



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1662645 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 03814935.4
 (22) 申请日 2003.06.23
 (30) 优先权数据
 182386/2002 2002.06.24 JP
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2004.12.24
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/JP2003/007906 2003.06.23
 (87) PCT申请的公布数据
 W02004/007700 JA 2004.01.22
 (73) 专利权人 田边三菱制药株式会社
 地址 日本大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号
 (72) 发明人 中山孝 井上顺雄 近藤靖
 铃木丰
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
 代理人 曹雯 王景朝
 (51) Int. Cl.
 C12N 5/079 (2010.01)
 A61P 25/00 (2006.01)
 A61K 35/30 (2006.01)

factor treatment produces differential effects on survival and neurite outgrowth from identified bulbospinal neurons in vitro..Exp. Neurol.163 2.2000, 357-372.
 Kawasaki,H., et al..Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells bystromal cell-derived inducing activity..Neuron28 1.2000, 第31-33页左手栏,第35页-36页.
 Zhang,SC., et al..In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells..Nat. Biotechnol.19 12.2001, 第1129-1132页.
 Yoshida,M., et al..Neurotrophic effects of conditioned media of astrocytes isolated from different brain regions on hippocampal and cortical neurons..Experientia51 2.1995, 133-136.
 Roussetlet,A, et al..In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors..Dev. Biol.137 1.1990, 33-45.
 审查员 李振鹏

(56) 对比文件
 Pataky, DM, et al..Fibroblast growth

权利要求书1页 说明书23页 附图22页

(54) 发明名称
 神经细胞的制备方法

(57) 摘要

本发明大量提供基本上分离的神经细胞,以及针对神经变性部位、神经损伤等神经再生疾病的神经再生医疗方法。本发明还提供在星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上等等的成分存在下,对胚胎干细胞进行悬浮培养,制备基本上分离的神经细胞的方法,和以通过该方法得到的神经细胞、所述神经干细胞作为有效成分的细胞医药组合物,以及将所述神经细胞导入神经变性部位或神经损伤部位的神经变性部位或神经损伤部位治疗方法。

1. 基本上分离的神经细胞的制备方法,其特征在于,所述方法包含在星形胶质细胞条件培养基存在下,对哺乳动物的胚胎干细胞进行悬浮培养,其中,所述的哺乳动物选自小鼠、长尾猴以及大鼠。

2. 权利要求 1 所述的神经细胞的制备方法,其中,所述方法包括 (A) 步骤:在星形胶质细胞条件培养基存在下,对所述胚胎干细胞进行悬浮培养,形成干细胞球状凝集体,即 SCS,的步骤。

3. 权利要求 2 所述的神经细胞的制备方法,其中包括在 (A) 步骤后进行下述步骤:

(B) 在存在碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和 / 或上皮生长因子 EGF、而且有选自聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™ 的细胞粘附分子存在的情况下,对在该步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体,即 SCS,进行培养的步骤,

通过该步骤获得由 SCS 迁移出的神经干细胞。

4. 权利要求 3 所述的神经细胞的制备方法,其中在步骤 (B) 的培养是使在步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体,即 SCS,与带有选自聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™ 的细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附的状态下进行的。

5. 权利要求 1 所述的神经细胞的制备方法,其中包括步骤 (A') :在存在星形胶质细胞条件培养基,而且有碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和 / 或上皮生长因子 EGF 存在的情况下,对胚胎干细胞进行悬浮培养,由此在干细胞球状凝集体,即 SCS,内获得神经干细胞的步骤。

6. 权利要求 2 所述的神经细胞的制备方法,其中在 (A) 步骤后进行步骤 (B') :在没有碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和 / 或上皮生长因子 EGF 存在、但有星形胶质细胞条件培养基存在的情况下,进行使在步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体,即 SCS,与带有选自聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™ 的细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附培养的步骤,通过该步骤得到神经元。

7. 权利要求 2 所述的神经细胞的制备方法,其中在 (A) 步骤后进行步骤 (B) 在存在碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和 / 或上皮生长因子 EGF、且有选自聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™ 的细胞粘附分子存在的情况下,对在步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体,即 SCS,进行培养的步骤,以及

步骤 (C) :在没有 bFGF 和 / 或 EGF 存在下,进行使在步骤 (B) 中得到的 SCS 在与带有细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附的情况下进行培养的步骤,通过该步骤获得由 SCS 迁移出的细胞作为神经胶质细胞。

8. 神经元的制备方法,其特征是在没有碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和 / 或上皮生长因子 EGF 存在、但有星形胶质细胞条件培养基存在的情况下,使由权利要求 1 ~ 5 中任意一项所述的制备方法得到的神经细胞在与所述神经干细胞与带有选自聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™ 的细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附的状态下进行培养。

神经细胞的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及可以获得基本上分离的神经细胞的制备方法、基本上分离的神经干细胞、基本上分离的神经元、基本上分离的神经胶质细胞、细胞药物组合物的神经细胞、以及神经变性疾病或神经损伤的治疗方法。

背景技术

[0002] 现在为了由胚胎干细胞制备神经细胞,主要通过以下 4 个方法进行。

[0003] ①用视黄酸对胚胎干细胞凝集体的悬浮培养物进行处理,通过该处理,诱导其向各种神经细胞分化的方法 [Bain, G. 等人, *Dev. Biol.*, 168 :642-657(1995)]

[0004] ②在制备胚状体 [称为 EB],并用无血清的培养液对该 EB 进行培养,获得作为神经上皮干细胞蛋白阳性细胞的神经干细胞,在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 存在下,对该神经干细胞进行培养,诱导所得的细胞向神经细胞分化的方法 [Okabe, S. 等人, *Mech. Dev.*, 59 :89-102(1996)] ;

[0005] ③通过在建成的基质细胞上培养胚胎干细胞 (ES 细胞),使其形成集落,并使所述集落向神经细胞分化的方法 (SDIA 法) [Kawasaki, H. 等人, *Neuron*, 28 :31-40(2000)] ;以及

[0006] ④在白血病抑制因子 (LIF) 存在下,对 ES 细胞进行悬浮培养,由存在于 ES 细胞中的约 0.2% 的神经干细胞制备神经球 (neural sphere),然后使所述神经球分化成神经细胞分化诱导的方法 [Tropepe V. 等人, *Neuron* 30 :65-78(2001)]。

[0007] 然而,按照这些方法,从由视黄酸引起分化细胞的致畸性、制备神经干细胞需要的时间、分化的比例、产率等观点考虑,现状是难于确保充足量的用于再生医疗的细胞。

[0008] 神经干细胞是具有可以分化为神经元和神经胶质细胞的多能性,而且具有自我更新能力的细胞,对于神经系统的移植再生医学起着重要作用的细胞。作为以未分化状态维持神经干细胞并其增殖的方法,确立了神经球 (神经球) 法 [Reynolds, B. A. 等人, *J. Neurosci.*, 12 :4565-4574, (1992)、Reynolds, B. A. 等人, *Science* 255 :1707-1710, (1992)]。按照上述神经球法,将含有从脑分离的神经干细胞的细胞群在含有 N2 添加物 [N2 添加物:胰岛素、铁传递蛋白、硒、孕酮] 和 20ng/ml 表皮生长因子 (也称为 EGF) 和 / 或 20ng/ml bFGF 的 DMEM :F-12 无血清培养基中进行培养,只有在上述培养基条件下能够生存的神经干细胞增殖。增殖的神经干细胞对作为标志物的中间丝神经上皮细胞蛋白而言是阳性的,可以形成细胞凝集体 (神经球),在悬浮状态下进行培养。上述的神经球如果在不含生长因子的粘附性基质包被的平板上培养,发现向神经细胞、星形胶质细胞、少突神经胶质细胞等分化 (多样分化能力)。另外,将神经球分离成单细胞,如果在含有生长因子的无血清培养基中对该细胞进行培养,则所分离的细胞可再形成神经球 (自我更新能力)。然而,所存在的缺陷在于神经球并不是由所有细胞,而只是由一部分细胞形成的。

[0009] 另外,作为与神经球法不同的方法,在用粘附性基质包被的板上对神经干细胞进行培养,使其增殖、分化的单层培养法也已确立。作为上述单层培养法,有通过密度梯

度离心对神经干细胞进行浓缩,进行单层培养的方法 [Palmer, T. D. 等人, J. Neurosci., 19 :8487-8497 (1999)]、在低密度下进行单层培养,使神经干细胞集落化增殖的方法 [Ray, J. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :3602-3606 (1993)、Gage, F. H 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 :11879-11883 (1995)]。上述单层培养法由于可以鉴定各种细胞,适合用于由神经干细胞分化成了哪一种细胞的细胞系谱的解析。然而,现状是将神经干细胞保持在未分化状态是困难的,由于该神经干细胞的增殖缓慢,不适合需要大量神经干细胞的目的。

[0010] 因此,在神经球法以及单层培养法中的任一种方法中,正确判断哪种细胞作为未分化神经干细胞进行增殖是困难的。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供神经细胞的制备方法,由此可以至少实现下述之一,即:获得基本上分离的神经细胞、大量获得神经细胞,和提供对胚胎干细胞来源没有限定的神经细胞。另外,本发明的目的还在于提供作为对神经变性疾病(例如,帕金森病、阿耳茨海默病等)、脊髓损伤、脑梗塞等的神经再生医疗等中的细胞或组织的供给源有用的基本上分离的神经干细胞。另外,本发明的目的还在于提供对神经变性疾病(例如,帕金森病、阿耳茨海默病等)、脊髓损伤、脑梗塞等的神经细胞移植治疗等的再生医疗中有用的神经元。另外,本发明的目的还在于提供与神经元和神经干细胞同时进行移植,直接支持神经元的分化和生长,形成血脑屏障后对营养物质补给有用的神经胶质细胞。另外,本发明的目的还在于提供对神经变性疾病(例如,帕金森病、阿耳茨海默病等)、脊髓损伤、脑梗塞等的神经细胞移植治疗等的再生医疗中有用的、在细胞治疗中可以获得稳定、高效的治疗效果等的细胞组合物。另外,本发明的目的还在于提供治疗神经变性或神经损伤的方法,该方法可以在稳定的状态下对由神经变性或神经损伤引起的病变进行治疗。

[0012] 即本发明的主要涉及到以下内容:

[0013] [1] 基本上分离的神经细胞的制备方法,其特征是在星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分存在下,对胚胎干细胞进行悬浮培养,所述胚胎干细胞不包括人胚胎干细胞。

[0014] [2] 上述 [1] 所述的神经细胞的制备方法,其中所述的胚胎干细胞是哺乳动物的胚胎干细胞,所述哺乳动物不包括人。

[0015] [3] 上述 [2] 所述的神经细胞的制备方法,其中哺乳动物选自:小鼠、长尾猴(カニクイザル)以及大鼠。

[0016] [4] 上述 [1] ~ [3] 中任意一项所述的神经细胞的制备方法,其中包括(A)在星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在下,对胚胎干细胞进行悬浮培养,由此形成干细胞球状凝集体(SCS)的步骤。

[0017] [5] 上述 [4] 所述的神经细胞的制备方法,其中,在步骤(A)后进行:

[0018] (B)在存在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和/或上皮生长因子(EGF)、并且有细胞粘附分子存在的情况下,对在该步骤(A)中得到的干细胞球状凝集体(SCS)进行培养的步骤,

[0019] 通过该步骤获得作为由SCS迁移出的细胞的神经干细胞。

[0020] [6] 上述 [5] 所述的神经细胞的制备方法,其中步骤 (B) 的培养是在步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体 (SCS) 与带有细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附的状态下进行的。

[0021] [7] 上述 [1] ~ [3] 中任意一项所述的神经细胞的制备方法,其中包括下述步骤:

[0022] (A') 在星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在下、而且在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或上皮生长因子 (EGF) 存在下,对胚胎干细胞进行悬浮培养的步骤,

[0023] 由此在干细胞球状凝集体 (SCS) 内获得神经干细胞。

[0024] [8] 上述 [4] 中所述的神经细胞的制备方法,其中在 (A) 步骤后进行:(B') 在没有碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或上皮生长因子 (EGF) 存在、但有星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在的情况下、使由步骤 (A) 中得到的干细胞球状凝集体 (SCS) 与带有细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附进行培养,

[0025] 由此获得神经元。

[0026] [9] 上述 [4] 中所述的神经细胞的制备方法,其中在 (A) 步骤后进行 (B) 在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或上皮生长因子 (EGF) 存在下、而且在细胞粘附分子存在下,培养由步骤 (A) 得到的干细胞球状凝集体 (SCS),以及

[0027] (C) 在没有 bFGF 和 / 或 EGF 存在下,使由步骤 (B) 中得到的 SCS 与带有细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附培养,

[0028] 由此通过 SCS 获得迁移出的细胞神经胶质细胞。

[0029] [10] 神经细胞的制备方法,其特征是在没有碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或上皮生长因子 (EGF) 存在、有星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在的情况下、使由上述 [1] ~ [7] 中任意一项所述的制备方法得到的神经干细胞球与带有细胞粘附分子的粘附性培养基质相粘附进行培养。

[0030] [11] 由上述 [1] ~ [7] 中任意一项所述的制备方法从胚胎干细胞分化诱导形成的基本上分离的神经干细胞。

[0031] [12] 被冷冻保存的上述 [10] 所述的神经干细胞。

[0032] [13] 通过上述 [8] 或 [10] 所述的制备方法得到的基本上分离的神经元。

[0033] [14] 上述 [13] 中所述的基本上分离的神经元,该细胞可以表达 III 类 β 微管蛋白、神经丝、酪氨酸羟化酶、谷氨酸脱羧酶以及乙酰胆碱转移酶中的至少一种。

[0034] [15] 利用上述 [9] 所述的制备方法得到的基本上分离的神经胶质细胞。

[0035] [16] 含有通过上述 [1] ~ [7] 中任意一项所述的制备方法,由胚胎干细胞分化诱导形成的基本上分离的神经干细胞作为有效成分的细胞药物组合物。

[0036] [17] 含有通过上述 [8] 或 [10] 所述制备方法得到的基本上分离的神经元作为有效成分的细胞药物组合物。

[0037] [18] 含有通过上述 [9] 所述的制备方法得到的基本上分离的神经胶质细胞的细胞作为有效成分的药物组合物。

[0038] [19] 神经变性疾病或神经损伤的治疗方法,其特征是将选自下述细胞中至少一种的细胞引入到神经变性部位或神经损伤部位,所述细胞为:

[0039] (1) 通过上述 [1] ~ [7] 中任意一项所述制备方法,由胚胎干细胞分化诱导形成的

基本上分离的神经干细胞、

[0040] (2) 通过上述 [8] 或 [10] 所述的制备方法得到的基本上分离的神经元,以及

[0041] (3) 利用上述 [9] 所述的制备方法得到的基本上分离的神经胶质细胞。

[0042] 附图的简单说明

[0043] 图 1 表示对于在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物中悬浮培养的小鼠胚胎干细胞 (HK 细胞株) 集落 (SCS), 研究作为神经干细胞标记的神经上皮干细胞蛋白的表达分布, 以及作为细胞分裂指标的 BrdU 的掺入结果照片。利用蔡斯 (Zeiss) 公司生产的共焦点激光扫描荧光显微镜进行观察。图中画面 A 表示 SCS 的相衬像, 画面 B 表示由抗神经上皮干细胞蛋白产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示由抗 BrdU 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 D 表示画面 B 和画面 C 的二次曝光像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0044] 图 2 表示对于连续悬浮培养 7 天的 SCS, 研究作为幼弱神经标志物的 III 类 β 微管蛋白表达结果的照片。使用 Nikon 公司生产的直立荧光显微镜观察。图中画面 A 表示 SCS 的相衬像, 画面 B 表示由抗 III β 微管蛋白抗体产生的免疫荧光染色像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0045] 图 3 表示在悬浮培养 4 天后, 在用粘附性底物包被的培养皿的培养面侧 (即, 培养基进入的一侧) 的表面, 研究粘附培养了 4 天的 SCS 的分化诱导结果照片。画面 A 表示相衬像, 画面 B 表示由抗神经上皮干细胞蛋白产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示由抗神经丝 (NF) 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 D 表示画面 B 和画面 C 的二次曝光像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0046] 图 4 表示对在粘附培养的 SCS 中 BrdU 的掺入以及神经丝的表达分布的研究结果的照片。在观察中使用共焦点激光荧光显微镜。图中画面 A 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 B 表示由抗 BrdU 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0047] 图 5 表示对在粘附培养的 SCS 中神经递质合成酶的表达结果照片。在观察中使用直立荧光显微镜。图中画面 A 表示相衬像, 画面 B 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示由抗酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 D 表示画面 B 和画面 C 的二次曝光像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0048] 图 6 表示对在粘附培养的 SCS 中神经递质合成酶的表达研究结果的照片。在观察中使用直立荧光显微镜。图中画面 A 表示由抗谷氨酸脱羧酶 (GAD) 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 B 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0049] 图 7 表示对胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 的表达的研究结果的照片。在观察中使用直立荧光显微镜。画面 A 表示由抗 ChAT 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 B 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像, 画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 $20 \mu\text{m}$ 。

[0050] 图 8 是对 SCS 进行粘附培养, 而且作为培养液使用含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27 时对 SCS 进行研究的照片。在观察中使用直立荧光显微镜。画面 A 表示相衬像, 画面 B 表示由抗神经上皮干细胞蛋白抗体产生的免疫荧光染色像。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0051] 图 9 表示可由 1 个 SCS 迁移出的神经干细胞集落的照片。标尺表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0052] 图 10 表示对在含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27 中, 在使神经干细胞迁移出的 SCS 中 BrdU 的掺入, 以及神经上皮干细胞蛋白的表达分布进行研究的照片。画面 A 表示

由抗 BrdU 的免疫荧光染色像,画面 B 表示由抗神经上皮干细胞蛋白抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 50 μm 。

[0053] 图 11 表示对在用小鼠胚胎干细胞 HK 细胞株制备 SCS 开始,当向悬浮培养液中加入 bFGF 时,作为神经干细胞标志物的神经上皮干细胞蛋白 的表达分布以及作为细胞分裂的指标的 BrdU 的分布的研究结果的照片。图中画面 A 表示由抗神经上皮干细胞蛋白产生的免疫荧光染色像,画面 B 表示由抗 BrdU 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 50 μm 。

[0054] 图 12 表示对由 SCS 迁移出的神经干细胞向神经元分化进行研究的照片。画面 A 表示将含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27 与星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物进行交换后,即刻的 SCS 以及神经干细胞的相衬像,画面 B 表示交换 1 天后的相衬像。标尺表示 50 μm 。

[0055] 图 13 表示对来自迁移出神经干细胞的神经元中的神经递质合成酶的表达的研究结果的照片。图中画面 A 表示相衬像,画面 B 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示由抗 TH 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 D 表示画面 B 和画面 C 的二次曝光像。标尺表示 20 μm 。

[0056] 图 14 表示对来自迁移出神经干细胞的神经元中的 TH 以及 GAD 的表达的研究结果的照片。图中画面 A 表示相衬像,画面 B 表示由抗 TH 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示由抗 GAD 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 D 表示画面 B 和画面 C 的二次曝光像。标尺表示 20 μm 。

[0057] 图 15 表示对来自迁移出神经干细胞的神经元中神经递质 5-羟色胺的存在情况进行研究的结果的照片。图中画面 A 表示相衬像,画面 B 表示由 5-羟色胺抗体产生的免疫荧光染色像。标尺表示 20 μm 。

[0058] 图 16 表示对由迁移出神经干细胞向星形胶质细胞的分化诱导进行研究的照片。图中,画面 A 表示以 SCS 为中心的相衬像,画面 B 表示在与画面 A 相同部位的由抗 GFAP 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示在与画面 A 相同部位的由抗 NF 抗体产生的对照的染色像,画面 D 表示离开 SCS 的部位的相衬像,画面 E 表示在与画面 D 同一部位的由抗 GFAP 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 F 表示在神经元周边部位的由抗 GFAP 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 G 同样表示在神经元周边部位的由抗 GFAP 抗体产生的免疫荧光染色像(高倍率),画面 H 表示在神经元周边部位的由抗 GFAP 抗体产生的免疫荧光染色像。画面 A ~ F 的标尺表示 50 μm ,画面 G 和 H 的标尺表示 20 μm (高倍率)。

[0059] 图 17 表示对由分散的迁移出神经干细胞向神经元分化进行研究的照片。画面 A 表示由抗神经上皮干细胞蛋白产生的免疫荧光染色像,画面 B 表示由抗 TH 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 20 μm 。

[0060] 图 18 表示对由冷冻保存的神经干细胞向神经元分化进行研究的照片。画面 A 表示相衬像,画面 B 表示由抗 TH 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示由抗 ChAT 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 D 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 50 μm 。

[0061] 图 19 表示对于市售的胚胎干细胞建株(129SV 细胞株)在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物中进行悬浮培养的结果的照片。标尺表示 50 μm 。

[0062] 图 20 表示制备由长尾猴建立的 CMK-6 胚胎干细胞株中的 SCS 时的神经上皮干细

胞蛋白分布的照片。图中画面 A 表示由抗神经上皮干细胞蛋白引起的悬浮 SCS 的免疫荧光染色像。图中画面 B 表示由抗神经上皮干细胞蛋白引起的可以使粘附的 SCS 迁移出的免疫荧光染色像。标尺表示 50 μm 。

[0063] 图 21 表示对来自长尾猴的 CMK-6 细胞株在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物中进行悬浮培养的结果的照片。标尺表示 20 μm 。

[0064] 图 22 表示对在由从长尾猴的胚胎干细胞 CMK-6 细胞株得到的 SCS 可以迁移出的神经细胞中神经递质合成酶的表达的研究结果的照片。图中画面 A 由抗 TH 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 B 表示由抗 NF 抗体产生的免疫荧光染色像,画面 C 表示画面 A 和画面 B 的二次曝光像。标尺表示 20 μm 。

[0065] 图 23 表示对伴随由胚胎干细胞向神经元的分化诱导的基因表达进行研究的结果的图。图中,带 1 表示未分化的胚胎干细胞集落,带 2 表示通过悬浮培养 4 天形成的 SCS,带 3 表示以粘附状态培养 5 天得到的细胞块的结果。

[0066] 图 24 表示胚胎干细胞向神经元的分化诱导的基因的表达随时间变化的图。Oct-4、神经上皮干细胞蛋白(图中,神经上皮干细胞蛋白)以及 TH 各个量分别被 GAPDH 量除,作为 Oct-4/GAPDH、神经上皮干细胞蛋白/GAPDH 或 TH/GAPDH 求出相对表达量,并以相对表达量的最高值为 1,示于曲线图中。

[0067] 实施发明的最佳方案

[0068] 本发明的基本上分离的神经细胞的制备方法的一大特征在于星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分存在下,对胚胎干细胞进行悬浮培养。本发明依据通过使用星形胶质细胞培养上清、即星形胶质细胞条件培养基,对未分化胚胎干细胞进行悬浮培养,可以在短时间诱导该胚胎干细胞向神经干细胞分化,而且可以大量制备神经干细胞,再利用分化的神经干细胞向神经元、特别是多巴胺能神经元;神经胶质细胞、特别是星形胶质细胞分化这一令人惊奇的见解。

[0069] 按照本发明的神经细胞的制备方法,由于在进行胚胎干细胞的培养时,使用星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分,所以可以在短时间内,有效地利用未分化的胚胎干细胞高效地获得基本上分离的神经细胞的优异效果。与 SDIA 等方法相比,按照本发明的神经细胞的制备方法,可以再在令人惊奇的短时间内,例如在胚胎干细胞的悬浮培养后 2~4 天获得神经干细胞。另外,按照本发明的神经细胞的制备方法,由于对胚胎干细胞进行悬浮培养,所以可以发挥以令人惊奇的效率、令人惊奇的短时间获得神经细胞的优异效果。具体来说,按照本发明的神经细胞的制备方法,可以发挥由胚胎干细胞高效地提供基本上分离的神经细胞,而无需对神经细胞以外的外胚层细胞、中胚层细胞以及内胚层细胞进行诱导,具有高效提供基本上分离的神经细胞的优异效果。另外,按照本发明的制备方法,可以起到由胚胎干细胞经过神经干细胞有选择地向神经元或神经胶质细胞中任一种进行分化的优异效果。

[0070] 在本说明书中,术语“神经细胞”包含神经干细胞、神经元、神经胶质细胞(例如星形胶质细胞)等。

[0071] 上述神经干细胞指的是具有向构成脑、脊髓等的神经元、神经胶质细胞等多分化能力,具有自我更新能力的中枢神经系统多能性未分化细胞。上述神经干细胞可以通过以神经上皮干细胞蛋白(Nestin)、RC2、Musashi1 等标志物的表达作为指标,例如利用惯用的

核酸检测方法研究对应的基因的表达或利用免疫细胞组织化学方法研究蛋白质的表达进行鉴定。

[0072] 上述神经细胞,即神经元,特征在于表达信息传递物质的受体,例如神经丝、酪氨酸羟化酶、谷氨酸脱羧酶、胆碱乙酰转移酶等的表达。另外作为神经元的形态特征,如细胞体、树状突起、轴索、轴索生长圆锥等。

[0073] 作为通过本发明的神经细胞制备方法得到的神经细胞,如神经元等,作为上述神经元,更具体来说,如多巴胺能神经元、GABA 能神经元、胆碱能神经元等。上述多巴胺能神经元有望用于帕金森病等。GABA 也是抑制性神经元,有望应用于过度兴奋的抑制等。另外,上述胆碱能神经元有望应用于阿耳茨海默病等。

[0074] 上述神经胶质细胞填补神经元和神经元的间隙,是在起到该神经元代谢中介的同时,起到支持组织作用的细胞。作为上述神经胶质细胞,在中枢神经系统中,可以列举如星形胶质细胞、少突神经细胞以及小神经胶质细胞,在末梢神经系统中可以列举如皮层细胞、许旺氏细胞以及末梢神经胶质细胞。特别是通过本发明的神经细胞的制备方法即使在上述神经胶质细胞当中也可以得到星形胶质细胞。上述星形胶质细胞其特征是表达胶质纤维性酸性蛋白质(GFAP)。另外,作为上述星形胶质细胞的形态特征如具有特有分支的多个突起。

[0075] 作为本发明的神经细胞的制备方法,具体来说,如包括

[0076] (A) 在星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在下对胚胎干细胞进行悬浮培养,使之形成干细胞球状凝集体(StemCell Sphere ;SCS)的步骤。

[0077] 本发明中使用的星形胶质细胞条件培养基是星形胶质细胞的培养物的上清,例如用含有 N2 添加物[胰岛素、铁传递蛋白、硒、孕酮;参见 Bottenstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 :154(1979) 等]的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)与 F-12 培养基的混合培养基[(体积比=1 : 1 ~ 1 : 3);以下将上述混合培养基称为「DMEM ;F-12」]作为基础培养基,培养星形胶质细胞,例如 1 天,用得到的培养物,通过例如离心分离等除去星形胶质细胞可以得到。而作为用于星形胶质细胞培养的基础培养基,除了上述的 DMEM : F-12 以外,还可以举出如 DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™[GIBCO BRL 公司生产]等。这些培养基可以根据 Frshney, R. Ian、Culture of animal cell A manual of basic technique, 2nd ed.、Alan R. Liss. Inc., 66-84(1987) 等记载的方法制备。另外,对于在星形胶质细胞条件培养基的制备中使用的星形胶质细胞,没有特别限定。

[0078] 星形胶质细胞可通过下述方法获得,可以根据已报道的方法[Banker, G. 等编, Culturing Nerve Cells(1991), The MIT Press 发行,剑桥,英国],从任意动物(例如,小鼠、大鼠、牛、马、猪、猴、兔等)的脑、例如小鼠胎仔脑、大鼠胎仔脑中除去脑膜后,进行按照惯用的细胞分离操作进行的酶处理(例如,胰蛋白酶处理、分散酶处理等),使细胞解离、分散,挑选表达胶质原纤维产生蛋白的细胞,利用含有动物血清,例如胎牛血清等的用于培养动物细胞的营养培养基[例如,DMEM、F-12、改良的 Eagle 培养基(MEM)等]通过上述方法增殖、收集细胞。

[0079] 上述所谓“基本上与条件培养基等同的成分”指的是可以发挥与条件培养基同样作用的成分,指的是从星形胶质细胞的培养物中除去所用的基础培养基成分和星形胶质细胞后得到的成分,例如代谢产物等。

[0080] 在本发明的神经细胞的制备方法中使用的胚胎干细胞,对于作为该细胞供给源的个体种类没有特别限定,可以列举如哺乳动物、具体来说如来自小鼠、猴(例如长尾猴等)、大鼠等的胚胎干细胞等。具体来说,如来自小鼠的HK细胞株、来自小鼠129SV细胞株、来自长尾猴的CMK-6细胞株等。在本发明中,也可以使用市售的胚胎干细胞。特别是在把所得的神经细胞用于细胞移植治疗等时,从与生物体相容性的观点考虑希望使用来自与细胞移植治疗等的适用对象个体同种个体的胚胎干细胞。

[0081] 作为在胚胎干细胞的培养中使用的培养基,可以列举如上述星形胶质细胞基础培养基、例如DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™等中任意一个培养基,与前述的星形胶质细胞条件培养基、或与条件培养基基本上同等的成分的混合物等,优选混合比以体积比计为1:1~1:3。

[0082] 胚胎干细胞的悬浮培养因使用的胚胎干细胞的种类不同而异,例如用于上述胚胎干细胞的悬浮培养的培养容器的大小优选为35mm培养皿,培养基中的胚胎干细胞浓度优选在2ml的培养液中SCS为20个以下的浓度,另外培养的气相条件,对于HK细胞株,优选37℃左右,例如37℃±0.2℃、CO₂浓度5%左右,例如4.8~5.2%、湿度100%。具体来说,对于来自小鼠的HK细胞株或来自小鼠的129SV细胞株,可以通过在加有2ml上述星形胶质细胞条件培养基和上述星形胶质细胞基础培养基的混合物(体积比1:1)的35mm培养皿中,于37℃、空气中CO₂浓度5%以及100%加湿氛围下,培养约10~20个细胞。另外,这里使用的来自小鼠的胚胎干细胞的大小,从操作的容易性、维持胚胎干细胞状态的稳定、以及有效获得SCS的观点考虑,作为在饲养细胞层上的大小,优选直径约为400~500μm。另外,对于来自长尾猴的CMK-6细胞株,可以通过在加有2ml上述星形胶质细胞条件培养基和上述星形胶质细胞基础培养基的混合物(体积比1:1)的35mm培养基中,于37℃、空气中CO₂浓度5%以及100%加湿氛围下,对约10~20个细胞株进行培养来进行。另外,这里使用的来自长尾猴的胚胎干细胞的大小从操作的容易性、维持胚胎干细胞的状态的稳定、以及有效获得SCS的观点考虑,优选直径约400~500μm。

[0083] 作为上述胚胎干细胞,可以使用在适当的培养基上,另外根据需要还可以在饲养细胞上以细胞粘附状态使其增殖,以未分化的胚胎干细胞的集落块形式得到的细胞。

[0084] SCS因使用的胚胎干细胞种类不同而异,对于来自小鼠的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,例如在2~7天、优选在4~5天形成,对于来自猴、特别是对于来自长尾猴的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,例如,在4~15天、优选在10~12天形成。另外SCS的形成可以在实体显微镜下或相差倒置显微镜下通过核心结构的形成确认。

[0085] 另外,通过本发明的神经细胞的制备方法,在制备神经干细胞时,从更有效获得神经干细胞的观点考虑,优选在(A)步骤后进行

[0086] (B)在bFGF和/或EGF存在、且有细胞粘附分子存在下,对在该步骤(A)中得到的SCS进行培养的步骤[也称为“神经干细胞制备方法1”],或

[0087] 取代上述步骤(A)进行

[0088] (A')在星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在、且有bFGF和/或EGF存在下对胚胎干细胞进行悬浮培养[也称为“神经干细胞制备方法2”]。

[0089] 在上述神经干细胞的制备方法1中,通过进行上述步骤(B),可以得到作为从SCS迁移出的细胞的神经干细胞。另外,在上述神经干细胞的制备方法2中,通过进行上述步骤

(A')，可以在 SCS 内得到大量的神经干细胞。

[0090] 在“上述神经干细胞的制备方法 1”中，作为 SCS 培养用培养基，如含有 bFGF 和 / 或 EGF，并且包括星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分与例如 Neurobasal™B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM 等的混合物。培养基中的 bFGF 的浓度，从充分发挥细胞的分化的抑制能力和神经干细胞的细胞分裂能力的观点考虑，是例如 10 ~ 50ng/ml、优选是 10 ~ 20ng/ml。另外，培养基中的 EGF 的浓度从充分显示出细胞的分化抑制能力和神经干细胞的细胞分裂能力的观点考虑，优选为例如 10 ~ 50ng/ml、优选 10 ~ 20ng/ml。另外对于将 bFGF 和 EGF 组合后使用时，也可以使 bFGF 达到 10 ~ 20ng/ml 浓度，EGF 达到 10 ~ 20ng/ml 浓度混合后使用。

[0091] 在本发明中，也可以使用呈现与 bFGF 和 EGF 相同分化的抑制作用的物质取代上述 bFGF 和 EGF。

[0092] 在步骤 (B) 中使用的培养基中，上述星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分与 Neurobasal™B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM 等的混合比，作为体积比优选为 1 : 1 ~ 1 : 3。

[0093] 作为上述细胞粘附分子，可以列举如聚赖氨酸、纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、MATRIGEL™[BD Bioscience 公司生产] 等。

[0094] 在上述步骤 (B) 中的培养也可以使在步骤 (A) 中得到的 SCS 和带有细胞粘附分子的粘附性培养基相粘附的状态下进行培养，也可以在使该细胞粘附分子保持在支持体中形成载体，再将该载体悬浮或直立设置培养容器内，于该培养容器内对 SCS 进行培养。

[0095] 作为上述粘附性培养基，可以列举如用上述细胞粘附分子对常用的细胞培养用培养皿的培养侧面进行包被的基质等。例如，使用聚赖氨酸作为细胞粘附分子时，使培养容器（细胞培养用培养皿）的培养侧面充分浸渍在含有聚赖氨酸的终浓度约 0.1mg/ml 的去离子水中，于室温下温育 1 ~ 2 小时，然后从培养容器中除去溶液，可以得到粘附性培养基。另外，使用纤连蛋白作为细胞粘附分子时，可以使用含纤连蛋白终浓度为 2 ~ 20 μg/ml 的磷酸缓冲生理盐水，于 37℃ 下温育 30 ~ 90 分钟，当使用层粘连蛋白作为细胞粘附分子时，可以使用含层粘连蛋白终浓度 10 ~ 100 μg/ml 的磷酸缓冲生理盐水，于 37℃ 下温育 2 小时以上，使用玻连蛋白作为细胞粘附分子时，可以使用含玻连蛋白终浓度 1 ~ 10 μg/ml 的磷酸缓冲生理盐水，于 37℃ 下温育 2 小时以上。使用 MATRIGEL™ 作为细胞粘附分子时，用培养基稀释 10 ~ 20 倍后于 37℃ 下温育 1 小时以上即可。

[0096] 其中，SCS 与粘附性培养基的粘附可以通过例如将 SCS 添加到加有适当培养基的粘附性培养基中的方法进行。

[0097] 另外，上述支持体，当使其悬浮在培养容器内时，可以是由比重比培养基还要小的物质构成的支持体，当使其在培养容器内直立设置时，可以是由与惯用的细胞培养用培养皿同样材质构成的支持体。

[0098] 在上述步骤 (B) 中的培养条件可以根据作为使用的 SCS 供给源的胚胎干细胞的种类适当设定。例如，培养容器的大小优选为 35mm 培养皿或 60mm 的培养皿。胚胎干细胞的集落数，即 SCS 数，对于来自小鼠的胚胎干细胞，例如在加有 2ml 培养基的 35mm 培养皿中优选 1 ~ 20 个，优选 1 ~ 5 个，更优选 1 ~ 2 个，对于来自猴的胚胎干细胞，例如，在加有 2ml 培养基的 35mm 培养皿中优选 SCS 数为 1 ~ 20 个，优选 1 ~ 5 个，更优选 1 ~ 2 个。另外，培养的

气相条件,对于小鼠,37℃左右,例如 37℃ ±0.2℃、CO₂ 浓度 5%左右,例如 4.8 ~ 5.2%、湿度 100%,对于猴,优选 37℃左右,例如 37℃ ±0.2℃、CO₂ 浓度 5%左右,例如 4.8 ~ 5.2%、湿度 100%。

[0099] 另外,在上述步骤 (B) 的培养时间,可以根据使用的胚胎干细胞的种类适当设定,对于来自小鼠的胚胎干细胞,优选 5 ~ 10 天,对于猴,优选 5 ~ 20 天。

[0100] 另外在上述步骤 (B) 中,悬浮培养中,为了达到适当的浓度可以在适当的时候(例如,隔 1 天、隔 2 天等)添加 bFGF 和 / 或 EGF。

[0101] 按照上述“神经干细胞的制备方法 1”,因使用的胚胎干细胞的种类不同获得神经干细胞的时间也不同,但是可以取得在短时间内得到神经干细胞的优异效果,对于来自小鼠的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,悬浮培养开始后,例如,在 2 ~ 7 天内形成 SCS,在 2 ~ 5 天内,优选在 2 ~ 4 天内的获得神经干细胞,对于来自猴、特别是来自长尾猴的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,悬浮培养开始后,例如,在 4 ~ 15 天内形成 SCS,在 4 ~ 7 天内,优选在 4 ~ 5 天内获得神经干细胞。

[0102] 在上述“神经干细胞的制备方法 2”的步骤 (A') 中,作为用于培养胚胎干细胞的培养基,可以列举如含有 bFGF 和 / 或 EGF,并且包括上述星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分的与例如与 Neurobasal™B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM 等的混合物。从充分发挥细胞的分化的抑制能力和神经干细胞的细胞分裂能力的观点考虑,培养基中 bFGF 的理想浓度为例如 10 ~ 50ng/ml、优选 10 ~ 20ng/ml。另外,从充分发挥细胞的分化的抑制能力的观点考虑,培养基中的 EGF 的理想浓度为例如 10 ~ 50ng/ml、优选 10 ~ 20ng/ml。另外对于将 bFGF 和 EGF 组合后使用时,也可以按照使 bFGF 的终浓度为 10 ~ 20ng/ml,EGF 的终浓度为 10 ~ 20ng/ml 混合使用。

[0103] 在上述“神经干细胞的制备方法 2”中,胚胎干细胞的悬浮培养因使用的胚胎干细胞的种类不同而异,例如用于上述胚胎干细胞的悬浮培养的培养容器的大小,优选与上述步骤 (A) 同样为 35mm 培养皿,培养基中的胚胎干细胞浓度在 2ml 的培养液中优选为 20 个细胞以下,另外培养的气相条件,对于 HK 细胞株,37℃左右,例如 37℃ ±0.2℃、CO₂ 浓度 5%左右,例如 4.8 ~ 5.2%、湿度 100%。具体来说,对于来自小鼠的 HK 细胞株或来自小鼠的 129SV 细胞株,可以在加有上述培养基 2ml 的 35mm 培养基中,于 37℃、空气中 CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下,通过对约 10 ~ 20 个细胞进行悬浮培养。

[0104] 另外,在上述步骤 (A') 的培养时间,可以根据使用的胚胎干细胞的种类适当设定,对于来自小鼠的胚胎干细胞,优选 4 ~ 5 天,对于猴,优选 7 ~ 10 天。

[0105] 另外在上述步骤 (A') 中,悬浮培养中,也可以在适当的时期(例如,隔 1 天、隔 2 天)、添加 bFGF 和 / 或 EGF,以使其达到适当的浓度。

[0106] 按照上述“神经干细胞的制备方法 2”,获得神经干细胞的时间因使用的胚胎干细胞的种类不同而异,但可以取得在短时间内得到神经干细胞的优异效果。对于来自小鼠的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,例如,在 2 ~ 7 天内形成 SCS,在 2 ~ 5 天内,优选在 2 ~ 4 天内获得神经干细胞,对于来自猴、特别是来自长尾猴的胚胎干细胞,在上述悬浮培养的条件下,例如,在 4 ~ 15 天内形成 SCS,在 4 ~ 7 天内,优选在 4 ~ 5 天内获得神经干细胞。

[0107] 得到的细胞是神经干细胞,可以通过以神经上皮干细胞蛋白、RC2、Musashi1 等标

志物的表达作为指标,例如利用惯用的核酸检测方法研究对应的基因的表达或利用免疫方法研究蛋白质的表达进行确认。另外,得到的细胞是神经干细胞,也可以通过在视黄酸等存在下,通过对得到的细胞在不妨碍向各种细胞或组织分化的培养基中培养,利用在分化后生成的分化细胞或分化组织的形态或该分化细胞或分化组织特异标志物的表达进行确认。另外,将得到的细胞移植到前脑、中脑、网膜、嗅球等中枢神经系统内,以形成神经元等作为指标也可以确认。作为上述分化细胞或分化组织的形态或该分化细胞或分化组织特异的标志物,可以列举如上述神经细胞以及神经胶质细胞的形态特征和特异的标志物。而上述神经干细胞除了上述指标外,还对于5-溴脱氧尿核苷(BrdU)的掺入表现出弱阳性~强阳性。

[0108] 其中作为核酸的检测方法,可以列举如按照使用由对编码检测对象基因的核酸或其特异片段构成的探针或与该核酸或其特异片段特异结合的探针的杂交的检测方法、按照使用为对该核酸或其特异片段进行扩增的引物的PCR的检测方法。作为基于上述杂交的检测方法,如Southern杂交,DNA阵列杂交、Northern杂交等。基于PCR的检测方法包括RT-PCR等。其中作为探针或引物使用的核酸优选具有检测对象基因的碱基序列中特异部分的序列。上述“检测对象基因的碱基序列中特异部分的序列”可以通过选择与非检测对象的已知序列的的序列同一性为20%以下、优选15%以下、更优选10%以下、更优选5%、特别优选的是0%部分的序列而获得。上述序列同一性可以在2个核酸间的比较对象序列区域内,对必对状态最适合的2个序列进行比较决定。另外,序列同一性的数值(百分比)可以通过决定存在于两方序列的同一的残基后,决定适合部位的数,然后用比较对象的序列区域内的残基总数除上述适合部位的数,通过对得到的数值乘以100算出。而为了算出最适比对以及同源性可以使用例如Smith等人的局部同源性算法[Add. APL. Math., 2, 482(1981)]、Needleman等人的同源性比对算法[J. Mol. Biol., 48, 443(1970)]、Smith-Waterman算法、Good-Kanehisa算法、BLAST算法、FASTA算法等。例如,作为利用BLAST算法,比对的条件,可以列举如期望值10、字长3、缺口值(gap cost)(Existence:11、Existension:1)等。

[0109] 而作为免疫学方法,使用针对检测对象的蛋白质或其特异片段的抗体或抗体片段,利用免疫学方法,例如用ELISA、免疫染色等方法进行检测。抗体可以通过惯用的方法[例如,1992年,John Wiley&Sons, Inc发行、John E. Coligan编辑、Current Protocols in Immunology等]中记载的方法,使用检测对象的标志物蛋白质,对合适的动物、例如兔、大鼠、小鼠、山羊等进行免疫而获得。

[0110] 在本发明中,也包括利用这样的制备方法由胚胎干细胞分化诱导的基本上分离神经干细胞。

[0111] 本发明的神经干细胞,即使是经冷冻保存的,也可以表达呈现向神经元、神经胶质细胞分化的优异的性质。

[0112] 本发明的神经干细胞由于可以分化为神经元、神经胶质细胞等,所以有望应用于帕金森病、阿耳茨海默病、唐氏综合症、疯牛病(例如,克-雅病、牛海绵状脑病等)、聚谷氨酰胺病(球脊髓性肌肉萎缩症、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑失调症等)、肌肉萎缩性侧索硬化症等神经变性疾病;脑缺血、脱髓鞘病、头部外伤、脊髓损伤、脑梗塞等中的神经再生医疗。

[0113] 按照本发明的神经细胞的制备方法,在制备神经细胞时,从更有效获得神经干细胞的观点考虑,优选在(A)步骤后进行(B')在没有bFGF和/或EGF存在、有星形胶质细

胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在的情况下,使在该步骤(A)中得到的SCS与带有细胞粘附分子的粘附性培养基相粘附的状态下进行培养[也称为“神经细胞的制备方法I”]。通过进行上述步骤(B'),可以得到神经元。另外,作为制备神经元时的其它方法,可以列举如使上述那样得到的神经干细胞在没有bFGF和/或EGF存在、但有星形胶质细胞条件培养基和与该条件培养基基本上同等的成分存在的情况下,与带有细胞粘附分子的粘附性培养基相粘附的状态下进行培养的方法[也称为“神经细胞的制备方法II”]。

[0114] 作为在上述步骤(B')或上述其它方法中使用的培养基,可以列举如上述星形胶质细胞条件培养基或与该条件培养基基本上同等的成分与例如DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™等任意一种培养基的混合物,混合比以体积比计为1:1~1:3。培养条件可以根据使用的SCS供给源的胚胎干细胞种类适当设定。例如,优选培养的培养容器的大小为35mm或60mm培养皿。SCS的数,对于来自小鼠的胚胎干细胞,例如在加有2ml培养基的35mm培养皿中为1~20个,优选1~5个,更优选1~2个,对于来自猴的胚胎干细胞,例如,可以是在加有2ml培养基的35mm培养皿中优选1~20个,优选1~5个,更优选1~2个。另外,培养的气相条件,对于小鼠,优选37℃左右,例如37℃±0.2℃、CO₂浓度5%左右,例如4.8~5.2%、湿度100%,对于猴,优选37℃左右,例如37℃±0.2℃、CO₂浓度5%左右,例如4.8~5.2%、湿度100%。

[0115] 另外,在上述步骤(B')的培养时间,可以根据使用的胚胎干细胞的种类适当设定,对于来自小鼠的胚胎干细胞,优选1~7天,对于猴,优选1~14天,神经细胞的制备方法II中的培养时间,对于来自小鼠的胚胎干细胞,优选1~7天,对于猴,优选1~14天。

[0116] 按照上述神经干细胞的制备方法I以及上述神经细胞的制备方法II,可以取得在1~7天、优选2~5天的这样令人惊奇的短时间获得神经元的优异效果。

[0117] 得到的细胞是神经细胞可以通过以神经丝、酪氨酸羟化酶、谷氨酸脱羧酶、胆碱乙酰转移酶等的表达作为指标,通过惯用的核酸的检测方法对对应的基因的表达进行研究或通过免疫学方法、例如惯用的ELISA、免疫染色等对蛋白质的表达进行研究确认。另外,也可以以神经元的形态特征,例如细胞体、树状突起、轴索、轴索生长圆锥等作为指标进行确认。

[0118] 本发明中也包括通过这样的制备方法得到的基本上分离的神经元。

[0119] 本发明的神经细胞是至少可以表达类IIIβ微管蛋白、神经丝、酪氨酸羟化酶、谷氨酸脱羧酶以及乙酰胆碱转移酶中的一种的细胞,有望应用于帕金森病、阿耳茨海默病、唐综合征、疯牛病(例如,克-雅病、牛海绵状脑病等)、聚谷氨酰胺病(球脊髓性肌肉萎缩症、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑失调症等)、肌肉萎缩性侧索硬化症等神经变性疾病;脑缺血、脱髓鞘病、头部外伤、脊髓损伤、脑梗塞等中的神经再生医疗。

[0120] 按照本发明的神经细胞的制备方法制备神经胶质细胞时,从更有效地获得神经胶质细胞的观点考虑,优选在步骤(B)后进行

[0121] (C)在没有bFGF和/或EGF存在下,使在该步骤(B)中得到的SCS与带有细胞粘附分子的粘附性培养基在相粘附的状态下进行培养。通过这样步骤(C)可以得到从SCS迁移出的神经胶质细胞,特别是星形胶质细胞。

[0122] 作为在步骤(C)中使用的培养基,如Neurobasal™B-27(GIBCO BRL公司生产)1~2%添加物、DMEM:F-12N₂添加物。培养条件可以按照成为使用的SCS的供给源的胚胎干细

胞的种类适当设定。例如,培养容器的大小优选为 35mm 培养皿或 60mm 培养皿。SCS 的数,对于来自小鼠的胚胎干细胞,例如在加有 2ml 培养基的 35mm 培养皿中优选 1 ~ 20 个,优选 1 ~ 5 个,更优选 1 ~ 2 个,对于来自猴的胚胎干细胞,例如,可以是在加有 2ml 培养基的 35mm 培养皿中优选 1 ~ 20 个,优选 1 ~ 5 个,更优选 1 ~ 2 个,对于来自猴的胚胎干细胞。另外,培养的气相条件,对于小鼠,优选 37℃ 左右,例如 37℃ ± 0.2℃、CO₂ 浓度 5% 左右,例如 4.8 ~ 5.2%、湿度 100%,对于猴,优选 37℃ 左右,例如 37℃ ± 0.2℃、CO₂ 浓度 5% 左右,例如 4.8 ~ 5.2%、湿度 100%。

[0123] 另外,在上述步骤 (C) 的培养时间,可以根据使用的胚胎干细胞的种类适当设定,对于来自小鼠的胚胎干细胞,优选 2 ~ 7 天,对于猴,优选 5 ~ 15 天。

[0124] 按照上述神经胶质细胞的制备方法,可以取得在 2 ~ 7 天、优选在 5 ~ 7 天内的这样令人惊奇的短时间获得神经胶质细胞的优异效果。

[0125] 得到的细胞为神经胶质细胞、特别是星形胶质细胞可以胶质纤维性酸性蛋白质 (GFAP) 等的表达作为指标,通过惯用的核酸的检测方法对对应的基因的表达进行研究或通过免疫学方法、例如惯用的 ELISA、免疫染色等对蛋白质的表达进行研究确认。可以以星形胶质细胞的形态特征,例如以具有多个特有星状分支的突起等作为指标进行确认。

[0126] 本发明中也包括通过这样的制备方法得到的基本上分离的神经胶质细胞。

[0127] 本发明的神经胶质细胞由于几乎是纯粹的星形胶质细胞,所以可望用于与神经元、神经干细胞同时移植后,有望应用于支持神经元的分化生长,进一步形成血脑屏障进行营养物质的补给等方面。

[0128] 通过本发明的神经细胞的制备方法得到的神经细胞的纯度可以通过例如使用对应于各个细胞特异的标志物的抗体或抗体片段的流式细胞仪,通过在全体细胞数中的细胞特异的标志物表达细胞的比例求出。通过本发明的神经细胞的制备方法可以得到基本上分离的神经细胞

[0129] 另外本发明的神经细胞也可以作为细胞药物组合物提供。这样的细胞药物组合物也包括在本发明中。

[0130] 本发明的细胞医药组合物具体来说是含有选自本发明的神经干细胞、神经细胞以及神经胶质细胞的细胞作为有效成分。

[0131] 本发明的医药组合物也可以适当含有药理上可接受的助剂。

[0132] 另外,以向细胞药物组合物的适用对象的个体的适用部位供给神经递质、神经营养因子等为目的时,例如,对于神经干细胞也可以使用导入了编码神经递质的核酸、编码神经营养因子的核酸等的细胞、或根据需要在合适的分化条件下将分化诱导得到的细胞封入到半透膜等胶囊后得到的细胞药物组合物。在囊中封入有效成分的细胞药物组合物中使用的细胞对于适用对象的个体可以是同种的细胞,也可以是异种的细胞。

[0133] 另外,利用本发明的神经干细胞、神经细胞或神经胶质细胞,通过导入到个体的神经变性部位或神经损伤部位,可以对起因于神经变性或神经损伤的状态,例如神经变性疾病 (例如,帕金森病、阿耳茨海默病等)、脊髓损伤、脑梗塞等神经损伤等进行神经细胞移植治疗等。因此,神经变性疾病或神经损伤的治疗方法也包括在本发明中。

[0134] 本发明的神经变性疾病或神经损伤的治疗方法的一大特征是将

[0135] (1) 本发明的神经干细胞、

[0136] (2) 本发明的神经细胞, 以及

[0137] (3) 本发明的神经胶质细胞

[0138] 至少选择的至少一种细胞导入到神经变性部位或神经损伤部位。

[0139] 利用本发明的治疗方法, 由于可以使用从本发明的神经干细胞、神经细胞, 以及神经胶质细胞中选择的至少一种细胞, 所以在细胞治疗时可以获得稳定的治疗效果、很高的治疗效果等, 可以取得以稳定状态对起因于神经变性或神经损伤的状态进行治疗的优异效果。

[0140] 本发明的治疗方法作为本发明的神经干细胞、神经细胞, 以及神经胶质细胞各种细胞的应用, 可以适用于上述列举的疾病。

[0141] 向神经变性部位或神经损伤部位导入细胞可以通过注射等进行。

[0142] 在本发明的治疗方法中, 可以进行如下导入:

[0143] - 当患脑梗塞、脊髓损伤时, 可以向损伤部位导入本发明的神经干细胞,

[0144] - 当患帕金森病时, 可以向纹状体、中脑黑质 (midbrain substantianigra) 等中导入本发明的神经干细胞多巴胺能神经元,

[0145] - 当患亨廷顿舞蹈病, 可以向尾状核等中导入本发明的神经细胞 GABA 能神经元等。

[0146] 另外, 本发明的神经干细胞、神经细胞, 以及神经胶质细胞也可以用于治疗神经变性疾病或神经损伤的医药的制备中使用。

[0147] 以下通过实施例对本发明进行具体说明, 但本发明并不限于这些实施例。另外在以下实施例中, 作为神经干细胞以及神经细胞分化诱导培养基, 使用星形胶质细胞条件培养基。另外, 作为用于星形胶质细胞培养的基础培养基 (星形胶质细胞基础培养基), 使用含有 N2 添加物 ([胰岛素、铁传递蛋白、硒、孕酮]) 的 DMEM:F-12。制备星形胶质细胞使用小鼠胎仔脑和大鼠胎仔脑, 根据已报道的方法 [Banker, G. 等编, Culturing Nerve Cells(1991), The MIT Press(剑桥, 英国) 发行] 进行。

[0148] 实施例 1 神经干细胞的制备

[0149] 作为胚胎干细胞使用通过惯用方法用 C57BL/6 小鼠的胚原基 (确认膈栓 (vaginal plug) 后第 3.5 天) 建立的 HK 细胞株 (传代数 10 以下)。上述 HK 细胞是传代数少、难于进行自发分化的细胞。

[0150] 将从妊娠第 14 天的同系小鼠制备的成纤维细胞在含有 10% (w/v) 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM 培养基中培养至铺满。然后向得到的细胞培养物中添加丝裂霉素 C (1 μ g/ml), 温育 3 小鼠, 得到钝化细胞。用磷酸缓冲生理盐水清洗钝化细胞, 然后用胰蛋白酶处理。将得到的细胞接种到用明胶包被的平板上, 得到饲养细胞层。作为前述平板分别使用 60mm 平板 (1.5 $\times 10^6$ 细胞 / 板) 以及 4 孔板 (3 $\times 10^5$ 细胞 / 孔)。

[0151] 将上述 HK 细胞株接种到 60mm 板的饲养细胞层上, 每块板接种 100 ~ 200 个。作为培养液使用含有终浓度为 15% (v/v) Knockout Serum Replacement (KSR GIBCO BRL 公司生产)、 10^3 U/ml 白血病抑制因子 (Leukemia Inhibitory factor) [LIF, E SGR0, Chemicon International Inc., 美国加利福尼亚州]、2mM L- 谷氨酸、100 μ M 非必需氨基酸、100 μ M β - 巯基乙醇、50U/ml 盘尼西林和 50 μ g/ml 链霉素的 DMEM。培养基每隔 1 ~ 2 天更换一次。

[0152] 7 ~ 10 天后,将胚胎干细胞集落的直径增殖到约 400 ~ 500 μm 的板用 DMEM(不含有血清和其他成分)清洗 2 ~ 3 次。用前端加工成细的玻璃毛细管将胚胎干细胞集落从饲养细胞层机械剥离,挑出。将得到的胚胎干细胞集落在培养用培养皿中用不含血清 DMEM 清洗 2 ~ 3 次。然后,将胚胎干细胞的集落移到培养侧表面未经处理的悬浮培养用 35mm 细菌培养皿中,在上述星形胶质细胞条件培养基和上述星形胶质细胞基础培养基的混合物(体积比 1 : 1)中,在 CO_2 温育箱内进行悬浮培养。在 CO_2 温育箱内的培养条件是 37°C 、空气中 CO_2 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围。培养时在 35mm 培养皿 2ml 的培养液中培养约 10 ~ 20 个胚胎干细胞的集落。而在分化诱导中不更换培养液。

[0153] 在悬浮培养第 4 天,向培养物中添加 5- 溴脱氧尿核苷 (BrdU) 使终浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。而 BrdU 的掺入成为细胞分裂的指标。在与上述同样的培养条件对培养物温育 8 小时。然后将得到的细胞在不含有 BrdU 的培养基中培养 1 小时,洗净。然后将得到的细胞用 4% (w/v) 多聚甲醛、0.4M 蔗糖、50mM 磷酸缓冲液 pH7.4 进行 30 分钟固定,移送到 0.1% (v/v) TritonTMX-100 处理和用 10% (w/v) BSA-PBS 封闭。

[0154] 将封闭后的细胞 (Stem Cell Sphere ;以下略为 SCS) 和来自小鼠抗神经上皮干细胞蛋白抗体于 4°C 下温育过夜。将得到的混合物和荧光标记兔抗 IgG 抗体于室温下温育 2 小时,再与生物素标记小鼠抗 BrdU 抗体在 4°C 下温育过夜。然后,将得到的混合物与荧光标记链霉抗生物素蛋白于室温下温育 2 小时。然后对得到的细胞用 Zeiss 公司生产的共焦点激光扫描显微镜 (商品名 :LSM510) 观察。图 1 给出了免疫荧光染色图像。

[0155] 就象图 1 所表示的那样,在 SCS 表层的细胞群中,观察到对作为神经干细胞的标志物的神经上皮干细胞蛋白强的信号 (神经上皮干细胞蛋白强阳性),观察到对 BrdU 的弱信号 (BrdU 弱阳性)。因此,表明上述 SCS 表层的细胞群是神经干细胞。

[0156] 另外,在处于 SCS 核心的部分的细胞群中,观察到对 BrdU 的强信号 (BrdU 强阳性)。因此,表明在处于 SCS 核心的部分的细胞群中,正在进行旺盛的细胞分裂。另外,在处于 SCS 核心的细胞群中,观察到对神经上皮干细胞蛋白的信号。根据这样的结果和下面的 RT-PCR 的结果可以认为处于上述 SCS 核心的部分的细胞群是未分化的胚胎干细胞。

[0157] 另外,在处于 SCS 表层于核心之间的细胞中,都没有观察到相对于神经上皮干细胞蛋白和 BrdU 任意一方的信号 (神经上皮干细胞蛋白阴性和 BrdU 阴性)。由此表明处于上述 SCS 表层于核心之间的细胞是处于由胚胎干细胞向神经干细胞分化诱导的过渡阶段状态的细胞。

[0158] 就象图 1 所表示的那样,可知通过使用星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物的悬浮培养形成的 SCS 具有类似于行星 的层构造。即,SCS 具有与地壳层对应的神经上皮干细胞蛋白阳性的神经干细胞层、对于核心轴层的神经上皮干细胞蛋白以及 BrdU 任意一方都为阴性的前神经干细胞层和处于核的 BrdU 阳性的胚胎干细胞层构成的三层构造。这些构造与通过液滴法等使 1 至数个胚胎干细胞形成凝集体的 EB 的构造完全不同。另外,在上述 EB 的制备中,在血清存在下使胚胎干细胞形成凝集体,通过血清中的不明确的各种分化诱导因子作用,被分别分化诱导为内胚层、外胚层和中胚层。

[0159] 与此相反在本实施例中,由于胚胎干细胞的悬浮培养中使用的星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物不含血清,通过星形胶质细胞释放出的因子 (群) 的作用,只有神经干细胞在短时间高效地分化诱导为 SCS 表层,这一点是很明确的。

即使在星形胶质细胞条件培养基中对由集落分散的单一胚胎干细胞进行悬浮培养,也不能形成凝集体。由此表明把细胞粘附状态增殖的未分化的胚胎干细胞的集落作为块进行悬浮培养对于神经干细胞的分化诱导是必要的。

[0160] 另外,对 SCS 形成时使用的胚胎干细胞的集落的大小进行了研究。结果表明对于小鼠,在饲养细胞层上开始对单一的胚胎干细胞进行培养,在 7~9 日后,生成大小以直径计,直径约为 400~500 μm 的集落,通过与上述同样的悬浮培养,几乎所有的胚胎干细胞都形成 SCS。这样的集落的大小当悬浮培养后形成球形时,相当于直径约 200~300 μm 。

[0161] 实施例 2 向神经细胞的分化

[0162] 把神经干细胞进行分化诱导至表层的 SCS[上述实施例 1 得到的 SCS(悬浮培养 4 天)]在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物(体积比 1:1)中,于 CO_2 温育箱内、 37°C 、空气中 CO_2 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下进行悬浮培养。

[0163] 另外,为了研究 SCS 中的分化状态随时间的变化,在 1~4 天培养中,对悬浮培养的 SCS 进行与上述操作中相同的固定。

[0164] 作为向神经细胞分化的指标,使用识别幼弱神经元的标志物的类 III β 微管蛋白的抗体 TUJ1。免疫荧光组织化学的观察使用 Nikon 公司生产的直立荧光显微镜(商品名: Eclipse E800)。

[0165] 结果在 SCS 的内部观察到在悬浮培养开始后马上可以观察到在 SCS 内部有对 TUJ1 呈弱反应的细胞。

[0166] 另外,图 2 给出了对上述 SCS 进行 6~7 天悬浮培养的结果。

[0167] 就象图 2 所表示的那样,观察到对 TUJ1 强阳性,在 SCS 内使神经突起伸展得很长的细胞。即可以分析认为由在 SCS 中分化的神经细胞通过抗类 III β 微管蛋白的抗体被染色的神经突起在 SCS 中伸展为网状。该结果表明通过星形胶质细胞条件培养基中的因子(群)作用,神经干细胞可以以 SCS 状态一直分化诱导至幼弱神经元。

[0168] 实施例 3 神经细胞分化法的改进

[0169] 通过在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中对 SCS 进行悬浮培养,可以制备神经干细胞,并使其分化诱导为幼弱神经元。

[0170] 接下来,对为了有效地使用在 SCS 表层形成的神经干细胞分化成神经细胞的最适培养条件进行了研究。

[0171] 对用聚赖氨酸包被的培养皿的培养侧表面再进一步用 0.1mg/ml 层粘连蛋白或稀释 10~20 倍的 MATRIGEL™[BD Bioscience 公司生产]进行处理后制备粘附性培养基。将 4 天悬浮培养的 SCS 用玻璃毛细管起,转移至预先添加了星形胶质细胞条件培养基的粘附性的培养皿,于 CO_2 温育箱内、 37°C 、 CO_2 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下培养数小时。结果 SCS 粘附于培养基上。

[0172] 再使用相位差倒置显微镜(Nikon 公司生产),观察 SCS 及其周边的形态。结果确认从进行粘附培养后第 1 天开始就可以确认使神经突起伸展的 SCS。

[0173] 另外,再通过继续进行 4~7 天的粘附培养,产生了许多神经细胞的分化诱导。与上述实施例 1 同样对 BrdU 对细胞的整合进行研究。另外,关于 SCS 及其周边,使用相对于各个标志物的抗体与上述实施例 1 中的神经上皮干细胞蛋白的检测同样,通过免疫组织化学方法对神经干细胞标志物的神经上皮干细胞蛋白、作为分化的神经细胞标志物的神经

丝、多巴胺能神经元标志物的酪氨酸羟化酶（以下略为 TH）、GABA 能标志物的谷氨酸脱羧酶（以下略为 GAD）以及作为胆碱能标志物的胆碱乙酰转移酶的各个表达进行研究。图 3～图 7 给出了研究结果。

[0174] 就象图 3 和图 4 所表示的那样，粘附的 SCS 整合 BrdU 后作为旺盛分裂的神经上皮干细胞蛋白阳性的神经干细胞整体进行分化。另外在 SCS 周边，观察到许多被抗 NF 抗体强染色的迁移出神经细胞和从细胞体伸展的神经突起，可知神经上皮干细胞蛋白阳性的神经干细胞存在于其内部。另外就象图 4 所表示的那样，可知在图 3 中神经上皮干细胞蛋白阳性的神经干细胞存在的 SCS 的部位对 BrdU 为阳性，细胞分裂旺盛。

[0175] 另外，就象图 5 所表示的那样，可知 SCS 整体被抗多巴胺能神经元的标志物 TH 的抗体强染色，伸展的神经突起多数都为 GAD 阳性。另外，就象图 6 所表示的那样，可知与 TH 同样，SCS 整体被抗 GABA 能神经元的标志物 GAD 抗体强染色，伸展的神经突起多数都为 TH 阳性。另外，就象图 7 所表示的那样，可知与 TH 同样，SCS 被抗胆碱能神经元的标志物 ChAT 抗体强染色。即，就象图 5、图 6 以及图 7 所表示的那样，分别引起了 TH、GAD 以及 ChAT 的表达诱导。

[0176] 分析表明星形胶质细胞条件培养基中的分化诱导因子（群）的作用，通过悬浮培养形成的 SCS 表层的神经干细胞与细胞粘附分子的作用协调，可以非常有效地向神经细胞分化。另外，在使用上述星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物的悬浮培养和粘附培养的逐次培养法中，不能确定向神经胶质细胞的分化，表明星形胶质细胞分泌的诱导因子（群）在决定由神经干细胞向神经元的分化方面可能具有很强的作用。在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中悬浮培养的 SCS 可以与粘附性培养基粘附的比例在 90% 以上，粘附的 SCS 使称为神经分化的指标的神经突起伸展的比例大致为 100%。因此，认为即使考虑到实验的操作误差等，通过使用星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物的悬浮培养增殖的 SCS 几乎全部被赋予了向神经干细胞分化的条件，再通过粘附培养产生的细胞粘附分子的作用，决定向神经元分化。另外，粘附培养中的星形胶质细胞条件培养基显示出向神经细胞的分化促进作用，但是也证实了如果通过其他的神经细胞培养液培养基、例如 DMEM :F-12/N-2supplement、Neurobasal™B-27 (GIBCO BRL 公司生产) 也可以向神经细胞分化。可以认为这是由于通过悬浮培养 SCS 一旦分化为神经干细胞，就作为向系统设定向神经细胞分化，通过与细胞粘附分子的相互作用促进其性质表达的结果。

[0177] 另外，由于即使直接使胚胎干细胞的集落块粘附，在星形胶质细胞条件培养基中培养也不发生分化诱导，所以可以认为对胚胎干细胞集落进行悬浮培养是必要条件。

[0178] 实施例 4 神经干细胞的增殖

[0179] 在悬浮培养的 SCS 表层可以形成神经干细胞层，通过那样直接悬浮培养或在星形胶质细胞条件培养基等中进行粘附培养可以分化为神经元。因此，为了抑制由上述 SCS 向神经细胞的分化，使神经干细胞增殖，所以对悬浮培养后的 SCS 在 bFGF 存在下，于 37℃，CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下进行培养。

[0180] 上述的 bFGF 是维持神经干细胞处于未分化状态、而且促进细胞增殖的因子，可以认为即使是对在 SCS 表层形成神经干细胞也是有效的。与实施例 3 同样使 SCS 与粘附性培养基粘附。另外作为培养液，使用含有终浓度 20ng/ml bFGF 的 Neurobasal™B-27。隔

1~2天,向培养物中重新添加终浓度为20ng/ml的bFGF。使用直立荧光显微镜(Nikon公司生产),观察SCS及其周边的形态。

[0181] 结果,进行粘附培养后就马上可以观察到神经细胞分化出现的神经突起。1~2天后,与神经细胞形态不同的细胞由粘附的SCS出现、迁移出。

[0182] 另外,对BrdU向细胞的整合进行与上述实施例1同样研究。另外,对于SCS及其周边,使用来自小鼠的抗神经上皮干细胞蛋白抗体,通过免疫组织化学方法对作为神经干细胞标志物的神经上皮干细胞蛋白的表达进行了与上述实施例1中的神经上皮干细胞蛋白的检测同样研究。第8图给出了研究结果。

[0183] 就象第8图的免疫荧光组织化学的结果给出的那样,迁移出的细胞是对神经上皮干细胞蛋白阳性,可知是神经干细胞。即,可知通过将培养液由星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物替换成含有bFGF的Neurobasal™B-27,可以抑制向神经细胞的分化,神经上皮干细胞蛋白阳性的神经干细胞增殖,并有很多神经干细胞从SCS迁移出许多。

[0184] 另外,图9给出了对由一个SCS扩展的神经干细胞的集落进行观察的结果。就象图9所表示的那样,由该结果可知获得了许多出奇均一的神经干细胞。迁移出的神经干细胞细胞之间粘附紧密,在以与培养基质粘附的SCS为中心,半径约600 μ m的圆心状区域迁移出,由一个SCS可获得大量的神经干细胞。如果利用神经球法或其他单层培养法很难制备许多如此均一的神经干细胞,可知本实施例中的方法优异。

[0185] 另外,就象本实施例那样,使用SCS,制备神经干细胞的方法具有SCS作为迁移出的神经干细胞集落种可以使用多次的优异特征。即,使SCS粘附后使神经干细胞迁移出后,通过用玻璃毛细管挑起处于中心的SCS,移到新的粘附性培养基质上,可以再使神经干细胞由该SCS迁移出。

[0186] 对在含有bFGF的Neurobasal™B-27中,使神经干细胞迁移出的SCS中的BrdU的整合以及神经上皮干细胞蛋白的表达分布进行研究。其结果如图10所示。就象图10所表示的那样,粘附后使神经干细胞迁移出的SCS是BrdU阳性,利用抗BrdU抗体进行的染色在SCS核心部分强,与图1比较,可知BrdU的整合扩展到整体。另外就象图10所表示的那样,由于利用抗神经上皮干细胞蛋白抗体,核心以外的部分都被染色,所以可以判断在SCS内部向神经干细胞分化的比例增加了。可以认为由于神经干细胞在SCS内的增殖而产生了向培养基质的迁移出。SCS由于其自身可以作为神经干细胞旺盛地反复进行细胞分裂,所以作为种可以多次使用。

[0187] 通过本实施例表明通过在bFGF存在下对SCS进行粘附培养。可以制备许多神经干细胞。

[0188] 实施例5

[0189] 在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物中对小鼠胚胎干细胞HK细胞的集落进行悬浮培养,形成SCS时,从该HK细胞的悬浮培养开始时在含有终浓度20ng/ml bFGF的培养基[星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物(体积比=1:1)]中,于CO₂温育箱内进行悬浮培养。在CO₂温育箱内的培养条件是37℃、空气中CO₂浓度5%以及100%加湿氛围。培养时在35mm培养皿2ml的培养液中培养约10~20个胚胎干细胞的集落。每隔1~2天,向悬浮培养培养物中添加终浓度20ng/

ml 的 bFGF。

[0190] 悬浮培养第 4 天,向培养物中添加终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 的 5- 溴脱氧尿核苷 (BrdU)。而 BrdU 的整合成为细胞分裂的指标。在与上述同样的培养条件下对培养物温育 8 小时。然后将得到的细胞在不含有 BrdU 的培养基中培养 1 小时,洗净。然后将得到的细胞用 4% (w/v) 多聚甲醛、0.4M 蔗糖、50mM 磷酸缓冲液 pH7.4 进行 30 分钟固定,移送到 0.1% (v/v) Triton™X-100 处理和用 10% (w/v) BSA 封闭的步骤。

[0191] 将封闭后的细胞 (Stem Cell Sphere ;以下略为 SCS) 和来自小鼠抗神经上皮干细胞蛋白抗体于 4°C 下温育过夜。将得到的混合物和荧光标记兔抗小鼠 IgG 抗体于室温下温育 2 小时,再与生物素标记小鼠抗 BrdU 抗体在 4°C 下温育过夜。然后,将得到的混合物与荧光标记链霉抗生物素蛋白于室温下温育 2 小时。然后对得到的细胞用 Zeiss 公司生产的共焦点激光扫描显微镜 (商品名 :LSM510) 观察。图 11 给出了对作为神经干细胞标志物的神经上皮干细胞蛋白和成为细胞分裂的指标的 BrdU 的分布进行研究的免疫荧光染色图像。

[0192] 就象图 11 所表示的那样,SCS 表层除了核心外的大部分都增殖成对神经上皮干细胞蛋白阳性的细胞。另外,这些细胞对于 BrdU 也表现出阳性。表明通过向星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物添加作为神经干细胞的增殖因子 bFGF,可以以令人惊奇的高效率制备神经干细胞。

[0193] 实施例 6 增殖的神经干细胞向神经细胞的分化

[0194] 研究实施例 4 中得到的神经干细胞是否与在 SCS 表层形成的神经干细胞同样分化为神经细胞。具体来说,在含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27 中培养 SCS,得到迁移出神经干细胞,对于分化被抑制的上述神经干细胞通过将培养基换成在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物,于 37°C 、空气中 CO_2 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下,研究是否能够分化诱导为神经细胞。结果如图 12 所示。

[0195] 就象图 12 所表示的那样,可知细胞之间紧密粘附的神经干细胞通过将培养基换成星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物,1 天后,相互紧密粘附状态下、迁移出的神经干细胞离散扩展开,形态向神经细胞分化。另外,可知与在 SCS 表层形成的神经干细胞同样,迁移出的神经干细胞通过星形胶质细胞条件培养基作用也分化为神经细胞。这样的结果表明由大量制备的神经干细胞可以直接进行大量的神经细胞的制备。

[0196] 另外,与上述实施例 1 同样对 BrdU 向细胞的整合进行研究。对于 SCS 及其周边,使用针对各个标志物的抗体与,通过免疫组织化学方法对神经干细胞标志物的神经上皮干细胞蛋白、分化的神经细胞标志物的神经 丝、作为多巴胺能神经元的标志物的酪氨酸羟化酶 (以下略为 TH)、GABA 能标志物的谷氨酸脱羧酶 (以下略为 GAD) 以及胆碱能标志物的胆碱乙酰转移酶的各个表达进行上述实施例 1 中的神经上皮干细胞蛋白的检测同样的研究。图 13、图 14、图 15 给出了研究结果。

[0197] 就象图 13 所表示的那样,在 NF 阳性大部分的神经细胞的大部分中表达作为多巴胺能神经元标志物的 TH。即,不仅由集聚在 SCS 内部的神经干细胞分化为 TH 阳性的神经细胞,而且由迁移出的神经干细胞也可分化 TH 阳性的神经细胞。又如图 13 所表示的那样,在来自迁移出神经干细胞的神经细胞中,确认表现出 TH 和 GAD 共表达的神经细胞,表明存在着未成熟的神经细胞。另外,象图 15 所表示的那样,可以确认细胞内含有神经递质 5- 羟色胺的神经细胞。由这些结果可知通过使用可增殖的神经干细胞可获得如下的优异效果:

[0198] ①可以大量制备用已知的方法得不到的均匀的神经细胞，

[0199] ②由于以分裂旺盛的胚胎干细胞作为起始材料，所以可以提供 HighThroughput Screenin 所必需神经细胞，

[0200] ③也可以大量制备使用由脑制备的初代培养神经细胞时制备困难的、对基因进行操作的神经细胞。

[0201] 实施例 7 增殖的神经干细胞向星形胶质细胞的分化

[0202] 神经干细胞由于是具有多样分化能力的细胞，所以通过改变培养条件研究能否分化为神经细胞以外的细胞种。

[0203] 与实施例 4 同样对 SCS 进行培养，神经干细胞从粘附的 SCS 迁移出，形成伸展的神经元时，将含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27 换成不含有 bFGF 的 Neurobasal™B-27，于 37℃、空气中 CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下继续培养。

[0204] 结果，在与分化为神经细胞时同样，数日后在神经元的周边部细胞之间紧密粘附状态的细胞一个一个地分离开。然后分离的细胞向具有星形胶质细胞特有的有多个分支的突起的细胞分化。在该阶段中，通过免疫荧光组织化学研究作为星形胶质细胞标志物的胶质纤维性酸性蛋白质 [Glial Fib rillary Acidic Protein(GFAP)] 的表达。

[0205] 结果就象图 16 所表示的那样，可知作为持续供给神经干细胞的种的 SCS 以及迁移出的神经干细胞全部都分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞，对 NF 为阴性。另外，就象图 16 所表示的那样，在神经元周边部分，星形胶质细胞特有的短分支突起被抗 GFAP 抗体染色。即，与实施例 6 合在一起，通过改变培养条件，可以决定神经干细胞向神经细胞或是星形胶质细胞哪一方分化。

[0206] 即，以往，将神经干细胞限定分为一种细胞是困难的，而通过本实施例的方法由于可以大量制备基本上均一的神经干细胞，所以可以将神经干细胞限定分为一种细胞。因此，如本实施例所示，可以期待使用 SCS 的方法对解决再生医疗、移植医疗等中最大问题，如移植细胞的畸化、癌变等的有效性。

[0207] 实施例 8 分散的神经干细胞向神经细胞的分化

[0208] 从含有实施例 4 中得到的神经干细胞的 60mm 培养皿中除去培养基，用 Dulbecco 的 PBS(不含 Ca、Mg) 洗。然后向上述 60mm 培养皿中添加 2ml 的 PBS，于 37℃ 下温育 5 分钟。通过移液管剥离与培养基质粘附变弱的神经干细胞，于 700×g 下离心分离 5 分钟，回收该神经干细胞。然后，向上述神经干细胞添加星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物 2ml，进行悬浮，接种到用细胞粘附分子包被的 35mm 培养皿中。结果就象图 17 所表示的那样，可知在实施例 4 中得到的神经干细胞一旦从粘附性培养基质剥离后即使进行单层培养也可在数日内向神经细胞分化。

[0209] 实施例 9 由冷冻保存的神经干细胞向神经细胞的分化

[0210] 用与实施例 8 同样的方法回收神经干细胞。将得到的神经干细胞悬浮于 10% (v/v) DMSO/90% (v/v) FCS 中，在极低温度快速冷冻机中，于 -80℃ 下冷冻保存。

[0211] 将冷冻保存的神经干细胞于 37℃ 的温育箱中融解，向得到的产物中添加 DMEM 5ml，通过于 700×g 下离心分离 5 分钟，对神经干细胞进行清洗，除去 FCS。然后，向得到的神经干细胞添加星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物 2ml，对神经干细胞进行悬浮，接种到用细胞粘附分子包被的 35mm 培养皿中。在图 18 中给出了对冷

冻保存的神经干细胞向神经细胞分化进行研究的结果。

[0212] 就象图 18 所表示的那样,可知即使使用冷冻保存的神经干细胞进行 单层培养也可在数日内向神经细胞分化。即,对能够大量制备的神经干细胞进行冷冻,在需要时可以融解后使用。

[0213] 实施例 10 胚胎干细胞 129SV 细胞株向神经细胞的分化

[0214] 使用市售的 129SV 小鼠的胚胎干细胞(传代数 15,大日本制药株式会社供给)[Kontgen F. 等, *Int. Immunol.*, 5:957-964, (1993); Malissen M. 等人, *EMBO J.*, 12:4347-4355., (1993)] 取代上述实施例 1~3 中的由 C57BL/6 小鼠的胚原基制备的建立胚胎干细胞 HK 细胞株,在与上述实施例 1~3 同样的培养条件下对分化诱导进行研究。在图 19 中给出了在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中进行悬浮培养,于粘附性培养基中进行粘附培养的结果。

[0215] 就象图 19 所表示的那样,悬浮培养后,在粘附性培养基中进行粘附培养,可知从由 129SV 细胞株得到的 SCS 伸展出许多神经突起。另外,通过将粘附培养时的培养基换成含有终浓度为 20ng/ml 的 bFGF 的 Neurobasal™B-27,可以引起神经干细胞迁移出,观察到与 HK 细胞株同样的现象。即,显然即使是对于来自不同系的小鼠胚胎干细胞,在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中对胚胎干细胞进行悬浮培养,使 SCS 形成,然后进行粘附培养的方法也适用。

[0216] 另外,在悬浮培养以外的条件下,有时不仅确认有神经细胞,还确认有其他细胞,所以很难选择性地向神经细胞分化。

[0217] 实施例 11 长尾猴胚胎干细胞 (CMK-6) 向神经细胞的分化

[0218] 由建立的胚胎干细胞 CMK-6 细胞株 [Suemori, H. 等人, *Dev. Dyn.*, 222:273-279, (2001)] 与小鼠胚胎干细胞同样对通过用星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物进行悬浮培养,以及在粘附性培养基中进行粘附培养,是否能分化诱导为神经细胞进行了研究。

[0219] 将小鼠初代成纤维细胞作为饲养细胞层,把 CMK-6 细胞株置于含有终浓度 13.3% (w/v) 的 FCS 和 10^3 U/ml LIF 的 DMEM:F-12(1:1) 中进行培养。培养条件为 37℃、CO₂ 浓度 5%。

[0220] 在 CMK-6 细胞株集落成为 400~500 μm 大小的阶段,与小鼠的情况同样用玻璃毛细管从饲养细胞层进行机械剥离。然后,对得到的 CMK-6 细胞株集落于 37℃、空气中 CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下, 35mm 细菌培养皿中在加星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物 2ml 中对 10~20 个集落进行悬浮培养。

[0221] 另外,与小鼠胚胎干细胞旺盛的状态下形成集落相反,由于 CMK-6 细胞株的集落是扁平的,所以剥离后马上以类似于纸的歪扭状态进行悬浮。然而,数小时后,由于胚胎干细胞之间的细胞间粘附 CMK-6 细胞株形成球状形态。

[0222] 另外,与小鼠胚胎干细胞相比,CMK-6 细胞株由于增殖缓慢,所以即使悬浮培养,要使来自 CMK-6 细胞株的 SCS 增大也需要时间。

[0223] 为了研究在长尾猴胚胎干细胞 (CMK-6 细胞株) 的 SCS 形成时向神经干细胞的分化的状态,在星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物中悬浮培养 10~12 天后进行固定,与小鼠的情况同样,在来自相对于灵长类的兔子的抗神经上皮干细

胞蛋白抗体研究了分布情况。再使悬浮培养后的 SCS 与粘附培养基粘附,对于 7~10 天后迁移出的细胞也研究对神经上皮干细胞蛋白的反应性。其结果如图 20 所示。

[0224] 就象图 20 所表示的那样,悬浮 SCS 整体被抗神经上皮干细胞蛋白抗体染色。另外,由粘附 SCS 迁移出的细胞也被抗神经上皮干细胞蛋白抗体染色,表明与小鼠的情况相同,神经干细胞可以通过星形胶质细胞条件培养基和星形胶质细胞基础培养基的混合物和悬浮培养有效地制备。

[0225] 图 21 给出了通过相差显微镜对在粘附培养第 1 天的 SCS 及其周边进行观察的结果。

[0226] 就象图 21 所表示的那样,可知与来自小鼠胚胎干细胞的 SCS 同样,在粘附培养后第 1 天,神经细胞来自长尾猴胚胎干细胞的 SCS 迁移出,使神经突起伸展。另外,就象在小鼠胚胎干细胞的粘附 SCS 中也观察到的那样,可知在 SCS 内向神经细胞分化,使神经突起由 SCS 旺盛伸展。

[0227] 另外,对于从由长尾猴胚胎干细胞 CMK-6 细胞株得到的 SCS 迁移出的神经细胞中的神经递质的合成酶的表达与上述实施例 1 中的神经上皮干细胞蛋白的检测同样通过免疫组织化学方法进行研究。结果如图 22 所示。

[0228] 就象图 22 所表示的那样,NF 阳性的神经细胞几乎都是 TH 阳性,可知多巴胺能神经元可分化诱导。即,通过使用星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物的悬浮培养以及使用粘附性培养基质的粘附培养,长尾猴胚胎干细胞 CMK-6 也很容易向神经细胞分化。

[0229] 由此可知在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中进行悬浮培养、粘附培养,向神经细胞分化的方法也普遍适用于与小鼠不同的灵长类的长尾猴胚胎干细胞。而这样的方法的有效程度超越了种属,认为具有普遍性。

[0230] 而在悬浮培养以外的条件下,有时不仅可以确认有神经细胞,也可以确认有其他的细胞,所以很难选择性地向神经细胞的分化。

[0231] 实施例 12 基因表达分析

[0232] 来自小鼠的 HK 株

[0233] 对伴随由未分化胚胎干细胞向神经细胞的分化诱导的基因表达进行了研究。

[0234] 对未分化的胚胎干细胞在 37℃、空气中 CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下进行 4 天悬浮培养,使其形成 SCS,然后在 37℃、空气中 CO₂ 浓度 5% 以及 100% 加湿氛围下进行 5 天粘附培养,诱导向神经细胞的分化。

[0235] 分别用 20 个未分化的胚胎干细胞、通过悬浮培养形成的 SCS 以及通过粘附培养得到的细胞块用惯用的方法制备 mRNA。以得到的 mRNA 作为模板,使用随机 6 聚体作为引物,于 37℃ 下进行 60 分钟逆转录反应,合成 cDNA。

[0236] 而作为引物,使用用于分别扩增 Oct-4 (ES 细胞特有的转录调控因子)、Pax-6 (神经前驱细胞中特有的转录调控因子)、神经上皮干细胞蛋白、NF-M、Nurr1 (多巴胺神经元的标志物)、TH、GATA4 (内胚层的标志物)、Brachyury (中胚层的标志物)、细胞角蛋白 17 (外胚层表皮细胞的标志物)、β-肌动蛋白以及 GAPDH 的引物。

[0237] 然后用上述分别针对 Oct-4 (24 循环)、Pax-6 (30 循环)、神经上皮干细胞蛋白 (26 循环)、NF-M (30 循环)、Nurr1 (26 循环)、TH (30 循环)、GATA4 (30 循环)、Brachyury (30 循

环)以及 β -肌动蛋白(22循环)的引物进行PCR反应,模板cDNA的用量应使相应于GAPDH的PCR产物片段量在未分化的胚胎干细胞之间相等,通过悬浮培养形成的SCS、通过粘附培养得到细胞块。PCR的一个循环为95°C 15秒、58°C 30秒和72°C 45秒。将得到的各个产物进行电泳分析。结果如图23所示。

[0238] 就象图23所表示的那样,可知在胚胎干细胞(带1)被检测的Oct-4在悬浮SCS(带2)中减少,在通过粘附SCS分化为神经的状态(带3)下只看到非常弱的信号。另外,在神经干细胞中表达的神经上皮干细胞蛋白在悬浮SCS中表达急速升高,在粘附SCS的阶段中表达仍继续。这样的神经上皮干细胞蛋白的表达分布图与神经干细胞不断进行分裂,分化为神经细胞非常一致。另外,只在神经细胞中表达的NF、多巴胺神经元的合成酶的TH以及其转录因子Nurr1随着各个悬浮SCS向粘附SCS分化,基因表达增强。另外,在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中对胚胎干细胞进行悬浮培养,使其形成SCS,然后在通过进行粘附培养的方法得到的分化神经细胞中,由于内胚层和中胚层以及外胚层的标志物基因的表达几乎没有变化,显然上述方法与形成EB后被分化的方法明显不同。

[0239] 接下来,对随时间变化引起的定量变化进行研究。将未分化的胚胎干细胞集落在星形胶质细胞条件培养基与星形胶质细胞基础培养基的混合物中悬浮培养4天,形成SCS,对该SCS进行5天粘附培养,诱导向神经细胞的分化。用惯用的方法从未分化的胚胎干细胞集落(悬浮培养0日)、悬浮培养2天和4天的SCS以及粘附培养后2天和5天的细胞块各4个或5个制备mRNA。以得到的mRNA作为模板,进行逆转录反应,合成cDNA。

[0240] 接下来,为了对GAPDH、Oct-4、神经上皮干细胞蛋白以及TH的mRNA量进行解析,进行与上述同样循环数的PCR,对产量进行定量,由此定量求出样品中的GAPDH、Oct-4、神经上皮干细胞蛋白以及TH的mRNA量。然后,用GAPDH的量除Oct-4、神经上皮干细胞蛋白以及TH的各个mRNA量,作为Oct-4/GAPDH、神经上皮干细胞蛋白/GAPDH、TH/GAPDH求出相对表达量,再将相对的表达量的最高值作为1,用曲线表示。结果如图24所示。

[0241] 结果就象图24所表示的那样,在神经干细胞中表达的神经上皮干细胞蛋白可知在悬浮SCS中表达急速提高,在粘附SCS的阶段也继续表达。这样的神经上皮干细胞蛋白表达分布图与神经干细胞不断进行分裂,分化为神经细胞非常一致。另外,多巴胺神经元的合成酶的TH随着从悬浮SCS向粘附SCS分化,基因表达增强。

[0242] 产业上利用可能性

[0243] 如果按照本发明的基本上分离的神经细胞的制备方法,则对胚胎干细胞的供给源没有限定,并且用改胚胎干细胞可以大量而高效地提供基本上分离的神经细胞,不必经过诱导神经细胞以外的外胚层细胞、中胚层细胞以及内胚层细胞的过程。因此有望以应用于神经再生医疗等。另外,本发明的神经细胞由胚胎干细胞经神经干细胞有选择地分化诱导为神经细胞或神经胶质细胞中的任一种,所以可以用作在对神经变性疾病、脊髓损伤、脑梗塞等神经细胞移植的神经再生医疗等中的细胞或组织的供给源。另外通过本发明的神经细胞,在对神经变性疾病、脊髓损伤、脑梗塞等的神经再生医疗等中,可以进行神经递质的放出、神经间联络的再构建等。另外,通过本发明的神经胶质细胞,可以与神经细胞、神经干细胞同时进行移植,支持神经细胞的分化成长,另外,形成血脑屏障后补充营养物质。

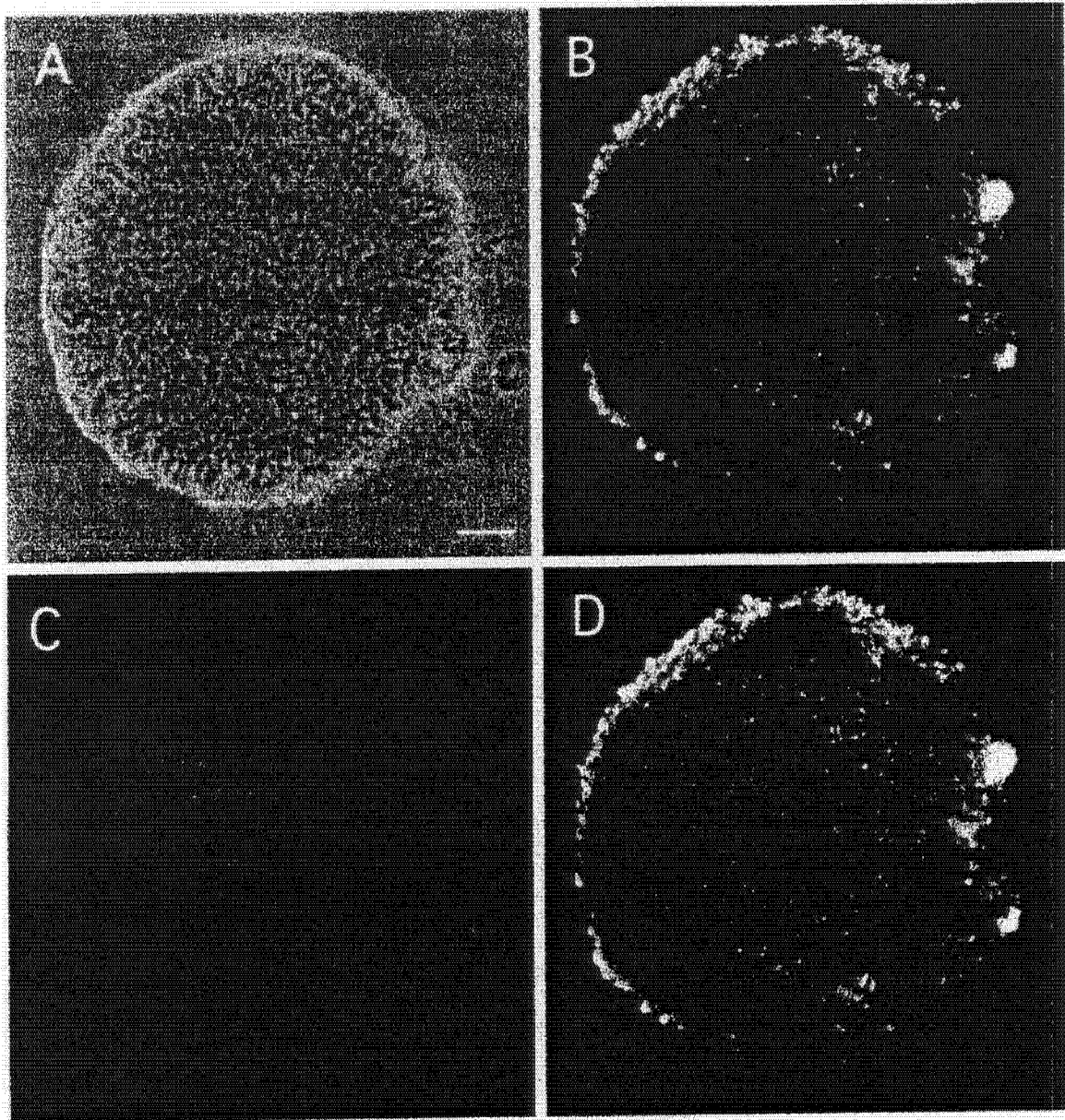


图 1

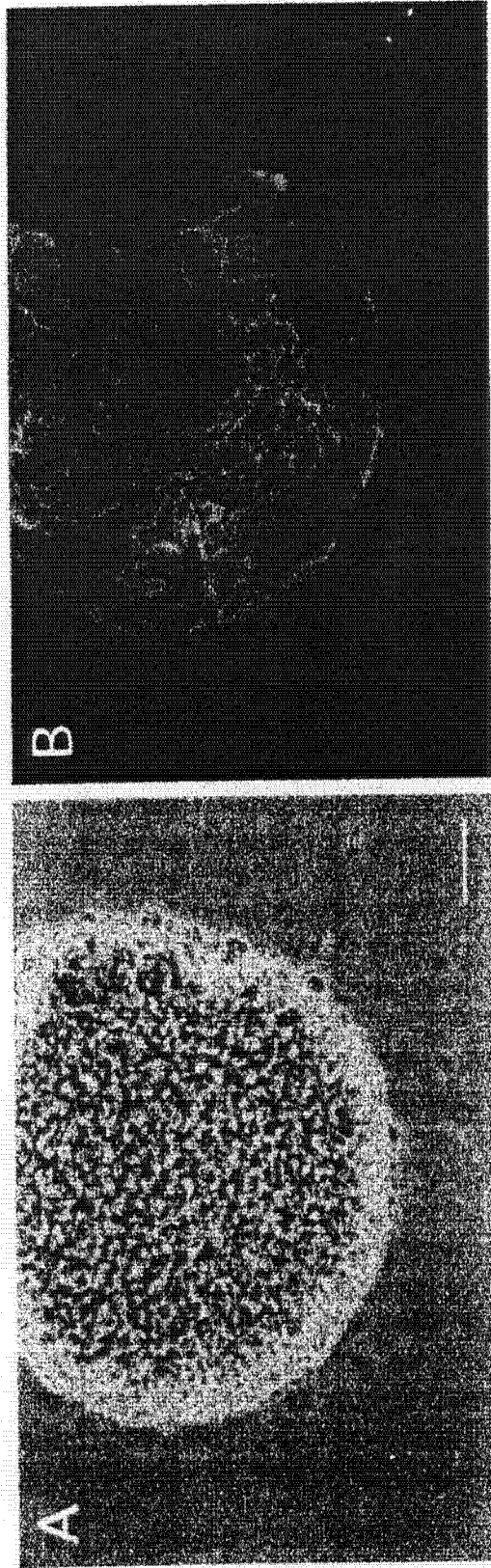


图 2

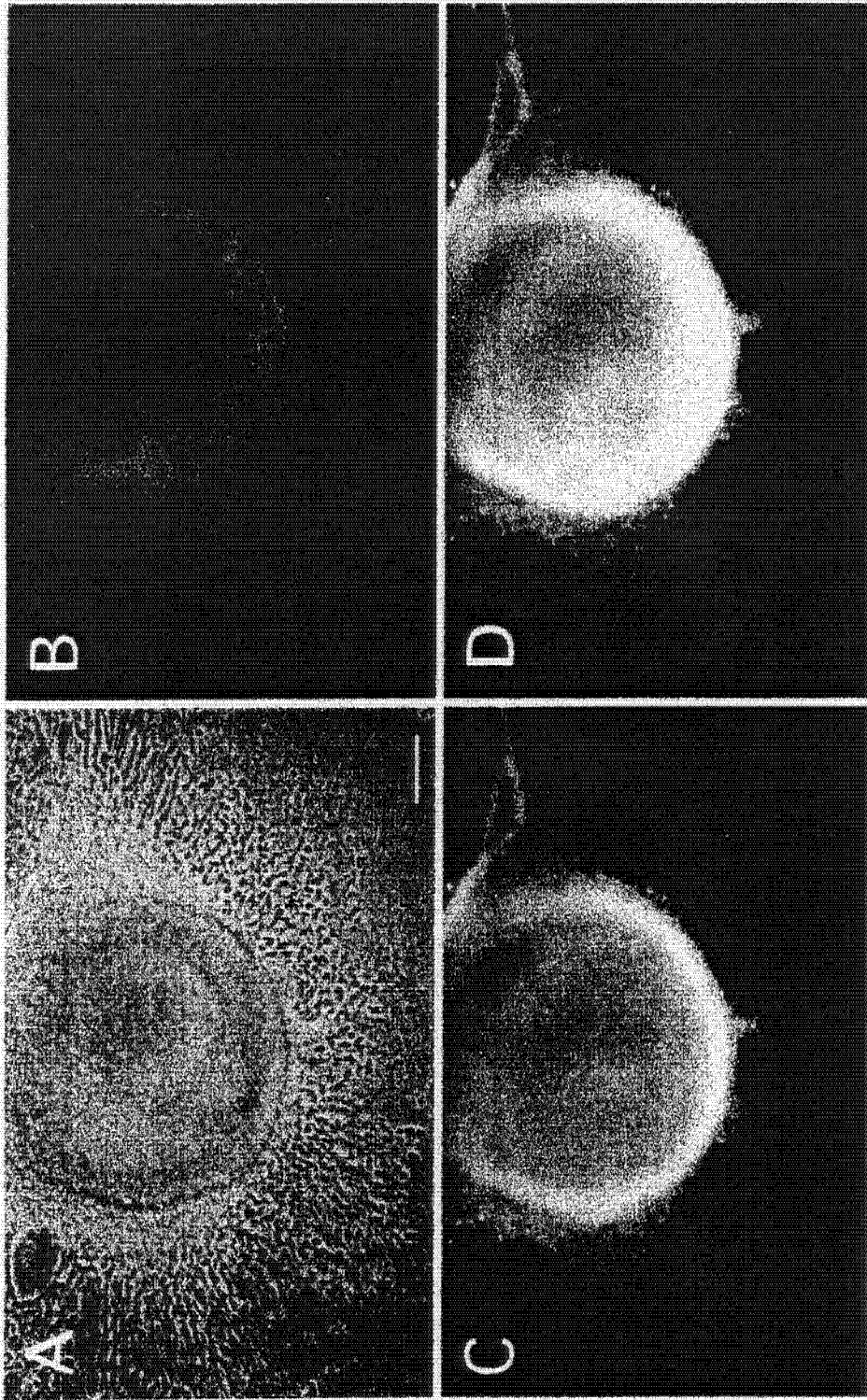


图 3

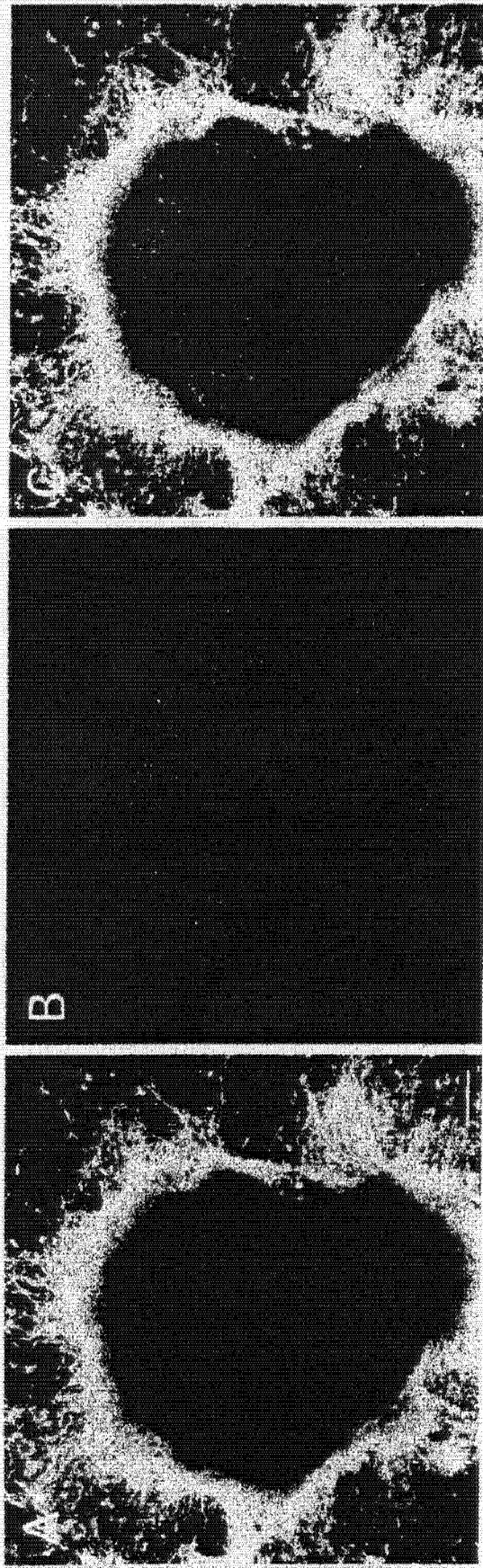


图 4

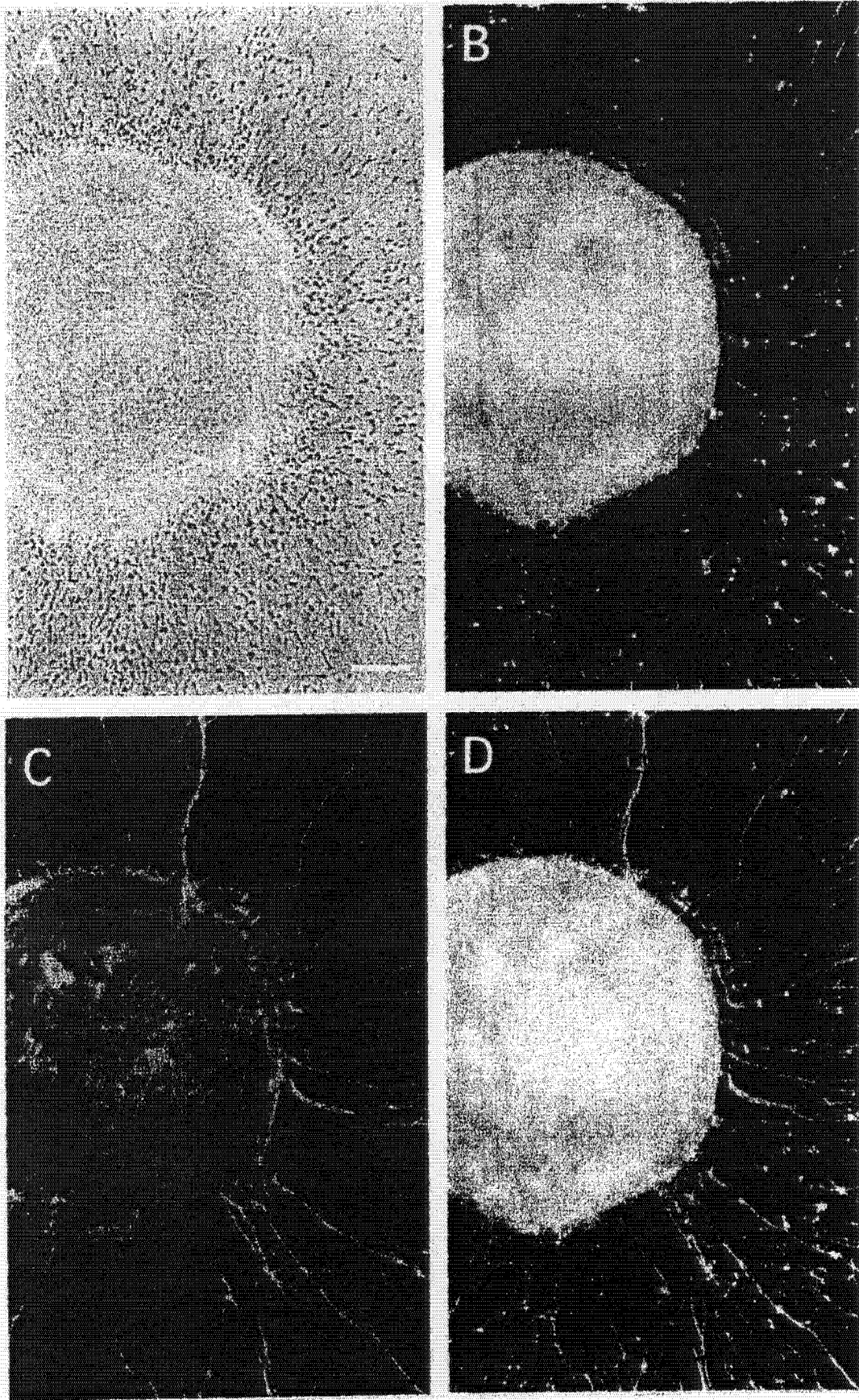


图 5

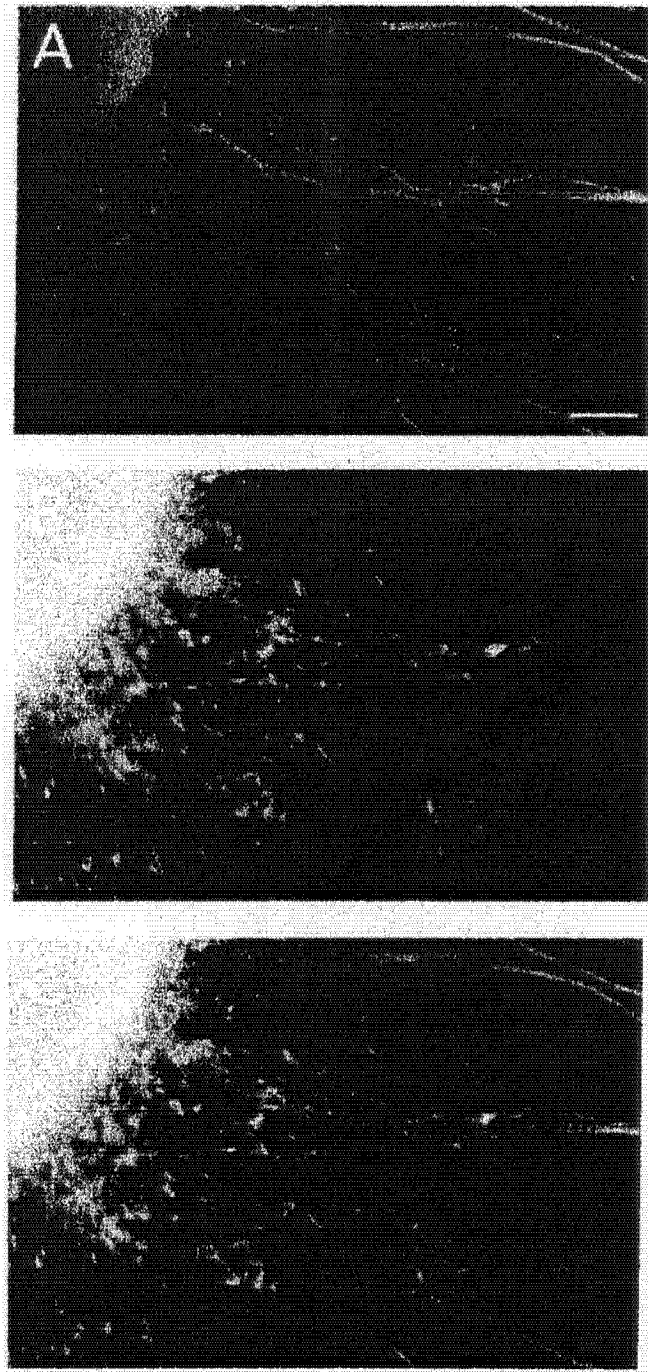


图 6

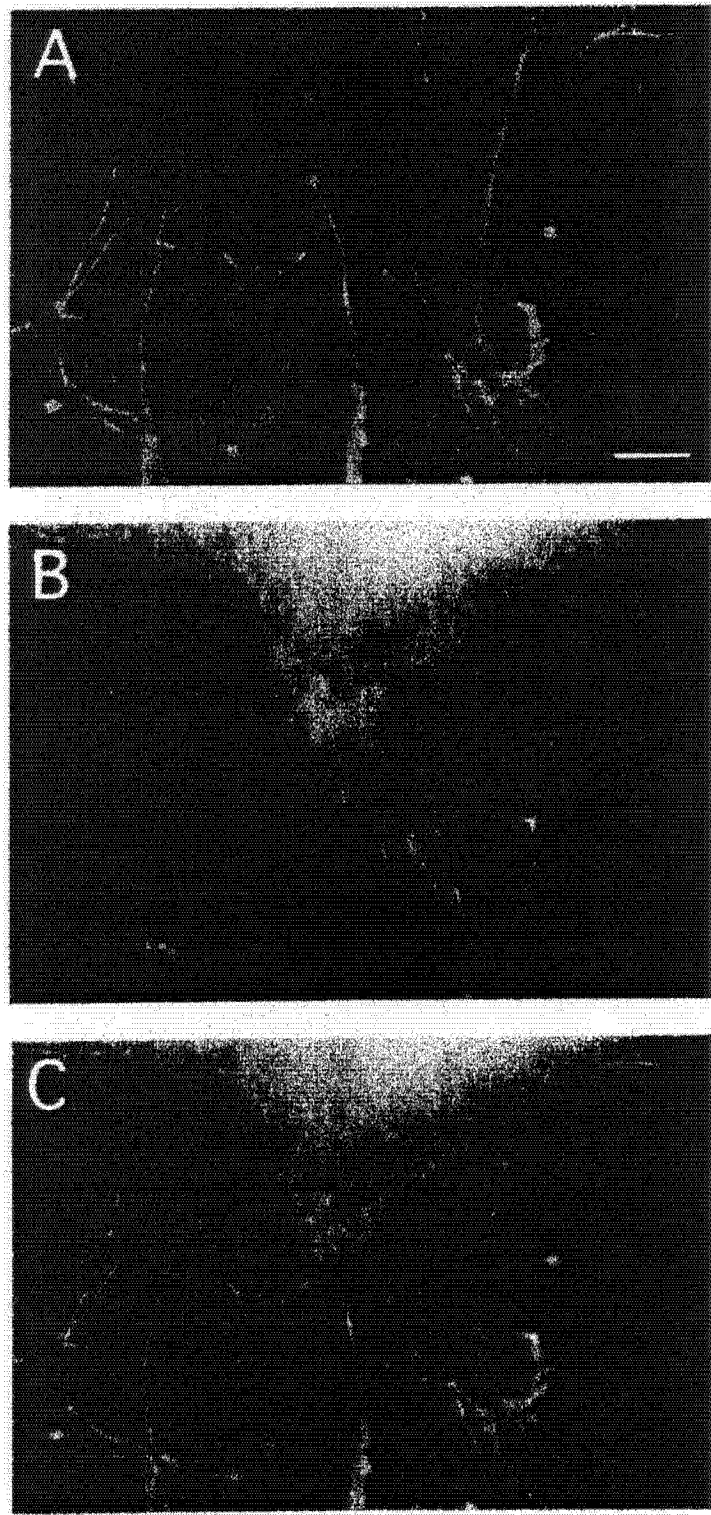


图 7

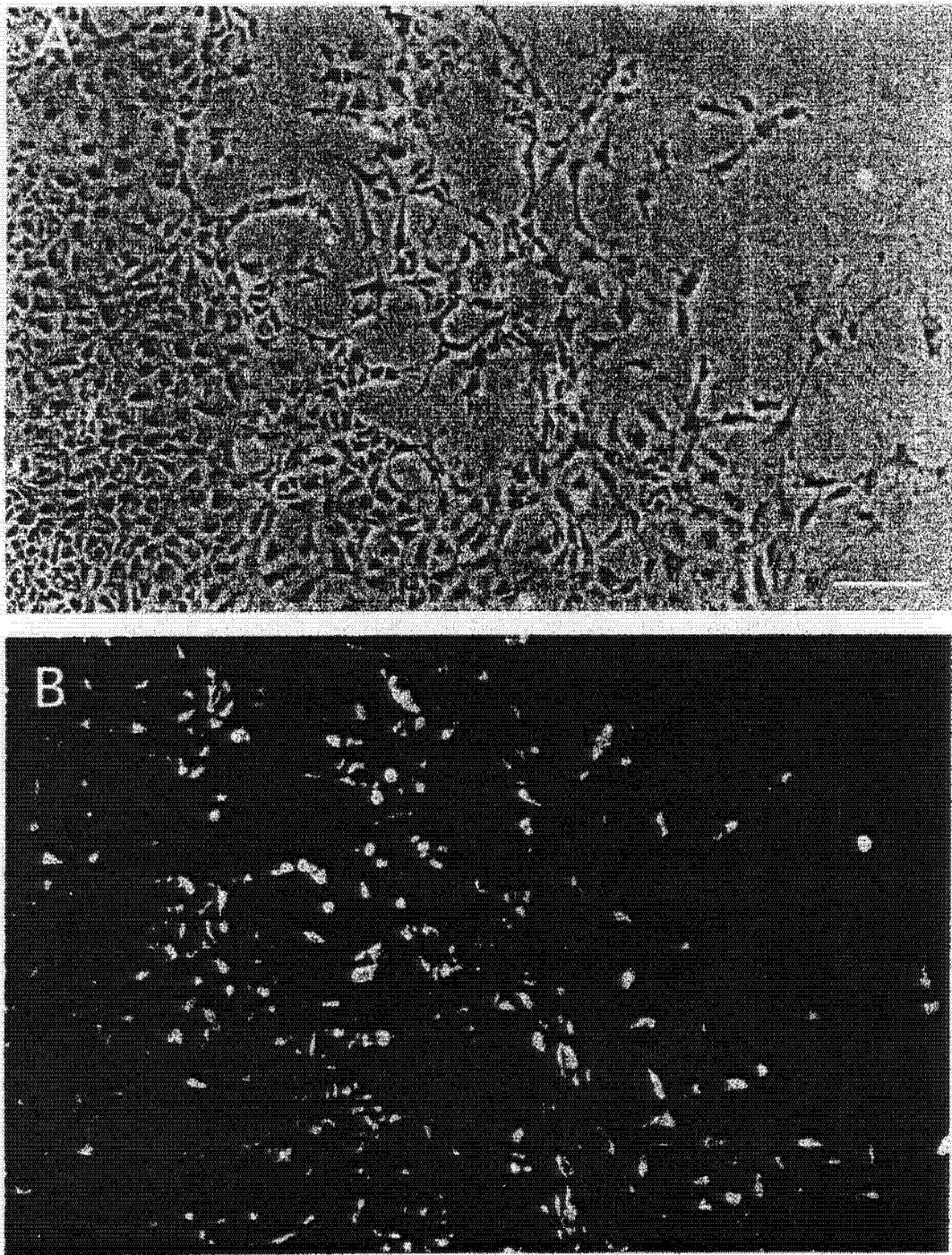


图 8

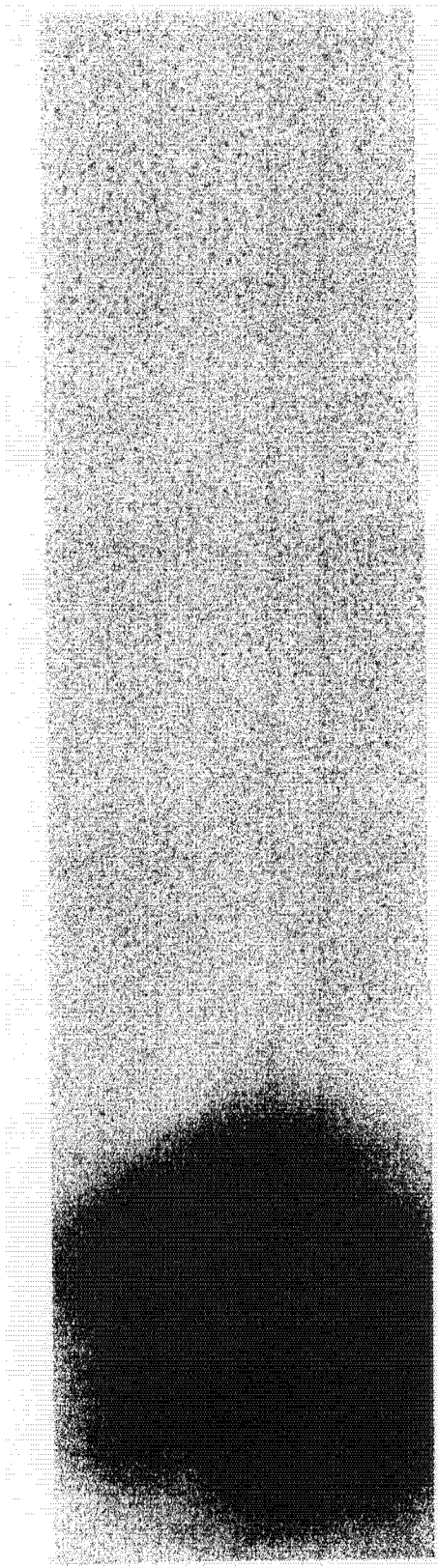


图 9

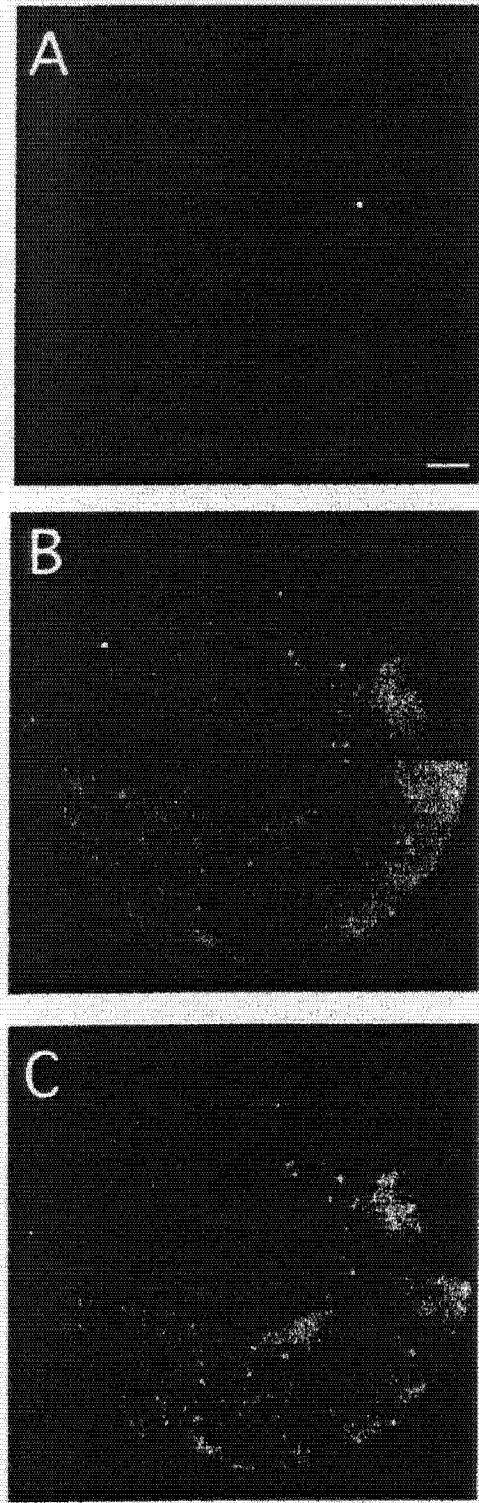


图 10

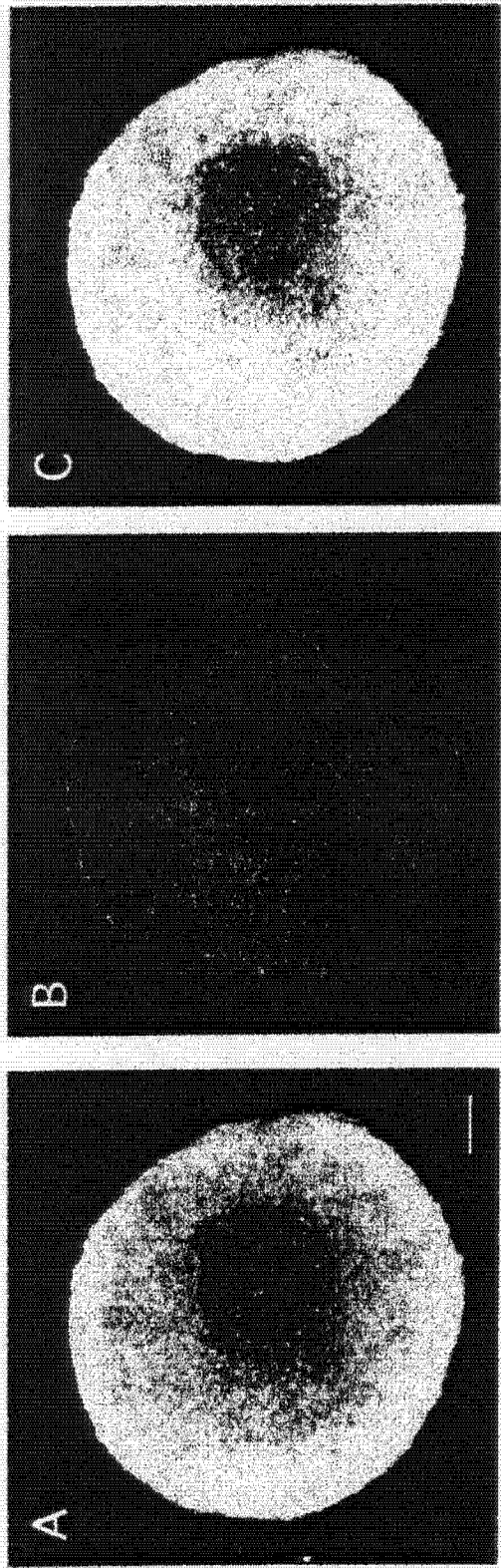


图 11

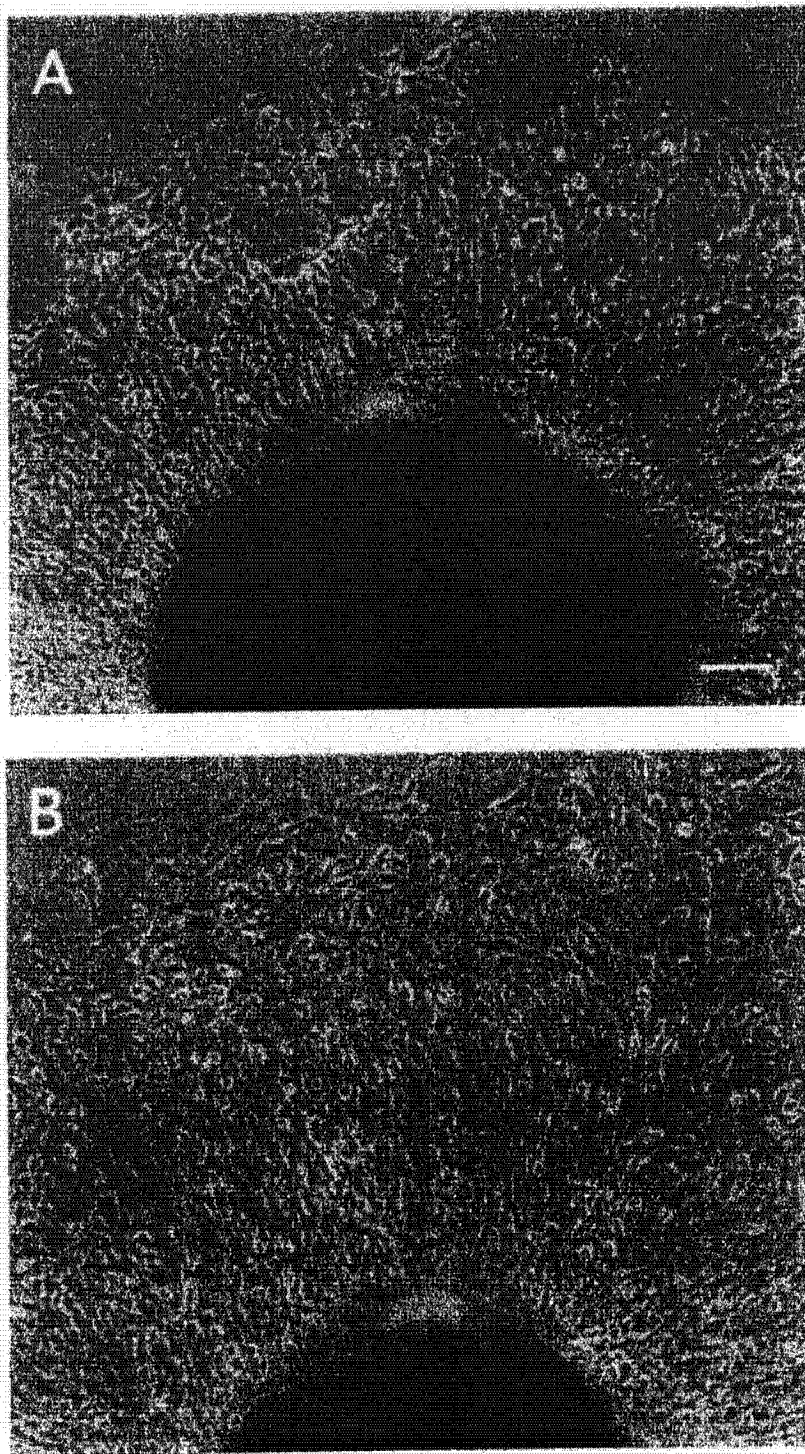


图 12

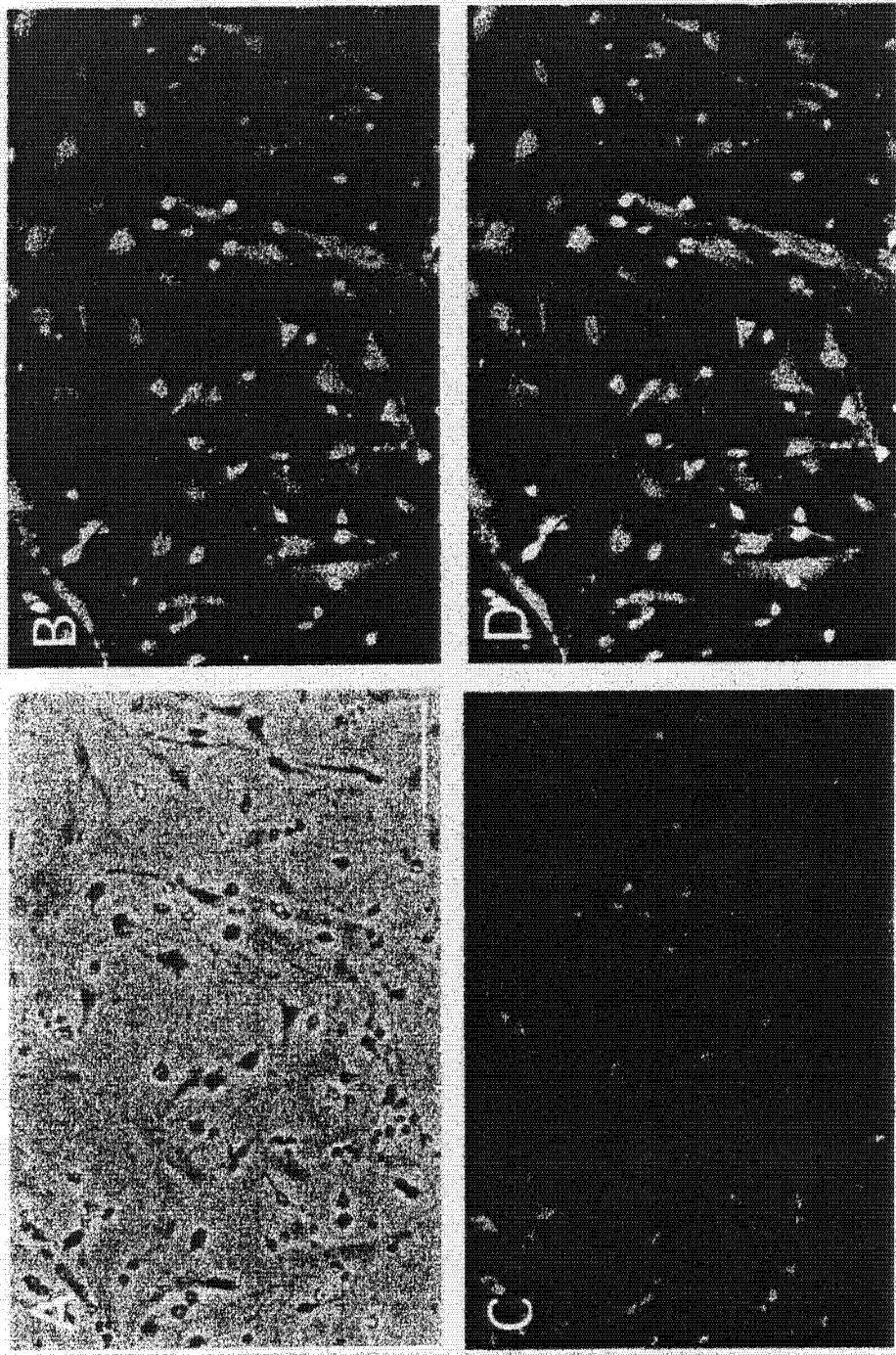


图 13

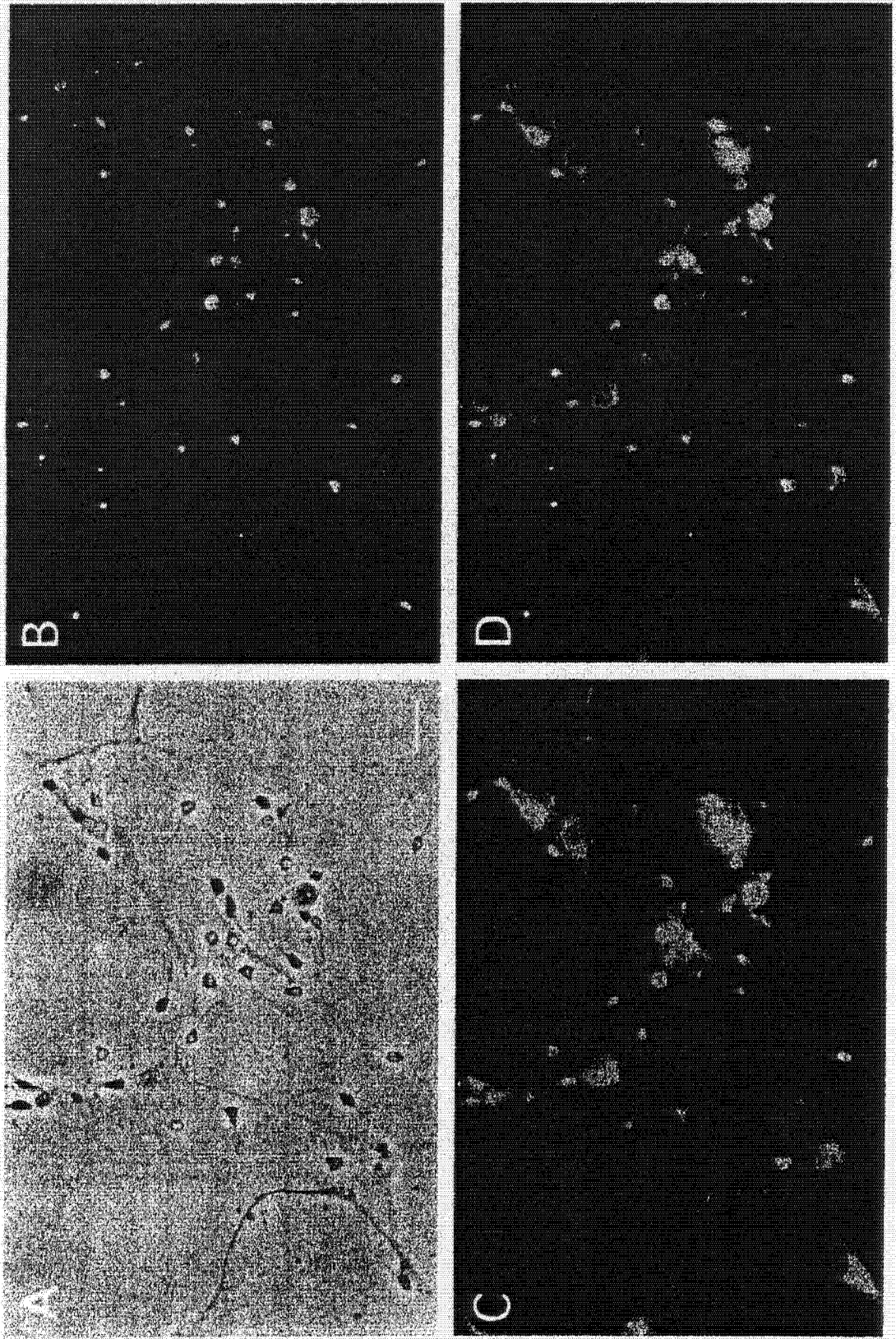


图 14

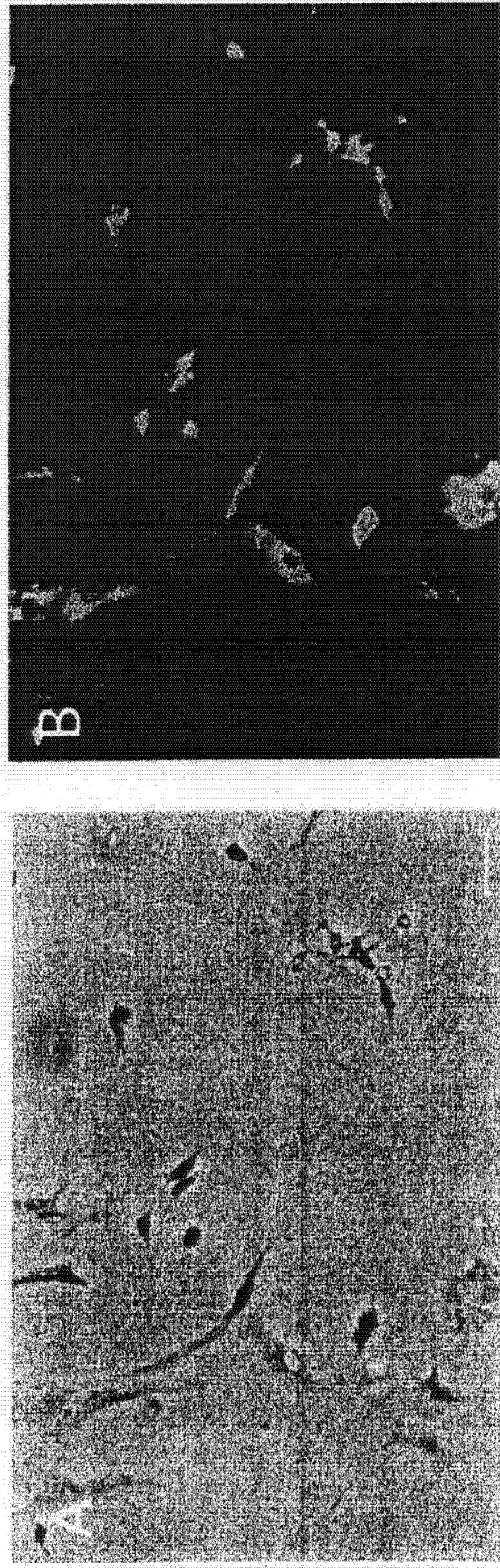


图 15

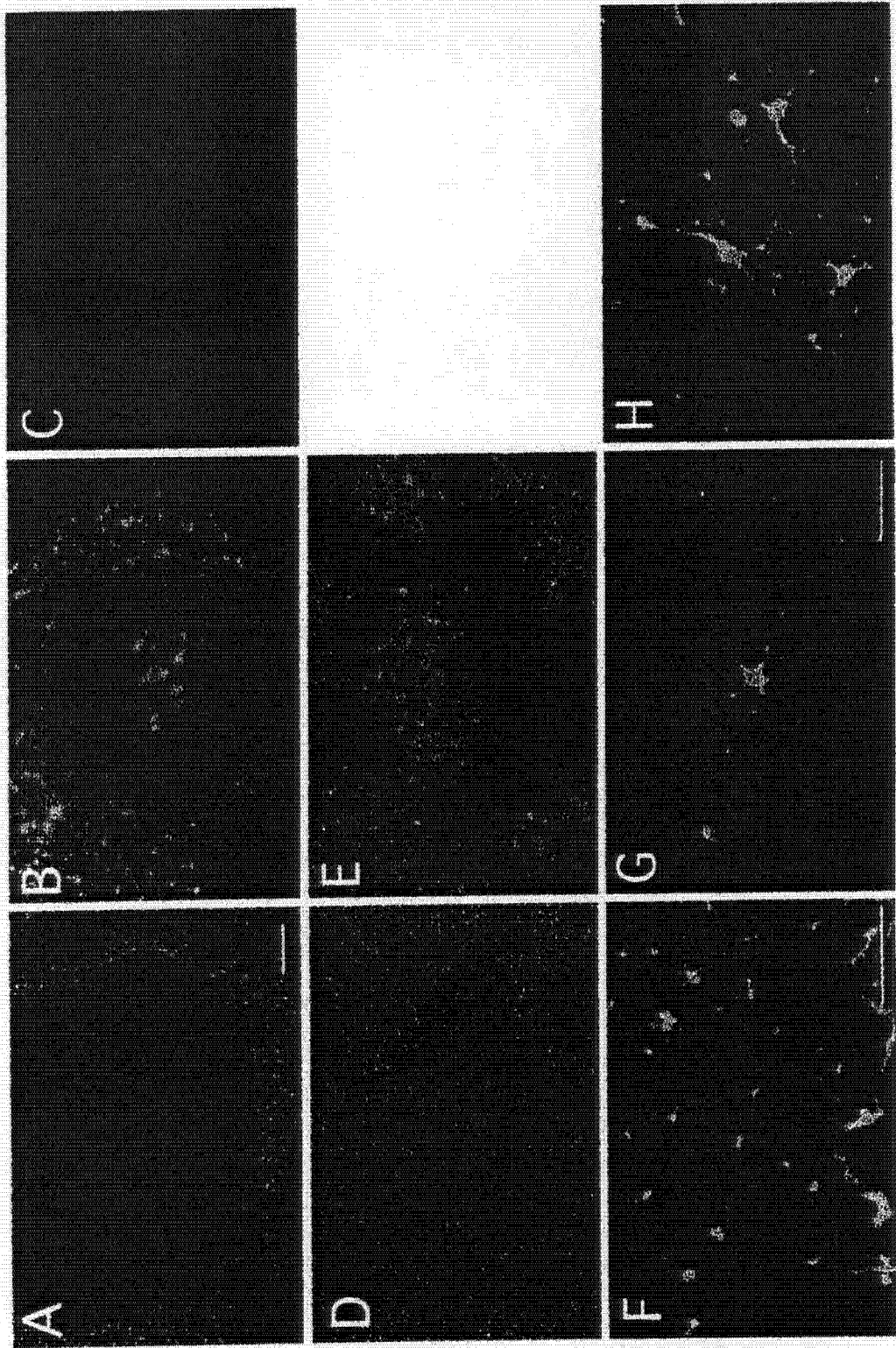


图 16

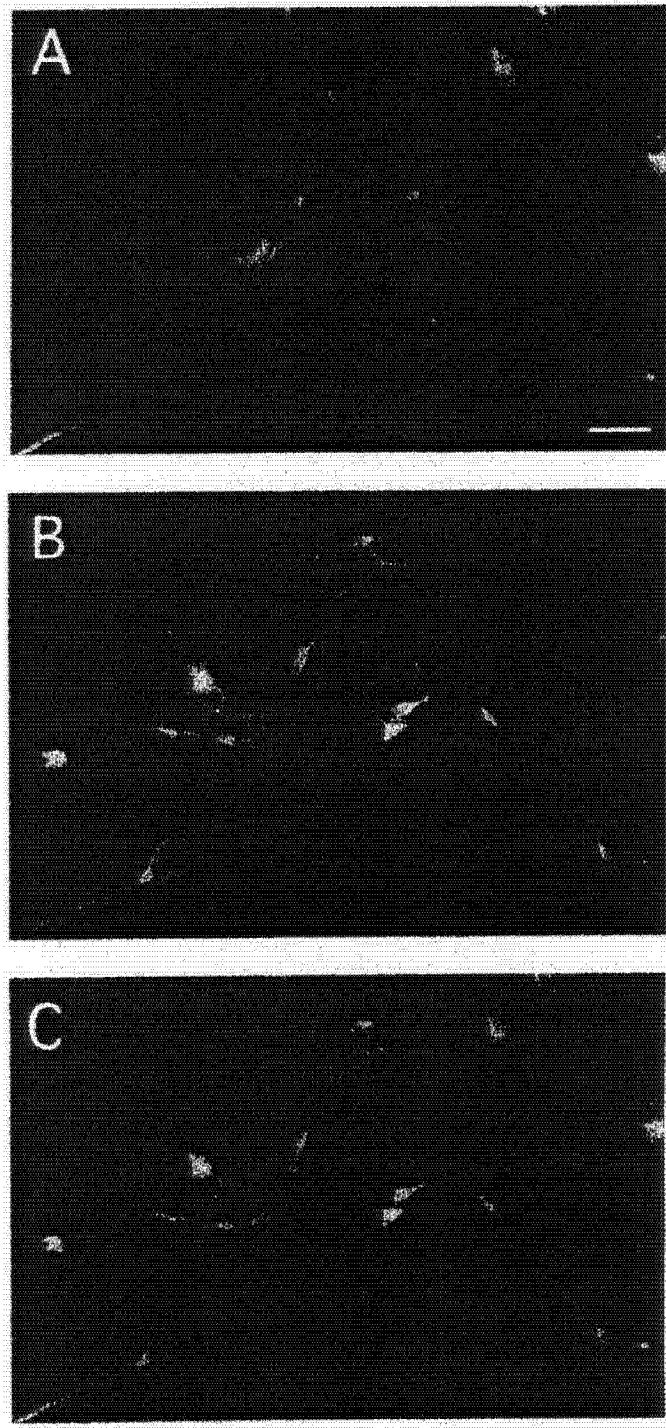


图 17

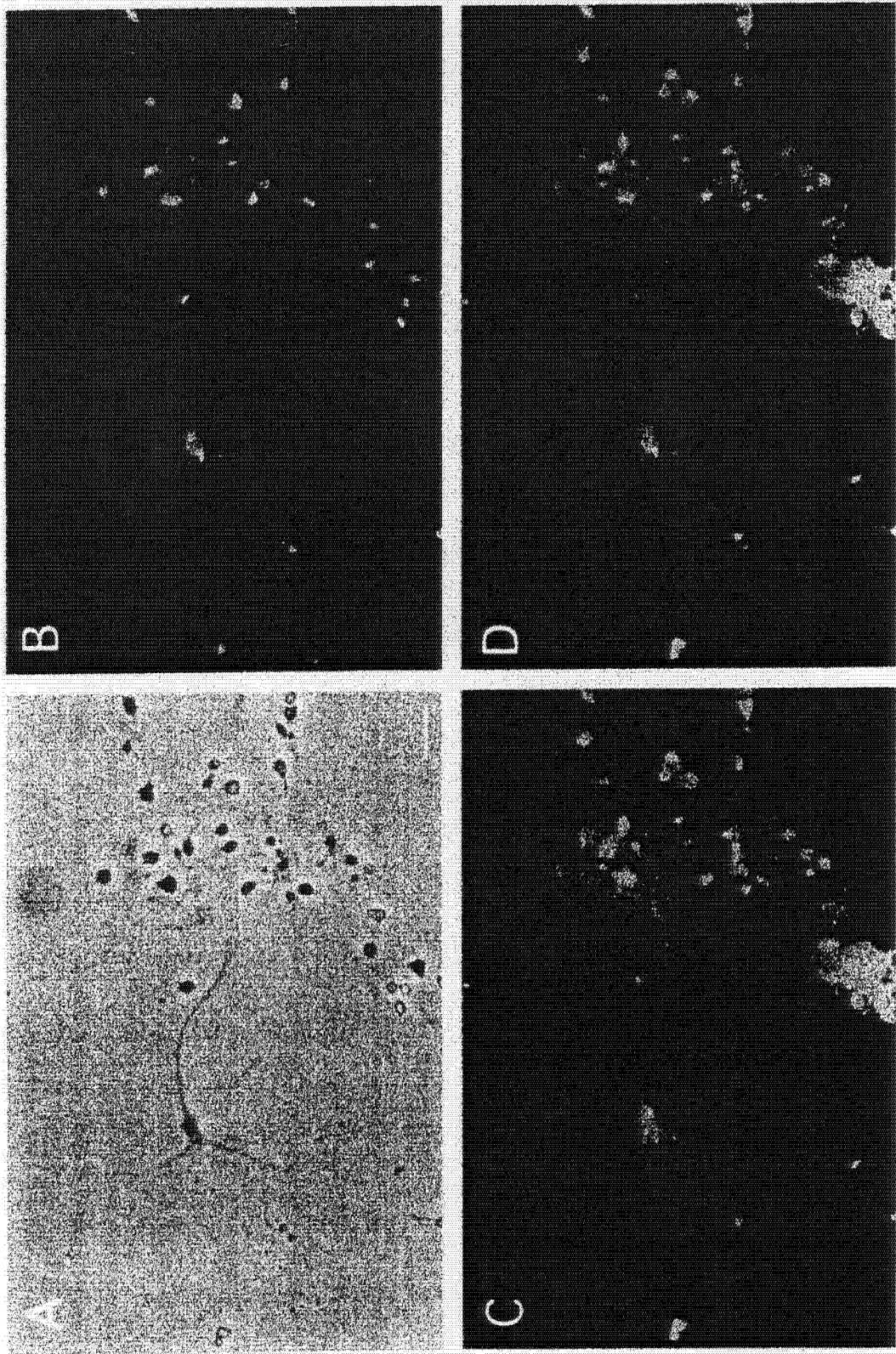


图 18

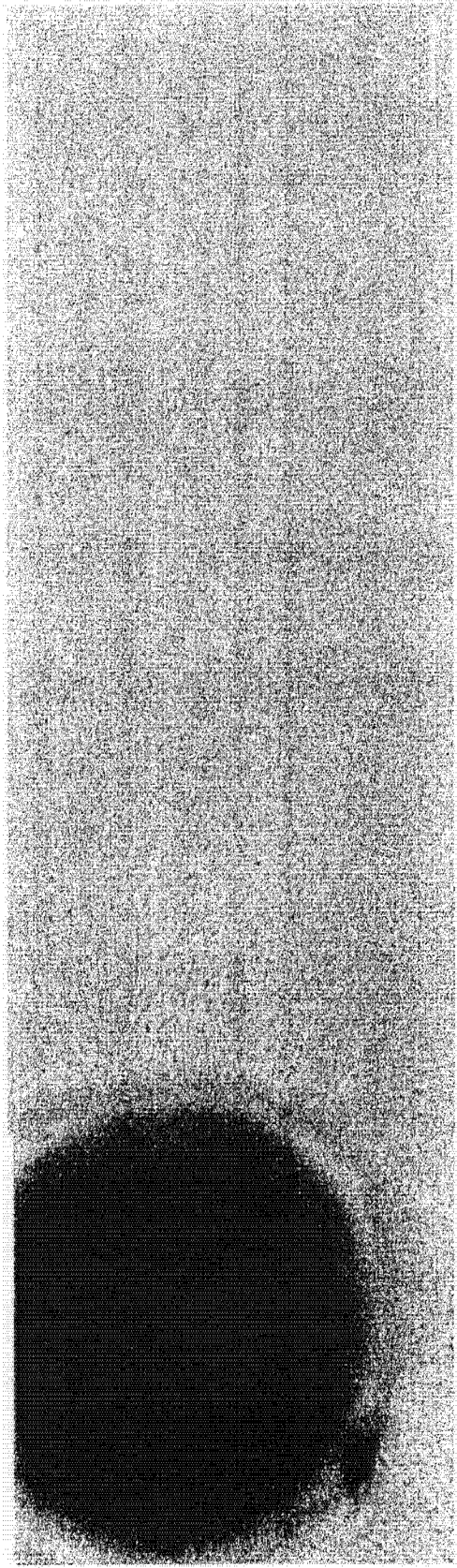


图 19

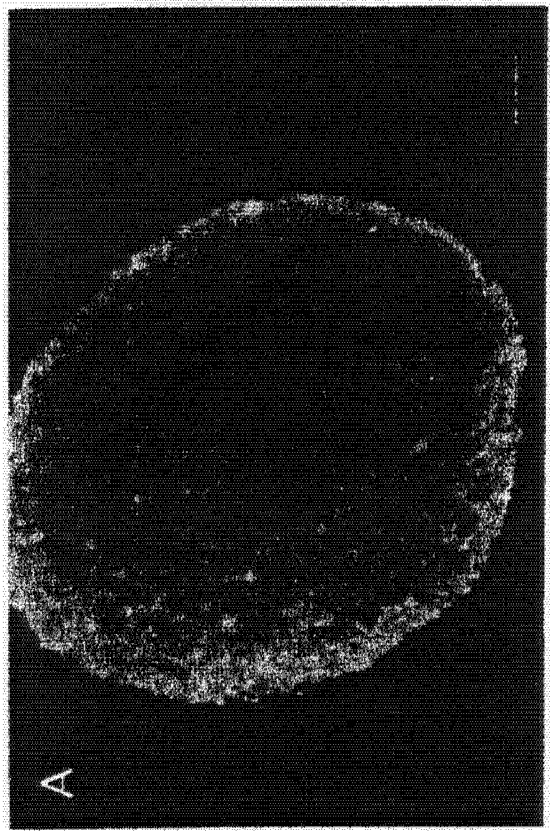


图 20

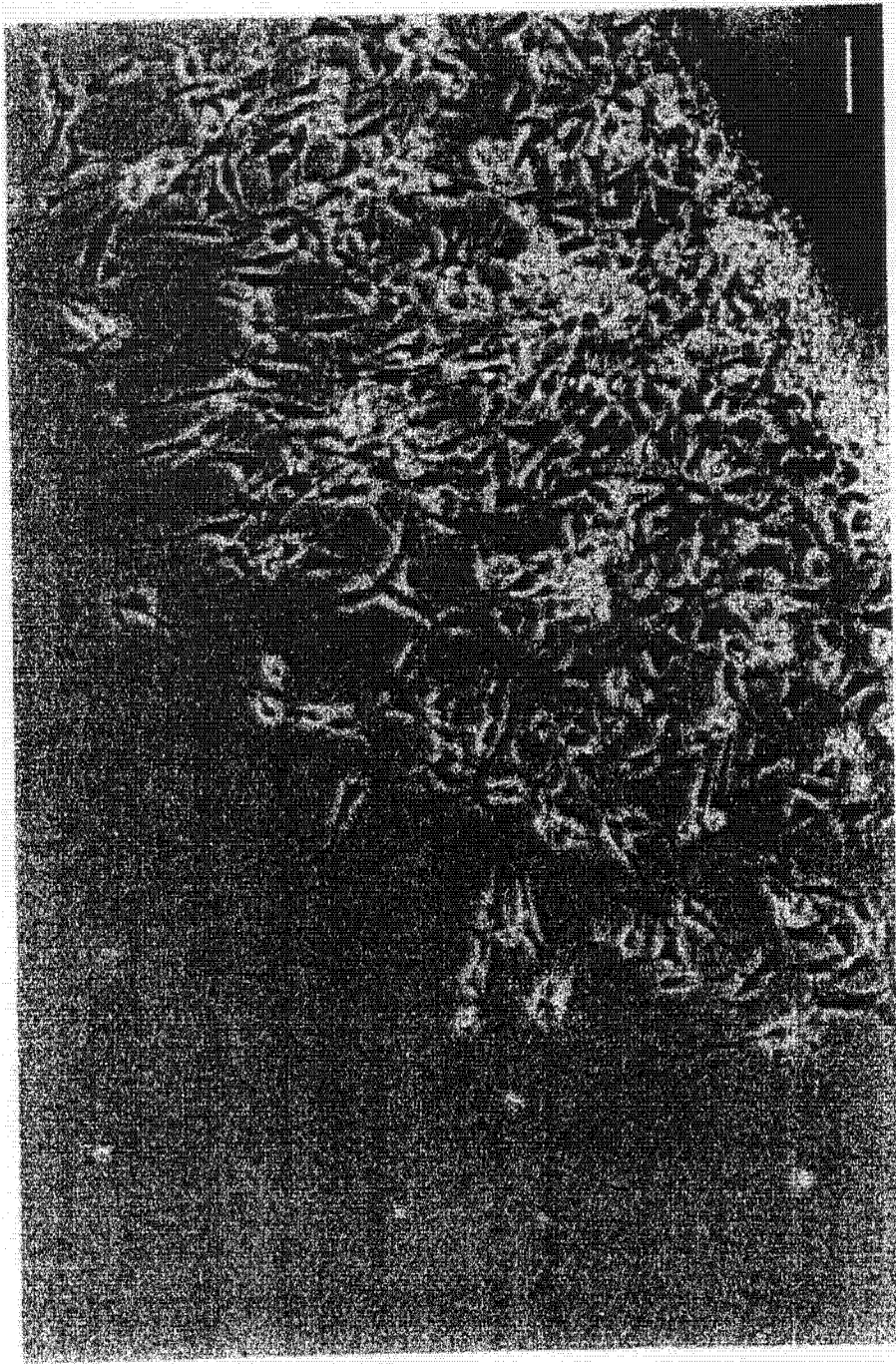


图 21

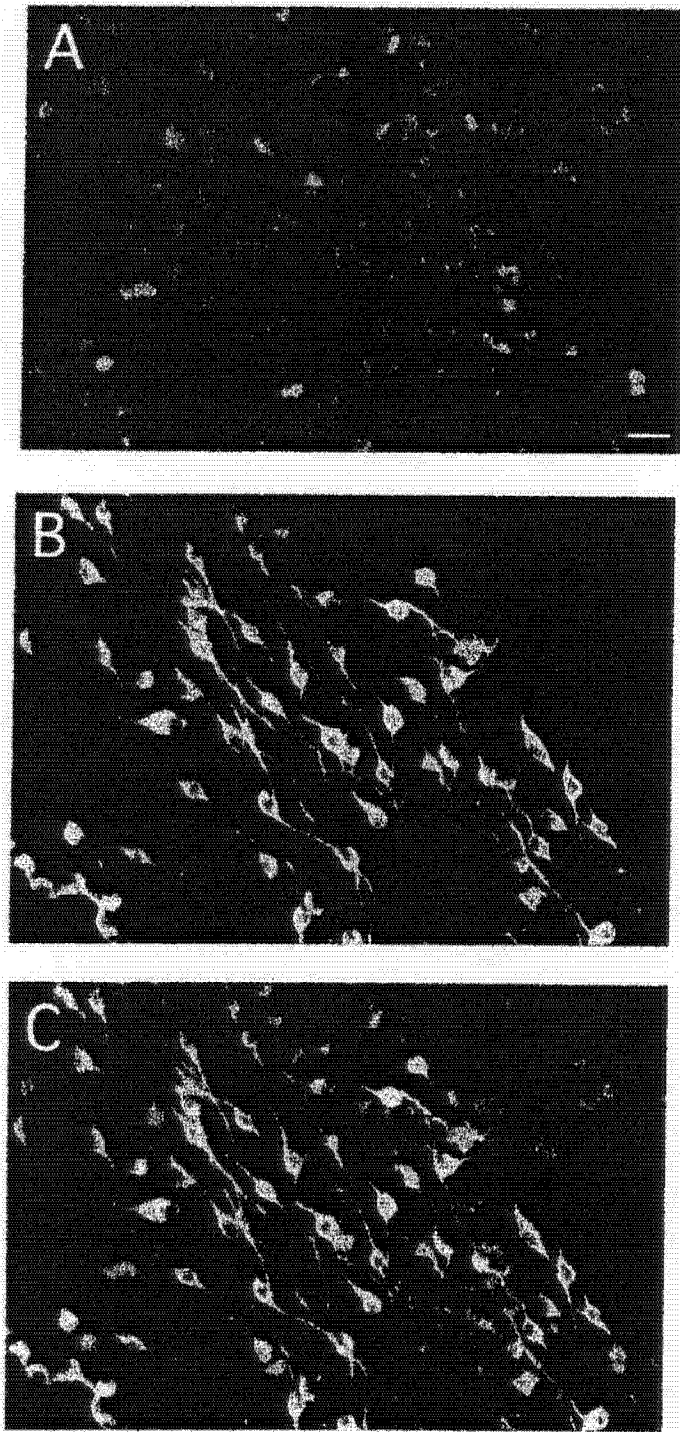


图 22

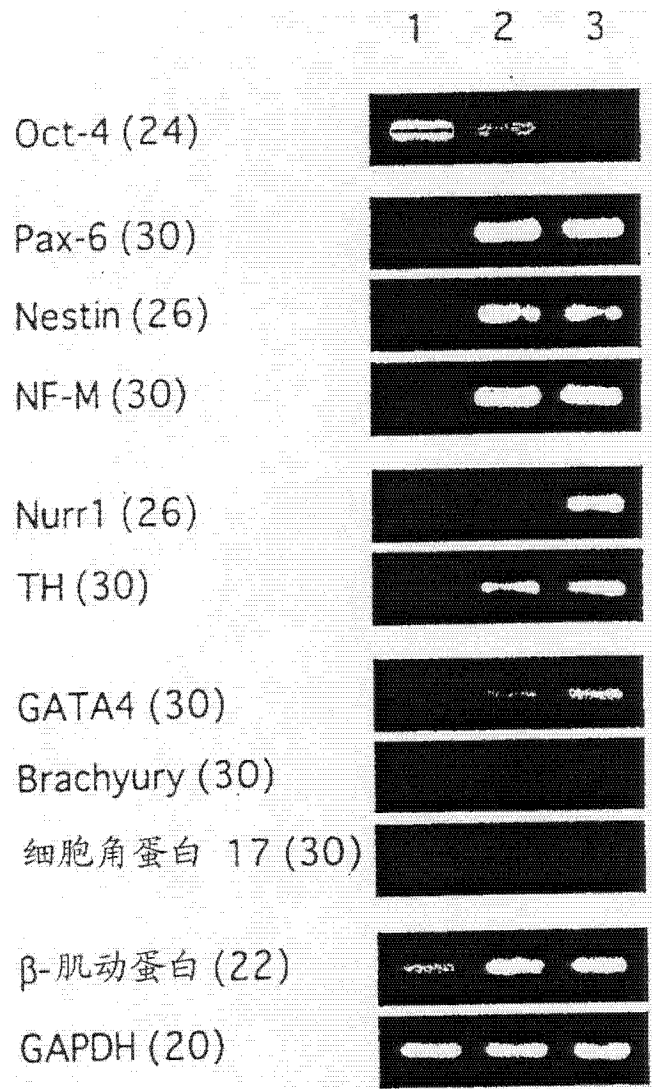


图 23

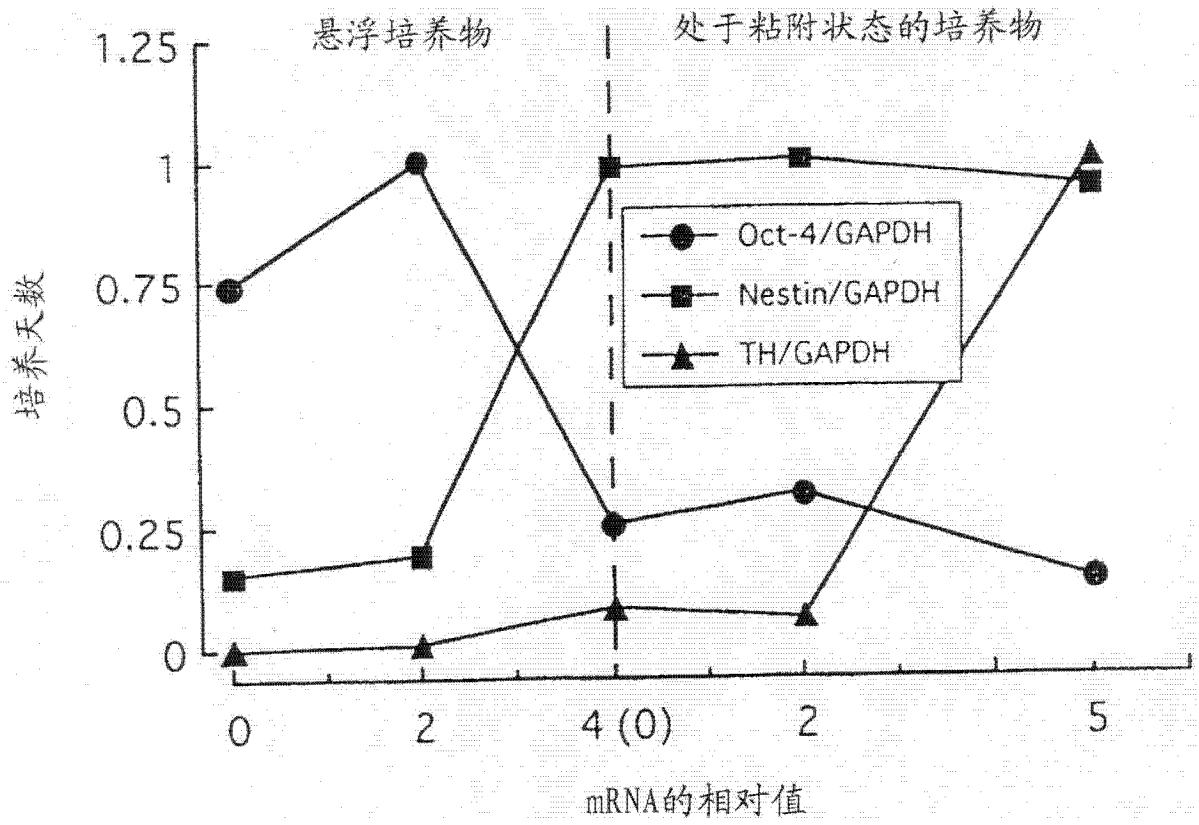


图 24