



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111787959 A

(43) 申请公布日 2020.10.16

(21) 申请号 201980016021.3

桥口庆一 大桥文哉 松村匡记

(22) 申请日 2019.07.26

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(30) 优先权数据

11256

2018-140977 2018.07.27 JP

代理人 牛蔚然

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2020.08.28

A61L 27/38 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61L 27/18 (2006.01)

PCT/JP2019/029479 2019.07.26

A61L 27/22 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61L 27/24 (2006.01)

W02020/022494 JA 2020.01.30

A61L 27/36 (2006.01)

(71) 申请人 国立大学法人长崎大学

A61L 27/40 (2006.01)

地址 日本长崎县

A61L 27/52 (2006.01)

申请人 泰尔茂株式会社

C12N 5/071 (2006.01)

C12N 5/077 (2006.01)

(72) 发明人 丸屋安广 松本亮 小林慎一郎

金高贤悟 江口晋 大仁田贤

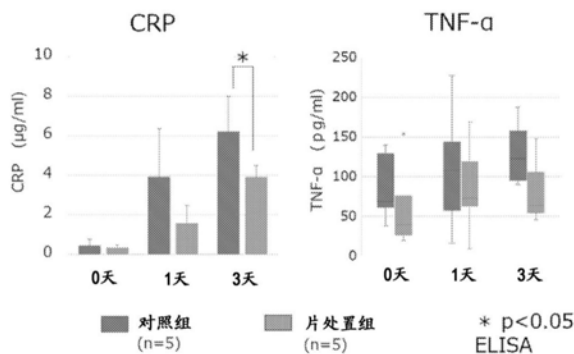
权利要求书1页 说明书26页 附图6页

(54) 发明名称

用于消化道再生的片状细胞培养物

(57) 摘要

本说明书中提供用于促进具有损伤部的管腔器官、尤其是十二指肠的组织的治愈的片状细胞培养物、该片状细胞培养物的制造方法及使用了该片状细胞培养物的管腔器官的损伤部的再生方法等。



1. 片状细胞培养物,其是用于促进在管腔壁至少一侧具有损伤部的管腔器官治愈的片状细胞培养物,其特征在于,所述片状细胞培养物应用于与存在损伤的部位对应的管腔壁的反侧。

2. 根据权利要求1所述的片状细胞培养物,其中,损伤处于管腔壁的内侧部,片状细胞培养物应用于管腔壁的对应的外侧部;或者,损伤处于管腔壁的外侧部,片状细胞培养物应用于管腔壁的对应的内侧部。

3. 根据权利要求1所述的片状细胞培养物,其中,损伤是贯穿性损伤或非贯穿性损伤。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的片状细胞培养物,其中,管腔器官是消化道系统的器官。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的片状细胞培养物,其中,损伤是管腔壁表面组织剥离导致的损伤。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的片状细胞培养物,其还具有包含凝胶及/或聚合物的增强层。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的片状细胞培养物,其特征在於,其与带蒂血管一起应用。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的片状细胞培养物,其具有50~500 $\mu\text{m}$ 的厚度。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的片状细胞培养物,其含有接种密度为约 $7.1 \times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约 $3.0 \times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 的细胞群。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的片状细胞培养物,其用于预防因外科处置及/或外科处置产生的穿孔而导致的炎症。

11. 用于预防外科处置后管腔器官穿孔的方法,所述方法包括将片状细胞培养物应用于管腔器官的步骤,所述片状细胞培养物应用于实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,外科处置是对管腔器官的粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层的剥离。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中,片状细胞培养物以能够完全覆盖实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧的方式而应用。

14. 根据权利要求11~13中任一项所述的方法,其中,片状细胞培养物经递送装置被递送至实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧。

15. 用于处置管腔壁表面的疾患部的方法,所述方法包括:

(a) 将管腔壁表面的疾患部剥离的步骤;以及

(b) 将片状细胞培养物应用于步骤(a)中经剥离的部分或与剥离部分对应的反侧的步骤。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,疾病为癌症。

17. 根据权利要求15或16所述的方法,其中,管腔壁表面的疾患部的剥离是具有疾患部的粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层的剥离。

## 用于消化道再生的片状细胞培养物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于处置具有损伤部的管腔器官的片状细胞培养物、该片状细胞培养物的制造方法及使用了该片状细胞培养物的管腔器官的处置方法等。

### 背景技术

[0002] 近年来,为了修复损伤的组织等,进行了移植各种细胞的尝试。例如,为了修复因心绞痛、心肌梗塞等缺血性心脏病而导致损伤的心肌组织,尝试利用了胎儿心肌细胞、骨骼肌成肌细胞、间充质干细胞、心脏干细胞、ES细胞、iPS细胞等(非专利文献1)。

[0003] 作为上述尝试的一环,开发出了利用支架(scaffold)形成的细胞结构物、使细胞形成为片状而得的片状细胞培养物(专利文献1、非专利文献2)。

[0004] 关于片状细胞培养物在治疗中的应用,已开展了下述研究:针对由烧伤等导致的皮肤损伤的培养表皮片的利用、针对角膜损伤的角膜上皮片状细胞培养物的利用、针对食管癌内窥镜切除的口腔粘膜片状细胞培养物的利用等,其一部分已进入临床应用的阶段。

[0005] 作为这样的应用之一,提出了在消化道等器官的损伤的治愈中利用片状细胞培养物的方案。例如在专利文献2中记载了为了治愈或预防因缝合不全等产生的从消化道损伤部漏出而利用包含间充质干细胞的片状细胞培养物。另外,在非专利文献3、4中记载了在胰痿、胃穿孔的模型动物中可以在它们的治愈中使用骨骼肌成肌细胞片。

[0006] 作为低侵害性地切除早期肿瘤的方法,近年来内镜粘膜下剥离术(ESD)受到关注。其是将局部注射液注入病变部的粘膜下层,人工引起浮肿后,将隆起的粘膜病变部与粘膜下层一起切除。然而,有报道称,尤其是十二指肠的ESD会因内窥镜的操作性、肠壁的薄度等而以30%左右的概率发生穿孔等并发症。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表2007-528755号公报

[0010] 专利文献2:国际公开第2017/130802号

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Haraguchi等人,Stem Cells Transl Med.2012Feb;1(2):136-41

[0013] 非专利文献2:Sawa等人,Surg Today.2012Jan;42(2):181-4

[0014] 非专利文献3:Tanaka等人,J Gastroenterol.2013Sep;48(9):1081-9

[0015] 非专利文献4:Tanaka等人,Surg Today.2017Jan;47(1):114-121

### 发明内容

[0016] 发明要解决的课题

[0017] 本发明的目的在于提供用于使具有损伤部的管腔器官、尤其是十二指肠的组织再生的片状细胞培养物、该片状细胞培养物的制造方法及使用了该片状细胞培养物的管腔器官的损伤部的再生方法等。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本申请的发明人在对十二指肠的ESD中减少术后并发症的方法进行深入研究的过程中,首次发现通过将骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物贴附于ESD施术部位的外侧,可以保持溃疡底部的连续性,可以预防术后穿孔,并基于该见解进一步继续进行研究,从而完成了本发明。

[0020] 即,本发明涉及下述所示的内容:

[0021] [1]片状细胞培养物,其是用于促进在管腔壁至少一侧具有损伤部的管腔器官治愈的片状细胞培养物,其特征在于,该片状细胞培养物应用于与存在损伤的部位对应的管腔壁的反侧。

[0022] [2]根据[1]的片状细胞培养物,其中,损伤处于管腔壁的内侧部,片状细胞培养物应用于管腔壁对应的反侧部;或者,损伤处于管腔壁的外侧部,片状细胞培养物应用于管腔壁对应的内侧部。

[0023] [3]根据[1]的片状细胞培养物,其中,损伤是贯穿性损伤或非贯穿性损伤。

[0024] [4]根据[1]~[3]的片状细胞培养物,其中,管腔器官是消化道系统的器官。

[0025] [5]根据[1]~[4]的片状细胞培养物,其中,损伤是管腔壁表面组织剥离导致的损伤。

[0026] [6]根据[1]~[5]的片状细胞培养物,其还具有包含凝胶及/或聚合物的增强层。

[0027] [7]根据[1]~[6]的片状细胞培养物,其特征在于,其与带蒂血管一起应用。

[0028] [8]根据[1]~[7]的片状细胞培养物,其具有50~500 $\mu\text{m}$ 的厚度。

[0029] [9]根据[1]~[8]的片状细胞培养物,其含有接种密度为约 $7.1 \times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约 $3.0 \times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 的细胞群。

[0030] [10]根据[1]~[9]的片状细胞培养物,其用于预防因外科处置及/或外科处置产生的穿孔而导致的炎症。

[0031] [11]用于预防外科处置后管腔器官穿孔的方法,所述方法包括将片状细胞培养物应用于管腔器官的步骤,所述片状细胞培养物应用于实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧。

[0032] [12]根据[11]所述的方法,其中,外科处置是对管腔器官的粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层的剥离。

[0033] [13]根据[11]或[12]的方法,其中,片状细胞培养物以能够完全覆盖实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧的方式而应用。

[0034] [14]根据[11]~[13]的方法,其中,片状细胞培养物经递送装置被递送至实施了处置的部位或与实施了处置的部位对应的反侧。

[0035] [15]用于处置管腔壁表面的疾患部的方法,所述方法包括:

[0036] (a) 将管腔壁表面的疾患部剥离的步骤;以及

[0037] (b) 将片状细胞培养物应用于步骤(a)中经剥离的部分或与剥离部分对应的反侧的步骤。

[0038] [16]根据[15]的方法,其中,疾病为癌症。

[0039] [17]根据[15]或[16]的方法,其中,管腔壁表面的疾患部的剥离是具有疾患部的粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层的剥离。

#### [0040] 发明效果

[0041] 根据本发明,在管腔壁至少一侧具有损伤的管腔组织中,将片状细胞培养物移植至与存在损伤的部位对应的相反侧,由此能够促进组织的治愈。尤其是对因ESD等的施术而形成的损伤也具有效果,因此能够预防这些施术后的并发症,能够提高预后。

#### 附图说明

[0042] 图1表示本发明的片状细胞培养物的组织染色图像。A是猪骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物,B是在猪骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物上形成了纤维蛋白凝胶的增强层的情况,C是猪间充质干细胞的片状细胞培养物的染色图像。骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物的片厚为约100 $\mu\text{m}$ ,与此相对,猪间充质干细胞的片状细胞培养物为不足50 $\mu\text{m}$ 的厚度。

[0043] 图2表示十二指肠的消化道壁的组织染色图像。A是表示猪十二指肠壁的结构的一面染色图像。11表示粘膜,12表示粘膜下层(布路纳氏腺(Brunner's gland)),20表示肌层。B是ESD处置前的组织染色图像,将虚线部分切除。C是ESD处置后的染色图像。可知残留肌层而除去了粘膜及粘膜下层。

[0044] 图3表示对照组的猪的ESD施术部位的组织染色图像。分别地,A表示对象组1,B表示对象组2。在任何施术部位,均在箭头所示的部位溃疡底部的连续性消失,发生了术后穿孔。

[0045] 图4-1表示片处置组的猪的ESD施术部位的组织染色图像。分别地,A、B表示片处置组1,C、D表示片处置组2,E、F表示片处置组3,G、H表示片处置组4。可知:A、C及F的箭头所示的部位是贴附有猪骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物的部位,可保持溃疡底部的连续性,还可以在组织学上预防术后穿孔。另外,A及C的虚线四边形所围成的部位的放大图分别为B及D,在B的由虚线椭圆所围成的部位可观察到作为所贴附的片状细胞培养物的增强层的纤维蛋白。另外可知:D的由虚线椭圆所围成的部位的纤维蛋白的连续性消失。另外,可以在F的箭头所示的部位可观察到作为所贴付的片状细胞培养物的增强层的纤维蛋白。

[0046] 图4-2表示片处置组的猪的ESD施术部位的组织染色图像。分别地,A、B表示片处置组1,C、D表示片处置组2,E、F表示片处置组3,G、H表示片处置组4。可知:A、C及F的箭头所示的部位是贴附有猪骨骼肌成肌细胞的片状细胞培养物的部位,可保持溃疡底部的连续性,还可以在组织学上预防术后穿孔。另外,A及C的由虚线四边形所围成的部位的放大图分别为B及D,在B的由虚线椭圆所围成的部位可观察到作为所贴付的片状细胞培养物的增强层的纤维蛋白。另外可知:D的由虚线椭圆所围成的部位的纤维蛋白的连续性正在消失。另外,在F的箭头所示的部位可观察到作为所贴付的片状细胞培养物的增强层的纤维蛋白。

[0047] 图5表示将表1的粘连分值作图而得到的数据。

[0048] 图6表示炎症反应的进展。炎症反应的增减以血浆中的C反应性蛋白(CRP)及TNF- $\alpha$ 的表达的增减来表示。

#### 具体实施方式

[0049] 以下,对本发明进行详细地说明。

[0050] 本说明书中,只要未另行定义,则本说明书中使用的所有技术用语及科学用语均具有与本领域技术人员通常理解的意思相同的含义。本说明书中所提及的所有专利、申请、

已公开的申请及其他出版物均通过引用全部并入本说明书中。另外,在本说明书中所提及的出版物与本说明书的记载产生矛盾的情况下,本说明书的记载优先。

[0051] 在本发明中,“片状细胞培养物”是指细胞相互连接成为片状的培养物。细胞彼此可以直接(包括经由粘附分子等细胞要素的方式)相互连接、及/或经由中间物而相互连接。作为中间物,只要是至少能够将细胞彼此物理性(机械性)地连接的物质,则并无特别限制,可列举例如胞外基质等。中间物优选为来自细胞的物质,特别优选为来自构成细胞培养物的细胞的物质。细胞至少被物理性(机械性)地连接,也可以进一步被功能性地连接,例如化学性连接、电连接。片状细胞培养物可以为由一个细胞层构成的培养物(单层),也可以是由两个以上的细胞层构成的培养物(层叠(多层)体,例如2层、3层、4层、5层、6层等)。另外,片状细胞培养物可以具有:细胞不显示明确的层结构而厚度超出单个细胞厚度的三维结构。例如在片状细胞培养物的垂直截面中细胞可以并不在水平方向上均匀地排列而以不均匀(例如镶嵌(mosaic)状)配置的状态存在。

[0052] 片状细胞培养物优选不包含支架(支承体)。支架有时用于使细胞粘附在其表面上及/或其内部从而维持片状细胞培养物的物理一体性而在本技术领域中使用,例如,已知有聚偏氟乙烯(PVDF)制的膜等,但本发明的片状细胞培养物即使在没有上述支架时也能够维持其物理一体性。另外,本发明的片状细胞培养物优选仅包含来自构成片状细胞培养物的细胞的物质,不包含其它物质。

[0053] 构成片状细胞培养物的细胞只要是能够形成片状细胞培养物的细胞,则并无特别限定,例如,包括贴壁细胞(粘附性细胞)。贴壁细胞包含例如具有贴壁性的体细胞(例如心肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞、胰细胞、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、滑膜细胞、软骨细胞等)及干细胞(例如成肌细胞、心脏干细胞等组织干细胞、胚胎干细胞、iPS细胞(induced pluripotent stem cell,诱导性多能干细胞)等多能性干细胞、间充质干细胞等)等。体细胞可以是由干细胞、尤其是iPS细胞分化而成的细胞(来自iPS细胞的贴壁细胞)。作为构成片状细胞培养物的细胞的非限定性例子,可列举例如成肌细胞(例如,骨骼肌成肌细胞等)、间充质干细胞(例如,源于骨髓、脂肪组织、外周血、皮肤、毛根、肌肉组织、子宫内膜、胎盘、脐带血的细胞等)、心肌细胞、成纤维细胞、心脏干细胞、胚胎干细胞、iPS细胞、滑膜细胞、软骨细胞、上皮细胞(例如,口腔粘膜上皮细胞、视网膜色素上皮细胞、鼻粘膜上皮细胞等)、内皮细胞(例如,血管内皮细胞等)、肝细胞(例如,肝实质细胞等)、胰细胞(例如,胰岛细胞等)、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞等。作为来自iPS细胞的贴壁细胞的非限定性例子,可列举来自iPS细胞的心肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞、胰细胞、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、滑膜细胞、软骨细胞等。

[0054] 在本发明中,“骨骼肌成肌细胞”是指存在于骨骼肌中的成肌细胞。骨骼肌成肌细胞是本技术领域是熟知的,可以由骨骼肌利用任意的已知方法(例如,日本特开2007-89442号公报中记载的方法等)来制备,也可以商业获得(例如Lonza、Cat#CC-2580)。骨骼肌成肌细胞并无限定,例如可以通过CD56、 $\alpha$ 7整联蛋白、肌球蛋白重链IIa、肌球蛋白重链IIb、肌球蛋白重链IIc(IIx)、MyoD、Myf5、Myf6、肌细胞生成素(Myogenin)、结蛋白(Desmin)、PAX3等标记物进行鉴定。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性。进而在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性及结蛋白阳性。骨骼肌成肌细胞可以来源于具有骨骼肌的任意生物而

并无限定,可以源于例如人、非人灵长类、啮齿目动物(小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔、狗、猫、猪、马、牛、山羊、绵羊等哺乳动物。在一个方式中,骨骼肌成肌细胞是哺乳动物的骨骼肌成肌细胞。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是人骨骼肌成肌细胞。另外,骨骼肌成肌细胞可以从任意的骨骼肌采集。在一个方式中,本发明的骨骼肌成肌细胞是来自大腿部、颈部、腹部的骨骼肌成肌细胞。

[0055] 构成片状细胞培养物的细胞可以来自能够利用片状细胞培养物进行治疗的任意生物。所述生物不受限定,例如,包括人、非人灵长类、狗、猫、猪、马、山羊、绵羊、啮齿目动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔等。另外,构成片状细胞培养物的细胞的种类的数目并无特别限定,可以仅由1种细胞构成,也可以使用两种以上的细胞。在形成片状细胞培养物的细胞为2种以上的情况下,最多的细胞的含有比率(纯度)在片状细胞培养物的形成结束时为50%以上,优选为60%以上,更优选为70%以上,进一步优选为75%以上。

[0056] 细胞可以是源自异种的细胞,也可以是源自同种的细胞。此处,关于“源自异种的细胞”,在片状细胞培养物被用于移植的情况下,表示源自与其受体为不同的种的生物的细胞。例如,受体为人时,源自猴、猪的细胞等属于源自异种的细胞。另外,“源自同种的细胞”是指源自与受体为相同的种的生物的细胞。例如,受体为人时,人细胞属于源自同种的细胞。源自同种的细胞包括自源细胞(也称为自身细胞或自体细胞,即,源自受体的细胞)和同种非自源细胞(也称为异体细胞)。自源细胞即使进行移植也不发生排斥反应,因此在本发明中是优选的。但是,也可以利用源自异种的细胞、同种非自源细胞。利用源自异种的细胞、同种非自源细胞时,为了抑制排斥反应,有时需要进行免疫抑制处理。需要说明的是,本说明书中也有时将自源细胞以外的细胞、即源自异种的细胞和同种非自源细胞统称为非自源细胞。在本发明的一个方式中,细胞为自体细胞或异体细胞。在本发明的一个方式中,细胞为自体细胞。在本发明的另一方式中,细胞为异体细胞。

[0057] 片状细胞培养物可以用已知的任意方法(例如参见专利文献1、日本特开2010-081829、日本特开2011-110368等)来制造。典型而言,片状细胞培养物的制造方法包括:将细胞接种于培养基材上的步骤、将已接种的细胞进行片化的步骤、将所形成的片状细胞培养物从培养基材剥离的步骤,但并不限于此。可以在将细胞接种于培养基材上的步骤之前进行将细胞冷冻的步骤及将细胞解冻的步骤。进而,也可以在将细胞解冻的步骤之后进行清洗细胞的步骤。上述各步骤可以用适合制造片状细胞培养物的已知的任意方法进行。本发明的制造方法可以包括制造片状细胞培养物的步骤,在该情况下,制造片状细胞培养物的步骤可以包含上述片状细胞培养物的制造方法涉及的1个或2个以上的步骤作为子步骤。在某一方式中,不包括在将细胞解冻的步骤之后且将细胞接种于培养基材上的步骤之前使细胞增殖的步骤。

[0058] 对于培养基材而言,只要细胞能在其上形成细胞培养物,则并无特别限制,例如,包括各种材质的容器、容器中的固态或半固态的表面等。容器优选为不使培养液等液体透过的结构·材料。作为所述材料,并无限定,可列举例如聚乙烯、聚丙烯、Teflon(注册商标)、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸甲酯、尼龙6,6、聚乙烯醇、纤维素、硅、聚苯乙烯、玻璃、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、金属(例如,铁、不锈钢、铝、铜、黄铜)等。另外,容器优选具有至少1个平坦的面。作为所述容器的例子,并无限定,可列举例如具备由能够形成细胞培养物的培养基材构成的底面和液体不透过性的侧面的培养容器。作为所述培养容

器的特定例,并无限定,可列举细胞培养皿、细胞培养瓶等。容器的底面可以为透明,也可以为不透明。若容器的底面为透明,则能够从容器的背侧进行细胞的观察、计数等。另外,容器可以在其内部具有固态或半固态的表面。作为固态的表面,可列举如上所述的各种材料的板、容器等,作为半固态的表面,可列举凝胶、软质的聚合物基质等。培养基材可以使用上述材料来制作,也可以利用市售的培养基材。作为优选的培养基材,并无限定,可列举例如适于片状细胞培养物的形成的、具有粘附性表面的基材。具体而言,可列举具有亲水性表面的基材,例如,在该表面上涂布有经电晕放电处理的聚苯乙烯、胶原蛋白凝胶(collagen gel)、亲水性聚合物等亲水性化合物的基材;另外,还可列举表面涂布有胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白(laminin)、玻连蛋白(tronectin)、蛋白多糖(proteoglycan)、糖胺多糖(glycosaminoglycan)等胞外基质、钙黏着蛋白家族(cadherin family)、选择素家族(seletin family)、整合素家族(integrin family)等细胞粘附因子等基材等。另外,上述基材已有市售(例如,Corning<sup>(R)</sup>TC处理培养皿(TC-Treated Culture Dish)、Corning等)。培养基材可以整体或部分透明,也可以不透明。

[0059] 培养基材可以在表面被覆有响应于刺激(例如,温度、光)而发生物性变化的材料。作为所述材料,并无限定,例如可以使用下述已知材料:由(甲基)丙烯酰胺化合物、N-烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如,N-乙基丙烯酰胺、N-正丙基丙烯酰胺、N-正丙基甲基丙烯酰胺、N-异丙基丙烯酰胺、N-异丙基甲基丙烯酰胺、N-环丙基丙烯酰胺、N-环丙基甲基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基甲基丙烯酰胺、N-四氢糠基丙烯酰胺、N-四氢糠基甲基丙烯酰胺等)、N,N-二烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如,N,N-二甲基(甲基)丙烯酰胺、N,N-乙基甲基丙烯酰胺、N,N-二乙基丙烯酰胺等)、具有环状基团的(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如,1-(1-氧代-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-丙烯基)-吗啉、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吗啉等)、或乙烯基醚衍生物(例如,甲基乙烯基醚)的均聚物或共聚物形成的温度响应性材料,具有偶氮苯基的光吸收性高分子、三苯甲烷无色氢氧化物(triphenylmethane leucohydroxide)的乙烯基衍生物与丙烯酰胺系单体的共聚物、及包含螺苯并吡喃的N-异丙基丙烯酰胺凝胶等光响应性材料等(例如,参见日本特开平2-211865、日本特开2003-33177)。通过对这些材料施加规定的刺激,可以使其物性(例如,亲水性、疏水性)变化,从而促进粘附在该材料上的细胞培养物的剥离。被覆有温度响应性材料的培养皿已有市售(例如,CellSeed Inc.的UpCell<sup>(R)</sup>),可以将其用于本发明的制造方法中。

[0060] 培养基材可以为各种形状,但优选为平坦的。另外,其面积并无特别限定,例如可以为约1cm<sup>2</sup>~约200cm<sup>2</sup>、约2cm<sup>2</sup>~约100cm<sup>2</sup>、约3cm<sup>2</sup>~约50cm<sup>2</sup>等。例如可列举作为培养基材的直径为10cm的圆形的培养皿。在该情况下,面积为56.7cm<sup>2</sup>。

[0061] 培养基材可以涂覆(被覆或涂布)有血清。通过使用涂覆有血清的培养基材,可以形成密度更高的片状细胞培养物。所谓“涂覆有血清”,是指在培养基材的表面粘附有血清成分的状态。所述状态并无限定,例如,可以通过用血清对培养基材进行处理而获得。利用血清的处理包括使血清与培养基材接触、及根据需要孵育规定的时间。

[0062] 作为血清,可以使用异种血清及/或同种血清。关于异种血清,在将片状细胞培养物用于移植的情况下,其表示来自与受体为不同的种的生物的血清。例如,受体为人时,来

自牛、马的血清(例如,胎牛血清(FBS、FCS)、小牛血清(CS)、马血清(HS))等属于异种血清。另外,“同种血清”是指来自与受体为相同的种的生物的血清。例如,受体为人时,人血清即为同种血清。同种血清包括自身血清(也称为自体血清,即,来自受体的血清)、及来自受体以外的同种个体的同种异体血清。需要说明的是,在本说明书中,也有时将自身血清以外的血清(即,异种血清和同种异体血清)统称为非自身血清。

[0063] 关于用以涂覆培养基材的血清,可以为市售的血清,或通过常规方法从采自所期望的动物的血液进行制备。具体而言,可列举例如下述方法,即,将采集的血液于室温下放置约20~约60分钟左右从而使其凝固,将其在约 $1000\times g$ ~约 $1200\times g$ 左右的条件下离心分离,并采集上清液的方法等。

[0064] 在培养基材上进行孵育时,血清可以使用原液,也可以稀释后使用。稀释可以使用任意介质进行,例如,可以不受限制地使用水、生理盐水、各种缓冲液(例如,PBS、HBSS等)、各种液体培养基(例如,DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等。关于稀释浓度,只要血清成分能够粘附在培养基材上则不受特别限制,例如,为约0.5%~约100%(v/v),优选为约1%~约60%(v/v),更优选为约5%~约40%(v/v)。

[0065] 孵育时间也是只要血清成分能够粘附在培养基材上则并无特别限定,例如,为约1小时~约2小时,优选为约2小时~约48小时,更优选为约2小时~约24小时,进一步优选为约2小时~约12小时。孵育温度也是只要血清成分能够粘附在培养基材上则并无特别限定,例如,为约 $0^{\circ}\text{C}$ ~约 $60^{\circ}\text{C}$ ,优选为约 $4^{\circ}\text{C}$ ~约 $45^{\circ}\text{C}$ ,更优选为室温~约 $40^{\circ}\text{C}$ 。

[0066] 孵育后可以将血清弃置。作为血清的弃置方法,可以采用利用移液器等的抽吸、倾析(decantation)等惯用的液体弃置方法。在本发明的优选方式中,在弃置血清后,可以使用无血清清洗液清洗培养基材。作为无血清清洗液,只要是不含有血清、且不对已粘附于培养基材的血清成分产生不良影响的液体介质,则并无特别限定,例如,可以不受限制地使用水、生理盐水、各种缓冲液(例如,PBS、HBSS等)、各种液体培养基(例如,DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等进行。作为清洗方法,可以采用惯用的培养基材清洗方法,例如可以不受限制地采用在培养基材上添加无血清清洗液、搅拌规定时间(例如,约5秒钟~约60秒钟)后弃置的方法等。

[0067] 本发明中,也可以用生长因子涂覆培养基材。此处,“生长因子”是指较之其不存在的情况而言能促进细胞的增殖的任意物质,例如,包括上皮细胞生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等。对于利用生长因子的培养基材的涂覆方法、弃置方法及清洗方法,除了孵育时的稀释浓度例如为约 $0.0001\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、优选为约 $0.0005\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 、更优选为约 $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 之外,基本与血清相同。

[0068] 本发明中,也可以用甾体药物涂覆培养基材。此处,“甾体药物”是指具有甾核的化合物中可能会对生物体造成肾上腺皮质功能障碍、库欣综合征等不良影响的化合物。作为所述化合物,并无限定,例如,包括皮质醇、泼尼松龙、去炎松(triamcinolone)、地塞米松、倍他米松等。对于利用甾体药物的培养基材的涂覆方法、弃置方法及清洗方法而言,除了孵育时的稀释浓度以外基本与血清相同,关于前述稀释浓度,对于地塞米松而言,例如为约

0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选为约0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选为约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0069] 培养基材可以用血清、生长因子及甾体药物中的任一种进行涂覆,也可以用这些成分的任意组合(即,血清和生长因子、血清和甾体药物、血清和生长因子和甾体药物、或生长因子和甾体药物的组合)进行涂覆。在用多种成分进行涂覆的情况下,可以将这些成分混合并同时进行涂覆,也可以通过各自分开的步骤进行涂覆。

[0070] 对于培养基材,可以在用血清等进行涂覆后立即接种细胞,也可以在涂覆后预先保存,然后接种细胞。经涂覆的基材可以通过保存于例如约4 $^{\circ}\text{C}$ 以下、优选约-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下、更优选约-80 $^{\circ}\text{C}$ 以下来进行长期保存。

[0071] 细胞向培养基材上的接种可以以已知的任意方法及条件进行。关于细胞向培养基材上的接种,例如可以通过将细胞悬浮于培养液而得的细胞悬浮液注入培养基材(培养容器)中而进行。关于细胞悬浮液的注入,可以使用滴管(spirit)、移液器等适合于细胞悬浮液的注入操作的器具。

[0072] 接种能够以约7.1 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约3.0 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约7.3 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约2.8 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约7.5 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约2.5 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约7.8 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约2.3 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约8.0 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约2.0 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约8.5 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约1.8 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约9.0 $\times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约1.6 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 、约1.0 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ ~约1.6 $\times 10^6$ 个/ $\text{cm}^2$ 等的密度进行。

[0073] 本发明的一方面涉及前述片状细胞培养物,其是用于促进在管腔壁至少一侧具有损伤部的管腔器官治愈的片状细胞培养物,其特征在于,所述片状细胞培养物应用于与存在损伤的部位对应的管腔壁的反侧。

[0074] 本发明的片状细胞培养物可以通过对管腔壁至少一侧(例如内侧部)的已损伤的组织从管腔壁的反侧(例如外侧部)进行应用来促进治愈。

[0075] 若在管腔壁、例如消化道壁的一侧产生损伤,则从损伤部分产生穿孔的风险提高,另外,如果损伤是贯通性,则成为穿孔。在管腔壁至少一侧产生损伤时,将本发明的片状细胞培养物通过例如贴附应用于与存在损伤的部位对应的反侧,由此能够促进产生损伤的管腔器官的组织的治愈并使其再生。

[0076] 作为组织再生的机制,认为是例如:基于片状细胞培养物在损伤部位持续地释放担负血管新生、细胞保护、修复等作用的VEGF、HGF等细胞因子、胶原蛋白等的旁分泌效果、及/或所应用的周围组织的前体细胞、干细胞活化而可得到促进胶原蛋白产生等的自分泌效果等。

[0077] 在本发明中,“管腔器官”是指收纳于体腔的具有内腔的器官、即具有管状或袋状结构的器官,可列举例如消化道系统、循环系统、泌尿系统、呼吸系统、女性生殖系统的器官等。典型而言,为消化道系统的器官。另外,在本发明中所谓“管腔壁”,是指构成管腔器官的管或袋的器官壁。管腔壁包括面向内腔的内侧部和形成器官的外表面的外侧部,在本发明中提及“管腔壁的一侧”的情况,是指管腔壁的内侧或外侧中的任意,将与内侧相对的外侧或与外侧相对的内侧称作“反侧”。另外,将相对于一侧的某个区域而言位于管腔壁的正好反侧的区域称作“对应的反侧”。

[0078] 作为消化道系统的器官,可列举食管、胃、十二指肠、胰脏、胆囊、胆管、小肠、大肠、直肠等。其中,从管腔壁薄、产生穿孔的风险高、由于处于暴露于各种消化液的严苛环境中而容易加剧损伤的恶化等方面考虑,最优选十二指肠。

[0079] 在本发明的一个方式中,管腔器官是消化道系统的器官。在消化道系统的器官中,管腔壁的截面结构大致分为自内腔侧起形成粘膜层、肌层、浆膜层的三层结构。粘膜层进一步分成粘膜、粘膜肌层及粘膜下层,浆膜层还分成浆膜下层及浆膜。例如在肿瘤、溃疡等的情况下,通常而言,内侧的粘膜首先产生病变,其向浆膜层侧即管腔壁的外侧浸润,从而疾患加剧。在病变浸润至粘膜层的情况下,剥离至粘膜层、即粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层而除去,从而能够对疾患进行处置。通过所述处置而在管腔器官的内腔侧产生肌层露出的部位。本发明的“损伤”包括所述肌层露出的部位。另外,例如,如果病变的浸润到达至浆膜等、损伤由于某种理由而从粘膜到达至浆膜时,则成为贯通性、即贯穿性损伤。在产生贯穿性损伤的情况下,如果浆膜侧的损伤轻微,则成为气体泄漏这样的轻微泄漏(minor leak),如果损伤变大,则成为内腔的液体漏出至管腔器官外这样的严重泄漏(major leak)。

[0080] 在本发明中所谓“损伤”或“损伤部”,是指管腔壁的至少一部分受损的状态或受损部分。所谓“在一侧具有损伤”,是指管腔壁的一侧(例如内侧)的至少一部分受损的状态,该损伤可以是贯通性,即可以是以贯穿管腔壁的形态受损的贯穿性损伤,也可以是非贯穿性损伤。在损伤为贯通性、即贯穿性损伤的情况下,一侧的损伤部大于相反侧的损伤部。例如在至少内侧具有损伤部的贯穿性损伤的情况下,内侧的损伤部大于外侧的损伤部。在一个方式中,损伤是非贯穿性损伤。在本发明中所谓“非贯穿性损伤”,是指损伤不贯穿管腔壁的状态。即内侧(内腔侧)的非贯穿性损伤仅在管腔的内腔侧发生损伤,损伤未到达外侧(外壁侧)。同样,外侧的非贯穿性损伤仅在管腔的外壁侧发生损伤,损伤未到达内腔侧。在一个方式中,损伤是管腔壁中粘膜层发生损伤的非贯穿性损伤。

[0081] 在另一个方式中,损伤是贯穿性损伤。在将本发明的片状细胞培养物应用于贯穿性损伤的情况下,可以直接应用于损伤部或与损伤部对应的相反侧,例如可以在通过用丝线缝合损伤部位等而堵塞贯穿性损伤的孔后进行应用。典型而言,在贯穿性损伤中,如果是轻微泄漏,则直接应用本发明的片状细胞培养物,如果是严重泄漏,则在将损伤部位缝合后应用本发明的片状细胞培养物。

[0082] 管腔器官的损伤可以是切伤、撕裂伤、割伤、挫伤、剥离伤等起因于来自外部的力所产生的创伤的损伤,也可以是例如因溃疡等结构受损而产生的损伤。在本发明中所谓“剥离伤”,是指管腔器官壁的结构的一部分因某种原因而剥脱所产生的创伤。在一个方式中,本发明的损伤可以是切伤、剥离伤等创伤,优选为剥离伤。在另一个方式中,本发明的损伤例如可以是因内镜粘膜下剥离术(ESD)、内镜粘膜切除术(EMR)、息肉切除术(polypectomy)等对消化道内壁的施术而产生的损伤。在优选的一个方式中,本发明的损伤例如可以是因内镜粘膜下剥离术(ESD)、内镜粘膜切除术(EMR)等对消化道内壁的剥离术而产生的损伤。在更优选的一个方式中,损伤是由内镜粘膜下剥离术(ESD)产生的损伤。

[0083] 因此,在本发明的特别优选的一个方式中,损伤是由十二指肠的ESD产生的损伤。如上述所示,出于肠道狭窄且弯曲、消化道壁薄、并且由于处于内窥镜到达的极限的范围而使得ESD的施术需要熟练、处于还暴露于胰液或胆汁的严酷的环境等理由,在ESD施术后作为并发症而在施术部位产生术后穿孔的风险特别高。就因胃、大肠的ESD产生的穿孔而言,利用夹子的封闭等而保守治愈的病例很多。十二指肠ESD的术后穿孔的预防也同样地在实际临床上尝试了利用夹子封闭(Maekawa S等人,Surg Endosc,2015)、聚乙醇酸片(Neovail sheet<sup>(R)</sup>)贴附(Takimoto K等人,Dig Endosco,2014)等使用已有的医药品或医疗装置的方

法,但现状是不能完全预防(Fujihara S等人,World J Gastroenterol,2016)。与此相对,通过对十二指肠ESD的施术部位从外壁侧应用本发明的片状细胞培养物,能够促进施术部位的再生,降低术后穿孔的风险,处置及/或预防术后穿孔。从管腔壁漏至腹腔内的胰液、胆汁与消化液混合而被活化,引起炎症,因此通过应用本发明的片状细胞培养物,能够预防因ESD等外科处置及术后穿孔引起的腹膜炎等炎症。

[0084] 本发明的片状细胞培养物应用于相对于损伤而言的损伤部或与损伤部对应的相反侧(以下,有时统称为“应用部位”)的至少任一者。在一个方式中,本发明的片状细胞培养物应用于与存在管腔壁的损伤的部位对应的相反侧。即,在损伤处于管腔壁的内侧部的情况下,本发明的片状细胞培养物应用于管腔壁的对外的外侧部,在损伤处于管腔壁的外侧部的情况下,本发明的片状细胞培养物应用于管腔壁的对内的内侧部。

[0085] 在本发明的另一个方式中,本发明的片状细胞培养物以相对于损伤而言能够完全覆盖损伤部或与损伤部对应的相反侧的方式而应用。所谓“完全覆盖损伤部或与损伤部对应的相反侧”,是指以覆盖损伤部存在的区域或与其对应的相反侧的区域整体的方式应用片状细胞培养物。在该情况下,可以用比前述区域大的1张片状细胞培养物以完全覆盖的方式进行应用,也可以通过无缝隙地应用多个片状细胞培养物来覆盖整个区域。

[0086] 构成本发明的片状细胞培养物的细胞(以下,有时称作“片形成细胞”)参照上文的详细叙述。本发明的片状细胞培养物无需包含所应用的管腔器官的细胞,当然也可以含有在该器官中不存在的细胞。因此,在一个方式中,本发明的片状细胞培养物包含异位细胞、即在应用器官中原本不存在的细胞。在优选的一个方式中,如上述那样应用本发明的片状细胞培养物的是消化道系统的器官(即平滑肌)的损伤,作为此时的异位细胞,可列举例如骨骼肌成肌细胞等源自横纹肌的细胞、间充质干细胞等。在更优选的一个方式中,本发明的片状细胞培养物包含骨骼肌成肌细胞。骨骼肌成肌细胞可以源自大腿、颈部、腹部等的横纹肌。

[0087] 骨骼肌成肌细胞是指存在于骨骼肌(横纹肌)的成肌细胞。骨骼肌成肌细胞是本技术领域熟知的,可以由骨骼肌利用任意的已知方法(例如,日本特开2007-89442号公报中记载的方法等)来制备,也可以商业获得(例如,Lonza、Cat#CC-2580)。骨骼肌成肌细胞并无限定,例如可以通过CD56、 $\alpha 7$ 整联蛋白、肌球蛋白重链IIa、肌球蛋白重链IIb、肌球蛋白重链IIc(IIx)、MyoD、Myf5、Myf6、肌细胞生成素、结蛋白、PAX3等标记物进行鉴定。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性。进而在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性及结蛋白阳性。骨骼肌成肌细胞可以源于具有骨骼肌的任意生物而并无限定,可以源于例如人、非人灵长类、啮齿目动物(小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔、狗、猫、猪、马、牛、山羊、绵羊等哺乳动物。在一个方式中,骨骼肌成肌细胞是哺乳动物的骨骼肌成肌细胞。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是人骨骼肌成肌细胞。

[0088] 在由横纹肌肌肉组织制备骨骼肌成肌细胞的情况下,所制备的细胞群包含成纤维细胞。在制造本发明的片状细胞培养物时,使用包含由横纹肌肌肉组织制备的骨骼肌成肌细胞的细胞群的情况下,该细胞群包含一定量的成纤维细胞。成纤维细胞是本技术领域熟知的,可以通过TE-7(例如,参照Rosendaal等人,J Cell Sci.1994;107(Pt 1):29-37、Goodpaster等人,J Histochem Cytochem.2008;56(4):347-58等)等标记物进行鉴定。

[0089] 在一个方式中,形成本发明的片状细胞培养物的细胞包含由横纹肌肌肉组织制备

的骨骼肌成肌细胞。因此,在本发明的片状细胞培养物的制造中所使用的细胞群可以包含骨骼肌成肌细胞及成纤维细胞。在一个方式中,本发明的片状细胞培养物的制造中所使用的细胞群的CD56阳性率可以为50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上,优选为60%以上。

[0090] 在本发明的片状细胞培养物的制造中所使用的细胞群可以包含成纤维细胞,但在成纤维细胞的含有率过高的情况下,骨骼肌成肌细胞的含有率下降,故不优选。因此,在一个方式中,在本发明的片状细胞培养物的制造中所使用的细胞群的TE7阳性率可以为50%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下,优选为40%以下。

[0091] 在本发明的片状细胞培养物的制造中所使用的细胞群也可以包含骨骼肌成肌细胞及成纤维细胞以外的细胞,但上述细胞优选尽可能地少。因此,CD56阳性率及TE7阳性率的合计值高是优选的,例如可以为80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上等,优选为90%以上。

[0092] 本发明的片状细胞培养物的厚度并无特别限定。在使用单层的片作为片状细胞培养物的情况下,其厚度通常为单个细胞以上的厚度,根据片形成细胞的种类,厚度也不同,在一个方式中,本发明的片状细胞培养物具有30 $\mu\text{m}$ 以上的厚度,在优选的一个方式中,具有50 $\mu\text{m}$ 以上的厚度。作为本发明的片状细胞培养物的厚度的范围,可列举例如30 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ 、优选50 $\mu\text{m}$ ~150 $\mu\text{m}$ 、更优选60 $\mu\text{m}$ ~100 $\mu\text{m}$ 等。在使用层叠而成的片作为片状细胞培养物的情况下,成为不超过前述单层片厚度 $\times$ 层叠张数的厚度。因此,作为一个方式,例如在使用将5张单层片层叠而成的片的情况下,其厚度为150 $\mu\text{m}$ 以上,优选为250 $\mu\text{m}$ 以上,另外,作为厚度的范围,可列举例如150 $\mu\text{m}$ ~1000 $\mu\text{m}$ 、优选250 $\mu\text{m}$ ~750 $\mu\text{m}$ 、更优选300 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ 等。

[0093] 因此,本发明的片状细胞培养物的厚度可列举例如30 $\mu\text{m}$ ~1000 $\mu\text{m}$ 、优选50 $\mu\text{m}$ ~750 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ 等。

[0094] 在某个方式中,本发明的片状细胞培养物有时非常脆弱,难以操作。因此,出于使操作简便、降低破损风险的目的,本发明的片状细胞培养物可以还具有增强层。作为增强层,只要能够在不损害本发明的片状细胞培养物的功能的前提下增强结构,则可以为任意的增强层,例如,可以为包含凝胶及/或聚合物的增强层,由于是移植于生物体内的物质,因此优选为例如包含生物体适应性凝胶、聚合物等的生物体适应性的增强层。

[0095] 作为能够在本发明的增强层中使用的凝胶、优选生物体适应性凝胶,只要是在引入生物体内时对生物体不造成不良影响的凝胶,则可以为任意凝胶,可列举例如纤维蛋白凝胶、纤维蛋白原凝胶、明胶凝胶、胶原蛋白凝胶等,但并不限于此。

[0096] 作为能够在本发明的增强层中使用的聚合物、优选生物体适应性聚合物,只要是在引入生物体内时对生物体不造成不良影响的聚合物,则可以为任意聚合物,可列举例如聚乳酸、聚乙醇酸、聚二氧六环酮(Polydioxanone)、聚糖乙内酰胺(Poliglecaprone)、胶原蛋白等,但并不限于此。

[0097] 包含生物体适应性凝胶的增强层的形成方法可以使用在本技术领域已知的方法。作为上述方法,可列举例如:在片状细胞培养物上喷雾生物体适应性凝胶、聚合物或成为其材料的成分的方法;在片状细胞培养物上层叠溶胶状的生物体适应性物质而凝胶化的方法;浸渍于液状的凝胶后使凝胶固化的方法;等等,此外,还可列举日本特开2016-52271

号公报等中记载的方法等,但不限于此。

[0098] 增强层是用于使本发明的片状细胞培养物的操作简便且降低破损风险的物质,因此优选具有一定以上的强度,优选还具有弹性。作为包含凝胶、聚合物的结构物的强度的已知的评价单位,可列举例如凝胶强度(jelly strength)等,作为片状结构物的强度的已知的评价单位,可列举例如拉伸断裂荷重等。关于凝胶强度的测定方法,记载于例如JIS K 6503等中。拉伸断裂荷重是指将片状细胞培养物等的两端在水平方向上拉伸直至断裂为止的最大荷重,其测定方法例如记载于日本特愿2014-179151等中。

[0099] 作为本发明的片状细胞培养物的增强层,并不限于此,例如,作为拉伸断裂荷重,可以为约0.010N以上、约0.015N以上、约0.020N以上、约0.025N以上、约0.030N以上、约0.035N以上、约0.040N以上、约0.045N以上等,另外,可以为约0.010N~约0.200N、约0.015N~约0.100N、约0.020N~约0.50N等的范围。具有增强层的片状细胞培养物相较于不具有增强层的片状细胞培养物而言强度可以为约1.5倍以上、约2倍以上、约3倍以上、约4倍以上、约5倍以上、约6倍以上、约7倍以上、约8倍以上、约9倍以上、约10倍以上,另外,可以为约1.5倍~约20倍、约2倍~约15倍、约2.5倍~约10倍等的范围。

[0100] 在应用具有增强层的片状细胞培养物的情况下,优选以增强层不与应用部位直接接触的方式进行应用。即,优选以使片状细胞培养物位于应用部位与增强层之间的方式进行应用。

[0101] 片状细胞培养物在应用部位的应用可以使用本技术领域中的已知任意装置及/或方法来实施。

[0102] 在一个方式中,在将本发明的片状细胞培养物应用于管腔组织时,可以与促进治愈的其他组合物及/或移植片等一并应用。作为促进治愈的其他组合物及/或移植片,可列举例如带蒂大网膜片等包含带蒂血管的移植片、聚乙醇酸片、纤维蛋白凝胶、Adspray<sup>(R)</sup>等,但并不限于此。在优选的一个方式中,本发明的片状细胞培养物与包含带蒂血管的移植片一起应用。作为包含带蒂血管的移植片的典型例,可列举例如带蒂大网膜片等。

[0103] 所述促进治愈的其他组合物及/或移植片可以为与本发明的片状细胞培养物独立的其他组合物或移植片,也可以例如组装入片状细胞培养物或增强层等中。

[0104] 在本发明的片状细胞培养物与独立的促进治愈的其他组合物及/或移植片一起应用的情况下,所述组合物及/或移植片可以在应用片状细胞培养物之前进行应用,也可以在应用片状细胞培养物之后进行应用。当在应用片状细胞培养物之前应用其他组合物及/或移植片的情况下,以位于应用部位与片状细胞培养物之间的方式而应用。即,首先,将其他组合物及/或移植片应用于应用部位,然后在其上应用片状细胞培养物(任意地包含增强层)。当在应用片状细胞培养物之后应用其他组合物及/或移植片的情况下,相对于应用部位在片状细胞培养物(任意地包含增强层)上进行应用。即,首先,将片状细胞培养物应用于应用部位,然后在其上应用其他组合物及/或移植片。

[0105] 本发明的另一方面涉及制造本发明的片状细胞培养物的方法(以下,有时称作“本发明的制造方法”)。

[0106] 本发明的制造方法包括以下步骤:

[0107] (i) 将包含片形成细胞的细胞群接种于培养基材的步骤;

[0108] (ii) 将步骤(i)中已接种的细胞群在片化介质中片化,形成片状细胞培养物的步

骤;以及

[0109] (iii) 将步骤(ii)中所形成的片状细胞培养物从培养基材剥离的步骤。

[0110] 在(i)中,在培养基材上接种包含片形成细胞的细胞群。就片形成细胞而言,作为能够构成片状细胞培养物的细胞,只要是上述细胞,则并无特别限定。细胞群包含至少1种片形成细胞,也可以包含2种以上的片形成细胞,还可以包含除片形成细胞以外的细胞。在本发明的一个方式中,细胞群中所包含的至少1种片形成细胞是不存在于应用器官的异位细胞,优选为骨骼肌成肌细胞。在上述方式中,细胞群可进一步包含成纤维细胞。即,可列举包含骨骼肌成肌细胞和成纤维细胞作为片形成细胞的片状细胞培养物。在本发明的另一个方式中,细胞群中所包含的至少1种片形成细胞为间充质干细胞。在上述方式中,细胞群可进一步包含血管内皮细胞、心肌细胞。

[0111] 所接种的细胞密度只要是可形成片状细胞培养物的密度,则并无特别限定,在优选的方式中,细胞群以达到汇合的密度或其以上的密度进行接种。在本发明中,所谓“达到汇合的密度”,是指预期在接种细胞时通过所接种的细胞而无缝隙地覆盖培养容器的粘附表面整个面的程度的密度。例如为在接种时预期细胞相互接触的程度、产生接触抑制的密度、或因接触抑制而使细胞增殖实质性停止的密度。

[0112] “达到汇合的密度或其以上的密度”可以根据所接种的片形成细胞的种类而不同。例如在骨骼肌成肌细胞的情况下,可以为 $3.0 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>以上、 $3.5 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>以上、 $1.0 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>以上等。

[0113] 作为细胞群的接种密度的非限定性例,包括约 $7.1 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $3.0 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $7.3 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $2.8 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $7.5 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $2.5 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $7.5 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $3.0 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $7.8 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $2.3 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $8.0 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $2.0 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $8.5 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $1.8 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $9.0 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $1.6 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>、约 $1.0 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>~约 $1.6 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>等的密度。需要说明的是,只要没有特别记载,这些密度为细胞群中所含有的全部细胞的密度。

[0114] 在又一其他方式中,接种能够以可包含于细胞群中的至少1种片形成细胞在实质上不包含生长因子的细胞培养液中实质上不增殖的密度进行。在上述方式中,可包含于细胞群中的其他细胞可以是在受到增殖抑制的同时能够增殖的密度。

[0115] 本发明的方法中所使用的培养基材如上述所示。在优选的一个方式中,培养基材可以被血清被覆。在优选的另一个方式中,培养基材可以被温度响应性材料被覆。在进一步优选的一个方式中,培养基材可以被温度响应性材料及血清被覆。

[0116] 在(ii)中,所接种的细胞群在片化介质中孵育而片化,形成为片状细胞培养物。

[0117] 所接种的细胞的片化可以以已知的任意方法及条件进行。上述方法的非限定性例子记载于例如专利文献1、W02014/185517等中。认为细胞的片化可以通过细胞彼此经由粘附分子、胞外基质等细胞间粘附机构相互粘附而实现。因此,所接种的细胞的片化可以通过例如在形成细胞间粘附的条件下对细胞进行培养来实现。关于所述条件,只要可以形成细胞间粘附则可以为任何条件,通常只要是与通常的细胞培养条件相同的条件,即可形成细胞间粘附。作为所述条件,可列举例如在约37℃、5%CO<sub>2</sub>下的培养。另外,培养可以在通常的压力下(大气压下、非加压下)进行。培养可以在任意的大小及形状的容器中进行。片状细胞培养物的大小、形状可以通过下述方法任意调节:调节培养容器的细胞粘附面的大小·形

状,或者在培养容器的细胞粘附面设置所期望的大小·形状的模框(日文:型枠)并在其内部培养细胞等。在本说明书中,有时也将用于将所接种的细胞片化的培养称作“片化培养”。通过片化培养而使培养基材上(培养容器内)的片状细胞培养物的厚度减少。即,经接种后、细胞沉降后,通过之后的片化而使得在培养基材上细胞层的厚度减少,而片状细胞培养物因从培养基材剥离而收缩,再次增加厚度。关于由片化所致的厚度的减少,若将刚接种后的细胞层的厚度设为100%,则为约90%~约70%左右。

[0118] 期望在自然剥离片状细胞培养物之前结束用于片化的孵育。从孵育开始到自然剥离开始为止的时间可以根据所接种的细胞群中所含有的细胞的种类(尤其是片形成细胞的种类)、细胞的状态而发生变化,例如在接种包含骨骼肌成肌细胞作为片形成细胞的细胞群的情况下,大多情况在6~12小时左右发生自然剥离。因此,在本发明的一个方式中,用于片化的孵育时间的上限可以为12小时、11.5小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时或4小时。因此,在本发明的制造方法中,用于片化的孵育时间可以为2~12小时、2~11.5小时、2~11小时、2~10小时、2~9小时、2~8小时、2~7小时、2~6小时、2~5小时或2~4小时,优选为2~4小时或2~6小时。

[0119] 用于片化培养的细胞培养液(有时也称为“片化介质”或者简称为“培养液”或“培养基”)只要可以维持细胞的生存则并无特别限定,典型而言,可以利用以氨基酸、维生素类、电解质作为主成分的培养液。在本发明的一个方式中,培养液为以细胞培养用的基础培养基为基底的培养液。所述基础培养基并无限定,例如,包括DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等。这些基础培养基大多已有市售,其组成也是已知的。

[0120] 关于基础培养基,可以以标准的组成直接(例如,在市售的原本状态下)进行使用,也可以根据细胞种类、细胞条件来适当变更其组成。因此,本发明中使用的基础培养基并不限于已知组成的培养基,包括1种或2种以上的成分被追加、除去、增量或减量而得的培养基。

[0121] 作为基础培养基中所包含的氨基酸,并无限定,例如包含L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸等;作为维生素类,不受限定,例如包含D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、内消旋肌醇(i-inositol)、烟酰胺、核黄素、硫胺素、吡哆醇、生物素、硫辛酸、维生素B12、腺嘌呤、胸苷(thymidine)等;此外,作为电解质,不受限定,例如包含CaCl<sub>2</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>、NaCl、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、FeSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>、NaVO<sub>3</sub>、NiCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>等。在基础培养基中,除含有这些成分以外,还可以含有D-葡萄糖等糖类、丙酮酸钠、酚红等pH指示剂、腐胺等。

[0122] 在本发明的一个方式中,基础培养基中所包含的氨基酸的浓度为L-精氨酸:约63.2mg/L~约84mg/L、L-胱氨酸:约35mg/L~约63mg/L、L-谷氨酰胺:约4.4mg/L~约584mg/L、甘氨酸:约2.3mg/L~约30mg/L、L-组氨酸:约42mg/L、L-异亮氨酸:约66mg/L~约105mg/L、L-亮氨酸:约105mg/L~约131mg/L、L-赖氨酸:约146mg/L~约182mg/L、L-甲硫氨酸:约15mg/L~约30mg/L、L-苯丙氨酸:约33mg/L~约66mg/L、L-丝氨酸:约32mg/L~约42mg/L、L-苏氨酸:约12mg/L~约95mg/L、L-色氨酸:约4.1mg/L~约16mg/L、L-酪氨酸:约18.1mg/L~约104mg/L、L-缬氨酸:约94mg/L~约117mg/L。

[0123] 另外,在本发明的一个方式中,基础培养基中所包含的维生素剂的浓度为D-泛酸钙:约4mg/L~约12mg/L、氯化胆碱:约4mg/L~约14mg/L、叶酸:约0.6mg/L~约4mg/L、内消旋肌醇:约7.2mg/L、烟酰胺:约4mg/L~约6.1mg/L、核黄素:约0.0038mg/L~约0.4mg/L、硫胺素:约3.4mg/L~约4mg/L、吡哆醇:约2.1mg/L~约4mg/L。

[0124] 细胞培养液除含有上述成分以外,还可以含有血清、生长因子、甾体药物成分、硒成分等1种或2种以上的添加物。但是,在这些成分不是自体成分的情况下,可能成为来自制造工序的杂质,无法否认该杂质在临床中可能成为给受体带来过敏性休克等副作用的主要原因,因此,在应用于临床时,有时期望将上述非自体成分排除。因此,在本发明的优选方式中,细胞培养液不含有这些非自体的添加物中的至少1种的有效量。另外,在本发明的更优选的方式中,细胞培养液实质上不含有这些非自体的添加物中的至少1种。另外,在本发明的特别优选的方式中,细胞培养液实质上不含有非自体的添加物。在一个方式中,细胞培养液可以仅含有基础培养基。

[0125] 在本发明的一个方式中,细胞培养液实质上不含有血清。本说明书中也有时将实质上不含有血清的细胞培养液称为“无血清培养基”。此处,“实质上不含有血清”是指,培养液中的血清含量为在将片状细胞培养物应用于生物体时不造成不良影响的程度(例如,片状细胞培养物中的血清白蛋白含量小于约50ng的量),优选不主动在培养液中添加这些物质。在本发明中,为避免移植时的副作用,细胞培养液优选实质上不含有异种血清,进一步优选实质上不含有非自体血清。

[0126] 在本发明的一个方式中,细胞培养液包含血清。血清可以是同种血清,也可以是异种血清。在特定方式中,细胞培养液包含自体血清。当在涂覆有血清的培养基材上培养细胞的情况下,细胞培养液中所包含的血清(在细胞的培养中使用的血清)可以与用于涂覆培养基材的血清相同或不同。在一个方式中,细胞培养液中所包含的血清与用于涂覆培养基材的血清相同,在特定方式中,该血清为自体血清。血清可以是用于本发明的制造方法的血清。例如,血清可以是用于细胞的培养的血清,也可以是用于涂覆培养基材的血清。

[0127] 在本发明的一个方式中,细胞培养液不含有有效量的生长因子。此处,“有效量的生长因子”是指与不存在生长因子的情况相比显著地促进细胞增殖的生长因子的量,或者,为了方便起见,指本技术领域中以细胞增殖为目的而通常添加的量。关于细胞增殖促进的显著性,例如,可以利用本技术领域中的已知任意统计学方法(例如,t检验等)适当评价,另外,通常的添加量可以从本技术领域的各种已知文献获知。具体而言,细胞培养中的EGF的有效量为例如约0.005 $\mu$ g/mL以上。

[0128] 因此,所谓“不含有有效量的生长因子”,是指本发明的培养液中的生长因子的浓度小于上述有效量。例如,细胞培养中的EGF在培养液中的浓度优选小于约0.005 $\mu$ g/mL、更优选小于约0.001 $\mu$ g/mL。在本发明的优选方式中,培养液中的生长因子的浓度小于生物体中的通常浓度。该方式中,例如,细胞培养中的EGF在培养液中的浓度优选小于约5.5ng/mL,更优选小于约1.3ng/mL,进一步优选小于约0.5ng/mL。在进一步优选的方式中,本发明的培养液实质上不含有生长因子。此处,“实质上不含有”是指,培养液中的生长因子的含量为将片状细胞培养物应用于生物体时不造成不良影响的程度,优选不主动在培养液中添加生长因子。因此,该方式中,培养液中不含有浓度为其中的其他成分(例如血清等)中所含的浓度以上的生长因子。

[0129] 在本发明的一个方式中,细胞培养液实质上不含有甾体药物成分。此处,“甾体药物成分”是指具有甾核的化合物中会对生物体造成肾上腺皮质功能障碍、库欣综合征等不良影响的化合物。作为上述化合物,并无限定,例如,包括皮质醇、泼尼松龙、去炎松、地塞米松、倍他米松等。因此,所谓“实质上不含有甾体药物成分”,是指培养液中的这些化合物的含量为将片状细胞培养物应用于生物体时不造成不良影响的程度,优选不主动在培养液中添加这些化合物,即,培养液中不含有浓度为其中的其他成分(例如血清等)中所含的浓度以上的甾体药物成分。

[0130] 在本发明的一个方式中,细胞培养液实质上不含有硒成分。此处,“硒成分”包含硒分子、及含硒化合物、特别是可以在生物体内游离出硒分子的含硒化合物(例如,亚硒酸等)。因此,所谓“实质上不含有硒成分”,是指培养液中的这些物质的含量为将片状细胞培养物应用于生物体时不造成不良影响的程度,优选不主动在培养液中添加这些物质,即,培养液中不含有浓度为其中的其他成分(例如血清等)中所含的浓度以上的硒成分。具体而言,例如,为人的情况下,培养液中的硒浓度比人血清中的正常值(例如,10.6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ~17.4 $\mu\text{g}/\text{dL}$ )乘以培养基中所含的人血清的比例而得的值低(即,如果人血清的含量为约10%,则硒浓度为例如约1.0 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ~小于约1.7 $\mu\text{g}/\text{dL}$ )。

[0131] 在本发明的上述优选方式中,不需要以往在制作应用于生物体的细胞培养物时所必需的下述步骤:通过清洗等将生长因子、甾体药物成分、异种血清成分等来自制造工序的杂质除去步骤。因此,本发明的方法的一个方式中不包括将该来自制造工序的杂质除去的步骤。

[0132] 此处,“来自制造工序的杂质”典型地包含下文中列举的来自各制造工序的物质。即,为来自细胞基材的杂质(例如,来自宿主细胞的蛋白质、来自宿主细胞的DNA)、来自细胞培养液的杂质(例如,诱导剂、抗生素、培养基成分)、或来自细胞培养之后的工序(即,目标物质的提取、分离、加工、纯化工序)的杂质等(例如,参见日本医药审发第571号)。

[0133] 在(iii)中,将所形成的片状细胞培养物从培养基材剥离。

[0134] 关于片状细胞培养物从培养基材的剥离,只要片状细胞培养物可以在至少部分地保持片结构的状态下从作为支架(日文:足場)的培养基材脱离(剥离),则并无特别限定,例如,可以通过利用蛋白水解酶(例如胰蛋白酶等)的酶处理及/或吹吸(pipetting)等机械性处理来进行。另外,在利用响应于刺激(例如,温度、光)而发生生物性变化的材料被覆表面而得的培养基材上培养细胞并形成细胞培养物时,通过施加规定的刺激,也可以非酶性地脱离。

[0135] 例如,将细胞在温度响应性培养皿中培养而形成细胞培养物的情况下,通过将温度设为温度响应性材料对于水而言的下限临界溶液温度(LCST)以下或上限临界溶液温度(UCST)以上的温度处理,可以使片状细胞培养物非酶性地游离。上述温度处理不受限定,例如可以通过将粘附有所形成的片状细胞培养物的培养基材从温度比LCST高的培养环境(例如,约37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度的孵育器内等)转移至LCST以下的环境(例如,孵育器外的室温环境等)等来实现。向LCST以下的环境的转移不受限定,例如可以通过将存在所形成的片状细胞培养物的温度比LCST高的培养液置换为LCST以下的温度的介质(例如,缓冲液(PBS、HBSS等)、培养液等液体等)等来实现。因此,在本发明的制造方法中,为了使片状细胞培养物从培养基材中非酶性地游离,可以使用上述缓冲液等介质。

[0136] 经(iii)的工序所剥离的片状细胞培养物相较于剥离前发生收缩,面积变小。利用本发明的制造方法制造的片状细胞培养物具有下述特征:在剥离后不易收缩而具有更大的面积。在本发明的一个方式中,剥离后的片状细胞培养物具有相对于剥离前的片状细胞培养物的面积(即培养基材的面积)而言为约20%以上、例如约20%、约25%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约50%、约60%的面积,优选具有约35%以上、例如约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约50%、约60%的面积。

[0137] 本发明的制造方法可以在(i)之前包括将细胞(细胞群)冷冻的步骤和将冷冻细胞解冻的步骤。细胞的冷冻可以利用已知的任意方法进行。作为所述方法,并无限定,可列举例如将容器内的细胞供于冷冻手段(例如,冰箱、超低温冰箱、低温介质(例如,液氮等))等。关于冷冻手段的温度,只要为能够使容器内的细胞群的一部分(优选为细胞群整体)冷冻的温度,则并无特别限定,典型的温度为约0℃以下,优选为约-20℃以下,更优选为约-40℃以下,进一步优选为约-80℃以下。另外,关于冷冻操作中的冷却速度,只要不严重损害冷冻解冻后的细胞的存活率、功能,则并无特别限定,典型地,为如下程度的冷却速度:从4℃开始冷却,直至达到-80℃为止,历经约1小时~约5小时、优选为约2小时~约4小时、特别优选为约3小时。具体而言,例如,可以以0.46℃/分钟的速度进行冷却。通过将包含细胞的容器直接供于或收纳于冷冻处理容器中后供于设定为所期望的温度的冷冻手段,可以实现上述冷却速度。冷冻处理容器也可以具有将容器内的温度的下降速度控制为规定速度的功能。作为所述冷冻处理容器,可以使用已知的任意容器,例如,BICELL<sup>(R)</sup>(Nihon Freezer Co.,Ltd.)、程控冰箱等。

[0138] 关于冷冻操作,可以在将细胞浸渍于培养液、生理缓冲液等中的状态下进行,也可以在实施了向培养液中添加冷冻保护剂(其用于保护细胞免受冷冻·解冻操作的损伤)、或将培养液置换为包含冷冻保护剂的冷冻保存液等的处理之后进行。因此,包括冷冻步骤的本发明的制造方法也可以进一步包括向培养液中添加冷冻保护剂的步骤、或将培养液置换为冷冻保存液的步骤。在将培养液置换为冷冻保存液的情况下,如果在冷冻时浸渍有细胞的液体中含有有效浓度的冷冻保护剂,则既可以在将培养液实质性地全部除去后添加冷冻保存液,也可以在残留有一部分培养液的状态下添加冷冻保存液。此处,“有效浓度”是指冷冻保护剂显示出冷冻保护效果(例如,相较于不使用冷冻保护剂的情况而言,抑制冷冻解冻后的细胞的存活率、活力、功能等的降低的效果)而不显示毒性的浓度。所述浓度为本领域技术人员已知的浓度,或者可以通过常规实验等适当确定。

[0139] 冷冻保护剂只要是对细胞显示出冷冻保护作用的物质,则并无特别限定,例如,包括二甲基亚砷(DMSO)、甘油、乙二醇、丙二醇、丝胶蛋白、丙二醇、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、羟乙基淀粉、硫酸软骨素、聚乙二醇、甲酰胺、乙酰胺、核糖醇、鳄梨糖醇(perseitol)、棉子糖(raffinose)、乳糖、海藻糖、蔗糖、甘露糖醇等。冷冻保护剂可以单独使用,也可以组合使用2种或3种以上。

[0140] 冷冻保护剂在培养液中的添加浓度、或冷冻保存液中的冷冻保护剂的浓度只要为上文中定义的有效浓度则并无特别限定,典型而言,例如相对于培养液或冷冻保存液整体而言为约2%~约20%(v/v)。但是,也可以采用虽不在上述浓度范围内、但就各种冷冻保护剂而言为已知的或经实验确定的替代性使用浓度,上述浓度也在本发明的范围之内。

[0141] 将冷冻的细胞解冻的步骤可以利用已知的任意细胞解冻方法来进行,典型而言,例如可通过将冷冻的细胞供于解冻手段(例如,温度比冷冻温度高的固态、液态或气态的介质(例如,水)、水浴、孵育器(incubator)、恒温器等)、或者将冷冻的细胞浸渍在温度比冷冻温度高的介质(例如,培养液)中来实现,但并不限于此。解冻手段或浸渍介质的温度只要是能够在所期望的时间内将细胞解冻的温度,则并无特别限定,典型的温度为约4℃~约50℃、优选为约30℃~约40℃、更优选为约36℃~约38℃。另外,解冻时间只要不严重损害解冻后的细胞的存活率、功能,则并无特别限定,典型的解冻时间为约2分钟以内,尤其是通过使解冻时间为20秒以内,可以大幅抑制存活率的下降。解冻时间例如可以通过改变解冻手段或浸渍介质的温度、冷冻时的培养液或冷冻保存液的容量或组成等来进行调节。冷冻的细胞包含利用任意方法使其冷冻的细胞,作为其非限定性例子,可列举例如经上述将细胞冷冻的步骤所冷冻的细胞等。在一个方式中,冷冻的细胞是在冷冻保护剂的存在下进行冷冻的细胞。在一个方式中,冷冻的细胞是用于本发明的制造方法的细胞。

[0142] 本发明的制造方法可以在上述的将冷冻的细胞解冻的步骤之后且形成片状细胞培养物的步骤、优选将细胞接种于培养基材的步骤之前包含清洗细胞的步骤。细胞的清洗可以利用已知的任意方法进行,典型而言,例如可通过将细胞悬浮于清洗液(例如,含有或不含有血清、血清成分(血清白蛋白等)的培养液(例如,培养基等)或生理缓冲液(例如,PBS、HBSS等)等)中、进行离心分离、弃置上清液并回收已沉淀的细胞而实现,但并不限于此。在清洗细胞的步骤中,上述悬浮、离心分离、回收的循环可以实施1次或多次(例如,2、3、4、5次等)。在本发明的一个方式中,清洗细胞的步骤在进行将冷冻的细胞解冻的步骤之后立即进行。

[0143] 本发明的制造方法可以在将上述的细胞冷冻的步骤之前还包括使细胞增殖的步骤。使细胞增殖的步骤可以通过已知的任意方法进行,本领域技术人员熟知适合于各种细胞的增殖的培养条件。

[0144] 在一个方式中,本发明的制造方法不包括向细胞中导入基因的步骤。在另一方式中,本发明的制造方法包括向细胞中导入基因的步骤。关于导入的基因,只要是对作为对象的疾病的处理有用的基因,则并无特别限定,例如可以是HGF、VEGF等细胞因子。基因的导入可以使用磷酸钙法、脂质体转染法(lipofection method)、超声波导入法、电穿孔法、基因枪法、利用腺病毒载体、逆转录病毒载体等病毒载体的方法、显微注射法等已知的任意方法实施。针对细胞的基因导入并无限定,例如,可以在将细胞冷冻的步骤之前进行。

[0145] 在一个方式中,本发明的制造方法的所有步骤均在体外(in vitro)实施。在另一方式中,本发明的制造方法包括在体内(in vivo)实施的步骤,其并无限定,例如为从对象采集细胞或成为细胞供给源的组织(例如,横纹肌肌肉组织、尤其是骨骼肌肌肉组织)的步骤。在一个方式中,本发明的制造方法的所有步骤均在无菌条件下实施。在一个方式中,本发明的制造方法以使得最终得到的片状细胞培养物为实质上无菌的方式实施。在一个方式中,本发明的制造方法以使得最终得到的片状细胞培养物为无菌的方式实施。

[0146] 本发明的制造方法可以在上述步骤(iii)之后、任意地包括在所剥离的片状细胞培养物上由生物体适应性凝胶形成增强层的步骤。能够用于形成增强层的生物体适应性凝胶参见上文的详细叙述。

[0147] 包含生物体适应性凝胶的增强层的形成方法可以使用本技术领域已知的方法。

作为上述方法,例如,除了对片状细胞培养物上喷雾生物体适应性凝胶的方法、在片状细胞培养物上层叠溶胶状的生物体适应性物质而凝胶化的方法、在浸渍于液状凝胶后使凝胶固化的方法等以外,还可列举日本特开2016-52271号公报等中记载的方法等,但并不限于于此。

[0148] 本发明的另一方面涉及包含本发明的片状细胞培养物的组合物(例如,医药组合物等)、移植片及医疗制品等(以下,有时统称为“组合物等”)。

[0149] 对于本发明的组合物等而言,除了本发明的片状细胞培养物以外,还可以包含各种追加成分,例如,药学上可允许的载体、提高片状细胞培养物的存活性、植入性及/或功能等的成分、对应用器官的再生有用的其他有效成分及/或移植片等。作为上述追加成分,可以使用已知的任意成分,本领域技术人员熟知这些追加成分。另外,本发明的组合物等可以与提高片状细胞培养物的存活性、植入性及/或功能等的成分、对应用器官的再生、治愈的促进等有用的其他有效成分及/或移植片等并用。

[0150] 本发明的另一方面涉及促进在对象中的管腔壁至少一侧具有损伤部的管腔器官的组织的治愈的方法,前述方法包括将有效量的本发明的片状细胞培养物或组合物等应用于与存在损伤的部位对应的管腔壁的相反侧的步骤(以下,有时称为“本发明的治愈促进方法”)。关于作为本发明的治愈促进方法的对象的组织、疾患、损伤、所使用的片状细胞培养物等,参见关于本发明的片状细胞培养物所记载的部分的详细叙述。在本发明的治愈促进方法中,可以将提高片状细胞培养物的存活性、植入性及/或功能等的成分、对促进对象器官的治愈有用的其他有效成分及/或移植片等与本发明的片状细胞培养物或组合物等并用。

[0151] 本发明的另一方面涉及使在对象中的管腔壁至少一侧具有损伤部的管腔器官的组织再生的方法,前述方法包括将有效量的本发明的片状细胞培养物或组合物等应用于与存在损伤的部位对应的管腔壁的相反侧的步骤(以下,有时称为“本发明的再生方法”)。成为本发明的再生方法的对象的组织、疾患、损伤、所使用的片状细胞培养物等参见关于本发明的片状细胞培养物所记载的部分的详细叙述。在本发明的再生方法中,可以将提高片状细胞培养物的存活性、植入性及/或功能等的成分、对对象器官的再生有用的其他有效成分及/或移植片等与本发明的片状细胞培养物或组合物等并用。

[0152] 本发明的治愈促进方法或再生方法可以还包括按照本发明的制造方法来制造片状细胞培养物的步骤。就本发明的治愈促进方法或再生方法而言,在制造片状细胞培养物的步骤之前,可以还包括从对象中采集用于制造片状细胞培养物的细胞或成为细胞的供给源的组织的步骤。在一个方式中,采集细胞或成为细胞供给源的组织的对象与接受片状细胞培养物或组合物等的应用的对象为同一个体。在另一方式中,采集细胞或成为细胞供给源的组织的对象是与接受片状细胞培养物或组合物等的应用的对象为同一物种的其他个体。在另一方式中,采集细胞或成为细胞供给源的组织的对象是与接受片状细胞培养物或组合物等的应用的对象为不同物种的个体。

[0153] 在本发明中,用语“对象”表示任意的生物个体,优选为动物个体,更优选为哺乳动物个体,进一步优选为人类个体。

[0154] 在本发明中,有效量是例如能够促进对象器官的治愈或再生的量(例如,片状细胞培养物的大小、重量、张数等),优选为能够使对象器官治愈或再生的量。所述量例如可以通

过小鼠、大鼠、狗或猪等实验动物、疾病模型动物的试验等来适当确定,这样的试验方法是本领域技术人员熟知的。另外,成为治愈的促进或再生的对象的器官的损伤的大小可以成为用于确定有效量的重要指标。

[0155] 作为应用方法,典型而言,在管腔壁的内侧部存在损伤的情况下,通过贴附而应用于与上述损伤部位对应的管腔壁的外侧部。典型地,应用频率为每次处置应用1次,但在无法得到所期望的效果的情况下,也可以应用多次。

[0156] 本发明的另一方面涉及用于预防对象中的管腔器官穿孔的方法,前述方法包括将本发明的片状细胞培养物应用于管腔器官的步骤(以下,有时称作“本发明的穿孔预防方法”)。在本发明中所谓“穿孔”,是指在贯穿性损伤中、尤其是伴有管腔器官内腔的内容物漏出的程度的孔打开或已打开的状态。在本发明中,所谓“预防穿孔”,是指在存在产生管腔器官穿孔的风险的部位中防止穿孔的发生。在本发明中,所谓“存在产生穿孔的风险的部位”,是指在医学上可预测为如果不做出任何处置则均会以高概率产生穿孔的部位,可列举例如因手术等而损伤的部位及溃疡、肿瘤等病变部位等,但并不限于于此。

[0157] 尤其在对管腔器官实施外科处置时,在实施了处置的部位发生术后穿孔的风险提高,因此为了预防对管腔器官外科处置后的术后穿孔,可以适当地使用本发明的穿孔预防方法。

[0158] 作为上述外科处置,可列举例如开腹手术、内窥镜手术等,优选内窥镜手术,其中,可列举ESD、EMR等粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层的剥离术,但并不限于于此。

[0159] 在本发明的穿孔预防方法中,片状细胞培养物应用于管腔壁的损伤部或与损伤部对应的相反侧。在一个方式中,损伤部是在利用外科处置实施了处置的部位所产生的损伤部。因此,在本发明的穿孔预防方法的优选的一个方式中,应用部位为实施了外科处置的部位或与实施了外科处置的部位对应的相反侧。

[0160] 在应用部位为实施了外科处置的部位或与实施了外科处置的部位对应的相反侧的情况下,在外科处置、例如剥离术的施术中可以在施术部位产生贯穿性损伤。即,无论有无术中的贯穿性损伤,本发明的穿孔预防方法均能够预防术后穿孔,例如,即使在外科处置中产生了贯穿性损伤的情况下,也能使其在外科处置后不产生穿孔。因此,通过在本发明的穿孔预防方法中应用片状细胞培养物,可以预防因ESD等外科处置及术后穿孔而引起的腹膜炎等炎症。

[0161] 在另一个方式中,片状细胞培养物以能够完全覆盖损伤部或与损伤部对应的相反侧的方式而应用。因此,如上所述,可以用比损伤部、优选在实施了外科处置的部位产生的损伤部大的1个片状细胞培养物以完全覆盖的方式进行应用,也可以通过无缝隙地应用多个片状细胞培养物来覆盖整个区域。

[0162] 在本发明的一个方式中,利用用于递送片状细胞培养物的已知的递送装置或方法,将片状细胞培养物递送至应用部位。所述装置或方法优选为用于低侵袭地递送片状细胞培养物的装置或方法。为了向体内递送尤其像片状细胞培养物那样脆弱的移植片,而开发了各种递送装置,在本发明的方法中,可以使用上述递送装置。作为上述递送装置,可以使用例如日本特开2008-173333号及日本特开2009-511号等中记载的装置,但并不限于于此。

[0163] 在一个方式中,上述装置从基端侧起具有操作部、长条部及应用部,在应用部保持

片状细胞培养物,向体内插入应用部和长条部,向体内递送片状细胞培养物,利用体外的手动操作部的操作,可以将片状细胞培养物应用于体内的应用部位。

[0164] 本发明的穿孔预防方法可以还包括按照本发明的制造方法来制造片状细胞培养物的步骤。本发明的穿孔预防方法可以还包括在制造片状细胞培养物的步骤之前从对象中采集用于制造片状细胞培养物的细胞或成为细胞的供给源的组织步骤。在一个方式中,采集细胞或成为细胞的供给源的组织对象与接受片状细胞培养物或组合物等的应用对象为同一个体。在另一个方式中,采集细胞或成为细胞的供给源的组织对象是与接受片状细胞培养物或组合物等的应用对象为同一物种的其他个体。在另一方式中,采集细胞或成为细胞供给源的组织对象是与接受片状细胞培养物或组合物等的应用对象为不同物种的个体。

[0165] 如上所述,十二指肠ESD的术中或术后的并发症(典型而言为穿孔)发病的风险高,本发明的片状细胞培养物可以降低所述并发症的发病风险。因此,本发明的一个方面涉及降低十二指肠的内镜粘膜下剥离术的并发症发病风险的方法,前述方法包括将本发明的片状细胞培养物应用于与粘膜下层剥离部位对应的十二指肠的外壁的步骤。

[0166] 本发明的另一方面涉及用于治疗对象中的管腔器官的损伤的方法(以下,有时称作“本发明的损伤治疗方法”)。本发明的损伤治疗方法包括以下的步骤:

[0167] (A) 将片状细胞培养物应用于管腔器官的步骤。

[0168] 本发明的损伤治疗方法可以任意地包括供给本发明的片状细胞培养物的步骤。在上述步骤中,制造并提供本发明的片状细胞培养物。关于上述步骤,参见在上述本发明的片状细胞培养物的制造方法中的详细叙述。

[0169] 在(A)中,将本发明的片状细胞培养物应用于管腔器官的应用部位。在本发明的损伤治疗方法中,“应用部位”是如上所述的损伤部或与损伤部对应的相反侧。关于“管腔器官”,参见上文中的详细叙述,但优选为消化道系统的器官。关于消化道系统的器官,也参见上文中的详细叙述。片状细胞培养物可以提供至少1张,也可以提供多张例如2张、3张、4张或5张。

[0170] 关于损伤,参见在上文中的详细叙述,可以是贯穿性损伤,也可以是非贯穿性损伤,但优选为非贯穿性损伤。其中,尤其从用以往的方法难以处置的方面考虑,优选为存在于内腔侧的非贯穿性损伤、即仅存在于内侧的损伤。

[0171] 关于损伤的种类,也并无特别限制,如上文所示,其中,优选为剥离伤。特别优选为内腔壁的一部分被剥离而产生的损伤,典型而言,可列举因ESD、EMR等剥离术产生的剥离伤。

[0172] 在优选的另一个方式中,管腔器官为十二指肠,损伤为贯穿性损伤。即本发明的治疗方法的优选的一个方式是治疗十二指肠中的贯穿性损伤的方法。对于十二指肠而言,如上文所示,由于管腔壁薄,因此产生穿孔的风险高,另外,由于处于暴露于各种消化液的严苛的环境中,因此容易加剧损伤的恶化,损伤的处置也困难,但是,如果是本发明的治疗方法,则还能适合地处置十二指肠的贯穿性损伤。

[0173] 在上述方式中,贯穿性损伤可以由剥离伤等非贯穿性损伤、溃疡等病变恶化而产生的贯穿性损伤,也可以是在剥离术等的施术中产生的裂孔。在本方式的治疗方法中,在将本发明的片状细胞培养物应用于应用部位之前,可以任意地包括将贯穿性损伤缝合的步

骤。

[0174] 在另一个方式中,片状细胞培养物以能够完全覆盖应用部位的方式而应用。如上文所示,片状细胞培养物可提供至少1张,可以利用1张大的片状细胞培养物将应用部位完全覆盖,也可以通过应用多张片状细胞培养物而将应用部位整体上完全覆盖。

[0175] 本发明的片状细胞培养物具有包含纤维蛋白凝胶等生物体适应性凝胶的增强层。增强层可以在片状细胞培养物的制造后、即步骤(A)之前形成,也可以在片状细胞培养物的应用后、即步骤(A)之后形成。关于包含生物体适应性凝胶的增强层的形成方法,参见在上文中的详细叙述。

[0176] 本方面的方法可以在步骤(A)之前或之后进一步包括(A')应用促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片的步骤。关于“促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片”,参见上文中的详细叙述。

[0177] 上述应用组合物及/或移植片的步骤可以在步骤(A)之前实施,也可以在步骤(A)之后实施。在(A)之前实施的情况下,促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片直接应用于应用部位,在其上应用本发明的片状细胞培养物。在(A)之后实施的情况下,在所应用的片状细胞培养物之上应用促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片。另外,片状细胞培养物可以任意地具有增强层,在该情况下,可以在应用促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片之前形成增强层,也可以通过在应用促进再生及/或治愈的其他组合物及/或移植片后,在其上喷雾生物体适应性凝胶等来形成增强层。

[0178] 在将本发明的片状细胞培养物向应用部位应用的情况下,使用在本技术领域已知的递送装置及/或方法将其递送至应用部位。关于上述递送装置,参见在上述穿孔预防方法中的详细叙述。

[0179] 本发明的另一方面涉及在管腔器官的外科处置中改善处置后的管腔器官的状态的方法(以下,有时称作“本发明的改善方法”)。通过将本发明的片状细胞培养物应用于外科处置的施术部位或与施术部位对应的相反侧,从而相较于未应用的情况能够改善实施外科处置后的管腔器官的状态。在本发明中,所谓“改善外科处置后的管腔器官的状态”,是指使起因于外科处置的管腔器官的状态相较于未使用本发明的方法的情况而言更为良好,典型而言,可列举降低在外科处置后的施术部位的并发症的风险、使施术部位的组织正常化等。作为并发症,可列举例如管腔器官的粘连、穿孔的产生等,但并不限于此。作为组织的正常化,可列举例如施术部位的组织再生、施术部位的组织连续性的确保等。

[0180] 因此,本发明的改善方法的一个优选方式涉及在管腔器官的外科处置中防止处置后的施术部位的粘连的方法。另外,另一个优选的方式涉及在管腔器官的外科处置中保持施术部位的组织、例如溃疡底部的连续性的方法。

[0181] 在本发明的改善方法中,关于片状细胞培养物、应用方法等的详细情况,参见在上述各方面中的详细叙述。

[0182] 本发明的另一方面涉及处置管腔壁表面的疾患部的方法(以下,有时称作“本发明的疾患处置方法”)。

[0183] 本发明的疾患处置方法包括以下步骤:

[0184] (a) 将管腔壁表面的疾患部剥离的步骤;以及

[0185] (b) 将片状细胞培养物应用于在步骤(a)中经剥离的部分或与剥离部分对应的相

反侧的步骤。

[0186] 在(a)中,管腔壁表面的疾患部被剥离。在本发明中,所谓“管腔壁表面”,是指在管腔壁一侧的外部露出的部分,典型而言,例如是指消化道壁中的粘膜层部分等。就能够用本发明的疾患处置方法进行处置的疾患而言,只要是在管腔器官的表面产生的疾患,则并无特别限制,可列举例如癌症等肿瘤、溃疡、炎症等,从可列举物理性除去作为适合的处置方法的方面考虑,优选肿瘤或溃疡。在本发明中,“肿瘤”包括良性肿瘤及恶性肿瘤(癌、恶性新生物)。癌症包括上皮性的恶性肿瘤(癌)和非上皮性的恶性肿瘤(肉瘤)。本发明的疾患处置方法中的管腔器官参见在上述各方面中的详细叙述,因此,在一个优选方式中,本发明的疾患处置方法中所处置的疾患为消化道的癌症。在上述方式中,癌优选为留驻在消化道内壁的粘膜层中的癌。在本发明中,“炎症”例如是指因漏出至腹腔内的胰液、胆汁与消化液混合而被活化并引起的炎症,典型而言,包括因消化道的外科处置及处置后的消化道穿孔而引起的腹膜炎。典型而言,上述炎症伴随着引起C反应性蛋白(CRP)的诱导等炎症反应的、血浆中的TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6等炎症细胞因子的表达的增加,通过研究它们的增减,可以调查有无炎症。

[0187] 疾患部的剥离可以使用本技术领域已知的方法。例如在为消化道的癌的情况下,将消化道内壁的疾患部、优选粘膜层(即粘膜、粘膜肌层及/或粘膜下层)剥离而除去。作为消化道内壁的剥离方法,可列举例如内镜粘膜下剥离术(ESD)、内镜粘膜切除术(EMR)、息肉切除术等通过管腔壁内侧的剥离而除去疾患的方法,但不限于于此。在一个优选方式中,疾患部的剥离通过内镜粘膜下剥离术(ESD)来进行。因疾患部的剥离而产生的剥离伤可以是贯穿性损伤,也可以是非贯穿性损伤,但优选为非贯穿性损伤。在为贯穿性损伤的情况下,可以在(b)之前进一步包括将贯穿性损伤缝合的步骤。

[0188] 在(b)中,将本发明的片状细胞培养物应用于剥离的部分或与剥离部分对应的相反侧(以下,在本发明的疾患处置方法中有时称作“应用部位”)。关于本发明的疾患方法中的片状细胞培养物、应用方法等,参见在上述本发明的各方面中的详细叙述。

[0189] 实施例

[0190] 参照以下例子更详细地说明本发明,但以下所示为本发明的特定的具体例子,本发明并不限于此。

[0191] 例1.片状细胞培养物的制作

[0192] (1)片状猪骨骼肌成肌细胞培养物

[0193] 在全身麻醉下采集猪的下肢的横纹肌,将所采集的组织用包含胶原酶和胰蛋白酶的酶消化液进行处理,使其分散为单一细胞。将上述细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>的条件下、在含有15%FBS的MCDB131培养基中培养至汇合,将细胞回收。所回收的细胞按 $2.2 \times 10^7$ 个接种于60mm的温度响应性培养皿(UpCell<sup>(R)</sup>,Cell Seed制)中,在含有20%FBS的DMEM/F12培养基中培养12小时。然后将温度降低至20°C,由此从培养皿中剥离片状细胞培养物并回收。在上述片状细胞培养物上由纤维蛋白凝胶形成增强层。

[0194] 将由纤维蛋白凝胶形成增强层之前及之后的片状猪骨骼肌成肌细胞培养物实施苏木素·曙红染色,进行了组织学分析(图1A及B)。

[0195] (2)片状猪脂肪来源间充质干细胞培养物

[0196] 脂肪来源间充质干细胞的片状细胞培养物使用W02017/130802的实施例1-1中记

载的方法来制作。将所得到的片状猪脂肪来源间充质干细胞培养物实施苏木素·曙红染色,进行了组织学分析(图1C)。

#### [0197] 例2. 十二指肠ESD猪模型的制作

[0198] 对在例1(1)中采集了横纹肌的猪,在全身麻醉下施行十二指肠ESD,作为片处置组(n=5)。另外,对对照的猪也同样在全身麻醉下施行十二指肠ESD,作为对照组(n=7)。即,作为十二指肠ESD,对猪的十二指肠的内腔表面的一部分进行剥离。在片处置组的猪的与ESD施术部位(十二指肠的内腔表面的剥离部位)对应的部位的十二指肠的外侧的浆膜面上,以完全覆盖内腔表面的剥离部位的方式贴付(应用)例1(1)中制成的片状骨骼肌成肌细胞培养物。进而,用带蒂大网膜片从所贴付的片状骨骼肌成肌细胞培养物上(外侧)以完全覆盖内腔表面的剥离部位的方式进行被覆。在片处置组中,2例于术后第14天再次在全身麻醉下开腹,其余的于术后第3天再次在全身麻醉下开腹,观察十二指肠ESD施术部位,然后,摘除组织。在对照组中,在十二指肠的内腔表面的剥离部位的管腔器官外表面不贴附片状骨骼肌成肌细胞培养物,而仅用带蒂大网膜片进行被覆。在对照组中,1例于术后第1天再次在全身麻醉下开腹,另外1例于术后第2天再次在全身麻醉下开腹,其余的于术后第3天再次在全身麻醉下开腹,观察十二指肠ESD施术部位,然后,摘除组织。将穿孔性腹膜炎的有无、粘连分值、组织学的治愈状况与对照组进行比较。

[0199] 将结果示于下表及图3~6中。

[0200] [表1]

[0201]

		溃疡直径 (cm)	术中穿孔	片 (cm/张)	大网膜 被膜	术后穿孔	摘除时期	粘连分值
对照组	1	1.5	无	—	有	有	术后3天	2
	2	1.5	严重	—	有	有	术后1天	2
	3	1.0	严重	—	有	无 <sup>*1</sup>	术后3天	3
	4	1.5	无	—	有	有	术后2天	3
	5	1.5	无	—	有	有	术后3天	2
	6	1.5	轻微	—	有	轻微	术后3天	2
	7	1.5	轻微	—	有	有	术后3天	3
片处置组	1	1.5	轻微	1.5/2	有	无	术后3天	0
	2	1.5	轻微	2.5/1	有	无	术后3天	1
	3	1.5	轻微	2.8/1	有	无	术后3天	1
	4	1.5	严重	2.5/2	有	无	术后14天	3
	5	2	无	2.5/1	有	无	术后14天	3

[0202] • 轻微为观察到气体泄漏的程度的微小穿孔,严重为观察到内容物泄漏的穿孔。

[0203] \*1观察到溃疡坏死

[0204] 粘连分值0:无粘连,1:轻微的粘连

[0205] 2:需要钝性剥离的粘连,3:需要锐性剥离的粘连

[0206] 在对照组1中,虽然未观察到ESD的术中穿孔,但是在术后第3天进行确认的阶段可以确认到术后穿孔,并且观察到胆汁的漏出。另外,还观察到与周围小肠的粘连。在ESD施术部位的组织染色图像中还确认到溃疡底部的连续性消失(图3A)。

[0207] 在对照组2中,观察到ESD的术中穿孔,施术后的状态差,因此于术后第1天进行了施术部位的确认及组织摘除。在施术部位可以确认到穿孔,还观察到胆汁漏出及与周围小肠的粘连。在ESD施术部位的组织染色图像还确认到溃疡底部的连续性消失(图3B)。

[0208] 在片处置组1中,在ESD的术中观察到来自施术部位的气体泄漏,认为存在微小的穿孔。在与施术部位对应的部位的浆膜侧贴附2张用纤维蛋白凝胶增强后的直径为1.5cm的骨骼肌成肌细胞片,然后被覆大网膜。在术后第3天进行了确认,结果穿孔、粘连均未观察到。在组织染色图像中还可以确认到溃疡底部的连续性得以保持(图4A、B)。

[0209] 在片处置组2中,在ESD的术中观察到来自施术部位的气体泄漏,认为存在微小的穿孔。在与施术部位对应的部位的浆膜侧贴附1张用纤维蛋白凝胶增强后的直径为2.5cm的骨骼肌成肌细胞片,然后被覆大网膜。在术后第3天进行了确认,结果未观察到穿孔,但是观察到能够与周围小肠钝性剥离的粘连。在组织染色图像中还可确认到溃疡底部的连续性得以保持(图4C、D)。

[0210] 在片处置组3中,在ESD的术中观察到来自施术部位(图E的箭头所示的部位)的气体泄漏,认为存在微小的穿孔。在与施术部位对应的部位的浆膜侧贴附1张用纤维蛋白凝胶增强后的直径为2.8cm的骨骼肌成肌细胞片,然后被覆大网膜。在术后第3天进行了确认,结果穿孔、粘连均未观察到。在组织染色图像中还可确认到溃疡底部的连续性得以保持,通过实施苏木素·曙红(HE)染色,可以确认炎症细胞的迁移,通过结蛋白染色,确认到成肌细胞片的植入(图4E、F)。

[0211] 在片处置组4中,在ESD的术中观察到来自施术部位(图G、H的箭头所示的部位)的气体泄漏,认为存在微小的穿孔。在与施术部位对应的部位的浆膜侧贴附2张用纤维蛋白凝胶增强后的直径为2.5cm的骨骼肌成肌细胞片,然后被覆大网膜。在术后第14天进行了确认,结果观察到胶原纤维的增生和壁肥大,溃疡形成瘢痕。因此可理解为:通过将片贴合而堵塞孔,将细胞引入因ESD而变薄的组织的部分而使其变厚,通过苏木素·曙红(HE)染色及偶氮卡红(azan)染色,从而植入成肌细胞片(图4G、H)。

[0212] 在片处置组5中,在ESD的术中未观察到来自施术部位的气体泄漏,认为无穿孔。在与施术部位对应的部位的浆膜侧贴附1张用纤维蛋白凝胶增强后的直径为2.5cm的骨骼肌成肌细胞片,然后被覆大网膜。在术后第14天进行了确认,结果观察到胶原纤维的增生和壁肥大,溃疡形成瘢痕。因此可理解为:通过将片贴合而堵塞孔,将细胞引入因ESD而变薄的组织的部分而使其变厚。

[0213] 关于穿孔性腹膜炎(炎症反应)的有无,进行如下所示的研究。

[0214] 炎症反应的进程通过C反应性蛋白(CRP)及TNF- $\alpha$ 的表达的增减进行测定。

[0215] 详细而言,在移植时(day0)、移植后1天(day1)、移植后3天(day3)采集猪的血液,通过离心分离而得到血清。用市售的CRP及TNF- $\alpha$ 测定ELISA试剂盒测定了这些血清中所包含的CRP及TNF- $\alpha$ 浓度。将其结果示于图6中。如图6所示,可知:在片移植组中,相较于对照组,作为炎症性标记物的CRP、TNF- $\alpha$ 降低。

[0216] 因此,在对照组中,孔打开,液体漏出,产生炎症,但是在片处置组中,通过将片进行贴附,可以预防因漏液引起的炎症(图6)。

[0217] 附图标记说明

[0218] 11 粘膜

[0219] 12 粘膜下层(布路纳氏腺)

[0220] 20 肌层

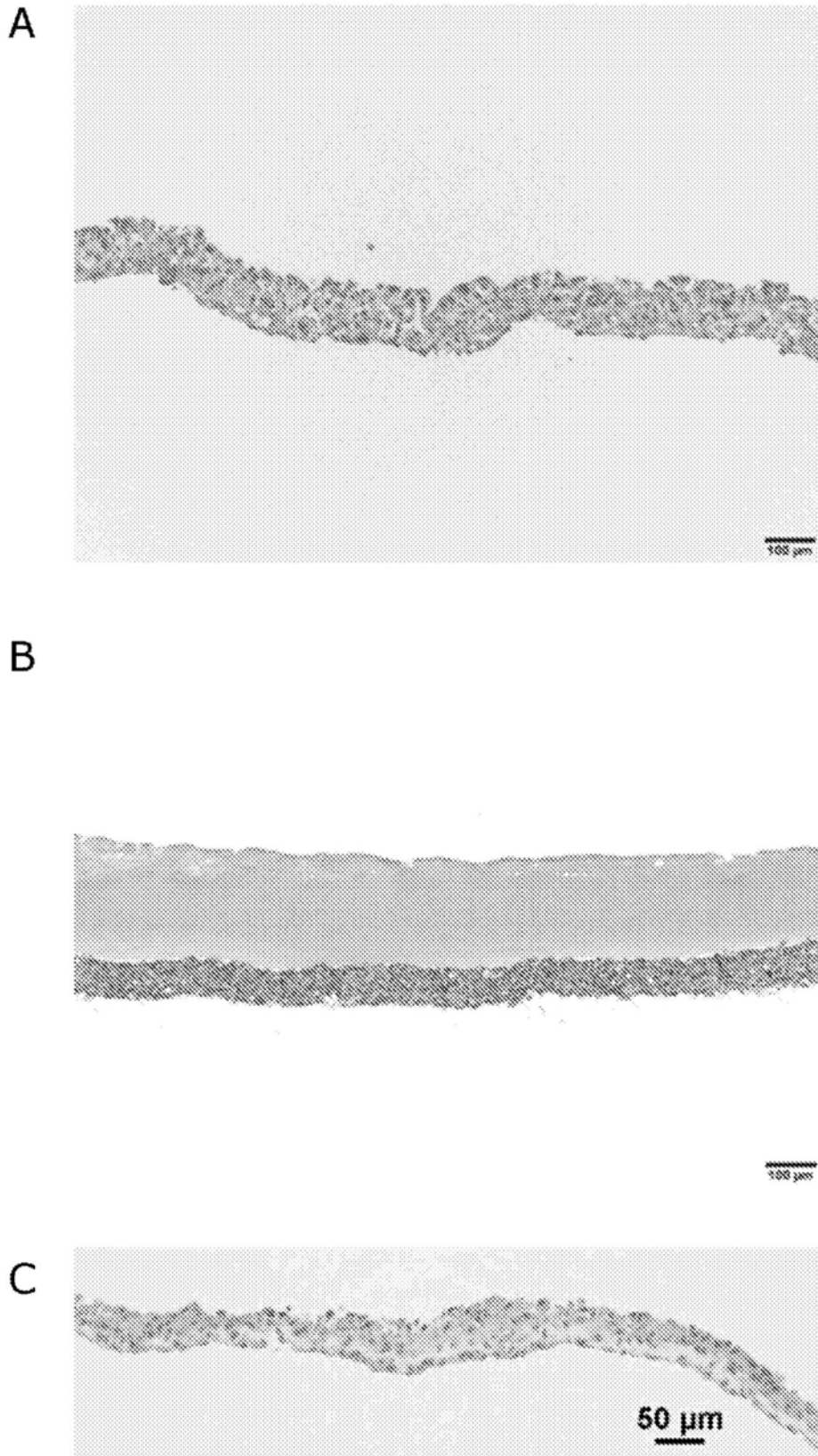


图1

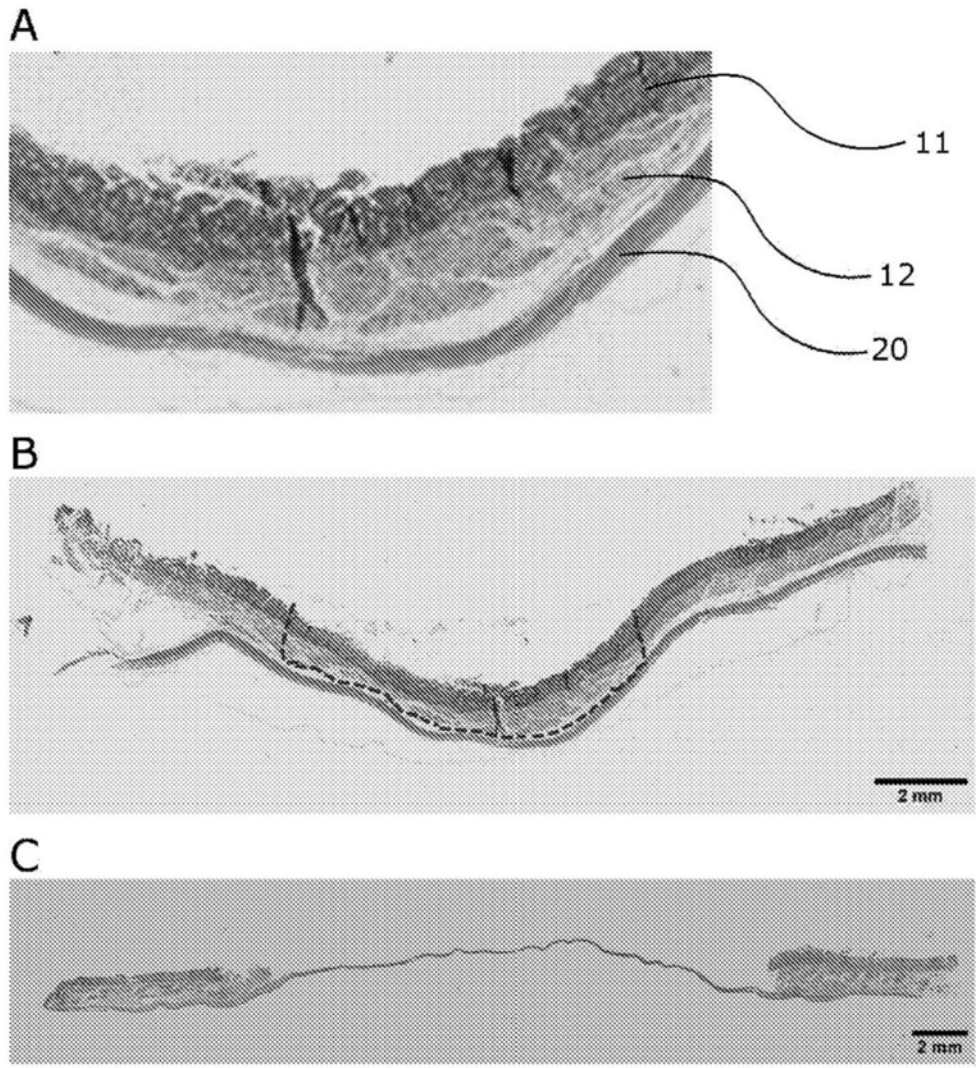


图2

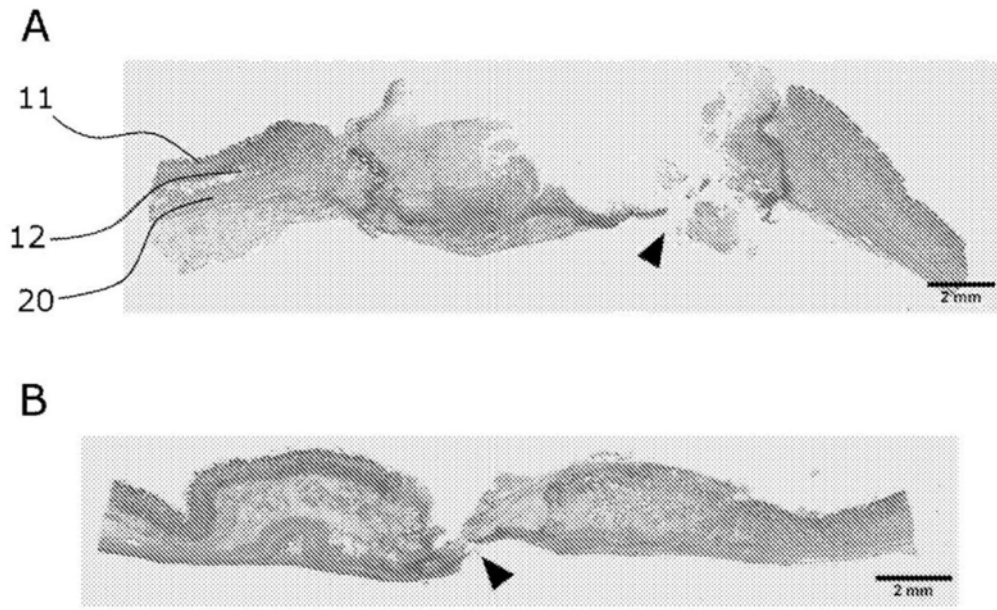


图3

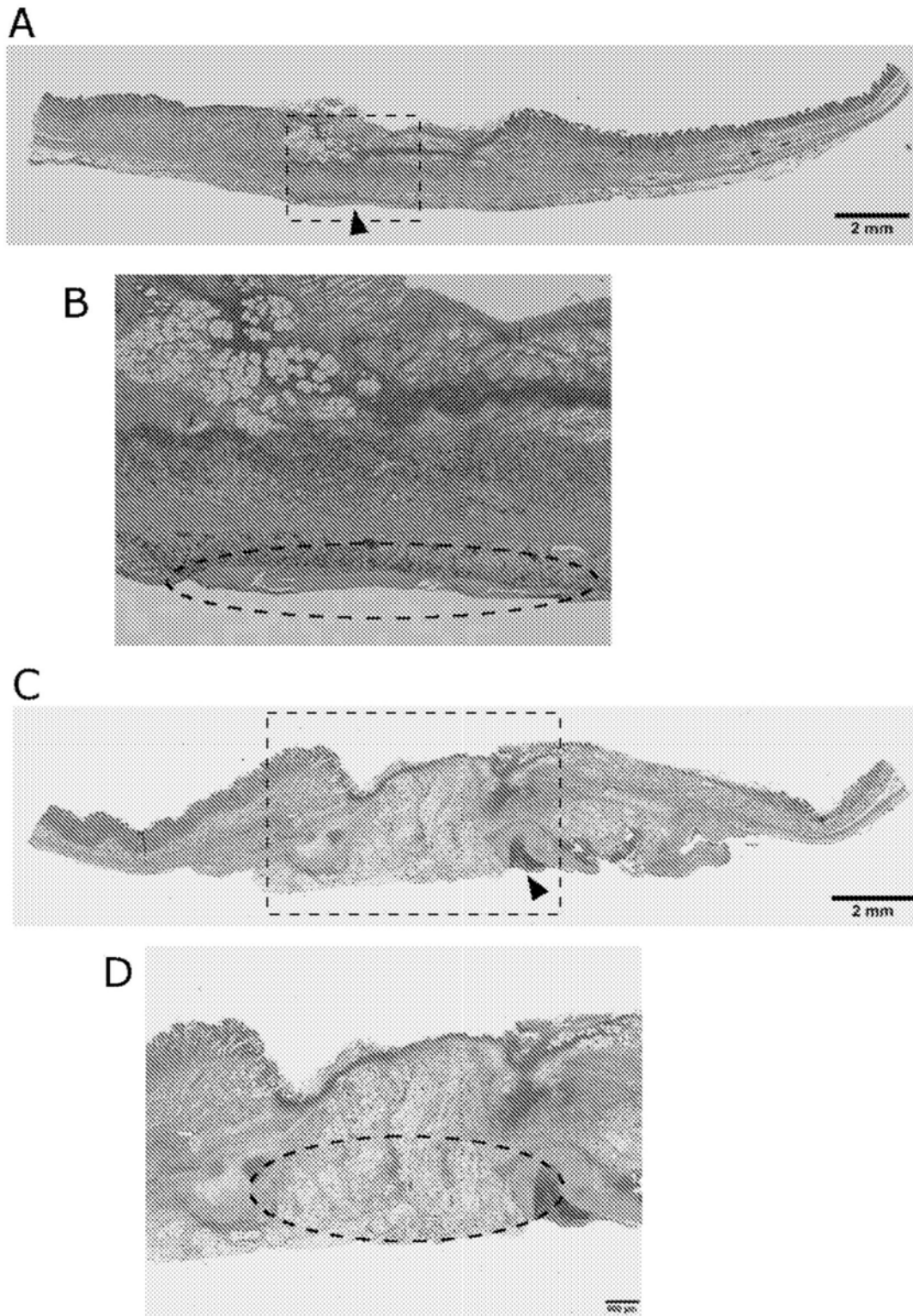


图4-1

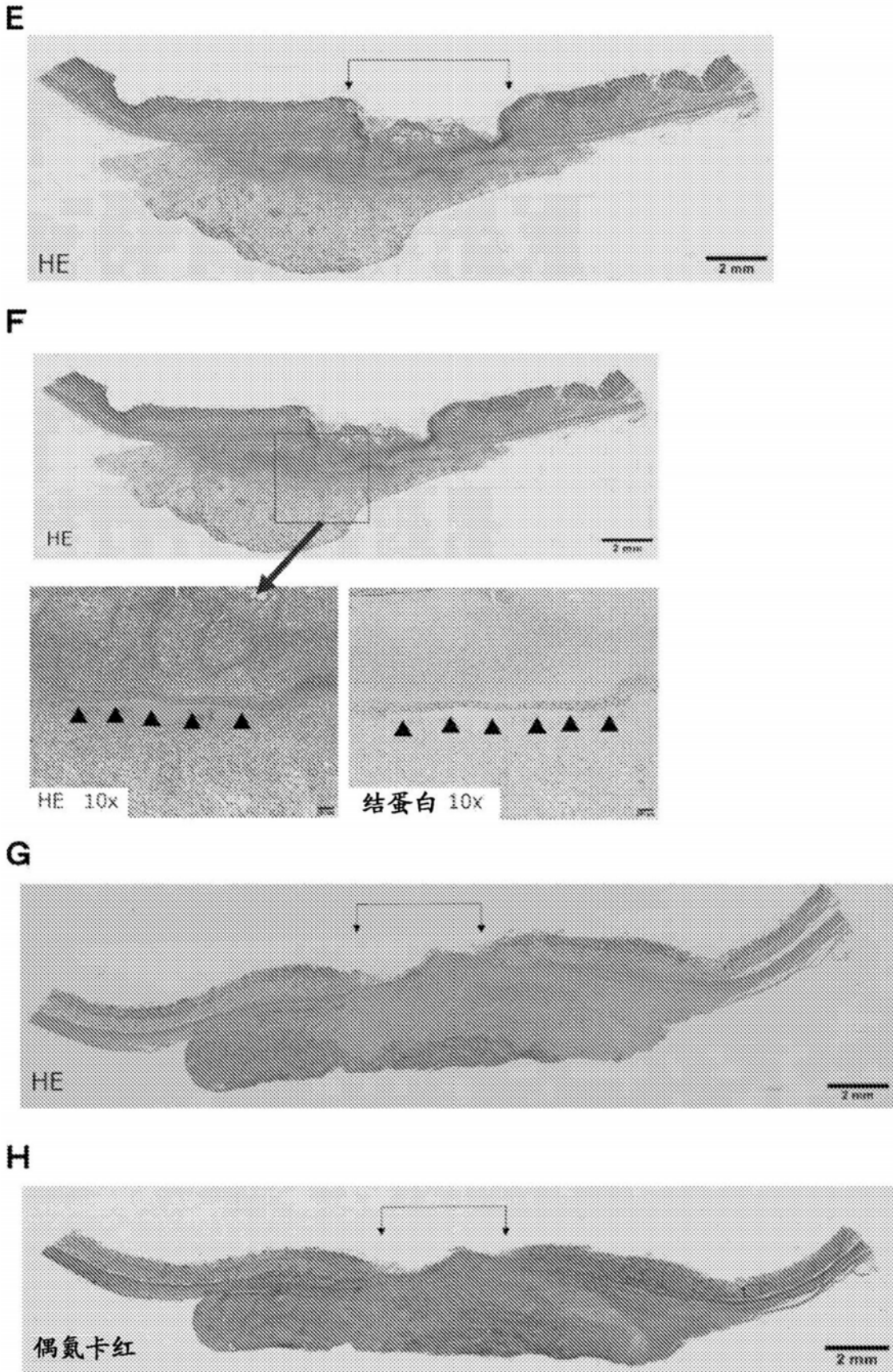


图4-2

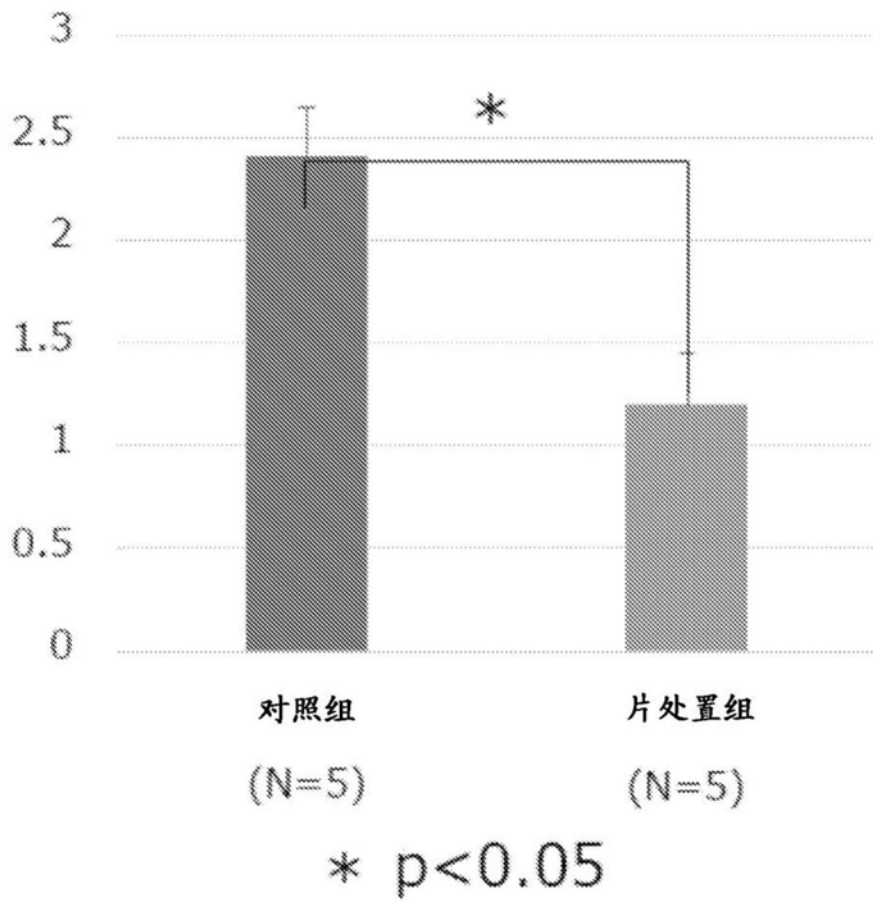


图5

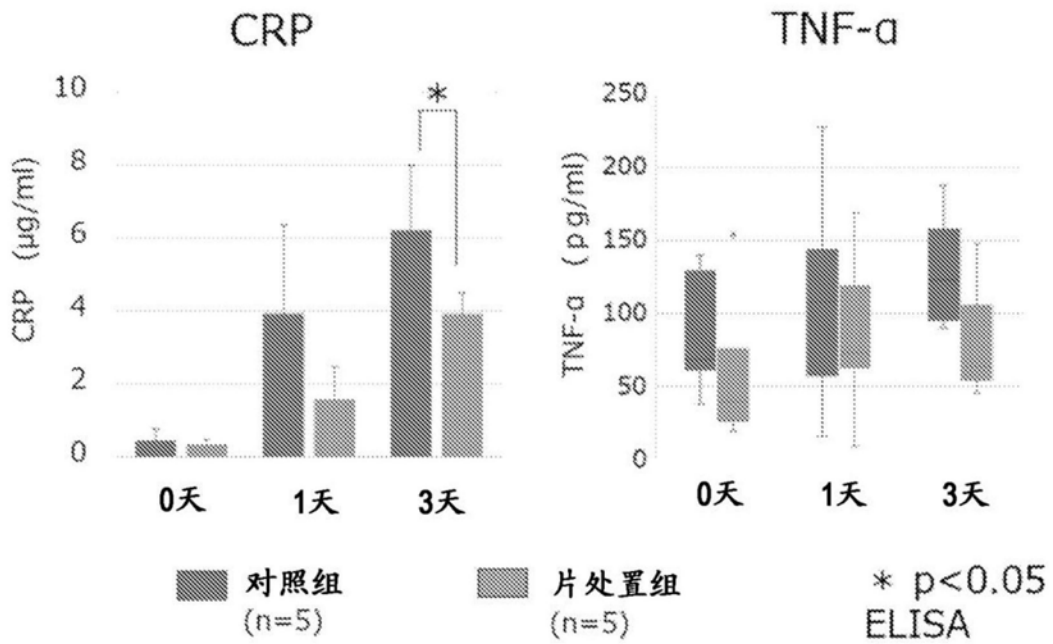


图6