

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年10月13日(2005.10.13)

【公開番号】特開2003-24056(P2003-24056A)

【公開日】平成15年1月28日(2003.1.28)

【出願番号】特願2002-166169(P2002-166169)

【国際特許分類第7版】

C 12 N 5/06

C 12 M 1/00

【F I】

C 12 N 5/00 E

C 12 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月6日(2005.6.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 すぐに使用できる均一に分散した細胞外マトリックスを基材に提供する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 すぐに使用できる(ready-to-use)均一に分散した細胞外マトリックスを基材に提供する方法であつて、

- a) 細胞外マトリックス成分を基材面に塗布すること、
- b) 前記細胞外マトリックス成分を、前記基材面上でインキュベートして重合させること、
- c) 前記重合した細胞外マトリックス成分を、前記基材面上で凍結させること、
- d) 前記凍結させた細胞外マトリックス成分を、前記基材面上で凍結乾燥すること、
- e) 前記凍結乾燥された細胞外マトリックスの温度を室温まで上昇させることを含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記細胞外マトリックス成分を、前記細胞外マトリックスがゲルを形成するのに十分な時間インキュベートすることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記細胞外マトリックス成分を、高温でインキュベートすることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記細胞外マトリックス成分を、約37℃の温度でインキュベートすることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記細胞外マトリックス成分を、二酸化炭素の存在下でインキュベートすることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記二酸化炭素の濃度が5%であることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記重合した細胞外マトリックスを、凍結乾燥機中で凍結させることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記重合した細胞外マトリックスを、-30℃より低温で凍結させることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記細胞外マトリックス成分が、天然のコラーゲン原纖維を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】 前記細胞外マトリックス成分が、さらにラミニン、エンタクチン( *e n t a c t i n* )、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、増殖因子、プロテイナーゼ、およびそれらの組合せからなる群から選択される成分を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記基材が、多孔膜、エッチング( *e t c h e d* )膜、キャスト( *c a s t* )膜、およびそれらの組合せからなる群から選択される膜材料であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】 前記膜が、インサートメンブレン表面  $1 \text{ cm}^2$  当たり約 0.5 から約 30  $\mu\text{g}$  の膜孔を有することを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 前記基材が、セルロース膜、多孔性ポリカーボネート、多孔性ポリテトラフルオロエチレン、ナイロン膜およびメッシュ、ガラスフィルター、多孔性ポリエチレンテレフタラート、ポリメチルベンタン、ポリプロピレン、ポリエチレンおよびそれらの組合せからなる群から選択される天然または合成重合体を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】 細胞増殖を目的とした表面を含む細胞培養装置であって、前記表面が細胞外マトリックスでコートされ、前記マトリックスが、

- a) 細胞外マトリックス成分を基材面に塗布すること、
  - b) 前記細胞外マトリックス成分を、前記基材面上でインキュベートして重合させること、
  - c) 前記重合した細胞外マトリックスを前記基材面上で凍結させること、
  - d) 前記凍結させた細胞外マトリックスを前記基材面上で凍結乾燥させること、
  - e) 前記凍結乾燥させた細胞外マトリックスの温度を室温まで上昇させること
- を含む諸ステップによって形成されることを特徴とする、細胞培養装置。

【請求項 15】 前記装置がさらに増殖培地を含むことを特徴とする、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 16】 前記培地が D M E M であることを特徴とする、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】 前記培養装置がさらに細胞、抗体、酵素、受容体、増殖因子、細胞外マトリックスの追加の成分、サイトカイン、ホルモン、薬剤、およびそれらの組合せからなる群から選択される追加の材料を含むことを特徴とする、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 18】 細胞をその上で増殖させるようになされた表面、および前記表面をコートする細胞外マトリックスを含み、前記マトリックスコーティングが生理活性タンパク質溶液の重合生成物を含み、前記マトリックス中にある流体が凍結乾燥によって実質上取り除かることを特徴とする細胞培養装置。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は一般に、独特の細胞培養用培地を提供する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、基材に付着した、均一に分散した細胞外マトリックスを含む細胞培養装置から流体を抜き取る方法に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

細胞と細胞の間にある纖維状および球状タンパク質の網状構造は、細胞外マトリックス( E C M )と呼ばれる。E C M は、細胞環境にとって不可欠な成分である。細胞間質( *i n t e r s t i t i a l m a t r i x* )および基底膜を形成するために、様々な E C M 成分が細胞によって分泌され、細胞は *i n v i v o* でこの骨格につなぎとめられている。これらの構造により、組織特有の組織像の構築および発達に必要な空間配置と安定性がもたらされる。しかし、E C M は、単なる不活性な骨格ではなく、細胞の成長および分化の調節において必須の働きをするものもある。E C M は、胚発生、組織修復、炎症、腫瘍浸潤、転移などの通常の病的リモデリング( *p a t h o l o g i c a l r e m o d e l i n g* )における主要な構成要素である。

ling) 過程中に、細胞機能の調節において中心的な役割を果たす環境を提供する。例えば、ECMは、増殖因子の誘導、隔離、貯蔵および提示の際に機能することが知られている。

#### 【0003】

ECMが、細胞の微細環境にとって不可欠な成分であるという事実を認識して、ますます多くの研究者が、細胞外マトリックスを彼らの細胞培養システムに組み込んでいる。 ECMをin vitroで使用することにより、細胞に、in vivoの生理的環境により近い状態が提供される。 ECMは、細胞に力学的支持をもたらし、また、細胞表面の受容体を介して細胞に影響を及ぼす生化学的な刺激を提供することによって、細胞の挙動に影響を与える。

#### 【0004】

基底膜は、特定のタイプの細胞外マトリックスであり、主としてラミニンおよびIV型コラーゲンからなる。 Engelbreth-Holm-Swarmマウス腫瘍から抽出した、良く知られた基底膜マトリックス(Basement Membrane Matrix)が、MATRIGEL(登録商標)という商標名で市販されている。このマウス腫瘍は、基底膜タンパク質が豊富である。マトリックスの主な成分は、ラミニン、コラーゲンIV、エンタクチンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、また、増殖因子、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP[コラゲナーゼ])、および他のプロテイナーゼ(プラスミノゲン活性化因子)、ならびに数種の未決定の化合物も含むが、検出可能なレベルのメタロプロテイナーゼの組織阻害因子(TIMP)は含まない。室温では、MATRIGEL(登録商標)マトリックス(Matrix)はゲル化して再構成基底膜を形成し、その構造、成分、物理的性質およびin vivoの基底膜に典型的な機能特性をもつ能力について類似している。

#### 【0005】

in vitroにおいて、腫瘍細胞による基底膜マトリックスへの浸潤を調べるために、MATRIGEL(登録商標)マトリックスを使用する多くの方法が開発されている。これらの方法は通常、細胞培養用インサートの微孔メンブレンにMATRIGEL(登録商標)マトリックスをコートするものである。 ECMを含有する細胞培養システムを調製する従来技術は、第一に、天然の原纖維の重合および析出を誘導するために、可溶性コラーゲンの中性にした冷溶液を温めることを含む。4より高温でMATRIGEL(登録商標)マトリックスをインキュベートすると、マトリックスが重合する。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

細胞培養で使用するための、非結晶性で、化学的に架橋し、アルカリ変性させたコラーゲンフィルムは、保存性を向上するために、また使用前にその都度細胞培養基材を調製する必要をなくすためにしばしば乾燥させるのに対し、天然の微纖維性コラーゲンを含有する細胞培養基材は、フィルム、天然の原纖維の粘着性ゲルの形でのみ調製され、使用される。こうしたゲルは、上で言及したように、可溶性コラーゲンの中性にした冷溶液を温めて、天然の原纖維の重合および析出を誘導することによって生成されることが最も多い。しかしこれらを保管用に乾燥することはしない。天然の微纖維性コラーゲンゲルを崩壊および乾燥させる以前の試みでは、天然の構造が失われ、纖維形成が最適ではなく、透過特性が不十分であるからである。したがって、天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材は、使用する直前に作成しなければならない。そうすることにより、天然の微纖維性コラーゲンを用いた細胞培養を含む研究に伴う労力および不便が増す。したがって、MATRIGEL(登録商標)マトリックス中に見いだされるような天然の微纖維性コラーゲンを含み、予定した使用の前に製品から調製することができる細胞培養基材が必要とされている。

#### 【0007】

天然の微纖維性コラーゲンを含有する細胞培養装置を調製する従来の方法では、ゲルが重合した後、使用する直前に、マトリックス中にある流体を取り除くことが望ましい。 ECMから流体を取り除く従来の方法は、風乾および高温での乾燥を含む。通常の高温乾燥

条件は、乾燥空気流を用いた高温での高速乾燥を含み、これは、M A T R I G E L（登録商標）マトリックスの大きな塩の結晶やより顕著なパターン化を促進する。M A T R I G E L（登録商標）マトリックスを高速乾燥することにより、浸潤細胞の分散が不十分になる。

#### 【 0 0 0 8 】

従来の流体を取り除く技術は、多孔表面の下面を、吸湿材の上に3分から終夜の間置くこと、および／または多孔表面の下面を穏やかに減圧することを含む。温度を徐々に下げる条件、かつ空気流の無い条件下で、ゆっくりと乾燥させることによって流体が取り除かれると、最も均一なコーティング、すなわち浸潤細胞の最も均一な分散がもたらされる。例えば、Swiderek他（米国特許第5,731,417号）では、基材を風乾することを含み、細胞培養用に天然の微纖維性コラーゲンの乾燥フィルムを作成する方法を開示している。

#### 【 0 0 0 9 】

従来の乾燥方法は、細胞培養装置の機能を低下させる。例えば、従来のコーティングおよび乾燥方法では、しばしば、コーティングが不均一または分断されたものとなり、これによって、濃い中央の点または環など浸潤細胞の様々なパターンの形成によって示される不均一な細胞浸潤が起こる。その結果、顕微鏡下で浸潤細胞を正確にカウントすることが非常に難しくなる。そのうえ、浸潤細胞と非浸潤細胞を識別する能力がかなり減少する。浸潤細胞にはHT-1080細胞が含まれ、非浸潤細胞にはNIH 3T3細胞が含まれる。したがって、M A T R I G E L（登録商標）マトリックスなどの分散した微纖維性コラーゲン基材は、均一かつむらのない（consistent）ことが望ましい。

#### 【 0 0 1 0 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、乾燥させた細胞外マトリックスを含み、細胞のin vitroにおける増殖のために開発された、細胞培養装置および方法に関する。詳細には本発明は、すぐに使用できる均一に分散した細胞外マトリックスを基材に提供する方法であって、a) 細胞外マトリックス成分を基材面に塗布すること、b) 細胞外マトリックス成分を基材面上でインキュベートして重合させること、c) 重合した細胞外マトリックスを基材面上で凍結させること、d) 凍結させた細胞外マトリックスを基材面上で凍結乾燥させること、e) 凍結乾燥させた細胞外マトリックスの温度を室温まで上昇させることを含む方法を企図する。

#### 【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様は、細胞増殖のための表面を含み、前記表面が、乾燥させた均一に分散した細胞外マトリックスに接着し、前記マトリックスが、a) 細胞外マトリックス成分を基材面に塗布すること、b) 細胞外マトリックス成分を基材面上でインキュベートして重合させること、c) 重合させた細胞外マトリックスを基材面上で凍結させること、d) 凍結させた細胞外マトリックスを基材面上で凍結乾燥させること、e) 凍結乾燥させた細胞外マトリックスの温度を室温まで上昇させることを含む諸ステップによって形成される細胞培養装置を提供する。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明はまた、細胞をその上で増殖させるようになされた表面、および表面の上をコートする細胞外マトリックスを含み、マトリックスコーティングが生理活性タンパク質溶液の重合生成物を含み、マトリックス中にある流体が、凍結乾燥中に実質上取り除かれることを特徴とする細胞培養装置も提供する。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明は、均一に分散しており、広い範囲のECM濃度に対して有効であり、細胞培養表面全体にわたる高度に均一な腫瘍細胞移動をもたらし、細胞の計数を容易にし、また浸潤性腫瘍細胞と、非浸潤性と推定されるコントロール細胞との区別を容易にする、細胞外マトリックスを含む細胞培養装置を提供する方法を記載することによって、従来技術の欠陥を解決することを試みる。さらに、本発明はまた、予定した使用の前に調製される細胞

外マトリックスを含む細胞培養装置を含む。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、基材を端から端までコートする非常に均一な細胞外マトリックスを提供する。従来の液体乾燥プロセスで調製されたものよりもかなり広い範囲の細胞外マトリックス濃度に対して有効である。膜の中央で、非常に不均一に細胞移動が起こる従来のプロセスとは異なり、コーティングの均一性により、細胞外マトリックスの表面全体に対して高度に均一な腫瘍細胞移動がもたらされる。均一な移動により、手動方法 (manual method) または画像解析による細胞の計数が容易になる。凍結乾燥させたコーティングにより、浸潤性腫瘍細胞と、非浸潤性と推定されるコントロール細胞との区別も大いに可能になる。

【0015】

天然の微纖維性コラーゲンを有する細胞培養装置は、当技術分野で知られるどんな細胞培養プロトコルおよび方法においても、従来のコラーゲン細胞培養基材に代わるものである。組織培養プレートのウェル内で、多孔表面の下面を適切な培地に接触させ、多孔表面上に、天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材を入れた。これにより、培地は、細胞培養基材に接触し、多孔表面を通って流れようになる。培地およびその中に存在可能な他の材料は、細胞培養基材を通して拡散し、細胞培養基材表面に接種した細胞に接触する。取り扱いを容易にするために、細胞培養基材は、細胞培養用インサートの微孔メンブレン上で調製することができる。

【0016】

冷細胞外マトリックスを多孔表面に塗布した後、中和させた冷コラーゲン溶液の温度を、約15℃から約40℃に上昇させ、天然のコラーゲンの原纖維および纖維形成を開始する。本発明のインキュベーションステップでは、温度は高温が望ましく、約5%二酸化炭素、加湿チャンバー中で、約37℃が好ましい。コラーゲン溶液の温度が上昇するにつれて、天然の原纖維が、多孔表面上で重合およびゲル化を開始し、多孔表面の上側をコートする。このゲルは、天然のコラーゲンの特性である横紋を伴う、コラーゲンの大きな、組織化した纖維、ならびにコラーゲン溶液（原纖維間の流体）由來の閉じ込められた流体を含む。インキュベーションステップは、細胞外マトリックスがゲルを形成するのに十分な時間であることが望ましい。一般に、細胞培養用インサートのメンブレンなどの多孔表面上で完全に重合させるために十分な時間は、約37℃で約0.5から約3時間である。

【0017】

細胞外マトリックスのコラーゲンが重合した後、重合したコラーゲンの原纖維間の流体は、ゲルから抜き取ることが望ましい。本発明の方法では、凍結乾燥プロセスを開始する前に、ゲルでコートしたインサートを、-30℃より低温で凍結させる。コートしたインサートは、凍結乾燥器中で凍結させ、次いで終夜凍結乾燥し、その間に凍結乾燥機の温度を室温まで上昇させることができる。このプロセスにより、ゲルは多孔表面上で崩壊し、天然のコラーゲン原纖維および纖維の薄い膜を形成する。インサートメンブレンに付着した均一なケーキを得ることが望ましい。

【0018】

本発明の天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材は、多孔表面上で、乾燥フィルムとして生成できる。これらは、乾燥させた形で天然の微纖維性コラーゲン構造を保持することが望ましく、したがって、キャスト (cast) コラーゲンゲルの向上した透過特性と、非結晶性あるいは架橋したコラーゲンフィルムの保管安定性とを有することが望ましい。乾燥させたメンブレンは、望むなら、細胞培養のための多孔表面から取り除くことができるが、一般に、構造的支持を増大させ、取り扱いを容易にするために、この多孔表面の上に天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材を使用することが好ましい。本発明の細胞培養フィルムとしての細胞培養基材は、優れた拡散特性を有するので、細胞培養基材の表面上側の細胞は、多孔表面下面を通る拡散によって、培地、増殖因子、他の材料に触れることができる。

## 【0019】

大きな天然のコラーゲン纖維の形成を促進するために、生理的濃度またはそれより高濃度、好ましくは約0.15モルから約1モルの塩濃度を使用することができる。生理的濃度よりも低い塩濃度では、コラーゲン纖維の形成は、あるとしても少量である。しかし、塩がほぼ生理的濃度まで上昇すると、非結晶性のコラーゲンは少くなり、ほぼ完全に纖維が形成される。さらに、塩が生理的濃度より増大すると、形成される纖維はより大きくなる。しかし、塩濃度が約1.1モルに到達すると、再び、ほぼ完全に纖維が形成されなくなる。可溶性コラーゲンが酸性溶液であるときは、pHを約6~8、好ましくは約7.0~7.4に上げてもよく、それと同時に、冷NaOHのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの緩衝液で塩濃度を調整し、最終の塩濃度を約0.15モル~1モル、好ましくは少なくとも約0.6モル(生理的濃度の約4倍)にする。コラーゲンは、コラーゲン原纖維および纖維の重合が望まれるまで、冷やして(通常約4℃)保管することによって、溶液中に維持される。コラーゲン濃度は、天然のコラーゲン纖維の形成にとって重要でないが、好ましくは細胞培養基材として使用される多孔表面 $1\text{ cm}^2$ 当たり約10から約500μg、より好ましくは約65から約85μgである。

## 【0020】

塩または有機材料などコラーゲン以外の残りの物質の、細胞環境に対する負の効果を気にせずに、非生理的条件を含む様々な重合条件を用いて、細胞培養用フィルムを生成することができる。本発明の方法に従って、ゲルを多孔表面へ崩壊させ乾燥させて微纖維性コラーゲンフィルムを形成することにより、細胞を均一に分散させるための均一な表面、および望むならコラーゲンの濃縮(約5~10mg/ml)がもたらされる。天然の微纖維性コラーゲン構造により、非結晶性のコラーゲン細胞培養基材中には見いだせないin vivoにおける細胞の受容体の結合のための空間配置がもたらされる。微纖維性コラーゲンの網目により表面が粗くなり、これにより、各フィルム上のコラーゲン表面積が、他のコラーゲン細胞培養基材の基本的に2次元の表面上で見られるよりも広くなる。天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材は、その表面に、従来技術のコラーゲン基材よりも、より強く均一に細胞を結合する。すなわち、表面に塗布された多くの異なるタイプの細胞が、この表面に迅速かつ完全に結合する(例えば、上皮細胞、内皮細胞、および線維芽細胞)。

## 【0021】

本発明の重合反応は組織化エントロピー(organizational entropy)によって進む。類似のタイプの自己集合が起こる他のタンパク質でも物理的機構は同じなので、in vitroで自然に組織化した重合構造を形成するどんな1種または複数のタンパク質でも、先述の生成プロセスにおいて、コラーゲンに代えて使用した場合、天然の構造体(construct)を生成する。こうしたタンパク質には、ホモポリマー(例えば、フィブロネクチンまたはラミニン)やヘテロポリマー(例えば、ラミニンとコラーゲンIV、またはラミニンとプロテオグリカン)を形成するタンパク質が含まれる。MATRIGEL(登録商標)(Collaborative Biomedical Products, Inc.)に含まれるもののような自己集合するタンパク質を含む細胞外マトリックス成分を、本発明の方法に従って重合させ、乾燥させて、天然の構造体を生成させることができる。このようなタンパク質のすべてが、原纖維間の流体を除去したときに、コラーゲンゲルと同じように崩壊してフィルムを形成するゲルを生成するわけではないが、重合した基材から原纖維間の流体を抜き取り乾燥させても、最終生成物中に天然の構造体を保持されたまま残すことができる。

## 【0022】

どんな膜材料も、本発明の方法で基材として使用できるが、ある種の生物学的使用時には、選択される膜によって正の効果または負の効果がある。エッティング膜が、移動試験に好ましいのに対し、キャスト膜は、試験される材料の透過係数が膜の透過係数を超えない場合にも使用することができる(つまり、膜の透過係数が制限因子ではない)。細胞培養の応用例で好都合なように、多孔膜を組み込んだ培養用プレート・インサートが好ましい

(例えば、Collaborative Biomedical ProductのBIOCOAT Control Cell Culture Insert、CostarのTRANSWELL、Millipore CorporationのMILLELL Culture Plate Insert)。鏡検を含む応用例では、高密度ポリカーボネートなどの材料よりも、透明度が高いため、PET膜が好ましい。これらの理由から、異なる使用法には異なる膜が好ましく、これは当分野の技術者なら型通りの手順で選択することができる。

#### 【0023】

本発明の基材として使用される適切な多孔表面には、セルロース膜、多孔性ポリカーボネート、多孔性ポリテトラフルオロエチレン(例えばMillipore CMなどのTEFLON mesh membranes)、ナイロン膜およびメッシュ、ガラスフィルター、多孔性ポリエチレンテレフタラート、ポリメチルペンタン、ポリプロピレン、ポリエチレン、および様々なタイプのフィルター(例えばANOPORE aluminum crystal filters)などの天然または合成の重合体がある。これらの多孔表面は、重合前にコラーゲン溶液が流失しないのに十分なほど小さく、培地および原纖維間の流体などの流体が通過するのに十分なほど大きい孔径であるべきである。一般に、孔径約0.5から約30ミクロンの膜であれば、望ましい性質が提供される。材料の移動試験など大部分の一般的な細胞培養に使用するためには、孔が約8ミクロンである膜を含む表面が好ましい。

#### 【0024】

乾燥させた後、本発明の細胞培養装置は、例えば照射(例えば、紫外線、電子ビームまたは照射)によって、あるいはエチレンオキシドガスにさらすことによって滅菌することができる。従来技術のコラーゲン細胞培養基材とは対照的に、本発明の天然の微纖維性コラーゲンフィルムは、乾燥されたときにも、天然の原纖維構造を保つので、in vivoコラーゲン基材により似ている。

#### 【0025】

生理活性タンパク質を含めた幅広い種類の材料を、特定の細胞培養システムに望まれるように、本発明の細胞外マトリックスと共に重合させることができ、あるいはコラーゲンに吸収させることによってフィルムに取り込ませることができる。これらの材料には、それだけには限らないが、細胞、抗体、酵素、受容体、増殖因子、細胞外マトリックスの追加の成分、サイトカイン、ホルモン、および薬剤が含まれる。こうした材料は、選択された細胞培養の応用例に適した濃度で冷コラーゲン溶液に加えることができる。上に記載したような天然のコラーゲン原纖維を重合させると、材料がコラーゲン纖維に結合する、または材料がコラーゲン纖維と共に重合する。細胞培養基材は開いた纖維構造であるため、加えられた生物学的作用物質が、培養細胞に直ちに使用可能になり、細胞の性質または挙動を和らげ(moderate)または調節する。

#### 【0026】

培養される細胞は、基材の上側表面にほぼコンフルエントまたはコンフルエントに接種し、細胞増殖に適した環境条件下に置くことができる。例えば、細胞培養基材を、培養ディッシュのウェルに対するインサートのメンブレン表面で調製する場合、ウェルに少量の増殖培地を入れる。培地が多孔メンブレンの下側に接触し、細胞培養基材を通して拡散して基材表面上に接種した細胞に接触するように、インサートをウェルに入れる。

#### 【0027】

このコラーゲン細胞培養基材を使用する細胞培養においては、上皮細胞の増殖および分化に適した培地であれば、どんな細胞培養用培地も使用することができる。これらの培地には、それだけには限らないが、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、MEM、M-199、RPMIが含まれる。当技術分野で周知の添加剤を培地に加えることができ、その添加剤には血清(例えば、FBSまたは子牛血清)、血清含有添加剤(NU-SERUM)、無血清添加剤(MITO+)がある。腸上皮細胞用の好ましい細胞培養用培地は、MITO+ Serum Extender(Collaborative Biom

edical Products, Bedford, Mass.)を添加したD MEMであり、これは完全に定義された無血清細胞培養環境を提供する。

#### 【0028】

##### 実施例

以下の実施例は、本発明のある種の実施形態を例示するために示したものであり、本発明を限定するものと解釈するべきではなく、本発明は添付の特許請求の範囲およびその均等物によって定義される。

#### 【0029】

##### 実施例1

乾燥させた均一に分散した細胞外マトリックスを有する細胞培養装置の調製

以下の実験実施例では、ポリエチレンテレフタラート(PET)細胞培養用インサート中の $1 \mu\text{m}$  PETメンブレン上の、乾燥させた均一に分散した天然の微纖維性コラーゲン細胞培養基材の調製を記述する。この実施例では、メンブレンに、約 $200 \mu\text{m}$ のM AT R I G E L(登録商標)マトリックスを加える。

#### 【0030】

M AT R I G E L(登録商標)マトリックスの酸性冷溶液は、 $10 \times$  D P B S / NaOHを加えることによって $674 \mu\text{m} / \text{ml}$ に調整し、約 $4 \times$  D P B Sの最終濃度、pH 7.4とする。この混合物は使用するまで氷上に置いておく。インサートホルダーを組織培養ディッシュ内に入れる。細胞培養用インサートを、滅菌済みピンセットを用いてインサートホルダー内に入れ、使用するまで、ディッシュにふたをしておく。M AT R I G E L(登録商標)コラーゲンコーティングゲル( $0.10 \text{ ml}$ )を各メンブレンに分注し、ディッシュのふたを戻し、ディッシュを静かにゆすってコーティング溶液をメンブレンに均等に分配させる。コートしたメンブレンを、未然に乾燥してしまうことを防ぐために加湿(h umid)環境で、37でインキュベートし、コラーゲンを重合させる(約2.0時間)。

#### 【0031】

コラーゲンが重合した後、コートしたインサートを、凍結乾燥プロセスを開始する前に、あらかじめ冷却した凍結乾燥機に入れ、(-30より低温で)凍結させる。インサートは、終夜凍結乾燥させ、その間凍結乾燥機の温度を室温まで上昇させる。インサートメンブレンに付着した均一なケークが得られる。

#### 【0032】

次いで、天然のコラーゲン細胞培養基材を、組織培養ディッシュ中で、0.05~0.06ジユールの紫外線に当てるこことによって滅菌し、使用するまでシールバッグ中で4で保管する。

#### 【0033】

##### 実施例2

##### 浸潤アッセイ

N I H 3 T 3(非浸潤性)およびH T - 1 0 8 0(浸潤性)細胞を、ウシ胎児またはウシ新生児血清(newborn calf serum)10%を含むD MEMで、ほぼコンフルエントまで増殖させた。トリプシン処理によって細胞を採取し、血清もプロティナーゼ阻害剤も添加しないD MEMで洗浄した。この細胞を、 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ で、D M E Mに懸濁させた。細胞懸濁液を調製する前に、M AT R I G E L(登録商標)マトリックスの乾燥させた層を、室温で2時間、D M E Mで再水和させた。再水和溶液を注意深く取り除き、化学走性誘因物質として5%ウシ胎児血清を含むD M E M $0.75 \text{ ml}$ を、各プレートウェルに加え、細胞懸濁液 $0.5 \text{ ml}$ ( $5 \times 10^4$  細胞)を、各インサートに加えた。プレートインサートを、37、5%CO<sub>2</sub>環境下で、22時間インキュベートした。コートしていないメンブレン・インサートにも接種して、コントロールとした。

#### 【0034】

コートしたインサートの固定および染色

インキュベートした後、各インサート内のメンブレンの上側表面を、綿棒で穩やかにこ

すり、非浸潤細胞と、M A T R I G E L（登録商標）マトリックスをすべて取り除いた。メンブレンの下側表面の浸潤細胞は、D i f f - Q u i k（D a d e）染色キットの3種の溶液に順次移すことによって、固定および染色した。余分な染色液は、各インサートを蒸留水に浸すことによって取り除いた。メンブレンの上側表面を2回こすり、残留した水、細胞、M A T R I G E L（登録商標）マトリックスを取り除いた。インサートを、別の24ウェルプレートに移して、風乾させた。細胞をD i f f - Q u i kで染色した後、顕微鏡で直接カウントすることによって、メンブレンのM A T R I G E L（登録商標）マトリックスを通過して浸潤した細胞数を、メンブレンの下面で定量した。

## 【0035】

細胞の数および分散に応じて40または200×の倍率で顕微鏡写真を撮影し、細胞を数えた。写真は、メンブレンをインサートハウジングから取り外さずに撮影した。各写真について複数の視野（通常5）で、細胞を、罫線格子（r u l e d g r i d）を用いてカウントした。データを、浸潤率、すなわち、コートしていないコントロールインサートを通過して浸潤した細胞に対する、M A T R I G E L（登録商標）マトリックスでコートしたインサートを通過して浸潤した細胞の割合として表した。

## 【0036】

## コートしたインサートのタンパク質染色

コートの分散の均一性を評価するために、コートしたインサートを、インサート表面全体のタンパク質含有量を水準化するためのクマシーブルー（C o o m a s s i e B l u e）で染色した。コートしたインサートを、室温で2時間、緩衝生理食塩水（b u f f e r e d s a l i n e）で再水和した。再水和溶液を慎重に取り除き、クマシー染色溶液（1mg/ml クマシーブリリアントブルー（C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e）R - 250の10%酢酸、40%メタノール溶液）で置き換えた。30分後、染色液を慎重に取り除き、インサートを蒸留水で2回リーンスし、風乾させた。M A T R I G E L（登録商標）マトリックス付着の特性を100×の倍率で評価した。

## 【0037】

## 実施例3

## 本発明の細胞培養装置を使用した浸潤アッセイの結果

この実施例は、本発明の方法に従って調製された細胞培養用インサートが、望ましい性能仕様に従って機能することを示すものである。この仕様は下の表1に示され、この表では、N I H 3 T 3（3 T 3）細胞が非浸潤性腫瘍細胞を代表し、H T - 1 0 8 0 細胞が転移性腫瘍細胞を代表している。

## 【0038】

## 【表1】

表1

## 望ましい性能仕様

N I H 3 T 3 の浸潤	H T - 1 0 8 0 の浸潤	パターン	コート表面の分散
10%以下	25%以上	なし	均一

## 【0039】

本発明の細胞培養用インサートを、N I H 3 T 3 細胞およびH T - 1 0 8 0 細胞の基底膜マトリックスに浸潤する能力について試験した。固定および染色したインサートを、上記のように試験し、浸潤およびパターンの程度を評価した。これらの評価の結果を以下に詳述する。

## 【0040】

本発明の細胞培養装置は、コントロールN I H 3 T 3 細胞、すなわち非浸潤細胞の浸潤を本質的に示さなかった。しかし、H T - 1 0 8 0 腫瘍細胞の浸潤の程度は高かった。細胞培養表面全体にわたる高度に均一な腫瘍細胞移動がもたらされ、浸潤H T - 1 0 8 0

細胞は、各インサートの表面全体に均一に分散した。本発明の細胞培養装置には、浸潤細胞のパターン、すなわち濃い中央の点または環などは見られなかった。本実施例の結果は、24ウェルインサート、ならびに24マルチウェルインサートの両方でそれぞれ実証された。この方法によってメンブレン表面全体に均一に広がるM A T R I G E L（登録商標）マトリックスの薄く、均一なコートにより、腫瘍浸潤アッセイ完了までの時間短縮が可能になる。