

### 請求の範囲

- [請求項1] 0.002～2000細胞／ $\text{cm}^2$ の細胞密度で播種された細胞を、増殖培養液中で、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントおよびその改変体から選ばれる培養基質の存在下において、接着培養により培養して、前記細胞を増殖させることを含む、増殖細胞の生産方法。
- [請求項2] 前記培養が、前記培養基質を含有する増殖培養液中で行われる請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記細胞が幹細胞である請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記細胞が間葉系幹細胞である請求項1～3の何れか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記細胞が臍帯由来間葉系幹細胞である請求項1～4の何れか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記細胞が凍結細胞である請求項1～5の何れか1項に記載の方法。
- [請求項7] 前記培養が、前記細胞がコンフルエントの状態に達するまで行われる請求項1～6の何れか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記培養が、500 $\text{cm}^2$ 以上の底面積を有する培養容器で行われる請求項1～7の何れか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記培養基質が、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントである請求項1～8の何れか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記培養基質が、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントの改変体である請求項1～8の何れか1項に記載の方法。
- [請求項11] 請求項1～10の何れか1項に記載の方法に従って細胞を増殖培養液中で培養して、増殖細胞を接着状態で得ることと、  
前記増殖細胞を、前記接着状態を維持したまま、生産培養液中で培養して、前記細胞に細胞生産物を生産させることと  
を含む、細胞生産物の生産方法。

- [請求項12] 請求項1～10の何れか1項に記載の方法に従って細胞を増殖培養液中で培養して、増殖細胞を接着状態で得ることと、  
前記増殖細胞を、前記接着状態を維持したまま、生産培養液中で培養して、前記細胞に細胞生産物を生産させることと、  
前記生産培養液中での前記培養の後、前記増殖細胞を、前記接着状態を維持したまま、回復培養液中で培養することと  
を含み、  
前記生産培養液中での前記培養と、前記回復培養液中での前記培養とが、細胞の前記接着状態を維持したまま交互に繰り返される、細胞生産物の生産方法。
- [請求項13] 前記生産培養液が、異種由来成分を含まない培養液である請求項11または12に記載の方法。
- [請求項14] 前記生産培養液が、サイトカインやインスリンを含まない培養液である請求項11～13の何れか1項に記載の方法。
- [請求項15] 前記生産培養液が、タンパク質を含まない培養液である請求項11～14の何れか1項に記載の方法。
- [請求項16] 前記生産培養液中での前記培養の後に、前記生産培養液の上清を回収することを更に含む請求項11～15の何れか1項に記載の方法。
- [請求項17] 幹細胞の培養上清の生産方法であって、  
幹細胞を、増殖培養液中で、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントおよびその改変体から選ばれる培養基質の存在下において、接着培養により培養して、増殖細胞を接着状態で得ることと、  
前記増殖細胞を、前記接着状態を維持したまま、生産培養液中で培養して、前記細胞に細胞生産物を生産させることと、  
前記生産培養液中での前記培養の後、前記増殖細胞を、前記接着状態を維持したまま、回復培養液中で培養することと  
を含み、  
前記生産培養液中での前記培養と、前記回復培養液中での前記培養

とが、細胞の前記接着状態を維持したまま交互に繰り返され、前記方法が、前記生産培養液中での前記培養の後に、前記生産培養液の上清を回収することを更に含む、方法。

[請求項18] 前記生産培養液の上清の回収が、前記生産培養液中での2回目以降の前記培養の後に行われる請求項17に記載の方法。

[請求項19] 前記幹細胞が間葉系幹細胞である請求項17または18に記載の方法。

[請求項20] 間葉系幹細胞を、増殖培養液中で、インテグリン結合活性を有するラミニンフラグメントおよびその改変体から選ばれる培養基質の存在下において培養して、増殖細胞を得ることを含む、低下したHLA-ABC陽性率を有する間葉系幹細胞集団の生産方法。

[請求項21] HLA-ABC陽性の間葉系幹細胞の比率が70%以下である間葉系幹細胞集団。

[請求項22] CD105陽性の間葉系幹細胞の比率が50%以下である請求項21に記載の間葉系幹細胞集団。

[請求項23] 5000 pg/mL以上のHGFを含有する、幹細胞の培養上清。

[請求項24] 50 pg/mL以上のCD9/CD63 ECドメイン 融合タンパク質を含有する、幹細胞の培養上清。

[請求項25] 3000 pg/mL以上のMCP-1、1000 pg/mL以上のGRO、および5 μg/mL以上のフィブロネクチンを更に含有する請求項23または24に記載の培養上清。

[請求項26] 200 pg/mL以上のTGF-β、5 pg/mL以上のIL-4、および8 pg/mL以上のIL-10を更に含有する請求項23～25の何れか1項に記載の培養上清。

[請求項27] インスリン、トランスフェリン、およびアルブミンの少なくとも1つを含まない請求項23～26の何れか1項に記載の培養上清。

[請求項28] 組換えタンパク質を含まない請求項23～27の何れか1項に記載の培養上清。

- [請求項29] IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の少なくとも1つが0～15 pg/mLの量で含まれる、請求項23～28の何れか1項に記載の培養上清。
- [請求項30] 20種類以上のサイトカインを含み、各サイトカインが10 pg/mL以上の濃度を有する請求項23～29の何れか1項に記載の培養上清。
- [請求項31] 前記培養上清が、間葉系幹細胞の培養上清である請求項23～30の何れか1項に記載の培養上清。
- [請求項32] 前記培養上清が、臍帯由来間葉系幹細胞の培養上清である請求項23～31の何れか1項に記載の培養上清。
- [請求項33] 請求項21または22に記載の間葉系幹細胞集団または請求項23～32の何れか1項に記載の培養上清を含む治療剤。