

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 4 月 10 日(10.04.2014)

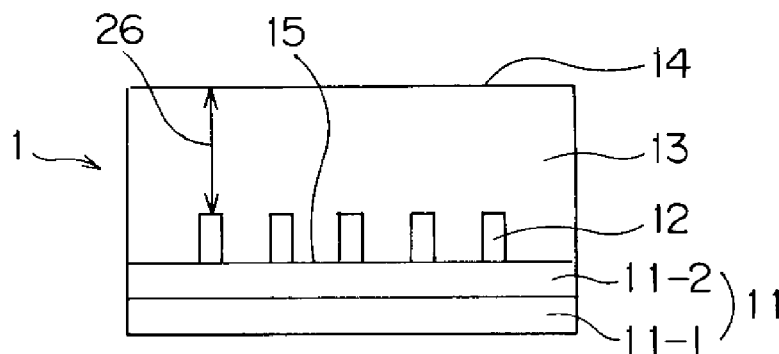


(10) 国際公開番号
WO 2014/054538 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/04 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/076334
- (22) 国際出願日: 2013 年 9 月 27 日(27.09.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-222744 2012 年 10 月 5 日(05.10.2012) JP
- (71) 出願人: 日本写真印刷株式会社(NISSHA PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6048551 京都府京都市中京区壬生花井町 3 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 田畑 泰彦(TABATA, Yasuhiko); 〒6110024 京都府宇治市琵琶台 3-8-16 Kyoto (JP). 小尾 奈緒子(OBI, Naoko); 〒6048551 京都府京都市中京区壬生花井町 3 番地 日本写真印刷株式会社内 Kyoto (JP). 住吉 千夏子(SUMIY-OSHI, Chikako); 〒6048551 京都府京都市中京区壬生花井町 3 番地 日本写真印刷株式会社内 Kyoto (JP). 村上 英樹(MURAKAMI, Hideki); 〒6048551 京都府京都市中京区壬生花井町 3 番地 日本写真印刷株式会社内 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CELL CULTURING MEMBER, AND CELL CULTURING METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養部材と細胞培養方法



(57) Abstract: [Problem] To address the problem of obtaining a cell culturing member which enables a structure of a cell culturing assembly to be controlled in three dimensional directions. [Solution] A cell culturing member (1) in which a patterned and layered hydrogel part (12), and a layered culturing part (13) which covers the hydrogel part (12) are formed on a substrate (11). A surface of the culturing part is a first cell seeding surface (14). The hydrogel part (12) is permeated by a cell growth factor, and the thickness of the hydrogel part enables a controlled release of the cell growth factor from the hydrogel part (12) to the culturing part (13) during the culturing period.

(57) 要約: 【課題】 培養細胞集合体の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養部材を得ることを課題とする。 【解決手段】 基板 11 の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位 12 を形成し、ハイドロゲル部位 12 を覆って層状の培養部位 13 を形成した細胞培養部材 1 である。培養部位の表面が第一の細胞種播種面 14 である。ハイドロゲル部位 12 は細胞成長因子を浸潤していて、ハイドロゲル部位の厚さは、ハイドロゲル部位 12 から培養部位 13 に細胞成長因子を培養期間に渡り徐放可能な厚さである。



WO 2014/054538 A1

明 細 書

発明の名称：細胞培養部材と細胞培養方法

技術分野

[0001] 本発明は人や動物等の細胞の培養を生体外で行うための細胞培養部材に関する。また、本発明は細胞の培養を生体外で行う細胞培養方法に関する。

背景技術

[0002] 生体内で細胞はある規則をもって三次元的に配列及び配置されている。しかしながら現状の細胞培養では、この細胞の配列・配置に関する技術はきわめて限られている。

[0003] これまで、二次元の細胞配列に関しては報告がある。例えば、細胞接着性表面と非接着性表面というパターンを形成し、それにより細胞の二次元接着、それに続く増殖パターンを制御することが行われている。一例を挙げれば、従来、基材上に温度応答性高分子を微細な線幅でパターンニングした細胞培養支持体と、当該細胞培養支持体で細胞を培養する細胞培養方法が知られている（例えば特許文献1参照）。上述の細胞培養支持体は、細胞培養部位を毛細血管の線幅でパターンニングできるので、培養細胞の構造を二次元的（膜面方向）に制御することができる。

[0004] これに対して、三次元での細胞配列に対する技術方法論はほとんどない。細胞シートを重ねて細胞の三次元配列を実現する技術が報告されている（例えば特許文献2参照）。しかし、細胞が重層化された内部の構造は必ずしも人為的に制御されているとは言えない。また、従来、細胞を三次元的・立体的に増殖させ塊形状の細胞塊を作る細胞培養法が提案されている。しかしながら、この方法論においても、三次元的での細胞配列は人為的に制御することはできない。

[0005] 細胞の三次元・立体培養（塊形状培養）では、しばしば、立体形状内部に位置する細胞への酸素や栄養の供給が悪く、内部細胞の機能低下、あるいは細胞の死滅が生じる。これに対して、生体は細胞の三次元的集合体からでき

ているにもかかわらず、このような問題は生じない。その理由は、三次元細胞集合体中に血管が存在し、立体形状内部の細胞に酸素と栄養をうまく供給しているからである。

[0006] このように三次元で細胞を生存、機能させるためには血管網の形成がKey（必須事項）である。この血管網の形成はまさに三次元の血管細胞の配列である。このような体内の組織構造に近い細胞配列の制御技術の開発が、今後の細胞生物学の発展に必要不可欠な課題となっている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2010-98973号公報

特許文献2：特開2005-342112号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、本発明は、培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養部材を得ることを課題とする。

[0009] 本発明の他の課題は、培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養方法を提供することにある。また、本発明は第一細胞種の培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能とし、さらに第二細胞種を共培養する細胞培養方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明では、細胞が細胞成長因子の濃度勾配に応答する性質を利用して、細胞の三次元配列を制御する。まず、基材上に、細胞成長因子を徐放（徐々に放出）するハイドロゲル層を、二次元パターンに形成する。次に、当該パターンを形成した基材上に細胞移動を可能とする培養部位（例えばマトリゲル層）を置き、その培養部位上に細胞を播種する。

[0011] 細胞成長因子の放出にともない、培養部位内に細胞成長因子の三次元濃度勾配パターンが形成される。この三次元パターンに沿って細胞が移動する。

その結果培養部位内に細胞成長因子の三次元濃度勾配パターンに従った、細胞配列が形成される。

[0012] 本発明は、ハイドロゲルからの細胞成長因子の徐放性と、ハイドロゲルの二次元パターンを組み合わせ、培養部位内で三次元での細胞配列を可能とした。

[0013] 本発明の一の態様にかかる細胞培養部材は、
基板の上に、
パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成し、
前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成した細胞培養部材において、
前記培養部位の表面が第一の細胞種播種面であり、
前記ハイドロゲル部位は細胞成長因子を浸潤していて、
前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放することを特徴とする。

[0014] 本発明にかかる細胞培養部材の好ましい実施態様にあつて、前記ハイドロゲル部位の厚さが、前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を2日以上21日以下徐放する厚さであってもよく、また、前記ハイドロゲル部位の厚さが、1 μ m以上30mm以下であってもよい。

[0015] 本発明のさらに他の好ましい実施態様にかかる細胞培養部材は、
前記ハイドロゲル部位が熱架橋ゼラチンからなるものであつてもよく、また、前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率が70%以上99%以下であってもよい。

[0016] 本発明にかかる細胞培養方法は以下の工程からなる。

イ. 基板の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成する工程
ロ. 前記ハイドロゲル部位に細胞成長因子を浸潤する工程

ハ. 前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成し、細胞培養部材を完成する工程

ニ. 前記培養部位の表面に第一の細胞種を播種する第一細胞種播種工程

ホ．第一細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第一細胞種培養工程

[0017] 本発明にかかる細胞培養方法の好ましい実施態様にあつては、

ニの工程である第一細胞種播種工程に使用する第一の細胞種は、播種前に飢餓処理を行った細胞であってもよく、また、前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率を70%以上99%以下の範囲とし、ハイドロゲルの含水率を前記範囲内で変更することにより前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放する期間を調整するものであつてもよい。

[0018] 本発明にかかる細胞培養方法のその他の好ましい実施態様にあつては、

ホの工程である第一細胞種培養工程に続いて、以下の工程を行うものであつてもよい。

ヘ．前記培養部位に第二の細胞種を播種する第二細胞種播種工程

ト．第二細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第二細胞種培養工程

[0019] 以上説明した本発明、本発明の好ましい実施態様、これらに含まれる構成要素は可能な限り組み合わせて実施することができる。

発明の効果

[0020] 本発明に係る細胞培養部材は、細胞成長因子を浸潤した一定の厚さを有するハイドロゲル部位を具備し、ハイドロゲル部位から細胞成長因子が徐放されるので、その他の発明特定事項とあわせて、培養中の第一の細胞種が培養部位の表面からハイドロゲル部位へ向かって移動と増殖を行う。この結果、ハイドロゲル部位のパターン形成に起因する第一の細胞種にかかる培養細胞（集合体）の二次元構造（基材の表面方向）を制御できるのみならず、培養部位の層厚さ方向への構造を制御できる。すなわち、培養細胞（集合体）の三次元構造を制御することができる。

[0021] 本発明にかかる細胞培養方法にあつても、上記細胞培養部材と同様に培養細胞（集合体）の三次元構造を制御できる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は細胞培養部材の断面説明図である。

[図2]図2は培養部位を取り除いた細胞培養部材の説明図であり、図2（a）は断面説明図、図2（b）は平面説明図である。

[図3]図3は第一の細胞種にかかる細胞培養方法の概念説明図であり、図3（a）は第一の細胞種播種直後、図3（b）は第一の細胞種培養初期、図3（c）は第一の細胞種培養後期のそれぞれの概念説明図である。

[図4]図4は実施例の評価結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、図面を参照して本発明の実施例にかかる細胞培養部材と細胞培養方法をさらに説明する。本明細書において参照する各図は、本発明の理解を容易にするため、一部の構成要素を誇張して表すなど模式的に表しているものがある。このため、構成要素間の寸法や比率などは実物と異なっている場合がある。また、本発明の実施例に記載した部材や部分の寸法、材質、形状、その相対位置などは、とくに特定の記載のない限りは、この発明の範囲をそれらのみに限定する趣旨のものではなく、単なる説明例にすぎない。

[0024] <細胞培養部材>

図1は細胞培養部材1の断面説明図であり、図2は培養部位13を取り除いた細胞培養部材1の説明図であり、図2（a）は断面説明図、図2（b）は平面説明図である。

[0025] 細胞培養部材1は基板11の上にハイドロゲル部位12を形成し、ハイドロゲル部位12を覆って培養部位13を形成したものである。ハイドロゲル部位12は細胞成長因子の徐放用担体である。また、ハイドロゲル部位12は第一の細胞種にかかる増殖細胞の接着部位でもある。

[0026] 基板11の形状は通常、平板、薄い平板、またはフィルム状である。基板11の上にパターン状にハイドロゲル部位12が形成されていて、ハイドロゲル部位12の無い部分は細胞非接着部分15が露出している。基板11を構成する基材11-1が細胞非接着材料（例えばポリジメチルシロキサン（以下PDMSと称する））からなるものであれば、基板11は基材11-1

のみから構成される。

[0027] 基材 11-1 が細胞接着材料（例えば、ポリエチレンテレフタレート（以下 P E T と称する））からなるものであれば、基材 11-1 の上面の全面に細胞非接着材料を層状に塗布することにより細胞非接着層 11-2 を形成する。本発明にあって細胞非接着層 11-2 は基材 11-1 の材料、表面性質等に応じて、存在が必要であったり、不必要であったりする。

[0028] 基材 11-1 の材料は、P D M S、P E T、ガラス、シリコン、金属（アルミニウム、S U S 3 0 4 等のステンレススチール、金、銀など）、金属酸化物（アルミナ、酸化チタン、I T O、酸化錫）などである。細胞非接着層 11-2 の材料は、アガロース、ポリエチレングリコール、P D M S などである。

[0029] ハイドロゲル部位 12 は、パターン状、かつ層状に形成される。パターン状に形成する理由は、第一の細胞種にかかる培養細胞集合体の二次元（基板 11 の平面方向）形状を制御するためである。図 2（b）を参照して、本実施例ではハイドロゲル部位 12 は直線状であり、5 本の直線が平行に並んだパターンとなっている。パターン状に形成するハイドロゲル部位の線幅（矢印 22）は特に制限は無いが、 $10\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ にすることが好ましい。パターン状に形成するハイドロゲル部位相互間の間隔（矢印 23）は特に制限は無いが、 $50\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ にすることが好ましい。

[0030] ハイドロゲル部位 12 は層状に形成することにより高さを与えた。高さを与えることによりハイドロゲル部位 12 に体積が付与されるので、ハイドロゲル部位 12 に細胞成長因子溶液を浸潤することにより、細胞成長因子徐放のための貯留が可能となる。

[0031] 細胞成長因子を貯留しかつ徐放するために、ハイドロゲル部位 12 はハイドロゲルで形成される。

[0032] また、層状に形成されるハイドロゲル部位 12 の厚さ（矢印 21）は、特に限定されるものではない。播種した細胞がハイドロゲル部位 12 に向かう方向に移動、増殖するに十分な時間と量の細胞成長因子を徐放できる貯留量

があればよい。

[0033] ハイドロゲルの架橋度を調整すれば、細胞成長因子の徐放期間は調整可能である。ハイドロゲルの架橋度に対応する指標として含水率がある。ハイドロゲルの架橋度は通常70%以上99%以下であり、好ましくは90%以上99%以下である。含水率をこの範囲にすれば、第一の細胞種にかかる細胞培養期間中の全ての期間に渡り、第一の細胞種にかかる増殖細胞の増殖方向を方向付けるに十分な細胞成長因子が徐放され続けるからである。

[0034] ハイドロゲル部位12に要求される細胞成長因子の徐放期間は、好ましくは2日以上21日以下である。また、ハイドロゲル部位12の好ましい厚さは1 μ m以上3000 μ m以下であり、より好ましくは20 μ m以上70 μ m以下である。第一の細胞種にかかる細胞培養期間中の全ての期間に渡り、第一の細胞種にかかる増殖細胞の増殖方向を方向付けるに十分な細胞成長因子が徐放され続けるからである。

[0035] ハイドロゲル部位12の材料は、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸、ファイブロネクチン、ラミニン、フィブリンなどであり、ゼラチンが特に好ましい。ゼラチンは比較的低温での加熱により熱架橋できるからである。

[0036] ハイドロゲル部位12の形成方法は、(1)ガラス板等の上に所定厚さの薄層物を作成し、これを切り出して基板11上に載置する方法、(2)ディスペンサーを用いてゲル状材料を載置する方法、(3)スクリーン印刷で重ね刷りをする方法等任意の方法で行うことができる。

[0037] 培養部位13は、ハイドロゲル部位12を覆って層状に形成する。基板の平面方向を考えれば、培養部位13は当該平面方向に面状に形成する。ハイドロゲル部位12は、基板11上の細胞非接着部分15に取り囲まれていて、培養部位13は面状に形成されているから、培養部位13はハイドロゲル部位12と細胞非接着部分15を覆っている。

[0038] 培養部位13の上面は第一の細胞種播種面14である。細胞培養部材1にあって、培養対象となる第一の細胞種は第一の細胞種播種面14に置かれる。培養部位13の上面は、層状に形成された培養部位13の2つの面のうち

、基板 1 1 から遠い方の面である。

[0039] 培養部位 1 3 は第一の細胞種が増殖する部位である。また培養部位 1 3 はハイドロゲル部位 1 2 から細胞成長因子が徐放される部位である。さらに、培養部位 1 3 は第二の細胞種が増殖する部位でもある。

[0040] 培養部位 1 3 の層厚さすなわちハイドロゲル部位 1 2 の表面から第一の細胞種播種面 1 4 までの距離（矢印 2 6 で示す）は $10\ \mu\text{m} \sim 30\ \text{mm}$ 、好ましくは $100\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$ である。層厚さがこの範囲であれば、第一の細胞種にかかる増殖細胞が細胞成長因子放出方向に方向付けられる効果が得られ、かつ、三次元方向（層厚さ方向）への構造が確認され得るからである。

[0041] 培養部位 1 3 の材料はマトリゲル、コラーゲンなどである。コラーゲンはコラーゲングルであってもよく、コラーゲンスポンジでもよい。

[0042] <細胞培養方法>

続いて第一の細胞種にかかる細胞培養方法を説明する。細胞の培養に先立ち、細胞培養部材を準備する。

[0043] 細胞培養部材は、まず(1)基板 1 1 の上に、パターン状かつ層状のハイドロゲル部位 1 2 を形成する工程、次に(2)ハイドロゲル部位 1 2 に細胞成長因子を浸潤する工程、続いて(3)ハイドロゲル部位 1 2 を覆って層状の培養部位 1 3 を形成する工程により完成する。

[0044] 図 3 は第一の細胞種にかかる細胞培養方法の概念説明図であり、図 3 (a) は第一の細胞種播種直後の状態を示し、図 3 (b) は第一の細胞種培養初期の状態を示し、図 3 (c) は第一の細胞種培養後期の状態を示している。

[0045] 図 3 (a) を参照し、培養部位の表面である第一の細胞種播種面 1 4 に培養細胞を播種する。播種した第一の細胞種にかかる細胞のイメージを符号 3 1 で示している。本発明の細胞培養方法を好適に実施できる第一の細胞種の例として、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（以下 H U V E C と称する）、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞、胆管上皮細胞、表皮細胞等を挙げることができる。

[0046] 本発明の細胞培養方法と細胞培養部材に使用する細胞成長因子は、第一の

細胞種にかかる細胞の増殖と移動を促す属性を持つ細胞成長因子であれば、特に限定されるものではない。例えば、H U V E C細胞を培養する場合は細胞成長因子V E G Fを選択し、リンパ管上皮細胞を培養する場合には細胞成長因子V E G Fを選択し、表皮細胞を培養する場合にはケラチノサイト細胞因子（K G F）を選択して使用する。

[0047] 第一の細胞種にかかる播種細胞31は播種前に飢餓処理（Starvation処理）を行うことが好ましい。細胞成長因子方向への移動と当該方向への増殖がより一層行われるからである。

[0048] 図3（b）を参照して、ハイドロゲル部位12から培養部位13に向かって細胞成長因子が徐放されている。放出された細胞成長因子のイメージを矢印34で示している。播種した細胞31は細胞成長因子34の方向に移動し、当該方向に増殖する。図3（b）中に培養初期の培養細胞集合体のイメージを符号32で示している。

[0049] 培養期間中に第一の細胞種は放出される細胞成長因子方向への移動と当該方向への増殖を繰り返す。培養終期に至ると第一の細胞種にかかる培養細胞集合体は、細胞播種面14とハイドロゲル部位12を連絡する状態となる。図3（c）中に培養終期の培養細胞集合体のイメージを符号33で示している。このようにして培養細胞集合体の三次元（培養部分13の層厚さ方向）構造の制御が行われる。

[0050] 基板11上でハイドロゲル部位12を取り巻く部分は細胞非接着部分15であり、培養細胞は細胞非接着部分15に至ることはない。このようにして培養細胞集合体の二次元（培養部位13の面方向）構造の制御が行われる。

[0051] H U V E C細胞を培養すると、培養細胞集合体33は管状構造となる。

[0052] 続いて本発明にかかる細胞培養方法の好ましい実施態様を説明する。上述のようにして得た培養細胞集合体を含む細胞培養部材に、第二の細胞種を播種する。第二の細胞種は培養部位に播種する。その後、細胞培養部材を培養条件下において、第二の細胞種を増殖させる。培養条件については、用いる細胞によっても異なるが、公知の培養方法を用いる。

[0053] このようにして、生体内の環境と類似する環境での2種類の細胞の共培養ができる。

[0054] 第二の細胞種の例は、肝実質細胞、伊東細胞、膵実質細胞、心筋細胞、神経細胞、間葉系細胞、腫瘍細胞などである。第一の細胞種と第二の細胞種の組み合わせについては特に制限はない。

実施例 1

[0055] <細胞培養部材（培養部位形成前）の作成>

ホットプレート（50℃）上で易接着処理のしてあるPETフィルム（テイジンテترونフィルムG274）上にアガロース水溶液（80℃、5%）をバーコーティングした。オーブン中で40℃、30分間加熱乾燥した。

[0056] ガラス板をホットプレート（50℃）上で加温しながら30%ゼラチン水溶液をコーティングした。冷却後にゼラチンを切り出して、上記アガロースコーティング済みフィルム上に載せた。その後当該フィルムを切り分けて、ゼラチンパターン基材を得た。

[0057] 作成したゼラチンパターン基材を140℃、48時間真空加熱乾燥することによりゼラチンの架橋及び滅菌を行った。ハイドロゲル部位であるゼラチンの層厚さは50μm、ゼラチンのパターンは1本の直線、線幅は70μmであった。作成したゼラチンパターン基材を140℃、48時間、真空加熱乾燥にかけることにより、ゼラチンの架橋及び基材の滅菌を行った。

[0058] 細胞成長因子は、HumanVEGF165を使用した。HumanVEGF165 40ng/ml水溶液に架橋済ゼラチン基材を浸し、基材上のゼラチンにVEGF水溶液を浸み込ませた。また、コントロールとして、純水に架橋済ゼラチン基材を浸し、基材上のゼラチンに純水を浸み込ませた。

[0059] <第一の細胞種の準備>

播種（培養）細胞はHUVECを使用した。HUVECを所定の培養液で培養後、1日前にmediumをmedium199+0.5%FCS（仔牛血清）+1%P/S（ペニシリンストレプトマイシン）に交換して培養した。当該培養は飢餓処理（starvation処理）である。細胞培養実験直前に、コラゲナーゼ処理によりHUVECをはがした。得られ

たHUVECをPKH26により蛍光標識した。

[0060] <播種と培養>

24well plate下部にVEGF含浸ゼラチンパターンニング基材を静置し、24well cell culture insert上部に培養部位であるマトリゲル (matrigel) 層を作製した。マトリゲルの濃度は10mg/mlであった。当該マトリゲル溶液を20 μ l用いたものと、50 μ l用いたものの2種類の細胞培養部材を使用した。マトリゲル溶液20 μ lの場合にマトリゲル層の厚さは約0.7mmであり、マトリゲル溶液50 μ lの場合にマトリゲル層の厚さは約1.7mmであった。コントロールは、24well plate下部に純水含浸ゼラチンパターンニング基材を静置し、24well cell culture insert上部に培養部位であるマトリゲル (matrigel) 層を同様に作製した。

[0061] 細胞播種面であるマトリゲル (matrigel) 層表面に飢餓処理済みのPKH26蛍光標識HUVECを播種した。CO₂インキュベーター内で21時間培養した。

[0062] <培養細胞の評価>

培養終了後、プレートリーダーでcell culture insert下部の蛍光強度を測定することで、培養部位 (マトリゲル層) 下部へ移動したHUVEC細胞数を評価した。

[0063] 評価結果を図4に示した。VEGF未添加群 (コントロール群) と比較して、VEGF含浸ゼラチン基材群では、cell culture insert下部の蛍光強度が増加した。これにより、VEGF含浸ゼラチンパターンニング基材から放出されたVEGFにより、HUVECが培養部位 (マトリゲル層) 中をVEGFの方向 (下部) へ移動した。

符号の説明

- [0064] 1 細胞培養部材
1 1 基板
1 1 - 1 基材
1 1 - 2 細胞非接着層
1 2 ハイドロゲル部位

- 1 3 培養部位
- 1 4 第一の細胞種播種面
- 1 5 細胞非接着部分
- 3 1 第一の細胞種にかかる播種した細胞（イメージ）
- 3 2 第一の細胞種にかかる培養細胞集合体 培養初期（イメージ）
- 3 3 第一の細胞種にかかる養細胞集合体 培養後期（イメージ）
- 3 4 放出された細胞成長因子（イメージ）

請求の範囲

- [請求項1] 基板の上に、
 パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成し、
 前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成した細胞培養
部材において、
 前記培養部位の表面が第一の細胞種播種面であり、
 前記ハイドロゲル部位は細胞成長因子を浸潤していて、
 前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放する
ことを特徴とする細胞培養部材。
- [請求項2] 前記ハイドロゲル部位の厚さは、前記ハイドロゲル部位から前記培
養部位に細胞成長因子を2日以上21日以下徐放する厚さであることを
特徴とする請求項1に記載した細胞培養部材。
- [請求項3] 前記ハイドロゲル部位の厚さは、1 μ m以上30mm以下であるこ
とを特徴とする請求項1に記載した細胞培養部材。
- [請求項4] 前記ハイドロゲル部位は熱架橋ゼラチンからなるものである請求項
1乃至3いずれかに記載した細胞培養部材。
- [請求項5] 前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率が70%以
上99%以下であることを特徴とする請求項1乃至4いずれかに記載
した細胞培養部材。
- [請求項6] 以下の工程からなる細胞培養方法。
 イ. 基板の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成す
 る工程
 ロ. 前記ハイドロゲル部位に細胞成長因子を浸潤する工程
 ハ. 前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成し、細胞培
 養部材を完成する工程
 ニ. 前記培養部位の表面に第一の細胞種を播種する第一細胞種播種工
 程
 ホ. 第一細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第

一細胞種培養工程

[請求項7] 請求項6に記載した細胞培養方法において、二の工程である第一細胞種播種工程に使用する第一の細胞種は、播種前に飢餓処理を行った細胞であることを特徴とする請求項6に記載した細胞培養方法。

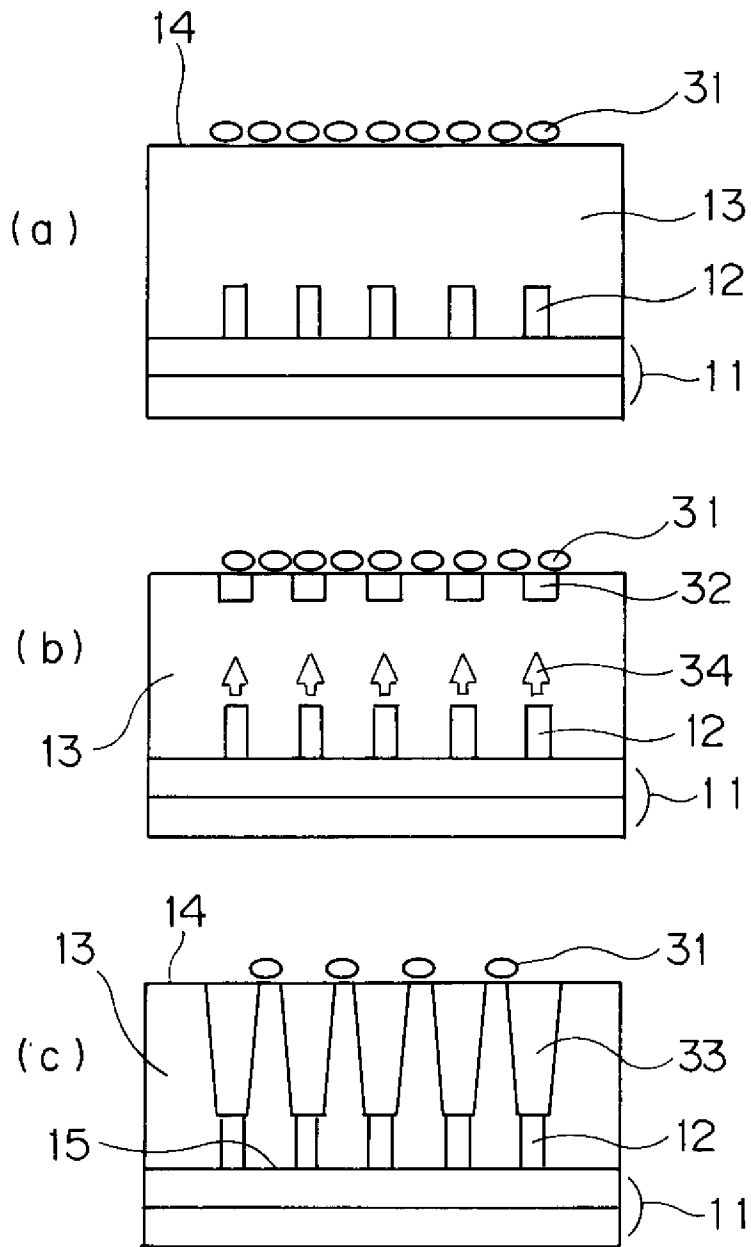
[請求項8] 前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率を70%以上99%以下の範囲とし、ハイドロゲルの含水率を前記範囲内で変更することにより前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放する期間を調整することを特徴とする請求項6又は7いずれかに記載した細胞培養方法。

[請求項9] 請求項6に記載した細胞培養方法において、
ホの工程である第一細胞種培養工程に続いて、以下の工程を行うことを特徴とする細胞培養方法。

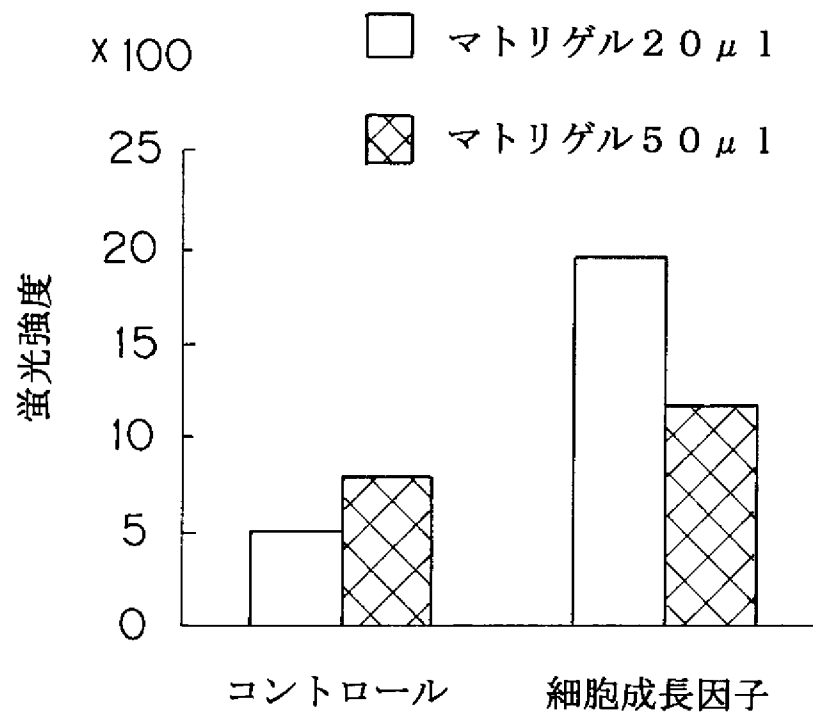
へ．前記培養部位に第二の細胞種を播種する第二細胞種播種工程

ト．第二細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第二細胞種培養工程

[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/076334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/04(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M3/04, C12N1/00, C12N5/071

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-207445 A (National University Corporation Kanazawa University), 17 September 2009 (17.09.2009), entire text (Family: none)	1-9
Y	JP 2007-007414 A (Lifescan, Inc.), 18 January 2007 (18.01.2007), entire text & US 2006/0153894 A1 & EP 1743663 A2 & CA 2551367 A & AU 2006202801 A	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 December, 2013 (24.12.13)

Date of mailing of the international search report
07 January, 2014 (07.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/076334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/090777 A1 (Nippon Cable System, Inc.), 31 August 2006 (31.08.2006), entire text & JP 2006-263445 A & JP 2006-263458 A & JP 5166864 B & US 2009/0215009 A1 & EP 1852135 A1 & CN 101141987 A & CN 101920046 A	1-9
A	Takashi SAITO, "P2) Tetsu Chelate-zai Johoka Hydrogel ni yoru Soshiki no Teisanso Yudo to Kekkan Shinsei", Dai 41 Kai Preprints of Research Group on Biochemical Polymer Symposium, 15 June 2012 (15.06.2012), pages 27 to 28	1-9
A	Akihiko SAITO, "Kekkan Shinsei Inshi no DDS o Mochiita Saibo Ishoku -Jin no Tanpaku Taisha Kino o Daisho suru Saibo Ishoku Ryoho no Kaihatsu o Mezashite-", Gene & medicine, 2002, vol.6, no.3, pages 415 to 418	1-9
A	Yasuhiko TABATA, "Saibo Seicho Inshi no Hoshutsu Seigyo to Kekkan Shinsei", Soshiki Baiyo Kogaku, 2001, vol.27, no.10, pages 372 to 375	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M3/04(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M3/04, C12N1/00, C12N5/071

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-207445 A（国立大学法人金沢大学）2009.09.17, 全文 （ファミリーなし）	1-9
Y	JP 2007-007414 A（ライフスキャン・インコーポレイテッド） 2007.01.18, 全文 & US 2006/0153894 A1 & EP 1743663 A2 & CA 2551367 A & AU 2006202801 A	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

長谷川 茜

4 N

3 2 2 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/090777 A1 (日本ケーブル・システム株式会社) 2006. 08. 31, 全文 & JP 2006-263445 A & JP 2006-263458 A & JP 5166864 B & US 2009/0215009 A1 & EP 1852135 A1 & CN 101141987 A & CN 101920046 A	1-9
A	齊藤高志, P2) 鉄キレート剤徐放化ハイドロゲルによる組織の低酸 素誘導と血管新生, 第41回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 2012. 06. 15, pp. 27-28	1-9
A	斎藤亮彦, 血管新生因子のDDSを用いた細胞移植—腎の蛋白代謝 機能を代償する細胞移植療法の開発をめざして—, 遺伝子医学, 2002, Vol. 6, No. 3, pp. 415-418	1-9
A	田畑泰彦, 細胞成長因子の放出制御と血管新生, 組織培養工学, 2001, Vol. 27, No. 10, pp. 372-375	1-9