

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-194084

(P2013-194084A)

(43) 公開日 平成25年9月30日(2013.9.30)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 8 L 101/14	(2006.01)	C O 8 L 101/14		4 J O O 2
C O 8 K 3/34	(2006.01)	C O 8 K 3/34		4 J O 1 1
C O 8 F 2/44	(2006.01)	C O 8 F 2/44	A	4 J O 2 6
C O 8 F 292/00	(2006.01)	C O 8 F 292/00		

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2012-60192 (P2012-60192)	(71) 出願人	000173751
(22) 出願日	平成24年3月16日 (2012. 3. 16)		一般財団法人川村理化学研究所
			千葉県佐倉市坂戸631番地
		(74) 代理人	100124970
			弁理士 河野 通洋
		(72) 発明者	山東 典子
			千葉県佐倉市坂戸631番地 一般財団法
			人 川村理化学研究所内
		(72) 発明者	原口 和敏
			千葉県佐倉市坂戸631番地 一般財団法
			人 川村理化学研究所内
		Fターム(参考)	4J002 BG131 BJ001 DJ006 DJ056 GB00
			4J011 AA05 PA13 PB02 PB15 PB22
			PC02
			4J026 AA50 AC00 BA32 BB01 DB02
			DB14 DB22 GA08

(54) 【発明の名称】 有機無機複合ヒドロゲル

(57) 【要約】

【目的】

表面で細胞を容易に接着、増殖させる有機無機複合ヒドロゲル、及びその製造方法を提供する。

【構成】

水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルであって、該ヒドロゲルの表面の一部または全面に水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を有することを特徴とする有機無機複合ヒドロゲル。本発明の有機無機複合ヒドロゲルおよび有機無機複合ヒドロゲルの製造方法の最大の特徴は、ヒドロゲルの構成成分でもある上記水膨潤性粘土鉱物（B）がヒドロゲル最表面に吸着し、吸着した水膨潤性粘土鉱物層に細胞接着因子やタンパクが吸着することで細胞の接着と増殖を担うことにある。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルであって、該ヒドロゲルの表面の一部または全面に水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を有することを特徴とする有機無機複合ヒドロゲル。

【請求項 2】

前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層が、ゼラチン、およびコラーゲンから選択される 1 種以上を含有する請求項 1 又は 2 記載の有機無機複合ヒドロゲル。

【請求項 3】

前記ゼラチン及びコラーゲンがアルカリ処理されている請求項 3 記載の有機無機複合ヒドロゲル。

【請求項 4】

前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層上に、更に、コラーゲン又はフィブロネクチンを含有する層を有する請求項 1～4 のいずれかに記載の有機無機複合ヒドロゲル。

【請求項 5】

請求項 1～5 のいずれかに記載の有機無機複合ヒドロゲルの製造方法であって、

（1）水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルを製造する工程、

（2）水膨潤性粘土鉱物（B）を水中に分散して、水膨潤性粘土鉱物（B）の分散液を製造する工程、

（3）前記分散液中に前記ヒドロゲルを浸漬することにより、又は前記分散液を前記ヒドロゲル表面に塗布することにより、前記ヒドロゲルの表面の一部または全面に前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を形成する工程、
を含むことを特徴とする有機無機複合ヒドロゲルの製造方法。

【請求項 6】

前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を形成させるために、ゼラチン、コラーゲンから選択される 1 種以上を含有する水溶液中で水膨潤性粘土鉱物（B）を分散させることにより、水膨潤性粘土鉱物（B）の分散液を製造する工程を有する、請求項 6 記載の有機無機複合ヒドロゲルの製造方法。

【請求項 7】

前記ゼラチン及びコラーゲンがアルカリ処理されている請求項 7 記載の有機無機複合ヒドロゲルの製造方法。

【請求項 8】

前記ヒドロゲルの表面の一部または全面に前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を形成する工程を行った後に、

前記ヒドロゲルをコラーゲン又はフィブロネクチンの水溶液中に浸漬することにより、又はコラーゲン又はフィブロネクチンの水溶液を表面の一部又は全面に塗布することにより、

前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層上に、コラーゲン又はフィブロネクチンを含有する層を形成する工程、
を行う請求項 6～8 のいずれかに記載の有機無機複合ヒドロゲルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面が水膨潤性粘土鉱物で被覆された有機無機複合ヒドロゲルに関し、具体的には、表面で細胞を容易に接着、増殖可能な有機無機複合ヒドロゲル、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

高分子ヒドロゲルは有機高分子の三次元架橋物が水を含んで膨潤したものであり、膨潤性やゴム状弾性を有するソフトマテリアルとして、医療・医薬、食品、土木、バイオエンジニアリング、スポーツ関連などの分野で広く用いられている（例えば、非特許文献1参照）。これまでに本発明者らは、水溶性有機高分子と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲルが、優れた吸水性や極めて高い伸張性などの特徴を有することについて報告した（例えば特許文献1および2参照）。

【0003】

さらに、本発明者らは、上記水溶性有機高分子のうち、下限臨界共溶温度（LCST）以下のポリN-イソプロピルアクリルアミドや疎水性高分子であるポリ2-メトキシエチルアクリレートなどと層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲルが、優れた細胞培養特性を有することについて報告した（例えば特許文献3および4参照）。しかし、ジメチルアクリルアミド、アクリロイルモルホリン、ポリエチレングリコールなどの親水性高分子と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲル表面で細胞を接着増殖させる技術についてはこれまでに開示されていなかった。

10

【0004】

一方、培養足場への細胞接着を促進させる目的で、コラーゲンやフィブロネクチン等の細胞接着因子を足場表面にコーティングする手法（1）がプラスチック製容器表面で広く行われている。

20

【0005】

しかし、（1）の手法を水溶性有機高分子と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲルに応用すると、コラーゲンやフィブロネクチンをゲルの内部に吸収することが出来ても、ヒドロゲル表面に固定化出来ない為、結果として細胞を接着増殖させることは困難であった。

【0006】

また、アクリルアミドゲルの表面にカルボジイミドやスクシンイミドなどのクロスリンカーを用いて、コラーゲンを化学的に固定化して細胞培養する手法（2）が開発されており、ゲル表面への細胞培養でも応用されている（例えば非特許文献2参照）。但し、（2）の手法は水溶性高分子がOH基を有さない場合は有効ではなく、OH基を有さない水溶性有機高分子と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲルに応用することはできない。

30

【0007】

一方、これまでに本発明者らは、水膨潤性粘土鉱物を含有する培養床が各種細胞に対して良好な培養性を示すことを見いだしてきた（例えば特許文献5参照）。しかし、この特許では、ヒドロゲル表面にタンパクが吸着したり、細胞が接着増殖したりするような有機無機複合ヒドロゲルおよび有機無機複合ヒドロゲルの製造方法については開示されていない。

【0008】

以上のように、水溶性高分子のうち、特にジメチルアクリルアミド、アクリロイルモルホリン、ポリエチレングリコールなどの親水性高分子と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高分子ヒドロゲルは、透明性や強度等、物性に優れているが、その表面に細胞が接着増殖させることは実現されていなかった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2002-53629号公報

【特許文献2】米国特許676710号

【特許文献3】特開2005-110604号公報

【特許文献4】特開2008-237088号公報

50

【特許文献5】特願2011-196012

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Adv. Mater., 14, 1120-1124 (2002)

【非特許文献2】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, pp13661-13665, (1997)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明が解決しようとする課題は、上記従来技術の問題点を解決し、表面で細胞を容易に接着、増殖させる有機無機複合ヒドロゲル、及びその製造方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、特に水溶性有機モノマーの重合物と層状剥離した粘土鉱物と媒体からなるゲルにおいて、ゲル表面を粘土鉱物または粘土鉱物とタンパク質の混合体で被覆することより、ゲルの高い伸縮性、透明性、および圧縮性を維持しながら、柔軟性が広範囲に制御され、且つ、各種細胞に対する良好な培養性を有する、ゲル材料が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本発明は、水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルであって、該ヒドロゲルの表面の一部または全面に水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を有することを特徴とする有機無機複合ヒドロゲルを提供する。

20

【0014】

また、本発明は、上記の有機無機複合ヒドロゲルの製造方法であって、

（1）水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルを製造する工程、

（2）水膨潤性粘土鉱物（B）を水中に分散して、水膨潤性粘土鉱物（B）の分散液を製造する工程、

（3）前記分散液中に前記ヒドロゲルを浸漬することにより、又は前記分散液を前記ヒドロゲル表面に塗布することにより、前記ヒドロゲルの表面の一部または全面に前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を形成する工程、

30

を含むことを特徴とする有機無機複合ヒドロゲルの製造方法を提供する。

【0015】

本発明の有機無機複合ヒドロゲルおよび有機無機複合ヒドロゲルの製造方法の最大の特徴は、ヒドロゲルの構成成分でもある上記水膨潤性粘土鉱物（B）がヒドロゲル最表面に吸着し、吸着した水膨潤性粘土鉱物層に細胞接着因子やタンパクが吸着することで細胞の接着と増殖を担うことにある。

【発明の効果】

【0016】

本発明は、高伸縮性や高圧縮性を有し、柔軟性が広範囲に制御され、且つ、細胞接着因子や培養液中のタンパク質成分を表面に多く吸着でき、続いて細胞の良好な接着・伸展・増殖（高培養性）、また、生体組織の接着を可能にできる有機無機複合ゲルを提供する。得られた有機無機複合ゲルは、細胞の高培養性の他に優れた力学物性、調湿性、難燃性などを併せ持つことができる。また、得られた有機無機複合ゲルは、表面の一部が細胞接着性、その他の部分が細胞非接着性を持つように制御することができる。

40

【0017】

以上の有機無機複合ヒドロゲルおよび有機無機複合ヒドロゲルの製造方法は円柱状、棒状、フィルム状、糸状を初めとした各種形状の有機無機複合ヒドロゲルで可能である。本発明の有機無機複合ヒドロゲルは、細胞培養用足場としての理化学材料として、さらに医

50

療・医薬品分野、特に、角膜、水晶体、軟骨、腱、骨などの再生医療材料として使用することが出来る。また、生体適合性、柔軟性に優れた人工弁、人工血管、人工軟骨などの人工臓器用材料や、カテーテルなどの治療用材料、としても有効に用いられる。さらに、各種工業材料として農業・工業・電子材料・土木建築・包装資材などの分野でも用いられる。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、水溶性有機モノマーの重合物と膨潤性粘土鉱物と媒体からなるヒドロゲルを形成し、その表面に水膨潤性粘土鉱物を塗布することにより、水膨潤性粘土鉱物が表面に密着し、タンパク質や細胞、及び組織接着性を持った表面を持つ有機無機複合ゲルが得られることを見出した点にある。これに対して水膨潤性粘土鉱物塗布を行わないゲルは、細胞培養性及び組織接着性に問題が残った。

10

【0019】

本発明に言う、有機無機複合ヒドロゲルとは、水溶性有機モノマーの重合物（以下、単に重合体（A）という）と、水に均一分散可能な水膨潤性粘土鉱物（B）とが複合化して形成された三次元網目の中に水（C）が包含されており、表面に水膨潤性粘土鉱物（B）の薄層を有するヒドロゲルのことである。

【0020】

本発明で使用する水溶性有機モノマーの重合体（A）としては、水膨潤性粘土鉱物（B）と相互作用により三次元網目を形成可能なものであり、好ましくはアミド基、アミノ基、エステル基、水酸基、カチオン基の一つ又は複数を側鎖又は主鎖に含有し、親水性又は両親媒性を示すものであり、特に好ましくは水又は水と有機溶剤との混合溶媒に膨潤したり溶解する性質を有するものである。かかる重合体（A）の好ましいものとしては、水溶性アクリルアミド誘導体の重合体やそれを少なくとも一部含む共重合体があげられる。水溶性アクリルアミド誘導体としては、例えば炭素数1以上のアルキル基を有する水溶性のN-アルキルアクリルアミド又はN,N-ジアルキルアクリルアミドが例示される。

20

【0021】

重合体（A）に用いられる水溶性有機モノマーとしては、前記アクリルアミド誘導体の他、例えばアクリルアミド、メタクリルアミド、炭素数1以上のアルキル基を有するアルキルメタクリルアミド、アルキルアクリレートの中から選択される一つ又は複数が用いられる。ここでN-アルキルアクリルアミド、N,N-ジアルキルアクリルアミド、アルキルメタクリルアミド、アルキルアクリレートの具体例としては、N-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチルメタクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-エチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-アクリロイルピロリジン、N-アクリロイルピペリジン、N-アクリロイルメチルホモピペラジン、N-アクリロイルメチルピペラジン、2-メトキシエチルアクリレートなどが例示される。またこれらモノマーにその他の有機モノマーをあわせて用いることも、本発明にいう有機無機複合ゲルが形成される限りにおいて可能である。

30

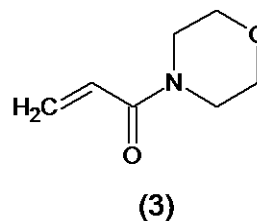
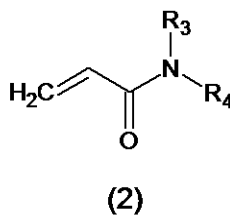
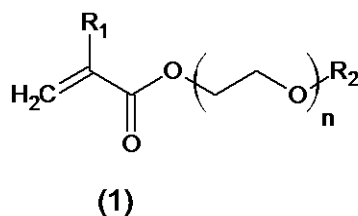
40

【0022】

さらに下記の化学式（1）を主成分とし、化学式（2）および（3）を共重合した重合体と層状粘土鉱物とが複合化して形成された三次元網目を有する高屈折率高分子ヒドロゲルなどが挙げられる。

【0023】

【化 1】

 $R_1 = \text{H, Me}$ $R_3, R_4 = \text{H, Me, Et, } i\text{Pr}$ $R_2 = \text{H, Me}$ $n = 3 - 30$

10

【0024】

本発明における水膨潤性粘土鉱物（B）としては、水又は水溶液中で膨潤するものであることが好ましく、より好ましくは水溶性有機モノマーを含む溶液中で層状剥離し、微細且つ均一に分散可能なものであり、更には、かかる微細且つ均一に分散した状態が水中でも保たれるものが特に好ましい。本発明の有機無機複合ゲルにおいて、膨潤性粘土鉱物（B）は好ましくは10層以下、より好ましくは3層以下、特に好ましくは1層又は2層のナノメートルレベル（の厚み）で分散しているものである。かかる膨潤性粘土鉱物の分散は発泡ゲルを乾燥したものの超薄切片を透過型電子顕微鏡により観察することによって確認されるほか、同様な試料を用いた小角X線回折測定によっても確認され、回折角（ 2θ ）が好ましくは3度～8度で、より好ましくは2度～8度で、特に好ましくは1度～8度で粘土鉱物の積層に基づく明確な回折ピークが観測されないことによって確認される。また、本発明における水膨潤性粘土鉱物（B）は、水溶性有機モノマーの重合物（A）と三次元網目を形成できるものであることが好ましく、より好ましくはメチレンビスアクリルアミド等の有機架橋剤を用いないで（A）（B）からなる三次元網目を形成できるものである。更に好ましくは、形成した三次元網目構造が水中でも維持されるものである。かかる水膨潤性粘土鉱物（B）としては、例えば、水膨潤性スメクタイトや水膨潤性雲母などの水中で膨潤し、層状剥離した状態で微分散することが可能な膨潤性の無機粘土鉱物が用いられ、具体的には、ナトリウムを層間イオンとして含む水膨潤性ヘクトライト、水膨潤性モンモリロナイト、水膨潤性サポナイト、水膨潤性合成雲母などが挙げられる。また、水溶性有機モノマーと共に溶媒中で層状剥離可能であれば、界面活性剤などにより部分的に有機化した粘土鉱物を用いることもできる。

20

30

【0025】

一方、水溶性有機モノマーの重合物（A）と水膨潤性粘土鉱物（B）からなる三次元網目形成に加えて、少量の化学架橋を同時に含ませることは、繰り返し圧縮および延伸試験におけるヒステリシスの減少、初期弾性率の増加などを行わせるのに有効に用いられる。用いる化学架橋度は、架橋剤の濃度がモノマーの0.3モル％以下、より好ましくは0.2モル％以下、特に好ましくは0.01～0.1モル％である。

【0026】

本発明における有機無機複合ゲルにおいては、ゲルを構成する（無機）粘土鉱物の比率を広い範囲で設定でき、特に低～高の広い粘土鉱物比率を有する有機無機複合ゲルが得られることが特徴である。本発明の有機無機複合ゲルに含まれる水溶性有機モノマーの重合物（A）と膨潤性粘土鉱物（B）の量比は、水中で両者が三次元網目を形成する範囲が好ましく、（B）／（A）の質量比として0.01～3、好ましくは0.1～3、特に好ましくは0.3～2.5である。（B）／（A）の質量比が0.01未満では、有効な（A）と（B）の三次元網目を形成することが困難となり、一方、3を越えると均一な（B）の層状剥離した分散が困難となる場合が多い。

40

【0027】

本発明では、水溶性有機モノマーの重合物（A）と水膨潤性粘土鉱物（B）の三次元網目形成には、（B）の表面と（A）の末端の相互作用や、（B）の表面と（A）の主鎖又

50

は側鎖の官能基との相互作用などが単独又は組み合わせて用いられる。相互作用の種類としては（A）と（B）との種類、組み合わせにより種々のものが選択可能であり、例えば、イオン相互作用、配位結合、水素結合、共有結合、疎水相互作用などの単独又は複数組み合わせで用いられる。

【0028】

本発明における媒体（C）としては、水、または、他の機能性分子（例えば、三次元網目を補強する効果を持ったり、薬効を有する有機化合物や有機又は無機の塩など）を併せて含む水が用いられる。

【0029】

本発明における表面被覆用の水膨潤性粘土鉱物（B）としては、有機無機複合ゲル表面に効果的に密着して、表面細胞接着性及び組織接着性を与えるものが用いられる。特に好ましくは水中で分子状（単一層）またはそれに近いレベルで均一分散可能な無機粘土鉱物が用いられる。具体的にはナトリウムを層間イオンとして含む水膨潤性ヘクトライト、水膨潤性モンモリライト、水膨潤性サポナイト、水膨潤性合成雲母、等が挙げられる。これらの粘土鉱物を混合して用いても良い。

【0030】

水膨潤性粘土鉱物（B）を表面に被覆する際の形態は、特に限定されないが、好ましくは10層以下、より好ましくは3層以下、特に好ましくは1層又は2層のナノメートルレベル（の厚み）で水などの媒体に分散させるのが望ましい。媒体中の水膨潤性粘土鉱物（B）量は、媒体との質量比で0.025以下、好ましくは0.015以下、更に好ましくは0.01以下が望ましい。水膨潤性粘土鉱物（B）の水媒体に対する質量比が上記であると、良好な分散液が得られ、表面への塗布が容易で、平滑で均一な薄い塗膜が得られ、好ましい。

【0031】

表面を被覆する水膨潤性粘土鉱物（B）の分散液中には、相互作用により凝集・沈殿を起こさない範囲で水溶性有機化合物、例えば防腐剤や抗菌剤、着色料、香料、酵素、たんぱく質、合成ペプチド類、糖類、アミノ酸類、ビタミン類、細胞、DNA類、塩類、水溶性有機溶剤類、界面活性剤、高分子化合物、レベリング剤などを含むことができる。好ましくはアルカリ処理コラーゲン、アルカリ処理ゼラチンを含むことができる。これらの水溶性有機化合物の量は、水膨潤性粘土鉱物との質量比が5以下、好ましくは2以下、更に好ましくは1以下で含有させることが望ましい。

【0032】

ゲル表面での被覆厚みとしては、ゲル表面の細胞接着性が向上し、より好ましくは細胞増殖性を示すようになる厚みで、且つ、ゲル表面から脱離されない範囲の厚みが用いられる。具体的には、好ましくは3 μm 以下、より好ましくは2 μm 以下、更に好ましくは1 μm 以下の範囲が、水膨潤性粘土鉱物（B）の種類によって選択して用いられる。3 μm 以上であると有機無機複合ヒドロゲルは表面に亀裂を生じ、水膨潤性粘土鉱物を含む層が脱落する可能性がある。前述の厚みであればヒドロゲル表面の水膨潤性粘土鉱物が膨潤で亀裂や脱落することなく、かつ細胞接着と増殖に効果がある。本発明で用いる水膨潤性粘土鉱物（B）は、有機無機複合ゲルに密着して、その表面細胞接着性を与えることができるれば良く、必ずしもその粒子径は限定されないが、好ましくは、0.05～1000 nm、より好ましくは0.5～300 nm、特に好ましくは1～50 μm である。

【0033】

本発明において、水膨潤性粘土鉱物（B）による表面被覆は、有機無機複合ゲルの表面全体に対して行っても良く、好ましくは、目的に応じて部分的に行うことである。例えば、フィルム状の有機無機複合ゲルの片面のみを水膨潤性粘土鉱物（B）で被覆することにより、下面が細胞非接着性を有し、上面が細胞接着性を有するゲルとすることができる。また、有機無機複合ゲルフィルムの表面を格子状又は短冊状の区画にわけ、その一部を水膨潤性粘土鉱物（B）で被覆することにより、表面細胞接着性が制御された有機無機複合ゲルが得られる。これにより、浮遊系細胞、例えばマクロファージやリンパ球、と接着細胞

胞、例えば血管内皮細胞や間葉系幹細胞、などとの共培養、接着細胞同士の共培養、細胞をシート状で剥離させることも可能になる。

【0034】

水膨潤性粘土鉱物（B）で被覆された表面は、タンパク質を吸着しやすいので、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等の細胞接着因子を吸着させることが可能である。これらの生体由来細胞接着因子の他に、細胞接着因子として用いられるポリ-L-リジンやポリアミン、ポリエチレンジアミン、RGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）配列を含む合成高分子であってもよい。また、生体由来細胞接着因子と合成高分子を混合させたものでもよい。これらの水媒体に対する濃度（質量％）は、細胞が接着増殖するのに有効であれば特に限定はされないが、5％以下、好ましくは1％、更に好ましくは0.1％以下であれば、良好に細胞が接着増殖する。

10

【0035】

本発明で培養する細胞としては、接着性の細胞であれば特に限定されないが、好ましくはヒトあるいはヒト以外の動物に由来する細胞が挙げられる。接着性の細胞としては、例えば、線維芽細胞、骨格筋細胞、筋芽細胞、筋管細胞、角膜内皮細胞、角膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、水晶体上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、表皮角化細胞、気道上皮細胞、乳腺上皮細胞、粘膜上皮細胞、間葉系幹細胞、ストローマ細胞、ES細胞、iPS細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、腎細胞、膀胱細胞、前立腺細胞、毛根細胞、歯髄幹細胞、膵β細胞、肝実質細胞等が挙げられる。なお、本発明において細胞とは、個々の細胞を意味するほか、生体から採取されて組織を構成している状態の細胞を含んでいる。

20

【0036】

これらの細胞は、ヒトなどを対象とした組織工学及び再生医療等における利用を考慮したとき、自家細胞を用いることが好ましいが、許容される免疫適合性を備える限り異種動物由来の細胞であってもよいし、同種細胞における他家細胞であってもよい。

【0037】

細胞を有機無機複合ヒドロゲルに播種する方法は、特に限定されないが、好ましくは組織から摘出された初代接着細胞を直接播種する方法が挙げられる。さらに好ましくはトリプシン処理などにより単一細胞集団となった接着細胞を播種する方法が挙げられる。さらに好ましくは、シャーレなどに培養された接着細胞を細胞間接着を維持したまま播種する方法が挙げられる。

30

【0038】

本発明の有機無機複合ゲルの製造法については以下の方法が用いられる。

（1）水溶性のラジカル重合性有機モノマー（A）の重合体と水膨潤性粘土鉱物（B）により形成される三次元網目構造中に水（C）を包含する有機無機複合ヒドロゲルを製造する工程、

（2）水膨潤性粘土鉱物（B）を水中もしくはコラーゲンまたはゼラチンを含む水中に分散して、水膨潤性粘土鉱物（B）の分散液を製造する工程、

（3）前記分散液中に前記ヒドロゲルを浸漬することにより、又は前記分散液を前記ヒドロゲル表面に塗布することにより、前記ヒドロゲルの表面の一部または全面に前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層を形成する工程、

40

必要に応じて（4）前記ヒドロゲルをコラーゲン又はフィブロネクチンの水溶液中に浸漬することにより、又はコラーゲン又はフィブロネクチンの水溶液を表面の一部又は全面に塗布することにより、前記水膨潤性粘土鉱物（B）を主成分とする層上に、コラーゲン又はフィブロネクチンを含有する層を形成する工程、である。

【0039】

水と水膨潤性粘土鉱物と水溶性有機モノマーを含む溶液を調製後、それらの共存下で水溶性有機モノマーを重合させ、水溶性有機モノマー重合体と層状剥離した粘土鉱物からなる三次元網目を形成させる。なお、水溶性有機モノマーを含有するために必要な重合開始

50

剤又は重合条件により必要となる触媒は、予め溶液に添加しておく。

【0040】

この三次元網目を形成した構造体を水膨潤性粘土鉱物または水膨潤性粘土鉱物とゼラチン又はコラーゲン等との混合体で表面を被覆する。水膨潤性粘土鉱物による構造体の表面被覆は、構造体の合成直後でも、水などの媒体を膨潤させた後でもかまわない。必要に応じて、さらにコラーゲンまたはフィブロネクチンで構造体を被覆する。

【0041】

構造体への水膨潤性粘土鉱物または水膨潤性粘土鉱物とゼラチン、コラーゲン等との混合体を表面に被覆する方法は、公知慣用の方法でよい。例えば、分散液を有機無機複合ヒドロゲルに流延させる方法や、構造体を分散液に浸漬させる方法、バーコーターやスピコーターによるコーター法、または噴霧などのスプレー法、模様のあるゴム版に分散液をつけてから支持体に転写する方法、また構造体に塗布しない部分を予め遮蔽して塗布後遮蔽部分を取り除くパターン状塗布や、インクジェットプリンター方式による分散液の塗布方法が挙げられる。好ましくは、構造体を分散液に浸漬させる方法が挙げられる。

【0042】

具体的な重合開始剤としては、水溶性の過氧化物、例えばペルオキシ二硫酸カリウムやペルオキシ二硫酸アンモニウム、水溶性のアゾ化合物、例えば、和光純薬工業株式会社製のVA-044、V-50、V-501などが好ましく用いられる。その他、ポリエチレンオキシド鎖を有する水溶性のラジカル開始剤なども用いられる。また触媒としては、3級アミン化合物であるN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンやβ-ジメチルアミノプロピオニトリルなどが好ましく用いられる。重合温度は、用いる水溶性有機高分子、重合触媒および開始剤の種類などに合わせて0℃～100℃の範囲に設定される。重合時間も触媒、開始剤、重合温度、重合溶液量（厚み）などの重合条件によって異なり、一概に規定できないが、一般に数十秒～十数時間の間で行う。

【0043】

なお、水膨潤性粘土鉱物を含有しない有機架橋剤により架橋された従来の有機架橋型ゲルにおいて同様な調製を行っても、伸縮性および強度に優れたゲルを得ることはできないなどの欠点を有する。例えば、水膨潤性粘土鉱物を含まず、代わりにメチレンビスアクリルアミドを水溶性有機モノマーの1モル%を添加して調製される有機架橋型ゲルの場合、密度によらず、弱く且つ脆い力学的性質を示す。

【0044】

本発明における有機無機複合ゲルは、水膨潤性粘土鉱物（B）で表面被覆をすることにより、表面細胞接着性を示すようになる。なお、表面粘着性以外の特性、例えば、伸縮性、圧縮性などの機械的性質は、重合物（A）と水膨潤性粘土鉱物（B）の種類、及び両者の比率、また媒体の種類とその比率（例えば、低揮発性媒体と水の比率）およびそれらの量などにより異なり、目的に応じて設定することが可能である。

【実施例】

【0045】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例にのみ限定されるものではない。

【0046】

（実施例1）

この実施例は有機・無機複合ヒドロゲル表面を改質する例である。

〔有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）の作製〕

粘土鉱物として、 $[Mg_{5.34}Li_{0.66}Si_8O_{20}(OH)_4]Na^{+}_{0.66}$ の組成を有する水膨潤性合成ヘクトライト（商標Laponite XLG（Rockwood Additives Ltd.社製））を100℃で2時間真空乾燥して用いた。有機モノマーは、N,N-ジメチルアクリルアミド（DMAA：和光純薬工業株式会社）を使用し、シリカゲルカラム（メルク社製）を有機モノマー100mlに対して80mlの容積で用いて重合禁止剤を取り除いてから使用した。

10

20

30

40

50

【0047】

重合開始剤は、ペルオキソ二硫酸カリウム（PPS：関東化学株式会社製）をPPS／水＝0.384／20（g／g）の割合で純水にて希釈し、水溶液にして使用した。水はイオン交換水を蒸留した純水を用いた。水は全て高純度窒素を予め3時間以上バブリングさせ含有酸素を除去してから使用した。

【0048】

20℃の恒温室において、内部を窒素置換した平底ガラス容器に、純水100gとテフロン（登録商標）製攪拌子を入れ、攪拌しながら1.6gのラポナイトXLGを気泡が入らないように注意しながら少量ずつ加え、無色透明の溶液を調製した。これにDMAA9.9gを加え無色透明溶液になるまで攪拌した。

10

【0049】

これにPPS水溶液0.1gを攪拌して加え、5分間攪拌して無色透明溶液を得た。この溶液をあらかじめ窒素雰囲気中に静置して容器内の酸素を除去しておいたガラス製容器（9cm×15cm）に酸素にふれないようにして移した後、密栓をし、20℃の恒温水槽中で20時間静置して重合を行った。

【0050】

重合開始から20時間後に、ガラス製容器内にはほぼ無色透明で均一なシート状のヒドロゲルが得られた。このシート状のヒドロゲルを、50℃の生理食塩水に15分間浸漬してから直径10mmのポンチでくり抜き、純水で一晩膨潤させた。該ヒドロゲルを表面被覆に用いた。

20

〔水膨潤性粘土鉱物（B）を含む分散液の調製〕

水膨潤性粘土鉱物（B）としてLaponite XLG（Rockwood Additives Ltd.社製）0.08g、水20g、を均一に混合して分散液（L）を調製した。

〔水膨潤性粘土鉱物（B）を含む水溶液の塗布〕

分散液（L）を2mL入れた細胞培養用6ウェルプレート（ファルコン353046）にヒドロゲルを入れ、37℃で3時間静置した。純水で3回洗浄後、水膨潤性粘土鉱物（B）を含む水溶液を塗布した有機無機複合ヒドロゲル（被覆後）を培養試験に用いた。

〔培養試験〕

培養する細胞は、正常ヒト真皮線維芽細胞（DSファーマバイオメディカル株式会社製）を使用した。培養は、ウシ胎児血清（バイオウエスト社製）を10%含有するダルベッコ変法ミニマム・エッセンシャル・イーグル培地（和光純薬製）を使用して、5%二酸化炭素含有37℃恒温器内で行った。播種細胞数は一枚のゲルあたり2万細胞を播種した。培地の播種量は4mLとした。播種してから1日後、4日後、7日後、有機無機複合ヒドロゲルの表面を光学顕微鏡にて観察したところ、細胞が有機無機複合ヒドロゲル上に接着して、また十分に増殖していた様子が鮮明に確認することが出来た。

30

（実施例2）

水膨潤性粘土鉱物（B）を含む分散液の調製にアルカリ処理コラーゲン（新田ゼラチン株式会社製）0.01gを追加して添加する以外は、実施例1と同様に実験した。

（実施例3）

実施例1と同様に作製した有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）に、水膨潤性粘土鉱物（B）を含む分散液を塗布し、続いて酸処理コラーゲン（新田ゼラチン株式会社製）0.1gを20gの水（pH3）に溶解させた溶液を100μL塗布した。実施例1と同様に培養試験を行った。

40

（実施例4）

実施例1と同様に作製した有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）に、水膨潤性粘土鉱物（B）とアルカリ処理コラーゲンを含有する分散液を塗布し、続いて酸処理コラーゲン（新田ゼラチン株式会社製）0.1gを20gの水（pH3）に溶解させた溶液を100μL塗布した。実施例1と同様に培養試験を行った。

（実施例5）

実施例1と同様に作製した有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）に、水膨潤性粘土鉱物（

50

B)とアルカリ処理コラーゲンを含む分散液を塗布し、続いてフィブロネクチン（ベクトン・ディッキンソン株式会社製）を水に溶解させて50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した溶液を100 μL 塗布した。実施例1と同様に培養試験を行った。

（比較例1）

実施例1と同様に有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）を作製し、水膨潤性粘土鉱物（B）を含む水溶液の塗布を行わずに、実施例1と同様に培養試験を行った。

（比較例2）

実施例1と同様に有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）を作製し、アルカリ処理コラーゲン（新田ゼラチン株式会社製）0.1 gを水20 gに均一に混合した分散液（水膨潤性粘土鉱物を含まない）を100 μL 塗布した有機無機複合ヒドロゲルを用いて、実施例1と同様に培養試験を行った。

（比較例3）

実施例1と同様に有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）を作製し、酸処理コラーゲン（新田ゼラチン株式会社製）0.1 gを水20 gに均一に混合した分散液（水膨潤性粘土鉱物を含まない）を100 μL 塗布した有機無機複合ヒドロゲルを用いて、実施例1と同様に培養試験を行った。

【0051】

実施例1～5、および比較例1～3の培養1日後、4日後、1週間後の細胞数を計測するために、まず、リン酸緩衝生理食塩水（PBS, 和光純薬製）2 mLで培養表面を洗浄した。次いで細胞溶解液A（ケモメテック社製）を0.2 mL添加し、続けて中和液B（ケモメテック社製）を0.2 mL添加した。この溶液を細胞計測用カセット（ヌクレオカセット、ケモメテック社製）で採取し、細胞数計測装置（ヌクレオカウンタTM、ケモメテック社製）で細胞数を計測した。

【0052】

培養試験での細胞数計測結果を表-1に示す。

【0053】

【表1】

表-1

<単位は $\times 10^4$ 個/ゲル>

	1日目	4日目	7日目
実施例1	1.0	2.5	6.0
実施例2	1.2	2.8	6.3
実施例3	1.8	3.0	7.2
実施例4	2.0	5.3	12.5
実施例5	2.0	5.0	10.3
比較例1	0	0	0
比較例2	0	0	0
比較例3	1.0	0	0

【0054】

表1に示されるように、有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）（比較例1）では細胞が接着増殖することはなかった。さらに、アルカリ処理（比較例2）を有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）に塗布するだけでは細胞が接着増殖することはなかった。また、酸処理（比較例3）コラーゲンを有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）に塗布すると、細胞播種翌日（1日目）は細胞接着が確認されたが、4日目には接着細胞は確認できなかった。しかしながら、有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）表面にクレイ溶液（実施例1）、アルカリ処理コラーゲンとクレイの混合溶液（実施例2）、実施例2にさらに酸処理コラーゲンを塗布（実施例3）した場合、細胞が接着及び増殖する効果を出すことが実現できた。

【0055】

つまり、有機無機複合ヒドロゲル（被覆前）の表面に水膨潤性粘土鉱物を含む溶液を塗布することで、細胞が良好に増殖させられることが表－１で明らかとなった。

10

20

30

40

【産業上の利用可能性】

【００５６】

本発明の有機無機複合ヒドロゲルおよび有機無機複合ヒドロゲルの製造方法を行えば、細胞接着因子やタンパク質成分を有機無機複合ヒドロゲル表面に多く吸着でき、続いて細胞及び生体組織の良好な接着・伸展・増殖（高培養性）を可能にできる特徴を有する。

50

【 0 0 5 7 】

本発明の有機無機複合ヒドロゲルは医療・医薬品分野、特に、角膜、水晶体、軟骨、腱、骨などの再生医療材料として使用することが出来る。また、生体適合性、柔軟性に優れた人工弁、人工血管、人工軟骨などの人工臓器用材料や、カテーテルなどの治療用材料、としても有効に用いられる。さらに、各種工業材料として農業・工業・電子材料・土木建築・包装資材などの分野でも用いられる。