濃度為 299.31 ± 86.3 pg/ml,而本發明培養方法為 1613.25 ± 166.71 pg/ml。以T75培養瓶所獲取培養液中所測得IL-6濃度為 76.21 ± 22.65 pg/ml,而本發明培養方法為 514.12 ± 9.29 pg/ml。以T75培養瓶所獲取培養液中所測得collagen type I濃度為 17.75 ± 6.96 ng/ml,而本發明培養方法為 39.45 ± 2.55 ng/ml。兩種培養方式之VEGF、HGF、IL-6及collagen type I濃度以Student's t test進行雙尾統計分析,結果顯示皆具有顯著差異,

故使用本發明方法所測得之VEGF、HGF、IL-6及collagen type I濃度顯著較高。

表1

	傳統法	創新法(本發明)
VEGF (pg/mL)	246.78±58.64	1987.18±103.25
HGF (pg/mL)	299.31±86.3	1613.25±166.71
IL-6 (pg/mL)	76.21±22.65	514.12±9.29
collagen type I (ng/mL)	17.75±6.96	39.45±2.55

● **【0051】** 綜上所述，本發明揭露之培養方法相較於傳統細胞培養法有下列優勢：

【0052】 短期大量培養脂肪幹細胞、省去繁複操作步驟與人力、減少設備空間、量產幹細胞分泌物以及節省細胞培養液之經濟成本。此外，具有乾式細胞植入技術可改善習知培養法細胞貼覆率較差之瓶頸、以及藉由定時定量培養液灌流與細胞定時斷食法，以改變幹細胞分泌物之組成及生產量。

● **【0053】** 以T175細胞培養瓶為例，可培養的面積為175 cm²，每次操作僅能操作單一細胞培養瓶。本計畫使用之三維載體的有效培養面積約為25 cm²，而每個生物反應器最多可裝載1,500個載體總共僅需500ml培養液，相當於同時培養214個T175細胞培養瓶，此需約4,000-6,500 ml。經濟效益方面可節約8至10倍的培養耗材用量與支出。以一個培養批次（一整個細胞培養箱）為例，一個細胞培養箱可同時培養144個T25細胞培養瓶或是2個生物反應器。若分別以T25細胞培養瓶及本發明之3D高效能系統進行培養，與利用T25細胞培養瓶的傳統生產方式相比，3D高效能系統的每個培養批次可減

少工時至少24小時，同時達成約27倍的產量。

幹細胞分泌物之檢測

【0054】 為驗證所生產之幹細胞分泌物，不會對細胞產生不正常增生等影響，將收取之培養液，進行人類纖維母細胞(human foreskin fibroblast, HSF)培養。

【0055】 培養3天後進行細胞增殖倍率分析，以20%或是100%幹細胞分泌物培養之細胞，細胞增殖倍率分別為 1.7 ± 0.3 和 1.3 ± 0.2 。

【0056】 以5%或10%FBS培養3天的HSF細胞增殖倍率分別為 4.4 ± 0.2 和 6.3 ± 0.4 ，均比幹細胞分泌物顯著較高。經由上述測試得以證明，本發明之培養方法所生產之幹細胞分泌物沒有人體使用上的安全疑慮。

【0057】 依據上述內容，本發明可快速大量培養脂肪幹細胞及量產其幹細胞分泌物，以提供疾病治療、細胞修復及再生醫學等領域之研究應用。獨創之細胞培養系統亦可做為其他種類細胞培養之研究開發應用。

【0058】 由以上實施例可知，本發明所提供之脂肪幹細胞之培養方法及其幹細胞分泌物確具產業上之利用價值，惟以上之敘述僅為本發明之較佳實施例說明，凡精於此項技藝者當可依據上述之說明而作其它種種之改良，惟這些改變仍屬於本發明之精神及以下所界定之專利範圍中。

【符號說明】

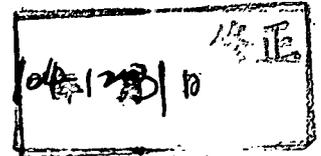
【0059】 101~104 步驟

【0060】 201~208 步驟

【0061】 301~310 步驟

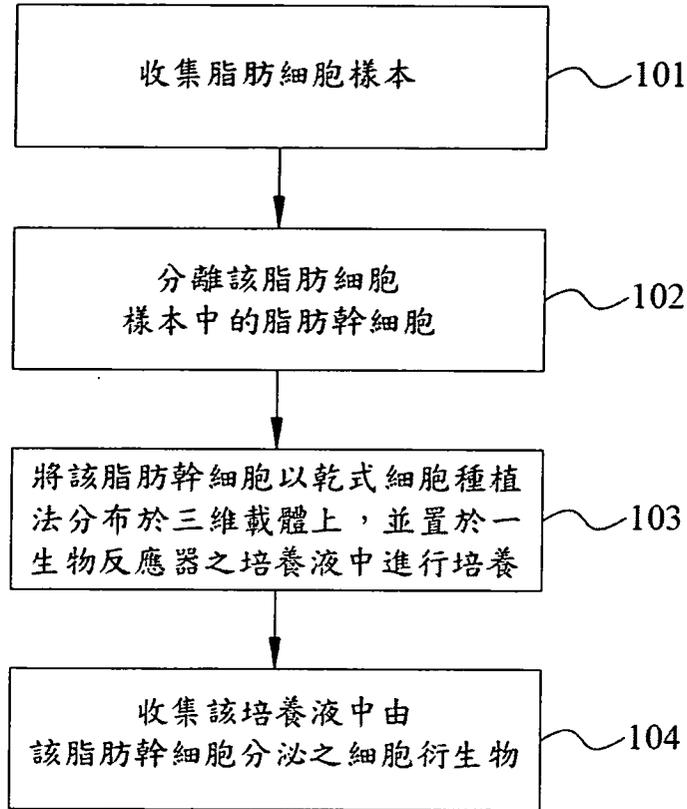
申請專利範圍

1. 一種脂肪幹細胞培養及量產其幹細胞分泌物的方法，其步驟至少包括：
 - (A) 收集脂肪細胞樣本；
 - (B) 分離該脂肪細胞樣本中的脂肪幹細胞；
 - (C) 將含有預定數量的脂肪幹細胞的細胞液直接分布於乾燥的三維載體上，並置於一生物反應器之培養液中進行培養；
 - (D) 收集由該脂肪幹細胞分泌之幹細胞分泌物；其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、介白素-6(Interleukin-6, IL-6)及第一型膠原蛋白(collagen type I)。
2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中步驟(C)所述的培養更包括以定時定量培養液灌流與細胞定時斷食法進行培養。
3. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該幹細胞分泌物之血管內皮生長因子之濃度介於593.5~2090 pg/ml，肝細胞生長因子之濃度介於656.4~1780 pg/ml、介白素-6之濃度介於151.9~523 pg/ml及第一型膠原蛋白之濃度介於23.41~42 ng/ml。
4. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中培養獲取之該脂肪幹細胞總數量為 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個/培養瓶。
5. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該脂肪幹細胞於三維載體上之貼覆率可達到90%。
6. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該每個生物反應器裝載之三維載體之數目係介於100~1500個。

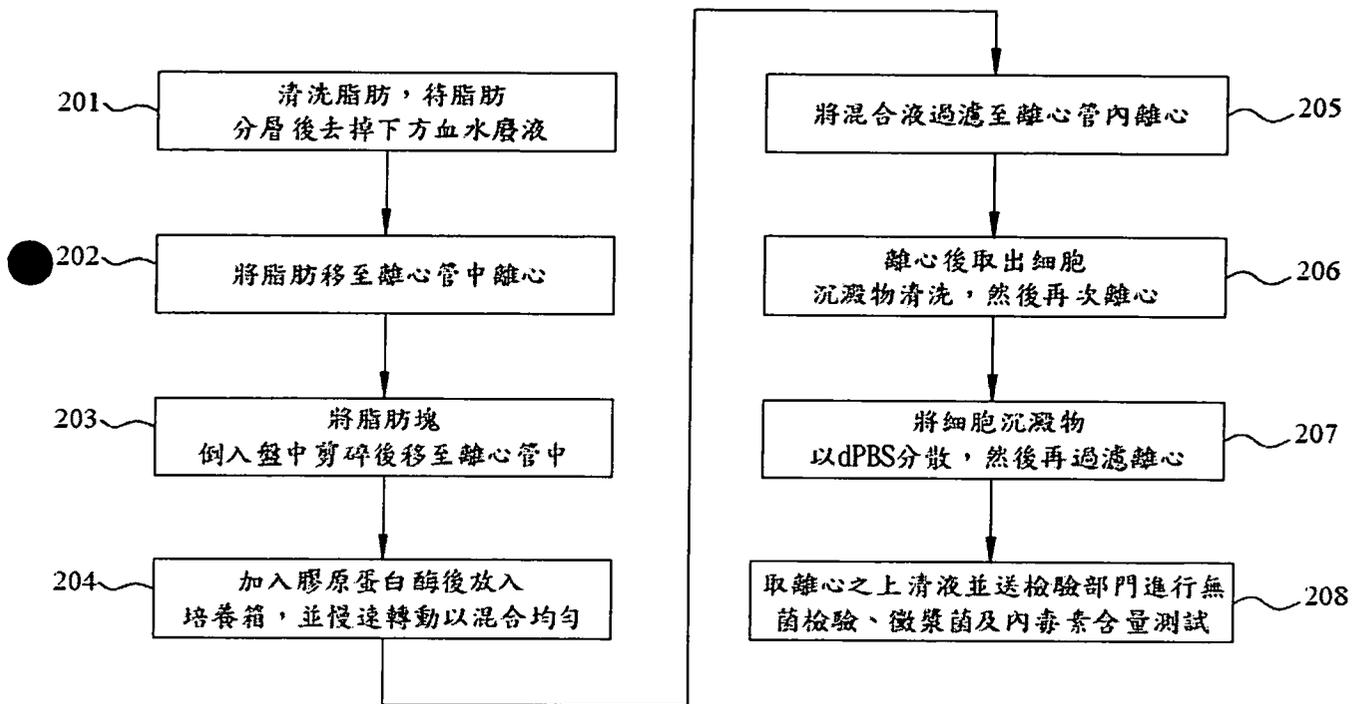


7. 一種幹細胞分泌物，係以如申請專利範圍第1項所述之方法所取得，其中該幹細胞分泌物至少包括血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、介白素-6(Interleukin-6, IL-6)及第一型膠原蛋白(collagen type I)，其中該幹細胞分泌物之血管內皮生長因子之濃度介於593.5~2090 pg/ml，肝細胞生長因子之濃度介於656.4~1780 pg/ml、介白素-6之濃度介於151.9~523 pg/ml及第一型膠原蛋白之濃度介於23.41~42 ng/ml。

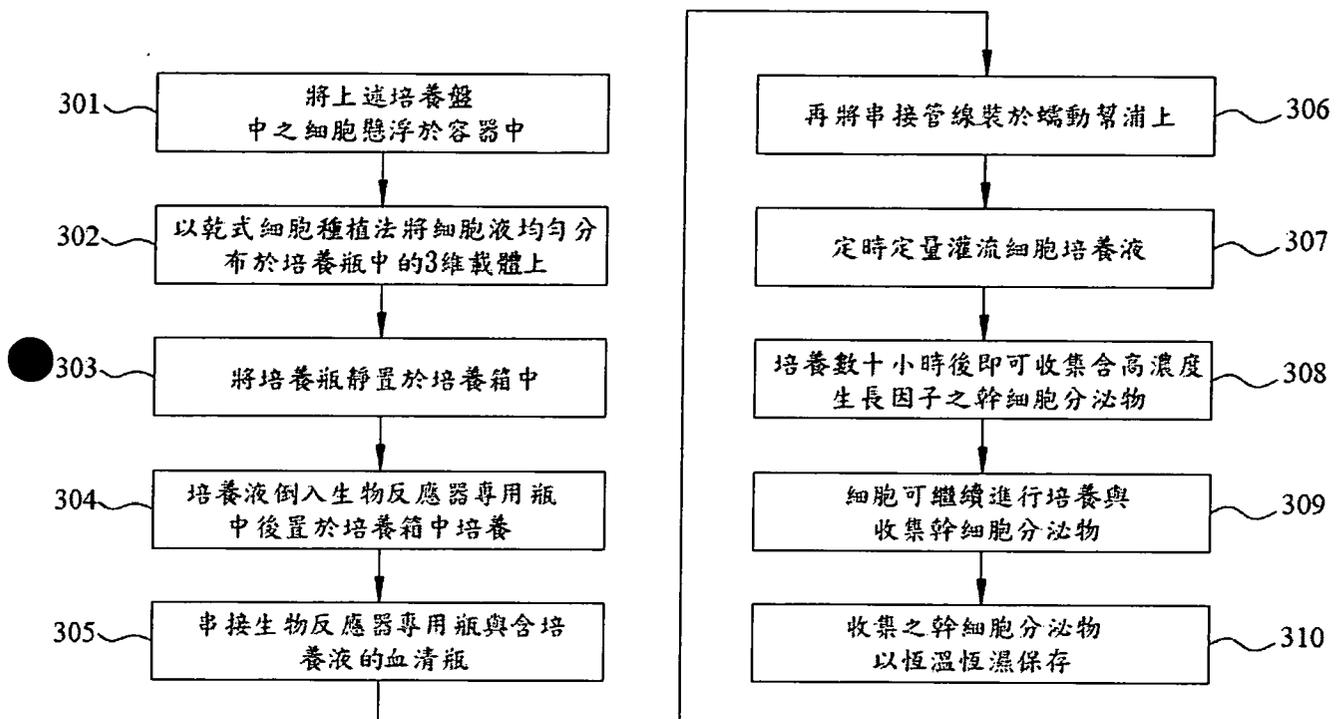
公告本 圖式



第一圖



第二圖



第三圖