

(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
2020年1月30日(30.01.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/022494 A1

(51) 国際特許分類:

A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/40 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
A61L 27/24 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)
A61L 27/36 (2006.01)

市文教町1-14 Nagasaki (JP). テルモ株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷二丁目44番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/029479

(22) 国際出願日: 2019年7月26日(26.07.2019)

(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 2018-140977 2018年7月27日(27.07.2018) JP

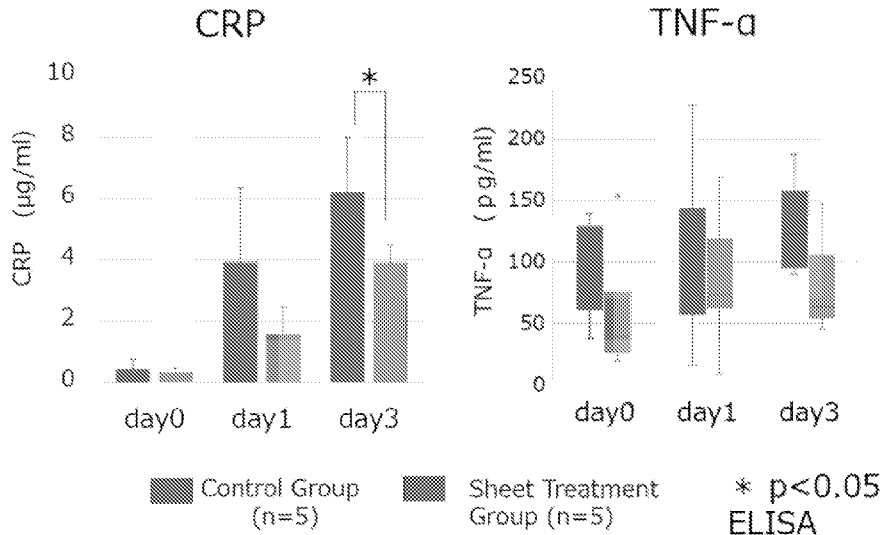
(71) 出願人: 国立大学法人 長崎大学 (NAGASAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎

(72) 発明者: 丸屋 安広 (MARUYA, Yasuhiro); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 松本 亮 (MATSUMOTO, Ryo); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 小林 慎一郎 (KOBAYASHI, Shinichiro); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 金高 賢悟 (KANETAKA, Kengo); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 江

(54) Title: SHEET-LIKE CELL-CULTURED PRODUCT FOR REGENERATION OF GASTROINTESTINAL TRACT

(54) 発明の名称: 消化管再生のためのシート状細胞培養物

[図6]



(57) Abstract: Provided in the present specification are: a sheet-like cell-cultured product for promoting healing of a hollow organ having a damaged area, in particular, tissues of duodenum; a method for producing the sheet-like cell-cultured product; a method for regenerating the damaged area of a hollow organ by using the sheet-like cell-cultured product; and the like.

(57) 要約: 本明細書において、損傷部を有する管腔臓器、特に十二指腸の組織の治癒を促進するためのシート状細胞培養物、当該シート状細胞培養物の製造方法および当該シート状細胞培養物を用いた管腔臓器の損傷部の再生方法等が提供される。



WO 2020/022494 A1

□ 晋(EGUCHI, Susumu); 〒8528521 長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 大仁田 賢(OHNITA, Ken); 〒8528521 長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 橋口 慶一(HASHIGUCHI, Keiichi); 〒8528521 長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学 知的財産部門内 Nagasaki (JP). 大橋 文哉(OHASHI, Fumiya); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 松村 匡記(MATSUMURA, Masaki); 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1 5 0 0 番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 葛 和 清 司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 4 番 1 号西新宿三井ビルディング 1 7 階 葛和国際特許事務所 Tokyo (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, 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:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：消化管再生のためのシート状細胞培養物

技術分野

[0001] 本発明は、損傷部を有する管腔臓器を処置するためのシート状細胞培養物、当該シート状細胞培養物の製造方法および当該シート状細胞培養物を用いた管腔臓器の処置方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織等の修復のために、種々の細胞を移植する試みが行われている。例えば、狭心症、心筋梗塞などの虚血性心疾患により損傷した心筋組織の修復のために、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、ES細胞、iPS細胞等の利用が試みられている（非特許文献1）。

[0003] このような試みの一環として、スキャフォールドを利用して形成した細胞構造物や、細胞をシート状に形成したシート状細胞培養物が開発されてきた（特許文献1、非特許文献2）。

シート状細胞培養物の治療への応用については、火傷などによる皮膚損傷に対する培養表皮シートの利用、角膜損傷に対する角膜上皮シート状細胞培養物の利用、食道がん内視鏡的切除に対する口腔粘膜シート状細胞培養物の利用などの検討が進められており、その一部は臨床応用の段階に入っている。

[0004] そのような応用の一つとして、消化管などの臓器の損傷の治癒にシート状細胞培養物を利用することが提案されている。例えば特許文献2には、縫合不全などにより生じた消化管の損傷部からの漏出を治癒または予防するために、間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物を利用することが記載されている。また非特許文献3や4には、膵臓瘻や胃穿孔のモデル動物において、それらの治癒に骨格筋芽細胞シートを用い得ることが記載されている。

[0005] 早期の腫瘍を低侵襲的に切除する方法として、近年では内視鏡的粘膜下層

剥離術（ESD）が注目されている。これは、病変部の粘膜下層に局注液を注入し、人工的に浮腫を起こした後、隆起した粘膜病変部を粘膜下層ごと切除するというものである。しかしながら、特に十二指腸のESDは、内視鏡の操作性や腸壁の薄さなどから、30%前後の確率で穿孔などの合併症を引き起こしてしまうことが報告されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特表2007-528755号公報
特許文献2：国際公開第2017/130802号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Haraguchi et al., Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):136-41
非特許文献2：Sawa et al., Surg Today. 2012 Jan;42(2):181-4
非特許文献3：Tanaka et al., J Gastroenterol. 2013 Sep;48(9):1081-9
非特許文献4：Tanaka et al., Surg Today. 2017 Jan;47(1):114-121

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本開示は、損傷部を有する管腔臓器、特に十二指腸の組織を再生するためのシート状細胞培養物、当該シート状細胞培養物の製造方法および当該シート状細胞培養物を用いた管腔臓器の損傷部の再生方法等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

- [0009] 本発明者らは、十二指腸のESDにおいて、術後合併症を低減する方法について鋭意研究する中で、骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物を、ESD施術箇所の外側に貼付することにより、潰瘍底の連続性を保ち、術後穿孔を予防することができることを初めて見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を続けた結果、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明に下記に掲げるものに関する：

[1] 管腔壁の少なくとも片側に損傷部を有する管腔臓器の治癒を促進させるためのシート状細胞培養物であって、該シート状細胞培養物は、損傷が存在する部位に対応する管腔壁の反対側に適用されることを特徴とする、前記シート状細胞培養物。

[2] 損傷が、管腔壁の内側部にあり、シート状細胞培養物が、管腔壁の対応する外側部に適用されるか、または損傷が、管腔壁の外側部にあり、シート状細胞培養物が、管腔壁の対応する内側部に適用される、[1]のシート状細胞培養物。

[3] 損傷が、貫通損傷または非貫通損傷である、[1]のシート状細胞培養物。

[4] 管腔臓器が、消化管系の臓器である、[1]～[3]のシート状細胞培養物。

[5] 損傷が、管腔壁の表面組織の剥離によるものである、[1]～[4]のシート状細胞培養物。

[6] さらにゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を有する、[1]～[5]のシート状細胞培養物。

[7] 有茎血管とともに適用されることを特徴とする、[1]～[6]のシート状細胞培養物。

[8] 50～500 μ mの厚みを有する、[1]～[7]のシート状細胞培養物。

[9] 約 7.1×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²の播種密度の細胞集団を含有する、[1]～[8]のシート状細胞培養物。

[10] 外科的処置および／または外科的処置により生じる穿孔により発生する炎症を予防するための、[1]～[9]のシート状細胞培養物。

[11] 外科的処置後の管腔臓器の穿孔を予防するための方法であって、シート状細胞培養物を管腔臓器へ適用するステップを含み、該シート状細胞培養物は、処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側に適用

される、前記方法。

[12] 外科的処置が、管腔臓器の粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層の剥離である、[11]に記載の方法。

[13] シート状細胞培養物が、処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側を全てカバーするように適用される、[11]または[12]の方法。

[14] シート状細胞培養物が、デリバリデバイスにより処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側にデリバリされる、[11]～[13]の方法。

[15] 管腔壁表面の疾患部を処置するための方法であって、

(a) 管腔壁表面の疾患部を剥離するステップ

(b) シート状細胞培養物を、ステップ(a)において剥離した部分または剥離部分に対応する反対側に適用するステップ、
を含む、前記方法。

[16] 疾患が、がんである、[15]の方法。

[17] 管腔壁表面の疾患部の剥離が、疾患部を有する粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層の剥離である、[15]または[16]の方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、管腔壁の少なくとも片側に損傷を有する管腔組織において、損傷が存在する部位に対応する反対側にシート状細胞培養物を移植することにより、組織の治癒を促進することができる。特にESDなどの施術によって形成された損傷であっても効果があるため、これらの施術後の合併症を予防し、予後を向上させることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本開示のシート状細胞培養物の組織染色像を表す。Aはブタ骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物、Bはブタ骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物にフィブリンゲルの補強層を形成したものの、Cはブタ間葉系幹細胞のシート状細胞培養物の染色像である。骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物は、

シートの厚みが約100 μ mであったのに対し、ブタ間葉系幹細胞のシート状細胞培養物は50 μ mに満たない厚みであった。

[図2]図2は十二指腸の消化管壁の組織染色像を表す。Aはブタ十二指腸壁の構造を表す断面染色像である。11は粘膜、12は粘膜下層（ブルネル腺）、20は筋層を表す。BはESD処置前の組織染色像であり、点線部分を切除する。CはESD処置後の染色像である。筋層を残して、粘膜および粘膜下層が除去されていることがわかる。

[図3]図3は、対照群のブタのESD施術箇所組織染色像を表す。Aは対象群1を、Bは対象群2をそれぞれ表す。いずれの施術箇所においても、矢頭で示された箇所が潰瘍の連続性が消失し、術後穿孔が生じていることがわかる。

[図4-1]図4-1は、シート処置群のブタのESD施術箇所組織染色像を表す。A、Bはシート処置群1を、C、Dはシート処置群2を、E、Fはシート処置群3を、G、Hはシート処置群4をそれぞれ表す。A、CおよびFの矢頭で示された箇所がブタ骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物を貼付した箇所であり、潰瘍の連続性が保たれ、組織学的にも術後穿孔が予防できていることがわかる。また、AおよびCの点線四角で囲まれた箇所の拡大図がそれぞれBおよびDであり、Bの点線楕円で囲まれた箇所には貼付したシート状細胞培養物の補強層であるフィブリンが観察できる。また、Dの点線楕円で囲まれた箇所は、フィブリンの連続性が消失していることがわかる。また、Fの矢頭で示された箇所には貼付したシート状細胞培養物の補強層であるフィブリンが観察できる。

[図4-2]図4-2は、シート処置群のブタのESD施術箇所組織染色像を表す。A、Bはシート処置群1を、C、Dはシート処置群2を、E、Fはシート処置群3を、G、Hはシート処置群4をそれぞれ表す。A、CおよびFの矢頭で示された箇所がブタ骨格筋芽細胞のシート状細胞培養物を貼付した箇所であり、潰瘍の連続性が保たれ、組織学的にも術後穿孔が予防できていることがわかる。また、AおよびCの点線四角で囲まれた箇所の拡大図がそ

れぞれBおよびDであり、Bの点線楕円で囲まれた箇所には貼付したシート状細胞培養物の補強層であるフィブリンが観察できる。また、Dの点線楕円で囲まれた箇所は、フィブリンの連続性が消失していることがわかる。また、Fの矢頭で示された箇所には貼付したシート状細胞培養物の補強層であるフィブリンが観察できる。

[図5]図5は、表1の癒着スコアをグラフ化したデータを表す。

[図6]図6は、炎症反応の推移を表す。炎症反応の増減は、血漿中のC反応性タンパク（CRP）およびTNF- α の発現の増減として表した。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本開示を詳細に説明する。

本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願、公開された出願および他の出版物は、その全体を参照により本明細書に援用する。また本明細書において参照された出版物と本明細書の記載に矛盾が生じた場合は、本明細書の記載が優先されるものとする。

[0014] 本開示において「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介するものを含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）体、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。また、シート状細胞培養物は、細胞が明確な層構造を示すことなく、細胞1個分の厚みを超える厚みを有

する3次元構造を有してもよい。例えば、シート状細胞培養物の垂直断面において、細胞が水平方向に均一に整列することなく、不均一に（例えば、モザイク状に）配置された状態で存在していてもよい。

[0015] シート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）製の膜等が知られているが、本開示のシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができる。また、本開示のシート状細胞培養物は、好ましくは、シート状細胞培養物を構成する細胞由来の物質のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0016] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたもの（iPS細胞由来接着細胞）であってもよい。シート状細胞培養物を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。iPS細胞由来接着細胞の非限定例としては、iPS細胞

由来の心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、脾細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

[0017] 本開示において「骨格筋芽細胞」は、骨格筋に存在する筋芽細胞を意味する。骨格筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報に記載の方法など）により調製することもできるし、商業的に入手することもできる（例えば、Lonza、Cat# CC-2580）。骨格筋芽細胞は、限定されずに、例えば、CD56、 $\alpha 7$ インテグリン、ミオシン重鎖11a、ミオシン重鎖11b、ミオシン重鎖11d（11x）、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3などのマーカーにより同定することができる。特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。さらに特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。骨格筋芽細胞は、骨格筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に由来してもよい。一態様において、骨格筋芽細胞は哺乳動物の骨格筋芽細胞である。特定の態様において、骨格筋芽細胞はヒト骨格筋芽細胞である。また、骨格筋芽細胞は、任意の骨格筋から採取できる。一態様において、本開示の骨格筋芽細胞は、大腿部、頸部、腹部由来の骨格筋芽細胞である。

[0018] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギなどが含まれる。また、シート状細胞培養物を構成する細胞の種類数は特に限定されず、1種類のみ細胞で構成されていてもよいが、2種類以上の細胞を用いたものであってもよい。シート状細胞培養物を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、シート状細胞培養物の形

成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。

[0019] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」は、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生じないため、本開示においては好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用する場合は、拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と総称することもある。本開示の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本開示の一態様において、細胞は自家細胞である。本開示の別の態様において、細胞は他家細胞である。

[0020] シート状細胞培養物は、既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-081829、特開2011-110368など参照）で製造することができる。シート状細胞培養物の製造方法は、典型的には、細胞を培養基材上に播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含むが、これに限定されない。細胞を培養基材上に播種するステップの前に、細胞を凍結するステップおよび細胞を解凍するステップを行ってもよい。さらに、細胞を解凍するステップの後に細胞を洗浄するステップを行ってもよい。これら各ステップは、シート状細胞培養物の製造に適した既知の任意の手法で行うこ

とができる。本開示の製造方法は、シート状細胞培養物を製造するステップを含んでもよく、その場合、シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの1または2以上を含んでもよい。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を培養基材上に播種するステップの前に細胞を増殖させるステップを含まない。

[0021] 培養基材は、細胞がその上で細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、種々の材質の容器、容器中の固形もしくは半固形の表面などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・材料が好ましい。かかる材料としては、限定することなく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ナイロン6, 6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。また、容器は、少なくとも1つの平坦な面を有することが好ましい。かかる容器の例としては、限定することなく、例えば、細胞培養物の形成が可能な培養基材で構成された底面と、液体不透過性の側面とを備えた培養容器が挙げられる。かかる培養容器の特定の例としては、限定されずに、細胞培養皿、細胞培養ボトルなどが挙げられる。容器の底面は透明であっても不透明であってもよい。容器の底面が透明であると、容器の裏側から細胞の観察、計数などが可能となる。また、容器は、その内部に固形もしくは半固形の表面を有してもよい。固形の表面としては、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、半固形の表面としては、ゲル、軟質のポリマーマトリックスなどが挙げられる。培養基材は、上記材料を用いて作製してもよいし、市販のものを利用してよい。好ましい培養基材としては、限定することなく、例えば、シート状細胞培養物の形成に適した、接着性の表面を有する基材が挙げられる。具体的には、親水性の表面を有する基材、例えば、コロナ放電処理したポリスチレン、コラーゲンゲルや親水性ポリマー

などの親水性化合物を該表面にコーティングした基材、さらには、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの細胞外マトリックスや、カドヘリンファミリー、セレクチンファミリー、インテグリンファミリーなどの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。また、かかる基材は市販されている（例えば、Corning^(R) TC-Treated Culture Dish、Corningなど）。培養基材は全体または部分が透明であっても不透明であってもよい。

[0022] 培養基材は、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面が被覆されていてもよい。かかる材料としては、限定されずに、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等）、N,N-ジアルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N,N-ジメチル（メタ）アクリルアミド、N,N-エチルメチルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド等）、環状基を有する（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-プロペニル）-モルホリン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピロリジン、1-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-ピペリジン、4-（1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル）-モルホリン等）、またはビニルエーテル誘導体（例えば、メチルビニルエーテル）のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピラン

を含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料などの公知のものを用いることができる（例えば、特開平2-211865、特開2003-33177参照）。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進することができる。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており（例えば、CellSeed Inc.のUpCell^(R)）、これらを本開示の製造方法に使用することができる。

[0023] 培養基材は、種々の形状であってもよいが、平坦であることが好ましい。また、その面積は特に限定されないが、例えば、約1cm²～約200cm²、約2cm²～約100cm²、約3cm²～約50cm²などであってよい。例えば、培養基材として直径10cmの円形の培養皿が挙げられる。この場合、面積は56.7cm²となる。

培養基材は血清でコート（被覆またはコーティング）されていてもよい。血清でコートされた培養基材を用いることにより、より高密度のシート状細胞培養物を形成することができる。「血清でコートされている」とは、培養基材の表面に血清成分が付着している状態を意味する。かかる状態は、限定されずに、例えば、培養基材を血清で処理することにより得ることができる。血清による処理は、血清を培養基材に接触させること、および、必要に応じて所定期間インキュベートすることを含む。

[0024] 血清としては、異種血清および／または同種血清を用いることができる。異種血清は、シート状細胞培養物を移植に用いる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ウシやウマに由来する血清、例えば、ウシ胎仔血清（FBS、FCS）、仔ウシ血清（CS）、ウマ血清（HS）などが異種血清に該当する。また、「同種血清」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト血清が同種血清に該当する。同種血清は、自己血清（自家血清ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する血清、およびレシピエント以外の同種個体に由来する同

種他家血清を含む。なお、本明細書中で、自己血清以外の血清、すなわち、異種血清と同種他家血清を非自己血清と総称することもある。

培養基材をコートするための血清は、市販されているか、または、所望の生物から採取した血液から定法により調製することができる。具体的には、例えば、採取した血液を室温で約20分～約60分程度放置して凝固させ、これを約1000×g～約1200×g程度で遠心分離し、上清を採取する方法などが挙げられる。

[0025] 培養基材上でインキュベートする場合、血清は原液で用いても、希釈して用いてもよい。希釈は、任意の媒体、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0.5%～約100%（v/v）、好ましくは約1%～約60%（v/v）、より好ましくは約5%～約40%（v/v）である。

[0026] インキュベート時間も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約1時間～約72時間、好ましくは約2時間～約48時間、より好ましくは約2時間～約24時間、さらに好ましくは約2時間～約12時間である。インキュベート温度も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0℃～約60℃、好ましくは約4℃～約45℃、より好ましくは室温～約40℃である。

[0027] インキュベート後に血清を廃棄してもよい。血清の廃棄手法としては、ピペットなどによる吸引や、デカンテーションなどの慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本開示の好ましい態様においては、血清廃棄後に、培養基材を無血清洗浄液で洗浄してもよい。無血清洗浄液としては、血清を含まず、培養基材に付着した血清成分に悪影響を与えない液体媒体であれば特に

限定されず、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSSなど）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB（MCDB102、104、107、120、131、153、199など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の培養基材洗浄手法、例えば、限定することなく、培養基材上に無血清洗浄液を加えて所定時間（例えば、約5秒～約60秒間）攪拌後、廃棄する手法などを用いることができる。

[0028] 本開示において、培養基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」は、細胞の増殖を、それが無い場合に比べて促進する任意の物質を意味し、例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）などを含む。成長因子による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、例えば、約 $0.0001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約 $0.0005\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約 $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0029] 本開示において、培養基材を、ステロイド剤でコートしてもよい。ここで「ステロイド剤」は、ステロイド核を有する化合物のうち、生体に、副腎皮質機能不全、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。かかる化合物としては、限定されずに、例えば、コルチゾール、プレドニゾン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等が含まれる。ステロイド剤による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、デキサメタゾンとして、例えば、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約 $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0030] 培養基材は、血清、成長因子およびステロイド剤のいずれか1つでコート

しても、これらの任意の組み合わせ、すなわち、血清と成長因子、血清とステロイド剤、血清と成長因子とステロイド剤、または、成長因子とステロイド剤の組み合わせでコートしてもよい。複数の成分でコートする場合、これらの成分を混合して同時にコートしてもよいし、別々のステップでコートしてもよい。

[0031] 培養基材は、血清等でコートした後直ちに細胞を播種してもよいし、コートした後に保存しておき、その後細胞を播種することもできる。コートした基材は、例えば約4℃以下、好ましくは約-20℃以下、より好ましくは約-80℃以下に保つことにより長期間保存することができる。

培養基材への細胞の播種は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。培養基材への細胞の播種は、例えば、細胞を培養液に懸濁した細胞懸濁液を培養基材（培養容器）に注入することにより行ってもよい。細胞懸濁液の注入には、スポイトやピペットなど、細胞懸濁液の注入操作に適した器具を用いることができる。

[0032] 播種は、約 7.1×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 7.3×10^5 個/cm²～約 2.8×10^6 個/cm²、約 7.5×10^5 個/cm²～約 2.5×10^6 個/cm²、約 7.8×10^5 個/cm²～約 2.3×10^6 個/cm²、約 8.0×10^5 個/cm²～約 2.0×10^6 個/cm²、約 8.5×10^5 個/cm²～約 1.8×10^6 個/cm²、約 9.0×10^5 個/cm²～約 1.6×10^6 個/cm²、約 1.0×10^6 個/cm²～約 1.6×10^6 個/cm²などの密度で行うことができる。

[0033] 本開示の一側面は、管腔壁の少なくとも片側に損傷部を有する管腔臓器の治癒を促進させるためのシート状細胞培養物であって、該シート状細胞培養物は、損傷が存在する部位に対応する管腔壁の反対側に適用されることを特徴とする、前記シート状細胞培養物に関する。

本開示のシート状細胞培養物は、管腔壁の少なくとも片側（例えば内側部）の損傷した組織を、管腔壁の反対側（例えば外側部）から適用することにより治癒を促進することができる。

[0034] 管腔壁、例えば消化管壁の片側に損傷が生じると、損傷部分から穿孔が生じるリスクが高まり、また損傷が全通性であれば穿孔となる。本開示のシート状細胞培養物は、管腔壁の少なくとも片側に損傷が生じた際に、損傷が存在する部位に対応する反対側に、例えば貼付により適用することで、損傷が生じた管腔臓器の組織の治癒を促進し、再生することができるものである。

[0035] 組織再生のメカニズムとしては、例えば障害部位で血管新生や細胞の保護、修復などを担うVEGF、HGFなどのサイトカインやコラーゲンなどを、シート状細胞培養物が持続的に放出するパラクライン効果によるものおよび／または、適用された周囲組織の前駆細胞や幹細胞が活性化して、コラーゲン産生等を促すオートクライン効果が得られることなどが考えられる。

[0036] 本開示において「管腔臓器」は、体腔に収納されている内腔を有する臓器、すなわち管状または袋状の構造を有する臓器を意味し、例えば消化管系、循環器系、尿路系、呼吸器系、女性生殖器系の臓器などが挙げられる。典型的には消化管系の臓器である。また、本開示において「管腔壁」とは、管腔臓器の管または袋を構成する臓器壁を意味する。管腔壁には内腔に面した内側部と臓器の外表面を形成する外側部とがあり、本開示において「管腔壁の片側」という場合、管腔壁の内側または外側のいずれかを意味し、内側に対する外側または外側に対する内側を「反対側」という。また、片側のある領域に対して、管腔壁のちょうど反対側に位置する領域を「対応する反対側」という。

消化管系の臓器としては、食道、胃、十二指腸、膵臓、胆のう、胆管、小腸、大腸、直腸などが挙げられる。中でも管腔壁が薄く、穿孔発生のリスクが高いことや、種々の消化液に暴露される厳しい環境にあるために損傷の悪化が進行しやすいことなどから、十二指腸が最も好ましい。

[0037] 本開示の一態様において、管腔臓器は、消化管系の臓器である。消化管系の臓器においては、管腔壁の断面構造は、大きく分けると内腔側から粘膜層、筋層、漿膜層の3層構造を形成する。粘膜層はさらに粘膜、粘膜筋板および粘膜下層に分類され、漿膜層はさらに漿膜下層および漿膜に分類される。

例えば腫瘍や潰瘍などの場合、一般的には内側の粘膜にまず病変が生じ、それが漿膜層側、すなわち管腔壁の外側へと浸潤していくことで疾患が進行する。病変の浸潤が粘膜層までの場合、粘膜層、すなわち粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層までを剥離して除去することにより、疾患を処置することができる。かかる処置により管腔臓器の内腔側には、筋層が露出した部位が生じることとなる。本開示の「損傷」には、かかる筋層が露出した部位が含まれる。また、例えば病変の浸潤が漿膜にまで達するなど、何らかの理由により粘膜から漿膜にまで損傷が達すると、全通性、すなわち貫通損傷となる。貫通損傷が生じた場合、漿膜側の損傷が軽微であればエアがリークするようなマイナーリークとなるが、損傷が大きくなれば内腔の液体が管腔臓器の外に漏出するようなメジャーリークとなる。

[0038] 本開示において「損傷」または「損傷部」とは、管腔壁の少なくとも一部が損なわれている状態またはその部分をいう。「片側に損傷を有する」とは、管腔壁の片側（例えば内側）の一部が少なくとも損傷している状態を言い、該損傷は全通性であってもよい、すなわち管腔壁を貫通する形で損傷した貫通損傷であってもよいし、非貫通損傷であってもよい。損傷が全通性、すなわち貫通損傷の場合、片側の損傷部の方が反対側の損傷部よりも大きい。例えば少なくとも内側に損傷部を有する貫通損傷の場合、内側の損傷部の方が外側の損傷部よりも大きい。一態様において、損傷は非貫通損傷である。本開示において「非貫通損傷」とは、損傷が管腔壁を貫通していない状態をいう。すなわち内側（内腔側）の非貫通損傷は、管腔の内腔側のみが損傷しており、損傷は外側（外壁側）に到達していない。同様に外側の非貫通損傷は、管腔の外壁側のみが損傷しており、損傷は内腔側に到達していない。一態様において、損傷は、管腔壁のうち粘膜層が損傷した非貫通損傷である。

別の一態様において、損傷は貫通損傷である。本開示のシート状細胞培養物を貫通損傷に適用する場合、損傷部または損傷部に対応する反対側にそのまま適用してもよいし、例えば糸で損傷箇所を縫合することなどにより貫通損傷の孔を塞いだ後に適用してもよい。典型的には、貫通損傷の中でもマイ

ナーリークであれば、本開示のシート状細胞培養物をそのまま適用し、メジャーリークであれば損傷箇所を縫合した後に本開示のシート状細胞培養物を適用する。

[0039] 管腔臓器の損傷は、切創、裂創、割創、挫創、剥離創など、外部からの力により生じた創傷に起因するものであってもよいし、例えば潰瘍などにより構造が損なわれることで生じたものであってもよい。本開示において「剥離創」とは、管腔臓器壁の構造の一部が何らかの原因により剥脱することにより生じた創傷を意味する。一態様において、本開示の損傷は、切創、剥離創などの創傷であってよく、好ましくは剥離創である。別の一態様において、本開示の損傷は、例えば、内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）、内視鏡的粘膜切開術（EMR）、ポリペクトミーなど、消化管内壁への施術により生じた損傷であってよい。好ましい一態様において、本開示の損傷は、例えば、内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）、内視鏡的粘膜切開術（EMR）など、消化管内壁への剥離術により生じた損傷である。より好ましい一態様において、損傷は内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）によるものである。

[0040] したがって、本発明の特に好ましい一態様において、損傷が、十二指腸のESDによるものである。上述のとおり腸管が狭く屈曲しているうえに、消化管壁が薄く、また内視鏡の届くぎりぎりの範囲であるため、ESDの施術に熟練を要することや、膵液や胆汁にも暴露される厳しい環境にあることなどの理由から、ESD施術後に合併症として施術箇所に術後穿孔を生じるリスクが特に高い。胃や大腸のESDによる穿孔は、クリップでの閉鎖などで保存的に治癒する症例が多い。十二指腸ESDの術後穿孔の予防も同様にクリップによる閉鎖 (Maekawa S, et al., Surg Endosc, 2015) やポリグリコール酸シート (ネオベールシート^(R)) 貼付 (Takimoto K, et al., Dig Endosco, 2014) など、既存の医薬品や医療機器を用いた方法が実臨床で試みられているが完全には予防出来ていないのが現状である (Fujihara S, et al., World J Gastroenterol, 2016)。これに対し本開示のシート状細胞培養物は、十二指腸ESDの施術箇所に外壁側から適用することにより、施術箇所の再生

を促し、術後穿孔のリスクを低減し、術後穿孔を処置および／または予防することが可能である。管腔壁から腹腔内に漏れた膵液や胆汁が消化液と混じることによって活性化されて炎症が引き起こされるため、本開示のシート状細胞培養物を適用することにより、ESDなどの外科的処置および術後穿孔によって発生する腹膜炎などの炎症を予防することが可能である。

[0041] 本開示のシート状細胞培養物は、損傷に対して、損傷部または損傷部に対応する反対側（以下、まとめて「適用箇所」という場合がある）の少なくともいずれかに適用される。一態様において、本開示のシート状細胞培養物は、管腔壁の損傷が存在する部位に対応する反対側に適用される。すなわち、損傷が管腔壁の内側部にある場合、本開示のシート状細胞培養物は、管腔壁の対応する外側部に適用され、損傷が管腔壁の外側部にある場合、本開示のシート状細胞培養物は、管腔壁の対応する内側部に適用される。

[0042] 本開示の別の態様において、本開示のシート状細胞培養物は、損傷に対し、損傷部または損傷部に対応する反対側を全てカバーするように適用される。「損傷部または損傷部に対応する反対側を全てカバーする」とは、損傷部が存在する領域または、それに対応する反対側の領域の全体を覆うようにシート状細胞培養物を適用することを意味する。この場合、前記領域よりも大きな1枚のシート状細胞培養物で全てカバーするように適用してもよいし、複数のシート状細胞培養物を隙間なく適用することにより、領域の全てをカバーしてもよい。

[0043] 本開示のシート状細胞培養物を構成する細胞（以下、「シート形成細胞」という場合がある）は、上記で詳述したとおりである。本開示のシート状細胞培養物は、適用する管腔臓器の細胞を含んでいる必要はなく、むしろ当該臓器に存在しない細胞を含んでいてもよい。したがって一態様において、本開示のシート状細胞培養物は、異所性の細胞、すなわち適用臓器に本来存在しない細胞を含んでいる。好ましい一態様において、上述のとおり本開示のシート状細胞培養物が適用されるのは消化管系の臓器（すなわち平滑筋）の損傷であり、この場合の異所性の細胞としては、例えば骨格筋芽細胞などの

横紋筋に由来する細胞や間葉系幹細胞などが挙げられる。より好ましい一態様において、本開示のシート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞を含んでいる。骨格筋芽細胞は、大腿、頸部、腹部などの横紋筋に由来するものであってよい。

[0044] 骨格筋芽細胞は、骨格筋（横紋筋）に存在する筋芽細胞を意味する。骨格筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報に記載の方法など）により調製することもできるし、商業的に入手することもできる（例えば、Lonza、Cat# CC-2580）。骨格筋芽細胞は、限定されずに、例えば、CD56、 $\alpha 7$ インテグリン、ミオシン重鎖11a、ミオシン重鎖11b、ミオシン重鎖11d（11x）、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3などのマーカーにより同定することができる。特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。さらに特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。骨格筋芽細胞は、骨格筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に由来してもよい。一態様において、骨格筋芽細胞は哺乳動物の骨格筋芽細胞である。特定の態様において、骨格筋芽細胞はヒト骨格筋芽細胞である。

[0045] 横紋筋組織から骨格筋芽細胞を調製する場合、調製した細胞集団には線維芽細胞が含まれる。本開示のシート状細胞培養物を製造する際に横紋筋組織から調製した骨格筋芽細胞を含む細胞集団を用いる場合、当該細胞集団には一定量の線維芽細胞が含まれることになる。線維芽細胞は当該技術分野でよく知られており、TE-7（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci, 1994; 107 (Pt 1):29-37、Goodpaster et al., J Histochem Cytochem, 2008;56(4):347-58など参照）などのマーカーにより同定することができる。

[0046] 一態様において、本開示のシート状細胞培養物を形成する細胞は、横紋筋組織から調製された骨格筋芽細胞を含む。したがって本開示のシート状細胞

培養物の製造において用いられる細胞集団には、骨格筋芽細胞および線維芽細胞が含まれ得る。一態様において、本開示のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、CD56陽性率が50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上であり得、好ましくは60%以上である。

[0047] 本開示のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、線維芽細胞を含み得るが、線維芽細胞の含有率が高すぎる場合、骨格筋芽細胞の含有率が低下してしまい好ましくない。したがって一態様において、本開示のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、TE7陽性率が50%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下であり得、好ましくは40%以下である。

[0048] 本開示のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞以外の細胞も含み得るが、かかる細胞はなるべく少ない方が好ましい。したがってCD56陽性率およびTE7陽性率の合計値は、高い方が好ましく、例えば80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上などであり得、好ましくは90%以上である。

[0049] 本開示のシート状細胞培養物の厚みは特に限定されない。シート状細胞培養物として単層のシートを用いる場合、その厚みは、通常は細胞1個分以上の厚みを有し、シート形成細胞の種類によっても厚みは異なるが、一態様において、本開示のシート状細胞培養物は、30 μ m以上の厚みを有し、好ましい一態様において、50 μ m以上の厚みを有する。本開示のシート状細胞培養物の厚みの範囲としては、例えば30 μ m~200 μ m、好ましくは50 μ m~150 μ m、より好ましくは60 μ m~100 μ mなどが挙げられる。シート状細胞培養物として積層したシートを用いる場合、前記単層シートの厚み×積層枚数を超えない厚みとなる。したがって、一態様として例えば単層シートを5枚積層したシートを用いる場合、その厚みは150 μ m以上、好ましくは250 μ m以上となり、また厚みの範囲としては、例えば1

50 μm ~ 1000 μm 、好ましくは250 μm ~ 750 μm 、より好ましくは300 μm ~ 500 μm などが挙げられる。

したがって本開示のシート状細胞培養物の厚みは、例えば30 μm ~ 1000 μm 、好ましくは50 μm ~ 750 μm 、50 μm ~ 500 μm 、60 μm ~ 500 μm などが挙げられる。

[0050] ある態様においては、本開示のシート状細胞培養物は、非常に脆弱であり、取り扱いが困難である場合がある。したがって本開示のシート状細胞培養物は、取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減する目的で、さらに補強層を有してよい。補強層としては、本開示のシート状細胞培養物の機能を損なわず、構造を補強できるものであればいかなるものであってもよく、例えばゲルおよび／またはポリマーを含む補強層であってよいが、生体内に移植するものであるため、好ましくは、例えば生体適合性ゲルやポリマーなどを含む、生体適合性の補強層である。

[0051] 本開示の補強層に用い得るゲル、好ましくは生体適合性ゲルとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないゲルであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばフィブリンゲル、フィブリノーゲンゲル、ゼラチンゲル、コラーゲンゲルなどが挙げられる。

本開示の補強層に用い得るポリマー、好ましくは生体適合性ポリマーとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないポリマーであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリジオキサノ、ポリグリカプロ、コラーゲンなどが挙げられる。

[0052] 生体適合性ゲルを含む補強層の形成方法は、当該技術分野において公知の方法を用いることができる。かかる方法としては、これに限定するものではないが、例えばシート状細胞培養物上に生体適合性ゲルやポリマーまたはその材料となる成分を噴霧する方法、シート状細胞培養物上にゾル状の生体適合性物質を積層してゲル化する方法、液状のゲルに浸漬したのちゲルを固形化させる方法などのほか、特開2016-52271号公報等に記載の方法

などが挙げられる。

[0053] 補強層は、本開示のシート状細胞培養物の取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減するためのものであるため、一定以上の強度を有していることが好ましく、さらに弾力性を有していることが好ましい。ゲルやポリマーを含む構造物の強度の公知の評価単位としては、例えばゼリー強度などが挙げられ、シート状構造物の強度の公知の評価単位としては、例えば引張破断荷重などが挙げられる。ゼリー強度の測定方法については、例えばJIS K 6503などに記載されている。引張破断荷重は、シート状細胞培養物などの両端を水平方向に引っ張り、破断するまでの最大荷重を意味し、その測定方法は、例えば特願2014-179151などに記載されている。

[0054] 本開示のシート状細胞培養物の補強層としては、これに限定するものではないが、例えば引張破断荷重として約0.010N以上、約0.015N以上、約0.020N以上、約0.025N以上、約0.030N以上、約0.035N以上、約0.040N以上、約0.045N以上等であってよく、また、約0.010N～約0.200N、約0.015N～約0.100N、約0.020N～約0.50N等の範囲であってよい。補強層を有するシート状細胞培養物は、補強層を有しないシート状細胞培養物と比較して、強度が約1.5倍以上、約2倍以上、約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上となり得、また、約1.5倍～約20倍、約2倍～約15倍、約2.5倍～約10倍等の範囲となり得る。

[0055] 補強層を有するシート状細胞培養物を適用する場合、補強層が適用箇所に直接接触しないように適用するのが好ましい。すなわち、適用箇所と補強層の間にシート状細胞培養物が位置するように適用するのが好ましい。

適用箇所へのシート状細胞培養物の適用は、当該技術分野において公知の任意のデバイスおよび／または手法を用いて実施することができる。

[0056] 一態様において、本開示のシート状細胞培養物を管腔組織に適用する際、治癒を促進する他の組成物および／または移植片などと併せて適用してもよ

い。治癒を促進する他の組成物および／または移植片としては、これに限定するものではないが、例えば、有茎大網片などの有茎血管を含む移植片、ポリグリコール酸シート、フィブリンゲル、アドスプレー^(R)などが挙げられる。好ましい一態様において、本開示のシート状細胞培養物は、有茎血管を含む移植片とともに適用される。有茎血管を含む移植片の典型例としては、例えば有茎大網片などが挙げられる。

かかる治癒を促進する他の組成物および／または移植片は、本開示のシート状細胞培養物とは独立した別の組成物または移植片であってもよいし、例えばシート状細胞培養物または補強層などに組み込まれたものであってもよい。

[0057] 本開示のシート状細胞培養物が、独立した治癒を促進する他の組成物および／または移植片とともに適用される場合、かかる組成物および／または移植片は、シート状細胞培養物の適用の前に適用されても、適用後に適用されてもよい。シート状細胞培養物の適用の前に他の組成物および／または移植片を適用する場合、適用箇所とシート状細胞培養物の間に位置するように適用される。すなわち、まず適用箇所に他の組成物および／または移植片を適用した後、その上からシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）を適用する。シート状細胞培養物の適用の後に適用される場合、適用箇所に対してシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）の上から適用される。すなわち、まず適用箇所にシート状細胞培養物を適用し、その上から他の組成物および／または移植片を適用する。

[0058] 本開示の別の側面は、本開示のシート状細胞培養物を製造する方法（以下、「本開示の製造方法」と称する場合がある）に関する。

本開示の製造方法は、以下を含む：

- (i) シート形成細胞を含む細胞集団を培養基材に播種するステップ、
- (i i) ステップ (i) で播種された細胞集団をシート化媒体中でシート化し、シート状細胞培養物を形成するステップ、および
- (i i i) ステップ (i i) で形成されたシート状細胞培養物を培養基材か

ら剥離するステップ。

[0059] (i)において、培養基材上にシート形成細胞を含む細胞集団を播種する。シート形成細胞は、シート状細胞培養物を構成し得る細胞として上述した細胞であれば特に限定されない。細胞集団には、少なくとも1種のシート形成細胞が含まれるが、2種以上のシート形成細胞を含んでもよいし、シート形成細胞以外の細胞を含んでもよい。本開示の一態様において、細胞集団に含まれる少なくとも1種のシート形成細胞は適用臓器に存在しない異所性の細胞であり、好ましくは骨格筋芽細胞である。かかる態様において、細胞集団にはさらに線維芽細胞が含まれ得る。すなわち、骨格筋芽細胞と線維芽細胞をシート形成細胞として含むシート状細胞培養物が挙げられる。本開示の別の態様において、細胞集団に含まれる少なくとも1種のシート形成細胞は、間葉系幹細胞である。かかる態様において、細胞集団にはさらに血管内皮細胞や心筋細胞が含まれ得る。

[0060] 播種される細胞密度は、シート状細胞培養物を形成し得る密度であれば特に限定されないが、好ましい態様において、細胞集団はコンフルエントに達する密度またはそれ以上の密度で播種される。本開示において、「コンフルエントに達する密度」とは、細胞を播種した際に、播種された細胞により、培養容器の接着表面一面が隙間なく覆われることが想定される程度の密度を指す。例えば、播種した際に、細胞が互いに接触することが想定される程度の密度、接触障害が発生する密度、または接触障害により細胞の増殖を実質的に停止する密度である。

[0061] 「コンフルエントに達する密度またはそれ以上の密度」は播種されるシート形成細胞の種類により異なり得る。例えば骨格筋芽細胞の場合、 3.0×10^5 個/cm²以上、 3.5×10^5 個/cm²以上、 1.0×10^6 個/cm²以上などであり得る。

[0062] 細胞集団の播種密度の非限定例は、約 7.1×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²、約 7.3×10^5 個/cm²～約 2.8×10^6 個/cm²、約 7.5×10^5 個/cm²～約 2.5×10^6 個/cm²、約 7.5×10^5

個/cm²～約3.0×10⁶個/cm²、約7.8×10⁵個/cm²～約2.3×10⁶個/cm²、約8.0×10⁵個/cm²～約2.0×10⁶個/cm²、約8.5×10⁵個/cm²～約1.8×10⁶個/cm²、約9.0×10⁵個/cm²～約1.6×10⁶個/cm²、約1.0×10⁶個/cm²～約1.6×10⁶個/cm²などの密度を含む。なお、これらの密度は、特段の記載がない限り、細胞集団に含有される全ての細胞の密度であることとする。

[0063] さらに別の態様において、播種は、成長因子を実質的に含まない細胞培養液において、細胞集団に含まれ得る少なくとも1種のシート形成細胞が実質的に増殖しない密度で行うことができる。かかる態様において、細胞集団に含まれ得る他の細胞は、増殖抑制を受けながらも、増殖可能な密度であり得る。

本開示の方法に用いられる培養基材は、上述のとおりである。好ましい一態様において、培養基材は血清で被覆されていてよい。別の好ましい一態様において、培養基材は温度応答性材料で被覆されていてよい。さらに好ましい一態様において、培養基材は温度応答性材料及び血清で被覆されていてよい。

[0064] (i i) において、播種された細胞集団は、シート化媒体中でインキュベートしてシート化され、シート状細胞培養物として形成される。

播種した細胞のシート化は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。かかる手法の非限定例は、例えば、特許文献1、W02014/185517などに記載されている。細胞のシート化は、細胞同士が接着分子や、細胞外マトリックスなどの細胞間接着機構を介して互いに接着することにより達成されると考えられている。したがって、播種した細胞のシート化は、例えば、細胞を、細胞間接着を形成する条件下で培養することにより達成することができる。かかる条件は、細胞間接着を形成することができればいかなるものであってもよいが、通常は一般的な細胞培養条件と同様の条件であれば細胞間接着を形成することができる。かかる条件としては、例えば、約37℃、5%CO₂での培養が挙げられる。また、培養は通常の圧力下（大気圧下、非加圧

下)で行うことができる。培養は任意の大きさおよび形状の容器で行うことができる。シート状細胞培養物の大きさや形状は、培養容器の細胞付着面の大きさ・形状を調整すること、または、培養容器の細胞付着面に、所望の大きさ・形状の型枠を設置し、その内部で細胞を培養することなどにより任意に調節することができる。本明細書において、播種した細胞をシート化するための培養を、「シート化培養」と称することもある。シート化培養により、培養基材上（培養容器内）のシート状細胞培養物の厚みは減少する。すなわち、播種後、細胞が沈降した後、その後のシート化により培養基材上で細胞層の厚みは減少するが、シート状細胞培養物は培養基材からの剥離により収縮し、再び厚みを増す。シート化による厚みの減少は、播種直後の細胞層の厚みを100%とすると、約90%～約70%程度である。

[0065] シート化のためのインキュベートは、シート状細胞培養物が自然剥離されるより前に終了されることが望ましい。インキュベート開始から自然剥離が開始されるまでの時間は、播種された細胞集団に含有される細胞の種類（特にシート形成細胞の種類）や細胞の状態により変化し得るが、例えばシート形成細胞として骨格筋芽細胞を含む細胞集団を播種した場合、6～12時間程度で自然剥離が生じる場合が多い。したがって本開示の一態様において、シート化のためのインキュベート時間の上限は12時間、11.5時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間または4時間であり得る。したがって本開示の製造方法において、シート化のためのインキュベート時間は、2～12時間、2～11.5時間、2～11時間、2～10時間、2～9時間、2～8時間、2～7時間、2～6時間、2～5時間または2～4時間、好ましくは2～4時間または2～6時間であり得る。

[0066] シート化培養に用いる細胞培養液（「シート化媒体」または単に「培養液」または「培地」と称することもある）は、細胞の生存を維持できるものであれば特に限定されないが、典型的には、アミノ酸、ビタミン類、電解質を主成分としたものが利用できる。本開示の一態様において、培養液は、細胞培養用の基礎培地をベースにしたものである。かかる基礎培地には、限定さ

れずに、例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB (MCDB102、104、107、120、131、153、199など)、L15、SkBM、RITC80-7などが含まれる。これらの基礎培地の多くは市販されており、その組成も公知となっている。

基礎培地は、標準的な組成のまま（例えば、市販されたままの状態）用いてもよいし、細胞種や細胞条件に応じてその組成を適宜変更してもよい。したがって、本開示に用いる基礎培地は、公知の組成のものに限定されず、1または2以上の成分が追加、除去、増量もしくは減量されたものを含む。

[0067] 基礎培地に含まれるアミノ酸としては、限定されずに、例えば、L-アルギニン、L-シスチン、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンなどが、ビタミン類としては、限定されずに、例えば、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、 α -イノシトール、ナイアシンアミド、リボフラビン、チアミン、ピリドキシン、ビオチン、リボ酸、ビタミンB12、アデニン、チミジンなどが、そして、電解質としては、限定されずに、例えば、 CaCl_2 、 KCl 、 MgSO_4 、 NaCl 、 NaH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MnSO_4 、 Na_2SiO_3 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、 NaVO_3 、 NiCl_2 、 ZnSO_4 などがそれぞれ含まれる。基礎培地には、これらの成分のほか、D-グルコースなどの糖類、ピルビン酸ナトリウム、フェノールレッドなどのpH指示薬、プトレシンなどを含んでもよい。

[0068] 本開示の一態様において、基礎培地に含まれるアミノ酸の濃度は、L-アルギニン：約63.2 mg/L～約84 mg/L、L-シスチン：約35 mg/L～約63 mg/L、L-グルタミン：約4.4 mg/L～約58.4 mg/L、グリシン：約2.3 mg/L～約30 mg/L、L-ヒスチジン：約4.2 mg/L、L-イソロイシン：約66 mg/L～約105 mg/L、

L-ロイシン：約105 mg/L～約131 mg/L、L-リジン：約146 mg/L～約182 mg/L、L-メチオニン：約15 mg/L～約30 mg/L、L-フェニルアラニン：約33 mg/L～約66 mg/L、L-セリン：約32 mg/L～約42 mg/L、L-トレオニン：約12 mg/L～約95 mg/L、L-トリプトファン：約4.1 mg/L～約16 mg/L、L-チロシン：約18.1 mg/L～約104 mg/L、L-バリン：約94 mg/L～約117 mg/Lである。

また、本開示の一態様において、基礎培地に含まれるビタミン剤の濃度は、D-パントテン酸カルシウム：約4 mg/L～約12 mg/L、塩化コリン：約4 mg/L～約14 mg/L、葉酸：約0.6 mg/L～約4 mg/L、i-イノシトール：約7.2 mg/L、ナイアシンアミド：約4 mg/L～約6.1 mg/L、リボフラビン：約0.0038 mg/L～約0.4 mg/L、チアミン：約3.4 mg/L～約4 mg/L、ピリドキシン：約2.1 mg/L～約4 mg/Lである。

[0069] 細胞培養液は、上記のほか、血清、成長因子、ステロイド剤成分、セレン成分などの1種または2種以上の添加物を含んでもよい。しかし、これらの成分が自己由来のものではない場合は、臨床においてはレシピエントに対するアナフィラキシーショック等の副作用要因となり得ることが否定できない製造工程由来不純物となり得るため、臨床への適用にあたってはかかる非自己由来成分を排除することが望ましい場合がある。したがって、本開示の好ましい態様において、細胞培養液は、これらの非自己由来の添加物の少なくとも1種の有効量を含まない。また、本開示のより好ましい態様において、細胞培養液は、これらの非自己由来の添加物の少なくとも1種を実質的に含まない。さらに、本開示の特に好ましい態様において、細胞培養液は、非自己由来の添加物を実質的に含まない。一態様において、細胞培養液は、基礎培地のみを含んでもよい。

[0070] 本開示の一態様において、細胞培養液は血清を実質的に含まない。血清を実質的に含まない細胞培養液のことを、本明細書中で「無血清培地」と呼ぶ

こともある。ここで、「血清を実質的に含まない」とは、培養液における血清の含量が、シート状細胞培養物を生体に適用した場合に悪影響を及ぼさない程度（例えば、シート状細胞培養物中の血清アルブミン含量が約50ng未満となる量）であること、好ましくは、培養液にこれらの物質を積極的に添加しないことを意味する。本開示においては、移植時の副作用を回避するために、細胞培養液は異種血清を実質的に含まないことが好ましく、非自己血清を実質的に含まないことがさらに好ましい。

[0071] 本開示の一態様において、細胞培養液は血清を含む。血清は、同種血清であっても異種血清であってもよい。特定の態様において、細胞培養液は自己血清を含む。血清でコートされた培養基材上で細胞を培養する場合、細胞培養液に含まれる血清（細胞の培養に用いる血清）は、培養基材をコートするために用いる血清と同じであっても異なってもよい。一態様において、細胞培養液に含まれる血清は、培養基材をコートするために用いる血清と同一であり、特定の態様において、該血清は自己血清である。血清は、本開示の製造方法に用いるためのものであってもよい。例えば、血清は、細胞の培養に用いるためのものであっても、培養基材をコートするためのものであってもよい。

[0072] 本開示の一態様において、細胞培養液は有効量の成長因子を含まない。ここで、「有効量の成長因子」とは、細胞の増殖を、成長因子がない場合に比べて、有意に促進する成長因子の量、または、便宜的に、当該技術分野において細胞の増殖を目的として通常添加する量を意味する。細胞増殖促進の有意性は、例えば、当該技術分野で知られた任意の統計学的手法、例えば、t検定などにより適宜評価することができ、また、通常の添加量は当該技術分野の種々の公知文献から知ることができる。具体的には、細胞培養におけるEGFの有効量は、例えば約0.005 μ g/mL以上である。

[0073] したがって、「有効量の成長因子を含まない」とは、本開示における培養液における成長因子の濃度がかかる有効量未満であることを意味する。例えば、細胞培養におけるEGFの培養液中の濃度は、好ましくは約0.005

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、より好ましくは約 $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満である。本開示の好ましい態様においては、培養液における成長因子の濃度は、生体における通常の濃度未満である。かかる態様においては、例えば、細胞培養におけるEGFの培養液中の濃度は、好ましくは約 $5.5\text{ng}/\text{mL}$ 未満、より好ましくは約 $1.3\text{ng}/\text{mL}$ 未満、さらに好ましくは、約 $0.5\text{ng}/\text{mL}$ 未満である。さらに好ましい態様において、本開示における培養液は、成長因子を実質的に含まない。ここで、実質的に含まないとは、培養液中の成長因子の含量が、シート状細胞培養物を生体に適用した場合に悪影響を及ぼさない程度であること、好ましくは、培養液に成長因子を積極的に添加しないことを意味する。したがって、この態様においては、培養液は、その他の成分、例えば血清などに含まれる以上の濃度の成長因子を含まない。

[0074] 本開示の一態様において、細胞培養液は、ステロイド剤成分を実質的に含まない。ここで「ステロイド剤成分」は、ステロイド核を有する化合物のうち、生体に、副腎皮質機能不全、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。かかる化合物としては、限定されずに、例えば、コルチゾール、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等が含まれる。したがって、「ステロイド剤成分を実質的に含まない」とは、培養液におけるこれらの化合物の含量が、シート状細胞培養物を生体に適用した場合に悪影響を及ぼさない程度であること、好ましくは、培養液にこれらの化合物を積極的に添加しないこと、すなわち、培養液が、その他の成分、例えば血清などに含まれる以上の濃度のステロイド剤成分を含まないことを意味する。

[0075] 本開示の一態様において、細胞培養液は、セレン成分を実質的に含まない。ここで「セレン成分」は、セレン分子、およびセレン含有化合物、特に、生体内でセレン分子を遊離し得るセレン含有化合物、例えば、亜セレン酸などを含む。したがって、「セレン成分を実質的に含まない」とは、培養液におけるこれらの物質の含量が、シート状細胞培養物を生体に適用した場合に悪影響を及ぼさない程度であること、好ましくは、培養液にこれらの物質を

積極的に添加しないこと、すなわち、培養液が、その中の他の成分、例えば血清などに含まれる以上の濃度のセレン成分を含まないことを意味する。具体的には、例えば、ヒトの場合、培養液中のセレン濃度は、ヒト血清中の正常値（例えば、 $10.6 \mu\text{g}/\text{dL} \sim 17.4 \mu\text{g}/\text{dL}$ ）に、培地中に含まれるヒト血清の割合を乗じた値よりも低い（すなわち、ヒト血清の含量が約10%であれば、セレン濃度は、例えば、約 $1.0 \mu\text{g}/\text{dL} \sim$ 約 $1.7 \mu\text{g}/\text{dL}$ 未満である）。

[0076] 本開示の上記好ましい態様においては、生体に適用する細胞培養物を作製する場合に従来必要であった、成長因子、ステロイド剤成分、異種血清成分などの製造工程由来不純物を、洗浄などにより除去するステップが不要となる。したがって、本開示の方法の一態様は、この製造工程由来不純物を除去するステップを含まない。

ここで、「製造工程由来不純物」とは、典型的には、製造各工程に由来する以下に列挙するものが含まれる。すなわち、細胞基材に由来するもの（例えば、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来DNA）、細胞培養液に由来するもの（例えば、インデューサー、抗生物質、培地成分）、あるいは細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものなどである（例えば、医薬審発第571号参照）。

[0077] (iii)において、形成されたシート状細胞培養物が、培養基材から剥離される。

シート状細胞培養物の培養基材からの剥離は、シート状細胞培養物が少なくとも部分的に、シート構造を保ったまま、足場となっている培養基材から遊離（剥離）できれば特に限定されず、例えば、タンパク質分解酵素（例えばトリプシンなど）による酵素処理および／またはピペティングなどの機械的処理によって行うことができる。また、細胞を、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面を被覆した培養基材上で培養して細胞培養物を形成した場合には、所定の刺激を加えることで、非酵素的に遊離することもできる。

[0078] 例えば、細胞を温度応答性培養皿で培養して細胞培養物を形成した場合には、温度を温度応答性材料の水に対する下限臨界溶液温度（LCST）以下または上限臨界溶液温度（UCST）以上とする温度処理により、シート状細胞培養物を非酵素的に遊離することができる。かかる温度処理は、限定されずに、例えば、形成されたシート状細胞培養物が付着した培養基材を、LCSTより高い温度の培養環境（例えば、約37℃の温度のインキュベーター内など）から、LCST以下の環境（例えば、インキュベーター外の室温環境など）に移行させることなどにより達成することができる。LCST以下の環境への移行は、限定されずに、例えば、形成されたシート状細胞培養物が存在するLCSTより高い温度の培養液を、LCST以下の温度の媒体（例えば、緩衝液（PBS、HBSS等）や、培養液などの液体等）に置換することなどにより達成することができる。したがって、上記緩衝液等の媒体は、本開示の製造方法において、シート状細胞培養物を培養基材から非酵素的に遊離するために用いることができる。

[0079] (iii) の工程により剥離されたシート状細胞培養物は、剥離前と比較して収縮し、面積が小さくなる。本開示の製造方法により製造されたシート状細胞培養物は、剥離後に収縮しにくく、より大きな面積を有するという特徴がある。本開示の一態様において、剥離後のシート状細胞培養物は、剥離前のシート状細胞培養物の面積（すなわち培養基材の面積）に対して、約20%以上、例えば約20%、約25%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約50%、約60%の面積を有し、好ましくは約35%以上、例えば約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約50%、約60%の面積を有する。

[0080] 本開示の製造方法は、(i)の前に、細胞（細胞集団）を凍結するステップと凍結細胞を解凍するステップとを含んでもよい。細胞の凍結は、既知の任意の手法により行うことができる。かかる手法としては、限定されずに、例えば、容器内の細胞を、凍結手段、例えば、フリーザー、ディープフリー

ザー、低温の媒体（例えば、液体窒素等）に供することなどが挙げられる。凍結手段の温度は、容器内の細胞集団の一部、好ましくは全体を凍結させ得る温度であれば特に限定されないが、典型的には約0℃以下、好ましくは約-20℃以下、より好ましくは約-40℃以下、さらに好ましくは約-80℃以下である。また、凍結操作における冷却速度は、凍結解凍後の細胞の生存率や機能を大きく損なうものでなければ特に限定されないが、典型的には4℃から冷却を始めて約-80℃に達するまで約1時間～約5時間、好ましくは約2時間～約4時間、特に約3時間かける程度の冷却速度である。具体的には、例えば、約0.46℃/分の速度で冷却することができる。かかる冷却速度は、所望の温度に設定した凍結手段に、細胞を含む容器を直接、または、凍結処理容器に収容して供することにより達成することができる。凍結処理容器は、容器内の温度の下降速度を所定の速度に制御する機能を有していてもよい。かかる凍結処理容器としては、既知の任意のもの、例えば、BICELL^(R)（日本フリーザー）、プログラムフリーザーなどを用いることができる。

[0081] 凍結操作は、細胞を培養液や生理緩衝液などに浸漬させたまま行ってもよいが、細胞を凍結・解凍操作から保護するための凍結保護剤を培養液に加えたり、培養液を凍結保護剤を含む凍結保存液と置換するなどの処理を施したうえで行ってもよい。したがって、凍結ステップを含む本開示の製造方法は、培養液に凍結保護剤を添加するステップ、または、培養液を凍結保存液に置換するステップをさらに含んでもよい。培養液を凍結保存液に置換する場合、凍結時に細胞が浸漬している液に有効濃度の凍結保護剤が含まれていれば、培養液を実質的に全て除去してから凍結保存液を添加しても、培養液を一部残したまま凍結保存液を添加してもよい。ここで、「有効濃度」とは、凍結保護剤が、毒性を示すことなく、凍結保護効果、例えば、凍結保護剤を用いない場合と比べた、凍結解凍後の細胞の生存率、活力、機能などの低下抑制効果を示す濃度を意味する。かかる濃度は当業者に知られているか、ルーチンの実験などにより適宜決定することができる。

- [0082] 凍結保護剤は、細胞に対して凍結保護作用を示すものであれば特に限定されず、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、セリシン、プロパンジオール、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルデンプン、コンドロイチン硫酸、ポリエチレングリコール、ホルムアミド、アセトアミド、アドニトール、ペルセイトール、ラフィノース、ラクトース、トレハロース、スクロース、マンニトールなどを含む。凍結保護剤は、単独で用いても、2種または3種以上を組み合わせ用いてもよい。
- [0083] 培養液への凍結保護剤の添加濃度、または、凍結保存液中の凍結保護剤の濃度は、上記で定義した有効濃度であれば特に限定されず、典型的には、例えば、培養液または凍結保存液全体に対して約2%～約20%（v/v）である。しかしながら、この濃度範囲からは外れるが、それぞれの凍結保護剤について知られているか、実験的に決定した代替的な使用濃度を採用することもでき、かかる濃度も本開示の範囲内である。
- [0084] 凍結した細胞を解凍するステップは、既知の任意の細胞解凍手法により行うことができ、典型的には、例えば、凍結した細胞を、解凍手段、例えば、凍結温度より高い温度の固形、液状もしくはガス状の媒体（例えば、水）、ウォーターバス、インキュベーター、恒温器などに供したり、または、凍結した細胞を、凍結温度より高い温度の媒体（例えば、培養液）で浸漬することにより達成されるが、これに限定されない。解凍手段または浸漬媒体の温度は、細胞を所望の時間内に解凍できる温度であれば特に限定されないが、典型的には約4℃～約50℃、好ましくは約30℃～約40℃、より好ましくは約36℃～約38℃である。また、解凍時間は、解凍後の細胞の生存率や機能を大きく損なうものでなければ特に限定されないが、典型的には約2分以内であり、特に約20秒以内とすることで生存率の低下を大幅に抑制することができる。解凍時間は、例えば、解凍手段または浸漬媒体の温度、凍結時の培養液または凍結保存液の容量もしくは組成などを変化させて調節することができる。凍結した細胞は、任意の手法により凍結させた細胞を含み

、その非限定例としては、例えば、上記の細胞を凍結するステップにより凍結された細胞などが挙げられる。一態様において、凍結した細胞は、凍結保護剤の存在下で凍結された細胞である。一態様において、凍結した細胞は、本開示の製造方法に用いるためのものである。

[0085] 本開示の製造方法は、上述の凍結した細胞を解凍するステップの後、かつ、シート状細胞培養物を形成するステップ、好ましくは細胞を培養基材に播種するステップの前に、細胞を洗浄するステップを含んでもよい。細胞の洗浄は、既知の任意の手法により行うことができ、典型的には、例えば、細胞を洗浄液（例えば、血清や血清成分（血清アルブミンなど）を含むもしくは含まない、培養液（例えば、培地等）または生理緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）など）に懸濁し、遠心分離し、上清を廃棄し、沈殿した細胞を回収することにより達成されるが、これに限定されない。細胞を洗浄するステップにおいては、かかる懸濁、遠心分離、回収のサイクルを1回または複数回（例えば、2、3、4、5回など）行ってもよい。本開示の一態様において、細胞を洗浄するステップは、凍結した細胞を解凍するステップの直後に行われる。

[0086] 本開示の製造方法は、上述の細胞を凍結するステップの前に、細胞を増殖させるステップをさらに含んでもよい。細胞を増殖させるステップは、既知の任意の手法で行ってもよく、当業者は各種細胞の増殖に適した培養条件に精通している。

[0087] 一態様において、本開示の製造方法は、細胞に遺伝子を導入するステップを含まない。別の態様において、本開示の製造方法は、細胞に遺伝子を導入するステップを含む。導入する遺伝子は、対象とする疾患の処置に有用なものであれば特に限定されず、例えば、HGF、VEGFなどのサイトカインであってもよい。遺伝子の導入は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、超音波導入法、電気穿孔法、パーティクルガン法、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクター利用する方法、マイクロインジェクション法などの既知の任意の方法を用いて行うことができる

。細胞への遺伝子の導入は、限定されずに、例えば、細胞を凍結するステップの前に行うことができる。

[0088] 一態様において、本開示の製造方法はその全ステップが *in vitro* で行われる。別の態様において、本開示の製造方法は、*in vivo* で行われるステップ、限定されずに、例えば、対象から細胞または細胞の給源となる組織（例えば、横紋筋組織、特に骨格筋組織）を採取するステップを含む。一態様において、本開示の製造方法はその全ステップが無菌条件下で行われる。一態様において、本開示の製造方法は、最終的に得られるシート状細胞培養物が実質的に無菌となるように行われる。一態様において、本開示の製造方法は、最終的に得られるシート状細胞培養物が無菌となるように行われる。

[0089] 本開示の製造方法は、上記ステップ（*iii*）の後、任意に、剥離されたシート状細胞培養物上に、生体適合性ゲルで補強層を形成するステップを含んでよい。補強層の形成に用い得る生体適合性ゲルは、上記で詳述したとおりである。

生体適合性ゲルを含む補強層の形成方法は、当該技術分野において公知の方法を用いることができる。かかる方法としては、これに限定するものではないが、例えばシート状細胞培養物状に生体適合性ゲルを噴霧する方法、シート状細胞培養物上にゾル状の生体適合性物質を積層してゲル化する方法、液状のゲルに浸漬したのちゲルを固形化させる方法などのほか、特開 2016-52271 号公報等に記載の方法などが挙げられる。

[0090] 本開示の別の側面は、本開示のシート状細胞培養物を含む、組成物（例えば、医薬組成物等）、移植片および医療製品など（以下、「組成物等」と総称することがある）に関する。

本開示の組成物等は、本開示のシート状細胞培養物に加えて、種々の追加成分、例えば、薬学的に許容し得る担体や、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分、適用臓器の再生に有用な他の有効成分および／または移植片などを含んでいてもよい。かかる追加成分としては、既知の任意のものを使用することができ、当業者はこれらの追加成

分について精通している。また、本開示の組成物等は、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、適用臓器の再生や治癒の促進などに有用な他の有効成分および／または移植片などと併用することができる。

[0091] 本開示の別の側面は、対象において管腔壁の少なくとも片側に損傷部を有する管腔臓器の組織の治癒を促進する方法であって、本開示のシート状細胞培養物または組成物等の有効量を、損傷が存在する部位に対応する管腔壁の反対側に適用することを含む、前記方法（以下、「本開示の治癒促進方法」と称する場合がある）に関する。本開示の治癒促進方法の対象となる組織や疾患、損傷、用いられるシート状細胞培養物などについては、本開示のシート状細胞培養物について記載した箇所において詳述したとおりである。本開示の治癒促進方法においては、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象臓器の治癒の促進に有用な他の有効成分および／または移植片などを、本開示のシート状細胞培養物または組成物等と併用することができる。

[0092] 本開示の別の側面は、対象において管腔壁の少なくとも片側に損傷部を有する管腔臓器の組織を再生する方法であって、本開示のシート状細胞培養物または組成物等の有効量を、損傷が存在する部位に対応する管腔壁の反対側に適用することを含む、前記方法（以下、「本開示の再生方法」と称する場合がある）に関する。本開示の再生方法の対象となる組織や疾患、損傷、用いられるシート状細胞培養物などは、本開示のシート状細胞培養物について記載した箇所において詳述したとおりである。本開示の再生方法においては、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能などを高める成分や、対象臓器の再生に有用な他の有効成分および／または移植片などを、本開示のシート状細胞培養物または組成物等と併用することができる。

[0093] 本開示の治癒促進方法または再生方法は、本開示の製造方法に従って、シート状細胞培養物を製造するステップをさらに含んでもよい。本開示の治癒促進方法または再生方法は、シート状細胞培養物を製造するステップの前に

、対象からシート状細胞培養物を製造するための細胞または細胞の供給源となる組織を採取するステップをさらに含んでもよい。一態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象と同一の個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象とは同種の別個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象とは異種の個体である。

本開示において、用語「対象」は、任意の生物個体、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体を意味する。

[0094] 本開示において、有効量とは、例えば、対象臓器の治癒または再生を促進し得る量（例えば、シート状細胞培養物のサイズや重量、枚数など）であり、好ましくは、対象臓器を治癒または再生できる量である。かかる量は、例えば、マウス、ラット、イヌまたはブタなどの実験動物や疾患モデル動物における試験などにより適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。また、治癒の促進または再生の対象となる臓器の損傷の大きさは、有効量決定のための重要な指標となり得る。

[0095] 適用方法としては、典型的には、管腔壁の内側部に損傷が存在する場合において、かかる損傷部位に対応する管腔壁の外側部に、貼付により適用される。適用の頻度は、典型的には1回の処置につき1回であるが、所望の効果が得られない場合には、複数回適用することも可能である。

[0096] 本開示の別の側面は、対象において管腔臓器の穿孔を予防するための方法であって、本開示のシート状細胞培養物を管腔臓器へ適用するステップを含む、前記方法（以下、「本開示の穿孔予防方法」と称する場合がある）に関する。本開示において「穿孔」とは、貫通損傷の中でも特に、管腔臓器内腔の内容物の漏出を伴うほどの穴が開くことまたは開いた状態をいう。本開示において、「穿孔を予防する」とは、管腔臓器の穿孔を発生するリスクがある箇所において、穿孔の発生を防止することを意味する。本開示において「

穿孔を発生するリスクがある箇所」とは、何の対処もしなければいずれ穿孔を高確率で発生することが医学的に予測される箇所であり、これに限定するものではないが、例えば手術などにより損傷した箇所および潰瘍や腫瘍などの病変部位などが挙げられる。

[0097] 本開示の穿孔予防方法は、特に管腔臓器に外科的処置を施した際に、処置を施した箇所において術後の穿孔が生じるリスクが高まることから、管腔臓器への外科的処置後の術後穿孔を予防するために好適に用いることができる。

かかる外科的処置としては、これに限定するものではないが、例えば開腹手術、内視鏡手術などが挙げられ、好ましくは内視鏡手術、中でもESDやEMRなどの粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層の剥離術が挙げられる。

[0098] 本開示の穿孔予防方法において、シート状細胞培養物は、管腔壁の損傷部または損傷部に対応する反対側に適用される。一態様において、損傷部は外科的処置によって処置を施した箇所に生じた損傷部である。したがって、本開示の穿孔予防方法の好ましい一態様において、適用箇所は外科的処置を施した箇所または外科的処置を施した箇所に対応する反対側である。

適用箇所が外科的処置を施した箇所または外科的処置を施した箇所に対応する反対側である場合、外科的処置、例えば剥離術の施術中に、施術箇所に貫通損傷が生じてもよい。すなわち本開示の穿孔予防方法は、術中の貫通損傷の有無とは関係なく、術後穿孔を予防することが可能であり、例えば外科的処置中に貫通損傷が生じた場合であっても、外科的処置後に穿孔を生じないようにすることができる。従って、本開示の穿孔予防方法において、シート状細胞培養物を適用することにより、ESDなどの外科的処置および術後穿孔によって発生する腹膜炎などの炎症を予防することが可能である。

[0099] 別の一態様において、シート状細胞培養物は、損傷部または損傷部に対応する反対側を全てカバーするように適用される。したがって上述のとおり、損傷部、好ましくは外科的処置を施した箇所に生じた損傷部よりも大きな1

枚のシート状細胞培養物で全てカバーするように適用してもよいし、複数のシート状細胞培養物を隙間なく適用することにより、領域の全てをカバーしてもよい。

[0100] 本開示の一態様において、シート状細胞培養物は、シート状細胞培養物をデリバリするための公知のデリバリデバイスまたは手法により、適用箇所にデリバリされる。かかるデバイスまたは手法は、好ましくは低侵襲的にシート状細胞培養物をデリバリするためのものである。特にシート状細胞培養物のように脆弱な移植片を体内にデリバリするために、種々のデリバリデバイスが開発されており、本開示の方法においては、かかるデリバリデバイスを用いることができる。かかるデリバリデバイスとしては、これに限定するものではないが、例えば特開2008-173333号および特開2009-511号などに記載のデバイスを用い得る。

[0101] 一態様において、かかるデバイスは、基端側から操作部、長尺部、および適用部を有し、適用部にシート状細胞培養物を保持して、適用部と長尺部を体内に挿入して体内にシート状細胞培養物をデリバリし、体外の手元操作部の操作により体内の適用箇所にシート状細胞培養物を適用することができる。

[0102] 本開示の穿孔予防方法は、本開示の製造方法に従って、シート状細胞培養物を製造するステップをさらに含んでもよい。本開示の穿孔予防方法は、シート状細胞培養物を製造するステップの前に、対象からシート状細胞培養物を製造するための細胞または細胞の供給源となる組織を採取するステップをさらに含んでもよい。一態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象と同一の個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象とは同種の別個体である。別の態様において、細胞または細胞の供給源となる組織を採取する対象は、シート状細胞培養物または組成物等の適用を受ける対象とは異種の個体である。

[0103] 上述のとおり、十二指腸ESDは、術中または術後の合併症、典型的には穿孔、を発症するリスクが高く、本開示のシート状細胞培養物は、かかる合併症の発症のリスクを低減することができる。したがって本開示の一側面は、十二指腸の内視鏡的粘膜下層剥離術の合併症発症リスクを低減する方法であって、本開示のシート状細胞培養物を、粘膜下層剥離部位に対応する十二指腸の外壁に適用することを含む、前記方法に関する。

[0104] 本開示の別の側面は、対象において管腔臓器の損傷を治療するための方法（以下、「本開示の損傷治療方法」と称する場合がある）に関する。本開示の損傷治療方法は、以下のステップを含む：

（A）シート状細胞培養物を管腔臓器へ適用するステップ。

[0105] 本開示の損傷治療方法は、任意に本開示のシート状細胞培養物を供するステップを含み得る。かかるステップにおいては、本開示のシート状細胞培養物が製造され、提供される。かかるステップについては、上記本開示のシート状細胞培養物の製造方法において詳述したとおりである。

（A）において、本開示のシート状細胞培養物が、管腔臓器の適用箇所へ適用される。本開示の損傷治療方法において、「適用箇所」は、上述のとおり、損傷部または損傷部に対応する反対側である。「管腔臓器」については、上記で詳述したとおりであるが、好ましくは消化管系の臓器である。消化管系の臓器についても、上記で詳述したとおりである。シート状細胞培養物は、少なくとも1枚提供されるが、複数枚、例えば2枚、3枚、4枚または5枚提供されてもよい。

[0106] 損傷については、上記において詳述したとおりであり、貫通損傷であっても非貫通損傷であってもよいが、好ましくは非貫通損傷である。中でも特に、従来の方法では処置が困難である点で、内腔側に存在する非貫通損傷、すなわち内側のみに存在する損傷が好ましい。

損傷の種類についても特に制限されず、上述したとおりであるが、中でも剥離創が好ましい。特に好ましくは、内腔壁の一部が剥離されて生じる損傷であり、典型的にはESDやEMRなどの剥離術による剥離創挙げられる。

[0107] 別の好ましい一態様において、管腔臓器が十二指腸であり、損傷が貫通損傷である。すなわち本開示の治療方法の好ましい一態様は、十二指腸における貫通損傷を治療する方法である。十二指腸は上述のとおり、管腔壁が薄いため穿孔発生のリスクが高く、また種々の消化液に暴露される厳しい環境にあるために損傷の悪化が進行しやすく損傷の処置も困難であるが、本開示の治療方法であれば、十二指腸の貫通損傷も好適に処置することが可能である。

[0108] かかる態様において、貫通損傷は、剥離創などの非貫通損傷や潰瘍などの病変が悪化して生じた貫通損傷であってもよいし、剥離術などの施術中に生じた裂孔であってもよい。本態様の治療方法においては、本開示のシート状細胞培養物を適用箇所に応用する前に、任意に貫通損傷を縫合するステップを含んでよい。

[0109] 別の一態様において、シート状細胞培養物は、適用箇所を全てカバーするように適用される。上述のとおり、シート状細胞培養物は少なくとも1枚提供されるが、1枚の大きなシート状細胞培養物により適用箇所すべてをカバーしてもよいし、複数枚のシート状細胞培養物を適用することにより、全体で適用箇所を全てカバーしてもよい。

[0110] 本開示のシート状細胞培養物は、フィブリンゲルなどの生体適合性ゲルを含む補強層を有する。補強層は、シート状細胞培養物の製造後、すなわちステップ（A）の前に形成されてもよいし、シート状細胞培養物の適用後、すなわちステップ（A）の後に形成されてもよい。生体適合性ゲルを含む補強層の形成方法については、上記で詳述したとおりである。

[0111] 本側面の方法は、ステップ（A）の前または後に、さらに（A'）再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片を適用するステップを含んでもよい。「再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片」については、上記で詳述したとおりである。

かかる組成物および／または移植片を適用するステップは、ステップ（A）の前に実施されても後に実施されてもよい。（A）の前に実施される場合

、再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片は、適用箇所直接適用され、その上から本開示のシート状細胞培養物が適用される。（A）の後に実施される場合、適用されたシート状細胞培養物の上から、再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片が適用される。また、シート状細胞培養物は任意に補強層を有し得るが、この場合再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片を適用する前に補強層を形成してもよいし、再生および／または治癒を促進する他の組成物および／または移植片を適用後、その上から生体適合性ゲルを噴霧するなどにより、補強層を形成してもよい。

[0112] 本開示のシート状細胞培養物を適用箇所に適用する場合、当該技術分野において知られたデリバリデバイスおよび／または手法を用いて適用箇所にデリバリされる。かかるデリバリデバイスについては、上記穿孔予防方法において詳述したとおりである。

[0113] 本開示の別の一側面は、管腔臓器の外科的処置において、処置後の管腔臓器の状態を改善する方法（以下、「本開示の改善方法」と称する場合があります）に関する。本開示のシート状細胞培養物を外科的処置の施術箇所または施術箇所に対応する反対側に適用することにより、外科的処置を施された後の管腔臓器の状態を、適用しない場合と比較して改善することが可能である。本開示において、「外科的処置後の管腔臓器の状態を改善する」とは、外科的処置に起因する管腔臓器の状態を、本開示の方法を用いない場合と比較して良好にすることを意味し、典型的には、外科的処置後の施術箇所における合併症のリスクを低減させること、施術箇所の組織を正常化することなどが挙げられる。合併症としては、これに限定するものではないが、例えば管腔臓器の癒着、穿孔の発生などが挙げられる。組織の正常化としては、例えば施術箇所の組織の再生、施術箇所の組織の連続性の確保などが挙げられる。

[0114] したがって本開示の改善方法の好ましい一態様は、管腔臓器の外科的処置において、処置後の施術箇所の癒着を防止する方法に関する。また、別の好ましい一態様は、管腔臓器の外科的処置において、施術箇所の組織、例えば

潰瘍底の連続性を保つ方法に関する。

本開示の改善方法において、シート状細胞培養物や適用方法などの詳細については、上記各側面において詳述したとおりである。

[0115] 本開示の別の側面は、管腔壁表面の疾患部を処置する方法（以下、「本開示の疾患処置方法」と称する場合がある）に関する。

本開示の疾患処置方法は、以下を含む：

(a) 管腔壁表面の疾患部を剥離するステップ、および

(b) シート状細胞培養物を、ステップ (a) において剥離した部分または剥離部分に対応する反対側に適用するステップ。

[0116] (a) において、管腔壁表面の疾患部が剥離される。本開示において「管腔壁表面」とは、管腔壁の片側の外部に露出した部分をいい、典型的には例えば、消化管壁における粘膜層部分などを意味する。本開示の疾患処置方法で処置できる疾患は、管腔臓器の表面に生じる疾患であれば特に制限されず、例えばがんなどの腫瘍、潰瘍、炎症などが挙げられるが、好適な処置方法として物理的除去が挙げられる点で、腫瘍または潰瘍が好ましい。本開示において、「腫瘍」は、良性腫瘍および悪性腫瘍（がん、悪性新生物）を含む。がんは、上皮性の悪性腫瘍（癌）と非上皮性の悪性腫瘍（肉腫）とを含む。本開示の疾患処置方法における管腔臓器は、上記各側面において詳述したとおりであり、したがって好ましい一態様において、本開示の疾患処置方法において処置される疾患は、消化管のがんである。かかる態様において、がんは消化管内壁の粘膜層に止まるがんであることが好ましい。本開示において、「炎症」は、例えば腹腔内に漏れた膵液や胆汁が消化液と混じることによって活性化されて引き起こされる炎症を意味し、典型的には、消化管の外科的処置および処置後の消化管穿孔により発生した腹膜炎を含む。かかる炎症は、典型的にはC反応性タンパク（CRP）の誘導などの炎症反応を引き起こす、血漿中のTNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカインの発現の増加を伴っており、これらの増減を検討することにより炎症の有無を調査することができる。

[0117] 疾患部の剥離は、当該技術分野において公知の方法を用いてよい。例えば消化管のがんである場合、消化管内壁の疾患部、好ましくは粘膜層（すなわち粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層）を剥離して除去する。消化管内壁の剥離方法としては、これに限定するものではないが、例えば内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）、内視鏡的粘膜切開術（EMR）、ポリペクトミーなど、管腔壁内側の剥離により疾患を除去する方法が挙げられる。好ましい一態様において、疾患部の剥離は内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）により行われる。疾患部の剥離による剥離創は、貫通損傷であっても非貫通損傷であってもよいが、好ましくは非貫通損傷である。貫通損傷である場合、（b）の前に貫通損傷を縫合するステップをさらに含んでもよい。

[0118] （b）において、本開示のシート状細胞培養物が剥離した部分または剥離部分に対応する反対側（以下、本開示の疾患処置方法において「適用箇所」という場合がある）に適用される。本開示の疾患方法におけるシート状細胞培養物、適用方法などについては、上記本開示の各側面において詳述したとおりである。

実施例

[0119] 本開示を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これは本開示の特定の具体例を示すものであり、本開示はこれらに限定されるものではない。

[0120] 例1. シート状細胞培養物の作製

（1）シート状ブタ骨格筋芽細胞培養物

ブタの下肢の横紋筋を全身麻酔下に採取し、採取した組織をコラゲナーゼとトリプシンを含む酵素消化液で処理して単一の細胞に分散させた。かかる細胞を、37℃、5%CO₂の条件下で、15%FBS含有MCDB131培地でコンフルエントになるまで培養し、細胞を回収した。回収した細胞は60mmの温度応答性培養皿（UpCell^(R)、セルシード製）に2.2×10⁷個播種し、20%FBS含有DMEM/F12培地中で12時間培養した。その後20℃まで温度を下げることでシート状細胞培養物を培養皿から剥離して回収した。かかるシート状細胞培養物にフィブリンゲルで補強層を形成し

た。

フィブリンゲルで補強層を形成する前および形成後のシート状ブタ骨格筋芽細胞培養物を、ヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的解析を行った（図1AおよびB）。

[0121] (2) シート状ブタ脂肪由来間葉系幹細胞培養物

脂肪由来間葉系幹細胞のシート状細胞培養物は、WO2017/130802の実施例1-1に記載された方法を用いて作製した。得られたシート状ブタ脂肪由来間葉系幹細胞培養物を、ヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的解析を行った（図1C）。

[0122] 例2. 十二指腸ESDブタモデルの作成

例1(1)で横紋筋を採取したブタに対し、全身麻酔下で十二指腸ESDを施行し、シート処置群(n=5)とした。また、対照のブタにも同様に全身麻酔下で十二指腸ESDを施行し、対照群(n=7)とした。すなわち、十二指腸ESDとして、ブタの十二指腸の内腔表面の一部を剥離した。シート処置群のブタのESD施術箇所(十二指腸の内腔表面の剥離箇所)にあたる箇所の十二指腸の外側の漿膜面に、内腔表面の剥離箇所をすべて覆うように例1(1)で作成したシート状骨格筋芽細胞培養物を貼付(適用)した。さらに、貼付したシート状骨格筋芽細胞培養物の上(外側)から内腔表面の剥離箇所をすべて覆うように有茎大網片で被覆した。シート処置群のうち、2例は術後14日目に、残りは術後3日目に再度全身麻酔下に開腹し、十二指腸ESD施術箇所を観察した後、組織を摘出した。対照群では、十二指腸の内腔表面の剥離箇所の管腔臓器外表面にシート状骨格筋芽細胞培養物を貼付せず、有茎大網片による被覆のみを行った。対照群のうち1例は術後1日目に、別の1例は術後2日目に、残りは術後3日目に再度全身麻酔下に開腹し、十二指腸ESD施術箇所を観察した後、組織を摘出した。穿孔性腹膜炎の有無、癒着スコア、組織学的治癒状況を対照群と比較した。

[0123] 結果を下表および図3~6に示す。

[表1]

		潰瘍径 (cm)	術中穿孔	シート (cm/枚)	大網 被膜	術後 穿孔	摘出時期	癒着 スコア
対照群	1	1.5	なし	—	あり	あり	術後3日	2
	2	1.5	major	—	あり	あり	術後1日	2
	3	1.0	major	—	あり	なし ^{*1}	術後3日	3
	4	1.5	なし	—	あり	あり	術後2日	3
	5	1.5	なし	—	あり	あり	術後3日	2
	6	1.5	micro	—	あり	micro	術後3日	2
	7	1.5	micro	—	あり	あり	術後3日	3
シート 処置群	1	1.5	micro	1.5/2	あり	なし	術後3日	0
	2	1.5	micro	2.5/1	あり	なし	術後3日	1
	3	1.5	micro	2.8/1	あり	なし	術後3日	1
	4	1.5	major	2.5/2	あり	なし	術後14日	3
	5	2	なし	2.5/1	あり	なし	術後14日	3

* micro はエアリークが観察される程度の微小穿孔、major は内容物のリークが観察される穿孔

*1 潰瘍壊死が観察された

癒着スコア 0:癒着なし、1:軽微な癒着

2:鈍的剥離が必要な癒着、3:鋭的剥離が必要な癒着

[0124] 対照群1では、ESDの術中穿孔は見られなかったものの、術後3日目に確認した段階では術後穿孔が確認でき、胆汁の漏出が認められた。また周囲小腸との癒着も認められた。ESD施術箇所の組織染色像でも潰瘍庭の連続性が消失していることが確認された(図3A)。

対照群2では、ESDの術中の穿孔が認められており、施術後の状態が悪かったため、術後1日目に施術箇所の確認及び組織摘出を行った。施術箇所には穿孔が確認でき、胆汁漏出および周囲小腸との癒着も認められた。ESD施術箇所の組織染色像でも潰瘍庭の連続性が消失していることが確認された(図3B)。

[0125] シート処置群1では、ESDの術中に施術箇所からのエアリークが認められ、わずかな穿孔があるものと考えられた。施術箇所に対応する箇所の漿膜側に、フィブリンゲルで補強した直径1.5cmの骨格筋芽細胞シートを2枚貼付し、その後大網を被覆した。術後3日目に確認したところ、穿孔、癒着共に認められなかった。組織染色像でも潰瘍庭の連続性が保たれているこ

とが確認できた（図4 A、B）。

シート処置群2では、ESDの術中に施術箇所からのエアリークが認められ、わずかな穿孔があるものと考えられた。施術箇所に対応する箇所の漿膜側に、フィブリンゲルで補強した直径2.5cmの骨格筋芽細胞シートを1枚貼付し、その後大網を被覆した。術後3日目に確認したところ、穿孔は認められなかったが、周囲小腸と鈍的剥離可能な癒着が認められた。組織染色像でも潰瘍庭の連続性が保たれていることが確認できた（図4 C、D）。

シート処置群3では、ESDの術中に施術箇所（図Eの矢印で示される箇所）からのエアリークが認められ、わずかな穿孔があるものと考えられた。施術箇所に対応する箇所の漿膜側に、フィブリンゲルで補強した直径2.8cmの骨格筋芽細胞シートを1枚貼付し、その後大網を被覆した。術後3日目に確認したところ、穿孔、癒着共に認められなかった。組織染色像でも潰瘍庭の連続性が保たれていることが確認でき、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により炎症細胞の遊走が確認でき、デスミン染色により筋芽細胞シートの生着が確認された（図4 E、F）。

シート処置群4では、ESDの術中に施術箇所（図G、Hの矢印で示される箇所）からのエアリークが認められ、わずかな穿孔があるものと考えられた。施術箇所に対応する箇所の漿膜側に、フィブリンゲルで補強した直径2.5cmの骨格筋芽細胞シートを2枚貼付し、その後大網を被覆した。術後14日目に確認したところ、膠原繊維の増生と壁肥厚が認められ、潰瘍は癒着痕化した。従って、シートを貼って孔をふさぐことにより、ESDにより薄くなった組織の部分に細胞を呼び込んで厚くなっており、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色およびアザン染色により筋芽細胞シートが生着していることが理解された（図4 G、H）。

シート処置群5では、ESDの術中に施術箇所からのエアリークが認められず、穿孔がないものと考えられた。施術箇所に対応する箇所の漿膜側に、フィブリンゲルで補強した直径2.5cmの骨格筋芽細胞シートを1枚貼付し、その後大網を被覆した。術後14日目に確認したところ、膠原繊維の増

生と壁肥厚が認められ、潰瘍は瘢痕化した。従って、シートを貼って孔をふさぐことにより、ESDにより薄くなった組織の部分に細胞を呼び込んで厚くなっていることが理解された。

[0126] 穿孔性腹膜炎（炎症反応）の有無については、以下のとおり検討した。

炎症反応の推移はC反応性タンパク（CRP）およびTNF- α の発現の増減により測定した。

詳細には、ブタの血液を移植時（day 0）、移植後1日（day 1）、移植後3日（day 3）で採取して、遠心分離にて血清を得た。市販のCRPおよびTNF- α 測定ELISAキットでそれらの血清中に含まれるCRPおよびTNF- α 濃度を測定した。その結果を図6に示す。図6に示す通り、シート移植群ではコントロール群と比べて、炎症性マーカーであるCRPやTNF- α が下がっていることが分かる。

従って、対照群では、孔が開いて液が漏れて炎症が生じていたが、シート処置群では、シートを貼付したことにより液漏れによる炎症を予防することができた（図6）。

符号の説明

- [0127]
- 1 1 粘膜
 - 1 2 粘膜下層（ブルネル腺）
 - 2 0 筋層

請求の範囲

- [請求項1] 管腔壁の少なくとも片側に損傷部を有する管腔臓器の治癒を促進させるためのシート状細胞培養物であって、該シート状細胞培養物は、損傷が存在する部位に対応する管腔壁の反対側に適用されることを特徴とする、前記シート状細胞培養物。
- [請求項2] 損傷が、管腔壁の内側部にあり、シート状細胞培養物が、管腔壁の対応する外側部に適用されるか、または損傷が、管腔壁の外側部にあり、シート状細胞培養物が、管腔壁の対応する内側部に適用される、請求項1に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項3] 損傷が、貫通損傷または非貫通損傷である、請求項1に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項4] 管腔臓器が、消化管系の臓器である、請求項1～3のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項5] 損傷が、管腔壁の表面組織の剥離によるものである、請求項1～4のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項6] さらにゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項7] 有茎血管とともに適用されることを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項8] 50～500 μ mの厚みを有する、請求項1～7のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項9] 約 7.1×10^5 個/cm²～約 3.0×10^6 個/cm²の播種密度の細胞集団を含有する、請求項1～8のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項10] 外科的処置および／または外科的処置により生じる穿孔により発生する炎症を予防するための、請求項1～9のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項11] 外科的処置後の管腔臓器の穿孔を予防するための方法であって、シ

シート状細胞培養物を管腔臓器へ適用するステップを含み、該シート状細胞培養物は、処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側に適用される、前記方法。

[請求項12] 外科的処置が、管腔臓器の粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層の剥離である、請求項11に記載の方法。

[請求項13] シート状細胞培養物が、処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側を全てカバーするように適用される、請求項11または12に記載の方法。

[請求項14] シート状細胞培養物が、デリバリデバイスにより処置を施した箇所または処置を施した箇所に対応する反対側にデリバリされる、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

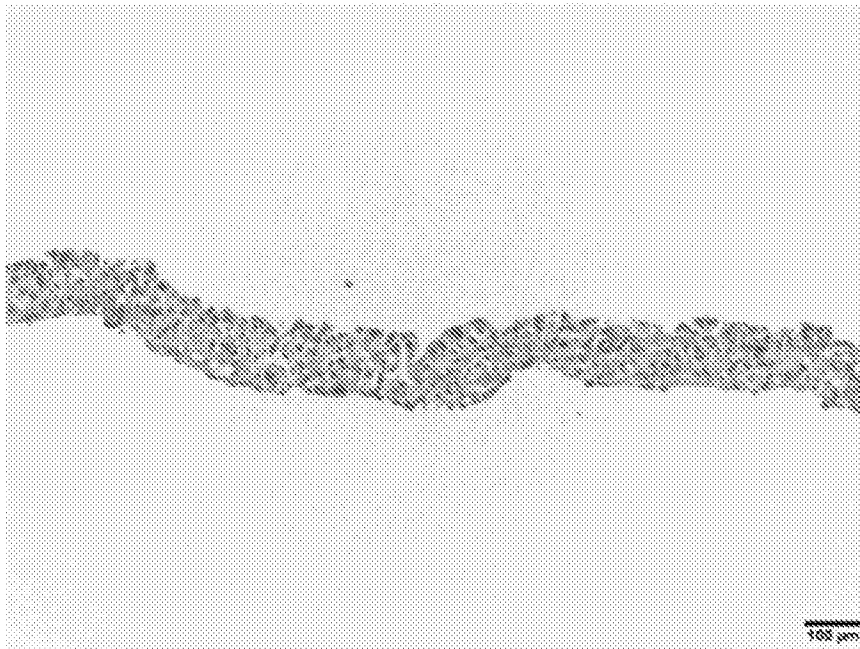
[請求項15] 管腔壁表面の疾患部を処置するための方法であって、
(a) 管腔壁表面の疾患部を剥離するステップ
(b) シート状細胞培養物を、ステップ(a)において剥離した部分または剥離部分に対応する反対側に適用するステップ、
を含む、前記方法。

[請求項16] 疾患が、がんである、請求項15に記載の方法。

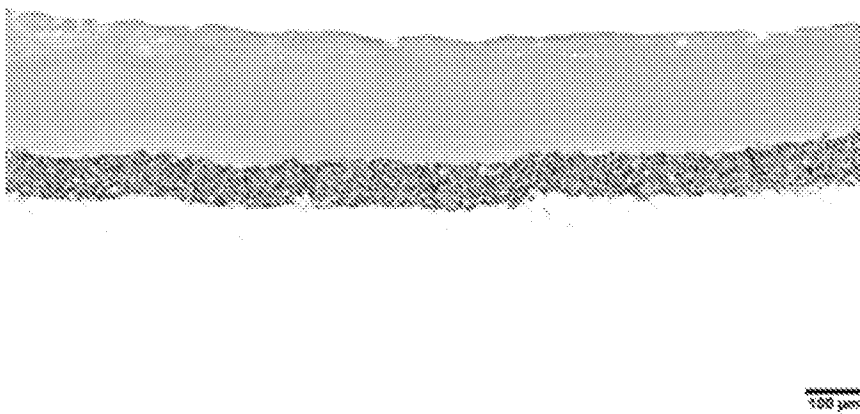
[請求項17] 管腔壁表面の疾患部の剥離が、疾患部を有する粘膜、粘膜筋板および／または粘膜下層の剥離である、請求項15または16に記載の方法。

[図1]

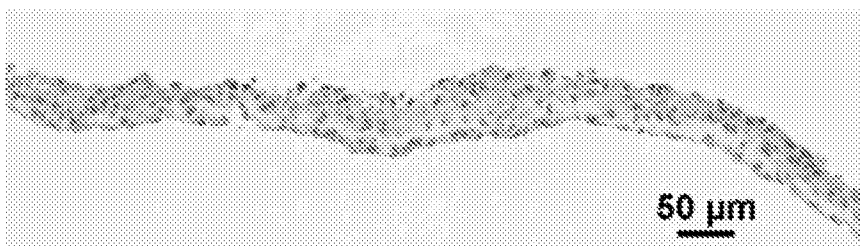
A



B

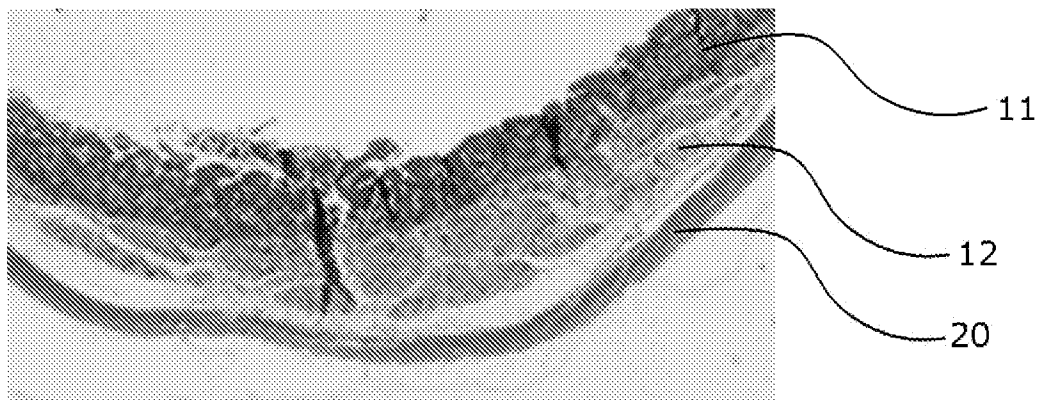


C

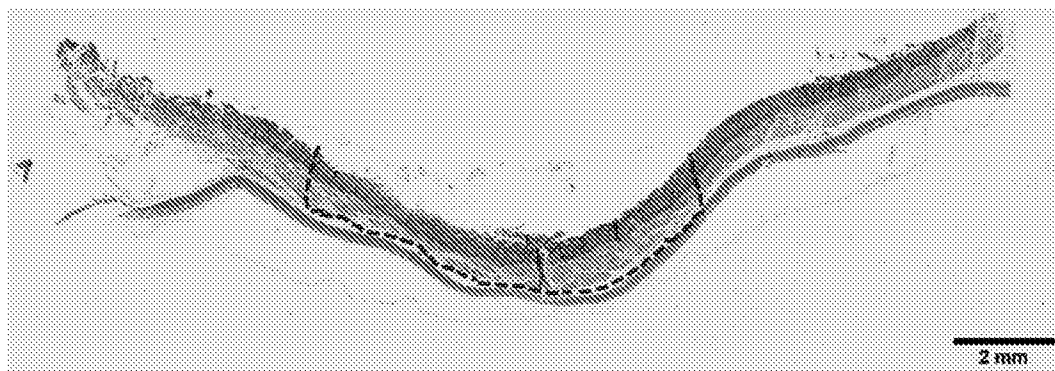


[図2]

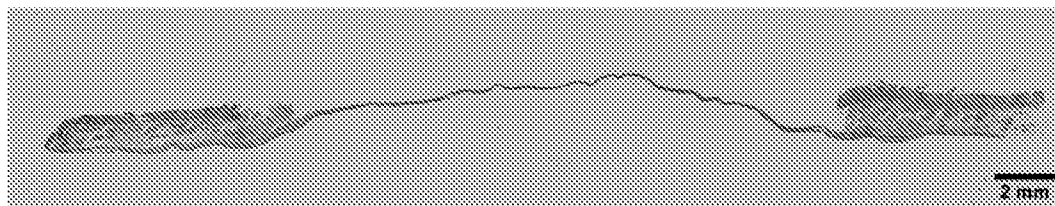
A



B

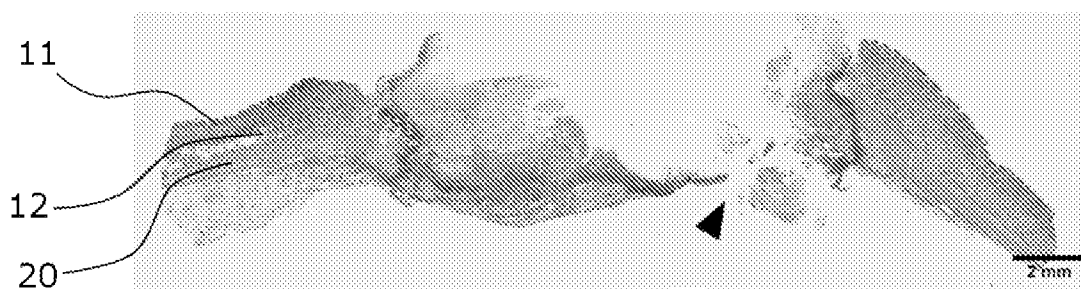


C

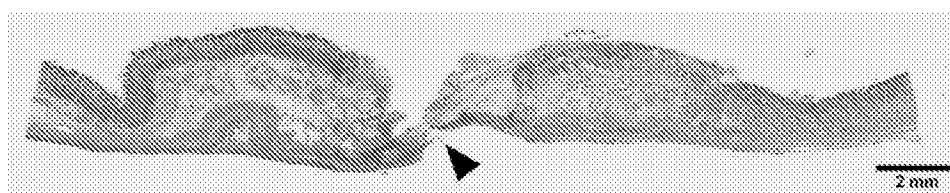


[図3]

A



B

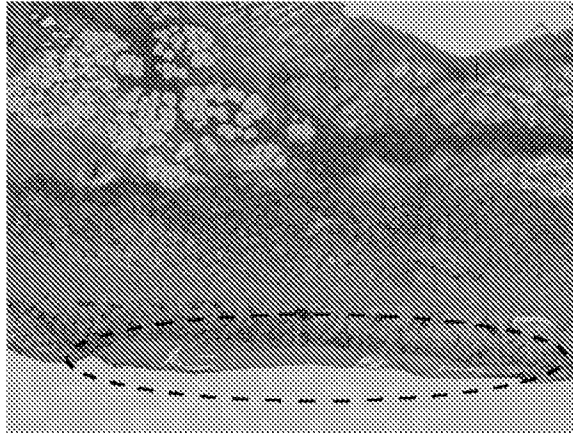


[図4-1]

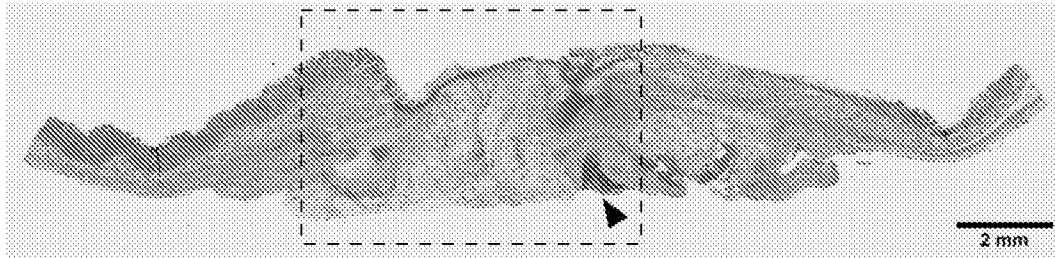
A



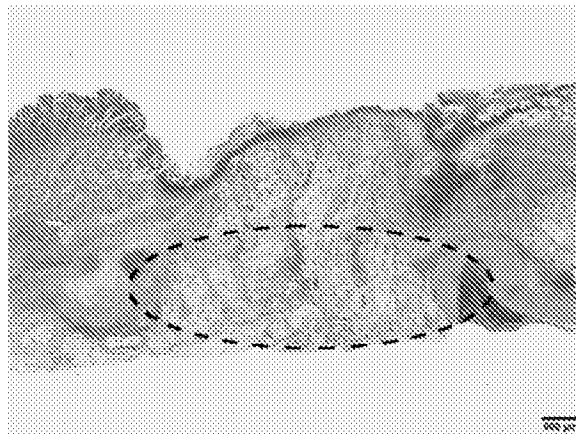
B



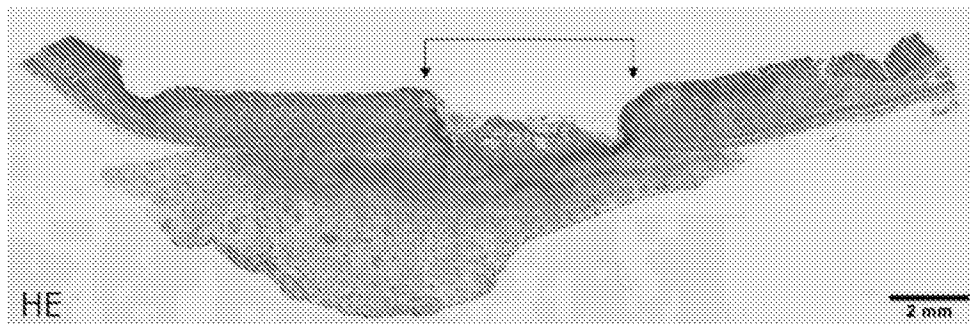
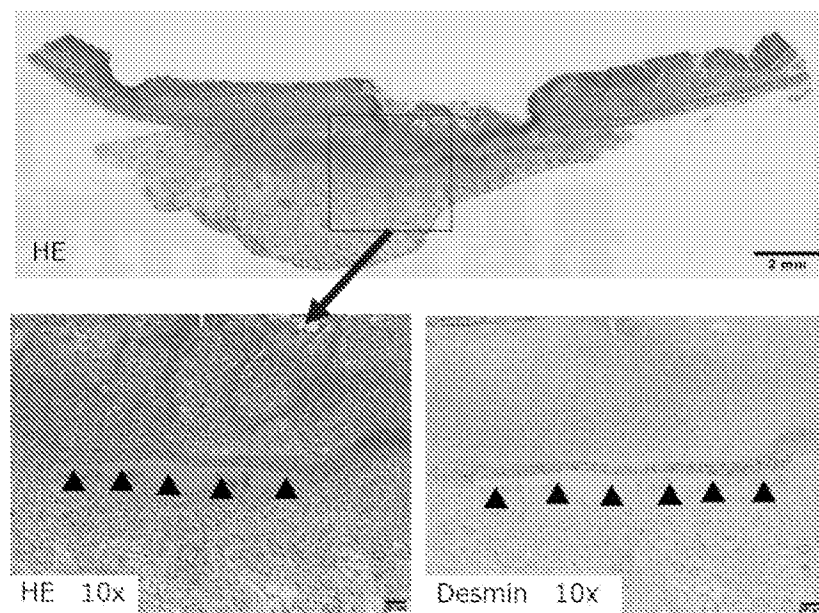
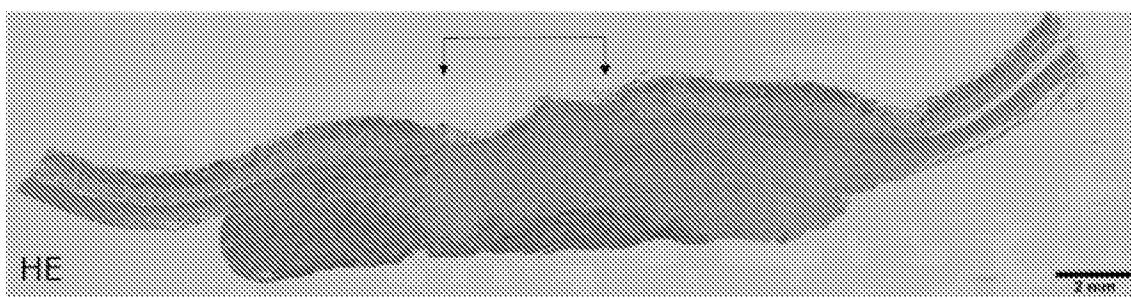
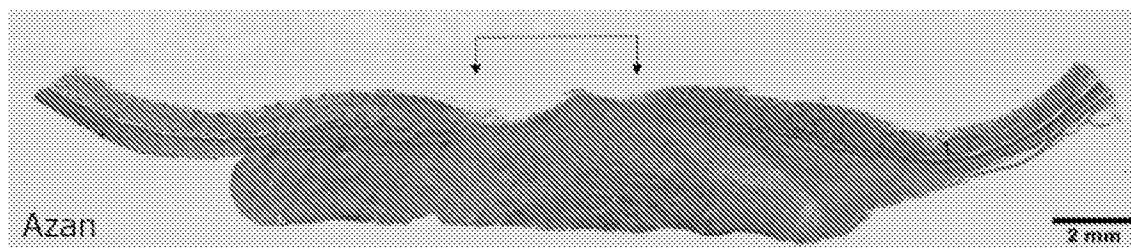
C



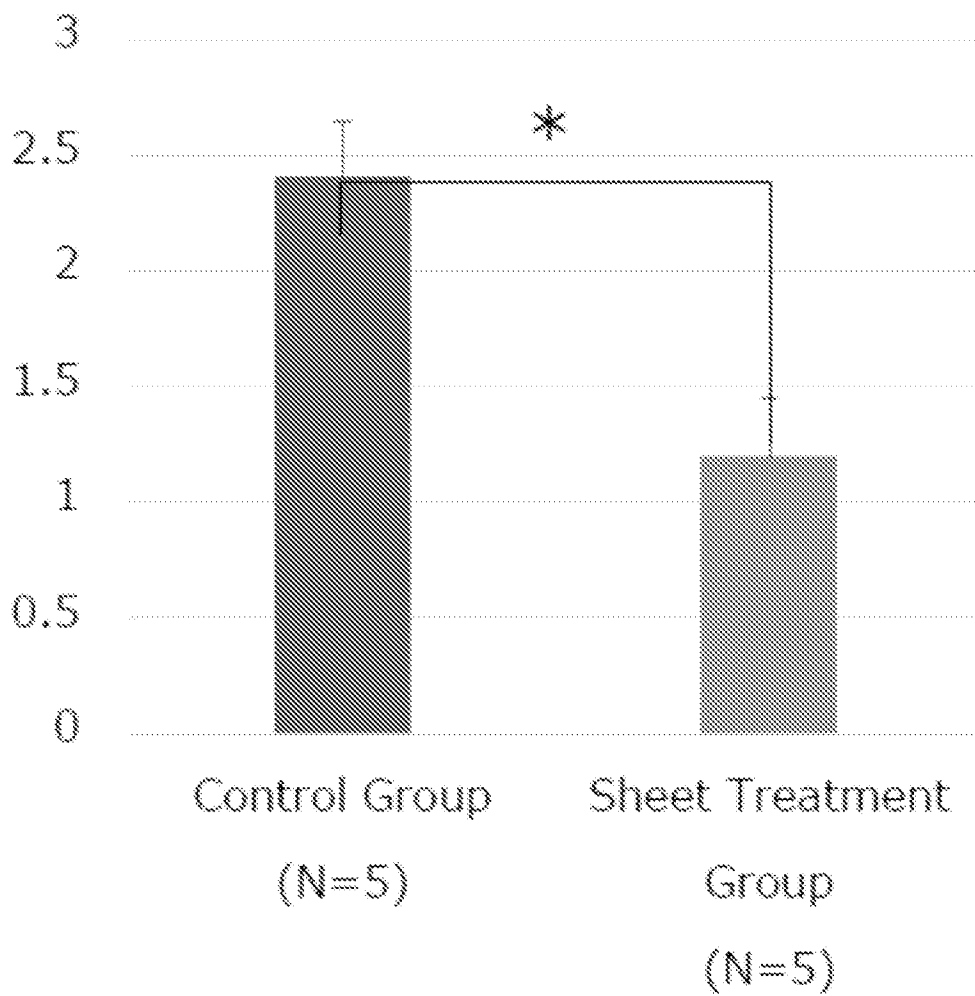
D



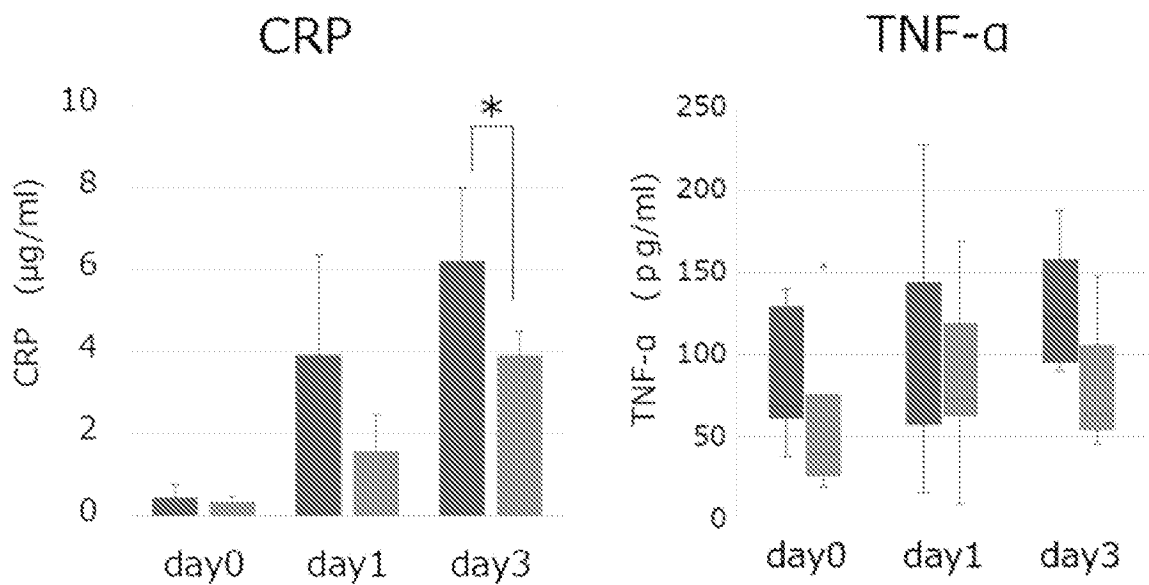
[図4-2]

E**F****G****H**

[図5]

* $p < 0.05$

[図6]

Control Group
(n=5)Sheet Treatment
Group (n=5)* $p < 0.05$
ELISA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/029479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61L27/38 (2006.01) i, A61L27/18 (2006.01) i, A61L27/22 (2006.01) i,
 A61L27/24 (2006.01) i, A61L27/36 (2006.01) i, A61L27/40 (2006.01) i,
 A61L27/52 (2006.01) i, C12N5/071 (2010.01) n, C12N5/077 (2010.01) n

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)

Int.Cl. A61L27/38, A61L27/18, A61L27/22, A61L27/24, A61L27/36,
 A61L27/40, A61L27/52, C12N5/071, C12N5/077

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-528755 A (CARDIO INCORPORATED) 18 October 2007, claims, paragraph [0038], example 3, etc. & US 2007/0092492 A1, claims, paragraph [0139], example 3 & WO 2005/011524 A1 & EP 1659979 A1	1-5, 7-10
Y		6-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 10 October 2019 (10.10.2019)	Date of mailing of the international search report 21 October 2019 (21.10.2019)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/029479

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TANAKA, S. et al., "Cell sheet technology for the regeneration of gastrointestinal tissue using a novel gastric perforation rat model:", Surg Today, 2017, vol. 47, p. 114-21, ISSN 0941-1291, abstract, materials and methods, discussion, etc.	1-5,7-17 6-10
X Y	JP 2016-52271 A (TERUMO CORP.) 14 April 2016, claims, paragraphs [0004], [0007], [0008], examples, etc. & US 2016/0058908 A1, claims, paragraphs [0006]-[0009], examples	1-10 6-10
Y	WO 2010/016469 A1 (SHOWA UNIVERSITY) 11 February 2010, claims, paragraph [0100], examples, etc. & US 2011/0263017 A1, claims, paragraph [0637], examples & EP 2322604 A1	7-10
X Y	TANAKA, T. et al., "Development of a novel rat model with pancreatic fistula and the prevention of this complication using tissue-engineered myoblast sheets", J Gastroenterol, 2013, vol. 48, p. 1081-9, ISSN 0944-1174, abstract, etc.	1-5,7-10 6-10
X Y	WO 2017/130802 A1 (TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY) 03 August 2017, claims, examples, etc. & US 2019/0054123 A, claims, examples	1-5,7-10 6-10
X Y	MARUYA, Y. et al., "Autologous adipose-derived stem cell sheets enhance the strength of intestinal anastomosis", Regen Ther, 2017, vol. 7, pp. 24-33, ISSN 2352-3204, abstract, etc.	1-5,7-10 6-10
X Y	堺裕輔, 外 名, 細胞シートによる消化器の創傷治癒と機能性臓器の作製, 膜, March 2018, vol. 43, p. 34-9, ISSN 0385-1036, entire text, (SAKAI, Yusuke et al., "Tissue Repair Promotion and Functional Tissue Fabrication of Digestive Organ by Cell Sheets", MEMBRANE)	1-5,7-10 6-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/029479

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>松本亮, 外 9 名, 十二指腸粘膜剥離モデルを用いた自家筋芽細胞シート移植による術後穿孔予防効果, 第 18 回日本再生医療学会総会プログラム抄録, 22 February 2019, p. 631, column "P-02-114", entire text, non-official translation (MATSUMOTO, Akira et al., "Postoperative perforation prevention effect by implantation of autologous myoblast sheet using a duodenal mucosal separation model", Programs and abstracts of 18th general meeting of the Japanese Society for Regenerative Medicine)</p>	1-17
P, X	<p>金高賢伍, 外 7 名, 早期十二指腸癌に対する自己筋芽細胞シート医療の開発, 第 18 回日本再生医療学会総会プログラム抄録, 22 February 2019, p. 51, column "SY-10-4", entire text, non-official translation (KANETAKA, Kengo et al., "Development of medical care of autologous myoblast sheet for early duodenal cancer", Programs and abstracts of 18th general meeting of the Japanese Society for Regenerative Medicine)</p>	1-17
P, X	<p>松本亮, 外 9 名, 消化管術後穿孔予防を目的とした自己筋芽細胞シート移植法のための大動物を用いた前臨床試験, 第 119 回日本外科学会定期学術集会抄録集, April 2019, p. 1198, column "SF-035-1", entire text, non-official translation (MATSUMOTO, Akira et al., "A preclinical study using large animals for a method of implantation of autologous myoblast sheet to prevent perforation after alimentary tract surgery", Abstracts of the 119th Annual Congress of Japan Surgical Society)</p>	1-17

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. A61L27/38(2006.01)i, A61L27/18(2006.01)i, A61L27/22(2006.01)i, A61L27/24(2006.01)i, A61L27/36(2006.01)i, A61L27/40(2006.01)i, A61L27/52(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)n, C12N5/077(2010.01)n</p>			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. A61L27/38, A61L27/18, A61L27/22, A61L27/24, A61L27/36, A61L27/40, A61L27/52, C12N5/071, C12N5/077</p>			
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年</p>			
<p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			
<p>C. 関連すると認められる文献</p>			
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	
X Y	JP 2007-528755 A (株式会社カルディオ) 2007.10.18, 特許請求の範囲、段落 0038、実施例 3、等 & US 2007/0092492 A1, Claims、[0139]、Example 3 & WO 2005/011524 A1 & EP 1659979 A1	1-5, 7-10 6-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>10.10.2019</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>21.10.2019</p>	
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>伊藤 基章</p>	<p>4U 4146</p>
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>	

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
X Y	TANAKA, S. et al., Cell sheet technology for the regeneration of gastrointestinal tissue using a novel gastric perforation rat model, Surg Today, 2017, Vol.47, p.114-21, ISSN 0941-1291, Abstract、Materials and methods、Discussion、等	1-5, 7-17 6-10
X Y	JP 2016-52271 A (テルモ株式会社) 2016.04.14, 特許請求の範囲、段落 0004、0007、0008、実施例、等 & US 2016/0058908 A1, Claims、[0006]-[0009]、Examples	1-10 6-10
Y	WO 2010/016469 A1 (学校法人昭和大学) 2010.02.11, 特許請求の範囲、[0100]、実施例、等 & US 2011/0263017 A1, Claims、[0637]、Examples & EP 2322604 A1	7-10
X Y	TANAKA, T. et al., Development of a novel rat model with pancreatic fistula and the prevention of this complication using tissue-engineered myoblast sheets, J Gastroenterol, 2013, Vol.48, p.1081-9, ISSN 0944-1174, Abstract、等	1-5, 7-10 6-10
X Y	WO 2017/130802 A1 (学校法人東京女子医科大学) 2017.08.03, 特許請求の範囲、実施例、等 & US 2019/0054123 A1, Claims、Examples	1-5, 7-10 6-10
X Y	MARUYA, Y. et al., Autologous adipose-derived stem cell sheets enhance the strength of intestinal anastomosis, Regen Ther, 2017, Vol.7, p.24-33, ISSN 2352-3204, Abstract、等	1-5, 7-10 6-10
X Y	堺裕輔, 外1名, 細胞シートによる消化器の創傷治癒と機能性臓器の作製, 膜, 2018.03, Vol.43, p.34-9, ISSN 0385-1036, 全文	1-5, 7-10 6-10

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
P, X	松本亮, 外 9 名, 十二指腸粘膜剥離モデルを用いた自家筋芽細胞シート移植による術 後穿孔予防効果, 第 18 回日本再生医療学会総会 プログラム抄録, 2019. 02. 22, p. 631, P-02-114 欄、全文	1-17
P, X	金高賢伍, 外 7 名, 早期十二指腸癌に対する自己筋芽細胞シート医療の開発, 第 18 回日本再生医療学会総会 プログラム抄録, 2019. 02. 22, p. 51, SY-10-4 欄、全文	1-17
P, X	松本亮, 外 9 名, 消化管術後穿孔予防を目的とした自己筋芽細胞シート移植法のため の大動物を用いた前臨床試験, 第 119 回日本外科学会定期学術集会 抄録集, 2019. 04, p. 1198, SF-035-1 欄、全文	1-17