發明專利說明書

※申請案號：094124484　　※I P C 分類：

一、發明名稱：

使用人類臍帶血清的細胞培養基及方法

二、中文發明摘要：

一種人類骨髓幹細胞的培養方法，其步驟包含配製一包含有人類臍帶血清的細胞培養基，接著將一欲進行培養的人類骨髓幹細胞移入該細胞培養基中，最後於適合該人類骨髓幹細胞生長的預設條件下，進行培養並使其增殖。根據本發明所指出之培養方法，其細胞培養基中可進一步包含一生長因子。本發明人類骨髓幹細胞的培養方法，不但可顯著地促進細胞生長，且經本發明培養方法增殖培養後的人類骨髓幹細胞，亦具有良好的可分化性，極適合於被應用在醫療上。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（　　）圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於一種幹細胞的培養方法，特別是有關於一種應用含有人類臍帶血清之細胞培養基來培養幹細胞的方法。

【先前技術】

[0002] 幹細胞(Stem Cell)係為生物體內尚未分化的原生細胞，其具有可以長時間地不斷複製、更新，並分化衍生成具有特殊型態和功能的成熟細胞之能力。一般來說，人類幹細胞的來源主要可分成胚胎幹細胞（其係取自於不孕症治療後剩餘的胚胎、懷孕終止的胚胎原始生殖細胞，或由細胞融合所得）及組織幹細胞（其係取自於從成熟個體組織所分離之骨髓、周邊血液、肝臟、皮膚等，或胎盤/臍帶中之血液幹細胞；亦或運用體細胞融合技術所得）兩種。幹細胞依其分化能力，目前主要可分成三大類，一為全能性的幹細胞(totipotent stem cells)，就是具有完全能力，可分化發育成為完整胚胎或生物體；二為多能性的幹細胞(pluripotent stem cells)，這是具有多種能力，但無法發育成為完整胚胎或生物體，而可形成某種組織或器官之所有細胞；三為複效性幹細胞(multipotent stem cells)，包括特定組織之幹細胞，如神經幹細胞、血球幹細胞、肝臟幹細胞、皮膚幹細胞等。

[0003] 人類幹細胞目前已可被應用於作為藥物開發（設計、篩選、作用機制、安全性測試），產生特定細胞或組織，或作為細胞、組織之移植、更新（包括疾病醫療、再生醫學、組織工學、老人醫學等）等。此外，人類幹細胞也可被應用於作為基因表現、細胞分化、疾病機制與癌症之研究和治療上。

[0004] 由於一般人對於幹細胞的提供意願不高，為了能將這些數量有限的人類幹細胞運用在醫學治療及研究上，因此發展對已取得之人類幹細胞進行增殖的培養技術，便成為一個極為重要的課題。習知要在生物體外培養細胞，必需為這些細胞提供適當的生長環境，並以適當的細胞營養液提供細胞生長所需的養分，而在習知的營養液中最常被使用的是動物血清。血清是指去除細胞及血小板後的血液，動物血清中包含許多可供細胞成長及存活所需之物質。習知血清的種類和品質對於細胞的生長會產生極大的影響，來自不同物種的血清，其所包含之內容物的成份及量上都有所不同，因此當血清使用錯誤時，常會造成細胞

無法存活。

[0005] 於習知技術中，人類幹細胞通常培養在含有動物胎兒血清（例如：胎牛血清(Fetal Calf Serum, FCS)）的培養基中。此種利用胎牛血清培養幹細胞的方法，已經廣為該領域習知技藝者所使用，且係為美國食品藥物管理局(FDA)所認可之幹細胞培養的操作程序。雖然胎牛血清已廣泛被使用於培養幹細胞，但若將這些以胎牛血清培養之人類幹細胞使用在人體身上，則有可能因動物胎兒血清中所含有的非人體蛋白質，而誘發人體產生過敏反應，且如果胎牛血清中帶有病毒及其他病原菌（例如：狂牛蛋白(prion)），則會使植入該幹細胞的病患處於被感染源感染的危險下。

[0006] 為避免因使用非人類血清培養幹細胞所產生之可能的免疫反應與感染等問題，因此便有人提出使用成人血清或人工合成血清來取代動物胎兒血清，將其用於人類幹細胞之培養上。然而，血清的成份非常複雜，它包含蛋白質、生長因子、激素、類脂、代謝物、無機鹽等，而血清的品質也受動物的健康、年齡、營養等影響而有所不同；現今之生物醫學技術，尚無法對動物及人類血清之所有組成物質及功能具有完整之了解，因此成人血清由於其所處生長時期、目的及功用的不同，故可能缺乏某些供幹細胞生長所需之重要物質，因此其促進人類幹細胞生長之效果並不顯著；此外，關於人工合成血清的使用，其亦具有相同的問題。

[0007] 諸如此類的問題，使得人類幹細胞在疾病治療的應用上受到了極大的限制。是以如何開發出一種排除病毒及其他病原菌感染，且可有效促進人類幹細胞生長的培養方法，已成為幹細胞醫療相關技術研發之主要課題。

【發明內容】

[0008] 因此，本發明即致力於解決上述先前技術的缺點。為解決前述習知技術之問題，本發明之目的即在於提供一種應用含有人類臍帶血清之細胞培養基，以培養人類骨髓幹細胞的方法，藉此當應用經培養後的該人類骨髓幹細胞於治療人類疾病時，可避免因使用非人類血清所引起的過敏反應及感染病毒或病原菌的危險。

[0009] 為達成本發明之目的，根據本發明所指出之一種人類骨髓幹細胞的培養方法，其步驟包含：(a)配製一細胞培養基，其中該細胞培養基包含有一人類臍帶血清；(b)將一欲進行培養的人類骨髓幹細胞移入該細胞培養基中；以及(c)於適合該人類骨髓幹細胞生長的預設條件下進行培養並使其增殖。

[0010] 本發明人類骨髓幹細胞的培養方法中，所使用之細胞培養基中可進一步包含一營養添加物，例如荷爾蒙、蛋白質、生物激素或生長因子等，但並不僅限於此。其中，可應用於本發明中的該生長因子，在此可舉出的例子包含血小板生長因子(PDGF)、上皮細胞生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)與類胰島素生長因子(IGF－1)等，但並不僅限於此。

[0011] 根據本發明所指出之人類骨髓幹細胞的培養方法，具有比使用非人類血清的培養方法更佳之生長效果。由於本發明之人類骨髓幹細胞的培養方法中，細胞培養基係使用人類臍帶血清為原料，因此該細胞培養基不但是安全衛生的，且係可以方便獲得。此外，所培養生長之骨髓幹細胞尚具有良好的生長狀態等優點。

[0012] 本發明人類骨髓幹細胞的培養方法可使人類骨髓幹細胞保持完整之可分化性，而不影響其後續之分化作用。

[0013] 此外，本發明人類骨髓幹細胞之培養方法為使用胎兒出生時之人類臍帶血清，因此可使藉由本發明方法進行培養之人類骨髓幹細胞得以於近似胎兒出生時之條件及狀態下繁殖及複製，因而所培養的人類骨髓幹細胞具有旺盛之生長力及發展性。再者，根據本發明所培養之人類骨髓幹細胞由於具有良好的可分化性，因此極適合被應用於細胞移植等醫學治療上。

【實施方式】

[0014] 根據本發明所述之人類骨髓幹細胞的培養方法，其係先配製一含有人類臍帶血清的細胞培養基，該培養基可藉由習知的細胞培養基之配方來配製，但將其中所含有之習用動物血清（例如：胎牛血清）以人類臍帶血清來替代。可應用於本發明中的細胞培養基，在此可舉出的例子包含MEM培養基(Mimimum Essential Medium, MEM)、α－MEM培養基(α－MEM)、BME培養基(Basal Media Eagle, BME)、DMEM培養基(Dulbecco's modified Eagle's modium, DMEM)、MEM/F12培養基、Ham's F10培養基、Ham's F12培養基、RPMI 1640培養基(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)與Medium 199培養基等，但並不僅限於此。另外，為使本發明人類骨髓幹細胞的培養方法於操作時，能獲致較佳之幹細胞增殖培養效果，上述該細胞培養基中的人類臍帶血清之含量較佳為5~30%(v/v)，更佳為6~20%(v/v)。

[0015] 一般而言，各種培養基成份相似，皆富含四個基本要素，包含胺基酸、碳水化合物、無機鹽類及維生素。因此，本發明人類骨髓幹細胞的培養方法中所使用之細胞培養基，亦可進一步包含一可促進人類骨髓幹細胞生長之營養添加物，可應用於本發明中之營養添加物，在此可舉出的例子包含荷爾蒙、蛋白質、生物激素、抗生素與生長因子等，但並不僅限於此。上述可應用於本發明中之生長因子，並沒有特別地限制，只要是任何習知可被應用於細胞培養上、可用以促進人類骨髓幹細胞生長，且符合相關醫療衛生法規規範者之生長因子，皆可被應用於本發明中，在此可舉出的例子，包含血小板生長因子(PDGF)、上皮細胞生長因子(EGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)與類胰島素生長因子(IGF－1)等，但並不僅限於此。此外，本發明所使用的培養基中，亦可進一步包含做為酸鹼指示劑的酚紅(Phenol Red)，藉以判定培養基中的pH值是否維持在正常範圍內。為有效維持培養基之酸鹼性，本發明培養基中亦可進一步包含一酸鹼緩衝劑，在此可舉出的例子包含碳酸氫鈉($NaHCO_3$)，但並不僅限於此。

[0016] 之後，將欲進行培養的人類骨髓幹細胞移入上述配製好之細胞培養基中。接著，將此含有人類骨髓幹細胞之細胞培養基，置於適合該人類骨髓幹細胞生長的預設條件下進行培養使其增殖，藉此即可有效的增殖該人類骨髓幹細胞。

[0017] 熟習本發明技術領域之技藝者，亦可根據本發明說明書所載之內容而輕易推知，除人類骨髓幹細胞可藉由本發明培養方法進行培養外，其他習知的人類幹細胞亦可藉由本發明培養方法進行培養。這些習知的幹細胞依其來源可分為胚胎幹細胞及組織幹細胞等。做為胚胎幹細胞的例子，包含不孕症治療後剩餘的胚胎、懷孕終止的胚胎原始生殖細胞，以及由細胞融合所得之胚胎幹細胞，但並不僅限於此。做為組織幹細胞的例子，包含自成熟個體的骨髓、周邊血液、肝臟及皮膚組織中所分離出之幹細胞，以及自胎盤或臍帶中所分離出之血液幹細胞。

[0018] 上述適合該人類骨髓幹細胞生長的該預設條件，係指適合該人類骨髓幹細胞生長之培養溫度及培養基的上部氣體組成。前述之培養溫度於本發明中並沒有特別的限制，其可依所培養之幹細胞種類加以調整，一般來說為使所培養之幹細胞有較好之生長狀態，培養溫度較佳係在32~42℃之間，更佳在35~39℃之間。該培養基的上部氣體可使用一般習知培養幹細胞之氣體組成，其包含氧氣及二氧化碳，但並不僅限於此，但為使所培養之幹細胞有較好之生長狀態，培養基上部氣體中的氧氣含量較佳係在90~100%(v/v)之間，二氧化碳含量較佳係在0~10%(v/v)之間。

[0019] 本發明將藉由參考下列的實施例做進一步的說明，這些實施例並不限制本發明前面所揭示之內容。熟習本發明所屬技術領域之技藝者，可做些許之改良與修飾，但仍不脫離本發明之範疇。

[0020] 配製含人類臍帶血清之細胞培養基為獲得進行測試之人類臍帶血清，在此係藉由將一不含有抗凝血劑之針管插入人類臍帶中，吸取所需的臍帶血。接著，將此臍帶血離心（3000rpm, 10分鐘）後，取其上清液於56℃下煮30分鐘，然後過濾(0.22μm)做為後續使用。

[0021] 另外，依照習知方法及配方配製DMEM培養基，然後再加入上述製備完成之人類臍帶血清於該基本的DMEM培養基中，做為後續細胞培養之應用。

[0022] 細胞生長情況比較將欲進行增殖培養之人類骨髓幹細胞分別移至下列四種DMEM細胞培養基中進行培養，以比較人類骨髓幹細胞之生長情形。此四種培養基分別為：(a)不含血清(Serum Free)之DMEM細胞培養基，以下簡稱為SF培養基；(b)含10%的胎牛血清(Fetal Calf Serum)之DMEM細胞培養基，以下簡稱為FCS培養基；(c)含10%的人類臍帶血清(human Umbilical Cord Serum)之DMEM細胞培養基，以下簡稱為hUCS培養基；以及(d)含10%的人類臍帶血清與10ng/ml的上皮細胞生長因子(EGF)和鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)之DMEM細胞培養基，以下簡稱為hUCS＋培養基。於進行培養的初始時，移入至各培養基中的細胞濃度分別為50細胞/平方公分。之後，將培養基置於37℃、95%空氣和5%二氧化碳的條件下，讓細胞生長。分別於移入三天及七天後以顯微鏡觀察細胞生長狀況，其結果如第一圖所示。

[0023] 參閱第一圖，於此四種不同培養基中生長之人類骨髓幹細胞，其於形狀外觀上並無太大差異。

[0024] 另外，分別計算於移入三天及七天後之細胞密度，其結果如第二圖所示。參閱第二圖，人類骨髓幹細胞於相同的培養條件下，hUCS培養基組，及hUCS＋培養基組的幹細胞生長密度顯著高於SF培養基組和FCS培養基組（約高2倍），其中又以hUCS＋培養基組具有最高的生長密度。

[0025] 由此結果可得知，人類臍帶血清確實可獲致較胎牛血清更佳的人類骨髓幹細胞增殖生長促進效果，且生長因子之加入亦具有進一步促進之效果。

[0026] 生長細胞的性質比較將實施例二中經以FCS培養基和hUCS＋培養基培養所得之人類骨髓幹細胞，分別以含有2mM二胺次乙基四醋酸(ethyenediamine tetraacetate, EDTA)的磷酸緩衝食鹽水(PBS)，使幹細胞自培養皿表面分離。再以含有2%牛血清蛋白(BSA)和0.1%三氮化鈉(NaN_3)的磷酸緩衝食鹽水(PBS)沖洗。將經沖洗後的幹細胞分別與抗體CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、HLA－ABC或HLA－DR進行反應，上述抗體上均預先結合有異構硫氰酸鹽螢光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)或藻紅素(phycoerythrin, PE)。最後，再使用流式細胞儀做檢測並分析上述幹細胞的表面抗原。其分析結果如第三圖、第四圖及第五圖所示。

[0027] 參閱第三圖，其係為分別以兩種不同培養基培養後所得之幹細胞的大小及顆粒性比較。從圖中可以看出，此兩種不同培養基培養後所得之幹細胞，經分析後其前方散射光（Forward Scattering, FSC,代表細胞大小）及側方散射光（Side Scattering, SSC,代表細胞顆粒性）大致上具有相同的性質。

[0028] 參閱第四圖及第五圖，其分別為以FCS培養基和hUCS＋培養基培養所得之人類骨髓幹細胞的表面抗原檢測圖。從第四圖與第五圖的比較可知，以hUCS＋培養基培養所得之人類骨髓幹細胞，可獲得和以FCS培養基培養所得者，具有相近的表面抗原表現型態。

[0029] 因此，綜合此三圖之分析結果可知，將欲進行增殖培養的人類骨髓幹細胞，以hUCS＋培養基培養後，可獲得與以FCS培養基培養所得者，具有相似的細胞大小、顆粒性及表面抗原之表現型態，此顯示人類臍帶血清確實可用以取代胎牛血清，被應用於幹細胞的培養上。

[0030] 細胞分化能力比較配製骨質細胞生成培養基【含有0.1μmol/l腎上腺皮質酮(dexamethasone)、10mmol/l β－磷酸甘油(β－glycerol phosphate)及50μmol/l抗壞血酸鹽(ascorbate)的DMEM培養基】並將其分成兩組，其中一組添加10%胎牛血清(FCS)，而另一組添加10%人類臍帶血清和生長因子(hUCS＋)。之後，分別於上述兩組培養基中移入5×10^3細胞/平方公分之人類骨髓幹細胞，並進行培養。於培養三週後以Aliarin Red S染劑染色檢測鈣的沉積，確認上述人類骨髓幹細胞分化成骨質細胞之能力，其結果如第六圖所示。

[0031] 參閱第六圖，該hUCS＋培養基組中的細胞染色範圍較FCS培養基組中的大且顏色較深；其染色結果代表以hUCS＋培養基培養的細胞之分化情況較佳。亦即，人類骨髓幹細胞經以含有人類臍帶血清之培養基培養後與以含有胎牛血清之培養基培養者相比，具有較佳的幹細胞分化結果。由此可知，於已知相同的促進分化條件下，以人類臍帶血清培養之人類骨髓幹細胞，具有比習用以胎牛血清者較佳的促進人類骨髓幹細胞於體外分化成骨質細胞之能力。

[0032] 配製脂肪細胞生成培養基【含有1μmol/l腎上腺皮質酮(dexamethasone)、5μg/ml胰島素(insulin)、0.5mmol/l異丁基甲基花黃素(isobutylmethylxanthine)及60μmol/l吲哚美洒辛(indomethacin)的DMEM培養基】並將其分成兩組，其中一組添加10%胎牛血清(FCS)，而另一組添加10%人類臍帶血清和生長因子(hUCS＋)。之後，分別於上述兩組培養基中移入5×10^3細胞/平方公分之人類骨髓幹細胞，並進行培養。於培養三週後以Oil Red O染劑染色檢測油滴的生成，確認上述人類骨髓幹細胞分化成脂肪細胞之能力，其結果如第七圖所示。

[0033] 參閱第七圖，該hUCS＋培養基組中的細胞染色數目較FCS培養基組中的多；其染色結果代表以hUCS＋培養基培養的細胞之分化情況較佳。亦即，人類骨髓幹細胞經以含有人類臍帶血清之培養基培養後與以含有胎牛血清之培養基培養者相比，具有較佳的幹細胞分化結果。由此可知，於已知相同的促進分化條件下，以人類臍帶血清培養之人類骨髓幹細胞，具有比習用以胎牛血清者較佳的促進人類骨髓幹細胞於體外分化成脂肪細胞之能力。

[0034] 配製神經細胞生成培養基【含有1mmol/l β－乙基硫醇(β－mercaptoethanol)及5ng/ml鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)的DMEM培養基】並將其分成兩組，其中一組添加10%胎牛血清(FCS)，而另一組添加10%人類臍帶血清和生長因子(hUCS＋)。之後，分別於上述兩組培養基中移入5×10^3細胞/平方公分之人類骨髓幹細胞，並進行培養。於培養七日後以免疫染色檢測神經細胞標誌，確認上述人類骨髓幹細胞分化成神經細胞之能力，其結果如第八圖所示。

[0035] 參閱第八圖，其染色結果代表此兩種培養基培養的細胞之分化情況幾乎相同。亦即，人類骨髓幹細胞經以含有人類臍帶血清之培養基培養後可與以含有胎牛血清之培養基培養者，具有相似的幹細胞分化結果由此可知，於已知相同的促進分化條件下，以人類臍帶血清培

養之人類骨髓幹細胞，具有和習用以胎牛血清者相同的促進人類骨髓幹細胞於體外分化成神經細胞之能力。

[0036]綜上所述，由骨質細胞、脂肪細胞與神經細胞的分化結果均顯示，人類臍帶血清確實可用以取代胎牛血清，被應用於幹細胞的分化培養上。

[0037]動物體內分化再生效果比較首先對成年大鼠進行血管結紮手術，使其腦部缺血產生中風症狀，然後將經以FCS培養基或以hUCS＋培養基培養所得之人類骨髓幹細胞與不含幹細胞的載體，移植入大鼠腦中，然後於細胞移植後第7、14、21、28天進行大鼠的神經行為量測，其結果如第九圖所示。

[0038]參閱第九圖，經上述兩種培養基培養增殖之人類骨髓幹細胞所移植的老鼠相較於僅植入載體的老鼠，在第14、21、28天後，於所減少的體型不對稱性（如第九a圖所示），垂直運動數目（如第九b圖所示），垂直運動時間（如第九c圖所示），垂直活動度（如第九d圖所示）等行為特性上，皆有顯著的差異，且以hUCS＋培養基培養所得之人類骨髓幹細胞，具有與習知以FCS培養基培養所得之人類骨髓幹細胞相同之效果。

[0039]因此，由上述結果可知，經以含有生長因子及人類臍帶血清的hUCS＋培養基所培養之人類骨髓幹細胞，可以和習知的以含有胎牛血清的FCS培養基所培養之人類骨髓幹細胞一樣，於動物體內進行再生醫療之行為，並且具有相同之活體內醫療效用。

【圖式簡單說明】

[0041]第一圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於三天後及七天後之生長狀態照相圖；(A)三天後之生長狀態；(B)七天後之生長狀態FCS含胎牛血清之培養基hUCS含人類臍帶血清之培養基hUCS＋含人類臍帶血清與生長因子之培養基SF不含血清之培養基第二圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於三天後及七天後之細胞密度比較圖；a：三天後；b：七天後第三圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於流式細胞儀檢測細胞大小及顆粒之比較圖；(A)含胎牛血清之培養基(B)含人類臍帶血清與生長因子之培養基第四圖 為以含胎牛血清之培養基培養的人類骨髓幹細胞於流式細胞儀檢測細胞表面抗原之結果圖；(A)CD13；(B)CD29；(C)CD44；(D)CD73；(E)CD90；(F)CD105；(G)HLA－ABC；(H)HLA－DR第五圖 為以含人類臍帶血清與生長因子之培養基培養的人類骨髓幹細胞於流式細胞儀檢測細胞表面抗原之結果圖；(A)CD13；(B)CD29；(C)CD44；(D)CD73；(E)CD90；(F)CD105；(G)HLA－ABC；(H)HLA－DR第六圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於體外促進骨質生成分化之結果染色圖；(A)含胎牛血清之培養基(B)含人類臍帶血清與生長因子之培養基第七圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於體外促進脂肪生成分化之結果染色圖；(A)含胎牛血清之培養基(B)含人類臍帶血清與生長因子之培養基第八圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞於體外促進神經生成分化之結果染色圖；以及GFAP：膠質原纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)NF－200：神經絲蛋白(neurofilament)MAP－2：微管結合蛋白(microtubule－associated protein 2)TUJ－1：β微管蛋白Nestin：中間絲蛋白質第九圖 為以不同培養基培養的人類骨髓幹細胞移植於動物體內醫療改善效果之比較圖。

[0042](A)運動恢復比例；(B)垂直運動數目(C)垂直運動時間；(D)垂直活動度▲：含人類臍帶血清與生長因子之培養基■：含胎牛血清之培養基◆：對照組

【主要元件符號說明】

[0040]

七、申請專利範圍：

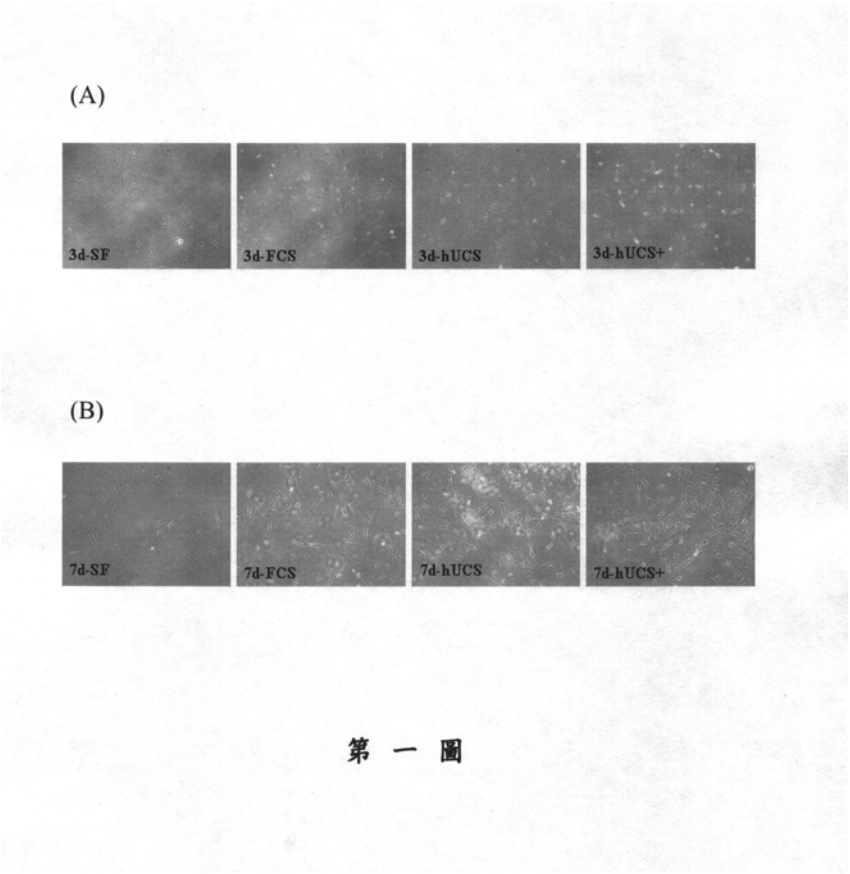
1.一種細胞培養基，係包含：DMEM培養基，包含：0.1μmol/l腎上腺皮質酮、10mmol/lβ-磷酸甘油、及50μmol/l抗壞血酸鹽；以及進一步包含：10%人類臍帶血清、10ng/ml的上皮細胞生長因子(EGF)、及10ng/ml鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)，俾使該細胞培養基使人類骨髓幹細胞分化成骨質細胞。

2.一種細胞培養基，係包含：DMEM培養基，包含：1μmol/l腎上腺皮質酮、5μg/ml胰島素、0.5mmol/l異丁基甲基花黃素、及60μmol/l吲哚美洒辛；以及進一步包含：10%人類臍帶血清、10ng/ml的上皮細胞生長因子(EGF)、及10ng/ml鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)，俾使該細胞培養基使人類骨髓幹細胞分化成脂肪細胞。

3.一種使用人類臍帶血清的方法，係使用如申請專利範圍第1項所述之細胞培養基，使人類骨髓幹細胞分化成骨質細胞。

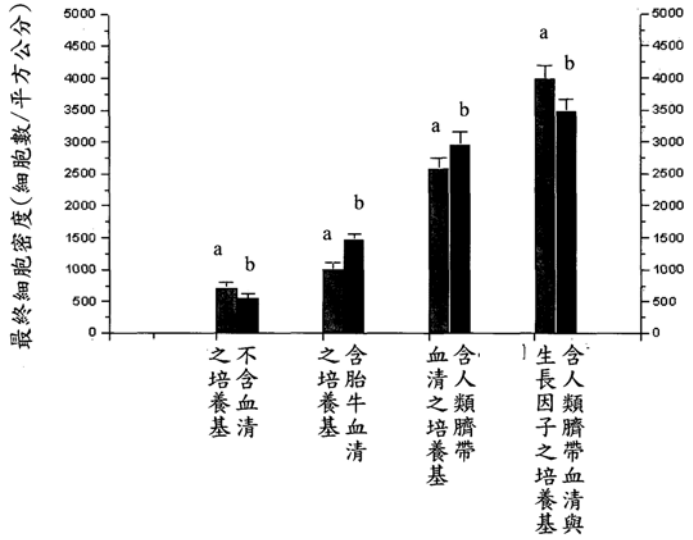
4.一種使用人類臍帶血清的方法，係使用如申請專利範圍第2項所述之細胞培養基，使人類骨髓幹細胞分化成脂肪細胞。

八、圖式：



第 一 圖

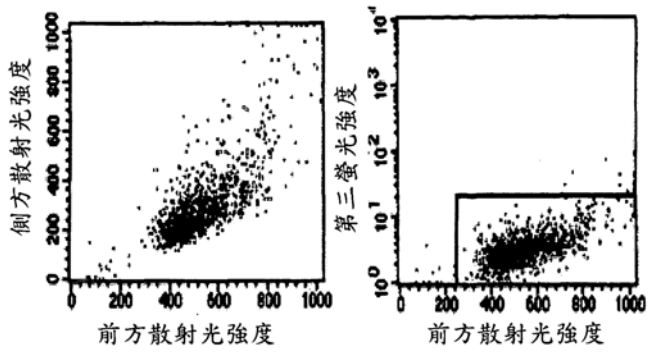
第一圖



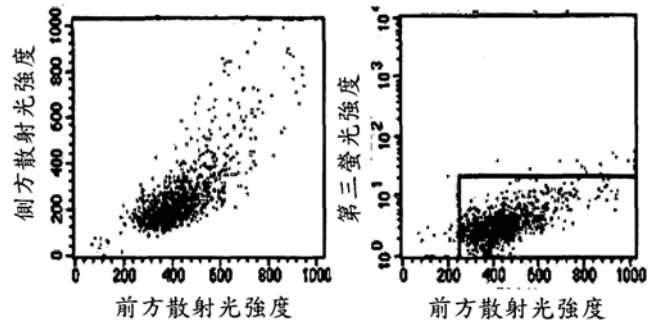
第 二 圖

第二圖

(A)

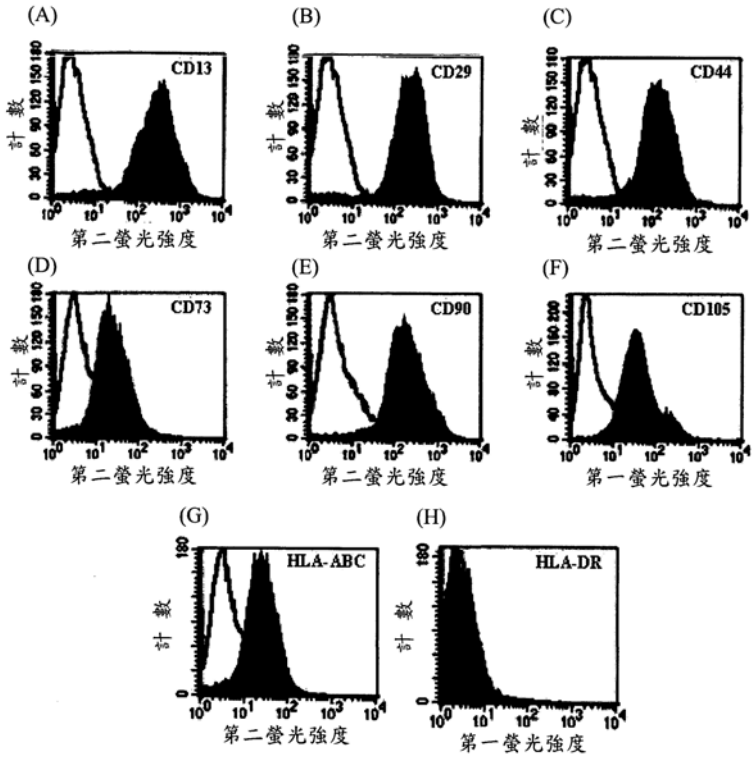

側方散射光強度
前方散射光強度
第三螢光強度
前方散射光強度

(B)


側方散射光強度
前方散射光強度
第三螢光強度
前方散射光強度

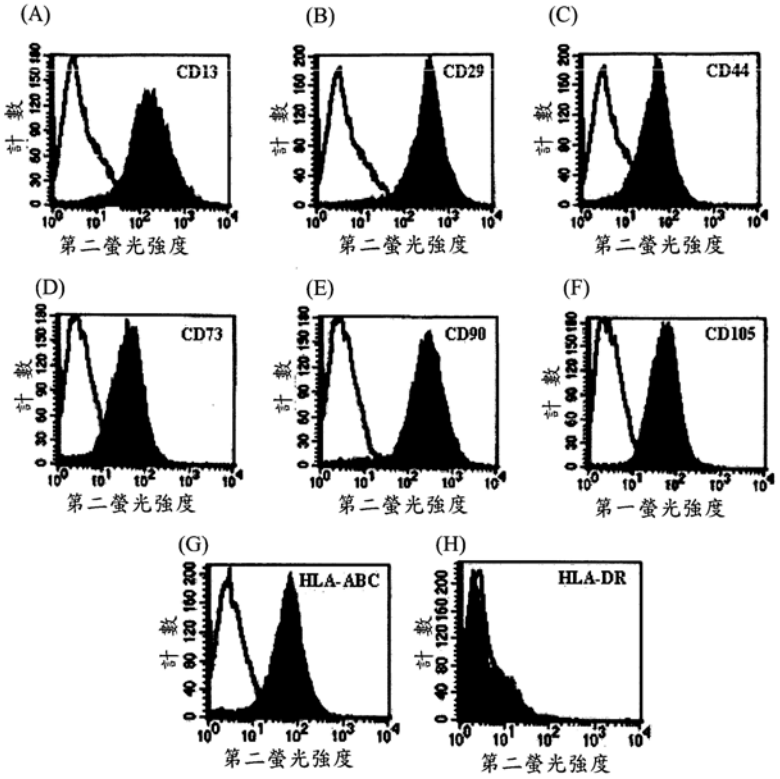
第 三 圖

第三圖


(A)
CD13
計數
第二螢光強度
(B)
CD29
計數
第二螢光強度
(C)
CD44
計數
第二螢光強度
(D)
CD73
計數
第二螢光強度
(E)
CD90
計數
第二螢光強度
(F)
CD105
計數
第一螢光強度
(G)
HLA-ABC
計數
第二螢光強度
(H)
HLA-DR
計數
第一螢光強度

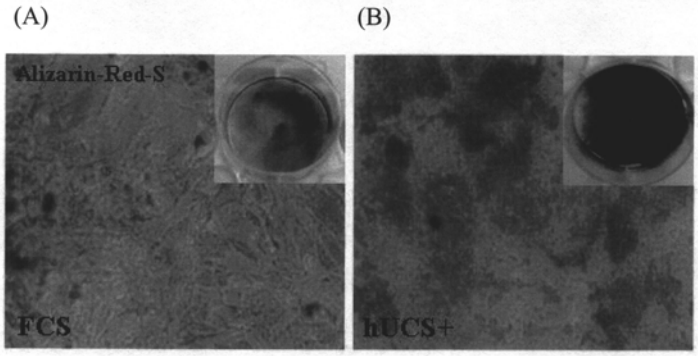
第 四 圖

第四圖


(A)
CD13
計數
第二螢光強度
(B)
CD29
計數
第二螢光強度
(C)
CD44
計數
第二螢光強度
(D)
CD73
計數
第二螢光強度
(E)
CD90
計數
第二螢光強度
(F)
CD105
計數
第一螢光強度
(G)
HLA-ABC
計數
第二螢光強度
(H)
HLA-DR
計數
第二螢光強度

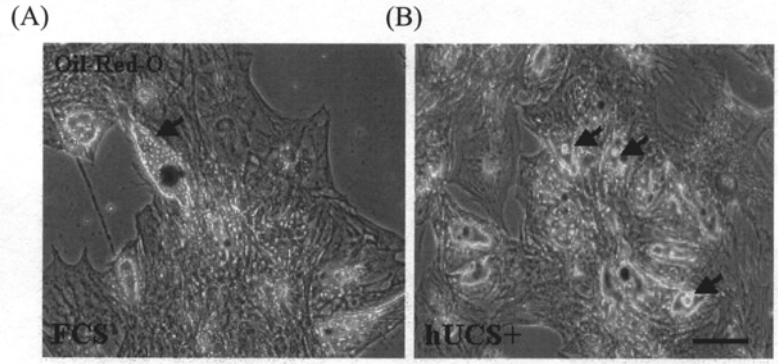
第 五 圖

第五圖



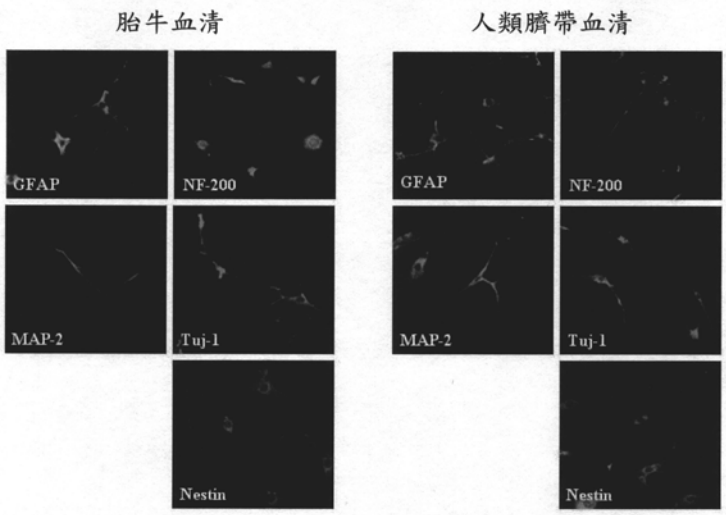
第 六 圖

第六圖



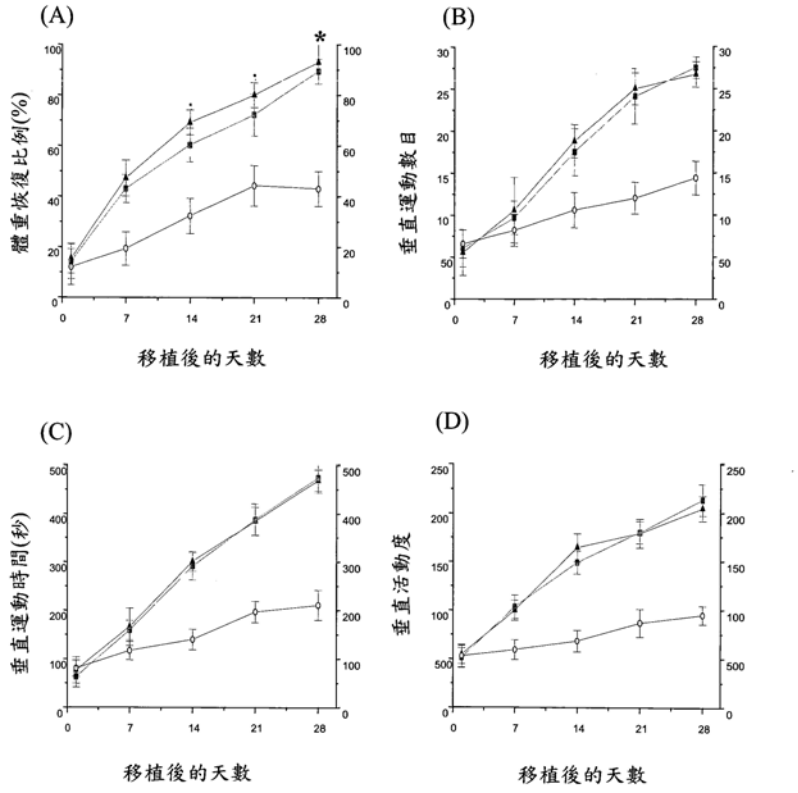
第 七 圖

第七圖


胎牛血清
人類臍帶血清
GFAP
NF-200
MAP-2
Tuj-1
Nestin
GFAP
NF-200
MAP-2
Tuj-1
Nestin

第 八 圖

第八圖


(A)
體重恢復比例(%)
移植後的天數
(B)
垂直運動數目
移植後的天數
(C)
垂直運動時間(秒)
移植後的天數
(D)
垂直活動度
移植後的天數

第 九 圖

第九圖