

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5620631号
(P5620631)

(45) 発行日 平成26年11月5日(2014.11.5)

(24) 登録日 平成26年9月26日(2014.9.26)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 11/02 (2006.01) C 1 2 N 11/02 Z NM
C 1 2 M 3/00 (2006.01) C 1 2 M 3/00 A

請求項の数 5 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-123189 (P2008-123189)	(73) 特許権者	000006035 三菱レイヨン株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号
(22) 出願日	平成20年5月9日(2008.5.9)	(72) 発明者	福場 芳則 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイ ヨン株式会社中央技術研究所内
(65) 公開番号	特開2009-100 (P2009-100A)	(72) 発明者	加茂 純 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイ ヨン株式会社中央技術研究所内
(43) 公開日	平成21年1月8日(2009.1.8)	(72) 発明者	山本 康哲 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社横浜技術研究所内
審査請求日	平成22年2月18日(2010.2.18)		
審判番号	不服2013-10051 (P2013-10051/J1)		
審判請求日	平成25年5月31日(2013.5.31)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-137048 (P2007-137048)		
(32) 優先日	平成19年5月23日(2007.5.23)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養用足場材料、その製造方法、細胞培養用モジュール

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

親水化処理された中空系膜と、ガス分離機能を有する三層複合中空系膜とがメッシュ状に配置され、該メッシュ上に、単繊維の直径が1～1000nmのナノファイバーが配置された、細胞培養足場材料。

【請求項2】

1～2mm間隔で中空系膜がメッシュ状に配置されている、請求項1記載の細胞培養足場材料。

【請求項3】

ナノファイバーとして、ポリアクリロニトリル系重合体を用いた、請求項1又は2記載の細胞培養足場材料。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞培養足場材料を用いた、細胞培養用モジュール。

【請求項5】

中空系膜両端の中空系膜中空部の開口部と、該開口部に繋がるポート部とを有する、請求項4記載の細胞培養用モジュール。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬品、化学物質、化粧品等の物質の薬効試験、毒性試験、安全性試験を、容易かつ迅速に行うための細胞培養用足場材料、その製造方法、及びこの細胞培養用足場材料を用いた細胞培養用モジュールに関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、医薬品、化学物質、化粧品等の、人体に影響を及ぼす可能性のある物質については、薬効試験、毒性試験、安全性試験が必要とされ、通常これらの試験には種々の動物を用いた動物実験が行われている。しかし、動物実験はヒトと動物種の違いや、動物の個体差を考慮しなければならず、データの信頼性の点から、多くの実験を繰り返す必要があり、それに伴い経費や試験時間を要するとともに、試験に供する多数の動物の確保や飼育する場所と手間がかかるなどの問題があった。特に、薬物の代謝系がヒトに近いとされているブタのような大型の動物を大量に共試することは、実質的に不可能である。さらに最近では、動物実験においても動物愛護の機運が高まりつつあり、以上のような問題の解決策として、動物の培養細胞を用いた評価試験法、すなわち動物実験代替法が開発されている。

10

【0003】

生体外で細胞を効率的に培養するためには、培養細胞に栄養と空気（酸素）を補給する必要がある。その例として、中空系膜を用いて細胞培養に必要な栄養分や空気（酸素）を供給する手法が提案されている（特許文献1）。これによれば、選択透過性を有する中空系膜とガス透過性を有する中空系膜を用いることにより、培養液と酸素を細胞培養空間に供給することが開示されている。しかしながら、細胞培養の効率は高まるものの培養液体中に細胞が存在するため、有用物質の生産等には好適であるが、培養細胞が組織を形成することが難しく、動物実験代替法には適用することは困難であった。

20

【0004】

動物細胞、特に付着性動物細胞を高密度で培養する方法として、半透膜機能を有する中空繊維と繊維状細胞支持体を用いた細胞培養器が提案されている（特許文献2）。しかしながら、用いる中空繊維は細胞の産生するタンパク様物質を透過しない半透膜であるため、細胞の代謝物等のモニタリングには好ましくない。また、繊維状細胞支持体は細胞培養容器に固定された状態で中空繊維の間隙に配置されているため、培養細胞への中空繊維からの栄養分補給や代謝老廃物の回収効率に劣るものであった。

30

【0005】

細胞組織体の形成を促進するため、中空系の内腔または外腔に遠心力を用いて細胞を高密度に充填し、かつ中空系を利用して酸素や栄養分の供給、代謝老廃物の除去が提案されている（特許文献3）。しかしながらこの方法では、充填した細胞と中空系が直接接するため、中空系表面が細胞吸着によって閉塞し、酸素や栄養の供給、代謝老廃物の除去が不十分であるという問題があった。

【0006】

近年、ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーを、細胞培養や組織形成の足場材料として用いることが注目されており（非特許文献1、非特許文献2）、例えば、溶融紡糸によって作製されたナノファイバーを足場材料に用いる方法が開示されている（特許文献4）。また、有機系ナノファイバーを溶媒に分散した混合液を利用してナノファイバーのパターンを形成し、さらには細胞培養に有効な機能性薬剤をこのパターンに吸着させることにより、細胞の接着、増殖、分化を制御する方法が提案されている（特許文献5）。しかしながら、これらの方法では、細胞の成育に必要な栄養分や空気（酸素）を補給することまでは考慮されていなかった。

40

【0007】

培養液を供給する中空系と、細胞を培養するための不織布などの多孔性担体を有する細胞培養用モジュールは、既に提案されている（特許文献6）。しかしながらこの方法は、中空系モジュール内に多孔性担体が配置されるだけであり、必ずしも培養液を供給する中空系と多孔性担体が近接していないため、細胞分泌物は保持しやすいが、栄養の補給効率

50

が悪く、代謝老廃物の除去は全く不十分であった。

【0008】

さらに、多孔質中空系膜の内腔に細胞を充填し、栄養分とともに中空系外部に化学物質や薬剤などの被験物質を流し、被験物質の細胞による代謝や代謝速度をモニタリングする試験方法および装置が知られている（特許文献7）。しかしながらこの方法では、充填した細胞と中空系が直接接するため、やはり中空系表面が細胞吸着によって閉塞し、酸素や栄養の供給、代謝老廃物の除去が不十分となるという問題があった。

【0009】

【特許文献1】特許第3026516号

【特許文献2】特開2002-112763号

【特許文献3】特許第3725147号

【特許文献4】特開2006-254722号

【特許文献5】特開2007-44149号

【特許文献6】特開2003-180334号

【特許文献7】特開2000-189189号

【非特許文献1】高分子, 55, 3, 142 (2006)

【非特許文献2】Tissue Eng., 11, 101 (2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、上記に挙げた課題を解決しようとするものであり、細胞培養において、十分な栄養分や空気（酸素）の供給、代謝老廃物の除去、細胞増殖促進能を有する細胞培養用足場材料、その製造方法、及びこの足場材料を用いた細胞培養用モジュールを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、中空系膜がメッシュ状に配置され、該中空系膜外表面上及び/又は該中空系膜間に、単繊維の直径が1~1000nmのナノファイバーが配置された、細胞培養足場材料に関する。

さらに本発明は、メッシュ状に配置した中空系膜をノズルとターゲットの間に配置して、ナノファイバーをエレクトロスピニングする、上記細胞培養足場材料の製造方法に関する。

また本発明は、上記の細胞培養足場材料を用いた、細胞培養用モジュールに関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、効率的に細胞を培養することが可能であることに加え、その代謝老廃物をオンラインでモニタリングすることも可能であり、化学物質や薬物などの動物代替実験法などによる試験を効率的に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明の好適な実施の形態について説明する。

本発明の細胞培養用足場材料は、メッシュ上に配置した中空系膜上、あるいは中空系膜で形成されたメッシュの空隙部内に、単繊維の直径が1~1000nmのナノファイバーを配置したものである。

【0014】

中空系膜の膜基材ポリマーとしては、中空系膜状に成形できるものであればよく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアリルスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアクリロニトリル、セルロースアセテート、ポリフッ化ビニリデン、2種類以上のポリマーの混合物等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0015】

中空系膜の外径は、50 μm 以上3000 μm 以下が好ましく、100 μm 以上2000 μm 以下がより好ましい。このような範囲を超えた場合、外径が50 μm 未満の場合は、中空系膜の中空部分が小さくなるために、例えば培養液を送液する際の差圧が大きくなり、代謝老廃物の除去が不十分になるなどの問題が生じるおそれがあり、外径が3000 μm 以上になると、単位体積に占める中空系膜の表面積が小さくなるため、例えば培養細胞への栄養供給やガス供給が不十分になるおそれがある。

【0016】

中空系膜の膜厚は、5 μm 以上500 μm 以下が好ましい。膜厚が5 μm 以下の場合、栄養供給やガス供給の際の加圧により中空系膜が破壊するおそれがあり、膜厚が500 μm 10

10 μm 以上の場合には過抵抗が大きくなり、培養細胞への栄養供給やガス供給、代謝老廃物の除去が不十分になるおそれがある。なお、中空系膜が多層膜である場合の膜厚は、各層の膜厚の総和（全層の膜厚）である。

中空系膜の内径は、中空系膜の外径と膜厚によるため一概には言えないが、通常10 μm 以上である。

【0017】

中空系膜としては、精密ろ過膜、限外ろ過膜、ガス分離膜などを用いることができる。これらは必要に応じて適宜選択することができるが、例えば精密ろ過膜を用いることにより培養細胞に栄養分を補給することができ、ガス分離膜を用いることにより培養細胞に酸素を含むガスを供給することができる。

【0018】

特定の物質を細胞に供給したり、特定の代謝老廃物を除去したりするために、物質選択透過性を有する中空系膜を用いることができる。この物質選択透過性を有する中空系膜としては、上述の精密ろ過膜や限外ろ過膜を挙げることができ、さらに、膜素材そのものに物質選択透過性を有する中空系膜や、中空部分に選択透過性を有する物質が充填された多孔質中空系膜を挙げることができる。

このような物質選択透過性を有する中空系膜を用いることによって、培養液中の特定成分や化学物質や薬物などの被験物質を培養細胞に効率的に供給することが可能となり、老廃物や代謝物を系外に排出させて、これをモニタリングすることも可能となる。

【0019】

培養細胞に効率的に空気、酸素、およびその他のガスを選択的に供給するため、上述のように、ガス分離膜を用いることができる。ガス供給は多孔質中空系膜を用いても可能であるが、例えばガス分離機能を有する非多孔性の基材を、多孔性の基材で支持した中空系膜等が好適である。このようなガス分離機能を有する中空系膜を用いることにより、培養液中にバブルレスでガスを供給できるので、培養細胞へのダメージを防止できる。また、培養液などの液体が中空系の中空部分に入り込んで中空部を閉塞することを防止することができる。

【0020】

本発明においては、親水化処理された中空系膜を用いることができる。中空系膜を親水化処理することにより、培養液などの液体成分の供給を容易にすることができ、中空系膜表面への細胞接着を制御することができる。中空系膜を親水化処理する方法としては、例えば中空系膜をエチレン-ビニルアルコール共重合体などの親水性高分子や、グリセリン、エタノールで処理することが挙げられる。

【0021】

本発明の細胞培養用足場材料では、2種類以上の中空系膜を用いることもできる。例えば、栄養を供給するための精密ろ過膜、気体を供給するためのガス分離膜、特定の成分を培養細胞に供給したりあるいは特定成分の代謝老廃物を排出するための物質選択透過性中空系膜を、任意に組み合わせることができる。

【0022】

本発明で用いる中空系膜は、メッシュ状に配置する。例えば、所定の間隔でシート状に

10

20

30

40

50

配置した中空糸膜と、これに対して概ね直行する方向に所定の間隔でシート状に配置した中空糸膜を配置して、中空糸膜をメッシュ状に配置することができる。メッシュ状に配置する中空糸膜のシートの層数は特に制限されないが、2層以上10層以下が好ましい。2種類以上の中空糸膜でメッシュを形成する場合、種類の異なる中空糸膜を同一中空糸膜シート中に混在させても良いし、同一中空糸膜をシート状に配置した後に、シート状に配置した種類の異なる中空糸膜を積層することによってメッシュを形成させることも可能である。中空糸膜を介して所望の液体や気体を供給、あるいは代謝老廃物を除去するためにどのような中空糸膜のメッシュとするかは、本発明の細胞培養足場材料をモジュール化する際のポート部の設計に依存する。

【0023】

本発明ではナノファイバーを使用する。ナノファイバーの直径は1nm以上1000nm以下であり、10nm以上500nm以下が好ましく、20nm以上300nm以下がより好ましい。単繊維の直径がこのような範囲を外れた場合、1nm未満では単繊維の強度が不足するおそれがあり、1000nm以上では比表面積の効果が不十分になるおそれがある。ナノファイバーの特徴の一つは比表面積の大きさであり、単繊維の直径が小さくなるほど指数関数的に比表面積が大きくなり、吸着特性が大きくなることから、培養細胞の足場材料として好適である。ナノファイバー基材については特に制限されないが、ナノファイバー紡糸の観点からは、溶剤可溶性のポリマーが好ましい。しかし、本発明で使用するナノファイバーの紡糸方法は特に限定されるものではなく、湿式紡糸、熔融紡糸、エレクトロスピニング等の方法を適宜選択することができる。

【0024】

本発明におけるナノファイバーの単繊維の直径は、以下のようにして測定することができる。まず、ナノファイバー、またはその集合体の表面を電子顕微鏡を用いて観察する。電子顕微鏡としては、走査型電子顕微鏡(SEM)が好ましい。観察倍率は5000倍~5万倍程度である。観察倍率が5000倍未満であると、ナノファイバーの繊維径の決定が困難になる。次いで、得られたSEM写真よりナノファイバーの単繊維の直径を求める。単繊維の直径は、SEM写真中任意の20本のナノファイバー表面の幅を計測し、その平均をナノファイバー単繊維の直径とする。

単繊維の直径を求める際には、画像解析ソフトを用いることが好ましい。画像解析ソフトによって得られる単繊維の直径は、画像解析のための画質調整、画像解析ソフトの種類等によって若干変動があるが、その差は通常の実験誤差の範囲内である。

【0025】

本発明のナノファイバーには、生理活性物質を吸着または固定することにより、例えば、培養細胞の接着、増殖、分化、機能発現の制御を行うことができる。生理活性物質としては、機能性ポリマー、アミノ酸、タンパク質、糖鎖、ビタミン類などが挙げられる。特に、細胞培養に有効な生理活性物質、例えば細胞の増殖、分化、機能発現に重要な役割を有する生理活性物質の総称であるサイトカインを用いると効果的である。サイトカインとしては、インターロイキン、増血因子、増殖因子などが挙げられる。あるいは、細胞-細胞外マトリックス、細胞-細胞間の接着に關与するインテグリン、カドヘリンなどの細胞接着基質を用いることも効果的である。また、薬剤や化学物質などの被験物質をナノファイバーに吸着または固定することによって、細胞培養試験を行うことも可能である。

【0026】

メッシュ状に配置された中空糸膜の外表面上、及び/又は膜間にナノファイバーを配置し、本発明の細胞培養足場材料を得る方法としては、例えば、中空糸膜シート上あるいは中空糸膜メッシュ上にナノファイバーを配置し、この上に別の中空糸膜シートあるいは中空糸膜メッシュを積層する方法や、予めナノファイバーで覆われた中空糸膜をメッシュ状にする方法を挙げることができる。

また、本発明の細胞培養足場材料は、ナノファイバーを溶媒中に分散させた混合液を、中空糸膜メッシュ上に滴下したり、この混合液中に中空糸膜メッシュを配置、あるいは中空糸膜が浸漬された溶媒中にナノファイバーを分散させ、溶媒を除去したりすることによ

10

20

30

40

50

って、中空糸膜のメッシュ上および、または中空糸膜のメッシュの空隙内にナノファイバーを配置させることによって得ることができる。

【0027】

また、本発明の細胞培養足場材料は、複数のナノファイバーからなるシート状物をメッシュ状に配置した中空糸膜上に配置し、これを積層することによって得ることができる。このシート状物は、ナノファイバーを抄紙したり、ナノファイバーの紡糸方法の一つであるエレクトロスピンニング法を適用したりすることによって得ることができる。

このシート状物の製造方法は適宜選択することができるが、エレクトロスピンニング法を採用した場合には、ナノファイバーの紡糸と同時にシート状物の成形を行うことができる。

10

【0028】

さらに、以下に説明する通り、メッシュ状に配置した中空糸膜の存在下で、ナノファイバーを紡糸することも可能である。

従って、本発明においては、細胞培養足場材料の製造方法としてエレクトロスピンニング法を採用するのが、この製造が効率的にできる点で特に好ましい。

【0029】

ここで、エレクトロスピンニング法を用いた本発明の細胞培養足場材料の製造方法について、簡単に説明する。エレクトロスピンニング法の基本的な装置構成は、ノズル、ターゲット、直流高圧電源からなる。ノズルに紡糸原液を供給しつつ高電圧を印加すると、紡糸原液に電氣的反発力が生じ、紡糸原液がターゲットに向かって噴射され、紡糸条件が適当な場合にターゲット上にナノオーダーの繊維、すなわちナノファイバーを得ることができる。

20

【0030】

ナノファイバーを得るための紡糸条件は、ポリマーの分子量、溶媒、溶液の濃度、印加電圧、ノズルと金属コレクターとの距離等であり、これらを適宜調節する。溶液のポリマー濃度は、使用するポリマーの種類や分子量、溶媒により異なるため、一概には言えないが、ポリマー濃度があまりにも低いと生産性が低下することや、繊維状物が得られにくいことがあり、ポリマー濃度が高すぎると粘度が上昇し噴射させにくいことから、一般的には0.1~40wt%程度に調整することが好ましい。

【0031】

エレクトロスピンニング法に用いるナノファイバー基材は、溶剤に可溶性ポリマーが好ましい。エレクトロスピンニング可能なポリマーとしては、ナイロン4,6、ナイロン6、ナイロン6,6、ナイロン12、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリエーテルイミド、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリフッ化ビニリデン、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、シルク、酢酸セルロース、キトサン、コラーゲン等を挙げることができる。しかし、これらに限定されるものではなく、これらのポリマーブレンドや、無機物や炭素材料を含有させることも可能である。また、溶剤に不溶性ポリマーであっても熱可塑性ポリマーであれば、レーザーエレクトロスピンニング法を適用することも可能である。

30

40

【0032】

用いるポリマーの分子量については特に限定されることはないが、分子量が低すぎると曳糸性が低下するおそれがあり、分子量が高すぎると粘度が高くなり、紡糸が困難になるおそれがある。これらのような場合でも、ポリマー濃度を調節することによってエレクトロスピンニングを可能にすることもできる。また、添加剤を加えるなどして、紡糸原液の表面張力や導電性を調整することも可能である。

【0033】

用いる溶媒は、上記濃度でポリマーを溶解させることができれば特に限定されることはない。例えばアセトン、トリアセチン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドなどの溶剤を用いることができるが、揮発性の高い溶媒を用いると溶媒が揮発することで、

50

ノズルの先端にポリマーが詰まりやすいなどの問題が生じるおそれがある。また溶解性の向上などのため、数種類の溶媒をブレンドして用いても構わない。

【0034】

印加する電圧の好ましい範囲は用いるポリマーの種類や物性により異なるため一概には言えないが、一般的には0.1～50kVの範囲が好ましく、1kV～40kVがより好ましい。ノズルとターゲットの距離は、用いるポリマーの種類や物性や印加電圧にもよるので一概には言えないが、距離が短すぎると放電が生じ、長すぎると噴射性が悪化することなどから10mm～1000mmの範囲が好ましく、30mm～500mmとすることがさらに好ましい。ターゲットは、平板状、ロール状、エッジ状、グリッド状など特に制限はなく、ノズルとターゲットの間に中空系膜のメッシュを配置することで、中空系膜のメッシュ上および、または中空系膜のメッシュの空隙内にナノファイバーを形成することができる。

10

【0035】

例えば、中空系膜メッシュをターゲット上に配置してエレクトロスピンニングすることによって、中空系膜のメッシュ上にナノファイバーを配置したり、中空系膜のメッシュ間隔を広くすることによって、中空系膜の空隙内にもナノファイバーを配置したりすることができる。あるいは、表面または空隙にナノファイバーが配置された中空系膜のメッシュを複数積層することも可能である。さらには、メッシュ状にする前の中空系膜をノズルとターゲットの間に配置してエレクトロスピンニングを行うことにより表面をナノファイバーで覆われた中空系膜を作製し、これをメッシュ上に積層することも可能である。

20

【0036】

本発明の細胞培養用足場材料を用いて、例えば、これを容器中に液密に封入することによって、細胞培養用モジュールを得ることができる。さらに、細胞培養用モジュールに、中空系膜両端の中空系膜中空部の開口部と、この開口部に繋がるポート部を設けることによって、中空系膜から排出された老廃物や代謝物などを外部機器に導入することが可能となり、オンラインでの分析が可能になる。

【0037】

また、本発明の細胞培養用足場材料において、2種類の中空系膜として、ガス分離膜である中空系膜と物質選択透過性を有する中空系膜を用い、ガス分離膜である中空系膜の片端中空部より酸素を含むガスを供給しつつ、もう一方の端部中空部より該ガスを排出させ、かつ選択透過性を有する中空系膜の片端中空部より培養細胞の栄養を供給したり、もう一方の端部中空部より該培養細胞の老廃物や代謝物を排出させたり、これらの排出される成分をオンラインで分析したりすることにより、細胞を培養しながら連続的に細胞の生育状況を評価することも可能である。

30

【0038】

さらに、本発明の細胞培養用モジュール中に培養した細胞に被験物質を投与し、老廃物や代謝物を含む溶液を中空系膜の片端中空部より排出させ、この溶液を分析しモニタリングすることによって、被験物質を投与した場合の細胞が受けるストレスを経時的に評価することができる。

また、細胞が培養された本発明の細胞培養用モジュールにおける中空系膜の片端中空部に被験物質を供給し、もう一方の端部より老廃物や代謝物を含む溶液を排出させ、この溶液を分析しモニタリングすることによって、細胞の状態を評価することができる。

40

【実施例】

【0039】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、これらに限定されるものではない。なお、実施例中で用いた評価方法および製造装置は以下の通りである。

<製造装置>

メッシュ状の中空系膜へのナノファイバーの配置は、カトーテック製のNEUナノファイバーエレクトロスピンニングユニットを用いた。紡糸条件は、ターゲットである金属ドラムの周速度を1m/min、印加電圧を12kV、ノズル先端とターゲットの距離を120

50

mmとした。

【0040】

<ナノファイバーの観察>

ナノファイバーの観察は、日本電子(株)製の走査型電子顕微鏡JSM-6060Aを用いた。

【0041】

<ナノファイバーの単繊維の直径>

ナノファイバーの単繊維の直径は、SEM写真を画像解析ソフト((株)プラネترون製、Image-Pro Plus ver.4.5.0.24)を用いて画像解析することによって求めた。SEM写真のスケールに対して、画像解析のスケールが合うように調整した後、SEM写真中の任意の20本のナノファイバーの表面の幅を求め、その平均値をナノファイバーの単繊維の直径とした。

10

【0042】

<細胞形状の観察>

細胞形状の観察は、カールツァイス社製の共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡LSM5PASCALを用いた。

【0043】

(実施例1:細胞培養足場材料の作製)

中空系膜として、親水化された多孔質中空系膜(三菱レイヨンエンジニアリング製EX270FS)(中空系膜A)と、ガス分離機能を有する三層複合中空系膜(三菱レイヨンエンジニアリング製MHF200TL)(中空系膜B)を用いた。

20

中空系膜Aを2mm間隔で配置し、次いでこれに対して概ね直交するように中空系膜Bを2mm間隔で配置した。次に、先に配置した各中空系膜Aの間に中空系膜Aを、同様に先に配置した各中空系膜Bの間にも中空系膜を配置することにより、1mm間隔でそれぞれの中空系膜を配置し中空系膜メッシュを作製した。

この際、中空系膜Aと中空系膜Bで構成されるメッシュ部分は約20mm×20mmになるようにした。作製した中空系膜メッシュをアルミホイル上に固定し、メッシュ部分にのみナノファイバーが形成されるように、メッシュ部分以外の場所をテープで覆った後、アルミホイルとともにドラム型のターゲットに固定した。

ナノファイバー基材としては、重量平均分子量(Mw)が約350000、アクリロニトリル含量が約97%のポリアクリロニトリル系重合体を用いた。このポリアクリロニトリル系重合体をジメチルアセトアミドに10wt%になるように溶解して紡糸原液とした。この紡糸原液を18Gのノズル(ニードル)が取り付けられたシリンジ内に充填し、作製した中空系膜メッシュ上にエレクトロスピニングを行って細胞培養用足場材料を作製した。

30

エレクトロスピニングした後、エレクトロスピニングされた中空系膜メッシュを固定するため、メッシュ部分の周囲から約15mmほど離れた位置をポッティングした。ポッティングにはポリウレタン樹脂を用いた。ポリウレタン樹脂は、日本ポリウレタン工業(株)のコロネート4403とニッポラン4223を1/1(wt比)で調合したものを使用し、メッシュ部分の周囲から約15mmほど離れた位置に型枠を設けてその外側の中空系膜部分をポッティング樹脂で固めた。

40

得られた細胞培養用足場材料の光学顕微鏡写真を図1、図2に示す。図1は作製した足場材料の全体像、図2はメッシュ部分の断面写真である。

これらより、中空系膜メッシュ上にエレクトロスピニングすることにより中空系膜メッシュ上にナノファイバーが形成されていることがわかる。

図3、図4は、得られた細胞培養用足場材料の走査型電子顕微鏡で観察した写真であり、それぞれナノファイバーの表面および断面である。図3の写真から画像解析を行った結果、ナノファイバー単繊維の直径は約150nmであるとともに、図4からナノファイバー層の厚さは、5~50μmであることが分かる。

【0044】

50

(実施例 2 : 細胞培養用モジュールの作製)

中空系膜 A および中空系膜 B は実施例 1 と同じものを用いた。また、中空系膜 A を 4 mm 間隔で配置し、次いでこれに対して概ね直交するように中空系膜 B を 4 mm 間隔で配置した。次に、先に配置した各中空系膜 A の間に中空系膜 A を、同様に先に配置した各中空系膜 B の間にも中空系膜を配置することにより、2 mm 間隔でそれぞれの中空系膜を配置し、中空系膜 A と中空系膜 B で構成されるメッシュ部分を約 10 mm × 10 mm とした以外は、実施例 1 と同様にして細胞培養用足場材料を作製した。

次いで、中空系膜メッシュ部分の周囲から約 1 mm の位置から外側に幅約 5 mm で、実施例 1 と同じポッティング樹脂を用いて型枠を作製した。さらに中空系膜の先端をシリコンチューブを用いて束ね、シリコンチューブ内と束ねた中空系膜の外側を上記と同じポッティング樹脂で固め、ポート部を作製した(図 5)。

【0045】

(実施例 3 : ウシ血管内皮細胞の培養)

中空系膜 A と中空系膜 B で構成される中空系膜メッシュを 100 mm × 100 mm とした以外は、実施例 2 と同様にして、細胞培養用足場材料を作製した。

この細胞培養足場材料のメッシュ部分を中心から直径 2.1 mm で円形に切り出したものを、実施例 1 で用いたポッティング用ウレタン樹脂を用い、円形カバーガラス(松浪硝子工業(株)製、2.1 mm)に固定し、これを 6 穴細胞培養プレートのウェル底面に置いて細胞培養を行った。その際、比較として、上記で作製した細胞培養用足場材料からナノファイバーを除去して中空系膜メッシュのみとしたものも用い、細胞培養を行った。

細胞培養に用いるダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)は、日本製薬(株)製の DMEM 試薬を用いて調製した。

カバーガラスを置いた細胞培養プレートの各ウェルにウシ血管内皮細胞(理化学研究所細胞バンクから入手)を 0.5×10^6 Cell/well で播種し、DMEM 培地中で 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

1 週間培養後、カバーガラスを細胞培養プレートから取り出し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

図 6、図 7 は細胞培養足場材料に接着した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した写真であり、図 6 はナノファイバーがある細胞培養足場材料での、図 7 はナノファイバーを除去した細胞培養足場材料での写真である。

図 6 から、ナノファイバーがある細胞培養足場材料ではウシ血管内皮細胞が細胞培養足場材料全面に広がっている。これは細胞培養足場材料が細胞培養に適した材料であることがわかる。また、中空系のある部分でも細胞が接着していることは中空系膜から栄養や酸素が供給される際に有利である。

図 7 から、ナノファイバーを除去した細胞培養足場材料ではウシ血管内皮細胞が中空系膜の一部に接着しているだけであることがわかる。これは細胞培養足場材料に多くの細胞を接着させるためにナノファイバーがあることが有効であることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0046】

本発明によれば、医薬品、化学物質、化粧品など物質の薬効試験、毒性試験、安全性試験を、容易かつ迅速に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図 1】実施例で得られた細胞培養用足場材料の光学顕微鏡写真

【図 2】実施例で得られた細胞培養用足場材料の光学顕微鏡写真

【図 3】実施例で得られた細胞培養用足場材料の走査型電子顕微鏡写真

【図 4】実施例で得られた細胞培養用足場材料の走査型電子顕微鏡写真

【図 5】実施例 2 で得られたポート部を有する細胞培養用モジュールの写真

【図 6】実施例 3 で得られた細胞培養用足場材料に接着した細胞の共焦点顕微鏡写真

10

20

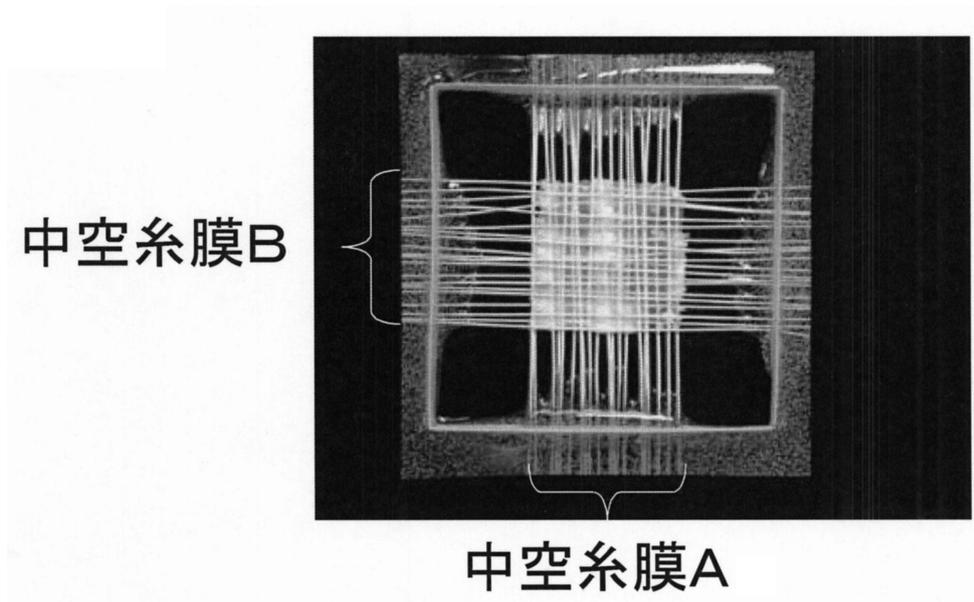
30

40

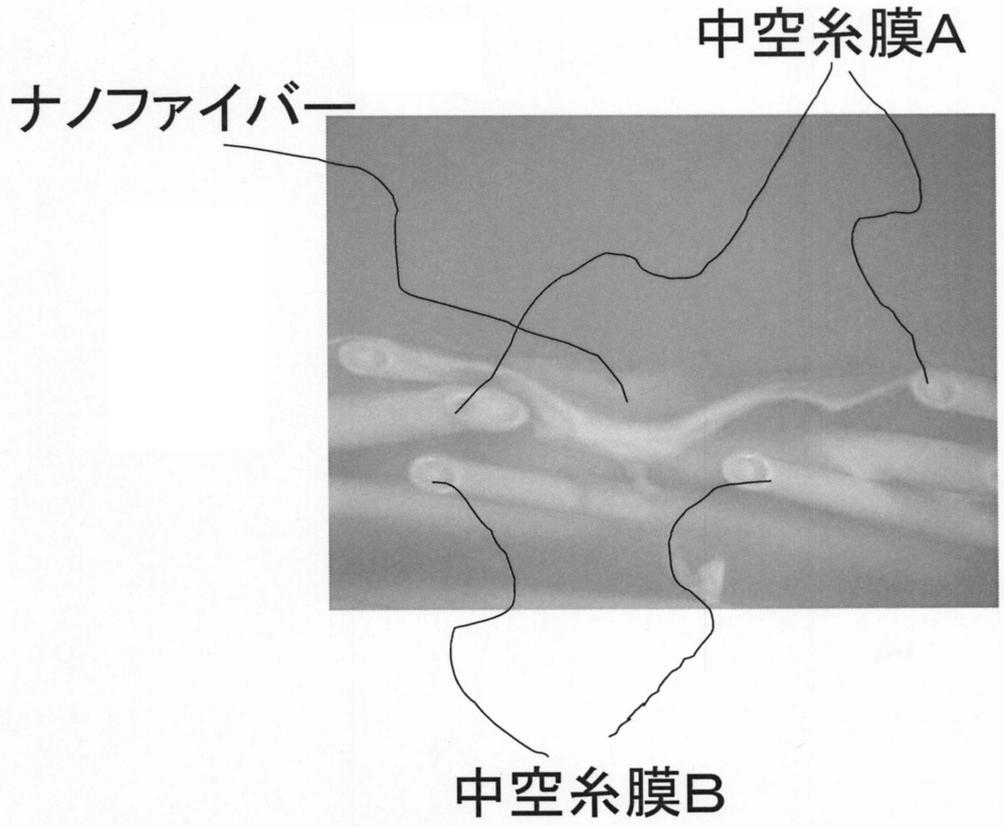
50

【図7】実施例3で得られた細胞培養用足場材料に接着した細胞の共焦点顕微鏡写真

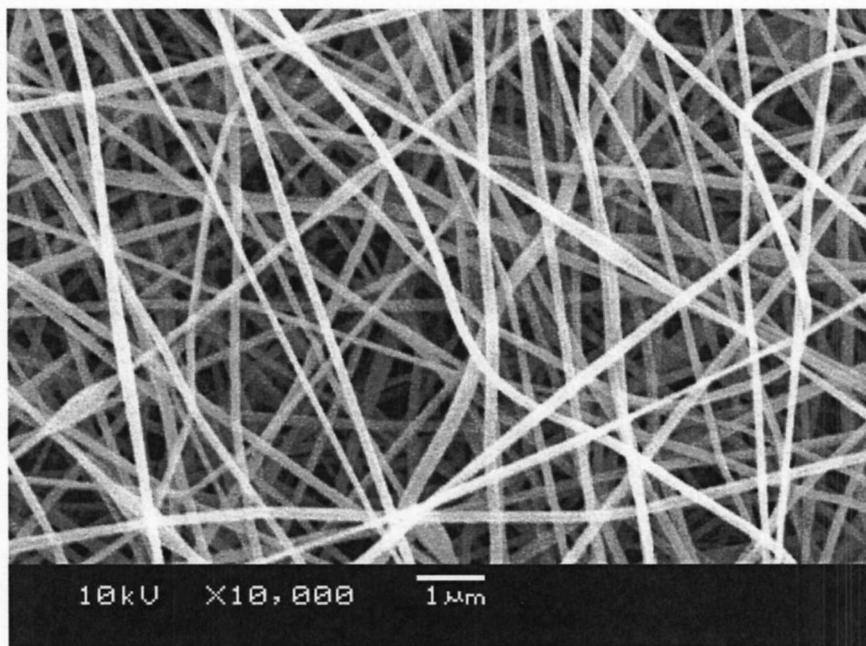
【図1】



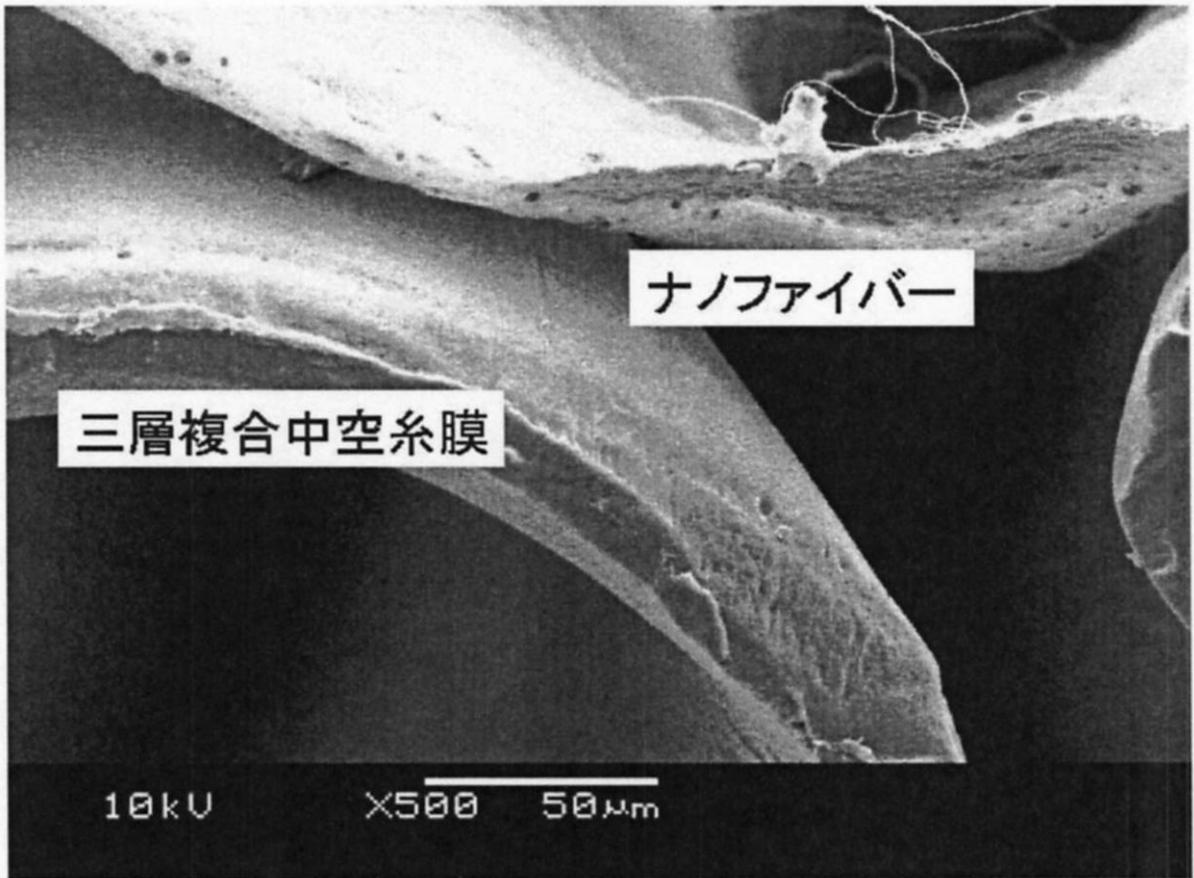
【図2】



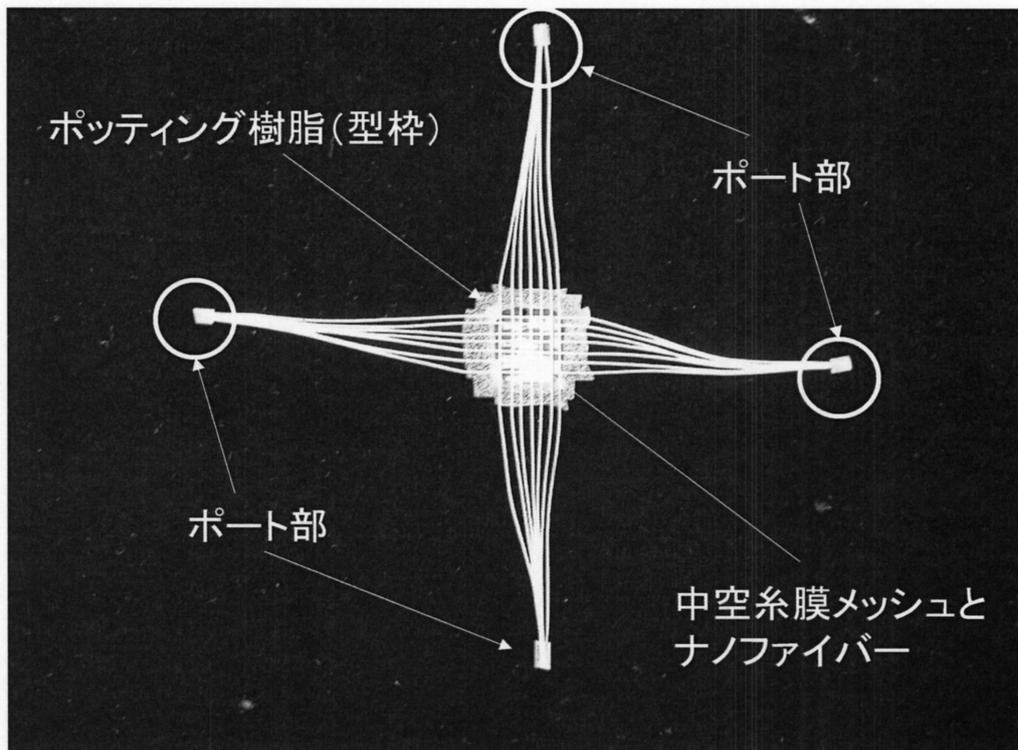
【図3】



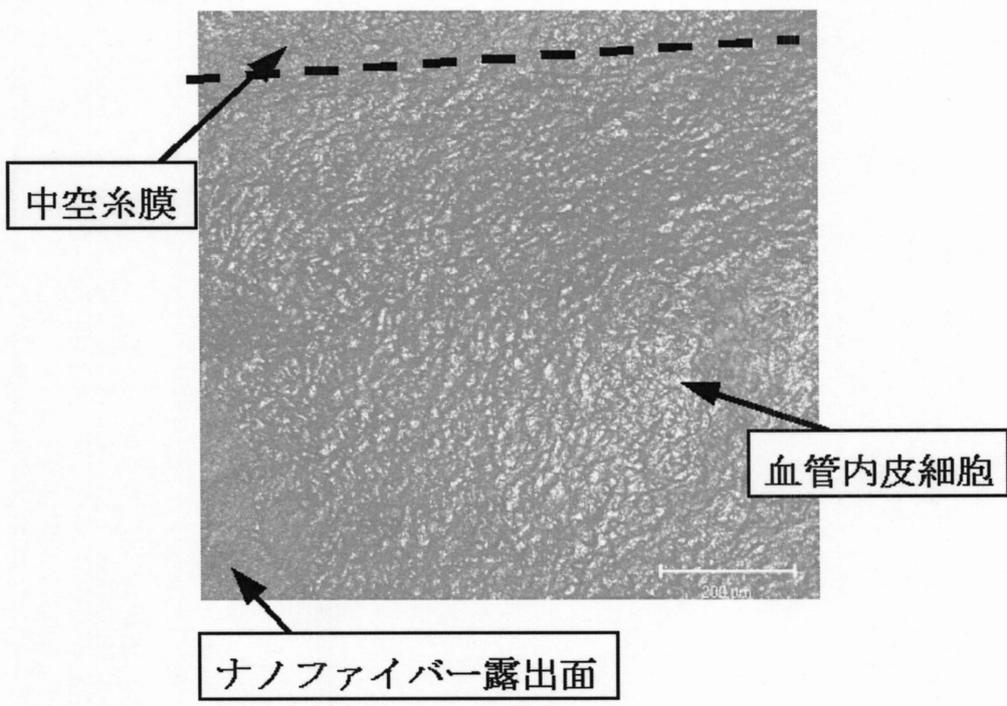
【 図 4 】



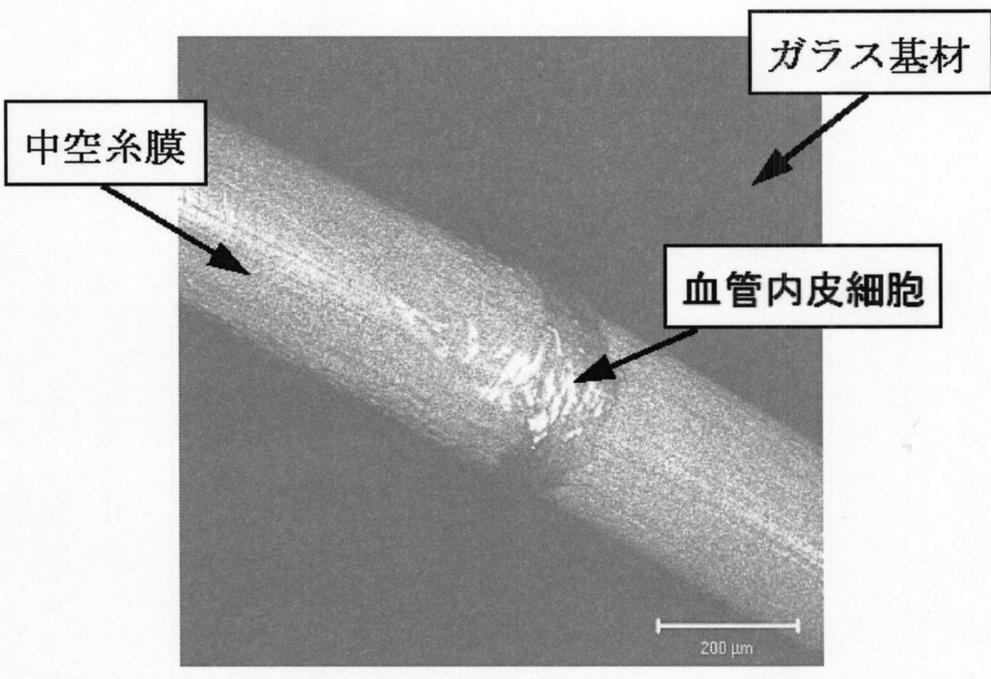
【 図 5 】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 小堀 麻子

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開平 1 - 2 2 2 7 6 8 (J P , A)
特開平 1 1 - 1 6 2 (J P , A)
特開平 5 - 3 0 8 9 5 3 (J P , A)
特開平 7 - 1 0 7 9 8 6 (J P , A)
特開平 9 - 1 5 0 0 4 1 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 3 7 8 5 0 (J P , A)
特表 2 0 0 7 - 5 1 0 8 2 0 (J P , A)
特開昭 6 1 - 3 5 8 0 3 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N11/00-13/00

C12M3/00-06