明　細　書

発明の名称 ： 培地組成物

技術分野

[0001] 本発明は、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、特に三次元或いは浮遊状態にて培養するための培地組成物、及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 近年、動物や植物体内で異なった役割を果たしている様々な器官、組織、及び細胞を生体外にて増殖或いは維持させるための技術が発展してきている。これらの器官、組織を生体外にて増殖或いは維持することは、それぞれ器官培養、組織培養と呼ばれており、器官、組織から分離された細胞を生体外にて増殖、分化或いは維持することは細胞培養と呼ばれている。細胞培養は、分離した細胞を培地中で生体外にて増殖、分化或いは維持する技術であり、生体内の各種器官、組織、細胞の機能及び構造を詳細に解析するために不可欠なものとなっている。また、当該技術により培養された細胞及び／又は組織は、化学物質、医薬品等の薬効及び毒性評価や、酵素、細胞増殖因子、抗体等の有用物質の大量生産、疾患や欠損により失われた器官、組織、細胞を補う再生医療、植物の品種改良、遺伝子組み換え作物の作成等様々な分野で利用されている。

[0003] 動物由来の細胞は、その性状から浮遊細胞と接着細胞に大きく２分される。浮遊細胞は、生育・増殖に足場を必要としない細胞であり、接着細胞は、生育・増殖に足場を必要とする細胞であるが、生体を構成する大部分の細胞は後者の接着細胞である。接着細胞の培養方法としては、単層培養、分散培養、包埋培養、マイクロキャリア培養、及びスフェア培養等が知られている。

[0004] 単層培養は、ガラス或いは種々の表面処理を行った合成高分子材料から成る培養容器や、フィーダー細胞と呼ばれる補助的な細胞を足場として目的の

細胞を単層状に培養する方法であり、最も一般的に普及している。例えば、ポリスチレンに対して種々の表面処理（プラズマ処理、コロナ処理等）を施したもの、コラーゲン、フィブロネクチン、ポリリジンなどの細胞接着因子をコーティングしたもの、或いはフィーダー細胞を予め播種したもの等、種々の形状又は性状の培養容器を用いた培養方法が開発されている。しかしながら、単層培養は、その二次元的培養環境が生体内での環境と全く異なるために細胞が生体内で有している特異的な機能を長期間維持することができない、生体内と同様な組織を再構築する事ができない、一定面積当たりの細胞数が制限されるため細胞の大量培養には向かない、等が問題となっている（特許文献１）。また、フィーダー細胞上にて目的の細胞を培養する方法は、フィーダー細胞と目的の細胞との分離が問題となる場合がある（非特許文献１）。

[0005] 分散培養は、培地中に細胞を播いた後、細胞の付着を阻害する表面処理を施した培養容器中にて、その培養液を撹拌し続けることにより細胞の培養容器への接着を阻害し、浮遊状態で接着細胞を培養する方法である。しかしながら、当該方法で培養される接着細胞は足場への接着ができないため、細胞増殖のために足場への接着を必須とする細胞には応用できない。また、せん断力で常時破砕されることにより本来の細胞機能を発揮できないため、機能を有する細胞を大量に培養することができない場合がある（非特許文献２）。

[0006] 包埋培養は、寒天、メチルセルロース、コラーゲンゲル、ゼラチン、フィブリン、アガロース、アルギン酸塩等の固形或いは半固体のゲル基材の中に細胞を埋め込み、固定させて培養する方法である。当該方法は、細胞を生体内に近い形で三次元的に培養することを可能とし、ゲル基材そのものが細胞の増殖や分化を促進する場合もあるため単層培養や分散培養と比較して、細胞の機能を維持したまま細胞を高密度に培養することが可能である（特許文献２、３）。更に、これらのゲル基材に細胞を埋め込んだ状態で大きさ１００～３００μｍのマイクロカプセルを作成し、当該マイクロカプセルを分散

させながら水溶液培地で細胞を培養する方法も開発されている（非特許文献３）。しかしながら、これらの方法は、ゲル基材が可視光を透過しない場合は培養細胞の継時的な観察ができない、ゲル基材を含む培地やマイクロカプセルは粘度が高いため当該培地中から細胞を回収するために酵素処理（例えば、コラーゲンゲルの場合はコラゲナーゼ処理）等の煩雑かつ細胞に障害を与える操作を必要とする、長期間培養する際に必要な培地交換が困難である等の問題を有している。近年、熱やせん断力などの処理によりゲル基材から細胞回収が可能となる技術が開発されているが、熱やせん断力等は細胞機能に悪影響を与えることがある上に、当該ゲル基材の生体に対する安全性については未だ明らかにはなっていない（特許文献４、５、非特許文献４、５、６、７）。また、小さくカットした果実や野菜等の粒状食品を均一に分散、浮遊させ、その沈殿や浮上を防ぐためのゾル状食品が食品分野にて開発されているが、当該ゾル状食品は分散させた粒状食品を回収することは考慮しておらず、細胞や組織を浮遊状態で培養できるかどうかの検討もなされていない（特許文献６）。水溶液中のジェランがカルシウムイオンの作用によりゲル化し、微細構造を形成することが知られている（非特許文献８）。

[0007] マイクロキャリア培養は、水よりも僅かに重い微粒子（以下、マイクロキャリアともいう）の表面上に細胞を単層に増殖させ、当該微粒子をフラスコ等の培養容器内で撹拌し、浮遊状態での培養を行うものである。通常、当該方法で用いるマイクロキャリアは、直径１００～３００μｍ、表面積３０００～６０００ｃｍ^2／ｇ、比重１．０３～１．０５の球状粒子であり、デキストラン、ゼラチン、アルギン酸あるいはポリスチレン等の素材により構成されている。マイクロキャリアの表面には細胞が付着しやすいように、コラーゲン、ゼラチンまたはジメチルアミノエチル等の荷電基を付与することもできる。当該方法は、培養面積を極めて増大させることが可能になるため、細胞の大量培養に応用されている（特許文献７、８）。しかしながら、全てのマイクロキャリアで目的とする細胞をほぼ均一に付着させることは困難であり、また、撹拌中のせん断力により細胞がマイクロキャリアから脱離する、

細胞が障害を受ける等が問題となっている（非特許文献９）。

[0008] スフェア培養は、目的の細胞が、数十～数百個から成る凝集塊（以下、スフェアともいう）を形成させた後、当該凝集塊を培地中で静置或いは振とうして培養する方法である。スフェアは、細胞密度が高く、生体内環境に近い細胞－細胞間相互作用及び細胞構造体が再構築されており、単層培養、分散培養法よりも細胞機能を長期的に維持したまま培養できることが知られている（非特許文献１０、１１）。しかしながら、スフェア培養は、スフェアのサイズが大きすぎる場合、スフェア内部の栄養分の供給と老廃物の排出が困難となるため、大きなスフェアを形成させることができない。また、形成したスフェアは培養容器の底面において分散状態で培養する必要があるため、一定体積あたりのスフェア数を増やすことが困難であり、大量培養には向かない。さらに、スフェアの作成方法としては、懸滴培養、細胞非接着表面での培養、マイクロウェル内での培養、回転培養、細胞の足場を利用した培養、遠心力や超音波、電場・磁場による凝集などが知られているが、これらの方法は操作が煩雑、スフェアの回収が困難、サイズの制御と大量生産が困難、細胞に対する影響が不明、特殊な専用容器や装置が必要である等が問題となっている（特許文献９）。

[0009] 一方、植物に関しても細胞、細胞壁を除去したプロトプラストあるいは植物の葉、茎、根、成長点、種子、胚、花粉などの器官、組織、カルスを無菌の状態で培養して増やすことができる。このような植物の組織や細胞の培養技術を用いて、植物の品種改良や有用物質生産も可能となっている。植物の細胞や組織を短期間で大量に増殖させるための手法として、植物細胞や組織を液体培地で懸濁培養する方法が知られている（非特許文献１２）。それらの良好な増殖を達成するためには、十分な酸素の供給と均一な混合状態の維持、さらに細胞の破損を防ぐ等が重要である。培養液への酸素の供給と細胞や組織の懸濁は、通気と機械的攪拌とを組み合わせて行なわれる場合と、通気のみにより行なわれる場合とがあるが、前者は、攪拌による細胞や組織の破損が原因で増殖不良を招く場合があり、一方、後者は細胞や組織のせん断

は少ないが、高密度培養では均一な混合状態を維持することが困難となる場合があるため、細胞や組織が沈降して増殖効率が低下する等の問題がある。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開２００１－１２８６６０号公報

特許文献2：特開昭６２－１７１６８０号公報

特許文献3：特開昭６３－２０９５８１号公報

特許文献4：特開２００９－２９９６７号公報

特許文献5：特開２００５－６０５７０号公報

特許文献6：特開平８－２３８９３号公報

特許文献7：特開２００４－２３６５５３号公報

特許文献8：国際公開第２０１０／０５９７７５号

特許文献9：特開２０１２－６５５５５号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ｋｌｉｍａｎｓｋａｙａら，Ｌａｎｃｅｔ ２００５，３６５：１６３６－１６４１

非特許文献2：Ｋｉｎｇら，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ． ２００７，１１：３９４－３９８．

非特許文献3：Ｍｕｒｕａら，Ｊ．ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ２００８，１３２：７６－８３．

非特許文献4：Ｍｅｎｄｅｓ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２００８，３７：２５１２－２５２９

非特許文献5：Ｍｏｏｎら，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ２０１２，４１：４８６０－４８８３

非特許文献6：Ｐｅｋら，Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ． ２００８，３：６７１－６７５

非特許文献7：Ｌｉｕら，Ｓｏｆｔ Ｍａｔｔｅｒ ２０１１，７：５４３０－５４３６

非特許文献8：Ｐｅｒｅｚ－Ｃａｍｐｏｓら，Ｆｏｏｄ Ｈｙｄｒｏｃｏｌｌｏｉｄｓ ２０１２，２８：２９１－３００

非特許文献9：Ｌｅｕｎｇら，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２０１１，１７：１６５－１７２

非特許文献10：Ｓｔａｈｌら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ． ２００４，３２２：６８４－６９２

非特許文献11：Ｌｉｎら，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ． ２００８，３：１１７２－１１８４

非特許文献12：Ｗｅａｔｈｅｒｓら，Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１０，８５：１３３９－１３５１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、上記の従来技術の問題を解決し、動植物細胞及び／又は組織を、特に三次元或いは浮遊状態にて培養するための培地組成物と当該培地組成物を用いた動植物細胞及び／又は組織の培養方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは鋭意検討の結果、セルロースやキチン等の多糖類からなるナノファイバーを液体培地中に混合することにより、該液体培地の粘度を実質的に高めることなく、動植物細胞及び／又は組織を静置した状態で浮遊培養し得ること、この培地組成物を用いて培養することにより細胞の増殖活性が亢進することを見出した。また、セルロース等の非水溶性の多糖類のみならず、脱アシル化ジェランガム等の水溶性の多糖類も、液体培地中で、ファイバー状の構造体を形成し、これが液体培地の粘度を実質的に高めることなく、動植物細胞及び／又は組織を静置した状態で浮遊培養することを可能にすることを見出した。更に、これらの培地組成物から、培養した細胞及び／又は組織を容易に回収することができることも見出した。以上の知見に基づき、更に検討を加えることにより、本発明を完成させるに至った。

[0014] すなわち、本発明は下記のとおりである：

[0015] ［１］細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物であって、ナノファイバーを含有することを特徴とする、培地組成物。

［２］培養時の培地組成物の交換処理及び培養終了後において細胞または組織の回収が可能である［１］の培地組成物。

［３］細胞または組織の回収の際に、温度変化、化学処理、酵素処理、せん断力のいずれも必要としない［１］の培地組成物。

［４］粘度が、８ｍＰａ・ｓ以下であることを特徴とする［１］の培地組成物。

［５］前記ナノファイバーの平均繊維径が０．００１～１．００μｍ、平均繊維径（Ｄ）に対する平均繊維長（Ｌ）の比（Ｌ／Ｄ）が２～５００であることを特徴とする［１］の培地組成物。

［６］前記ナノファイバーが高分子化合物から構成されることを特徴とする［１］の培地組成物。

［７］前記高分子化合物が、多糖類であることを特徴とする［６］の培地組成物。

［８］前記多糖類が、

セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類；又は

ヒアルロン酸、ジェランガム、脱アシル化ジェランガム、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、ザンタンガム、ヘキスロン酸、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ラムナン硫酸、アルギン酸及びそれらの塩からなる群から選択される水溶性多糖類

を含む、［７］の培地組成物。

［９］前記多糖類が、セルロース又はキチンを含む、［８］の培地組成物。

［１０］前記ナノファイバーが、粉砕により得られたものであることを特徴

とする［９］に記載の培地組成物。

［１１］細胞培養用である、［１］乃至［１０］のいずれかに記載の培地組成物。

［１２］前記細胞が、接着細胞または浮遊細胞であることを特徴とする［１１］の培地組成物。

［１３］前記接着細胞が、スフェアであることを特徴とする［１２］の培地組成物。

［１４］［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物と、細胞又は組織とを含む、細胞又は組織培養物。

［１５］［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物中で細胞または組織を培養することを特徴とする、細胞又は組織の培養方法。

［１６］［１４］の培養物から細胞または組織を分離することを特徴とする、細胞又は組織の回収方法。

［１７］前記分離が、遠心分離で行われることを特徴とする［１６］の回収方法。

［１８］［１］乃至［１３］のいずれかの培地組成物中で接着細胞を培養することを特徴とするスフェアの製造方法。

［１９］［１］乃至［１３］のいずれかの培地組成物を調製するための培地添加剤であって、当該ナノファイバー又は当該ナノファイバーを構成する水溶性高分子化合物を含むことを特徴とする培地添加剤。

［２０］［１９］の培地添加剤と培地を混合することを特徴とする培地組成物の製造方法。

［２１］［１］乃至［１３］のいずれかの培地組成物の製造方法であって、当該ナノファイバー又は当該ナノファイバーを構成する水溶性高分子化合物と培地を混合することを特徴とする培地組成物の製造方法。

［２２］［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物中で細胞または組織を保存することを特徴とする、細胞又は組織の保存方法。

［２３］［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物中で細胞または

組織を輸送することを特徴とする、細胞又は組織の輸送方法。

［２４］［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物中で細胞または組織を培養することを特徴とする、細胞又は組織の増殖方法。

［２５］以下の工程を含む、接着細胞の継代培養方法：

（１）［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物中で接着細胞を浮遊培養すること；及び

（２）培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、(i)工程（１）の浮遊培養により得られた接着細胞を含む培養物に、新鮮な［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物を添加するか、或いは(ii)新鮮な［１］乃至［１３］のいずれかに記載の培地組成物へ、工程（１）の浮遊培養により得られた接着細胞を含む培養物の全部又は一部を添加すること。

［２６］キチンナノファイバーを含有する培地組成物中で接着細胞を該キチンナノファイバーに付着した状態で浮遊培養することを含む、接着細胞の増殖方法。

［２７］培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、０．０００１％（重量／容量）以上、０．１％（重量／容量）以下である、［２６］記載の方法。

発明の効果

[0016] 本発明は、ナノファイバー、特に多糖類からなるナノファイバーを含む培地組成物を提供する。当該培地組成物を用いると、細胞や組織の障害や機能喪失を引き起こすリスクのある振とうや回転等の操作を伴わずに細胞及び／又は組織を浮遊状態にて培養することができる。更に、当該培地組成物を用いると、培養の際、容易に培地を交換することができる上に、培養した細胞及び／又は組織を容易に回収することもできる。当該培養方法を、動物生体或いは植物体から採取した細胞及び／又は組織に適用し、目的の細胞及び／又は組織をその機能を損なうことなく大量に調製することができる。そして、当該培養方法で得られる細胞及び／又は組織は、化学物質、医薬品等の薬効及び毒性評価や、酵素、細胞増殖因子、抗体等の有用物質の大量生産、疾

患や欠損により失われた器官、組織、細胞を補う再生医療等を実施する際に利用することができる。

[0017] また、本発明の培地組成物を用いると、細胞または組織を生体内に近い環境に維持できるため、細胞や組織の保存および輸送に有用である。例えば、プレート上で細胞を接着培養し、これをそのまま輸送する場合、輸送中の振動により、細胞がプレートから剥離する等して、細胞が有する本来の機能が低下する場合があったが、本発明の培地組成物は、ナノファイバーが三次元のネットワークを形成し、これが細胞を支えることにより、細胞を浮遊した状態で保持できるため、輸送中の振動によるプレートからの剥離等による細胞のダメージを回避し、細胞の本来の機能を維持した状態で細胞を保存および輸送することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]培地組成物でＨｅｐＧ２細胞のスフェアを培養したところ、スフェアが均一に分散され、かつ浮遊状態にて培養できることを示す図である。

[図2]培地組成物でＨｅＬａ細胞のスフェアを培養したところ、スフェアが均一に分散され、かつ浮遊状態にて培養できることを示す図である。

[図3]培地組成物でＨｅＬａ細胞のスフェアを培養し、本スフェアを顕微鏡観察したところ、既存の培地に比べてスフェア同士の会合が抑えられることを示す図である。

[図4]培地組成物でＨｅｐＧ２細胞を付着させたマイクロキャリアを培養したところ、ＨｅｐＧ２細胞がマイクロキャリア上で増殖できることを示す図である。

[図5]培地組成物にＨｅＬａ細胞のスフェアを添加した際に、スフェアが均一に分散され、かつ浮遊状態にあることを示す図である。

[図6]培地組成物によりＨｅＬａ細胞のスフェアが形成されることを示す図である。

[図7]構造体の一態様であるフィルムを示す図である。培地組成物に対する脱アシル化ジェランガムの濃度は、０．０２％（重量／容量）。

[図8]培地組成物によりＨｅｐＧ２細胞のスフェアが形成されることを示す図である。

[図9]ＨｅｐＧ２細胞を付着させたラミニンコートＧＥＭを培地組成物で培養した際の浮遊状態を示す図である。

[図10]ＨｅｐＧ２細胞を包埋したアルギン酸ビーズを培地組成物で培養した際の浮遊状態を示す図である。

[図11]ＨｅｐＧ２細胞を包埋したコラーゲンゲルカプセルを培地組成物で培養した際の浮遊状態を示す図である。

[図12]培地組成物でイネ由来カルスを培養した際の浮遊状態を示す図である。

[図13]２５℃における各培地組成物の粘度を示す。

[図14]実施例１のＭＮＣ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図15]実施例２のＰＮＣ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図16]実施例３のＣＴ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図17]実施例４のＤＡＧ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図18]実施例５のＣａｒ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。室温にて乾燥。

[図19]実施例５のＣａｒ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。１１０℃にて乾燥。

[図20]比較例３のＸａｎ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図21]比較例４のＤＵ含有培地組成物の走査型電子顕微鏡写真を示す。

[図22]実施例１のＭＮＣ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、ＭＮＣ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図23]実施例２のＰＮＣ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、ＰＮＣ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１

ｗ／ｖ％である。

[図24]実施例３のＣＴ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、ＣＴ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図25]実施例４のＤＡＧ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、ＤＡＧ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図26]実施例５のＣａｒ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、Ｃａｒ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図27]実施例５のＸａｎ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、Ｘａｎ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図28]比較例４のＤＵ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、ＤＵ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図29]比較例５のＡｌｇ含有培地組成物中で、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを６日間浮遊培養した後における、スフェアの分散状態の観察結果を示す。左から、Ａｌｇ濃度が、０．０１、０．０３、０．０５、０．０７及び０．１ｗ／ｖ％である。

[図30]ＭＣＦ７細胞を、実施例１’及び比較例５’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図31]ＭＣＦ７細胞を、実施例２’及び３’の培地組成物中で浮遊培養を開

始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図32]ＭＣＦ７細胞を、実施例４’及び実施例５’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図33]ＭＣＦ７細胞を、比較例３’及び４’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図34]Ａ３７５細胞を、実施例１’及び比較例５’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図35]Ａ３７５細胞を、実施例２’及び３’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図36]Ａ３７５細胞を、実施例４’及び実施例５’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図37]Ａ３７５細胞を、比較例３’及び４’の培地組成物中で浮遊培養を開始して６日目におけるＲＬＵ値を示す。

[図38]浮遊培養開始２日目における、各培地組成物中におけるＭＣＦ７細胞の分散状態を顕微鏡観察した結果である。

[図39]浮遊培養開始２日目における、各培地組成物中におけるＡ３７５細胞の分散状態を顕微鏡観察した結果である。

[図40]浮遊培養開始４日目における、各培地組成物中におけるＭＤＣＫ細胞の分散状態を顕微鏡観察した結果である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、更に詳細に本発明を説明する。

本明細書において用いる用語につき、以下の通り定義する。

[0020] 本発明における細胞とは、動物或いは植物を構成する最も基本的な単位であり、その要素として細胞膜の内部に細胞質と各種の細胞小器官をもつものである。この際、ＤＮＡを内包する核は、細胞内部に含まれても含まれなくてもよい。例えば、本発明における動物由来の細胞には、精子や卵子などの生殖細胞、生体を構成する体細胞、幹細胞、前駆細胞、生体から分離された癌細胞、生体から分離され不死化能を獲得して体外で安定して維持される細

胞（細胞株）、生体から分離され人為的に遺伝子改変が成された細胞、生体から分離され人為的に核が交換された細胞等が含まれる。生体を構成する体細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、繊維芽細胞、骨髄細胞、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、好中球、赤血球、血小板、マクロファージ、単球、骨細胞、骨髄細胞、周皮細胞、樹枝状細胞、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、造血前駆細胞、及び単核細胞等が含まれる。当該体細胞は、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、脾臓、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る細胞が含まれる。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り、その例としては、以下に限定されるものではないが、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、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、毛包幹細胞などが含まれる。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。癌細胞とは、体細胞から派生して無限の増殖能を獲得した細胞である。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であり、その例としては、以下に限定されるものではないが、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）、ＨＣＴ１１６、Ｈｕｈ７、ＨＥＫ２９３（ヒト胎児腎細胞）、ＨｅＬａ（ヒト子宮癌細胞株）、ＨｅｐＧ２（ヒト肝癌細胞株）、ＵＴ７／ＴＰＯ（ヒト白血病細胞株）、ＭＤＣＫ、ＭＤＢＫ、ＢＨＫ、Ｃ－３３Ａ、ＨＴ－２９、ＡＥ－１、３Ｄ９、Ｎｓ０／１、Ｊｕｒｋａｔ、ＮＩＨ３Ｔ３、ＰＣ１２、Ｓ２、Ｓｆ９、Ｓｆ２１、Ｈｉｇｈ　Ｆｉｖｅ（登録商標）、Ｖｅｒｏ等

が含まれる。

[0021] 本発明における植物由来の細胞には、植物体の各組織から分離した細胞が含まれ、当該細胞から細胞壁を人為的に除いたプロトプラストも含まれる。

[0022] 本発明における組織とは、何種類かの異なった性質や機能を有する細胞が一定の様式で集合した構造の単位であり、動物の組織の例としては、上皮組織、結合組織、筋組織、神経組織等が含まれる。植物の組織の例としては、分裂組織、表皮組織、同化組織、葉肉組織、通道組織、機械組織、柔組織、脱分化した細胞塊（カルス）等が含まれる。

[0023] 細胞及び／又は組織を培養するに際し、培養する細胞及び／又は組織は、前記に記載した細胞及び／又は組織から任意に選択して培養することができる。細胞及び／又は組織は、動物或いは植物体より直接採取することができる。細胞及び／又は組織は、特定の処理を施すことにより動物或いは植物体から誘導させたり、成長させたり、または形質転換させた後に採取してもよい。この際、当該処理は生体内であっても生体外であってもよい。動物としては、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る。哺乳動物の例としては、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、チンパンジーおよびヒトが挙げられる。植物としては、採取した細胞及び／又は組織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。

[0024] 本発明において、細胞及び／又は組織の浮遊とは、培養容器に対して細胞

及び／又は組織が接着しない状態（非接着）であることをいう。さらに、本発明において、細胞及び／又は組織を増殖、分化或いは維持させる際、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及び／又は組織が当該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。

[0025] 好ましい態様において、本発明の培地組成物は、細胞や組織の維持や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、細胞及び／又は組織の浮遊静置が可能である。本発明の培地組成物は、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、細胞及び／又は組織の浮遊静置が可能である。

[0026] 浮遊静置が可能か否かは、例えば、ポリスチレンビーズ（Ｓｉｚｅ　５００－６００μｍ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．製）を、評価対象の培地組成物中に均一に分散させ、２５℃にて静置し、少なくとも５分以上（好ましくは、２４時間以上、４８時間以上）、当該細胞の浮遊状態が維持されるか否かを観察することにより、評価することができる。

[0027] 本発明の培地組成物は、細胞または組織を浮遊させて培養できる（好ましくは浮遊静置培養できる）ナノファイバーと培地を含有する組成物である。

当該培地組成物は、好ましくは、培養時の培地組成物の交換処理及び培養終了後において細胞または組織の回収が可能である組成物であり、より好ましくは、細胞または組織の回収の際に、温度変化、化学処理、酵素処理、せん断力のいずれも必要としない組成物である。

[0028] ［ナノファイバー］

本発明の培地組成物中に含まれるナノファイバーは、液体培地中で、細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる効果を示すものである。より詳細には、

低分子化合物や高分子化合物が共有結合やイオン結合、静電相互作用や疎水性相互作用、ファンデルワールス力などを介して集合及び自己組織化し液体培地中でナノファイバーを形成したもの、あるいは、高分子化合物からなる比較的大きな繊維構造体を高圧処理などにより微細化することにより得られたナノファイバー等が、本発明の培地組成物中に含まれるナノファイバーとして挙げられる。理論には拘束されないが、本発明の培地組成物においては、ナノファイバーが三次元のネットワークを形成し、これが細胞や組織を支えることにより、細胞や組織の浮遊状態が維持される。

[0029] 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。本発明に用い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。平均繊維径が０．００１μｍ未満であると、ナノファイバーが微細すぎることにより浮遊効果が得られない恐れがあり、それを含有する培地組成物の特性の改善につながらない可能性がある。

[0030] 本発明に用い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、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。アスペクト比が２未満の場合には、培地組成物中での分散性に欠け、浮遊作用が充分に得られない恐れがある。５００を超える場合には、繊維長が極めて大きくなることを意味することから、当該組成物の粘度を上昇させることにより培地交換など継代操作に支障をきたす恐れがある。また、培地組成物が可視光を透過しづらくなることから透明性の低下につながり、培養細胞の経時的な観察が困難となることや吸光・蛍光・発光などを用いた細胞評価に支障をきたす可能性がある。

[0031] 尚、本明細書中、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た。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、室温乾燥した。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）とした。

[0032] また、平均繊維長（Ｌ）は、以下のようにして求めた。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た。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した。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）とした。

[0033] 本発明に用いるナノファイバーは、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細胞及び／又は組織を実質的に保持し、その沈降を防ぐ効果を有する。液体の粘度を実質的に高めないとは、液体の粘度が８ｍＰａ・ｓを上回らないことを意味する。この際の当該液体の粘度（すなわち、本発明の製造方法により製造される培地組成物の粘度）は、８ｍＰａ・ｓ以下であり、好ましくは４ｍＰａ・ｓ以下であり、より好ましくは２ｍＰａ・ｓ以下である。さらに、当該ナノファイバーを液体培地中に分散させた際、当該液体の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）効果を示すものであれば、ナノファイバーの化学構造、分子量、物性等は何ら制限されない。

ナノファイバーを含む液体の粘度は、例えば後述の実施例に記載の方法で測定することができる。具体的には、２５℃条件下で音叉振動式粘度測定（ＳＶ－１Ａ、Ａ＆Ｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｌｔｄ．）を用いて評価することができる。

[0034] ナノファイバーを構成する原料の例としては、特に制限されるものではな

いが、低分子化合物や高分子化合物が挙げられる。

本発明に用いる低分子化合物の好ましい具体例としては、特に制限されるものではないが、例えば、Ｌ－イソロイシン誘導体やＬ－バリン誘導体、Ｌ－リシン誘導体などのアミノ酸誘導体、ｔｒａｎｓ－１，２－ジアミノシクロヘキサンジアミド誘導体等のシクロヘキサンジアミン誘導体、５-アミノイソフタル酸誘導体、Ｒ－１２－ヒドロキシステアリン酸、１，３，５－ベンゼントリカルボキサイミド、ｃｉｓ－１，３，５－シクロヘキサントリカルボキサミド、２，４－ジベンジリデン－Ｄ－ソルビトール、Ｎ－ラウロイル－Ｌ－グルタミン酸－α，γ－ビス－ｎ－ブチルアミド、デヒドロアビエチン酸カルシウム等の低分子ゲル化剤を挙げることができる。

[0035] 本発明に用いる高分子化合物の好ましい具体例としては、特に制限されるものではないが、例えば多糖類、ポリペプチド等が挙げられる。

[0036] 多糖類とは、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。多糖類には、非水溶性多糖類及び水溶性多糖類が包含される。

[0037] 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。

[0038] 水溶性多糖類としては、アニオン性の官能基を有する酸性多糖類が挙げられる。アニオン性の官能基を有する酸性多糖類としては、特に制限されないが、例えば、構造中にウロン酸（例えば、グルクロン酸、イズロン酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸）を有する多糖類；構造中に硫酸又はリン酸を有する多糖類、或いはその両方の構造を持つ多糖類等が挙げられる。より具体的には、ヒアルロン酸、ジェランガム、脱アシル化ジェランガム（ＤＡＧ）、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、ザンタンガム、ヘキスロン酸、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ラムナン硫酸、アルギン酸及びそれらの塩からな

る群より１種又は２種以上から構成されるものが例示される。

ここでいう塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウムといったアルカリ金属の塩；カルシウム、バリウム、マグネシウムといったアルカリ土類金属の塩；アルミニウム、亜鉛、銅、鉄等の塩；アンモニウム塩；テトラエチルアンモニウム、テトラブチルアンモニウム、メチルトリブチルアンモニウム、セチルトリメチルアンモニウム、ベンジルメチルヘキシルデシルアンモニウム、コリン等の四級アンモニウム塩；ピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルアミン、エタノールアミン、ジオラミン、トロメタミン、メグルミン、プロカイン、クロロプロカイン等の有機アミンとの塩；グリシン、アラニン、バリン等のアミノ酸との塩等が挙げられる。

[0039] ポリペプチドとしては、生体において繊維を構成するポリペプチドが挙げられる。具体的には、コラーゲン、エラスチン、ミオシン、ケラチン、アミロイド、フィブロイン、アクチン、チューブリン等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0040] 本発明に用いるナノファイバーを構成する原料としては、天然由来の物質のみならず、微生物により産生された物質、遺伝子工学的に産生された物質、或いは酵素や化学反応を用いて人工的に合成された物質も含まれる。本発明に用いるナノファイバーを構成する原料は、好ましくは天然由来の物質（即ち、天然より抽出された物質）、又はこれを化学反応又は酵素反応により修飾することにより得られた物質である。

[0041] 一態様において、多糖類は非水溶性多糖類である。好ましい非水溶性多糖類としては、セルロース；キチン、キトサン等のキチン質が挙げられる。培地組成物の粘度を低くできる点と細胞または組織の回収のしやすさの点を考慮すると、セルロース及びキチンが最も好ましい。

[0042] セルロースとは、ブドウ糖の６員環であるＤ－グルコピラノースがβ－１、４グルコシド結合した天然高分子化合物である。原料としては、例えば、木材、竹、麻、ジュート、ケナフ、コットン、農作物・食物残渣など植物由来のセルロース、又はバクテリアセルロース、シオグサ（クラドフォラ）、

灰色植物（グラウコキスチス）、バロニア、ホヤセルロースなど、微生物産生若しくは動物産生のセルロースを使用することができる。植物由来のセルロースはミクロフィブリルと呼ばれる非常に細い繊維がさらに束になりフィブリル、ラメラ、繊維細胞と段階的に高次構造を形成している。また、バクテリアセルロースは菌細胞から分泌されたセルロースのミクロフィブリルが、そのままの太さで微細な網目構造を形成している。

[0043] 本発明において、コットンやバクテリアセルロースなど高純度のセルロース原料は原料のまま用いる事ができるが、これ以外の植物由来のセルロースなどは、単離・精製したものを用いる事が好ましい。本発明において好適に用いられるセルロースは、コットンセルロース、バクテリアセルロース、クラフトパルプセルロース、微結晶セルロース等である。特に、高い浮遊作用を有することから、クラフトパルプセルロースが好適に用いられる。

[0044] キチン質とは、キチン及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。高い浮遊作用を達成する観点から、キチンを構成する糖単位に占めるＮ－アセチルグルコサミンの割合が高いほど好ましい。キチンを構成する糖単位に占めるＮ－アセチルグルコサミンの割合は、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、更に好ましくは９８％以上、最も好ましくは１００％である。

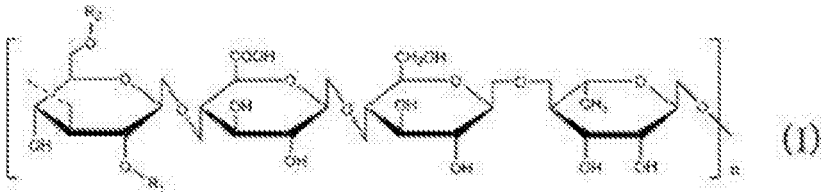
[0045] キチンの原料としては、例えば、エビ、カニ、昆虫、貝、キノコなど、多くの生物資源を用いることができる。本発明に用いるキチンは、カニ殻やエビ殻由来のキチンなどのα型の結晶構造を有するキチンであってもよく、イカの甲由来のキチンなどのβ型の結晶構造を有するキチンであってもよい。

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。

[0046] 一態様において、多糖類は水溶性多糖類である。好ましい水溶性多糖類としては、脱アシル化ジェランガム、カラギーナン等が挙げられる。高い浮遊作用を達成する観点から、脱アシル化ジェランガムが最も好ましい。

[0047] 脱アシル化ジェランガムとは、１－３結合したグルコース、１－４結合したグルクロン酸、１－４結合したグルコース及び１－４結合したラムノースの４分子の糖を構成単位とする直鎖状の高分子多糖類であり、以下の一般式（Ｉ）において、Ｒ１、Ｒ２が共に水素原子であり、ｎは２以上の整数で表わされる多糖類である。ただし、Ｒ１がグリセリル基を、Ｒ２がアセチル基を含んでいてもよいが、アセチル基及びグリセリル基の含有量は、好ましくは１０％以下であり、より好ましくは１％以下である。

[0048] [化1]



(I)

[0049] ジェランガムの製造方法としては、発酵培地で生産微生物を培養し、菌体外に生産された粘膜物を通常の精製方法にて回収し、乾燥、粉砕等の工程後、粉末状にすればよい。また、脱アシル化ジェランガムは、発酵培地でジェランガムを生産する微生物を培養し、菌体外に生産された粘膜物を回収する。この際、粘膜物にアルカリ処理を施し、１－３結合したグルコース残基に結合したグリセリル基とアセチル基を脱アシル化した後に回収すればよい。回収された粘膜物からの脱アシル化ジェランガムの精製は、例えば、液－液抽出、分別沈澱、結晶化、各種のイオン交換クロマトグラフィー、セファデックスＬＨ－２０等を用いたゲル濾過クロマトグラフィー、活性炭、シリカ

ゲル等による吸着クロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる活性物質の吸脱着処理、あるいは逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等を単独あるいは任意の順序に組み合わせ、また反復して用いることにより、実施することができる。ジェランガムの生産微生物の例としては、これに限定されるものではないが、スフィンゴモナス・エロディア（Ｓｐｈｉｎｇｏｍｏｎａｓ　ｅｌｏｄｅａ）及び当該微生物の遺伝子を改変した微生物が挙げられる。

そして、脱アシル化ジェランガムの場合、市販のもの、例えば、三晶株式会社製「ＫＥＬＣＯＧＥＬ（シーピー・ケルコ社の登録商標）ＣＧ－ＬＡ」、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製「ケルコゲル（シーピー・ケルコ社の登録商標）」等を使用することができる。

[0050] 本発明に用いる高分子化合物の重量平均分子量は、好ましくは１，０００乃至５０，０００，０００であり、より好ましくは１０，０００乃至２０，０００，０００、更に好ましくは１００，０００乃至１０，０００，０００である。例えば、当該分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（ＧＰＣ）によるポリエチレングリコール、またはプルラン換算や水溶液の粘度等から見積もることができる。

[0051] 本発明においては、上記高分子化合物を複数種（好ましくは２種）組み合わせて使用することができる。高分子化合物の組み合わせの種類は、培地組成物中でナノファイバーを形成し、或いはナノファイバーとして分散し、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできるものあれば特に限定されないが、好ましくは、当該組合せは少なくともセルロース、キチン、コラーゲン、又は脱アシル化ジェランガムを含む。即ち、好適な高分子化合物の組合せには、セルロース、キチン、コラーゲン、又は脱アシル化ジェランガム；及びそれ以外の高分子化合物（例、キサンタンガム、アルギン酸、カラギーナン、ダイユータンガム、メチルセルロース、ローカストビーンガム又はそれらの塩）が含まれる。

[0052] ［ナノファイバーの調製］

本発明の培地組成物は、上述の原料から調製されたナノファイバーを含む。ナノファイバーの調製方法は、原料として非水溶性の高分子化合物（例えば、セルロース、キチン等の非水溶性多糖類）を用いた場合と、水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）を用いた場合とで異なる。

[0053] ナノファイバーの原料が非水溶性の高分子化合物（例えば、セルロース、キチン等の非水溶性多糖類）である場合、通常は、当該原料を粉砕することにより、ナノファイバーを得る。粉砕方法は限定されないが、本発明の目的に合う後述する繊維径・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。

[0054] 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。

[0055] 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、通常、５０～２５０ＭＰａであり、好ましくは１５０～２４５ＭＰａである。圧送圧力が５０ＭＰａ未満の場合には、ナノファイバーの微細化が不充分となり、微細化により期待される効果が得られない恐れがある。

[0056] また、微細化処理時の水分散液中の原料の濃度は０．１質量％～３０質量％、好ましくは１質量％～１０質量％である。水分散液中の原料の濃度が０

．１質量％未満だと生産性が低く、３０質量％より高い濃度だと粉砕効率が低く、所望のナノファイバーが得られない。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。また、３０質量％を超える高濃度な場合は、数千回以上の処理回数が必要となることや、取扱いに支障をきたす程度まで高粘度化が進むため、工業的観点から非現実的である。

[0057] ナノファイバーの原料が水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）を用いた場合、当該物質を培地中に添加すると、当該物質が培地中の金属カチオンを介して集合し、培地中でナノファイバーを形成し、これが三次元ネットワークを構築することにより、結果として、細胞または組織を浮遊させて培養できるナノファイバーが形成される。

[0058] 本発明の培地組成物中におけるナノファイバーの濃度は、培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできるように、適宜設定することができるが、通常は、０．０００１％乃至１．０％（重量／容量）、例えば０．０００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ましくは０．００１％乃至０．５％（重量／容量）、より好ましくは０．００５％乃至０．１％（重量／容量）、さらに好ましくは０．００５％乃至０．０５％（重量／容量）の範囲内である。

例えば、セルロースナノファイバーの場合、通常０．０００１％乃至１．０％（重量／容量）、例えば０．０００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ましくは０．００１％乃至０．５％（重量／容量）、より好ましくは０．０１％乃至０．１％（重量／容量）、更に好ましくは、０．０１％乃至０．０５％（重量／容量）培地中に添加すれば良い。

セルロースナノファイバーのうちパルプセルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の下限値は、浮遊作用発現の観点及び、浮遊静置培養を可能にする観点から、好ましくは、０．０１％（重量／容量）以上、０．０１５

％（重量／容量）以上、０．０２％（重量／容量）以上、０．０２５％（重量／容量）以上、又は、０．０３％（重量／容量）以上である。また、パルプセルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の上限値は、培地の粘度を実質的に高めない観点から、好ましくは０．１％（重量／容量）以下、又は０．０４％（重量／容量）以下である。

微結晶セルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の下限値は、浮遊作用発現の観点から、好ましくは０．０１％（重量／容量）以上、０．０３％（重量／容量）以上、又は０．０５％（重量／容量）以上である。浮遊静置培養を可能にする観点からは、培地中の微結晶セルロースナノファイバー濃度の下限値は、好ましくは０．０３％（重量／容量）以上、又は０．０５％（重量／容量）以上である。また、微結晶セルロースナノファイバーの場合、培地中の濃度の上限値は、好ましくは、０．１％（重量／容量）以下である。

キチンナノファイバーの場合、通常０．０００１％乃至１．０％（重量／容量）、例えば０．０００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ましくは０．００１％乃至０．５％（重量／容量）、より好ましくは０．０１％乃至０．１％（重量／容量）、最も好ましくは、０．０３％乃至０．０７％（重量／容量）培地中に添加すれば良い。浮遊作用発現の観点から、培地中のキチンナノファイバー濃度の下限値は、好ましくは０．０００１％（重量／容量）以上、０．０００３％（重量／容量）以上、０．０００５％（重量／容量）以上、又は０．００１％（重量／容量）以上である。浮遊静置培養を可能にする観点からは、培地中のキチンナノファイバーの下限値は、好ましくは０．０３％（重量／容量）以上である。培地中のキチンナノファイバー濃度の上限値は、好ましくは、０．１％（重量／容量）以下である。

セルロースナノファイバー、キチンナノファイバー等の非水溶性のナノファイバーについては、通常、０．１％（重量／容量）以下の濃度であれば、培地組成物の粘度を実質的に高めることはない。

カラギーナンの場合、０．０００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ま

しくは　０．００１％乃至０．５％（重量／容量）、より好ましくは０．０１％乃至０．１％（重量／容量）、最も好ましくは、０．０２％乃至０．１％（重量／容量）培地中に添加すれば良い。浮遊作用発現の観点及び、浮遊静置培養を可能にする観点から、培地中のカラギーナン濃度の下限値は、好ましくは、０．０１％以上である。培地中のカラギーナン濃度の上限値は、好ましくは、０．１％（重量／容量）以下である。培地の粘度を実質的に高めない観点から、カラギーナンの上限値を、０．０４％（重量／容量）以下とすることもまた好ましい。

脱アシル化ジェランガムの場合、通常０．００１％乃至１．０％（重量／容量）、例えば、０．００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ましくは０．００３％乃至０．５％（重量／容量）、より好ましくは０．０１％乃至０．１％（重量／容量）、更に好ましくは０．０１乃至０．０５％（重量／容量）、最も好ましくは、０．０１％乃至０．０２％（重量／容量）培地中に添加すれば良い。浮遊作用発現の観点から、培地中の脱アシル化ジェランガム濃度の下限値は、好ましくは０．００５％（重量／容量）以上、又は０．０１％以上である。浮遊静置培養を可能にする観点から、培地中の脱アシル化ジェランガム濃度の下限値は、好ましくは０．０１％（重量／容量）以上である。培地の粘度を実質的に高めない観点から、培地中の脱アシル化ジェランガム濃度の上限値は、０．０５％（重量／容量）以下である。培地の粘度を実質的に高めない観点から、脱アシル化ジェランガムの上限値を、０．０４（重量／容量）％以下とすることもまた好ましい。

[0059] ［多糖類の併用］

上記ナノファイバーに加えて、多糖類を複数種（好ましくは２種）組み合わせて使用することもできる。多糖類の濃度は、当該液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできる範囲で、適宜設定することができる。例えば、ナノファイバーと多糖類との組合せを用いる場合、ナノファイバーの濃度としては０．００５～０．１％（重量／容量）、好ましくは０．０１～０．０

７％（重量／容量）が例示され、多糖類の濃度としては、０．００５～０．４％（重量／容量）、好ましくは０．１～０．４％（重量／容量）が例示される。具体的な濃度範囲の組合せとしては、以下が例示される。

セルロースまたはキチンナノファイバー：０．００５～０．１％（好ましくは０．０１～０．０７％）（重量／容量）

多糖類

キサンタンガム：０．１～０．４％（重量／容量）

アルギン酸ナトリウム：０．１～０．４％（重量／容量）（好ましくは０．０００１～０．４％（重量／容量））

ローカストビーンガム：０．１～０．４％（重量／容量）

メチルセルロース：０．１～０．４％（重量／容量）（好ましくは０．２～０．４％（重量／容量））

カラギーナン：０．０５～０．１％（重量／容量）

ダイユータンガム：０．０５～０．１％（重量／容量）

ネイティブジェランガム：０．０００１～０．４％（重量／容量）

[0060] なお該濃度は、以下の式で算出できる。

濃度（％）＝ナノファイバーの重量（ｇ）／培地組成物の容量（ｍｌ）×１００

[0061] ［金属カチオン］

一態様において、本発明の培地組成物には、金属カチオン、例えば２価の金属カチオン（カルシウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオンおよび銅イオン等）、好ましくはカルシウムイオンを含有する。特に、本発明の培地組成物に含まれるナノファイバーが、水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）から構成されているとき、本発明の培地組成物は上記金属カチオンを含むことが好ましい。金属カチオンが含まれることにより、当該水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）が金属カチオンを介して集合し、培地組成物中でナノファイバーを形成し、これが三次元ネットワークを構築する

ことにより、結果として、細胞または組織を浮遊させて培養できるナノファイバーが形成されるからである。

[0062] ［培地］

本発明の培地組成物中に含まれる培地としては、例えばダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅｓ’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（Ｅａｇｌｅｓ’ｓ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ；ＥＭＥＭ）、αＭＥＭ培地（ａｌｐｈａ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅｓ’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）、Ｓｔｅｍｌｉｎｅ ＩＩ（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－９００ ＩＩ（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。

[0063] 細胞及び／又は組織が植物由来である場合、植物組織培養に通常用いられるムラシゲ・スクーグ（ＭＳ）培地、リンズマイヤー・スクーグ（ＬＳ）培地、ホワイト培地、ガンボーグＢ５培地、ニッチェ培地、ヘラー培地、モーレル培地等の基本培地、或いは、これら培地成分を至適濃度に修正した修正

培地（例えば、アンモニア態窒素濃度を半分にする等）に、オーキシン類及び必要に応じてサイトカイニン類等の植物生長調節物質（植物ホルモン）を適当な濃度で添加した培地が培地として挙げられる。これらの培地には、必要に応じて、カゼイン分解酵素、コーンスティープリカー、ビタミン類等をさらに補充することができる。オーキシン類としては、例えば、３－インドール酢酸（ＩＡＡ）、３－インドール酪酸（ＩＢＡ）、１－ナフタレン酢酸（ＮＡＡ）、２，４－ジクロロフェノキシ酢酸（２，４－Ｄ）等が挙げられるが、それらに限定されない。オーキシン類は、例えば、約０．１～約１０ｐｐｍの濃度で培地に添加され得る。サイトカイニン類としては、例えば、カイネチン、ベンジルアデニン（ＢＡ）、ゼアチン等が挙げられるが、それらに限定されない。サイトカイニン類は、例えば、約０．１～約１０ｐｐｍの濃度で培地に添加され得る。

[0064] 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。動物由来の細胞及び／又は組織培養の際には、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。動物由来の細胞及び／又は組織の培地に添加される成分としては、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、各種細胞外マトリッ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。

[0065] 培地に添加され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、エリスロポイエチン、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。

[0066] 培地に添加され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）、繊維芽細胞増殖因子－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。

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。

[0067] 各種細胞外マトリックスや各種細胞接着分子の例としては、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－１乃至１２、ニトジェン、テネイシン、トロンボスポンジン，フォンビルブランド（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｅｂｒａｎｄ）因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、デスモコリン、デスモグレイン、各種インテグリン、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｌ

－セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリー、マトリゲル、ポリ－Ｄ－リジン、ポリ－Ｌ－リジン、キチン、キトサン、セファロース、ヒアルロン酸、アルギン酸ゲル、各種ハイドロゲル、さらにこれらの切断断片などが挙げられる。

[0068] 培地に添加され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、ノルカディシン、m-カルボキシフェニル、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。

[0069] ［培地組成物の製造方法］

上記ナノファイバーを、液体培地の粘度を実質的に高めること無く細胞及び／又は組織を均一に浮遊させる（好ましくは浮遊静置させる）ことのできる濃度となるように、細胞及び／又は組織を培養する際に用いられる培地と混合することにより、上記本発明の培地組成物を製造することができる。本発明は、かかる本発明の培地組成物の製造方法をも提供する。

[0070] 当該ナノファイバーの形状は、粉末、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような製剤化された固体、適切な生理的な水性溶媒中の分散液のような液体

、又は基板や単体に結合させた状態であり得る。製剤化される際の添加物としては、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤；乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニット等の賦形剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等が挙げられる。これらの添加物は上記のものに限定されることはなく、当業者が利用可能であれば自由に選択することができる。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌、オートクレーブ滅菌、フィルター滅菌等が挙げられる。

[0071] 好ましい態様において、上記ナノファイバーの生理的な水性溶媒中の分散液と、液体培地とを混合することにより、本発明の培地組成物を調製する。該分散液は、滅菌（オートクレーブ、ガンマ線滅菌等）されていてもよい。あるいは、該分散液と、粉末培地を水に溶かして調製した液体培地（培地の水溶液）とを混合した後に、滅菌して使用してもよい。該分散液と液体培地の滅菌は、混合する前に、別々に行ってもよい。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、これらに限られるわけではない。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。上記ナノファイバーの分散液は、本発明の培地組成物を調製するための培地添加剤として有用である。本発明は、かかる培地添加剤をも提供する。

[0072] 混合比率は、ナノファイバーの分散液：液体培地（培地の水溶液）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。

[0073] 尚、ナノファイバーが、水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）から構成されている場合には、当該ナノファイバーと培地とを混合する代わりに、当該水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）と培地とを混合して、当該培地中でナノファイバーを形成させることにより、本発明の培地組成物を製造して

もよい。当該高分子化合物の形状は、粉末、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような製剤化された固体、適切な溶媒並びに溶解剤で溶解した溶液あるいは懸濁液のような液体、又は基板や担体に結合させた状態であり得る。製剤化される際の添加物としては、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤；乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニット等の賦形剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等が挙げられる。これらの添加物は上記のものに限定されることはなく、当業者が利用可能であれば自由に選択することができる。

また、上記高分子化合物は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌、オートクレーブ滅菌、フィルター滅菌等が挙げられる。

[0074] 好ましい態様において、水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）の水溶液（これを、培地添加剤２とする。）が、本発明の製造方法に用いられる。当該水溶液は、水溶性の高分子化合物の固体（例、粉末）を、生理的な水性溶媒に溶解することにより、得ることができる。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、これらに限られるわけではない。水性溶媒としては、水が好ましい。

[0075] 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。該水性溶媒には、２価金属カチオンが含まれていてもいなくてもよいが、好ましい態様において、２価金属カチオンが含まれない。水性溶媒中に２価金属カチオンを含まない場合、該水溶液中で水溶性の高分子化合物（例えば、脱アシル化ジェランガム等の水溶性多糖類）は、細胞または組織を浮遊させて培養できるナノファイバーを形成し難く、水に溶解した状態で安定して保存することが可能だからである。

[0076] 上記培地添加剤には、ナノファイバーの効果を高めたり、使用する際の濃度を下げたりするような添加物を更に添加することもできる。この様な添加

剤の例として、グァーガム、タマリンドガム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム、タマリンドガム、メチルセルロース等の多糖類を１種以上混合することができる。

[0077] 本発明の培地組成物の製造方法を例示するが、本発明はこれによって限定されるものではない。ナノファイバーをイオン交換水あるいは超純水に添加する。そして、全体が均一な状態に分散されるまで室温にて撹拌した後、滅菌（例えば、１２１℃にて２０分でのオートクレーブ滅菌）を行う。静置培養に使用する任意の培地を撹拌（例えば、ホモミキサー等）しながら、当該培地に前記滅菌後のナノファイバー分散液を添加し、当該培地と均一になるように混合する。本水溶液と培地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、マグネチックスターラーやメカニカルスターラー、ホモミキサー、ホモジナイザー等の機器を用いた混合が挙げられる。

[0078] 例えば、セルロースナノファイバーを用いて培地組成物を調製する場合、０．０００１％乃至５．０％（重量／容量）、好ましくは０．００１％乃至１．０％（重量／容量）、より好ましくは０．０１％乃至０．６％（重量／容量）となるようにイオン交換水あるいは超純水にセルロースナノファイバーを添加する。そして、全体が均一な状態になるまで室温にて撹拌した後、滅菌（例えば、１２１℃にて２０分でのオートクレーブ滅菌）を行う。例えばＤＭＥＭ培地等の液体培地をホモミキサー等で攪拌しながら、当該培地に本水溶液を所望の最終濃度となるように添加し（例えば終濃度が０．０３％の場合は０．６％水溶液：培地の比率は１：２０）、均一に混合させる。または、ＤＭＥＭ培地等の液体培地を本水溶液に所望の最終濃度となるようにピペットで添加し（例えば終濃度が０．０３％の場合は０．６％水溶液：培地の比率は１：２０）、ピペッティングで均一に混合させる。本水分散液と培地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、マグネチックスターラーやメカニカルスターラー、ホモミキサー、ホモジナイザー等の機器を用いた混合が挙げられる。

[0079] ［培養方法］

本発明は、上記本発明の培地組成物を用いて、細胞又は組織を増殖させる培養方法；得られる細胞又は組織を、例えばろ過、遠心又は磁性分離により、回収する方法；本発明の培地組成物を用いて、スフェアを製造する方法をも提供するものである。

[0080] 本発明で用いるナノファイバーは、細胞及び／又は組織を生体外で培養した時に、当該細胞及び／又は組織を、当該ナノファイバーを含有する液体中で浮遊させる効果（好ましくは浮遊静置させる効果）を示すものである。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及び／又は組織を増やして培養することが可能である。また、従来の浮遊培養方法において回転や振とう操作を伴う場合、細胞及び／又は組織に対するせん断力が働くため、細胞及び／又は組織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、本発明のナノファイバーを含有する培地組成物を用いることにより振とう等の操作を行わずに細胞及び／又は組織を均一に分散することができるため、目的とする細胞及び／又は組織を細胞機能の損失無く容易かつ大量に取得することができる。また、従来のゲル基材を含む培地において細胞及び／又は組織を浮遊培養する際、細胞及び／又は組織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、本発明のナノファイバーを含有する培地組成物を用いることにより、細胞及び／又は組織を浮遊培養し、その機能を損なうこと無く観察し、回収することができる。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、本発明のナノファイバーを含有する培地組成物は、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できる。

[0081] 本発明の方法により培養されたヒト由来の細胞及び／又は組織は、疾患や障害を有する患者に対し治療目的にて移植することができる。この際、治療の対象とする疾患や障害の種類、前処置方法並びに細胞移植方法は、当事者により適宜選択される。移植された細胞のレシピエントへの生着と疾患や障害からの回復や、移植に伴う副作用の有無、治療の効果は、移植治療におけ

る一般的な方法により適宜検査され、判断することができる。

[0082] さらに、細胞及び／又は組織が効率よく増殖されるため、本発明の培地組成物は細胞の研究用試薬として用いることができる。例えば、細胞や組織の分化や増殖を調節する因子を解明する際、細胞と目的の因子を共存させて培養した時の細胞の数や種類、細胞表面分化マーカーや発現遺伝子の変化を解析するが、この際に本発明の培地組成物を用いることにより解析対象となる細胞の数を効率よく増幅できるだけでなく、効率よく回収することができる。目的とする因子を解明する際の培養条件、培養装置、培地の種類、本発明ナノファイバーの種類、ナノファイバーの含量、添加物の種類、添加物の含量、培養期間、培養温度などは、本明細書に記載した範囲から当事者により適宜選択される。培養により増殖或いは出現した細胞は、当該分野にて標準的な顕微鏡を用いて観察することができる。この際、培養した細胞について特異的抗体を用いて染色してもよい。目的の因子により変化した発現遺伝子は、培養した細胞からＲＮＡ（リボ核酸）を抽出しノーザンブロッティング法、ＲＴ－ＰＣＲ法などによって検出することができる。また、細胞表面分化マーカーは、特異的抗体を用いてＥＬＩＳＡやフローサイトメトリーにより検出し、目的の因子による分化や増殖に対する効果を観察することができる。

[0083] また、本発明の培地組成物を用いると、細胞及び／又は組織が効率よく増殖されるため、本発明の培養方法は、細胞及び／又は組織の増殖方法又は細胞及び／又は組織の増殖促進方法として優れている。本発明の培地組成物を用いて、細胞及び／又は組織を培養すると、細胞及び／又は組織は、培養容器に接着せずに、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。特に、ナノファイバーとしてキチンナノファイバーを用いると、細胞がキチンナノファイバーに付着し、そこを足場として強力に増殖し、その結果、増殖した細胞、細胞塊（スフェア等）及び／又は組織が、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、細胞及び／又は組織を浮遊させる（即ち、細胞や組織の培

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及び／又は組織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。例えば、キチンナノファイバーの場合、浮遊作用発現に十分な０．０００１％（重量／容量）以上の濃度であれば、安定した浮遊静置培養を可能にする０．０３％（重量／容量）を下回る濃度（例、０．０２５％（重量／容量）以下、０．０２％（重量／容量）以下）であっても、増殖促進効果が奏される。微結晶セルロースナノファイバーの場合、浮遊作用発現に十分な０．０１％（重量／容量）以上であれば、安定した浮遊静置培養を可能にする０．０３％（重量／容量）を下回る濃度（例、０．０２５％（重量／容量）以下、０．０２％（重量／容量）以下）であっても、増殖促進効果が奏される。脱アシル化ジェランガムの場合、浮遊作用発現に十分な０．００５％（重量／容量）以上であれば、安定した浮遊静置培養を可能にする０．０１％（重量／容量）を下回る濃度（例、０．００９％（重量／容量）以下、０．００８％（重量／容量）以下）であっても、増殖促進効果が奏される。

[0084] ナノファイバーの中でも、とりわけキチンナノファイバーは、細胞増殖促進効果に優れている。

[0085] 本発明の培養方法においては、浮遊細胞及び接着細胞のいずれの細胞も用いることができる。接着細胞は、生育・増殖に足場を必要とする細胞である。浮遊細胞は、生育・増殖に足場を必要としない細胞である。本発明の培養方法においては、好ましくは接着細胞が用いられる。本発明の方法において、接着細胞を用いると、接着細胞が培養容器の底面に接着せずに、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、ナノファイバーに付着した状態、或いはスフェアの状態で増殖する。特に、ナノファイバーとしてキチンナノファイバーを用いると、細胞がキチンナノファイバーに付着し、そこを足場として強力に増殖し、その結果、増殖した細胞や細胞塊（スフェア等）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。

そのため、接着細胞の浮遊培養が可能となる。また、その結果、培養容器の底面へ接着させた状態で培養した場合よりも、接着細胞の増殖が促進される。また、培養容器の底面へ接着させた状態で培養した場合よりも、高い密度で接着細胞を培養することができる。

[0086] 本発明の培養方法においては、接着細胞の浮遊培養が可能なので、本発明の培養方法により接着細胞を浮遊培養した後、培養容器からの細胞の剥離操作を要することなく、新鮮な本発明の培地組成物を培養後の培養物に単に添加するか、新鮮な本発明の培地組成物へ、培養後の培養物の全部又は一部を添加することのみで接着細胞を継代することが可能である。本発明は、このような接着細胞の継代培養方法をも提供する。従って、本発明の継代培養方法を用いることにより、接着細胞を、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、本発明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。本発明の継代培養方法は、培養容器からの細胞の剥離操作に感受性が高い接着細胞（例えば、剥離操作により生存性が低下する接着細胞、剥離操作により形質が変わりやすい接着細胞）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細胞としては、ヒト多能性幹細胞；ヒト前駆細胞；肝細胞、腎細胞、軟骨細胞、血管細胞および脂肪細胞などの組織から調製する初代細胞；ＭＤＣＫ細胞、ＨＥＫ２９３細胞およびＣＨＯ細胞などの生物医薬品（医薬品用タンパク質）の生産細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0087] 本発明の培地組成物を用いると、高い密度で接着細胞を培養することができ、また細胞及び／又は組織を効率よく増殖することが可能なので、本発明の培養方法は、インビトロ細胞培養による有用物質の生産に有用である。有用物質を産生する細胞を、本発明の培地組成物中で浮遊培養に付し、培養物中から、有用物質を単離することにより、当該有用物質を得ることが出来る

。有用物質としては、抗体、酵素（ウロキナーゼ等）、ホルモン（インシュリン等）、サイトカイン（インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、コロニー刺激因子、成長因子等）、ワクチンの抗原、その他の生理活性物質（タンパク質、ペプチド等）を挙げることができるが、これらに限定されない。有用物質を産生する細胞には、皮膚細胞、軟骨細胞、肝細胞、膵臓細胞、腎細胞等の非形質転換細胞や、有用物質をコードする遺伝子や有用物質の生合成に関与する遺伝子を導入した形質転換細胞が含まれる。有用物質を産生する細胞は、接着細胞であっても浮遊細胞であってもよいが、好ましくは接着細胞である。有用物質を産生する細胞は、好適には、有用物質を細胞外へ分泌する細胞である。有用物質を産生する細胞としては、具体的には、有用物質をコードする遺伝子や有用物質の生合成に関与する遺伝子を導入した、ＨＥＫ２９３，ＣＨＯ－Ｋ１、ＢＨＫ－２１、ＭＤＣＫ、Ｖｅｒｏ、ＨｅｐＧ２、ＭＣＦ－７等を挙げることができるが、これらに限定されない。組み換えタンパク質等の有用物質の生産に使用される細胞は当業者に周知であり、これらの細胞を本発明の方法において用いることが出来る。培養スケールの拡大に際しては、上記本発明の継代培養方法を用いて、培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、新鮮な本発明の培地組成物を培養後の培養物に添加するか、新鮮な本発明の培地組成物へ、培養後の培養物の全部又は一部を添加してもよい。有用物質を培養物から単離するにあたり、培養物から細胞を除く必要があるが、本発明の培地組成物は、ナノファイバーの添加により実質的に粘度が高められておらず、また細胞が培地組成物中に浮遊しているので、遠心分離やろ過処理等の簡便な方法で細胞を除去することができる。また、培地組成物中のナノファイバーも、遠心分離やろ過処理等の簡便な方法で除去することができる。有用物質を培養物から単離する方法は、当業者に周知であり、例えばクロマトグラフィー（例、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー）等の、生理活性物質の生化学的な分離精製方法を適用可能である。

[0088] 本発明の培養方法を用いて細胞及び／又は組織を培養する際には、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器材を用いて培養することが可能である。これらの培養器材の材質は特に制限されないが、例えば、ガラス、ポリ塩化ビニル、セルロース系ポリマー、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリエステル、ポリアミド、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック等が挙げられる。また、これらのプラスチックに対して種々の表面処理（例えば、プラズマ処理、コロナ処理等）を施してもよい。更に、これらの培養器材に対しては、予め細胞外マトリックスや細胞接着分子などをコーティングしてもよい。このようなコーティング材料としては、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－１乃至１２、ニトジェン、テネイシン，トロンボスポンジン，フォンビルブランド（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｅｂｒａｎｄ）因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、デスモコリン、デスモグレイン、各種インテグリン、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｌ－セレクチン、免疫グロブリン、ヒアルロン酸、スーパーファミリー、マトリゲル、ポリ－Ｄ－リジン、ポリ－Ｌ－リジン、キチン、キトサン、セファロース、アルギン酸ゲル、ハイドロゲル、さらにこれらの切断断片などが挙げられる。これらのコーティング材料は、遺伝子組換え技術によりアミノ酸配列を人為的に改変させたものも使用することできる。また、細胞及び／又は組織の培養器材に対する接着を阻害するためのコーティング材料を用いることもできる。このようなコーティング材料としては、シリコン、ポリ（２－ヒドロキシメチルメタクリレート）、ポリ（２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）等が挙げられるが、これらに限られるわけではない。

[0089] 細胞及び／又は組織の培養は、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。これらの装置を用いて培養の途中に新しい培地を補給し、要求する物質を過不足なく細胞及び／又は組織に供給する手法として、流加培養、連続培養及び灌流培養があるが、いずれの手法も本発明の培養方法に用いることができる。

[0090] 本発明の方法で培養する細胞及び／又は組織の形態や状態は、当業者が任意に選択することができる。その好ましい具体例としては、特に制限されるものではないが、細胞及び／又は組織が単独で培地組成物中に分散した状態、細胞及び／又は組織が担体表面上に接着した状態、細胞及び／又は組織が担体内部に包埋した状態、複数個の細胞が集合し細胞塊（スフェア）を形成した状態、或いは２種以上の細胞が集合して細胞塊（スフェア）を形成した状態等が、より好ましくは細胞及び／又は組織が担体表面上に接着した状態、細胞及び／又は組織が担体内部に包埋した状態、複数個の細胞が集合し細胞塊（スフェア）を形成した状態、或いは２種以上の細胞が集合して細胞塊（スフェア）を形成した状態が、さらに好ましくは細胞及び／又は組織が担体表面上に接着した状態、複数個の細胞が集合し細胞塊（スフェア）を形成した状態、或いは２種以上の細胞が集合して細胞塊（スフェア）を形成した状態が挙げられる。これらの状態の内、細胞塊（スフェア）を形成した状態は、生体内環境に近い細胞－細胞間相互作用及び細胞構造体が再構築されており、細胞機能を長期的に維持したまま培養でき、また細胞の回収が比較的容易であるため、本発明の方法で培養する最も好ましい状態として挙げることができる。

[0091] 細胞及び／又は組織を表面上に担持させる担体としては、種々の高分子から構成されたマイクロキャリアやガラスビーズ、セラミックスビーズ等が挙げられる。当該高分子の例としては、ビニル樹脂、ウレタン樹脂、エポキシ樹脂、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートポリエステル、ポリアミド

、ポリイミド、シリコン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、ユリア樹脂、アニリン樹脂、アイオノマー樹脂、ポリカーボネート、コラーゲン、デキストラン、ゼラチン、セルロース、アルギン酸塩及びこれらの混合物等が使用できる。当該担体は、細胞の接着を高める、或いは細胞からの物質の放出を高める化合物でコートされてもよい。この様なコーティング材料の例としては、ポリ（モノステアロイルグリセリドコハク酸）、ポリ－Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド、ヒアルロン酸ナトリウム、ｎ－イソプロピルアクリルアミド、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－１乃至１２、ニトジェン、テネイシン、トロンボスポンジン、フォンビルブランド（ｖｏｎ　Ｗｉｌｌｅｂｒａｎｄ）因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、デスモコリン、デスモグレイン、各種インテグリン、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｌ－セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリー、マトリゲル、ポリ－Ｄ－リジン、ポリ－Ｌ－リジン、キチン、キトサン、セファロース、アルギン酸ゲル、各種ハイドロゲル、さらにこれらの切断断片などが挙げられる。この際、２種以上のコーティング材料を組みわせても良い。また更に、細胞及び／又は組織を表面上に担持した担体の培養に用いられる培地に対して、グァーガム、タマリンドガム、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム、タマリンドガム、メチルセルロース等の多糖類を１種以上混合することができる。また、当該担体は、磁性体材料、例えばフェライトを含有していてもよい。当該担体の直径は数１０μｍから数１００μｍ、より好ましくは１００μｍから２００μｍであり、その比重は、１に近いことが好ましく、より好ましくは０．９～１．２、特に好ましくは約１．０である。当該担体の例としては、これに限られるものではないが、Ｃｙｔｏｄｅｘ１（登録商標）、Ｃｙｔｏｄｅｘ ３（登録商標）、Ｃｙｔｏｌｉｎｅ１（登録商標）、Ｃｙｔｏｌｉｎｅ２（登録商標）、Ｃｙｔｏｐｏｒｅ１（登録商標）、Ｃｙｔｏｐｏｒｅ２（登録商標）、（以上、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｂｉｏｓｉｌｏｎ（登録

商標）（ＮＵＮＣ）、Ｃｕｌｔｉｓｐｈｅｒ－Ｇ（登録商標）、Ｃｕｌｔｉｓｐｈｅｒ－Ｓ（登録商標）（以上、Ｔｈｅｒｍｏ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）、ＨＩＬＬＥＸＣＴ（登録商標）、ＰｒｏＮｅｃｔｉｎＦ－ＣＯＡＴＥＤ（登録商標）、及びＨＩＬＬＥＸＩＩ（登録商標）（ＳｏｌｏＨｉｌｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ）等が挙げられる。当該担体は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌等が挙げられる。当該担体を用いて動物細胞を培養する方法としては特に制限はなく、通常の流動層型培養槽又は充填層型培養槽を用いる培養方法等を用いることができる。この際、細胞及び／又は組織を表面上に担持させた担体は、本発明のナノファイバーを含有する培地組成物を用いることにより振とう等の操作を行わずに均一に分散することができるため、目的とする細胞及び／又は組織を細胞機能の損失無く培養することができる。本法により培養された細胞及び／又は組織は、培養後に担体に担持させたまま遠心やろ過処理を行うことにより、回収することができる。この際、用いた液体培地を加えた後、遠心やろ過処理を行ってもよい。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。また、担体中にフェライト等の磁性を有する材料を内包させておけば、磁力により培養した担体を回収することができる。本法により培養された細胞及び／又は組織は、各種キレート剤、熱処理や酵素を用いて担体から剥離することにより回収することができる。

[0092] 細胞及び／又は組織を担体内部に包埋する際、種々の高分子から構成された材料を当該担体として選択することができる。この様な高分子の例としては、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸塩、キトサン、アガロース、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、フィブリン接着剤、ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン、ポリウレタンフォーム等のスポンジ、ＤｓｅＡ－３Ｄ（登録商標）、ポリＮ－置換アクリルアミド

誘導体、ポリＮ－置換メタアクリルアミド誘導体およびこれらの共重合体、ポリビニルメチルエーテル、ポリプロピレンオキサイド、ポリエチレンオキサイド、ポリビニルアルコール部分酢化物等の温度感受性高分子、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、メチルセルロース、ニトロセルロース、セルロースブチレート、ポリエチレンオキシド、ｐｏｌｙ（２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ）／ｐｏｌｙｃａｐｒｏｌａｃｔｏｎｅ等のハイドロゲルが挙げられる。また、これらの高分子を２種以上用いて細胞を包埋するための担体を作製することも可能である。更に、当該担体には、これらの高分子以外に生理活性物質を有していても良い。この生理活性物質の例としては、細胞増殖因子、分化誘導因子、細胞接着因子、抗体、酵素、サイトカイン、ホルモン、レクチン、又は細胞外マトリックス等が挙げられ、これらを複数含有させることも可能である。また更に、細胞及び／又は組織を包埋した担体の培養に用いられる培地に対して、グァーガム、タマリンドガム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム、メチルセルロース等の増粘剤を１種以上混合することができる。

[0093] これらの担体に細胞及び／又は組織を包埋させる方法は特に制限されないが、例えば、細胞と前記高分子の混液をシリンジに吸引し、２５Ｇ～１９Ｇ程度の注射針を介して培地中に滴下する、あるいはマイクロピペットを用いて培地中に滴下するなどの方法を用いても良い。ここで形成されるビーズ状担体のサイズは、細胞と前記高分子混合液を滴下する際に用いる器具先端の形状により決定され、好ましくは数１０μｍから数１０００μｍ、より好ましくは１００μｍから２０００μｍである。ビーズ状担体で培養できる細胞数は特に制限されないが、このビーズサイズに合わせて自由に選択すれば良い。例えば、直径約２０００μｍのビーズ状担体の場合、５００万個までの細胞をこのサイズのビーズ状担体中に包埋することができる。また、細胞は担体内にて一つずつ分散していても、複数個の細胞が集合した細胞塊を形成していても良い。この際、細胞及び／又は組織を包埋させた担体は、本発明

のナノファイバーを含有する培地組成物を用いることにより撹拌等の操作を行わずに均一に分散することができるため、目的とする細胞及び／又は組織を細胞機能の損失無く培養することができる。本法により培養された細胞及び／又は組織は、培養後に担体に包埋した状態で遠心やろ過処理を行うことにより、回収することができる。この際、用いた液体培地を加えた後、遠心やろ過処理を行ってもよい。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。本法により培養された細胞及び／又は組織は、各種キレート剤、熱や酵素等の処理を用いて担体を分解することにより分散させ、回収することができる。

[0094] 細胞凝集塊（スフェア）を形成させる方法は、特に制限は無く、当業者が適宜選択することができる。その例としては、細胞非接着表面を有する容器を用いた方法、ハンギングドロップ法、旋回培養法、３次元スキャフォールド法、遠心法、電場や磁場による凝集を用いた方法等が挙げられる。例えば、細胞非接着表面を有する容器を用いた方法については、目的の細胞を、細胞接着を阻害する表面処理を施した培養容器中にて培養し、スフェアを形成させることができる。この細胞非接着性培養容器を使用する場合は、まず、目的の細胞を採取した後にその細胞浮遊液を調製し、当該培養容器中に播種して培養を行なう。一週間ほど培養を続けると、細胞は自発的にスフェアを形成する。このとき用いる細胞非接着性表面としては、一般に用いられるシャーレなどの培養容器の表面に、細胞接着を阻害する物質をコートしたものなどを用いることができる。このような物質としては、アガロース、寒天、ポリ－ＨＥＭＡ（ポリ－（２－ハイドロキシ－エチルメタクリレート））２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンと他のモノマー（例えばブチルメタクリレート等）との共重合体などが挙げられるが、細胞毒性がなければ、これらに限定されるものではない。

[0095] また、細胞凝集塊（スフェア）を形成させる方法として、ＮＡＴＵＲＥ ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，ＶＯＬ．２８，ＮＯ．４，ＡＰＲＩＬ ２０

１０，３６１－３６６、ＮＡＴＵＲＥ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ，ＶＯＬ．６，ＮＯ．５，２０１１，６８９－７００、ＮＡＴＵＲＥ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ，ＶＯＬ．６，ＮＯ．５，２０１１，５７２－５７９、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，７，２０１１，９７－１１１、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｖ ａｎｄ Ｒｅｐ，６，２０１０，２４８－２５９等に記載された方法を用いることもできる。

また、スフェアを形成させる培養の際に用いる培地中に、スフェアの形成を早める、或いはその維持を促進する成分を含有させることもできる。このような効果を有する成分の例としては、ジメチルスルホキシド、スーパーオキシドジムスターゼ、セルロプラスミン、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、Ｌ－アスコルビン酸、Ｌ－アスコルビン酸リン酸エステル、トコフェロール、フラボノイド、尿酸、ビリルビン、含セレン化合物、トランスフェリン、不飽和脂肪酸、アルブミン、テオフィリン、フォルスコリン、グルカゴン、ヂブチルリルｃＡＭＰ、Ｙ２７６３２、Ｆａｓｕｄｉｌ（ＨＡ１０７７）、Ｈ－１１５２、Ｗｆ－５３６等のＲＯＣＫ阻害剤などを挙げることができる。含セレン化合物としては、亜セレン酸ナトリウム、セレン酸ナトリウム、ジメチルセレニド、セレン化水素、セレノメチオニン、Ｓｅ－ メチルセレノシステイン、セレノシスタチオニン、セレノシステイン、セレノホモシステイン、アデノシン－５’－ホスホセレン酸、Ｓｅ－アデノシルセレノメチオニンが挙げられる。また、目的とするサイズの均一な細胞凝集塊を得るためには、使用する細胞非付着性培養容器上に、目的とする細胞凝集塊と同一径の複数の凹みを導入することもできる。これらの凹みが互いに接しているか、あるいは目的とする細胞凝集塊の直径の範囲内であれば、細胞を播種した際、播種した細胞は凹みと凹みの間で細胞凝集塊を形成することなく、確実に凹みの中でその容積に応じた大きさの細胞凝集塊を形成し、均一サイズの細胞凝集塊集団を得ることができる。この際の凹みの形状としては半球または円錐上が好ましい。

[0096] あるいは、細胞接着性を有する支持体を基にスフェアを形成させることも

できる。この様な支持体の例としては、コラーゲン、ポリロタキサン、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリ乳酸グリコール酸共重合体（ＰＬＧＡ）、ハイドロゲル等を挙げることができる。

また、フィーダー細胞と共培養することにより、スフェアを形成させることもできる。スフェア形成を促進させるためのフィーダー細胞としては、如何なる接着性細胞でも用いることが可能であるが、好適には各種細胞に応じたフィーダー細胞が望ましい。限定されるものではないが、例えば肝臓や軟骨由来の細胞のスフェアを形成させる場合、そのフィーダー細胞の例としてはＣＯＳ－１細胞や血管内皮細胞が好適な細胞種として挙げられる。

さらに、本発明のナノファイバーを含有する培養組成物を用いてスフェアを形成させることもできる。その際、当該ナノファイバーの濃度が、細胞の浮遊培養（好ましくは浮遊静置培養）を可能とする濃度となるように、当該ナノファイバーをスフェア形成の際に用いる培地中に添加すれば良い。例えば、当該ナノファイバーの濃度が、通常０．０００１％乃至１．０％（重量／容量）、例えば０．０００５％乃至１．０％（重量／容量）、好ましくは０．００１％乃至０．３％（重量／容量）、より好ましくは０．００５％乃至０．１％（重量／容量）、さらに好ましくは０．０１％乃至０．０５％（重量／容量）となるように、当該ナノファイバーをスフェア形成の際に用いる培地中に添加すれば良い。スフェアは、当該ナノファイバーを含む培地中に目的とする細胞を均一に分散させ、３日間乃至１０日間静置して培養することにより調製される。ここで調製されたスフェアは、遠心やろ過処理を行うことにより、回収することができる。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。また、目的とする細胞に特異的に結合する抗体を表面上にコーティングした磁性微粒子を用いて、磁力により培養したスフェアを回収することができる。この様な磁性微粒子の例としては、ダイナビーズ（ヴェリタス社製）、ＭＡＣＳマイクロビーズ（ミルテニーバイオテク社製）、ＢｉｏＭａ

ｇ（テクノケミカル社製）等が挙げられる。

[0097] スフェアの大きさは、細胞種及び培養期間によって異なり特に限定されないが、球形状或いは楕円球形状であるとした際には２０μｍ乃至１０００μｍ、好ましくは４０μｍ乃至５００μｍ、より好ましくは５０μｍ乃至３００μｍの直径を有する。

このようなスフェアは、そのまま静置培養を続けることでも１０日以上、好ましくは１３日以上、さらに好ましくは３０日以上の期間において増殖能を保持し得るが、さらに静置培養中に定期的に機械的分割を行うことで、またはさらに単細胞化処理と凝集を行うことで、実質的に無期限に増殖能を保持し得る。

スフェアの培養に用いられる培養容器は、一般的に動物細胞の培養が可能なものであれば特に限定されないが、例えば、フラスコ、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、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトル等が挙げられる。

スフェアの静置培養に用いられる培地は、細胞接着因子を含むことが可能であり、その例としては、マトリゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ポリ－Ｌ－リジン、ポリ－Ｄ－リジン、ラミニン、フィブロネクチンが挙げられる。これらの細胞接着因子は、２種類以上を組み合わせて添加することもできる。また更に、スフェアの培養に用いられる培地に対してグァーガム、タマリンドガム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、ローカストビーンガム、アラビアガム、タラガム、メチルセルロース等の増粘剤を更に混合することができる。

本発明のナノファイバーを含有する培地組成物を用いることにより、振とう等の操作を行わずに均一に培養液中に分散することができるため、目的とする細胞及び／又は組織を細胞機能の損失無くスフェアとして培養することができる。本法により静置培養されたスフェアは、培養後に遠心やろ過処理

を行うことにより、回収することができる。この際、用いた液体培地を加えた後、遠心やろ過処理を行ってもよい。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。また、目的とする細胞に特異的に結合する抗体を表面上にコーティングした磁性微粒子を用いて、磁力により培養したスフェアを回収することができる。この様な磁性微粒子の例としては、ダイナビーズ（ヴェリタス社製）、ＭＡＣＳマイクロビーズ（ミルテニーバイオテク社製）、ＢｉｏＭａｇ（テクノケミカル社製）等が挙げられる。回収されたスフェアは、更に各種キレート剤、熱、フィルターや酵素等の処理を用いて解すことにより単一な細胞として分散させることができる。

[0098] 植物由来の細胞及び／又は組織を静置培養する際の方法として、分化していない植物細胞塊であるカルスを培養することができる。カルスの誘導は、使用する植物種についてそれぞれ公知の方法により行うことができる。例えば、分化した植物体の一部の組織（例えば、根、茎、葉の切片、種子、生長点、胚、花粉等）表面を、必要に応じて７０％アルコールや１％次亜塩素酸ナトリウム溶液等を用いて滅菌した後、メス等を用いて適当な大きさの組織片（例えば、約１～約５ｍｍ角の根切片）を切り出し、クリーンベンチ等を用いた無菌操作により、当該組織片を予め滅菌したカルス誘導培地に播種して適当な条件下で無菌培養する。ここで誘導されたカルスは、すぐに大量増殖のために液体培養に付されてもよいし、あるいは継代用培地で継代培養することにより種株として維持することもできる。継代培養は、液体培地及び固形培地のいずれを用いて行ってもよい。

本発明の培地組成物を用いて静置培養を開始する際に接種される植物細胞塊の量は、目的の細胞の増殖速度、培養様式（回分培養、流加培養、連続培養等）、培養期間などに応じて変動するが、例えば、カルス等の植物細胞塊を培養する場合、本発明の培地組成物に対する細胞塊の湿重量が４～８（重量／容積（ｗ／ｖ））％、好ましくは５～７（ｗ／ｖ）％となるように本発

明の培地組成物に接種される。培養の際の植物細胞塊の粒径は３ｍｍ乃至４０ｍｍ、好ましくは３ｍｍ乃至２０ｍｍ、より好ましくは５ｍｍ乃至１５ｍｍである。ここで「粒径」とは、例えば植物細胞塊が球形である場合はその直径を意味し、楕円球形である場合にはその長径を意味し、その他の形状においても同様にとり得る最大長を意味する。

[0099] 細胞及び／又は組織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℃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。培養期間は通常３乃至３５日間であるが、培養の目的に合わせて自由に設定すればよい。植物細胞の培養温度は、通常２０乃至３０℃であり、光が必要であれば照度２０００～８０００ルクスの照度条件下にて培養すればよい。培養期間は通常３乃至７０日間であるが、培養の目的に合わせて自由に設定すればよい。

[0100] 本発明の方法で細胞及び／又は組織を培養する際には、本発明の培養組成物に対して別途調製した細胞及び／又は組織を添加し、均一に分散される様に混合すればよい。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。混合後は培養液を静置状態にしてもよいし、必要に応じて培養液を回転、振とう或いは撹拌してもよい。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。また、静置培養の期間において培地組成物の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及び／又は組織と培地組成物を分離した後、新しい培地組成物を細胞及び／又は組織に添加すればよい。或いは、遠心やろ過処理を行うことにより細胞及び／又は組織を適宜濃縮した後、新しい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。また、目的とする細胞に特異的に結合する抗体を

表面上にコーティングした磁性微粒子を用いて、磁力により培養した細胞及び／又は組織を分離することができる。この様な磁性微粒子の例としては、ダイナビーズ（ヴェリタス社製）、ＭＡＣＳマイクロビーズ（ミルテニーバイオテク社製）、ＢｉｏＭａｇ（テクノケミカル社製）等が挙げられる。これらの培地組成物の交換は、機械的な制御下のもと閉鎖環境下で実行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。

[0101] ［細胞又は組織の保存又は輸送方法］

また、本発明は、上記本発明の培地組成物を用いた、細胞または組織を保存する保存方法および輸送方法を提供する。本発明の保存又は輸送方法においては、本発明の培地組成物を用いることにより、細胞や組織を浮遊状態で（好ましくは、浮遊静置状態で）、保存又は輸送することができる。

[0102] 保存又は輸送の対象となる細胞及び組織としては、本発明の培地組成物を用いた培養に用いることができる細胞や組織として上述したものを挙げることが出来る。

[0103] 保存又は輸送に用いる本発明の培地組成物には、上述の組成に加えて、細胞や組織の非凍結状態での保存の際に、細胞延命効果がある各種成分が含まれていてもよい。該成分としては、糖類（但し、多糖類を除く）（例、単糖類、二糖類）、抗酸化剤（例、ＳＯＤ、ビタミンEまたはグルタチオン）、親水性ポリマー（例、ポリビニルピロリドン）、キレート剤（例、ＥＤＴＡ）、糖アルコール（例、マンニトール、ソルビトール）、グリセロール等を挙げることが出来る。

[0104] 本発明の保存又は輸送方法においては、所望の細胞又は組織を、本発明の培地組成物中に分散した上で、密封可能な容器中に入れる。該容器としては、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、チューブ、培養バック等を挙げることが出来るが、これらに限定されない。保存又は輸送中に、内容物の漏れや外界からの細菌等のコンタミネーションを回避するため、細胞や組織の本発明の培地組成物中の分散物を入れた容器は、好適には密封される。

[0105] 保存又は輸送中の温度は、細胞又は組織の生存が維持される限り特に限定されないが、通常は、３７℃以下である。温度が低い方が、保存又は輸送中の細胞又は組織の生存性の低下を回避することができるが、細胞又は組織が凍結してしまわないよう、通常、本発明の培地組成物の融点を上回る温度で保存又は輸送する。従って、保存又は輸送中の温度は、通常－５～４２℃、好ましくは１～３７℃、より好ましくは４～３２℃、更に好ましくは１８～３０℃で維持される。

[0106] 浮遊静置状態での、細胞又は組織の保存又は輸送を可能とするため、保存又は輸送中の温度は、本発明の培地組成物が、細胞又は組織の浮遊静置を可能とする温度であることが好ましい。細胞又は組織の浮遊静置を可能とする温度は、ナノファイバーを構成する原料の種類に応じて適宜設定することができる。

[0107] 一態様において、本発明の保存又は輸送方法において用いる、本発明の培地組成物中に含有されるナノファイバーを構成する原料として、カラギーナン（好ましくは、κ－カラギーナン）が用いられる。カラギーナンから構成されたナノファイバーを含有する本発明の培地組成物は、２５℃以下において浮遊作用を有する一方、３７℃では浮遊作用を失うため、２５℃以下（好ましくは０～２５℃）にて、所望の細胞又は組織を浮遊静置状態で保存又は輸送し、保存又は輸送の完了後、温度を３７℃以上（例えば、３７～４０℃、好ましくは３７℃）とすることにより、浮遊していた細胞又は組織を沈降させることにより、容易に細胞又は組織を回収することができる。

[0108] 保存又は輸送の期間は、本発明の培地組成物中で細胞又は組織を生存状態のまま維持できる範囲内で特に限定されないが、通常１時間以上、１０日以内、好ましくは１～８日、より好ましくは１～３日である。保存又は輸送期間中、細胞又は組織は本発明の培地組成物中で浮遊静置状態が維持されることが好ましい。

[0109] 本発明の保存又は輸送方法を用いると、細胞や組織を浮遊した状態で保持できるため、輸送中の振動によるプレートからの剥離や、沈降により接触し

た細胞や組織同士の凝集による細胞や組織のダメージを回避し、本来の機能を維持した状態で細胞や組織を保存および輸送することができる。

実施例

[0110] 以下に本発明の培地組成物の実施例を具体的に述べることで、本発明をさらに詳しく説明する。以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容及び処理手順は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例に解釈されるべきものではない。

[0111] 参考例１　高温加熱処理した脱アシル化ジェランガムを含む培地の粘度測定及び細胞浮遊試験

脱アシル化ジェランガム含有培地の調製及び粘度測定

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．４％（ｗ／ｖ）となるように純水に懸濁させた後、９０℃にて加熱攪拌し溶解させた。本水溶液を攪拌しながら室温まで放冷し、１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。３００ｍＬトールビーカーに２倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ａｌｄｒｉｃｈ社製）５０ｍＬと滅菌水４７．５ｍＬを入れ、室温でホモミキサー（３０００ｒｐｍ）で攪拌しながら脱アシル化ジェランガム水溶液２．５ｍＬを添加し、そのまま１分攪拌を続けることで脱アシル化ジェランガム終濃度０．０１％培地組成物を調製した。同様に終濃度が０．０２、０．０３、０．０５％（ｗ／ｖ）となるよう脱アシル化ジェランガム水溶液を添加した培地組成物を調製した。本培地組成物の粘度は３７℃条件下でＥ型粘度計（東機産業株式会社製、Ｖｉｓｃｏｍｅｔｅｒ　ＴＶＥ－２２Ｌ、標準ロータ１°３４’×Ｒ２４）を用いて、回転数１００ｒｐｍで５分間測定した。

[0112] 脱アシル化ジェランガム含有培地の細胞浮遊試験

ヒト子宮頸癌細胞株ＨｅＬａ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に２５００００個／ｍＬとなるように懸濁し、本懸濁液１０ｍＬをＥＺ　ＳＰＨＥ

ＲＥ（旭硝子社製）に播種した後、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で３日間培養した。ここで得られたスフェア（直径１００～２００μｍ）の懸濁液１０ｍＬを遠心処理（２００Ｇ、５分間）してスフェアを沈降させ、上清を除くことによりスフェア懸濁液１．０ｍＬを調製した。引き続き、上記で調製した脱アシル化ジェランガム含有培地を１．５ｍＬエッペンドルフチューブに１．０ｍＬずつ入れ、更にＨｅＬａ細胞スフェア懸濁液１０μＬを加えた。タッピングにより細胞塊を分散させ、３７℃でインキュベートし、１時間後の細胞の分散状態を目視にて観察した。

[0113] [表1]

脱アシル化ジェランガム濃度 ％（ｗ／ｖ）	状態	粘度 （ｍＰａ・ｓ）	HeLa 細胞 浮遊／沈殿
０．０１	液状	１．３１	浮遊
０．０２	液状	１．９２	浮遊
０．０３	液状	２．３８	浮遊
０．０５	液状	３．３４	浮遊

[0114] 参考比較例　メチルセルロース、コラーゲン含有培地の調製

メチルセルロース含有培地の調製

２００ｍＬナスフラスコにＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ａｌｄｒｉｃｈ社製）１００ｍＬを入れ、メチルセルロース（Ｍ０３８７、Ａｌｄｒｉｃｈ社製）０．１ｇを加えた。氷浴にて冷却しながら攪拌し、メチルセルロースを溶解させた。本溶液を用いて終濃度が０．１、０．３、０．６、１．０％（ｗ／ｖ）となるようメチルセルロース水溶液を添加した培地組成物を調製した。

コラーゲン含有培地の調製

０．３％セルマトリックスタイプＩ－Ａ（新田ゼラチン社製）６．５ｍＬに１０倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ａｌｄｒｉｃｈ社製）１ｍＬ、再構成用緩衝液（新田ゼラチン社製）１ｍＬ及び純水１．５ｍＬを入れ、氷中にて撹拌しながら０．２％のコラーゲン含有培地を調製した。同様に、終濃度が０．０１、０．０５、０．１、０．２％（ｗ／ｖ）となるようコラーゲ

ンを添加した培地組成物を調製した。

上記で調製した培地組成物についても脱アシル化ジェランガム含有培地と同様にＨｅＬａ細胞スフェアの浮遊試験および粘度測定を実施した。ただし、１．０％（ｗ／ｖ）メチルセルロースの粘度は、装置の測定範囲より５０ｒｐｍにて測定した。

[0115] [表2]

メチルセルロース濃度 %（w／v）	状態	粘度 （mＰａ・ｓ）	HeLa 細胞 浮遊／沈殿
０．１	液状	２．３１	沈殿
０．３	液状	８．１５	沈殿
０．６	液状	１３．０	沈殿
１．０	液状	４８．２	沈殿

[0116] [表3]

コラーゲン濃度 %（w／v）	状態	粘度 （mＰａ・ｓ）	HeLa 細胞 浮遊／沈殿
０．０１	液状	１．１８	沈殿
０．０５	液状／固体（ゲル）	測定不能	浮遊
０．１	固体（ゲル）	測定不能	浮遊
０．２	固体（ゲル）	測定不能	浮遊

[0117] 参考試験例

以下の参考試験例では、CO_2インキュベーターにおけるCO_2の濃度（％）は、雰囲気中のCO_2の体積％で示した。また、ＰＢＳはリン酸緩衝生理食塩水（シグマアルドリッチジャパン社製）を意味し、ＦＢＳは牛胎児血清（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ社製）を意味する。また、（ｗ／ｖ）は、１体積あたりの重量を表わす。

[0118] 参考試験例１：単一の細胞を分散させた際の細胞増殖試験

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清及び１０ｎｇ／ｍＬのトロンボポエチン（ＷＡＫＯ社製）を含むＩＭ

ＤＭ培地（ギブコ社製）に終濃度０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物を調製した。引き続き、ヒト白血病細胞株ＵＴ７／ＴＰＯを、２００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物に播種した後、６ウェル平底マイクロプレート（コーニング社製）のウェルに１ウェル当たり５ｍＬとなるように分注した。同様に、ヒト子宮頸癌細胞株ＨｅＬａ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、２００００細胞／ｍＬとなるように１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を添加した培地組成物に播種した後、６ウェル平底マイクロプレート（コーニング社製）のウェルに１ウェル当たり５ｍＬとなるように分注した。これらの細胞懸濁液をCO_2インキュベーター（５％CO_2）内にて３日間静置状態で培養した。その後、培養液の一部を回収し、トリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。

[0119] その結果、ＵＴ７／ＴＰＯ細胞及びＨｅＬａ細胞は、上記培地組成物を用いることにより浮遊状態にて均一に培養することが可能であり、当該培地組成物で増殖することが確認された。浮遊静置培養３日間後のＵＴ７／ＴＰＯ細胞及びＨｅＬａ細胞の細胞数を表４に示す。

[0120] [表4]

	ＵＴ７／ＴＰＯ細胞	ＨｅＬａ細胞
細胞数（×１００００／ｍＬ）	３８	４０

[0121] 参考試験例２：細胞株由来スフェアを培養した際の細胞増殖試験

ヒト肝癌細胞株ＨｅｐＧ２（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に２５００００個／ｍＬとなるように懸濁し、本懸濁液１０ｍＬをＥＺ　ＳＰＨＥＲＥ（旭硝子社製）に播種した後、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で７日間培養した。同様に、ヒト子宮頸癌細胞株ＨｅＬａ（ＤＳファーマバイ

オメディカル社製）を、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に２５００００個／ｍＬとなるように懸濁し、本懸濁液１０ｍＬをＥＺ　ＳＰＨＥＲＥ（旭硝子社製）に播種した後、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で７日間培養した。ここで得られたそれぞれの細胞株のスフェア（直径１００～２００μｍ）の懸濁液２．５ｍＬを遠心処理（２００Ｇ、５分間）してスフェアを沈降させ上清を除いた。引き続き、本スフェア（約８００個）に上記培地１０ｍＬを添加して懸濁した後、平底チューブ（ＢＭ機器社製）に移した。同様に、上記培地に０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を添加した培地組成物を用いてスフェアの懸濁液を作成し、平底チューブ（ＢＭ機器社製）に移した。なお、０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物は、まず脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した後、１／２０希釈で１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地に添加することにより調製した。

[0122] ３７℃で３日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で上記スフェア懸濁液を静置培養した後、２倍容量の培地を添加して遠心処理（２００Ｇ、５分間）を行うことによりスフェアを沈降させ、上清を除いた。ここで、スフェアの一部を分取し、光学顕微鏡（ＯＬＹＭＰＵＳ社製、ＣＫ３０－Ｆ１００）にてその形状を観察した。引き続き、回収したスフェアをＰＢＳ１０ｍＬにて１回洗浄した後、１ｍＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。上記培地を９ｍＬ添加した後、遠心処理（２００Ｇ、５分間）により細胞を回収した。ここで得られた細胞懸濁液２ｍＬの一部に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞及び死細胞の数を測定した。

[0123] その結果、ＨｅｐＧ２細胞及びＨｅＬａ細胞のスフェアは上記培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、既存の培地と比べて細胞を増殖させた際に死細胞の割合が少なく、細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。この際、既存の培地で培養したスフェアは培養容器の底面に沈降していた。更に、培養したスフェアの形状を光学顕微鏡にて観察したところ、該培地組成物ではスフェア同士の会合が見られないのに対し、既存の培地ではスフェア同士の会合が観察された。

ＨｅｐＧ２細胞及びＨｅＬａ細胞に関して、脱アシル化ジェランガムを含まない培地にて培養した際の細胞数を１としたときの相対的細胞数を表５に示す。また、脱アシル化ジェランガムを含まない培地で培養した際の死細胞率（死細胞数／生細胞数）を１としたときの相対的死細胞率を表６に示す。また、ＨｅｐＧ２細胞及びＨｅＬａ細胞のスフェアを該培地組成物で培養した際の浮遊状態を図１及び図２にそれぞれ示す。さらに、培養したＨｅＬａ細胞のスフェアの形状を図３に示す。

[0124] [表5]

脱アシル化ジェランガム		ＨｅｐＧ２細胞	ＨｅＬａ細胞
無	相対的細胞数	１．０	１．０
有	相対的細胞数	１．７	１．５

[0125] [表6]

脱アシル化ジェランガム		ＨｅｐＧ２細胞	ＨｅＬａ細胞
無	相対的死細胞率	１．０	１．０
有	相対的死細胞率	０．５	０．５

[0126] 参考試験例３：マイクロキャリア上に付着した細胞株を培養した際の細胞増殖試験

マイクロキャリアＣｙｔｏｄｅｘ（登録商標）１（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）をＰＢＳに０．０２ｇ／ｍＬとなるように懸濁し１晩静置後、上清を捨てて新たなＰＢＳで本マイクロキャリアを２回洗浄した。その後、再度ＰＢＳで０．０２ｇ／ｍＬとなるように懸

濁し、１２１℃、２０分間オートクレーブ滅菌した。引き続き、本マイクロキャリアを７０％エタノールにて２回、ＰＢＳにて３回洗浄した後、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）にて０．０２ｇ／ｍＬとなるように懸濁した。本マイクロキャリア懸濁液を用いて、１２０ｍｇのＣｙｔｏｄｅｘ（登録商標）１及び４０００００個のＨｅｐＧ２細胞を含むＤＭＥＭ培地（１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清含有）２０ｍＬを調製し、本細胞懸濁液を予めシリコンコーティング剤（旭テクノグラス社製）で処理したビーカー中にて３７℃、６時間、スターラーで撹拌（１００ｒｐｍ）しながら培養した。ここで、ＨｅｐＧ２細胞がマイクロキャリアに接着していることを顕微鏡にて確認した。引き続き、細胞が接着したマイクロキャリアを１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地にて２回洗浄し、同培地３ｍＬにて懸濁した。

[0127] １０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地２０ｍＬ或いは本培地に０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を添加した培地組成物に、上記のマイクロキャリア懸濁液３００μＬをそれぞれ添加し、３日間、３７℃にて培養した。この際、脱アシル化ジェランガムを含まない培養液は、スターラーで撹拌（１００ｒｐｍ）しながら培養した。培養後は、顕微鏡にてマイクロキャリア上の細胞の付着状態を確認した後、遠心処理（２００Ｇ、５分間）でマイクロキャリアを沈降させた。ＰＢＳ１０ｍＬで本マイクロキャリアを洗浄した後、１ｍＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。更に、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を９ｍＬ添加した後、メッシュサイズ７０μｍのセルストレーナー（ＢＤファルコン社製）を用いてマイクロキャリアを除去した。ここで得られたろ液から遠心処理（２００Ｇ、５分）により細胞を回収した。本細胞を５００μＬの培地に懸濁し、その一部に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。その結果、脱アシル

化ジェランガムを含まない培養液は１２３，０００個の細胞を含んでいたが、脱アシル化ジェランガムを含む培養液は１，３２０，０００個の細胞を含んでいた。上記のとおり、該特定化合物の構造体を含む培地組成物は、マイクロキャリアを用いて細胞培養を実施しても、既存の培地と比べて細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。該特定化合物の構造体を含む培地組成物を用いてマイクロキャリア培養を３日間実施した際の、ＨｅｐＧ２細胞の付着状態を図４に示す。

[0128] 参考試験例４：細胞株由来スフェアを用いた細胞浮遊試験

キサンタンガム（ＫＥＬＴＲＯＬ　ＣＧ、三晶株式会社製）を１％（ｗ／ｖ）の濃度となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解した。本水溶液を用いて、キサンタンガムについて終濃度が０．１、０．１５、０．２％（ｗ／ｖ）であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。また、０．２％（ｗ／ｖ）のκ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ　ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製）及び０．２％（ｗ／ｖ）のローカストビーンガム（ＧＥＮＵＧＵＭ　ＲＬ－２００－Ｊ、三晶株式会社製）を含む水溶液を９０℃にて加熱することにより調製し、本水溶液を用いて０．０３、０．０４、０．０５％（ｗ／ｖ）のκ－カラギーナンとローカストビーンガムを含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（シグマ社製）組成物を調製した。

[0129] 参考試験例２と同様の方法を用いてＨｅＬａ細胞のスフェアを作成し、上記で調製した培地１ｍＬにそれぞれ数１０個のスフェアを添加した後、１時間３７℃にて静置して、スフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。その結果、ＨｅＬａ細胞のスフェアは、上記の培地組成物全てにおいて浮遊状態にて維持されることを確認した。更に、本細胞懸濁液に等量の培地を添加した後、遠心処理（３００乃至４００Ｇ、５分）によりＨｅＬａ細胞のスフェアが沈降し、回収できることを確認した。ＨｅＬａ細胞のスフェアを該培地組成物にて培養した際の浮遊状態を図５にそれぞれ示す。また、分析例１と同様の方法で測定した粘度を表７、８に示す。

[0130] [表7]

キサンタンガム濃度 %（w／v）	状態	粘度 （mＰａ・ｓ）	HeLa 細胞 浮遊／沈殿
０．１	液状	３．６９	浮遊
０．１６	液状	５．４６	浮遊
０．２	液状	７．２６	浮遊

[0131] [表8]

κ―カラギーナン、ローカストビーンガム濃度 %（w／v）	状態	粘度 （mＰａ・ｓ）	HeLa 細胞 浮遊／沈殿
０．０３	液状	１．３４	浮遊
０．０４	液状	１．５５	浮遊
０．０５	液状	１．９５	浮遊

[0132] 参考試験例５：フィルターろ過した培地組成物を用いた細胞浮遊試験

参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１５％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を含有するＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。引き続き、本培地組成物１ｍＬを７０μｍ、４０μｍのフィルター（ＢＤファルコン社製）、３０μｍ、２０μｍのフィルター（アズワン社製）、１０μｍのフィルター（Ｐａｒｔｅｃ社製）、５μｍ、１．２μｍ、０．４５μｍ、０．２μｍのフィルター（ザルトリウス・ステディム・ジャパン社製）を用いてそれぞれろ過した。参考試験例２と同様の方法を用いて作成したＨｅｐＧ２細胞のスフェアを、上記のろ液に対して約数十個添加した後、１時間３７℃にて静置して、スフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。その結果、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアは、１０μｍ以上のフィルターを透過した培地組成物においては浮遊状態にて維持されるが、５μｍ以下のフィルターを透過した培地組成物においては沈殿することを確認した。更に、ここで浮遊状態にあるＨｅｐＧ２細胞のスフェアは、室温にて３００Ｇ、５分間の遠心処理、或いは等量の培地を加えた後室温にて２００Ｇ、５分間の遠心処理を施すことにより沈降し、回収できることを確認した。

[0133] 参考試験例６：スフェア形成試験

参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１％の脱アシル化ジェランガム

（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）及び１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＥＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）の組成物を調製した。引き続き、ＨｅＬａ細胞を、１０００個／ｍＬの濃度になるように添加した後、２４ウェルプレート（コーニング社製）に分注した。本プレートを９日間、３７℃にて浮遊静置培養した後、スフェアの形成を顕微鏡にて確認した。更に、３００Ｇ、５分間の遠心処理によりスフェア細胞を沈降させ、ＰＢＳ５ｍＬにて１回洗浄した後、１００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液１００μＬに対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地を１００μＬ添加し、その一部の細胞懸濁液に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。その結果、１７００００個／ｍＬまでＨｅＬａ細胞が増えていることが確認された。該培地組成物にて形成したＨｅＬａ細胞のスフェアを図６に示す。

[0134] 参考試験例７：構造体の光学顕微鏡観察

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．４％（ｗ／ｖ）となるように純水に懸濁させた後、９０℃にて加熱攪拌し溶解させた。３００ｍＬトールビーカーに２倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ａｌｄｒｉｃｈ社製）９５ｍＬを入れ、室温でマグネチックスターラーにて攪拌しながら脱アシル化ジェランガム水溶液５ｍＬを添加し、そのまま５分攪拌を続けることで脱アシル化ジェランガム終濃度０．０２％培地組成物を調製した。さらに当培地組成物をホモミキサー（３０００ｒｐｍ）により５分間攪拌した。調製した培地組成物を光学顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ社、ＢＩＯＲＥＶＯ　ＢＺ－９０００）により観察した。観察された構造体を図７に示す。

[0135] 参考試験例８：粉培地とＤＡＧの混合過熱による調製

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）２０ｍｇと、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇ

ｉｅｓ社製）１．５８ｇを２００ｍＬ三角フラスコに入れ、純水１００ｍＬを注いだ。１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌し、脱アシル化ジェランガム濃度が０．０２％であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。調製した培地に、デキストランビーズＣｙｔｏｄｅｘ１（Ｓｉｚｅ　２００μｍ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を添加し、ビーズの分散状態を目視にて確認した。浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した。結果を表９に示す。

[0136] [表9]

脱アシル化ジェランガム濃度 %（w／v）	状態	Ｃｙｔｏｄｅｘ１ 分散
０．０５	液体状	○
０．０２	液体状	○
０．０１	液体状	○

[0137] 参考試験例９：多糖類を混合した培地組成物の調製

キサンタンガム（ＫＥＬＴＲＯＬ　ＣＧ、三晶株式会社製）を０．５％（ｗ／ｖ）の濃度となるように純水に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解した。同様にアルギン酸ナトリウム（ダックアルギン酸ＮＳＰＭ、フードケミファ社製）、ローカストビーンガム（ＧＥＮＵＧＵＭ　ＲＬ－２００－Ｊ、三晶株式会社製）、κ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ　ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製）、ダイユータンガム（ＫＥＬＣＯ　ＣＲＥＴＥ　ＤＧ－Ｆ、三晶株式会社製）について、０．５％（ｗ／ｖ）の水溶液を作製した。

本水溶液と０．２もしくは０．１％（ｗ／ｖ）脱アシル化ジェランガム溶液と１０倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地を混合し、８０℃で３０分過熱した。室温まで放冷した後、７．５％炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、終濃度０．０１、０．０２％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムと終濃度０．１、０．２、０．３、０．４％（ｗ／ｖ）の他の多糖を含有するＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。また、脱アシル化ジェランガムを含む培地を前記同様に調製した後、メチルセルロース（ｃＰ４００、ＷＡＫＯ株式会社製）の粉末を添加した。氷浴にて攪拌し、メチルセルロースを溶解させ

、終濃度０．０１、０．０２％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムと終濃度０．１、０．２、０．３、０．４％（ｗ／ｖ）の他のメチルセルロースを含有するＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。

[0138] 上記にて調製した培地に、ポリスチレンビーズ（Ｓｉｚｅ　５００－６００μｍ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．製）を添加し、ビーズの分散状態を目視にて確認した。浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した。結果を表１０に示す。

[0139] [表10]

脱アシル化ジェランガム濃度 %(w/v)	多糖濃度 %(w/v)	キサンタンガム	アルギン酸Na	ローカストビーンガム	メチルセルロース	κ-カラギーナン	ダイユータンガム
0.01	0.1	○	○	○	×	○	○
	0.2	○	○	○	△/×	固化	未実施
	0.3	○	○	○	△/×	固化	未実施
	0.4	○	○	○	△/×	固化	未実施
0.02	0.1	○	○	○	○/×	○	○
	0.2	○	○	○	○	固化	未実施
	0.3	○	○	○	○	固化	未実施
	0.4	○	○	○	○	固化	未実施

[0140] 参考試験例１０：多糖類を混合した培地組成物の粘度測定

参考試験例９の多糖混合系と同様の方法で、終濃度が０．００５、０．０１％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムと他の多糖を含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地を調製した。多糖は最終濃度がキサンタンガム、アルギン酸ナトリウム、ローカストビーンガムは０．１％（ｗ／ｖ）、メチルセルロースは０．２％（ｗ／ｖ）、κ－カラギーナンとダイユータンガムは０．０５％（ｗ／ｖ）となるように調製した。それぞれの培地組成物の状態と分析例１と同様の方法で測定した粘度を表１１～１６に示す。

[0141] [表11]

キサンタンガム濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.1	0.005	液体状	4.36
0.1	0.010	液体状	4.59

[0142]

[表12]

アルギン酸ナトリウム濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.1	0.005	液体状	1.53
0.1	0.010	液体状	1.75

[0143] [表13]

ローカストビーンガム濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.1	0.005	液体状	1.92
0.1	0.010	液体状	2.36

[0144] [表14]

メチルセルロース濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.2	0.005	液体状	3.36
0.2	0.010	液体状	3.81

[0145] [表15]

κ-カラギーナン濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.05	0.005	液体状	1.04
0.05	0.010	液体状	1.28

[0146] [表16]

ダイユータンガム濃度 % (w/v)	脱アシル化ジェランガム濃度 % (w/v)	状態	粘度 (mPa・s)
0.1	0.005	液体状	2.76
0.1	0.010	液体状	3.04

[0147] 参考試験例１１：２価金属カチオン濃度を変更した培地組成物の調製

塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウムを含まないＤＭＥＭ／Ｆ－１２（Ｄ９７８５、Ａｌｄｒｉｃｈ製）を使用し、参考試験例８の方法と同様に０．０２％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。また、終濃度がＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地の規定量になるよう、塩化カルシウムまたは硫酸マグネシウム、塩化マグ

ネシウムを添加したＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地の規定組成より、それぞれの終濃度は塩化カルシウム０．１１６ｇ／Ｌ、硫酸マグネシウム０．０４９ｇ／Ｌ、塩化マグネシウム０．０６１ｇ／Ｌとした。

調製した培地組成物にデキストランビーズＣｙｔｏｄｅｘ１（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を加え、２日後にビーズの分散を目視にて確認した。浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した。結果を表１７に示す。

[0148] [表17]

脱アシル化ジェランガム濃度 %（w／v）	塩化カルシウム	硫酸マグネシウム 塩化マグネシウム	Ｃｙｔｏｄｅｘ１ 分散
０．０２	＋	＋	○
０．０２	＋	－	○
０．０２	－	＋	△
０．０２	－	－	×

[0149] 参考試験例１２：２価金属カチオンを後添加した培地組成物の調製

０．１％（ｗ／ｖ）脱アシル化ジェランガム溶液と５倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム不含、Ｄ９７８５、Ａｌｄｒｉｃｈ製）、塩化カルシウム１１６７ｍｇ、硫酸マグネシウム４８９ｍｇ、塩化マグネシウム２８７ｍｇを純水３００ｍＬに溶解させた塩溶液を調製した。２００ｍＬのトールビーカーに脱アシル化ジェランガム水溶液と純水を入れ、イカリ型攪拌羽を用いて２００ｒｐｍで溶液を攪拌した。培地液と水を混合したＡ液を添加し、そのまま１０分攪拌した。次いで塩溶液を添加、さらに７．５％炭酸水素ナトリウム水溶液を１．６ｍＬ添加し、終濃度０．０２％の脱アシル化ジェランガムを含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。それぞれの液の混合量を表に示す。調製４時間後に、６本の培地組成物について、ポリスチレンビーズとＣｙｔｏｄｅｘ１の分散評価を行なった。結果を表１８、１９に示す。

[0150]

[表18]

	0．1％（w／v）脱アシル化ジェランガム水溶液	純水	A液		塩溶液
			5倍濃度 DMEM／F－12	純水	塩化カルシウム 塩化マグネシウム 硫酸マグネシウム
1	20mL	10mL	20mL	50mL	なし
2	20mL	10mL	20mL	47mL	3mL
3	20mL	10mL	20mL	40mL	3mL／水7mL
4	20mL	30mL	20mL	30mL	なし
5	20mL	30mL	20mL	27mL	3mL
6	20mL	30mL	20mL	20mL	3mL／水7mL

[0151] [表19]

	脱アシル化ジェランガム濃度％（w／v）	塩溶液	ポリスチレンビーズ分散	Cytodex1分散
1	0．02	－	×	×
2	0．02	＋	○	○
3	0．02	＋	○	○
4	0．02	－	×	×
5	0．02	＋	○	○
6	0．02	＋	○	○

[0152] 参考試験例１３：各種培地組成物の調製

０．１％（ｗ／ｖ）脱アシル化ジェランガム溶液と高濃度の培地液を調製した。高濃度の培地液は１０倍濃度のＭＥＭ（Ｍ０２６８、Ａｌｄｒｉｃｈ製）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｒ６５０４、Ａｌｄｒｉｃｈ製）と５倍濃度のＤＭＥＭ（高圧滅菌対応培地、ニッスイ製）を調製した。０．１％（ｗ／ｖ）脱アシル化ジェランガム溶液と各高濃度培地、濃度調整用の純水を混合し、８０℃で３０分過熱した。室温まで放冷した後、７．５％炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、終濃度０．０１、０．０２、０．０３％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム含有する培地組成物をそれぞれ調製した。

調製した６本の培地組成物について、ポリスチレンビーズとデキストランビーズＣｙｔｏｄｅｘ１の浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した。結果を表２０、２１に示す。

[0153]

[表20]

MEM培地			
脱アシル化ジェランガム濃度 %（w／v）	状態	ポリスチレンビーズ分散	Ｃｙｔｏｄｅｘｌ分散
０．０１	液体状	△	△
０．０２	液体状	○	○
０．０３	液体状	○	○

[0154] [表21]

DMEM培地			
脱アシル化ジェランガム濃度 %（w／v）	状態	ポリスチレンビーズ分散	Ｃｙｔｏｄｅｘｌ分散
０．０１	液体状	△	△
０．０２	液体状	○	○
０．０３	液体状	○	○

[0155] 参考試験例１４：脱アシル化ジェランガムを含む培地組成物の粒度分布測定

参考例１に倣い、０．０３８％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。培地はホモミキサーを用いて３０００ｒｐｍと６０００ｒｐｍにて１分攪拌し調製した。本培地組成物の粒度分布について、ベックマンコールター（株）製Ｍｕｌｔｉｓｉｚｅｒ４（コールター原理による精密粒度分布測定装置）を用いて測定し、体積基準粒度分布のメジアン径（ｄ５０）を求めた。結果を表２２に示す。

[0156] [表22]

培地調製時ホモミキサー回転数	ｄ５０（μｍ）
３０００ｒｐｍ	１．７０９
６０００ｒｐｍ	１．４９９

[0157] 参考試験例１５：脱アシル化ジェランガムのリン酸化

ガラス製の１００ｍＬ試験管に、脱アシル化ジェランガム１ｇと、純水４０ｍＬを秤りとり、１００℃で３０分加熱し、懸濁液を調製した。この懸濁液に、リン酸水溶液（８５％）１gを添加し、５時間加熱還流した。その後、１２時間撹拌しながら、室温まで放冷することで得た白色懸濁液を、９９％

エタノール（５００ｍＬ）に注いだ。生じた綿状の白色固体を、ろ取後、乾燥させることで、脱アシル化ジェランガムのリン酸化物として、淡褐色固体（０．４ｇ）を得た。リン酸基が導入されたことは、フーリエ変換赤外分光分析（株式会社島津製作所製、ＩＲ－Ｐｒｅｓｔａｇｅ２１）によって確認した（１７００ｃｍ－１；Ｐ－ＯＨ、１２９６ｃｍ－１、１２６５ｃｍ－１；Ｐ＝Ｏ）。淡褐色固体をマイクロ波加熱分解装置（ETHOS TC，マイルストーンゼネラル製）によって分解した後に、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)（SPS 5520，SIIナノテクノロジー社製)によってリン原子の含有率を測定した結果、３．５ｗｔ％（ｎ＝２）であった。

[0158] 参考試験例１６：リン酸化した脱アシル化ジェランガムを含む培地組成物の調製

任意量のリン酸化した脱アシル化ジェランガム（３０ｍｇ）と、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（ライフテクノロジーズ社製）１．５６ｇを２００ｍＬ三角フラスコに入れ、純水１００ｍＬを注いだ。１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌し、脱アシル化ジェランガム濃度が０．０３％であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。調製した培地に、デキストランビーズＣｙｔｏｄｅｘ１（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）を添加し、ビーズの分散状態を目視にて確認した。０．０３％（ｗ／ｖ）のリン酸化した脱アシル化ジェランガム濃度において、ビーズの分散状態が認められた。

[0159] 参考試験例１７：脱アシル化ジェランガムを含む培地組成物の調製

脱アシル化ジェランガム水溶液と培地溶液とを下表に示す割合で添加することで混合して、脱アシル化ジェランガム濃度が０．０２％であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製したときのポリスチレンビーズ（Ｓｉｚｅ　５００－６００μｍ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．製）の分散状態を評価した。結果を表２３、２４に示す。１日以上静置することで、全ての条件で、スチレンビーズが分散した。

[0160]

[表23]

脱アシル化ジェランガム／純水	DMEM/F12 粉培地／純水	静置時間
20 mg / 10 mL	1.56 g / 90 mL	5 min
20 mg / 20 mL	1.56 g / 80 mL	5 min
20 mg / 30 mL	1.56 g / 70 mL	5 min
20 mg / 40 mL	1.56 g / 60 mL	6 h
20 mg / 50 mL	1.56 g / 50 mL	6 h
20 mg / 60 mL	1.56 g / 40 mL	6 h
20 mg / 70 mL	1.56 g / 30 mL	6 h
20 mg / 80 mL	1.56 g / 20 mL	1 day
20 mg / 90 mL	1.56 g / 10 mL	1 day

「DMEM/F12 粉培地／純水」を「脱アシル化ジェランガム／純水」に添加

[0161] [表24]

脱アシル化ジェランガム／純水	DMEM/F12 粉培地／純水	静置時間
20 mg / 10 mL	1.56 g / 90 mL	5 min
20 mg / 20 mL	1.56 g / 80 mL	5 min
20 mg / 30 mL	1.56 g / 70 mL	1 h
20 mg / 40 mL	1.56 g / 60 mL	6 h
20 mg / 50 mL	1.56 g / 50 mL	6 h
20 mg / 60 mL	1.56 g / 40 mL	6 h
20 mg / 70 mL	1.56 g / 30 mL	1 day
20 mg / 80 mL	1.56 g / 20 mL	1 day
20 mg / 90 mL	1.56 g / 10 mL	1 day

「脱アシル化ジェランガム／純水」を「DMEM/F12 粉培地／純水」に添加

[0162] 参考試験例１８：フィルターを用いた培地組成物の調製

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を最終濃度が０．０２或いは０．０４％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて３０分間或いは１２１℃にて２０分間加熱することにより溶解した。更に、本水溶液１００ｍＬを孔径が０．２２μｍのポリエーテルスルホン製メンブレンフィルター（コーニング社製）にてろ過した。引き続き、本ろ液を２乃至４倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（シグマ・アルドリッチ社製）と混合した後、マイルドミキサー（ＳＩ－２４、タイテック社製）にて１時間振とうし、最終濃度０．０１或いは０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを含む培地組成物をそれぞれ調製した（例えば、０．０２％（ｗ／ｖ）脱アシル化ジェランガム水溶液と２倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地を２５ｍＬずつ混合し、０．０

１％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム培地組成物を５０ｍＬ調製した）。参考試験例２と同様の方法を用いてＨｅｐＧ２細胞のスフェアを作成し、上記で調製した培地１ｍＬにそれぞれ数１０個のスフェアを添加した後、３７℃にて静置して、１時間及び１晩後のスフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。その結果、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアは、上記の培地組成物全てにおいて浮遊状態にて維持されることを確認した。更に、２倍容量の培地を添加した後、本細胞懸濁液を遠心処理（５００Ｇ、５分）することによりＨｅｐＧ２細胞のスフェアが沈降し、細胞が回収できることを全ての培地組成物において確認した。１晩後のスフェアの分散状態を目視にて確認した際、浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した結果を表２５に示す。

[0163] [表25]

脱アシル化ジェランガム水溶液濃度（%）	溶解時の温度（℃）	培地組成物の脱アシル化ジェランガム濃度（%）	ＨｅｐＧ２細胞の浮遊効果
0.02	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○
0.04	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○

[0164] 参考試験例１９：細胞株由来スフェアを培養した際の細胞増殖試験

ヒト胎児腎細胞株ＨＥＫ２９３（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に２５００００個／ｍＬとなるように懸濁し、本懸濁液１０ｍＬをＥＺ　ＳＰＨＥＲＥ（旭硝子社製）に播種した後、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で２日間培養した。ここで得られたＨＥＫ２９３細胞のスフェア（直径１００～２００μｍ）の懸濁液１０ｍＬを遠心処理（２００Ｇ、５分間）してスフェアを沈降させ上清を除いた後、１ｍＬに懸濁した。引き続き、本スフェア懸濁液２００μＬ（細胞数は約２０００００個）に上記培地１０ｍＬを

添加して懸濁した後、平底チューブ（ＢＭ機器社製）に移した。同様に、上記培地に０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を添加した培地組成物を用いてスフェアの懸濁液を作成し、平底チューブ（ＢＭ機器社製）に移した。なお、０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物は、まず脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した後、１／２０希釈で１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地に添加することにより調製した。

[0165] ３７℃で５日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で上記スフェア懸濁液を静置培養した後、２倍容量の培地を添加して遠心処理（５００Ｇ、５分間）を行うことによりスフェアを沈降させ、上清を除いた。引き続き、回収したスフェアをＰＢＳ１０ｍＬにて１回洗浄した後、１ｍＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。上記培地を９ｍＬ添加した後、遠心処理（５００Ｇ、５分間）により細胞を回収した。ここで得られた細胞懸濁液２ｍＬの一部に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞及び死細胞の数を測定した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まない培地組成物を作成し、同様の実験を行った。

[0166] その結果、ＨＥＫ２９３細胞のスフェアは該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない培地組成物と比べて細胞を増殖させた際に死細胞の割合が少なく、細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。この際、既存の培地で培養したスフェアは培養容器の底面に沈降していた。

ＨＥＫ２９３細胞に関して、脱アシル化ジェランガムを含まない培地にて

培養した際の細胞数を１としたときの相対的細胞数を表２６に示す。また、脱アシル化ジェランガムを含まない培地で培養した際の死細胞率（死細胞数／生細胞数）を１としたときの相対的死細胞率を表２７に示す。

[0167] [表26]

脱アシル化ジェランガム		ＨＥＫ２９３細胞
無	相対的細胞数	１．０
有	相対的細胞数	１．６

[0168] [表27]

脱アシル化ジェランガム		ＨＥＫ２９３細胞
無	相対的死細胞率	１．０
有	相対的死細胞率	０．３

[0169] 参考試験例２０：昆虫細胞を培養した際の細胞増殖試験

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いてＳｆ－９００（登録商標）IIISＦM培地（ギブコ社製）に終濃度０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物を調製した。引き続き、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ由来のＳｆ９細胞（ギブコ社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物に播種した後、２４ウェル平底マイクロプレート（コーニング社製）のウェルに１ウェル当たり１ｍＬとなるように分注した。これらの細胞懸濁液をインキュベーター内にて２５℃で５日間静置培養した。その後、培養液の一部を回収し、トリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まない培地組成物を作成し、同様の実験を行った。

[0170] その結果、Ｓｆ９細胞は、該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて均一に培養することが可能であり、当該培地組成物で増殖することが確認さ

れた。更に、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない培地組成物と比べて細胞を増殖させた際に細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。浮遊静置培養５日間後のＳｆ９細胞の細胞数を表２８に示す。

[0171] [表28]

脱アシル化ジェランガム	Ｓｆ９細胞数（×１００００）
無	３３．５
有	４７．４

[0172] 参考試験例２１：ＣＤ３４陽性細胞を培養した際の細胞増殖試験

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いてＳｔｅｍＳｐａｎ　ＳＦＥＭ培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に終濃度０．０１５％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガム、２０ｎｇ／ｍＬのトロンボポエチン（ＷＡＫＯ社製）及び１００ｎｇ／ｍＬの幹細胞因子（ＳＣＦ、ＷＡＫＯ社製）を添加した培地組成物を調製した。引き続き、ヒト臍帯血由来のＣＤ３４陽性細胞（ロンザ社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物に播種した後、２４ウェル平底マイクロプレート（コーニング社製）のウェルに１ウェル当たり１ｍＬとなるように分注した。これらの細胞懸濁液を３７℃で７日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置培養した。その後、培養液の一部を回収し、トリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。また、残りの培養液に３倍容量の培地を添加して遠心処理（５００Ｇ、５分間）を行うことにより全ての細胞を沈降させた。なお、対照として脱アシル化ジェランガムを含まない培地組成物を作成し、同様の実験を行った。

[0173] その結果、ＣＤ３４陽性細胞は、該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて均一に培養することが可能であり、当該培地組成物で増殖することが確認された。更に、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない既

存の培地と比べて同等以上の細胞増殖促進効果を有することが確認された。また、遠心処理により細胞が沈降し、細胞が回収できることを確認した。脱アシル化ジェランガムを含まない培地にて培養した際の細胞数を１としたときの、浮遊静置培養７日間後におけるＣＤ３４陽性細胞から増殖した細胞の相対的細胞数を表２９に示す。

[0174] [表29]

脱アシル化ジェランガム	相対的細胞数
無	１．０
有	１．２

[0175] 参考試験例２２：スフェア形成試験

参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１５％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）及び１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）の組成物を調製した。引き続き、ＨｅｐＧ２細胞を、１５０００個／ｍＬの細胞濃度になるように添加した後、２４ウェルプレート（コーニング社製）に１ｍＬ分注した。本プレートを７日間、３７℃にて浮遊静置培養した後、スフェアの形成を顕微鏡にて確認した。更に、４００Ｇ、５分間の遠心処理によりスフェア細胞を沈降させ、ＰＢＳ５ｍＬにて１回洗浄した後、１００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液１００μＬに対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を１００μＬ添加し、その一部の細胞懸濁液に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。その結果、ＨｅｐＧ２細胞は、該培地組成物にてスフェアを形成し、また細胞数も８０８００個／ｍＬまでが増えていることが確認された。該培地組成物にて形成したＨｅｐＧ２細胞のスフェアを図８に示す。

[0176] 参考試験例２３：細胞株由来スフェアを用いた細胞浮遊試験

ダイユータンガム（ＫＥＬＫＯ－ＣＲＥＴＥ　ＤＧ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）の濃度となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁

した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解した。本水溶液を用いて、ダイユータンガムについて終濃度が０．１％（ｗ／ｖ）であるＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。また、０．５％（ｗ／ｖ）のネイティブ型ジェランガム（ケルコゲル　ＨＴ、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製）を含む水溶液を９０℃にて加熱することにより調製し、本水溶液を用いて０．０５、０．１％（ｗ／ｖ）のネイティブ型ジェランガムを含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（シグマ社製）組成物を調製した。

[0177] 参考試験例２と同様の方法を用いてＨｅＬａ細胞のスフェアを作成し、上記で調製した培地１ｍＬにそれぞれ数１０個のスフェアを添加した後、１時間３７℃にて静置して、スフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。その結果、ＨｅＬａ細胞のスフェアは、上記の培地組成物全てにおいて浮遊状態にて維持されることを確認した。更に、０．１％（ｗ／ｖ）のダイユータンガムを含む本細胞懸濁液を遠心処理（２００Ｇ、５分）することによりＨｅＬａ細胞のスフェアが沈降し、細胞が回収できることを確認した。

[0178] 参考試験例２４：細胞接着能を有する磁気ビーズを用いた細胞浮遊試験１

ラミニン或いはフィブロネクチンにてコーティングしたＧＥＭ（登録商標、Ｇｌｏｂａｌ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｍｉｃｒｏｃａｒｒｉｅｒ、ジーエルサイエンス株式会社製）懸濁溶液を５００μＬずつ１．５ｍＬ容量のマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に分注し、磁石スタンド（ＴＡ４８９９Ｎ１２、多摩川精機株式会社製）を使用して上記ＧＥＭ懸濁溶液からＧＥＭを集積させて溶媒を除去した。更に、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）５００μＬによりＧＥＭを２回洗浄した後、同上培地５００μＬに懸濁した。本懸濁液を細胞低接着プレートであるスミロンセルタイトプレート２４Ｆ（住友ベークライト株式会社製）に１ウェルあたり５０μＬ分注した。引き続き、別途調製したＨｅｐＧ２細胞を２５００００細胞／ｍＬとなる様に添加し、同上培地にて最終容量を５００μＬ／ウェルとした。本細胞懸濁液を手動にて撹拌した後、本プレートを一晩、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置した。ＧＥＭ上で

の細胞の接着を顕微鏡にて確認した後、細胞懸濁液を１．５ｍＬ容量のマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、上記磁石スタンドを用いて細胞付着ＧＥＭを集積させて上清を除去した。

[0179] 参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１５％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）及び１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）の組成物を調製した。本培地組成物或いは脱アシル化ジェランガムを含まない同上培地それぞれ１ｍＬを上記にて調製したＨｅｐＧ２細胞付着ＧＥＭ（ラミニン或いはフィブロネクチンコーティング）に添加し、懸濁させた後、スミロンセルタイトプレート２４Ｆに移した。引き続き、本プレートを６日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置した後、細胞培養液を１．５ｍＬ容量のマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、上記磁石スタンド上にて緩やかにピペッティングしながら細胞付着ＧＥＭを集積させて上清を除去した。本ＧＥＭをＰＢＳ１ｍＬにて１回洗浄し、２００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で１０分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液２００μＬに対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を８００μＬ添加し、その一部の細胞懸濁液に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。

[0180] その結果、ＨｅｐＧ２細胞を接着させたＧＥＭは該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない既存の培地と比べて、細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。また、磁力を用いることにより該培地組成物からＨｅｐＧ２細胞付着ＧＥＭを集積させることが可能であり、更に本ＧＥＭからＨｅｐＧ２細胞が回収できることを確認した。

脱アシル化ジェランガム含有或いは非含有培地にてＨｅｐＧ２細胞をＧＥ

Ｍ上で６日間培養した際の細胞数を表３０に示す。また、ＨｅｐＧ２細胞を付着させたラミニンコートＧＥＭを該培地組成物で培養した際の浮遊状態を図９に示す。

[0181] [表30]

脱アシル化ジェランガム	ＨｅｐＧ２細胞数（×１００００／ｍＬ）	
	ラミニンコートＧＥＭ	フィブロネクチンコートＧＥＭ
無	５０．０	５４．７
有	１１２．３	９４．０

[0182] 参考試験例２５：細胞接着能を有する磁気ビーズを用いた細胞浮遊試験２

参考試験例２４と同様に、フィブロネクチンにてコーティングしたＧＥＭ（登録商標、Ｇｌｏｂａｌ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｍｉｃｒｏｃａｒｒｉｅｒ、ジーエルサイエンス株式会社製）をＭＦ－Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡株式会社製）に懸濁した。本懸濁液を細胞低接着プレートであるスミロンセルタイトプレート２４Ｆ（住友ベークライト株式会社製）に１ウェルあたり５０μＬ分注した。引き続き、別途調製したヒト骨髄由来の間葉系幹細胞（Ｃｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社製）を２５００００細胞／ｍＬとなる様に添加し、参考試験例２４と同様に、本プレートを一晩、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置させて間葉系幹細胞が接着したＧＥＭを調製した。

[0183] 参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１５％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を含有するＭＦ－Ｍｅｄｉｕｍ（登録商標）間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡株式会社製）の組成物を調製した。本培地組成物或いは脱アシル化ジェランガムを含まない同上培地それぞれ１ｍＬを上記にて調製した間葉系幹細胞付着ＧＥＭ（フィブロネクチンコーティング）に添加し、懸濁させた後、スミロンセルタイトプレート２４Ｆに移した。引き続き、本プレートを４日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置した後、細胞培養液を１．５ｍＬ容量のマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、上記磁石スタンド上にて緩やかにピペッティングしながら細胞付着ＧＥＭを集積させて上清を除去した。

本ＧＥＭをＰＢＳ１ｍＬにて１回洗浄し、２００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で１０分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液２００μＬに対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を８００μＬ添加し、その一部の細胞懸濁液に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。

[0184] その結果、間葉系幹細胞を接着させたＧＥＭは該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない既存の培地と比べて、細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。また、磁力を用いることにより該培地組成物から間葉系幹細胞付着ＧＥＭを集積させることが可能であり、更に本ＧＥＭから間葉系幹細胞が回収できることを確認した。

脱アシル化ジェランガム含有或いは非含有培地にて間葉系幹細胞をＧＥＭ上で４日間培養した際の細胞数を表３１に示す。

[0185] [表31]

脱アシル化ジェランガム	間葉系幹細胞数（×１００００／ｍＬ）
無	１１．３
有	２０．９

[0186] 参考試験例２６：アルギン酸ビーズを用いた細胞浮遊試験

以下の試験は、株式会社ＰＧリサーチ製アルギン酸三次元培養キットの方法に準じて実施した。別途調製したＨｅｐＧ２細胞を４００００細胞／ｍＬとなる様にアルギン酸ナトリウム溶液（株式会社ＰＧリサーチ製）２．５ｍＬに添加し、更にヒト組み換えラミニン５１１（株式会社ベリタス製）を５μｇ／ｍＬとなる様に添加し、細胞懸濁液を調製した。本細胞懸濁液についてゾンデを装着した５ｍＬシリンジ（テルモ株式会社製）で回収した後、本シリンジに２２Ｇ注射針（テルモ株式会社製）を装着した。引き続き、塩

化カルシウム水溶液（株式会社ＰＧリサーチ製）が２ｍＬずつ添加してある２４ウェル平底マイクロプレート（株式会社ＰＧリサーチ製）のウェルに対して、本細胞懸濁液を１０滴ずつ添加した。１０分間、室温にて静置してからアルギン酸ビーズの形成を確認した後、塩化カルシウム溶液を除去し、ＰＢＳ２ｍＬを添加して室温で１５分静置した。更に、ＰＢＳを除去した後、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）２ｍＬを添加し室温で１５分静置した。培地を除去した後、参考試験例２と同様の方法を用いて調製した０．０３％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）及び１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）の培地組成物或いは脱アシル化ジェランガムを含まない同上培地それぞれ１ｍＬを各ウェルに添加し、８日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で静置培養した。なお、培地交換は、培養４日目に実施した。

[0187] 培養したアルギン酸ビーズを１ｍＬ容量のチップを用いて１．５ｍＬ容量のマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に移した後、クエン酸ナトリウム溶液（株式会社ＰＧリサーチ製）１ｍＬを各チューブに添加し、室温１５分間攪拌してアルギン酸ビーズを溶解させた。引き続き、３００Ｇ、３分間の遠心処理により細胞を沈降させ、上清を除去した。本細胞に対して２００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液２００μＬに対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を８００μＬ添加し、その一部の細胞懸濁液に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。

[0188] その結果、ＨｅｐＧ２細胞を包埋したアルギン酸ビーズは該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない既存の培地と比べて、細胞増殖の促進効果

が優れていることが確認された。

脱アシル化ジェランガム含有或いは非含有培地にてＨｅｐＧ２細胞をアルギン酸ビーズ内で８日間培養した際の細胞数を表３２に示す。また、ＨｅｐＧ２細胞を包埋したアルギン酸ビーズを該培地組成物で培養した際の浮遊状態を図１０に示す。

[0189] [表32]

脱アシル化ジェランガム	ＨｅｐＧ２細胞数（×１００００／ｍＬ）
無	３４．９
有	６１．８

[0190] 参考試験例２７：コラーゲンゲルカプセルを用いた細胞浮遊試験

Ａ：組織培養用コラーゲンＣｅｌｌｍａｔｒｉｘ（登録商標）Ｔｙｐｅｌ－Ａ(セルマトリックス、新田ゼラチン株式会社製)、Ｂ：１０倍濃度のＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ａｌｄｒｉｃｈ社製）、Ｃ：再構成用緩衝液（０．０５Ｎ水酸化ナトリウム溶液１００ｍＬに炭酸水素ナトリウム２．２ｇ、ＨＥＰＥＳ（４－(２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ)－１－ｐｉｐｅｒａｚｉｎｅｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ））４．７７ｇを加えてろ過滅菌したもの）のそれぞれを氷中にて冷却しながらＡ：Ｂ：Ｃ＝８：１：１となるように混合した。更に、ヒト組み換えラミニン５１１（株式会社ベリタス製）を５μｇ／ｍＬとなる様に添加し、コラーゲン混合溶液５００μＬを調製した。本混合溶液に対して別途調製したＨｅｐＧ２細胞を２００００細胞／ｍＬとなる様に添加し、２５Ｇ注射針（テルモ株式会社製）を装着した１．５ｍＬシリンジ（テルモ株式会社製）を用いて全量を回収した。引き続き、３７℃にて予め保温した１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）１０ｍＬを添加した平底チューブ（ＢＭ機器社製）に対して、上記シリンジを用いて１滴ずつ細胞懸濁液を滴下した。３７℃水浴中にて１０分間保温して、直径２ｍｍ程度の不定形なコラーゲンゲルカプセルの形成を確認した後、参考試験例２と同様の方法にて最終濃度０．０４％となるように脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、

三晶株式会社製）を添加し、軽く撹拌して上記カプセルを浮遊させた。引き続き、５日間、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で本チューブを静置培養した。

[0191] コラーゲンゲルカプセルを含む培養液に対してＰＢＳ２５ｍＬを添加し、４００Ｇ、５分間の遠心処理によりコラーゲンゲルカプセルを沈降させ、上清を除去した。再度、ＰＢＳ２５ｍＬを加えて遠心処理を行い、残量が５ｍＬとなるように上清を除去した。本液に対して１％（Ｗ／Ｖ）のコラゲナーゼＬ（新田ゼラチン株式会社製）２０μＬを添加した後、３７℃にて２時間振とうした。コラーゲンゲルの溶解を確認した後、ＰＢＳ１０ｍＬを加え、４００Ｇ、５分間の遠心処理により細胞を沈降させ、上清を除去した。本細胞に対して１ｍＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液に対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を４ｍＬ添加し、４００Ｇ、５分間の遠心処理により細胞を沈降させ、上清を除去した。得られた細胞を２ｍＬの同上培地にて懸濁し、その一部に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。

[0192] その結果、ＨｅｐＧ２細胞を包埋したコラーゲンゲルカプセルは該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物で効率良く細胞が増殖することが確認された。しかも、該培地組成物は、脱アシル化ジェランガムを含まない既存の培地と比べて、細胞増殖の促進効果が優れていることが確認された。

脱アシル化ジェランガム含有或いは非含有培地にてＨｅｐＧ２細胞をコラーゲンゲルカプセル内で５日間培養した際の細胞数を表３３に示す。また、ＨｅｐＧ２細胞を包埋したコラーゲンゲルカプセルを該培地組成物で培養した際の浮遊状態を図１１に示す。

[0193]

[表33]

脱アシル化ジェランガム	ＨｅｐＧ２細胞数（×１００００／ｍＬ）
無	６２．４
有	１０６．０

[0194] 参考試験例２８：フィルターを用いたスフェアの回収試験

参考試験例２と同様の方法を用いて０．０１５％の脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）及び１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含有するＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）の組成物を調製した。また、対照として脱アシル化ジェランガムを含まない同上培地を調製した。参考試験例２と同様の方法を用いてＨｅｐＧ２細胞のスフェアを作成し、上記で調製した培地１ｍＬにそれぞれ８６０００個の細胞数となるようにスフェアを添加した後、１時間３７℃にて静置して、スフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。更に、メッシュサイズが４０μｍのセルストレーナー（ベクトン・ディッキンソン社製）上に本細胞懸濁液を添加し、スフェアをフィルター上に捕捉した。引き続き、フィルターの裏面からＰＢＳ１０ｍＬを流し込むことによりスフェアを１５ｍＬチューブに回収し、３００Ｇ、５分間の遠心処理によりスフェアを沈降させた。上清を除去した後、スフェアに対して５００μＬのトリプシン－ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液（ＷＡＫＯ社製）を添加し、３７℃で５分間保温した。ここで得られた細胞懸濁液に対して１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地を１ｍＬ添加し、その一部に対してトリパンブルー染色液（インヴィトロジェン社製）を同量添加した後、血球計算盤（エルマ販売株式会社製）にて生細胞の数を測定した。その結果、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアは、上記の培地組成物において浮遊状態にて維持されることを確認した。更に、０．０１５％の脱アシル化ジェランガムを含む本スフェア懸濁液をフィルター処理することにより、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアを、脱アシル化ジェランガムを含まない培地と同等の回収率にて細胞が回収できることを確認した。脱アシル化ジェランガムを含まない培地を用いてフィルターにて回収されたＨｅｐＧ２細胞

数を１としたときの、脱アシル化ジェランガムを含む培地から回収された相対的細胞数を表３４に示す。

[0195] [表34]

脱アシル化ジェランガム	相対的ＨｅｐＧ２細胞数
無	１．０
有	１．１

[0196] 参考試験例２９：各種多糖類の混合剤を用いたスフェアの細胞浮遊試験

参考試験例９と同様の方法を用いて、キサンタンガム（ＫＥＬＴＲＯＬ ＣＧ、三晶株式会社製）、アルギン酸ナトリウム（ダックアルギン酸ＮＳＰＭ、フードケミファ社製）、ローカストビーンガム（ＧＥＮＵＧＵＭ ＲＬ－２００－Ｊ、三晶株式会社製）、メチルセルロース（ｃＰ４００、ＷＡＫＯ株式会社製）、κ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製）、ペクチン（ＧＥＮＵ ｐｅｃｔｉｎ ＬＭ－１０２ＡＳ、三晶株式会社製）或いはダイユータンガム（ＫＥＬＣＯ ＣＲＥＴＥ ＤＧ－Ｆ、三晶株式会社製）と脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を組み合わせて混合したＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地組成物を調製した。参考試験例２と同様の方法を用いてＨｅｐＧ２細胞のスフェアを作成し、上記で調製した培地１ｍＬにそれぞれ数１０個のスフェアを添加した後、３７℃にて静置して、１時間及び１晩後のスフェア細胞の浮遊状態を目視にて観察した。その結果、ＨｅｐＧ２細胞のスフェアは、上記の培地組成物全てにおいて浮遊状態にて維持されることを確認した。更に、２倍容量の培地を添加した後、本細胞懸濁液を遠心処理（５００Ｇ、５分）することによりＨｅｐＧ２細胞のスフェアが沈降し、細胞が回収できることを全ての培地組成物において確認した。１晩後のスフェアの分散状態を目視にて確認した際、浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した結果を表３５及び表３６に示す。なお、表中の－は未実施を示す。

[0197]

[表35]

脱アシル化ジェランガム濃度（%）	糖類添加濃度（%）	メチルセルロース	ダイユータンガム
0．005	0．05	—	△
	0．2	△	—

[0198] [表36]

脱アシル化ジェランガム濃度（%）	糖類添加濃度（%）	キサンタンガム	アルギン酸ナトリウム	ローカストビーンガム	メチルセルロース	κ-カラギーナン	ペクチン	ダイユータンガム
0．01	0．05	—	—	—	—	○	—	○
	0．1	○	○	○	—	—	△	—
	0．2	—	—	—	○	—	—	—

[0199] ビーズと細胞の分散性比較１

上記（比較例）にて調製した脱アシル化ジェランガム含有培地とメチルセルロース含有培地について、デキストランビーズＣｙｔｏｄｅｘ（登録商標）１（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）とＨｅＬａ細胞スフェアの分散状態を比較した。結果を表（表３７及び３８）に示す。Ｃｙｔｏｄｅｘ１とＨｅＬａ細胞スフェアの分散状態はよく相関していることから、Ｃｙｔｏｄｅｘ１を細胞スフェアモデルとして使用することができる。

[0200] [表37]

脱アシル化ジェランガム濃度％（w／v）	Ｃｙｔｏｄｅｘ１ 浮遊／沈殿	ＨｅＬａ細胞 浮遊／沈殿
0．01	浮遊／一部沈殿	浮遊
0．02	浮遊	浮遊
0．03	浮遊	浮遊
0．05	浮遊	浮遊

[0201]

[表38]

メチルセルロース ％（w／v）	Ｃｙｔｏｄｅｘ１ 浮遊／沈殿	ＨｅＬａ細胞 浮遊／沈殿
０．１	沈殿	沈殿
０．３	沈殿	沈殿
０．６	沈殿	沈殿
１．０	沈殿	沈殿

[0202] ビーズと細胞の分散性比較２

参考試験例９にて調製した多糖および脱アシル化ジェランガム含有培地について、ポリスチレンビーズ（Ｓｉｚｅ　５００－６００μｍ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．製）とＨｅｐＧ２細胞スフェアの分散状態を比較した。浮遊分散状態を○、一部沈降／分散状態を△、沈降状態を×として評価した。結果を表（表３９）に示す。ポリスチレンビーズとＨｅｐＧ２細胞スフェアの分散状態はよく相関していることから、ポリスチレンビーズを細胞スフェアモデルとして使用することができる。

[0203] [表39]

		キサンタンガム		アルギン酸Na		ローカストビーンガム		ダイユータンガム	
	多糖濃度	PSビーズ	HepG2塊	PSビーズ	HepG2塊	PSビーズ	HepG2塊	PSビーズ	HepG2塊
脱アシル化ジェランガム濃度	0.05%							○	○
	0.1%	○	○	○	○	○	○	○	
	0.2%	○		○		○			

[0204] 参考試験例３０：イネ由来植物カルスの浮遊培養試験

塩水選にて精選されたイネ日本晴の完熟種子（湖東農業協同組合より購入）５０粒を５０ｍＬポリスチレンチューブ（ＢＤファルコン社製)に移し、滅菌水５０ｍＬにて洗浄した後、７０％エタノール水３０ｍＬ中にて１分間撹拌した。エタノール水を除去した後、キッチンハイター（花王株式会社製）３０ｍＬを添加し、１時間撹拌した。キッチンハイターを除去した後、滅菌水５０ｍＬにて４回洗浄した。ここで滅菌した種子を、２μｇ／ｍＬの２，４－ジクロロフェノキシ酢酸（シグマ・アルドリッチ社製）及び寒天を含むムラシゲ・スクーグ基礎培地（Ｍ９２７４、シグマ・アルドリッチ社製）１．５ｍＬ／ウェル（２４ウェル平底マイクロプレート（コーニング社製））上に置床した。３０℃、１６時間暗所／８時間暗所の条件にて３週間培養し

、種子の胚盤上で増殖したクリーム色のカルス（１～２ｍｍ）を採取した。

[0205] 脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて、２μｇ／ｍＬの２，４－ジクロロフェノキシ酢酸（シグマ・アルドリッチ社製）を含むムラシゲ・スクーグ基礎培地（Ｍ９２７４、シグマ・アルドリッチ社製）に終濃度０．０３％（ｗ／ｖ）の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物を調製した。上記にて調製したカルス１５個を本培地組成物１０ｍＬ／平底チューブ（ＢＭ機器社製）に添加し、７日間、２５℃にて振とう培養を行った。その結果、イネ由来カルスは当該培地組成物を用いることにより浮遊状態にて培養することが可能であり、当該培地組成物にてカルスが維持されることが確認された。イネ由来カルスを該培地組成物で培養した際の浮遊状態を図１２に示す。

[0206] ［製造例１：結晶セルロース由来セルロースナノファイバーの製造］

市販の結晶セルロース（旭化成ケミカルズ株式会社製　ＰＨ－１０１）４質量部に純水３９６質量部を加え分散させた後、（株）スギノマシン製高圧粉砕装置（スターバーストシステム）を用いて、２２０ＭＰａにて１００回粉砕処理を行い、結晶セルロース由来のセルロースナノファイバーの水分散液（ＭＮＣ）を得た。得られた分散液をシャーレに測りとり、１１０℃にて１時間乾燥を行い、水分を除去して残渣の量を測定し、濃度を測定した。その結果、水中のセルロース濃度（固形分濃度）は、１．０質量％であった。この水分散液を１２１℃、２０分間オートクレーブ処理し、滅菌した。

[0207] ［製造例２：パルプ由来セルロースナノファイバーの製造］

市販のクラフトパルプ（王子エフテックス株式会社製ＬＢＫＰ、固形分８９質量％）５質量部に純水１４５質量部を加えて分散させた後、増幸産業株式会社製石臼式粉砕装置（マスコロイダー）を用いて、１５００ｒｐｍにて９回粉砕処理を行い、パルプスラリーを作製した。前記パルプスラリーを株

式会社スギノマシン社製高圧粉砕装置（スターバーストシステム）用いて、２２０ＭＰａにて３００回処理することにより、ナノセルロースの水分散液（ＰＮＣ）を得た。得られた分散液をシャーレに測りとり、１１０℃にて１時間乾燥を行い、水分を除去して残渣の量を測定し、濃度を測定した。その結果、水中のセルロース濃度（固形分濃度）は、１．６質量％であった。この水分散液を１２１℃、２０分間オートクレーブ処理し、滅菌した。

[0208] ［製造例３：キチンナノファイバーの製造］

市販のキチン粉末（甲陽ケミカル株式会社製）２０質量部に純水９８０質量部を加えて分散させた後、（株）スギノマシン製高圧粉砕装置（スターバーストシステム）を用いて、２４５ＭＰａにて２００回粉砕処理を行い、キチンナノファイバーの水分散液（ＣＴ）を得た。得られた分散液をシャーレに測りとり、１１０℃にて１時間乾燥を行い、水分を除去して残渣の量を測定し、濃度を測定した。その結果、水中のキチン濃度（固形分濃度）は、２．０質量％であった。この水分散液を１２１℃、２０分間オートクレーブ処理し、滅菌した。

[0209] ［試験例１：平均繊維径Ｄ及び平均繊維長Ｌの測定］

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た。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、製造例１～３において作製したナノファイバー分散液（超純水にて希釈）を数滴滴下し、室温乾燥した。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）とした。

また、平均繊維長（Ｌ）は、製造例において作製した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た。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した。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）とした。

製造例１乃至製造例３で得られたナノファイバーの平均繊維径Ｄ及び平均繊維長Ｌを求め、これらの値よりアスペクト比Ｌ／Ｄを求めた。得られた結果を表４０に示す。

[0210] [表40]

	平均繊維径 D [nm]	平均繊維長 L [nm]	アスペクト比 L／D
製造例１（MNC）	１５	１８１	１２
製造例２（PNC）	１３	２８１０	２２２
製造例３（CT）	１２	３５２	２９

[0211] ［実施例１乃至実施例４］

前述の製造例１乃至製造例３で調製したナノファイバー分散液および脱アシル化ジェランガム水溶液を用いて、下記表４１に記載の培地組成物を調製した。

まず、製造例１乃至製造例３で調製したセルロースナノファイバーＭＮＣ、ＰＮＣ及びキチンナノファイバーへ滅菌水を加えることで、それぞれ１％（ｗ／ｖ）水分散液へと希釈した。一方で、脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製：ＤＡＧ）１質量部へ９９体積部の滅菌水を加え、１２１℃、２０分間オートクレーブ処理することによって溶解および滅菌させ、脱アシル化ジェランガム１％（ｗ／ｖ）水溶液を調製した。

前述の１％（ｗ／ｖ）分散液または水溶液１体積部を５０ｍＬコニカルチューブにとり、４９体積部の滅菌水を加えて、均一となるまでピペッティングした。ここへ０．２２μｍフィルターにより滅菌ろ過した２倍濃度のＤＭＥＭ（ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ、Ａｌｄｒｉｃｈ社製、所定量の炭酸水素ナトリウムを含む）を５０体積部添加し、ピペッティングにより混合し、ナ

ノファイバー濃度が０．０１％（ｗ／ｖ）の培地組成物を調整した。

同様に最終濃度が０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）の所望の濃度となるようナノファイバー分散液または脱アシル化ジェランガム水溶液を添加した培地組成物を調製した。

[0212] ［実施例５及び比較例２乃至比較例５］

κ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ　ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製：Ｃａｒ）（実施例５）、ローカストビーンガム（ＧＥＮＵＧＵＭ　ＲＬ－２００－Ｊ、三晶株式会社製：ＬＢＧ）（比較例２）、キサンタンガム（ＫＥＬＴＲＯＬ　ＣＧ、三晶株式会社製：Ｘａｎ）（比較例３）、ダイユータンガム（ＫＥＬＣＯ　ＣＲＥＴＥ　ＤＧ－Ｆ、三晶株式会社製：ＤＵ）（比較例４）、アルギン酸Ｎａ（ダックアルギン酸ＮＳＰＭ、フードケミファ社製：Ａｌｇ）（比較例５）１質量部へ９９質量部の滅菌水を加え、１２１℃、２０分間オートクレーブ処理することによって、溶解および滅菌させた。

前述により調製した多糖溶液について、実施例１乃至４と同様な操作により、最終濃度が０．０３、０．０５、０．０７、０．１％（ｗ／ｖ）となるよう多糖溶液を添加した培地組成物を調製した。

[0213] ［試験例２：浮遊作用の評価１］

実施例１～５及び比較例２～５の培地組成物に、ポリスチレンビーズ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．社製、２００－３００μｍ）を添加し、ボルテックス撹拌により培地組成物中にビーズが均一に分散したのを確認した後、室温（２５℃）において一日間静置し、ビーズの分散状態を目視にて確認した。培地組成物中で均一にビーズが浮遊した状態を◎、一部上清を生じた状態を○、沈降状態を×として評価した。結果を表４１に示す。

[0214] その結果、実施例１乃至実施例４の培地組成物では、ビーズを浮遊させる作用を示した。また、実施例５では室温ではビーズの浮遊作用が見られたものの、３７℃に加温することによってビーズが沈降し、細胞培養条件では浮遊作用は得られなかった。比較例２乃至比較例５ではビーズは完全に底面へ沈降した。

[0215] [表41]

			濃度 %（w／v）				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
実施例	1	MNC	×	×	○	○	○
	2	PNC	○	◎	◎	◎	◎
	3	CT	×	○	○	○	○
	4	DAG	◎	◎	◎	◎	◎
	5	Car	×	○*	○*	○*	○*
比較例	2	LBG	×	×	×	×	×
	3	Xan	×	×	×	×	×
	4	DU	×	×	×	×	×
	5	Alg	×	×	×	×	×

[0216] ＊実施例５のκ－カラギーナン（Ｃａｒ）は、２５℃において浮遊作用が見られたものの、細胞培養条件と同等の３７℃では、即座に浮遊作用を失い、沈降した。その他の培地については、３７℃及び２５℃において、同一の結果が得られた。

[0217] ［試験例３：浮遊作用の評価２］

試験例２と同様に、実施例２、４及び５並びに比較例２の培地組成物について、低濃度領域（０．０１～０．０４％（ｗ／ｖ））における浮遊作用を詳細に評価した。ポリスチレンビーズを添加し、２日間静置後、ビーズの分散状態を目視にて確認した。浮遊分散状態を○、沈降状態を×として評価した。一部沈降／分散状態については、１０mLコニカルチューブ内における浮遊領域の高さに基づきビーズ浮遊率を算出した。結果を表４２に示す。

[0218] [表42]

			濃度 %（w／v）					
		高分子	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035	0.04
実施例	2	PNC	50※	65※	85※	90※	○	○
	4	DAG	○	○	○	○	○	○
	5	Car	×	×*	×*	×*	×*	×*
比較例	2	LBG	×	×	×	×	×	×

[0219] ※はビーズ浮遊率を示す。ＰＮＣは０．０１５％（ｗ／ｖ）以上の濃度で、実施例４の培地組成物は０．０１５％（ｗ／ｖ）以上の濃度で、浮遊作用を示した。実施例２の培地組成物は、濃度増加に伴って、段階的に浮遊作用

が向上した。実施例５の培地組成物は、０．０２％以上で、２５℃において浮遊作用を示したものの、３７℃では、即座に浮遊作用を失い、沈降した（＊）。その他の培地については、３７℃及び２５℃において、同一の結果が得られた。

[0220] ［試験例４：培地組成物の粘度］

実施例１～５及び比較例２～５の培地組成物の粘度を、２５℃条件下で音叉振動式粘度測定（ＳＶ－１Ａ、Ａ＆Ｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｌｔｄ．）を用いて評価した。結果を図１３に示す。この結果、本発明の培地組成物は、ナノファイバーまたは増粘性多糖の含有量が極めて少ないため、一般的な培地の粘度と比較して、顕著な粘度増加は見られないとする結果が得られた。試験例２の結果との比較から、粘度と浮遊作用との間に相関は認められなかった。

[0221] ［試験例５：培地組成物の走査型電子顕微鏡観察］

実施例１乃至５、比較例３乃至４において調製した培地組成物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℃（比較例１のみ室温）にて１時間乾燥させた後、純水によりかけ洗いし余分な塩分等を除去した後、再度１１０℃１時間乾燥させた状態で試料とした。前述の試料を日本電子（株）製走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ、ＪＳＭ－７４００Ｆ、１０，０００倍）を用いて観察した。実施例１乃至４および比較例３乃至４の培地組成物の観察結果を図１４乃至２１へと示した。

[0222] 観察の結果、実施例１乃至４および室温で乾燥させた実施例５では、ファイバーが多数観察されたのに対し、１１０℃で乾燥させた実施例５および比較例３乃至４では、ファイバーは全く観察されなかった。なお、観察画像中に多数観察される球状物体は、培地中の塩成分が析出したものである。この結果から、培地組成物中に含まれるファイバー構造が浮遊作用に寄与している可能性が示唆された。

[0223] ［試験例７：スフェアの浮遊作用］

ヒト肝癌細胞株ＨｅｐＧ２（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１

０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（ＷＡＫＯ社製）に５００００個／ｍＬとなるように懸濁し、前記懸濁液１０ｍＬをＥＺ　ＳＰＨＥＲＥ（旭硝子社製）に播種した後、CO_2インキュベーター（５％CO_2）内で２日間培養した。ここで得られたスフェアの懸濁液８０ｍＬを遠心処理（８００ｒｐｍ、５分間）してスフェアを沈降させ、上清を除くことによりスフェア懸濁液４．５ｍＬを調製した。引き続き、実施例１乃至４および比較例１、比較例３乃至５の培地組成物を１５ｍＬコニカルチューブに１０ｍＬずつ入れ、更にＨｅｐＧ２細胞のスフェア懸濁液１００μＬを加えた。ピペッティングによりスフェアを分散させ、３７℃で５日間インキュベートし、培地組成物中におけるスフェアの分散状態を目視にて観察した。培地組成物中で均一にスフェアが浮遊した状態を◎、上清を生じた状態を○、沈降状態を×として評価した。実施例１乃至５、比較例３乃至５の培地組成物の観察結果を表４３および図２２乃至２９へ示した。

[0224] この結果、実施例１乃至実施例４では培地組成物中にては６日間培養の後も浮遊状態であった。一方で実施例５および比較例３乃至比較例５の培地組成物では、全てのスフェアは沈降しており、更にスフェア同士が凝集していた。

[0225] [表43]

		高分子	濃度 % (w／v)				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
実施例	1	MNC	×	○	○	○	○
	2	PNC	○	○	○	○	○
	3	CT	×	○	○	○	○
	4	DAG	○	◎	◎	◎	◎
	5	Car	×	×	×	×	×
比較例	3	Xan	×	×	×	×	×
	4	DU	×	×	×	×	×
	5	Alg	×	×	×	×	×

[0226] ［実施例１’乃至実施例４’］

製造例１乃至製造例３で調製したセルロースナノファイバーＭＮＣ、ＰＮＣ及びキチンナノファイバーへ滅菌水を加えることで、それぞれ１％（ｗ／

ｖ）水分散液を調製した。一方で、脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製：ＤＡＧ）１質量部へ９９体積部の滅菌水を加え、１２１℃、２０分間オートクレーブ処理することによって溶解および滅菌させ、１％（ｗ／ｖ）水溶液を調製した。前述にて調製した１％（ｗ／ｖ）ファイバー分散液または脱アシル化ジェランガム水溶液を用いて、終濃度が０．０１％、０．０３％、０．０６％及び０．１％（ｗ／ｖ）となるように１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（日水製薬社製、ｈｉｇｈ－ｇｌｕｃｏｓｅ）に添加し、培地組成物を調製した。

[0227] ［実施例５’、及び比較例３’乃至比較例５’］

κ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ　ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製：Ｃａｒ）、キサンタンガム（ＫＥＬＴＲＯＬ　ＣＧ、三晶株式会社製：Ｘａｎ）、ダイユータンガム（ＫＥＬＣＯ　ＣＲＥＴＥ　ＤＧ－Ｆ、三晶株式会社製：ＤＵ）、アルギン酸Ｎａ（ダックアルギン酸ＮＳＰＭ、フードケミファ社製：Ａｌｇ）１質量部へ９９体積部の滅菌水を加え、１２１℃、２０分間オートクレーブ処理することによって溶解および滅菌させ、それぞれ１％（ｗ／ｖ）多糖水溶液を調製した。前述により調製した各多糖水溶液について、実施例５乃至８と同様な操作により、１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＤＭＥＭ培地（日水製薬社製）へ終濃度０．０１％、０．０３％、０．０６％及び０．１％（ｗ／ｖ）となるように多糖水溶液を添加し、培地組成物を調製した。

[0228] ［試験例８：細胞増殖試験］

ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７（ＤＳファーマバイオメディカル社製）及びヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５（ＡＴＣＣ製）を、３３３３３細胞／ｍＬとなるように実施例１’乃至実施例５’および比較例３’乃至比較例５’にて調製した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１５０μＬになるように分注した。なお、陰性対照としてナノファイバーまたは多糖を含まない同上培地にＭＣＦ７細胞或いはＡ３７５細胞を懸濁したものを分注

した。引き続き、本プレートをCO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）内にて最大６日間静置状態で培養した。２日間及び６日間培養後の培養液に対して、ＡＴＰ試薬１５０μＬ（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くことで生細胞の数を測定した。

[0229] その結果、ＰＮＣ、ＭＮＣ、ナノキチンを含む当該培地組成物で細胞凝集塊の大きさが過剰になることなく、均一に分散された状態にて培養することが可能であり、効率的に増殖することが確認された。一方、アルギン酸ナトリウムを含む当該培地組成物では、増殖促進を認めなかった。ＭＣＦ７細胞の静置培養２日間および６日間後のＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表４４乃至表４７、および６日間後のＲＬＵ値を図３０乃至図３３に、Ａ３７５細胞の結果を表４８乃至表５１、および６日間後のＲＬＵ値を図３４乃至図３７に示す。２日間培養の凝集塊の顕微鏡観察において、ＭＣＦ７細胞の結果を図３８に、Ａ３７５細胞の結果を図３９に示す。

[0230] [表44]

MCF７	培養日数	高分子濃度 ％（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例1'	2	9192	14688	15735	17096	17114
	6	7134	18829	21113	22987	22863
比較例5'	2	9192	10795	11016	11027	11947
	6	7134	9052	8727	7751	10444

[0231]

[表45]

MCF7	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例2'	2	8324	14836	16139	15188	15292
	6	7213	21391	20795	19498	19912
実施例3'	2	8324	13563	14601	14760	15125
	6	7213	19340	19997	20439	21883

[0232] [表46]

MCF7	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例4'	2	10137	12454	13639	13424	9490
	6	9221	16246	18949	20341	16391
実施例5'	2	10137	10018	10714	11446	11888
	6	9221	5175	9414	9271	9191

[0233] [表47]

MCF7	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
比較例3'	2	9915	11163	12016	11867	11501
	6	9201	10180	11686	12727	13678
比較例4'	2	9915	13354	13490	15527	15857
	6	9201	19364	19965	20615	21895

[0234] [表48]

A375	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例1'	2	31487	38387	39421	39260	39514
	6	49234	110943	113026	119850	125918
比較例5'	2	31487	30733	29778	29299	32224
	6	49234	46701	42424	43863	52514

[0235]

[表49]

A375	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例2'	2	30087	35275	35385	35648	35637
	6	50280	111250	130356	146403	153298
実施例3'	2	30087	36297	38784	37907	37408
	6	50280	112508	111581	123872	132729

[0236] [表50]

A375	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
実施例4'	2	32553	41656	41349	43184	41347
	6	43620	81160	80734	103404	122478
実施例5'	2	32553	28039	29995	31168	30212
	6	43620	33578	31297	40548	36972

[0237] [表51]

A375	培養日数	高分子濃度 %（w／v）				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
比較例3'	2	29361	30417	28822	25348	23952
	6	38820	37202	38083	38340	38566
比較例4'	2	29361	34219	29473	34592	35261
	6	38820	54749	57507	68100	82009

[0238] ［試験例９：３Ｔ３－Ｌ１細胞を用いた保存試験］

マウス前駆脂肪細胞株３Ｔ３－Ｌ１（ＡＴＣＣ社製）を、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を用いて１０ｃｍポリスチレンシャーレ上に播種し、５％CO_2、３７℃に設定したインキュベーター内で培養した。３Ｔ３－Ｌ１細胞がコンフルエントになった状態で、培地を吸引除去し、Ｄ－ＰＢＳ（和光純薬社製）でＦＢＳを取り除き、０．２５％Ｔｒｙｐｓｉｎ及び１ｍＭＥＤＴＡ含有液１ｍｌ（和光純薬社製）を上記ポリスチレンシャーレに添加した。細胞の剥離を確認した後、１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を添加してシャーレから細胞を回収し、遠心分離管に移した。３００×ｇで遠心分離をした後、上清を取り除いた。約１００×10^4細胞／ｍＬの細胞懸濁液として、１

．５ｍＬマイクロチューブに１００μＬの細胞懸濁液を添加し、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含むように予め調製しておいた実施例１乃至実施例２、実施例４乃至実施例５、比較例３および比較例５の培地組成物を１００μＬずつ添加し、ピペッティングすることにより細胞懸濁液を作製した。

密閉状態で室温下にて１０日間静置状態で保存し、３日、１０日間経過後の細胞懸濁液の一部を１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地で１／１０希釈し、希釈した細胞懸濁液１００μＬにＡＴＰ試薬１００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ，　Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、１５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くことで生細胞の数を測定した。陰性対照は多糖を含まない培地のみのサンプルとした。

[0239] その結果、陰性対照または比較例３および比較例５の培地組成物の各細胞生存率は、３乃至１０日間の室温保存でＡＴＰ値が顕著に低下したのに対し、実施例１乃至実施例２および実施例４の培地組成物では、ＡＴＰ値の低下が抑えられており細胞保護効果を示した。生細胞数の結果を表５２に示す。

[0240] [表52]

		多糖類	濃度	ＲＬＵ値（生細胞数）		
				０日目	３日後	１０日後
陰性対象		－	０％	１０６０１６	３４９６５	１３０６９
実施例	１	ＭＮＣ	０．０３％	－	６２６２７	３６０４６
	２	ＰＮＣ	０．０３％	－	５９７２３	３２４３６
	４	ＤＡＧ	０．０１５％	－	７５４９３	４９９５２
比較例	３	Ｘａｎ	０．０３％	－	４０６６７	１３４４１
	５	Ａｌｇ	０．０３％	－	４７０６８	８８３４

[0241] ［試験例１０：ＣＨＯ－Ｋ１細胞を用いた保存試験］

チャイニーズハムスター卵巣株ＣＨＯ－Ｋ１－ｈＩＦＮβ細胞（北九州高等専門学校、川原教授より譲渡）を、１０％ＦＢＳ含有Ｆ１２培地を用いて１０ｃｍポリスチレンシャーレ上に播種し、５％CO_2、３７℃に設定したインキュベーター内で培養した。ＣＨＯ－Ｋ１－ｈＩＦＮβ細胞がコンフルエ

ントになった状態で、培地を吸引除去し、Ｄ－ＰＢＳ（和光純薬社製）でＦＢＳを取り除き、０．２５％Ｔｒｙｐｓｉｎ及び１ｍＭＥＤＴＡ含有液１ｍｌ（和光純薬社製）を上記ポリスチレンシャーレに添加した。細胞の剥離を確認した後、１０％ＦＢＳ含有Ｆ１２培地を添加してシャーレから細胞を回収し、遠心分離管に移した。３００Ｘｇで遠心分離をした後、上清を取り除いた。約５ｘ１０^{6}細胞／ｍＬの細胞懸濁液として、１．５ｍＬマイクロチューブに２５μＬの細胞懸濁液を添加し、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含むように予め調製しておいた実施例２、実施例４の培地組成物を２５μＬずつ添加し、ピペッティングすることにより細胞懸濁液を作製した。密閉状態で室温下にて１日間保存後の細胞懸濁液の一部を１０％ＦＢＳ含有Ｆ１２培地で１／１０希釈し、希釈した細胞懸濁液１００μＬにＡＴＰ試薬１００μＬ（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くことで生細胞の数を測定した。陰性対照は多糖を含まない培地のみのサンプルとした。

[0242] その結果、陰性対照での各細胞生存率は、１日間室温で保存するとＡＴＰ値が低下したのに対し実施例２および実施例４の培地組成物では、播種時レベルのＡＴＰ値を示し、細胞保護効果を示した。生細胞数の結果を表５３に示す。

[0243] [表53]

	多糖類	濃度	ＲＬＵ値（生細胞数）	
			０日目	１日後
陰性対照	－	０％	１０９３７６	８７０３１
実施例２	ＰＮＣ	０．１％	－	１０８６６６
実施例４	ＤＡＧ	０．０３％	－	９５０２８
		０．１％	－	１１１３８３

[0244] ［試験例１１：３Ｔ３－Ｌ１細胞を用いた保存試験、多糖類の濃度変更］

マウス前駆脂肪細胞株３Ｔ３－Ｌ１（ＡＴＣＣ社製）を、１０％ＦＢＳ含

有ＤＭＥＭ培地を用いて１０ｃｍポリスチレンシャーレ上に播種し、５％CO_2、３７℃に設定したインキュベーター内で培養した。３Ｔ３－Ｌ１細胞が４０％コンフルエントになった状態で、培地を吸引除去し、Ｄ－ＰＢＳ（和光純薬社製）でＦＢＳを取り除き、０．２５％Ｔｒｙｐｓｉｎ及び１ｍＭＥＤＴＡ含有液１ｍｌ（和光純薬社製）を上記ポリスチレンシャーレに添加した。細胞の剥離を確認した後、１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を添加してシャーレから細胞を回収し、遠心分離管に移した。３００×ｇで遠心分離をした後、上清を取り除いた。約100×10^4細胞／ｍＬの細胞懸濁液として、１．５ｍＬマイクロチューブに１００μＬの細胞懸濁液を添加し、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含むように予め調製しておいた実施例２及び実施例４、比較例５の多糖類の濃度の異なる培地組成物を１００μＬずつ添加し、ピペッティングすることにより細胞懸濁液を作製した。

密閉状態で室温下にて８日間静置状態で保存し、０日、５日、８日間経過後の細胞懸濁液の一部を１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地で１／５希釈し、希釈した細胞懸濁液１００μＬにＡＴＰ試薬１００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ，　Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し懸濁させ、１５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くことで生細胞の数を測定した。陰性対照は多糖を含まない培地のみのサンプルとした。

[0245] その結果、陰性対照または比較例５の培地組成物の各細胞生存率は、５乃至８日間の室温保存でＡＴＰ値が顕著に低下したのに対し、実施例２および実施例４の培地組成物では、ＡＴＰ値の低下が抑えられており細胞保護効果を示した。生細胞数の結果を表５４に示す。

[0246]

[表54]

		多糖類	濃度%	RLU値（生細胞数）		
				0日目	5日後	8日後
陰性対象		—	0	99550	38344	34158
実施例	2	PNC	0.015	—	55431	57008
			0.03	—	76226	72182
			0.05	—	70520	47521
	4	DAG	0.015	—	67938	61719
			0.03	—	61126	—
			0.05	—	65334	55547
比較例	5	Alg	0.015	—	35927	26641
			0.03	—	43659	40677
			0.05	—	49629	44898

[0247] ［試験例１２：ＭＤＣＫ細胞の細胞生存作用に対する効果］

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて１０％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥＭＥＭ培地（和光純薬社製）に終濃度０．００５％（ｗ／ｖ）および０．０１５％の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物あるいは脱アシル化ジェランガムを含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）イヌ腎臓尿細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１５日間継続した。２、６、９、１２、１５日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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くことで生細胞の数を測定した。

[0248] その結果、本発明の培地組成物を用いてＭＤＣＫ細胞を低接着プレート上で培養すると、生細胞数の減少を抑えることが明らかとなった。各培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５５に示す。

[0249] [表55]

培養時間（日）	未添加	脱アシル化ジェランガム（０．００５％）	脱アシル化ジェランガム（０．０１５％）
2	23453	25309	26069
6	15839	17643	26602
9	9939	14552	26668
12	9833	12409	26210
15	10374	13152	29512

[0250] ［試験例１３：Ｖｅｒｏ細胞の細胞生存作用に対する効果］

脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を０．３％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。本溶液を用いて５％（ｖ／ｖ）胎児ウシ血清を含むＥｍｅｄｉｕｍ１９９培地（シグマ社製）に終濃度０．００５％（ｗ／ｖ）および０．０１５％の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物あるいは脱アシル化ジェランガムを含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）サル腎臓上皮細胞株Ｖｅｒｏ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムを添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１５日間継続した。２、６、９、１２、１５日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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くことで生細胞の数を測定した。

[0251] その結果、本発明の培地組成物を用いてＶｅｒｏ細胞を低接着プレート上で培養すると、生細胞数の減少を抑えることが明らかとなった。各培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５６に示す。

[0252] [表56]

培養時間（日）	未添加	脱アシル化ジェランガム（0．005%）	脱アシル化ジェランガム（0．015%）
2	17518	17870	16940
6	12970	13298	13472
9	9500	12560	13097
12	8702	10039	14053
15	6934	9207	14910

[0253] ［試験例１４：ＭＤＣＫ細胞増殖作用に対する各基材の効果］

製造例２で調製したセルロースナノファイバー（ＰＮＣ）、キチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ（ビンフィス）　２質量%、株式会社スギノマシン）および脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を１%（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）に終濃度０．０１%（ｗ／ｖ），０．０３%，０．１%のセルロースナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地に終濃度０．０１%（ｗ／ｖ），０．０３%，０．１%のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）に終濃度０．００５%（ｗ／ｖ），０．０１５%，０．０３%，０．０６%，０．１%の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処

理）イヌ腎臓尿細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記のそれぞれの基材を添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１４日間継続した。３、７、１０、１４日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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くことで生細胞の数を測定した。

[0254] その結果、本発明の培地組成物である脱アシル化ジェランガム、ナノセルロースファイバーＰＮＣ、そしてキチンナノファイバーを用いてＭＤＣＫ細胞を低接着プレート上で培養すると、すべての基材添加でＭＤＣＫ細胞の増殖促進作用が認められた。その中でキチンナノファイバーが最も強い効果を示した。各培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５７に示す。

[0255]

[表57]

	3日目	7日目	10日目	14日目
未添加	6945	7388	7611	10225
脱アシル化ジェランガム 0．005%	7389	9039	10981	16549
脱アシル化ジェランガム 0．015%	7735	10467	14369	21255
脱アシル化ジェランガム 0．03%	7943	21459	30706	38572
脱アシル化ジェランガム 0．06%	7538	17257	31697	44346
脱アシル化ジェランガム 0．1%	6696	15065	27092	35897
ナノセルロースPNC 0．01%	7622	14815	22065	34661
ナノセルロースPNC 0．03%	7795	17250	29732	44805
ナノセルロースPNC 0．1%	7406	15408	27157	41852
キチンナノファイバー 0．01%	8777	21536	42566	54671
キチンナノファイバー 0．03%	8886	28311	44933	58338
キチンナノファイバー 0．1%	8621	29025	45074	59755

[0256] ［試験例１５：ＭＤＣＫ増殖作用に対するキチンナノファイバーの効果］

製造例１で調製したセルロースナノファイバー（ＰＮＣ）、キチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ（ビンフィス）　２質量%、株式会社スギノマシン）および脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を１%（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。無血清培地ＫＢＭ２２０培地に終濃度０．０００１%（ｗ／ｖ），０．０００３%，０．００１%，０．００３%，０．０１%，０．０２%，０．０３%のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）に終濃度０．００５%（ｗ／ｖ），０．０１５%，０．

０３％の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）イヌ腎臓尿細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムあるいはキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１４日間継続した。５、９、１２、１５日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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３点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0257] その結果、本発明の培地組成物である脱アシル化ジェランガムおよびキチンナノファイバーを用いてＭＤＣＫ細胞を低接着プレート上で培養すると、両方の基材添加でＭＤＣＫ細胞の増殖促進作用が認められた。その中でキチンナノファイバーは０．０００１％以上の濃度で増殖促進効果を示し、特に０．００１％以上で高い効果を示した。各培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５８に示す。

[0258]

[表58]

	5日目	9日目	12日目	15日目
未添加	30616	22182	32644	27527
脱アシル化ジェランガム 0．005%	36600	32749	49935	54224
脱アシル化ジェランガム 0．015%	44682	54161	71837	85747
脱アシル化ジェランガム 0．03%	35918	43907	55424	64556
キチンナノファイバー 0．0001%	44955	42380	55915	55612
キチンナノファイバー 0．0003%	61972	66269	75845	81075
キチンナノファイバー 0．001%	72036	93296	114045	122244
キチンナノファイバー 0．003%	78232	108468	140210	146761
キチンナノファイバー 0．01%	74018	104834	148507	156114
キチンナノファイバー 0．02%	84482	113526	160236	168680
キチンナノファイバー 0．03%	84062	127656	174498	173008

[0259] ［試験例１６：ＭＤＣＫ細胞増殖作用に対するキチンナノファイバーの効果］

初回培養；

製造例２で調製したセルロースナノファイバー（ＰＮＣ）、キチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ（ビンフィス）　２質量%、株式会社スギノマシン）を１%（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。無血清培地ＫＢＭ２２０培地に終濃度０．０１%（ｗ／ｖ）のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）およびキチンナノファイバーを含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）イヌ腎臓尿

細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、７５００細胞／ｍＬとなるように上記のキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、三角フラスコ１２５ｍｌ（コーニング社製、＃４３１４０５）に１フラスコ当たり３０ｍＬになるように分注した。フラスコは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、６日間継続した。０、６日目の培養液をピペットで懸濁した後に１００μＬを３点分注し、それぞれにＡＴＰ試薬１００μＬ（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、培地のみの発光置を差し引くことで生細胞の数を測定した。

[0260] 継代培養；

継代培養に対する効果を確認するために、０．０１％キチンナノファイバーを含む培地でＭＤＣＫ細胞を６日間培養した細胞懸濁液を用いて検討した。細胞懸濁液３ｍｌと未添加培地組成物２７ｍｌを混合しキチンナノファイバー濃度を０．００１％にした細胞懸濁液と、細胞懸濁液３ｍｌと終濃度０．０１％（ｗ／ｖ）のキチンナノファイバーを添加した培地組成物２７ｍｌを混合しキチンナノファイバー濃度を０．０１％にした細胞懸濁液を、それぞれ三角フラスコ１２５ｍｌに分注した。フラスコは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、１４日間継続した。０、７、１４日目の培養液をピペットで懸濁した後に１００μＬを３点ずつ分注し、それぞれにＡＴＰ試薬１００μＬ（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３点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0261] その結果、本発明の培地組成物であるキチンナノファイバーを用いてＭＤＣＫ細胞を三角フラスコ上で培養すると、ＭＤＣＫ細胞の増殖促進作用が認められた。さらにキチンナノファイバーを含有する培地を継ぎ足すと、ＭＤＣＫ細胞の増殖が認められ、トリプシンなどの処理無しに簡便に継代培養が出来ることが明らかとなった。初回培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表５９に、継代培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表６０に示す。

[0262] [表59]

	０日目	６日目
キチンナノファイバー０．０１％	１２８５３	２８８２６

[0263] [表60]

	０日目	７日目	１４日目
キチンナノファイバー０．００１％	２４２８	１１４６１	１８６４１
キチンナノファイバー０．０１％	２５５３	１３９８１	３４３９７

[0264] ［試験例１７：各培地におけるキチンナノファイバーのＭＤＣＫ細胞の増殖促進作用の比較］

製造例１で調製したセルロースナノファイバー（ＰＮＣ）、キチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ（ビンフィス）　２質量％、株式会社スギノマシン）および脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を１％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後、９０℃にて加熱しながらの撹拌により溶解し、本水溶液を１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）あるいはＣｏｓｍｅｄｉｕｍ　０１２培地（コスモバイオ社製）に終濃度０．００１％（ｗ／ｖ）、０．０１％のキチンナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地あるいはＣｏｓｍｅｄｉｕｍ　０１２培地に終濃度０．０１５％（

ｗ／ｖ）、 ０．０３％の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）イヌ腎臓尿細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガムあるいはキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１２日間継続した。４、８、１２日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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３点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0265] その結果、本発明の培地組成物である脱アシル化ジェランガムおよびキチンナノファイバーを用いてＭＤＣＫ細胞を低接着プレート上で培養すると、両方の基材添加でＭＤＣＫ細胞の増殖促進作用が認められた。その中でキチンナノファイバーは０．００１％の濃度以上でＣｏｓｍｅｄｉｕｍ０１２培地を用いた条件でも高い増殖能を示した。4日目の細胞状態について顕微鏡観察したところ、脱アシル化ジェランガムを用いた培地条件では細胞凝集塊（スフェア）が分散しているだけであるが、キチンナノファイバーを用いた培地条件ではスフェアおよび細胞がぶどうの房状に増殖している様子が観察された。ＫＢＭ２２０培地を用いた培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表６１に、Ｃｏｓｍｅｄｉｕｍ０１２培地を用いた培養でのＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表６２に示す。４日間培養の顕微鏡観察の結果を図４０に示す。

[0266]

[表61]

	4日目	8日目	12日目
未添加	23542	23441	30472
脱アシル化ジェランガム 0．015％	28314	35649	57595
脱アシル化ジェランガム 0．03％	27360	33025	53464
キチンナノファイバー 0．001％	49998	63869	120492
キチンナノファイバー 0．01％	55646	70073	131614

[0267] [表62]

	4日目	8日目	12日目
未添加	23373	23709	27167
脱アシル化ジェランガム 0．015％	27412	29959	51690
脱アシル化ジェランガム 0．03％	25382	27227	44496
キチンナノファイバー 0．001％	45617	62417	102726
キチンナノファイバー 0．01％	57318	69040	118593

[0268] ［試験例１８：キトサンナノファイバーとキチンナノファイバーのＭＤＣＫ細胞増殖作用の比較］

キトサンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ、１質量％、株式会社スギノマシン）とキチンナノファイバー（バイオマスナノファイバー　ＢｉＮＦｉ－Ｓ（ビンフィス）　２質量％、株式会社スギノマシン）及び、参考例１と同様にして脱アシル化ジェランガム（ＫＥＬＣＯＧＥＬ　ＣＧ－ＬＡ、三晶株式会社製）を１％（ｗ／ｖ）となるように超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水）に懸濁した後に９０℃にて撹拌しながら調製した水溶液をそれぞれ１２１℃で２０分オートクレーブ滅菌した。無血清培地ＫＢＭ２２０培地（コージンバイオ社製）に終濃度０．００１％（ｗ／ｖ）、０．００３％、０．０１％、０．０３％のキトサンナノファーバーあるいはキ

チンナノファイバーを添加した培地組成物、無血清培地ＫＢＭ２２０培地に終濃度０．０１５％（ｗ／ｖ）、０．０３％の脱アシル化ジェランガム添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、血清を除去した培地で１昼夜培養した（スタベーション処理）イヌ腎臓尿細管上皮細胞株ＭＤＣＫ（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を、１００００細胞／ｍＬとなるように上記の脱アシル化ジェランガム、キトサンナノファイバーあるいはキチンナノファイバーを添加した培地組成物に播種した後、９６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、＃３４７４）のウェルに１ウェル当たり１００μＬになるように分注した。各プレートは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、１２日間継続した。７、１１日目の培養液に対してＡＴＰ試薬１００μＬ（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３点の平均値として生細胞の数を測定した。

[0269] その結果、本発明の培地組成物であるキトサンナノファイバーおよびキチンナノファイバーを用いてＭＤＣＫ細胞を低接着プレート上で培養すると、脱アシル化ジェランガムよりも高い増殖促進作用が認められた。またキチンナノファイバーは０．００１％の濃度の条件でも高い増殖能を示したが、キトサンナノファイバーは０．０１％の濃度から高い増殖能を示していた。ＲＬＵ値（ＡＴＰ測定、発光強度）を表６３に示す。

[0270]

[表63]

	７日目	１１日目
未添加	３０６５３	２７０７８
脱アシル化ジェランガム０．０１５％	５１４３６	６３７９４
脱アシル化ジェランガム０．０３％	４１１４６	５１３５６
キチンナノファイバー０．００１％	８３０１３	９３６４２
キチンナノファイバー０．００３％	９２６１１	１０２６６９
キチンナノファイバー０．０１％	９１７７１	１０６４９０
キチンナノファイバー０．０３％	１１５７１０	１２６３０５
キトサンナノファイバー０．００１％	４６００９	５０５２５
キトサンナノファイバー０．００３％	４６１０３	４８０８３
キトサンナノファイバー０．０１％	８５９２２	９３８３１
キトサンナノファイバー０．０３％	１１９５６６	１２６３９５

[0271] ［試験例１９：新鮮カニクイザル初代肝細胞保存試験］

製造例２で調製したセルロースナノファイバー（ＰＮＣ）及び、実施例５と同様にしてκ－カラギーナン（ＧＥＮＵＧＥＬ　ＷＲ－８０－Ｊ、三晶株式会社製：Ｃａｒ）１質量％（ｗ／ｖ）水溶液を作製して使用した。１０％ＦＢＳ含有Ｗｉｌｌｉａｍｓ’Ｅ培地（ライフテクノロジー社製）に終濃度０．０３％（ｗ／ｖ）、０．１％のＰＮＣあるいはカラギーナンを添加した培地組成物、そして上記基材を含まない未添加培地組成物を調製した。引き続き、新鮮カニクイザル初代肝細胞（株式会社イナリサーチ社製）を、２，５００，０００細胞／mLとなるように上記のＰＮＣあるいはカラギーナンを添

加した培地組成物に混合した後、細胞凍結用Ｃｒｙｏｇｅｎｉｃ　ｖｉａｌ（サーモサイエンティフィック社製）に分注した。なお、基材を含まない同上培地にカニクイザル初代肝細胞を懸濁したものを分注した。上記の操作は２ロット実施した。引き続き、本チューブを冷蔵（約４℃）にて２日間静置状態で輸送した。２日間冷蔵条件下で輸送した後の、細胞懸濁液に対してトリパンブルー試薬（ライフテクノロジー社製）を用いて、懸濁液中の細胞生存率を測定した。

[0272] その結果、本発明の培地組成物であるＰＮＣを用いて新鮮サル初代肝細胞を冷蔵下で輸送すると、未添加条件よりも高い生存率を示した。一方、カラギーナンにはそのような作用を認めなかった。生存率を表１０に示す。

[0273] [表64]

	ロット１	ロット２
	生存率（%）	生存率（%）
未添加	４８	４１
ＰＮＣ ０．０３%	６２	４８
ＰＮＣ ０．１%	６２	５６
カラギーナン ０．０３%	３７	３５
カラギーナン ０．１%	４２	２３

[0274] ［試験例２０：再播種後の増殖性評価］

マウス前駆脂肪細胞株３Ｔ３－Ｌ１（ＡＴＣＣ社製）を、１０%ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を用いて１０ｃｍポリスチレンシャーレ上に播種し、５%CO_2、３７℃に設定したインキュベーター内で培養した。３Ｔ３－Ｌ１細胞がコンフルエントになった状態で、培地を吸引除去し、Ｄ－ＰＢＳ（和光純薬社製）でＦＢＳを取り除き、０．２５%Ｔｒｙｐｓｉｎ及び１ｍＭＥＤＴＡ含有液１ｍｌ（和光純薬社製）を上記ポリスチレンシャーレに添加した。細

胞の剥離を確認した後、１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を添加してシャーレから細胞を回収し、遠心分離管に移した。３００×ｇで遠心分離をした後、上清を取り除いた。約２００×１０^{4}細胞／ｍＬの細胞懸濁液として、１．５ｍＬマイクロチューブに１５０μＬの細胞懸濁液を添加し、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含むように予め調製しておいた実施例２（ＰＮＣ濃度０．０６％）乃至実施例４（ＤＡＧ濃度０．０３％）、比較例５（ＡＩｇ濃度０．０３％）の培地組成物および陰性対照として１０体積％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を１５０μＬずつ添加し、ピペッティングすることにより細胞懸濁液（約１００×１０^{4}細胞／ｍＬ）を作製した。

[0275] 密閉状態で室温下にて７日間静置状態で保存した後、細胞懸濁液の一部を１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地で希釈し、７日間保存前の播種濃度を基準として約１０×１０^{4}細胞／ｍＬの細胞懸濁液を調製した。９６穴マルチプレート（コーニング社製）へ１００μＬずつ細胞懸濁液を播種し、播種当日、１日後および２日後にＡＴＰ試薬１００μＬ（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ，Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加して１５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（ｎ＝５）し、培地のみの発光値を差し引くことで生細胞の数を測定した。

[0276] その結果、７日間保存後の再播種当日の陰性対照または比較例５の培地組成物の生細胞数（ＲＬＵ値）は、実施例２乃至実施例４の培地組成物と比較して著しく低い結果となった。再播種一日後の生細胞数（ＲＬＵ値）は実施例２及び実施例４それぞれ再播種当日と比較して増加しており、保存後の細胞も増殖性を保持していた。生細胞数の結果を表６５に示す。

[0277]

[表65]

		多糖類	濃度	ＲＬＵ値（生細胞数）	
				再播種当日	１日後
陰性対象		－	０％	１７４９	６８４５
実施例	２	ＰＮＣ	０．０３％	１３７１７	２０２８２
	４	ＤＡＧ	０．０１５％	１４７７０	２２５８８
比較例	５	Ａｌｇ	０．０３％	７４６６	１４４０７

産業上の利用可能性

[0278] 本発明に係る培地組成物は、優れた細胞及び／又は組織浮遊効果を示し、動植物由来の細胞及び／又は組織をその機能を維持しながら大量に培養する際に極めて有用である。また、本発明の方法により培養された細胞及び／又は組織は、化学物質、医薬品等の薬効及び毒性評価や、酵素、細胞増殖因子、抗体等の有用物質の大量生産、疾患や欠損により失われた器官、組織、細胞を補う再生医療等の分野において極めて有用である。

[0279] 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。

[0280] 本出願は日本で出願された特願２０１４－０１０８４２（出願日：２０１４年１月２３日）、特願２０１４－１２３７７２（出願日：２０１４年６月１６日）、特願２０１４－１７４５７４（出願日：２０１４年８月２８日）、及び特願２０１４－２１７７６１（出願日：２０１４年１０月２４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。

請求の範囲

[請求項1] 細胞または組織を浮遊させて培養できる培地組成物であって、ナノファイバーを含有することを特徴とする、培地組成物。

[請求項2] 培養時の培地組成物の交換処理及び培養終了後において細胞または組織の回収が可能である請求項１に記載の培地組成物。

[請求項3] 細胞または組織の回収の際に、温度変化、化学処理、酵素処理、せん断力のいずれも必要としない請求項１に記載の培地組成物。

[請求項4] 粘度が、８ｍＰａ・ｓ以下であることを特徴とする請求項１に記載の培地組成物。

[請求項5] 前記ナノファイバーの平均繊維径が０．００１～１．００μｍ、平均繊維径（Ｄ）に対する平均繊維長（Ｌ）の比（Ｌ／Ｄ）が２～５００であることを特徴とする請求項１に記載の培地組成物。

[請求項6] 前記ナノファイバーが高分子化合物から構成されることを特徴とする請求項１に記載の培地組成物。

[請求項7] 前記高分子化合物が、多糖類であることを特徴とする請求項６に記載の培地組成物。

[請求項8] 前記多糖類が、

セルロース、キチン及びキトサンからなる群から選択されるいずれかの非水溶性多糖類；又は

ヒアルロン酸、ジェランガム、脱アシル化ジェランガム、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、ザンタンガム、ヘキスロン酸、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ラムナン硫酸、アルギン酸及びそれらの塩からなる群から選択される水溶性多糖類

を含む、請求項７に記載の培地組成物。

[請求項9] 前記多糖類が、セルロース又はキチンを含む、請求項８に記載の培地組成物。

[請求項10] 前記ナノファイバーが、粉砕により得られたものであることを特徴とする請求項９に記載の培地組成物。

[請求項11] 細胞培養用である、請求項１乃至１０のいずれか１項に記載の培地組成物。

[請求項12] 前記細胞が、接着細胞または浮遊細胞であることを特徴とする請求項１１に記載の培地組成物。

[請求項13] 前記接着細胞が、スフェアであることを特徴とする請求項１２に記載の培地組成物。

[請求項14] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物と、細胞又は組織とを含む、細胞又は組織培養物。

[請求項15] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で細胞または組織を培養することを特徴とする、細胞又は組織の培養方法。

[請求項16] 請求項１４に記載の培養物から細胞または組織を分離することを特徴とする、細胞又は組織の回収方法。

[請求項17] 前記分離が、遠心分離で行われることを特徴とする請求項１６に記載の回収方法。

[請求項18] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で接着細胞を培養することを特徴とするスフェアの製造方法。

[請求項19] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物を調製するための培地添加剤であって、当該ナノファイバー又は当該ナノファイバーを構成する水溶性高分子化合物を含むことを特徴とする培地添加剤。

[請求項20] 請求項１９に記載の培地添加剤と培地を混合することを特徴とする培地組成物の製造方法。

[請求項21] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物の製造方法であって、当該ナノファイバー又は当該ナノファイバーを構成する水溶性高分子化合物と培地を混合することを特徴とする培地組成物の製造方法。

[請求項22] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で細胞または組織を保存することを特徴とする、細胞又は組織の保存方法。

[請求項23] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で細胞または組織を輸送することを特徴とする、細胞又は組織の輸送方法。

[請求項24] 請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で細胞または組織を培養することを特徴とする、細胞又は組織の増殖方法。

[請求項25] 以下の工程を含む、接着細胞の継代培養方法：

（１）請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物中で接着細胞を浮遊培養すること；及び

（２）培養容器からの細胞の剥離操作を行うことなく、（ｉ）工程（１）の浮遊培養により得られた接着細胞を含む培養物に、新鮮な請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物を添加するか、或いは（ｉｉ）新鮮な請求項１乃至１３のいずれか１項に記載の培地組成物へ、工程（１）の浮遊培養により得られた接着細胞を含む培養物の全部又は一部を添加すること。

[請求項26] キチンナノファイバーを含有する培地組成物中で接着細胞を該キチンナノファイバーに付着した状態で浮遊培養することを含む、接着細胞の増殖方法。

[請求項27] 培地組成物中のキチンナノファイバーの含有量が、０．０００１％（重量／容量）以上、０．１％（重量／容量）以下である、請求項２６記載の方法。