明　細　書

発明の名称 ：

接着性細胞を浮遊培養するための培地組成物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、接着性細胞を浮遊培養するための培地組成物の製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、医療や美容の分野を中心に、細胞を生体内に移植や注入する方法が開発されている。中でも、体性幹細胞や前駆細胞は、多能性幹細胞に比べて癌化リスクが低く、分化期間が短い等の理由から注目されている。

[0003] これらの細胞を利用する際には、良好な状態の細胞を大量に提供する必要があるが、その方法としては、幹細胞等をマイクロキャリア等に接着した状態で培養し、増殖させる方法が知られている。

[0004] しかしながら、現在、一般的に入手可能なマイクロキャリアは、静置条件では培養液中で沈降してしまうことから、培養時に撹拌する必要があり、その撹拌によりマイクロキャリア同士の衝突などにより細胞死が起こる等の課題が指摘されている。また、細胞増殖の効率についても十分ではなく、更なる改良が期待されている。

[0005] 本発明者らは、水への分散性を高めた多糖類等のナノファイバーを用いて、動植物細胞及び／又は組織を浮遊状態にて培養するための培地組成物を開発している（特許文献１）。

[0006] さらに本発明者らは、非水溶性多糖類からなるナノファイバーが、接着性細胞のｉ）浮遊培養、ｉｉ）分化誘導、ｉｉｉ）非凍結条件下での輸送や保存、ｉｖ）移植、ｖ）培養上清からの生理活性物質の回収等の種々の操作における共通のキャリアとなり得ることを見出している（特許文献２、特許文献３）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：ＷＯ２０１５／１１１６８６

特許文献2：ＷＯ２０１７／１７５７５１

特許文献3：ＷＯ２０１８／１８２０１６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、体性幹細胞や前駆細胞等の接着性細胞の大量生産につながる技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意工夫を重ねた結果、非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに、細胞外マトリクスを担持させたものをキャリア基材として使用して接着性細胞を浮遊培養することにより、該接着性細胞の増殖を極めて効率よく促進できることを見出した。また、細胞外マトリクスを担持させたナノファイバーを液体培地中に混合し、接着性細胞を該ナノファイバーに接着した状態で培養することにより、該細胞を静置した状態で浮遊培養することができることや、新鮮な培地組成物を追加するだけで、トリプシン等による細胞の剥離処理を行うことなく拡大培養できること等も見出した。本発明者らは、これらの知見に基づきさらに検討を進め、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[１] 以下の工程を含む、接着性細胞を浮遊培養するための培地組成物の製造方法：

(i)非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに細胞外マトリクスを担持させる工程、

(ii)工程(i)で得られた細胞外マトリクスを担持するナノファイバーを培地に添加する工程。

[２] 非水溶性多糖類が、キチン、キトサン、セルロース、およびヘミセルロ

ースからなる群から選択される少なくとも１つである、[１]記載の方法。

[３] 細胞外マトリクスが、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ＲＧＤ配列、およびカドヘリンからなる群から選択される少なくとも１つである、[１]または[２]記載の方法。

[４] ナノファイバーが細胞外マトリクスを担持する量が、ナノファイバー１ｇあたり細胞外マトリクスが０．０１～５０ｍｇである、[１]～[３]のいずれか記載の方法。

[５] 非水溶性多糖類がキチンである、[１]～[４]のいずれか記載の方法。

[６] 工程(ii)において、キトサンナノファイバーがさらに添加される、[５]記載の方法。

[７] 細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーの含有量比(重量)が、細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～２０である、[６]記載の方法。

[８] 細胞外マトリクスがビトロネクチンである、[１]～[７]のいずれか記載の方法。

[９] 細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーと、キトサンナノファイバーを含む、培地添加用組成物。

[１０] 細胞外マトリクスが、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ＲＧＤ配列、およびカドヘリンからなる群から選択される少なくとも１つである、[９]記載の組成物。

[１１] キチンナノファイバーが細胞外マトリクスを担持する量が、キチンナノファイバー１ｇあたり細胞外マトリクスが０．０１～５０ｍｇである、[９]または[１０]記載の組成物。

[１２] 培地組成物に含有される細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーの含有量比(重量)が、細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～２０である、[９]～[１１]のいずれか記載の組成物。

[１３] 細胞外マトリクスがビトロネクチンである、[９]～[１２]のいずれか記載の組成物。

[１４] [９]～[１３]のいずれか記載の組成物を含む、接着性細胞の浮遊培養用培地組成物。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持した非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに接着した状態で培養することにより、振とうや回転等の操作を要することなく、静置した状態で浮遊培養することができる。加えて、細胞外マトリクスの効果により、細胞の増殖を促進することができる。

[0012] また、本発明によれば、接着性細胞の維持培養を行うこともできるし、その形質を維持したまま増殖させることもできる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、ＣＢＢ染色液添加後のキチンナノファイバー水分散液の位相差顕微鏡写真を示す図である。

[図2]図２は、ＣＢＢ染色液添加後のキチンナノファイバー／キトサンナノファイバー水分散液の位相差顕微鏡写真を示す図である。

[図3]図３は、ＣＢＢ染色液添加後のビトロネクチン担持キチンナノファイバー水分散液の位相差顕微鏡写真を示す図である。

[図4]図４は、ＣＢＢ染色液添加後のビトロネクチン担持キチンナノファイバー／キトサンナノファイバー水分散液の位相差顕微鏡写真を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明について詳述する。

[0015] １．培地組成物の製造方法

本発明は、以下の工程を含む、接着性細胞を浮遊培養するための培地組成物の製造方法（以下、「本発明の製造方法」等と称することがある）を提供する：

(i)非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに細胞外マトリクスを担

持させる工程、

(ii)工程(i)で得られた細胞外マトリクスを担持するナノファイバーを培地に添加する工程。

[0016] 本発明の製造方法において接着性細胞とは、生存や増殖に容器壁等の足場を必要とする細胞である。

[0017] 本発明の製造方法において、接着性細胞としては、特に限定されるものではないが、例えば、幹細胞、前駆細胞、体性非幹細胞、初代培養細胞、細胞株、癌細胞等を挙げることができる。幹細胞とは、自分自身を複製する能力と他の複数系統の細胞に分化する能力を兼ね備えた細胞である。接着性の幹細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、例えば、間葉系幹細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛包幹細胞等の体性幹細胞等を挙げることができる。間葉系幹細胞とは、骨細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞の全て又はいくつかへの分化能を有する幹細胞である。間葉系幹細胞は骨髄、末梢血、臍帯血、脂肪組織等の組織中に低頻度で存在し、これらの組織から公知の方法で単離することが出来る。前駆細胞とは、前記幹細胞から特定の体細胞や生殖細胞に分化する途中の段階にある細胞である。接着性の前駆細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、例えば、前駆脂肪細胞、前駆心筋細胞、前駆内皮細胞、神経前駆細胞、肝前駆細胞、膵臓前駆細胞、腎臓前駆細胞等を挙げることができる。接着性の体性非幹細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、例えば、線維芽細胞、骨細胞、骨周皮細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経系細胞、グリア細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、星状膠細胞、心臓細胞、食道細胞、筋肉細胞（たとえば、平滑筋細胞または骨格筋細胞）、膵臓ベータ細胞、メラニン細胞等が含まれる。初代培養細胞とは、生体から分離した細胞や組織を播種し、第１回目の継代を行うまでの培養の状態にある細胞をいう。初代培養細胞は、例えば皮膚、腎臓、脾臓、副腎、肝臓、肺、卵巣、膵臓、

子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前立腺、精巣、胸腺、筋肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液、心臓、眼、脳または神経組織などの任意の組織から採取された細胞であり得る。細胞株とは、生体外での人為的な操作により無限の増殖能を獲得した細胞をいう。本発明の製造方法における接着性細胞は、好ましくは幹細胞又は前駆細胞であり、より好ましくは、間葉系幹細胞である。

[0018] 本発明の製造方法における接着性細胞の由来は特に限定されず、動物および植物のいずれに由来する細胞であってよい。動物としては、限定されるものではないが、例えば魚類、両生類、爬虫類、鳥類、汎甲殻類、六脚類、哺乳類等が挙げられ、好適には哺乳類である。哺乳類の例としては、限定されるものではないが、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、リス、ハムスター、ハタネズミ、カモノハシ、イルカ、クジラ、イヌ、ネコ、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ゾウ、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル、チンパンジー、ヒト等が挙げられる。植物としては、採取した細胞が液体培養可能なものであれば、特に限定はない。例えば、生薬類（例えば、サポニン、アルカロイド類、ベルベリン、スコポリン、植物ステロール等）を生産する植物（例えば、薬用人参、ニチニチソウ、ヒヨス、オウレン、ベラドンナ等）や、化粧品・食品原料となる色素や多糖体（例えば、アントシアニン、ベニバナ色素、アカネ色素、サフラン色素、フラボン類等）を生産する植物（例えば、ブルーベリー、紅花、セイヨウアカネ、サフラン等）、或いは医薬品原体を生産する植物などがあげられるが、それらに限定されない。本発明の製造方法で製造される培地は、好適には、哺乳類の接着性細胞に用いられる。

[0019] 本明細書において、ナノファイバーとは、平均繊維径（Ｄ）が、０．００１乃至１．００μｍの繊維をいう。本発明において使用するナノファイバーの平均繊維径は、好ましくは、０．００５乃至０．５０μｍ、より好ましくは０．０１乃至０．０５μｍ、更に好ましくは０．０１乃至０．０２μｍである。

[0020] 本発明の製造方法において、使用するナノファイバーのアスペクト比（Ｌ／Ｄ）は、平均繊維長／平均繊維径より得られ、特に限定されないが、通常２～５００であり、好ましくは５～３００であり、より好ましくは１０～２５０である。

[0021] 本明細書において、ナノファイバーの平均繊維径（Ｄ）は以下のようにして求める。まず応研商事（株）製コロジオン支持膜を日本電子（株）製イオンクリーナ（ＪＩＣ－４１０）で３分間親水化処理を施し、評価対象のナノファイバー分散液（超純水にて希釈）を数滴滴下し、室温乾燥する。これを（株）日立製作所製透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ、Ｈ－８０００）（１０，０００倍）にて加速電圧２００ｋＶで観察し、得られた画像を用いて、標本数：２００～２５０本のナノファイバーについて一本一本の繊維径を計測し、その数平均値を平均繊維径（Ｄ）とする。

[0022] また、平均繊維長（Ｌ）は、以下のようにして求める。評価対象ナノファイバー分散液を純水により１００ｐｐｍとなるように希釈し、超音波洗浄機を用いてナノファイバーを均一に分散させる。このナノファイバー分散液を予め濃硫酸を用いて表面を親水化処理したシリコンウェハー上へキャストし、１１０℃にて１時間乾燥させて試料とする。得られた試料の日本電子（株）製走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ、ＪＳＭ－７４００Ｆ）（２，０００倍）で観察した画像を用いて、標本数：１５０～２５０本のナノファイバーについて一本一本の繊維長を計測し、その数平均値を平均繊維長（Ｌ）とする。

[0023] 好ましい態様において、ナノファイバーは、液体培地と混合した際、一次繊維径を保ちながら当該ナノファイバーが当該液体中で均一に分散し、当該液体の粘度を実質的に高めること無く、ナノファイバーに付着した細胞を実質的に保持し、その沈降を防ぐ効果を有する。

[0024] 本発明の製造方法において用いられるナノファイバーは、非水溶性多糖類から構成されるものである。糖類とは、単糖類（例えば、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース等）が１０個以上重合した糖重合体を意味する。

[0025] 非水溶性多糖類としては、セルロース、ヘミセルロース等のセルロース類；キチン、キトサン等のキチン質等が挙げられるが、これらに限定されない。非水溶性多糖類は、好ましくは、キチン又はキトサンであり、より好ましくはキチンである。尚、本明細書において、「キチンから構成されるナノファイバー」を「キチンナノファイバー」と称することがある。また、その他の非水溶性多糖類の場合も同様である。

[0026] キチン質とは、キチンおよびキトサンからなる群より選ばれる１以上の糖質をいう。キチン及びキトサンを構成する主要な糖単位は、それぞれ、Ｎ－アセチルグルコサミン及びグルコサミンであり、一般的に、Ｎ－アセチルグルコサミンの含有量が多く酸性水溶液に対し難溶性であるものがキチン、グルコサミンの含有量が多く酸性水溶液に対し可溶性であるものがキトサンとされる。本明細書においては、便宜上、構成糖に占めるＮ－アセチルグルコサミンの割合が５０％以上のものをキチン、５０％未満のものをキトサンと呼ぶ。

[0027] キチンの原料としては、例えば、エビ、カニ、昆虫、貝、キノコなど、多くの生物資源を用いることができる。本発明に用いるキチンは、カニ殻やエビ殻由来のキチンなどのα型の結晶構造を有するキチンであってもよく、イカの甲由来のキチンなどのβ型の結晶構造を有するキチンであってもよい。カニやエビの外殻は産業廃棄物として扱われることが多く、入手容易でしかも有効利用の観点から原料として好ましいが、不純物として含まれるタンパク質や灰分等の除去のために脱タンパク工程および脱灰工程が必要となる。そこで、本発明においては、既に脱マトリクス処理が施された精製キチンを用いることが好ましい。精製キチンは、市販されている。本発明に用いられるキチンナノファイバーの原料としては、α型およびβ型のいずれの結晶構造を有するキチンであってもよいが、α型キチンが好ましい。

[0028] 上述の多糖類を粉砕することにより、多糖類ナノファイバーを得ることができる。粉砕方法は限定されないが、本発明の目的に合う繊維径・繊維長にまで微細化するには、高圧ホモジナイザー、グラインダー（石臼）、あるい

はビーズミルなどの媒体撹拌ミルといった、強いせん断力が得られる方法が好ましい。

[0029] これらの中でも高圧ホモジナイザーを用いて微細化することが好ましく、例えば特開２００５－２７０８９１号公報や特許第５２３２９７６号に開示されるような湿式粉砕法を用いて微細化（粉砕化）することが望ましい。具体的には、原料を分散させた分散液を、一対のノズルから高圧でそれぞれ噴射して衝突させることにより、原料を粉砕するものであって、例えばスターバーストシステム（（株）スギノマシン製の高圧粉砕装置）やナノヴェイタ（吉田機械興業（株）の高圧粉砕装置）を用いることにより実施できる。

[0030] 前述の高圧ホモジナイザーを用いて原料を微細化（粉砕化）する際、微細化や均質化の程度は、高圧ホモジナイザーの超高圧チャンバーへ圧送する圧力と、超高圧チャンバーに通過させる回数（処理回数）、及び水分散液中の原料の濃度に依存することとなる。圧送圧力（処理圧力）は、特に限定されないが、通常５０～２５０ＭＰａであり、好ましくは１００～２００ＭＰａである。

[0031] また、微細化処理時の水分散液中の原料の濃度は、特に限定されないが、通常０．１質量％～３０質量％、好ましくは１質量％～１０質量％である。微細化（粉砕化）の処理回数は、特に限定されず、前記水分散液中の原料の濃度にもよるが、原料の濃度が０．１～１質量％の場合には処理回数は１０～１００回程度で充分に微細化されるが、１～１０質量％では１０～１０００回程度必要となる場合がある。

[0032] 前記微細化処理時の水分散液の粘度は特に制限されないが、例えば、αキチンの場合、該水分散液の粘度の範囲は、１～１００ｍＰａ・Ｓ、好ましくは１～８５ｍＰａ・Ｓ（２５℃条件下での音叉振動式粘度測定（ＳＶ－１Ａ、Ａ＆Ｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｌｔｄ．）による）である。また、キトサンの場合、該水分散液の粘度の範囲は、０．７～３０ｍＰａ・Ｓ、好ましくは０．７～１０ｍＰａ・Ｓ（２５℃条件下での音叉振動式粘度測定（ＳＶ－１Ａ、Ａ＆Ｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｌｔｄ．）による）である。

[0033] ナノファイバーの調製方法については、ＷＯ２０１５／１１１６８６Ａ１等に記載されている。

[0034] 本発明の製造方法では、第１工程において、非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに細胞外マトリクスを担持させる。本明細書において、ナノファイバーが細胞外マトリクスを「担持する」とは、ナノファイバーと細胞外マトリクスが、化学的な共有結合を介さずに付着または吸着している状態を意味する。ナノファイバーによる細胞外マトリクスの担持は、分子間力や静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用等により達成され得るが、これらに限定されるものではない。また、ナノファイバーが細胞外マトリクスを担持している状態とは、ナノファイバーと細胞外マトリクスが、化学的な共有結合を介さずに、接した状態で留まっている状態、或いは、ナノファイバーと細胞外マトリクスが、化学的な共有結合を介さずに、複合体を形成している状態と言い換えることができる。

[0035] 本発明の製造方法の第１工程において、ナノファイバーに担持させる細胞外マトリクスは、所望の効果が得られる限り特に限定されないが、コラーゲン（コラーゲンＩ乃至ＸＩＸ）、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン（ラミニン－１乃至１２）、ＲＧＤ配列、カドヘリン等が挙げられる。細胞外マトリクスの選択は、増殖させる細胞の種類によって異なるが、当業者であれば適宜選択可能である。例えば間葉系幹細胞の場合、細胞外マトリクスとしてはビトロネクチンが好ましい。また、ビトロネクチンは、ヒト由来のビトロネクチンの場合、アミノ酸配列（以下、ａ．ａ．配列と表記）が２０－３９８（配列番号１）または６２－４７８（配列番号２）のものが好ましい。非ヒト由来のビトロネクチンを使用する場合、ヒト由来のビトロネクチンの断片に対応する領域を使用することができる。

[0036] 本発明の製造方法において、ナノファイバーが担持する細胞外マトリクスの量は、ナノファイバー１ｇ当たり、細胞外マトリクスが、通常０．００１～５０ｍｇ、好ましくは０．０１～１０ｍｇ、より好ましくは０．１～１０ｍｇ、さらに好ましくは０．３～１０ｍｇ、よりさらに好ましくは、１～１

０ｍｇ、特に好ましくは２～１０ｍｇであるが、これらに限定されない。

[0037] 本発明の製造方法において、細胞外マトリクスを担持するナノファイバーの調製は、ナノファイバーを水性溶媒に分散させた分散液と細胞外マトリクスの水溶液を混合し、必要に応じて一定時間静置することで調製することができる。ナノファイバーを分散させる水性溶媒の例としては、水、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）などが挙げられるが、これらに限定されない。水性溶媒としては、水が好ましい。水性溶媒中には、適切な緩衝剤や塩が含まれていてもよい。細胞外マトリクスを均一にナノファイバーと接触させるために、ピペッティング操作等により十分に混合することが好ましい。また、静置する時間としては、ナノファイバーの分散液と細胞外マトリクスの水溶液の混合液を、通常３０分以上、好ましくは１時間以上、より好ましくは３時間以上、さらに好ましくは６時間以上、よりさらに好ましくは９時間以上、特に好ましくは１２時間以上、静置することができる。静置時間に特に上限は無いが、例えば、上限として４８時間以下（例、３６時間以下、２４時間以下、または１６時間以下等）を設定し得る。静置時の温度としては、特に限定されないが、通常１～３０℃、好ましくは１～１５℃、より好ましくは２～１０℃、特に好ましくは２～５℃（例、４℃）とすることができる。

[0038] 非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーと細胞外マトリクスの混合比は、使用するこれらの物質の種類に応じて異なるが、固形分重量換算で例えば、１００：０．１～１、好ましくは、１００：０．４～０．６とすることができるが、これらに限定されない。

[0039] 非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーに担持された細胞外マトリクスの量については、例えば、Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡ法、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）等によって測定することができるが、これらに限定されない。

[0040] 好ましい態様において、非水溶性多糖類から構成されるナノファイバーは液体培地中で均一に分散し、該ナノファイバーに付着した接着性細胞を該液体培地中に浮遊させる。

[0041] 本発明の製造方法の第２工程における、細胞外マトリクスを担持するナノ

ファイバーを添加する培地は、使用する接着性細胞の種類等により適宜選択することが可能であり、例えば、哺乳類の接着性細胞の培養を目的とする場合、哺乳類細胞の培養に一般的に使用される培地を使用することができる。哺乳類細胞用の培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；ＤＭＥＭ）、ハムＦ１２培地（Ｈａｍ’ｓ Ｎｕｔｒｉｅｎｔ Ｍｉｘｔｕｒｅ Ｆ１２）、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地、マッコイ５Ａ培地（ＭｃＣｏｙ’ｓ ５Ａ Ｍｅｄｉｕｍ）、イーグルＭＥＭ培地（Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ；ＥＭＥＭ）、αＭＥＭ培地（ａｌｐｈａ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ；αＭＥＭ）、ＭＥＭ培地（Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ）、ＲＰＭＩ１６４０培地、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；ＩＭＤＭ）、ＭＣＤＢ１３１培地、ウィリアム培地Ｅ、ＩＰＬ４１培地、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ培地、ＳｔｅｍＰｒｏ３４（インビトロジェン社製）、Ｘ－ＶＩＶＯ １０（ケンブレックス社製）、Ｘ－ＶＩＶＯ １５（ケンブレックス社製）、ＨＰＧＭ（ケンブレックス社製）、ＳｔｅｍＳｐａｎ Ｈ３０００（ステムセルテクノロジー社製）、ＳｔｅｍＳｐａｎＳＦＥＭ（ステムセルテクノロジー社製）、Ｓｔｅｍｌｉｎｅｌｌ（シグマアルドリッチ社製）、ＱＢＳＦ－６０（クオリティバイオロジカル社製）、ＳｔｅｍＰｒｏｈＥＳＣＳＦＭ（インビトロジェン社製）、ｍＴｅＳＲ１或いは２培地（ステムセルテクノロジー社製）、Ｓｆ－９００ＩＩ（インビトロジェン社製）、Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ（インビトロジェン社製）、などが挙げられる。

[0042] 上記の培地には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、各種アミノ酸、各種ビタミン、抗生物質、血清、脂肪酸、糖などを当業者は目的に応じて自由に添加してもよい。哺乳類細胞の培養の際には、当業者は目的に応じてその他の化学成分あるいは生体成分を一種類以上組

み合わせて添加することもできる。哺乳類細胞用の培地に添加され得る成分としては、ウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、インシュリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、コレステロール、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、２－メルカプトエタノール、ウシ血清アルブミン、ピルビン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、各種ビタミン、各種アミノ酸、寒天、アガロース、コラーゲン、メチルセルロース、各種サイトカイン、各種ホルモン、各種増殖因子、各種細胞外マトリクスや各種細胞接着分子などが挙げられる。培地に添加され得るサイトカインとしては、例えばインターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－２（ＩＬ－２）、インターロイキン－３（ＩＬ－３）、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－５（ＩＬ－５）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－７（ＩＬ－７）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、インターロイキン－９（ＩＬ－９）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン－１１（ＩＬ－１１）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、インターロイキン－１３（ＩＬ－１３）、インターロイキン－１４（ＩＬ－１４）、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン－１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）、インターフェロン－α（ＩＦＮ－α）、インターフェロン－β（ＩＦＮ－β）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、単球コロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ｆｌｋ２／ｆｌｔ３リガンド（ＦＬ）、白血病細胞阻害因子（ＬＩＦ）、オンコスタチンＭ（ＯＭ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）などが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0043] 培地に添加され得るホルモンとしては、メラトニン、セロトニン、チロキシン、トリヨードチロニン、エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン、抗ミュラー管ホルモン、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン、アンギオテンシノゲン及びアンギオテンシン、抗利尿ホルモン、心房ナトリウム

利尿性ペプチド、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトロピン放出ホルモン、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトーゲン、成長ホルモン、インヒビン、インスリン、インスリン様成長因子、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポイエチン、甲状腺刺激ホルモン、チロトロピン放出ホルモン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール、カルシジオール、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳ナトリウム利尿ペプチド、神経ペプチドＹ、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニン、及びエンケファリンが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0044] 培地に添加され得る増殖因子としては、トランスフォーミング成長因子－α（ＴＧＦ－α）、トランスフォーミング成長因子－β（ＴＧＦ－β）、マクロファージ炎症蛋白質－１α（ＭＩＰ－１α）、上皮細胞増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子－１、２、３、４、５、６、７、８、又は９（ＦＧＦ－１、２、３、４、５、６、７、８、９）、神経細胞増殖因子（ＮＧＦ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、プロテアーゼネキシンＩ、プロテアーゼネキシンＩＩ、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、コリン作動性分化因子（ＣＤＦ）、ケモカイン、Ｎｏｔｃｈリガンド（Ｄｅｌｔａ１など）、Ｗｎｔ蛋白質、アンジオポエチン様蛋白質２、３、５または７（Ａｎｇｐｔ２、３、５、７）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、インスリン様成長因子結合蛋白質（ＩＧＦＢＰ）、プレイオトロフィン（Ｐｌｅｉｏｔｒｏｐｈｉｎ）などが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0045] また、遺伝子組替え技術によりこれらのサイトカインや増殖因子のアミノ酸配列を人為的に改変させたものも添加させることもできる。その例としては、ＩＬ－６／可溶性ＩＬ－６受容体複合体あるいはＨｙｐｅｒ　ＩＬ－６（ＩＬ－６と可溶性ＩＬ－６受容体との融合タンパク質）などが挙げられる。

[0046] 培地に添加され得る抗生物質の例としては、サルファ製剤、ペニシリン、フェネチシリン、メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、ペニシリン、アモキシシリン、シクラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、アズロシリン、メクズロシリン、メシリナム、アンジノシリン、セファロスポリン及びその誘導体、オキソリン酸、アミフロキサシン、テマフロキサシン、ナリジクス酸、ピロミド酸、シプロフロキサン、シノキサシン、ノルフロキサシン、パーフロキサシン、ロザキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、ピペミド酸、スルバクタム、クラブリン酸、β－ブロモペニシラン酸、β－クロロペニシラン酸、６－アセチルメチレン－ペニシラン酸、セフォキサゾール、スルタンピシリン、アディノシリン及びスルバクタムのホルムアルデヒド・フードラートエステル、タゾバクタム、アズトレオナム、スルファゼチン、イソスルファゼチン、ノカルディシン、フェニルアセトアミドホスホン酸メチル、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、メタサイクリン、並びにミノサイクリンが挙げられる。

[0047] 混合比率は、特に限定されることはないが、ナノファイバーの分散液：液体培地（培地の水溶液）（体積比）が、通常１：９９～９９：１、好ましくは１０：９０～９０：１０、より好ましくは、２０：８０～８０：２０である。

[0048] 本明細書において、細胞の浮遊とは、培養容器に対して細胞が接着しない状態（非接着）であることをいい、細胞が沈降しているか否かは問わない。さらに、本明細書において、細胞を培養する際、液体培地組成物に対する外

部からの圧力や振動或いは当該組成物中での振とう、回転操作等を伴わずに細胞が当該液体培地組成物中で分散し尚且つ浮遊状態にある状態を「浮遊静置」といい、当該状態で細胞及び／又は組織を培養することを「浮遊静置培養」という。「浮遊静置」において浮遊させることのできる期間としては、少なくとも５分以上、好ましくは、１時間以上、２４時間以上、４８時間以上、６日以上、２１日以上であるが、浮遊状態を保つ限りこれらの期間に限定されない。

[0049] 好ましい態様において、本発明の製造方法により製造される培地組成物は、細胞の培養が可能な温度範囲（例えば、０～４０℃）の少なくとも１点において、細胞の浮遊静置が可能である。該培地組成物は、好ましくは２５～３７℃の温度範囲の少なくとも１点において、最も好ましくは３７℃において、細胞の浮遊静置が可能である。

[0050] 接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持したナノファイバーに付着した状態で培養することにより、接着性細胞を浮遊培養することができる。細胞外マトリクスを担持したナノファイバーは、該ナノファイバーに付着した細胞を培地中で浮遊させる効果（好ましくは浮遊静置させる効果）及び細胞増殖促進効果を示す。細胞外マトリクスを担持したナノファイバーは、液体培地中で溶解することも、培養容器に付着することもなく分散するので、該液体培地組成物中で接着性細胞を培養すると、接着性細胞は該ナノファイバーに付着し、該培地組成物中に浮遊する。当該浮遊効果により、単層培養に比べて、一定体積あたりの細胞数を増やして培養することが可能である。また、従来の回転や振とう操作を伴う浮遊培養においては、細胞に対するせん断力が働くため、細胞の増殖率や回収率が低い、或いは細胞の機能が損なわれてしまう場合があるが、本発明の製造方法で製造した培地組成物を用いることにより振とう等の操作を要することなく細胞を分散した状態で培養し得るので、目的とする接着性細胞を細胞機能の損失無く容易かつ大量に浮遊培養することが期待できる。また、従来のゲル基材を含む培地において細胞を浮遊培養する際、細胞の観察や回収が困難であったり、回収の際にその機能を損

なったりする場合があるが、本発明の製造方法で製造した培地組成物を用いることにより、浮遊培養した細胞を、その機能を損なうこと無く観察し、回収することが期待できる。また、従来のゲル基材を含む培地は、粘度が高く培地の交換が困難である場合があるが、本発明の製造方法で製造した培地組成物は、低粘度であるためピペットやポンプ等を用いて容易に培地を交換することが期待できる。

[0051] 細胞外マトリクスを担持したナノファイバーを用いて接着性細胞を浮遊培養する場合、該ナノファイバーを含有する培地組成物に対して別途調製した接着性細胞を添加し、均一に混合すればよい。その際の混合方法は特に制限はなく、例えばピペッティング等の手動での混合、スターラー、ヴォルテックスミキサー、マイクロプレートミキサー、振とう機等の機器を用いた混合が挙げられる。混合後は、得られた細胞懸濁液を静置状態にて培養してもよいし、必要に応じて回転、振とう或いは撹拌しながら培養してもよい。その回転数と頻度は、当業者の目的に合わせて適宜設定すればよい。例えば、接着性細胞を継代培養から回収し、適切な細胞解離液を用いて単一細胞、又はこれに近い状態にまで分散し、分散された接着性細胞を、培地組成物中に懸濁し、これを浮遊培養（好ましくは、浮遊静置培養）に付す。

[0052] 細胞を培養する際の温度は、動物細胞であれば通常２５乃至３９℃、好ましくは３３乃至３９℃（例、３７℃）である。CO_2濃度は、通常、培養の雰囲気中、４乃至１０体積％であり、４乃至６体積％が好ましい。培養期間は、培養の目的に合わせて適宜設定すればよい。

[0053] 本発明の製造方法で製造された培地組成物中での接着性細胞の培養は、細胞の培養に一般的に用いられるシャーレ、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、ディッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトル等の培養容器を用いて実施することができる。ナノファイバーに付着した接着性細胞が、培養容器へ接着しない

よう、これらの培養容器は細胞低接着性であることが望ましい。細胞低接着性の培養容器としては、培養容器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの、あるいは培養容器の表面が、細胞との接着性を低減させる目的で人工的に処理されているものを使用できる。

[0054] 培地交換が必要となった際には、遠心やろ過処理を行うことにより細胞を分離した後、新鮮な培地もしくは本発明の製造方法で製造した培地組成物を該細胞に添加すればよい。或いは、遠心やろ過処理を行うことにより細胞を適宜濃縮した後、新鮮な培地もしくは本発明の培地組成物をこの濃縮液に添加すればよい。例えば、遠心する際の重力加速度（Ｇ）は１００乃至４００Ｇであり、ろ過処理をする際に用いるフィルターの細孔の大きさは１０μｍ乃至１００μｍであるが、これらに制限されることは無い。

[0055] 接着性細胞の培養は、機械的な制御下のもと閉鎖環境下で細胞播種、培地交換、細胞画像取得、培養細胞回収を自動で実行し、ｐＨ、温度、酸素濃度などを制御しながら、高密度での培養が可能なバイオリアクターや自動培養装置によって行うこともできる。

[0056] 接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持したナノファイバーに付着させた状態において浮遊培養すると、接着性細胞が効率よく増殖するため、該浮遊培養は、接着性細胞の増殖方法として優れている。接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持したナノファイバーに付着させた状態において浮遊培養すると、接着性細胞は、培養容器の底面のみに偏在せずに、三次元的な広がりをもって分散し、増殖が促進される。その結果、増殖した細胞が、ぶどうの房状にナノファイバー上に連なる状態となる。この増殖促進効果には、接着性細胞を浮遊させる（即ち、接着性細胞の培養容器への接着を回避する）のに十分な濃度のナノファイバーが培地組成物中に含まれていればよく、浮遊静置（即ち、外部からの圧力、振動、振とう、回転操作等を伴わずに細胞が液体培地組成物中で均一に分散し尚且つ浮遊状態にあること）が可能であることは必須ではない。

[0057] 接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持したナノファイバーに付着した状態で、浮遊培養し、該細胞を増殖する場合、該浮遊培養に用いる培地として、該接着性細胞の形質を維持しながら、該細胞を増殖することができる培地が用いられる。該培地は、接着性細胞の種類に応じて、当業者であれば適宜選択することができる。

[0058] 本発明の製造方法の別の一態様において、細胞外マトリクスを担持したナノファイバーに加えて、キトサンナノファイバーがさらに配合され得る。細胞外マトリクスを担持したナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いて接着性細胞を浮遊培養することにより、培養される細胞の増殖を促進し、且つ、その品質を維持することができる。例えば、哺乳動物の幹細胞（例、間葉系幹細胞）を浮遊培養した場合、その分化能やホーミング・遊走能を維持させながら増殖させることができる。従って、本態様によれば、高品質な幹細胞を大量に調製することができる。なお、幹細胞が分化能や遊走能等の特性を維持しているかは、自体公知の方法によって判別することができる。簡潔には、幹細胞における未分化性に関する細胞マーカー（例、ＯＣＴ４遺伝子、ＳＯＸ２遺伝子、ＮＡＮＯＧ遺伝子等）や、遊走性に関する細胞マーカー（例、ＣＸＣＲ４遺伝子等）の発現量を、ｍＲＮＡレベル及び／又はタンパク質量レベルで決定することにより容易に判別することができる。

[0059] 本態様において、細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）を担持したナノファイバー（例、キチンナノファイバー）およびキトサンナノファイバーを所望の比率（重量）で含有する培地を調製するために、細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～２０（好ましくは細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～１０、より好ましくは細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．７～９、さらに好ましくは細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：１～８、よりさらに好ましくは細胞外マトリクスを担持したナノファイ

バー：キトサンナノファイバー＝１：２～７、特に好ましくは細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：３～６）でブレンドする。得られた細胞外マトリクスを担持したナノファイバー／キトサンナノファイバーの混合物を、培地に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、通常０．０００１～０．２％（ｗ／ｖ）、好ましくは０．０００５～０．１％（ｗ／ｖ）、さらに好ましくは０．００１～０．０５％（ｗ／ｖ）、特に好ましくは０．００６～０．０５％（ｗ／ｖ）となるように液体培地に配合することができる。或いは、液体培地に、必要量の細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）を担持したナノファイバー（例、キチンナノファイバー）およびキトサンナノファイバーを別々に添加し、良く撹拌することによって所望の培地を調製してもよい。

一態様において、本発明の製造方法で製造される培地組成物中の細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）を担持したナノファイバー（例、キチンナノファイバー）とキトサンナノファイバーの濃度は、次の条件を満たす：

（１）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０００１～０．２％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（２）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００００５～０．１％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（３）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担

持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００１～０．０５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

または、

（４）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００６～０．０５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）。

[0060] 別の実施形態において、得られた細胞外マトリクスを担持したナノファイバー／キトサンナノファイバーの混合物を、培地に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、通常０．０００１～１．０％（ｗ／ｖ）、好ましくは０．００１～０．５％（ｗ／ｖ）、さらに好ましくは０．００５～０．３％（ｗ／ｖ）、特に好ましくは０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）となるように液体培地に配合することができる。

別の一態様において、本発明の製造方法で製造される培地組成物中の細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）を担持したナノファイバー（例、キチンナノファイバー）とキトサンナノファイバーの濃度は、次の条件を満たす：

（５）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０００１～１．０％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１

：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（６）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００１～０．５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（７）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００５～０．３％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

または、

（８）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）。

[0061] 接着性細胞を、細胞外マトリクスを担持したナノファイバー及び/又はキトサンナノファイバーに付着させた状態において浮遊培養する場合、培養容器からの細胞の剥離操作を要することなく、新鮮な培地もしくは本発明の培地組成物を当該浮遊培養物に単に添加するか、新鮮な培地もしくは本発明の培地組成物へ、当該浮遊培養物の全部又は一部を添加することのみで接着性細胞を継代することが可能である。この継代培養方法を用いることにより、接着性細胞を、培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、継代培養することができる。また、この継代培養方法を用いることにより、培養容器から

の細胞の剥離操作を行うことなく、接着性細胞の培養スケールを拡大することができる。培養容器からの細胞の剥離操作としては、キレート剤（例、ＥＤＴＡ）及び／又はタンパク質分解酵素（例、トリプシン、コラゲナーゼ）による処理が挙げられる。上記継代培養方法は、培養容器からの細胞の剥離操作に感受性が高い接着性細胞（例えば、剥離操作により生存性が低下する接着性細胞、剥離操作により形質が変わりやすい接着性細胞）の継代培養に有利である。培養容器からの細胞の剥離操作に感受性が高い接着性細胞としては、幹細胞（例、間葉系幹細胞）、前駆細胞（例、前駆脂肪細胞）、初代培養細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0062] 例えば、キチンナノファイバーに付着させた接着性細胞の懸濁液に対して、キチンの分解酵素を添加し、混合物を、接着性細胞の剥離に十分な時間、インキュベートする。キチンの分解酵素によるインキュベーション温度は、通常、２０℃～３７℃である。インキュベーション時間は、酵素の種類等にもよるが、通常、５～６０分である。

[0063] キチンナノファイバーが分解し、接着性細胞がナノファイバーから剥離したら、懸濁液を遠心分離に付すことにより、剥離した接着性細胞を回収することができる。

[0064] このようにして回収した接着性細胞は、ダメージが最小限に抑制されているので、機能解析や、移植等に好適に使用することができる。

[0065] ２．培地添加用組成物

本発明はまた、細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーと、キトサンナノファイバーを含む、培地添加用組成物（以下、「本発明の組成物」と称することがある）を提供する。

[0066] 本発明の組成物は、細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーと、キトサンナノファイバーを含むことを特徴とする。本発明の組成物における、キチンナノファイバー、キトサンナノファイバー、及び細胞外マトリクス等は、本発明の製造方法で説明したものと同様である。

[0067] 本発明の組成物の調製方法の一例としては、次のような方法が例示される

。まず、キチンナノファイバーと水性溶媒とからなる分散液に細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）の水溶液を混合し、撹拌した後に静置する（静置の際の時間や温度等の条件は「本発明の製造方法」で説明したものと同様である）。撹拌は、特に限定されないが、ピペッティング操作等により行えばよい。これにより、細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバーの分散液が調製される。次に、細胞外マトリクスを担持するキチンナノファイバーの分散液に、キトサンナノファイバーと水性溶媒とからなる分散液を配合し、これを撹拌することで、本発明の組成物を調製することができる。

[0068] 本発明の組成物に含有されるキチンナノファイバーの細胞外マトリクスを担持する量は、所望の効果が得られる限り特に限定されないが、キチンナノファイバー１ｇ当たり、細胞外マトリクスが、通常０．００１～５０ｍｇ、好ましくは０．０１～１０ｍｇ、より好ましくは０．１～１０ｍｇ、さらに好ましくは０．３～１０ｍｇ、よりさらに好ましくは、１～１０ｍｇ、特に好ましくは２～１０ｍｇであるが、これらに限定されない。

[0069] 本発明の組成物において、細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーの量比（重量）は、所望の効果が得られる限り特に限定されないが、通常、細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～２０（好ましくは細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．５～１０、より好ましくは細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：０．７～９、さらに好ましくは細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：１～８、よりさらに好ましくは細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：２～７、特に好ましくは細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバー＝１：３～６）である。

[0070] 本発明の組成物は、接着性細胞の培養培地に配合される。本発明の組成物の培地への添加量は、所望の効果が得られる限り特に限定されないが、例え

ば、当該培地に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、通常０．０００１～０．２％（ｗ／ｖ）、好ましくは０．０００５～０．１％（ｗ／ｖ）、さらに好ましくは０．００１～０．０５％（ｗ／ｖ）、特に好ましくは０．００６～０．０５％（ｗ／ｖ）となるように添加できる。

[0071] 別の一態様において、本発明の組成物の培地への添加量は、当該培地に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、通常０．０００１～１．０％（ｗ／ｖ）、好ましくは０．００１～０．５％（ｗ／ｖ）、さらに好ましくは０．００５～０．３％（ｗ／ｖ）、特に好ましくは０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）となるように添加できる。

[0072] ３．培地組成物

本発明はまた、本発明の組成物を含む、接着性細胞の浮遊培養用培地組成物（以下、「本発明の培地組成物」と称することがある）を提供する。

[0073] 本発明の培地組成物は、本発明の組成物と細胞培養用の培地とを混合することにより調製される。細胞培養用の培地は、培養する接着性細胞の種類に則して適宜決定することができる。本発明の培地組成物の調製に用いられる培地としては、「本発明の製造方法」において例示した培地が挙げられる。

[0074] 一態様において、本発明の培地組成物における細胞外マトリクス（例、ビトロネクチン）を担持するキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバーは、次の条件を満たす：

（１）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０００１～０．２％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（２）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担

持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０００５～０．１％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（３）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００１～０．０５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

または、

（４）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００６～０．０５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）。

[0075] 別の一態様において、本発明の培地組成物における細胞外マトリクス(例、ビトロネクチン）を担持するキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバーは、次の条件を満たす：

（５）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０００１～１．０％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（６）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担

持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００１～０．５％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

（７）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．００５～０．３％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）；

または、

（８）培地組成物中に含有される総ナノファイバー（細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバーおよびキトサンナノファイバー）の濃度が、０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）であり、且つ、該培地組成物中に含有される細胞外マトリクスを担持したキチンナノファイバー：キトサンナノファイバーの重量比が１：０．５～２０（好ましくは、１：０．５～１０、１：０．７～９、１：１～８、１：２～７、または１：３～６）。

[0076] 以下の実施例において本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの例によってなんら限定されるものではない。

実施例

[0077] ［調製例１］

（キチンナノファイバーを含んだ水分散液の調製）

上記特許文献１（国際公開第２０１５／１１１６８６号）の記載に準じて調製した２質量％キチンナノファイバー水分散液を、１２１℃で２０分間オートクレーブ滅菌処理を行った。その後、この水分散液を１％（ｗ／ｖ）となるように無菌蒸留水（大塚蒸留水、株式会社大塚製薬工場製）に混合し懸濁させることで、無菌のキチンナノファイバーを含んだ水分散液を作製した

。

[0078] ［調製例２］

（キトサンナノファイバーを含んだ水分散液の調製）

上記特許文献１（国際公開第２０１５／１１１６８６号）の記載に準じて調製した２質量％キトサンナノファイバー水分散液を、１２１℃で２０分間オートクレーブ滅菌処理を行った。その後、この水分散液を１％（ｗ／ｖ）となるように無菌蒸留水（大塚蒸留水、株式会社大塚製薬工場製）に混合し懸濁させることで、無菌のキトサンナノファイバーを含んだ水分散液を作製した。

[0079] ［調製例３］

（キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液の調製）

調製例１で作製したキチンナノファイバー水分散液（２ｍＬ）に、調製例２で作製したキトサンナノファイバー水分散液（８ｍＬ）を加え、ピペッティングにより混合することで、キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液（１０ｍＬ）を作製した。

[0080] ［調製例４］

（ビトロネクチン担持キチンナノファイバーを含んだ水分散液の調製）

調製例１で作製した１％（ｗ／ｖ）キチンナノファイバー水分散液に、５００μｇ／ｍＬ含有のビトロネクチン水溶液（Ｇｉｂｃｏ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＶＴＮ－Ｎ） Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｔｒｕｎｃａｔｅｄ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を加え、ピペッティングにより混合後、４℃で一晩静置保管することで、ビトロネクチン配合量の異なるビトロネクチン担持キチンナノファイバーを含んだ水分散液を作製した。作製したビトロネクチン担持キチンナノファイバーを含んだ水分散液を表１に示す。下記に記す分析例１により、ビトロネクチンがキチンナノファイバーに担持されたことを確認した。

[0081] [表1]

No.	1%(w／v)キチンナノファイバー水分散液(mL)	500μg／mLビトロネクチン水溶液(mL)
DHd509	5	0.1
DHd510	5	0.2
DHd511	5	0.5

[0082] [調製例５]

（ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液の調製）

調製例４で作製したビトロネクチン担持キチンナノファイバー水分散液（２ｍＬ）に、調製例２で作製したキトサンナノファイバー水分散液（８ｍＬ）を加え、ピペッティングにより混合することで、ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液（１０ｍＬ）を作製した。作製したビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液を表２に示す。

[0083] [表2]

No.	1%(w／v)ビトロネクチン担持キチンナノファイバー水分散液(mL)	1%(w／v)キトサンナノファイバー水分散液(mL)
DHd513	2 (DHd509)	8
DHd514	2 (DHd510)	8
DHd515	2 (DHd511)	8

[0084] [分析例１]

（組成物中のビトロネクチンの染色）

調製例１で作製したキチンナノファイバー水分散液（１００μＬ）、調製例３で作製したキチンナノファイバー／キトサンナノファイバー水分散液（１００μＬ）、調製例４で作製したＤＨｄ５１１（１００μＬ）、調製例５

で作製したＤＨｄ５１５（１００μＬ）に、それぞれタンパク質高感度染色液（ＴａＫａＲａ　ＣＢＢ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓａｆｅ　Ｓｔａｉｎ、タカラバイオ株式会社製）（４０μＬ）を加え、１０分間静置した。これらをガラスプレートに２０μＬずつ滴下し、カバーガラスをかけて位相差顕微鏡により観察を行った。キチンナノファイバー水分散液の観察像を図１に、キチンナノファイバー／キトサンナノファイバー水分散液の観察像を図２に、ＤＨｄ５１１の観察像を図３に、ＤＨｄ５１５の観察像を図４に示す。図１及び図２には染色部分が観察されないのに対し、図３及び図４ではキチンナノファイバー部分に染色が観察された。このことから、調製例４の方法で、キチンナノファイバー表面にビトロネクチンが物理吸着し、担持されたことを確認した。これは、ビトロネクチンが（化学結合ではなく）物理的にキチンナノファイバーに吸着したためと考えられる。また、図４より、調製例５の工程を経た後でも、キチンナノファイバーにビトロネクチンが担持されたままであることも示された。

[0085] [分析例２]

（キチンファイバーに担持されたビトロネクチン量の算出）

調製例４で作成したビトロネクチン担持キチンナノファイバー水分散液中には、タンパク質はビトロネクチンしか含まれていない。そのため、ビトロネクチン担持量を、総タンパク質定量用キットであるＭｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を用いて、以下の方法で算出した。

[0086] 調製例４で作製したＤＨｄ５０９、５１０、５１１（各１ｍＬ）を１．５ｍＬマイクロチューブにそれぞれ分注し、遠心分離（１２３００×ｇ、５分間）を行った。上清（５００μＬ）を０．４５μｍフィルターバイアル（Ｔｈｏｍｓｏｎ社製）にてろ過し、ろ液（３００μＬ）を新たな１．５ｍＬマイクロチューブにそれぞれ回収した。上述したキットのプロトコールを参考に、ＭＡ液（５．０ｍＬ）／ＭＢ液（４．８ｍＬ）／ＭＣ液（０．２ｍＬ）の割合で混合し調製したＷｏｒｋｉｎｇ　Ｒｅａｇｅｎｔ試薬（３００μＬ

）を回収した上清に加え、６０℃で１時間加温を行った。加温後、それぞれ３００μＬずつ９６ウェルアッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　３６０３）に分注し、プレートリーダー（ｉｎｆｉｎｉｔｅＭ２００ＰＲＯ、テカン社製）にて５６２ｎｍの吸光度を測定した。なお、ビトロネクチンの検量線は、１、５、２５、５０、１００μｇ／ｍＬ溶液を上記サンプルと同様の方法で処理し測定した５６２ｎｍの吸光度を用いて作成した。得られた測定値より定量した水分散液の上清に含まれるビトロネクチン量から、キチン表面に担持（物理的に吸着）したビトロネクチン量を以下の式により算出した。

[0087] [添加したビトロネクチン全量]－[水分散液の上清に含まれるビトロネクチン量]＝[キチン表面に担持されたビトロネクチン量]

[0088] 結果を表３に示す。表３より、配合したビトロネクチンはキチンナノファイバーに担持されていることが確認され、ビトロネクチンの添加量を増やすとキチンナノファイバーのビトロネクチン担持量も増加することがわかった。

[0089] [表3]

Lot.	キチン濃度 %(w/v)	VTN－N添加濃度 (μg/mL)	VTN－N上清濃度 (μg/mL)	VTN－N担持量 (μg/mL)	VTN－N重量/キチン重量 (mg/g)
DHd509	0.98	9.8	9.72	0.08	0.01
DHd510	0.96	19.23	14.47	4.76	0.5
DHd511	0.91	45.45	24.64	20.81	2.29

[0090] ［試験例１］

（ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いた３Ｄ培養におけるヒト臍帯由来間葉系幹細胞の連続拡大培養）

血清培地である間葉系幹細胞増殖培地（Ｃ－２８００９、タカラバイオ社製）に調製例５で作製したＤＨｄ５１３、ＤＨｄ５１４、ＤＨｄ５１５を、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるようにそれぞれ添加した培地組成物を調製した。また、対照サンプルとして、調製例３で作製した１％（ｗ／ｖ）キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液を、０

．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるように添加した培地組成物を調製した。

[0091] 引き続き、培養したヒト臍帯由来間葉系幹細胞（Ｃ－１２９７１、タカラバイオ社製）を、１６６６７細胞／ｍＬとなるように上記の各培地組成物にそれぞれ懸濁した後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７３）に１．２ｍＬ／ウェルで播種した。細胞をCO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）内にて静置状態で４日間培養した。播種時（０日目）と播種後４日目の培養液３００μＬに対してＡＴＰ試薬３００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。

[0092] 播種後４日目において、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから２ウェル分（約２．４ｍＬ）回収し、これに上記の各培地組成物７．６ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、６ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し培養した。７日目に、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を６ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約５ｍＬ回収し、これに上記の各培地組成物５ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、新しい６ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し培養した。７日目と同様の操作を１０日目にも実施し、１３日目まで培養を継続した。６ウェル平底超低接着表面マイクロプレートにて拡大培養を行った７、１０、１３日目の細胞培養液５００μＬに対してＡＴＰ試薬５００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌ

ａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。また４、７、１０、１３日目における最終的なＡＴＰ値は、各ステップにおける拡大比率を用いて換算した。

[0093] その結果、ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いてヒト臍帯由来間葉系幹細胞を培養すると、ビトロネクチンを担持していないキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物（対照サンプル）と比較して、明らかな増殖促進作用を示した。また、その増殖促進効果は、ビトロネクチン担持量に依存していた。また、新鮮なキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を追加するだけで、トリプシン等による基材からの細胞剥離処理を行うことなく、拡大培養が可能であった。各培養での換算ＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表４に示す。

[0094] [表4]

	0日目（24穴）	4日目（24穴）	7日目（6穴）	10日目（6穴）	13日目（6穴）
播種時	1472	—	—	—	—
対照サンプル	（同上）	8697	20184	36471	57413
DHd513	（同上）	9053	22400	48707	76209
DHd514	（同上）	9505	26863	55933	123086
DHd515	（同上）	12710	47003	108722	207309

[0095] ［試験例２］

（ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いた３Ｄ培養におけるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の連続拡大培養）

血清培地である間葉系幹細胞増殖培地（Ｃ－２８００９、タカラバイオ社製）に調製例５で作製したＤＨｄ５１３、ＤＨｄ５１４、ＤＨｄ５１５を、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるようにそれぞれ添加した培地組成物を調製した。また、対照サンプルとして、調製例３で作製した１％（ｗ／ｖ）キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液を、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるように添加した培地組成物を調製した。

[0096] 引き続き、培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞（Ｃ－１２９７７、タカラバイオ社製）を、８３３３細胞／ｍＬとなるように上記の各培地組成物にそれぞれ懸濁した後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７３）に１．２ｍＬ／ウェルで播種した。細胞をCO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）内にて静置状態で培養した。４日目にウェル中の培地上清を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後８日目まで継続した。播種時（０日目）と播種後８日目の培養液３００μＬに対してＡＴＰ試薬３００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。

[0097] 播種後８日目において、ＤＨｄ５１５群のみ細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約０．６ｍＬ回収し、これに上記のＤＨｄ５１５を含んだ培地組成物０．６ｍＬを新たに追加しピペッティングで混合後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し、さらに培養を播種後１１日目まで継続した。その他のサンプル群は、ウェル中の培地上清を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより

懸濁後、さらに培養を播種後１１日目まで継続した。１１日目にＤＨｄ５１５を含むすべてのサンプル群は、ウェル中の培地上清を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後１５日目まで継続した。播種後１５日目において、ＤＨｄ５１５群およびＤＨｄ５１４群において、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約０．６ｍＬ回収し、上記のＤＨｄ５１５あるいはＤＨｄ５１４を含んだ培地組成物０．６ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し、さらに培養を播種後１８日目まで継続した。その他のサンプル群は、ウェル中の培地上清を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後１８日目まで継続した。１８日目にＤＨｄ５１５を含むすべてのサンプル群は、ウェル中の培地上清を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後２２日目まで継続した。播種後２２日目において、ＤＨｄ５１５群およびＤＨｄ５１４群において、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約０．６ｍＬ回収し、上記のＤＨｄ５１５あるいはＤＨｄ５１４を含んだ培地組成物０．６ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し、さらに培養を播種後２７日目まで継続した。その他のサンプル群は、ウェル中の培地を約０．６ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後２７日目まで継続した。

[0098] ２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートにて培養を行った１５、２２、２７日目の細胞培養液３００μＬに対してＡＴＰ試薬３００μＬ（Ｃｅ

ＩＩＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。また１５、２２、２７日目における最終的なＡＴＰ値は、各ステップにおける拡大比率を用いて換算した。

[0099] その結果、ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いてヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養すると、ビトロネクチンを担持していないキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物（対照サンプル）と比較して、明らかな増殖促進作用を示した。また、その増殖促進効果は、ビトロネクチン担持量に依存していた。また新鮮なキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を追加するだけで、トリプシン等による基材からの細胞剥離処理を行うことなく、拡大培養が可能であった。各培養での換算ＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５に示す。

[0100] [表5]

	0日目（24穴）	8日目（24穴）	15日目（24穴）	22日目（24穴）	27日目（24穴）
播種時	514	—	—	—	—
対照サンプル	（同上）	1534	2724	2856	2851
DHd513	（同上）	2353	3542	3192	3950
DHd514	（同上）	2921	5406	13028	15453
DHd515	（同上）	5341	9135	27273	54436

[0101] ［試験例３］

（ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含

有する培地組成物を用いた３Ｄ培養におけるヒト脂肪由来間葉系幹細胞の連続拡大培養およびビトロネクチン添加効果との比較）

血清培地である間葉系幹細胞増殖培地（Ｃ－２８００９、タカラバイオ社製）に調製例５で作製したＤＨｄ５１３、ＤＨｄ５１４、ＤＨｄ５１５を、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるようにそれぞれ添加した培地組成物を調製した。また、対照サンプルとして、調製例３で作製した１％（ｗ／ｖ）キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液を、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるように添加した培地組成物を調製した。

[0102] 引き続き、培養したヒト脂肪由来間葉系幹細胞（Ｃ－１２９７７、タカラバイオ社製）を、８３３３細胞／ｍＬとなるように上記の各培地組成物にそれぞれ懸濁した後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７３）に１．２ｍＬ／ウェルで播種した。細胞をCO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）内にて静置状態で培養した。また対照サンプルを用いて播種して数時間後に、５００μｇ／ｍＬ含有のビトロネクチン水溶液（Ｇｉｂｃｏ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＶＴＮ－Ｎ） Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ, Ｔｒｕｎｃａｔｅｄ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を、最終濃度０．５μｇ／ｍＬあるいは１．０μｇ／ｍＬになるように添加し培養を継続した。０．５μｇ／ｍＬはＤＨｄ５１５において担持に用いたビトロネクチン量と同等の添加量であり、１．０μｇ／ｍＬはＤＨｄ５１５の２倍量のビトロネクチン添加量である。播種時（０日目）と播種後４日目の培養液３００μＬに対してＡＴＰ試薬３００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。

[0103] 播種後４日目において、対照サンプルはウェル中の培地を約０．６ｍＬ除

去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地０．６ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁後、さらに培養を播種後８日目まで継続した。一方、その他のサンプルは、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約０．６ｍＬ回収し、これに各培地組成物０．６ｍＬを新たに追加しピペッティングで混合後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７３）に全量／ウェルで播種し、さらに培養を播種後８日目まで継続した。播種後８日目以降から、３～４日の間隔で、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約０．６ｍＬ回収し、各培地組成物０．６ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７３）に全量／ウェルで播種し、さらに培養を播種後２１日目まで継続した。

[0104] ２４ウェル平底超低接着表面マイクロプレートにて培養を行った８、１５、２１日目の細胞培養液３００μＬに対してＡＴＰ試薬３００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。また８、１５、２１日目における最終的なＡＴＰ値は、各ステップにおける拡大比率を用いて換算した。

[0105] その結果、ビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を用いてヒト脂肪由来間葉系幹細胞を培養すると、ビトロネクチンを担持していないキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物（対照サンプル）と比較して、明らかな増殖促進作用を示した。また、その増殖促進効果は、ビトロネクチン担持量に依存していた。さらにＤＨｄ５１５の増殖促進効果は、対照サンプルを用い

た培養液に直接ビトロネクチンを同量あるいは２倍量添加した効果より、明らかに高かった。また新鮮なキチンナノファイバーとキトサンナノファイバーを含有する培地組成物を追加するだけで、トリプシン等による基材からの細胞剥離処理を行うことなく、拡大培養が可能であった。各培養での換算ＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表６に示す。

[0106] [表6]

	0日目（24穴）	8日目（24穴）	15日目（24穴）	21日目（24穴）
播種時	1098	—	—	—
対照サンプル	（同上）	4880	12942	25789
DHd513	（同上）	7613	22738	46358
DHd514	（同上）	13760	49285	79574
DHd515	（同上）	27202	79337	278336
対照サンプル＋0.5μg/mL VTN-N	（同上）	8088	19571	31472
対照サンプル＋1.0μg/mL VTN-N	（同上）	11231	45190	78509

[0107] ［試験例４］

（担持されるビトロネクチンのアミノ酸配列の違いによる細胞増殖効果の検討）

調製例１で作製した１％（ｗ／ｖ）キチンナノファイバー水分散液５ｍＬに、アミノ酸残基の異なる３種類の５００μｇ／ｍＬビトロネクチン水溶液（（Ａ）Ｇｉｂｃｏ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＶＴＮ－Ｎ） Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｔｒｕｎｃａｔｅｄ、ａ．ａ．配列６２－４７８、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、（Ｂ）ＰｌｕｒｉＳＴＥＭ-ＸＦ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ、ａ．ａ．配列２０－３９８、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃ

ｈ社製、（Ｃ）Ａｎｉｍａｌ－Ｆｒｅｅ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｖｉｔｒｏｎｅｃｔｉｎ、ＨＥＫ２９３ ｃｅｌｌ ｄｅｒｉｖｅｄ、ａ．ａ．配列２０－４７８（配列番号３）、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社製）のいずれかを０．５ｍＬ加え、ピペッティングにより混合後、４℃で一晩静置保管することで、３種類のビトロネクチン担持キチンナノファイバー含有水分散液を作製した。以下、上記（Ａ）、（Ｂ）、または（Ｃ）を用いて調製したビトロネクチン担持キチンナノファイバーとキトサンナノファイバーとを含んだ水分散液を、それぞれ、水分散液Ａ、水分散液Ｂ、または水分散液Ｃと表記する。

[0108] 血清培地である間葉系幹細胞増殖培地（Ｃ－２８００９、タカラバイオ社製）に水分散液Ａ、水分散液Ｂ、または水分散液Ｃを、０．０５％（ｗ／ｖ）の終濃度となるようにそれぞれ添加した培地組成物を調製した。

引き続き、培養したヒト臍帯由来間葉系幹細胞（Ｃ－１２９７１、タカラバイオ社製）を、１５０００細胞／ｍＬとなるように上記の各培地組成物にそれぞれ懸濁した後、６ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に１０ｍＬ／ウェルで播種した。細胞をCO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）内にて静置状態で培養した。３日目にウェル中の培地上清を約５ｍＬ除去し、ウェルに新鮮な間葉系幹細胞増殖培地５ｍＬをそれぞれ添加しピペットにより懸濁することで半量培地交換を行った後、さらに培養を播種後７日目まで継続した。７日目に、細胞が接着したナノファイバーをピペッティングにより再分散させ、その懸濁液を６ウェル平底超低接着表面マイクロプレートから約５ｍＬ回収し、これに上記の各培地組成物５ｍＬを新たにそれぞれ追加しピペッティングで混合後、新しい６ウェル平底超低接着表面マイクロプレート（コーニング社製、＃３４７１）に全量／ウェルで播種し培養した。７日目と同様の操作を１０日目にも実施し、１３日目まで培養を継続した。播種時（０日目）および６ウェル平底超低接着表面マイクロプレートにて培養を行った３、７、１０、１３日目の細胞培養液５００μＬに対してＡＴＰ試薬５００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇ

Ｉｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ、Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、約１０分間室温で静置した後、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社製）にて発光強度（ＲＬＵ値）を測定し、培地のみの発光値を差し引き、生細胞量（２点の平均値）を算出した。また３、７、１０、１３日目における最終的なＡＴＰ値は、各ステップにおける拡大比率を用いて換算した。各培養での換算ＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表７、および表８に示す。

[0109] その結果、（Ａ）と（Ｂ）のビトロネクチンは、同等の増殖効果を示した。一方で、（Ｃ）のビトロネクチンは、（Ａ）の場合よりも増殖効果が緩やかであった。

[0110] [表7]

	０日目（６穴）	３日目（６穴）	７日目（６穴）	１０日目（６穴）	１３日目（６穴）
A	107436（播種時）	383868	1487491	2035450	2440453
B	107436（播種時）	368956	1230836	2098070	2540106

[0111] [表8]

	０日目（６穴）	３日目（６穴）	７日目（６穴）	１０日目（６穴）	１３日目（６穴）
A	116273（播種時）	177803	527707	1257390	2424467
C	116273（播種時）	182198	415918	670810	894040

産業上の利用可能性

[0112] 培地に不溶性で、培地中で浮遊するナノファイバー状の多糖類に、細胞外マトリクスを担持させた多糖類ナノファイバーをキャリア基材として使用することにより、間葉系幹細胞や前駆脂肪細胞等の接着性細胞を静置した状態で浮遊培養することができ、浮遊培養条件下において、当該ナノファイバー

に接着した細胞は、増殖が促進し、長期間の生存性を示す。

[0113] ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0114] 本出願は、日本で出願された特願２０１９－１２５５３６（出願日：２０１９年７月４日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。