

(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
2016年3月3日(03.03.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/031824 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C12N 11/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/073888
- (22) 国際出願日: 2015年8月25日(25.08.2015)
- (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 2014-173502 2014年8月28日(28.08.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人弘前大学(HIROSAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 Aomori (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 下田 浩(SHIMODA, Hiroshi); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 浅野 義哉(ASANO, Yoshiya); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 明石 満(AKASHI, Mitsuru); 〒5650871 大阪府吹田市山田

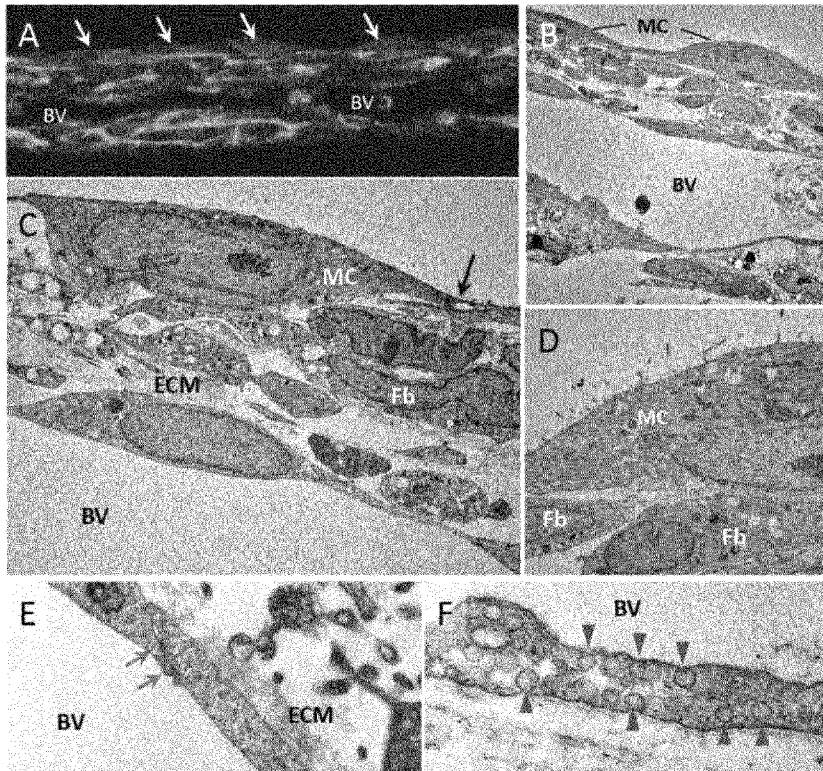
丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 松▲崎▼ 典弥(MATSUSAKI, Michiya); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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

[続葉有]

(54) Title: ARTIFICIAL PERITONEAL TISSUE AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 人工腹膜組織及びその製造方法



(57) Abstract: The present disclosure relates to: an artificial peritoneal tissue comprising a cellular tissue and a mesothelial cell layer that covers the surface of the cellular tissue, wherein the cellular tissue comprises a fibroblast, an extracellular matrix, and a vascular endothelial cell and/or a lymphatic endothelial cell each capable of forming a lumen; and a method for producing the artificial peritoneal tissue.

(57) 要約: 本開示は、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える、人工腹膜組織、ならびにその製造方法に関する。

WO 2016/031824 A1

ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：人工腹膜組織及びその製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、人工腹膜組織及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、遺伝子工学、分子生物学、細胞工学の医療への応用を目的として組織工学による人工臓器・移植材料等のバイオマテリアルの開発が求められており、*in vitro*での組織構造形成を主眼とした研究が行われている（例えば、特許文献1及び2等）。三次元組織の構築には、材料となる培養細胞、人工材料又は細胞外マトリックス（ECM）等の足場、組織化を促す刺激が必要である。これまでに様々な組織モデルが報告されている。

[0003] 腹膜は、腹壁並びにすべての腹腔内臓器から骨盤内臓器の一部を被う連続した生体膜であり、単層の中皮細胞層と血管網やリンパ管網等を含有する結合組織で形成される。腹膜は、癌の転移に密接に関与することが古くから知られている。消化管や卵巣などの骨盤内臓器の多くの癌は、腹腔内に遊離し、腹膜に接着して浸潤し（腹膜播種）、さらには血管やリンパ管を介したさらなる転移を引き起こすことが知られている。また、透析療法の一つとして腹膜を用いた腹膜透析が行われている。腹膜透析を長期間継続すると、腹膜の機能の劣化や腹膜の硬化・肥厚化がおこり、最終的には被嚢性腹膜硬化症（EPS）等を引き起こすことが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2007-228921号公報

特許文献2：特開2012-115254号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 以上の点から、腹膜播種や被嚢性腹膜硬化症等が生じるメカニズムの解明

、及びその予防・治療方法の研究が行われている。この研究にはマウス等の実験動物が用いられているのが現状である。しかしながら、ヒトへの臨床応用等を考慮すると、ヒトの生体により近い腹膜組織を用いた研究が必要とされている。そのため、ヒトの生体の腹膜組織により近い環境を再現可能な人工腹膜組織の開発が求められている。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、鋭意研究を重ね、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織を完成することに成功した。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、ヒトの生体の腹膜組織により近い環境を再現可能な人工腹膜組織及びそれを製造する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、実施例1の人工腹膜組織の画像の一例であって、図1Aは光学顕微鏡画像であり、図1B～Fは透過型電子顕微鏡画像である。

[図2]図2は、実施例2の人工腹膜組織の画像の一例であって、図2Aは光学顕微鏡画像であり、図2B～Dは透過型電子顕微鏡画像である。

発明を実施するための形態

[0009] 一つの実施態様において、本開示は、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織に関する。

[0010] 他の実施態様において、本開示は、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織の製造方法であって、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも

一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスとを培養して前記細胞組織を形成すること、及び前記細胞組織上に中皮細胞を配置することを含む人工腹膜組織の製造方法に関する。

[0011] 本開示において「人工腹膜組織」とは、腹膜という組織として機能しうる細胞集団であって、腹膜の機能的又は構造的なモデルとなりうるものをいう。本開示における人工腹膜組織は、例えば、生体における腹膜の構造を模したものの、生体における腹膜の機能を再現可能なモデル又は再現するためのモデル等を含みうる。

[0012] [人工腹膜組織]

一つの実施態様において、本開示は、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織（以下、「本開示の人工腹膜組織」ともいう）に関する。

[0013] 本開示の人工腹膜組織は、細胞組織と中皮細胞とを有する。一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、中皮細胞層が被蓋構造を形成するとともに、中皮細胞層が線維芽細胞と毛細血管様構造及びリンパ管様構造の少なくとも一方からなる組織に細胞外マトリックスを介して結合した構造を有している。すなわち、一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、線維芽細胞と中皮細胞との間に細胞外マトリックスを含む。本開示の人工腹膜組織によれば、生体の腹膜組織により近い腹膜組織の構造、好ましくは機能を再現できる。

[0014] <細胞組織>

一つの実施形態において、細胞組織は、線維芽細胞と、細胞外マトリックスと、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方とを含む細胞の集合体であって、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方の細胞を含む管腔を有している。他の実施形態において、細胞組織は、線維芽細胞と間質からなる細胞層が血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方による脈管ネットワークをサンドイッチ状に挟んだ構造を成す。

- [0015] 本開示において「管腔」とは、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞によって形成された中空の管状構造をいう。管腔の壁面を構成する細胞は、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞のいずれかを含む。一つの実施形態において、管腔の壁面を構成する細胞は、実質的に血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞のいずれかによって形成されていることが好ましい。管腔の構造には、例えば、毛血管様構造及びリンパ管様構造が挙げられる。一つの実施形態において、管腔は、細胞組織内において脈管ネットワークを形成する。他の実施形態において、管腔は、毛細血管網又はリンパ管網のように網目状のネットワークに形成された構造であってもよい。
- [0016] 血管内皮細胞が形成する管腔は、生体の毛細血管により近い構造となるように形成される。この点から、一つの実施形態において、隣接する血管内皮細胞同士が細胞間接着を形成していることが好ましい。また、管腔の内壁は、生体の毛細血管により近い構造となるように形成される。この点から、他の実施形態において、管腔の内壁は小胞様構造に富む構造であることが好ましい。
- [0017] 血管内皮細胞が形成する管腔の径は、例えば、 $5\ \mu\text{m}$ ～ $28\ \mu\text{m}$ であるが、これらに限定されない。本開示の人工腹膜組織によれば、一つの実施形態において、細胞組織内部の細胞への培地成分がより到達しやすくなり、組織構造が維持されやすくなりうるという効果を好ましくは奏する。また、本開示の人工腹膜組織を用いた腹膜の研究及び評価において、癌細胞等の血管様構造への侵襲過程や血管様構造内での動態を可視化しやすくなりうるという効果を奏しうる。管腔の径は、血管内皮細胞の免疫染色像などの従来公知の方法により測定できる。
- [0018] リンパ管内皮細胞が形成する管腔は、生体の毛細リンパ管により近い構造となるように形成される。この点から、一つの実施形態において、隣接するリンパ管内皮細胞同士が細胞間接着を形成している部分と、隣接するリンパ管内皮細胞同士が離間した部分とを含むことが好ましい。
- [0019] 一つの実施形態において、細胞組織における線維芽細胞は、細胞外マトリ

ックスを介して配置され三次元構造を形成している。

- [0020] 細胞組織に含まれる線維芽細胞の濃度は、管腔形成のための微小環境を最適化するという理由から、例えば、 4×10^8 細胞/cm³~ 1.2×10^9 細胞/cm³であり、好ましくは、 1.0×10^9 細胞/cm³~ 1.2×10^9 細胞/cm³である。
- [0021] 一つの実施形態において、上述した線維芽細胞、内皮細胞及びリンパ管内皮細胞は、ヒト由来の細胞であってもよいし、ヒト以外の動物由来の細胞であってもよい。他の実施形態において、これらの細胞は、間葉系幹細胞、胚性幹細胞あるいは人工多能性幹細胞等に由来する細胞であってもよい。別の実施形態において、細胞は培養細胞であってもよい。培養細胞には、例えば、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0022] 一つの実施形態において、細胞組織は、上記以外の細胞を含んでもよい。上記以外の細胞には、例えば、周皮細胞、及び平滑筋細胞が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞は、ヒト由来の細胞であってもよいし、ヒト以外の動物由来の細胞であってもよい。他の実施形態において、細胞は、間葉系幹細胞、胚性幹細胞あるいは人工多能性幹細胞等に由来する細胞であってもよい。別の実施形態において、細胞は培養細胞であってもよい。培養細胞には、例えば、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0023] 一つの実施形態において、細胞外マトリックスは、*in vitro*細胞培養において上記の役割を果たしうる物質や、人工的に合成された物質やその一部を含んでもよい。細胞外マトリックスの具体例には、フィブロネクチン、ゼラチン、コラーゲン、コラーゲンペプチド、ラミニン及びポリリジン等が挙げられる。細胞外マトリックスは、これらの例に限定されるものではなく、特開2007-228921号公報（特許第4919464号）及び特開2012-115254号公報に開示のものが挙げられる。
- [0024] 細胞組織に含まれる細胞外マトリックスは、一種類であってもよいし、二

種類以上であってもよい。一つの実施形態において、細胞組織に含まれる細胞外マトリックスの組み合わせには、第1物質及び第1物質と相互作用する第2物質の組み合わせが挙げられる。第1物質と第2物質との組み合わせには、RGD配列を有する高分子及びRGD配列を有する高分子と相互作用する高分子の組み合わせ、又は、正の電荷を有する高分子及び負の電荷を有する高分子の組み合わせが挙げられる。第1物質と第2物質との組み合わせの具体例には、フィブロネクチンとゼラチン（またはコラーゲンペプチド）、フィブロネクチンとε-ポリリジン、フィブロネクチンとヒアルロン酸、フィブロネクチンとデキストラン硫酸、フィブロネクチンとヘパリン、及びラミニンとゼラチン等が挙げられる。

[0025] <中皮細胞層>

中皮細胞層は、細胞組織表面を覆うように形成されている。一つの実施形態において、中皮細胞層は、細胞組織の上面に位置している。他の実施形態において、中皮細胞は、最表層を形成する細胞（被蓋細胞）となる。別の実施形態において、中皮細胞層は、実質的に一層の中皮細胞の層で形成されている。

[0026] 一つの実施形態において、中皮細胞層における中皮細胞の密度は、 5.2×10^2 細胞/mm²~ 2.5×10^3 細胞/mm²である。他の実施形態において、一層の中皮細胞層を形成する最適条件の点から、 5.2×10^2 細胞/mm²~ 1.3×10^3 細胞/mm²が好ましい。

[0027] 一つの実施形態において、隣接する中皮細胞同士は、細胞間接着を形成していることが好ましい。他の実施形態において、中皮細胞層は、その表面に1又は複数の微絨毛を有する。これにより、生体の腹膜組織により近い腹膜組織の構造、好ましくは機能を再現できる。

[0028] 一つの実施形態において、上述した中皮細胞は、ヒト由来の細胞であってもよいし、ヒト以外の動物由来の細胞であってもよい。他の実施形態において、中皮細胞は、間葉系幹細胞、胚性幹細胞あるいは人工多能性幹細胞等に由来する細胞であってもよい。別の実施形態において、中皮細胞は培養細胞

であってもよい。培養細胞には、例えば、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0029] 一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、被検物質の腹膜に対する薬効試験、薬理試験及び安全性試験等といった薬剤評価に用いることができる。他の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、有効成分となる候補物質のスクリーニングを行うための用途に用いることができる。

[0030] 別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、生体における腹膜の基礎研究及び評価を行うための用途として用いることができる。さらに別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、体液及び免疫細胞等の吸収及び輸送等といった腹膜が本来有する機能の研究及び評価を行うための実験ツールとして用いることができる。

[0031] 別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、腹膜組織における癌細胞の挙動を評価するための用途に用いることができる。さらに別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、抗癌剤等の腹膜の治療に用いる薬剤の有効成分となる候補物質のスクリーニングを行うための用途に用いることができる。さらに別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、腹膜播種に伴う癌の浸潤、癌の転移を再現し、又はそのメカニズムを解明するための実験ツールとして用いることができる。

[0032] 別の実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、腹膜透析に伴う腹膜の機能の劣化、腹膜の硬化又は肥厚化、被嚢性腹膜硬化症（EPS）のメカニズムを解明するための実験ツールとして用いることができる。

[0033] 別の実施形態において、本開示の人工腹膜は、移植医療のための移植片として使用できる。

[0034] [人工腹膜組織の製造方法]

他の実施態様において、本開示は、線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織の製造方法（以下、「本開示の人工腹膜組織の製造方法」ともいう）に

関する。本開示の人工腹膜組織の製造方法は、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスとを培養することによって前記細胞組織を形成すること、及び前記細胞組織上に中皮細胞を配置することを含む。

[0035] 本開示の人工腹膜組織の製造方法によれば、一つの実施形態において、隣接する血管内皮細胞同士が細胞間接着を形成し、また内壁に小胞様構造が形成された管腔（血管様構造）を備える人工腹膜組織が製造できる。本開示の人工腹膜組織の製造方法によれば、他の実施形態において、隣接するリンパ管内皮細胞同士が細胞間接着を形成している部分と離間した部分とを有する管腔（リンパ管様構造）を備える人工腹膜組織が製造できる。したがって、本開示の人工腹膜組織の製造方法によれば、一つの実施形態において、ヒトの生体の腹膜組織により近い環境を再現可能な人工腹膜組織を製造することができる。本開示の人工腹膜組織の製造方法によれば、他の実施形態において、組織再現性の高い人工腹膜組織を製造することができる。本開示の人工腹膜組織の製造方法は、一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織を製造することができる。

[0036] <細胞組織の形成>

細胞組織の形成は、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスとを培養することを含む。一つの実施形態において、細胞組織の形成は、血管内皮細胞及び／又はリンパ管内皮細胞を含む1層の細胞層を線維芽細胞の細胞層で挟み、その状態で培養することにより行うことができる（サンドイッチ型）。また、他の実施形態において、細胞組織の形成は、線維芽細胞と、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方との混合物を基材上に配置して培養することにより行うことができる（ミクスチャー型）。別の実施形態において、細胞組織の形成は、サンドイッチ型とミクスチャー型を組み合わせてもよい。

[0037] 一つの実施形態において、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスの培養は、細胞外マトリックスを

含む被膜で被覆したこれらの細胞を三次元に配置して培養することにより行うことができる。あるいは、かかる培養は、これらの細胞（1層）と細胞外マトリックスとを交互に積層（L b L）して培養することにより行ってもよい。一つの実施形態において、細胞組織の形成は、細胞外マトリックスを含む被膜で被覆された細胞と被覆されていない細胞とを併用してもよい。一つの実施形態において、被覆細胞を用いた細胞組織の形成は、実施例、及び特開2012-115254号等を開示された方法等に基づき作製できる。他の実施形態において、L b Lによる細胞組織の形成は、特開2007-228921号公報（特許第4919464号）を開示された方法等に基づき作製できる。

[0038] 一つの実施形態において、線維芽細胞は、線維芽細胞の細胞層が好ましくは4層以上、より好ましくは5層、6層、7層、8層、9層又は10層以上積層されるように配置される。

[0039] 一つの実施形態において、線維芽細胞の配置（播種）密度は、管腔形成及び単層の中皮細胞層形成のための微小環境を最適化するという理由から、 4×10^8 細胞/cm³～ 1.2×10^9 細胞/cm³が好ましく、 1×10^9 細胞/cm³～ 1.2×10^9 細胞/cm³がより好ましい。

[0040] <中皮細胞層の形成>

一つの実施形態において、中皮細胞層の形成は、細胞組織上に中皮細胞を配置して培養することを含む。他の実施形態において、中皮細胞は、細胞組織表面を覆うように配置される。また、別の実施形態において、中皮細胞は、中皮細胞の層が実質的に一層形成されるように配置される。

[0041] 一つの実施形態において、中皮細胞の配置（播種）密度は、 5.2×10^2 細胞/mm²～ 2.5×10^3 細胞/mm²である。他の実施形態において、一様な一層の中皮細胞層を形成する最適条件の点から、かかる密度は、 5.2×10^2 細胞/mm²～ 1.3×10^3 細胞/mm²であることが好ましい。

[0042] 一つの実施形態において、中皮細胞は、一様な一層の中皮細胞層を形成する点から、細胞外マトリックスで表面を被覆することなく播種することが好

ましい。他の実施形態において、中皮細胞は、中皮細胞が細胞外マトリックスを介した細胞組織との一体構造が形成され、生体の腹膜組織により近い人工腹膜組織が得られる点から、細胞組織のための細胞の播種（例えば、細胞組織の最上層に位置する線維芽細胞の播種）から6～24時間後に細胞組織上に播種することが好ましい。一つの実施形態において、培養は、隣接する中皮細胞間に接着構造が形成され、生体の腹膜組織により近い人工腹膜組織が得られる点から、中皮細胞播種後5日間以上行うことが好ましい。

[0043] [人工腹膜組織における癌細胞の挙動の評価方法]

別の実施態様において、本開示は、本開示の人工腹膜組織と癌細胞とを共培養すること、及び共培養させた人工腹膜組織における癌細胞の挙動を観察することを含む、人工腹膜組織における癌細胞の挙動を評価する方法（以下、「本開示の評価方法」ともいう）に関する。

[0044] 癌細胞の挙動の評価には、人工腹膜組織における癌細胞の増殖能、浸潤能、転移能、及び他の細胞への影響、並びにこれらの抑制の様子を評価又は観察することが挙げられるが、これらに限定されない。本開示における評価方法はまた、本開示の人工腹膜組織を用いた癌の増殖、浸潤及び／又は転移の再現における培養条件及び／又は外的の変化における再現の変動の有無等を観察することを含みうる。

[0045] 一つの実施形態において、人工腹膜組織と癌細胞との共培養は、人工腹膜組織に癌細胞を配置して培養することにより行うことができる。培地は上述のものが使用できる。培養温度は上述のとおりである。

[0046] 一つの実施形態において、本開示の評価方法は、癌細胞と共培養した人工腹膜組織に被験物質を接触させることを含んでいてもよい。

[0047] 一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織は、癌細胞と共培養することにより、癌の増殖、浸潤及び／又は転移の再現が可能になりうる。したがって、本開示は、一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織と癌細胞とを含む腹膜組織における癌浸潤モデルに関する。

[0048] [スクリーニング方法]

別の実施態様において、本開示は、本開示の人工腹膜組織と癌細胞とを共培養させること、癌細胞と接触させた人工腹膜組織と被験物質とを接触させること、及び前記癌細胞と接触させた人工腹膜組織に対する前記被験物質の作用を評価することを含む、抗癌剤の有効成分となる候補物質のスクリーニング方法（以下、「本開示のスクリーニング方法」ともいう）に関する。本開示のスクリーニング方法によれば、一つの実施形態において、本開示の人工腹膜組織を使用するため、従来の方法と比較して生体に近い環境で被験物質の評価を行うことができるという効果を奏しうる。

[0049] 被験物質の作用には、被験物質の癌細胞に対する転移、浸潤、及び増殖からなる群から選択される少なくとも一つを抑制する作用が挙げられる。

[0050] [スクリーニング用キット]

別の実施態様において、本開示は、本開示の人工腹膜組織と、癌細胞とを含む、抗癌剤の有効成分となる候補物質のスクリーニングを行うためのキット（以下、「本開示のスクリーニング用キット」ともいう）に関する。本開示のスクリーニング用キットによれば、一つの実施形態において、本開示のスクリーニング方法を行うことができる。

[0051] 一つの実施形態において、本開示のスクリーニング用キットは、所定の検査に用いる試薬、材料、用具、及び装置、並びに、説明書（取扱説明書）の少なくとも一つを含む製品をさらに含んでもよい。

[0052] 以下に、本開示を好適な実施形態を示しながら詳細に説明する。但し、本開示は、以下の実施形態に限定されるものではないことはいうまでもない。

[0053] まず、線維芽細胞の被覆細胞（以下、「被覆線維芽細胞」ともいう）を準備する。一つの実施形態において、被覆線維芽細胞は、フィブロネクチン及びゼラチンを交互に積層することにより形成できる。

[0054] 被覆線維芽細胞をセルカルチャーインサート等の基材上に播種して培養する。被覆線維芽細胞の播種は、被覆線維芽細胞が4層以上、好ましくは5層、6層、7層、8層、9層又は10層以上積層されるように行う。一つの実施形態において、播種時の線維芽細胞の密度は、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$ 細胞/

cm^3 、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/ cm^3 又は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/ cm^3 である。

[0055] 一つの実施形態において、培養は、培地を添加して行う。培地には、Eagle's MEM培地、Dulbecco's Modified Eagle培地 (DMEM)、Modified Eagle培地 (MEM)、Minimum Essential培地、RDML、及びGlutaMax培地等が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、培養する細胞の種類に応じて、適宜培地を選択できる。一つの実施形態において、培地は、血清を添加した培地を用いる。培養温度は、例えば、 37°C である。培養時間は、例えば、6～24時間である。当業者であれば、培養する細胞の種類に応じて、培養温度および培養時間を適宜設定できる。

[0056] 次に、形成された線維芽細胞の積層体の上に血管内皮細胞を播種して培養する。血管内皮細胞は、血管内皮細胞の層が1層形成されるように配置する。血管内皮細胞は、細胞外マトリックスで被覆したものを使用してもよいし、被覆されていないものを使用してもよい。培養条件は上述のとおりである。

[0057] ついで、血管内皮細胞の上に被覆線維芽細胞を播種して培養する。被覆線維芽細胞の播種及び培養は上記と同様に行う。

[0058] そして、細胞組織上に中皮細胞を播種して培養する。中皮細胞は、1層の中皮細胞層を効率よく形成する点から、細胞外マトリックスで被覆されていない細胞を用いる。中皮細胞の播種密度は上述のとおりである。培地及び培養温度は、細胞組織は上述のとおりである。培養時間は、培養温度によっても異なるが、例えば5日以上である。一つの実施形態において、培養時間は、好ましくは5～14日である。これにより、内部に毛細血管様構造が形成された細胞組織と中皮細胞層とを有する人工腹膜組織が形成できる。

[0059] 本実施形態では血管内皮細胞の層 (1層) を線維芽細胞の細胞層 (4層以上) でサンドイッチして製造する形態を例にとり説明したが、本開示はこれに限定されるものではなく、血管内皮細胞と被覆線維芽細胞とを混合して播

種し培養することによって細胞組織を形成してもよい。

[0060] 本実施形態では線維芽細胞と血管内皮細胞とを用いて細胞組織を製造する方法を例にとり説明したが、本開示はこれに限定されるものではない。一つの実施形態において、線維芽細胞に替えて又は併せて周皮細胞、平滑筋細胞、及び間葉系幹細胞を用いて細胞組織を製造してもよい。他の実施形態において、血管内皮細胞に替えて又は併せてリンパ管内皮細胞を用いて細胞組織を製造してもよい。

[0061] 本開示は以下の実施形態に關しうる。

[1] 線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える、人工腹膜組織。

[2] 前記管腔が、毛細血管様構造及びリンパ管様構造の少なくとも一方である、[1]記載の人工腹膜組織。

[3] 前記中皮細胞層が被蓋構造を形成し、前記中皮細胞が線維芽細胞と毛細血管様構造及びリンパ管様構造の少なくとも一方からなる組織に細胞外マトリックスを介して結合した、[1]記載の人工腹膜組織。

[4] 前記中皮細胞層の表面に微絨毛を有する、[1]から[3]のいずれかに記載の人工腹膜組織。

[5] 前記細胞外マトリックスが、フィブロネクチン及びゼラチンを少なくとも含む、[1]から[4]のいずれかに記載の人工腹膜組織。

[6] 前記細胞外マトリックスが、第1物質及び第2物質を含み、前記第1物質と前記第2物質との組み合わせが以下からなる群から選択される、[1]から[4]のいずれかに記載の人工腹膜組織：

- (a) フィブロネクチン及びゼラチン；
- (b) フィブロネクチン及び ϵ -ポリリジン；
- (c) フィブロネクチン及びヒアルロン酸；
- (d) フィブロネクチン及びデキストラン硫酸；
- (e) フィブロネクチン及びヘパリン；ならびに

(f) ラミニン及びゼラチン。

[7] 前記第1物質と前記第2物質との組み合わせがフィブロネクチン及びゼラチンである、[6]記載の人工腹膜組織。

[8] 線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織の製造方法であって、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスとを培養して前記細胞組織を形成すること、及び前記細胞組織上に中皮細胞を配置することを含む、人工腹膜組織の製造方法。

[9] 細胞組織の形成が、細胞外マトリックスで被覆された線維芽細胞を配置することを含む、[8]記載の人工腹膜組織の製造方法。

[10] 前記中皮細胞を、 5×10^2 細胞/mm²~ 1.3×10^3 細胞/mm²の密度で配置する、[8]又は[9]に記載の人工腹膜組織の製造方法。

[11] 前記細胞外マトリックスが、フィブロネクチン及びゼラチンを少なくとも含む、[8]から[10]のいずれかに記載の人工腹膜組織の製造方法。

[12] 前記細胞外マトリックスが、第1物質及び第2物質を含み、前記第1物質と前記第2物質との組み合わせが以下からなる群から選択される、

[8]から[10]のいずれかに記載の人工腹膜組織の製造方法：

- (a) フィブロネクチン及びゼラチン；
- (b) フィブロネクチン及びε-ポリリジン；
- (c) フィブロネクチン及びヒアルロン酸；
- (d) フィブロネクチン及びデキストラン硫酸；
- (e) フィブロネクチン及びヘパリン；ならびに
- (f) ラミニン及びゼラチン。

[13] 前記第1物質と前記第2物質との組み合わせがフィブロネクチン及びゼラチンである、[12]記載の人工腹膜組織の製造方法。

[14] [1] から [7] のいずれかに記載の人工腹膜組織を製造する、
[8] から [13] のいずれかに記載の人工腹膜組織の製造方法。

[0062] 以下、実施例を用いて本開示をさらに説明する。ただし、本開示は以下の実施例に限定して解釈されない。

[0063] なお、本明細書において、以下の略語を使用する。

50mM Tris-HCl (pH7.4) : HCl (Nacalai Tesque社製) でpH7.4に調整した50mM Trisを、オートクレーブ(121℃、20分)で湿熱滅菌したもの

BFN: Fibronectin from bovine plasma (Sigma-Aldrich社製)

FN液: 0.04mg BFN / 1ml 50mM Tris-HCl (pH7.4) G液: 0.04mg Gelatin / 1ml 50mM Tris-HCl (pH7.4)

実施例

[0064] [被覆細胞の作製]

特開2012-115254号公報の記載に基づき被覆細胞を調製した。

<正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) >

細胞はNHDF、細胞外マトリックス成分はフィブロネクチン (FN) 及びゼラチン (G) を使用した。細胞をFN液及びG液に交互に計9回浸漬させることによって、表面に (FN/G)₄ FN膜が形成された被覆NHDFを作製した (被膜の厚み: 約10nm)。FN液の浸漬は5回、G液の浸漬は4回行った。なお、被膜の厚みは特開2012-115254号公報の実施例に記載の方法により測定した。

<ヒト臍帯静脈血管内細胞 (HUVEC) >

NHDFに替えてHUVECを使用した以外は、上記と同様にして (FN/G)₄ FN膜が形成された被覆HUVECを作製した (被膜の厚み: 約10nm)。

<ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) >

NHDFに替えてHDLECを使用した以外は、上記と同様にして(FN/G)₄FN膜が形成された被覆HDLECを作製した(被膜の厚み:約10nm)。

[0065] (実施例1)

[血管網構造を有する人工腹膜組織の作製]

培養器として、有孔ポリエステルメンブラン(孔径:0.4μm)を備えるインサート及び24ウェルマルチプレートを準備した。インサート底面にBFNをコーティングした後、被覆NHDFを4×10⁵細胞/well播種し、6時間培養し、NHDF層(4層)を作製した。NHDF層上に被覆HUVECを1×10⁵細胞/well播種し、6時間培養した(HUVEC層:1層)。HUVEC層上に被覆NHDFを4×10⁵細胞/well播種し、6時間培養し、HUVEC層上にNHDF層(4層)を作製した。HUVEC層上に作製したNHDF層の上に、ヒト大網由来中皮細胞を5×10⁴細胞/well(1.3×10³細胞/mm²)播種し、5日間培養して人工腹膜組織を得た。得られた人工腹膜組織を図1に示す。なお、培地は10%FBS含有DMEMを使用し、培養は5%CO₂、37℃で行った。得られた人工腹膜組織は厚みが45μmであった。また、細胞組織の厚みは42μm、毛細血管様構造の径は18μm、中皮細胞層の厚みは3μmであった。これらの厚みは免疫染色像により測定した。

[0066] 図1Aは光学顕微鏡画像であり、図1B~Fは透過型電子顕微鏡画像である。図1A~Fにおいて、BVは毛細血管様構造、MCは中皮細胞、Fbは線維芽細胞、及びECMは細胞外マトリックスをそれぞれ示す。図1Aの矢印は、中皮細胞によるシート構造を示す。図1A~Fに示すように、得られた人工腹膜組織は、血管内皮細胞により形成された管腔と線維芽細胞及び細胞外マトリックスを含む結合組織層とを有し、結合組織層の表面が一層の中皮細胞で覆われた構造であることが確認でき、生体の腹膜と類似する構造を示していた。図1Cの矢印で示すように、隣接する中皮細胞間に接着構造が確認できた。また、図1Dに示すように、中皮細胞層の表面には微絨毛が確

認できた。図1 Eに示すように、管腔を形成する血管内皮細胞は、重なり合うように細胞同士が接着し、その部分で細胞間接着（図中矢印）が行われていることが示唆された。図1 Fは管腔を形成する血管内皮細胞の一部の拡大図である。図1 Fに示すように、管腔の内壁は、生体の毛細血管壁に多く分布する小胞様構造（図中矢頭）に富むことが確認できた。

[0067] （実施例2）

[リンパ管網構造を有する人工腹膜組織の作製]

被覆H U V E Cに替えて被覆H D L E Cを用いた以外は実施例1と同様にして人工腹膜組織を作製した。得られた人工腹膜組織を図2に示す。得られた人工腹膜組織は厚みが44 μm であった。また、細胞組織の厚みは41 μm 、リンパ管様構造の径は13 μm 、中皮細胞層の厚みは3 μm であった。図2 Aは光学顕微鏡像、B～Dは透過型電子顕微鏡画像である。図2 A～Dにおいて、Lはリンパ管様構造、F bは線維芽細胞、及びE C Mは細胞外マトリックスをそれぞれ示す。図2 Aの矢印は、中皮細胞によるシート構造を示す。得られた人工腹膜組織は、リンパ管内皮細胞により形成された管腔と線維芽細胞及び細胞外マトリックスを含む結合組織層とを有し、図2 Aに示すように、結合組織層の表面が一層の中皮細胞で覆われた構造であることが確認できた。図2 B～Dに示すように、リンパ管内皮細胞により形成された管腔は、リンパ管内皮細胞同士が接着する部分（図2 Bの矢印）と、リンパ管内皮細胞が解離している部分（図2 Dの矢印）とが確認され、生体の毛細リンパ管に近い構造であることが確認できた。

[0068] 同様の方法で、ヒト大網由来中皮細胞の代わりに長期継代培養可能な中皮細胞株を用いても、血管網構造を有する人工腹膜組織およびリンパ管網構造を有する人工腹膜組織を作製することができた。

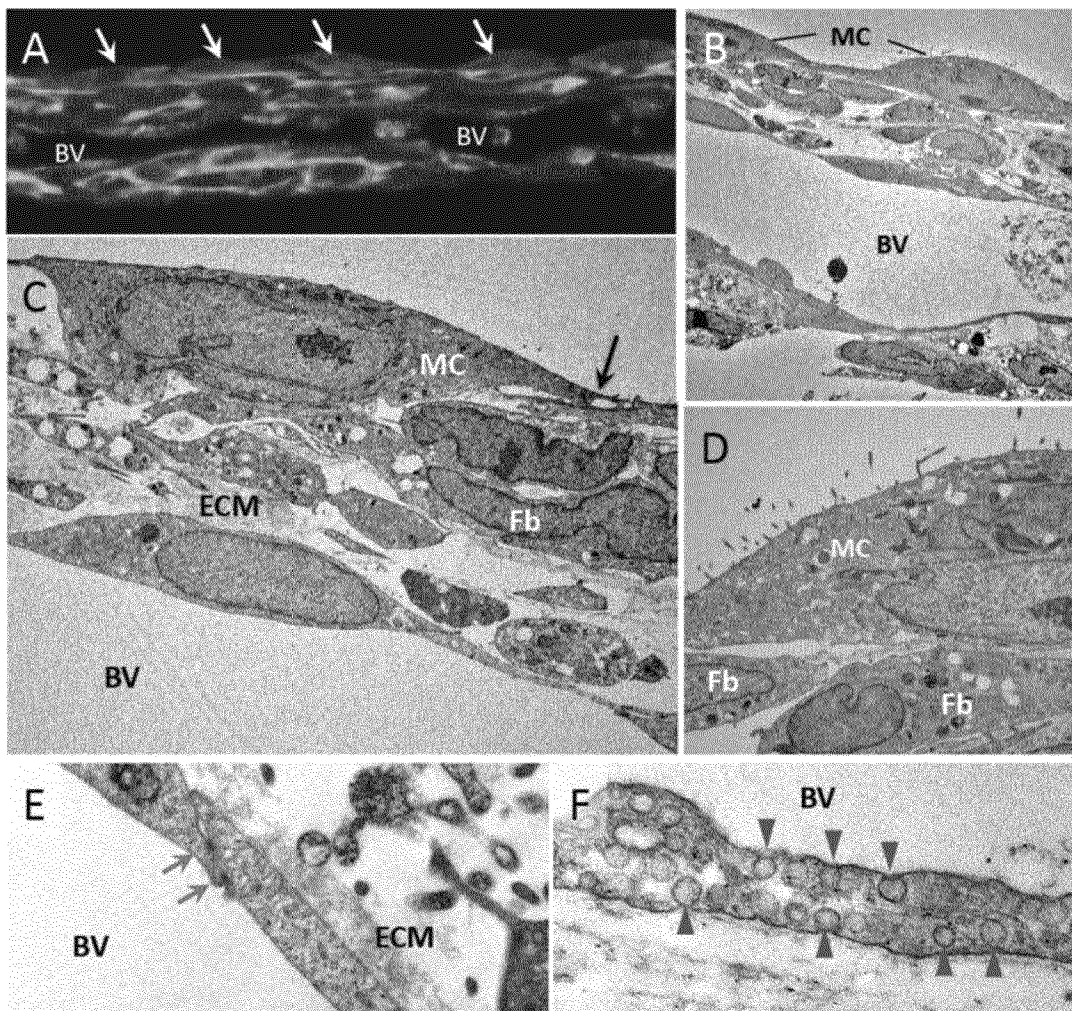
請求の範囲

- [請求項1] 線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える、人工腹膜組織。
- [請求項2] 前記管腔が、毛細血管様構造及びリンパ管様構造の少なくとも一方である、請求項1記載の人工腹膜組織。
- [請求項3] 前記中皮細胞層が被蓋構造を形成し、前記中皮細胞は前記線維芽細胞と前記毛細血管様構造及び前記リンパ管様構造の少なくとも一方からなる組織に細胞外マトリックスを介して結合した、請求項2記載の人工腹膜組織。
- [請求項4] 前記中皮細胞層の表面に微絨毛を有する、請求項1から3のいずれかに記載の人工腹膜組織。
- [請求項5] 前記細胞外マトリックスが、フィブロネクチン及びゼラチンを少なくとも含む、請求項1から4のいずれかに記載の人工腹膜組織。
- [請求項6] 線維芽細胞、細胞外マトリックス、並びに管腔を形成する血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を含む細胞組織と、前記細胞組織の表面を覆う中皮細胞層とを備える人工腹膜組織の製造方法であって、血管内皮細胞及びリンパ管内皮細胞の少なくとも一方と線維芽細胞と細胞外マトリックスとを培養して前記細胞組織を形成すること、及び前記細胞組織上に中皮細胞を配置することを含む、人工腹膜組織の製造方法。
- [請求項7] 細胞組織の形成が、細胞外マトリックスで被覆された線維芽細胞を配置することを含む、請求項6記載の人工腹膜組織の製造方法。
- [請求項8] 前記中皮細胞が、 $5 \cdot 2 \times 10^2$ 細胞/ $\text{mm}^2 \sim 1 \cdot 3 \times 10^3$ 細胞/ mm^2 の密度で配置される、請求項6又は7に記載の人工腹膜組織の製造方法。
- [請求項9] 前記細胞外マトリックスが、フィブロネクチン及びゼラチンを少なくとも含む、請求項6から8のいずれかに記載の人工腹膜組織の製造

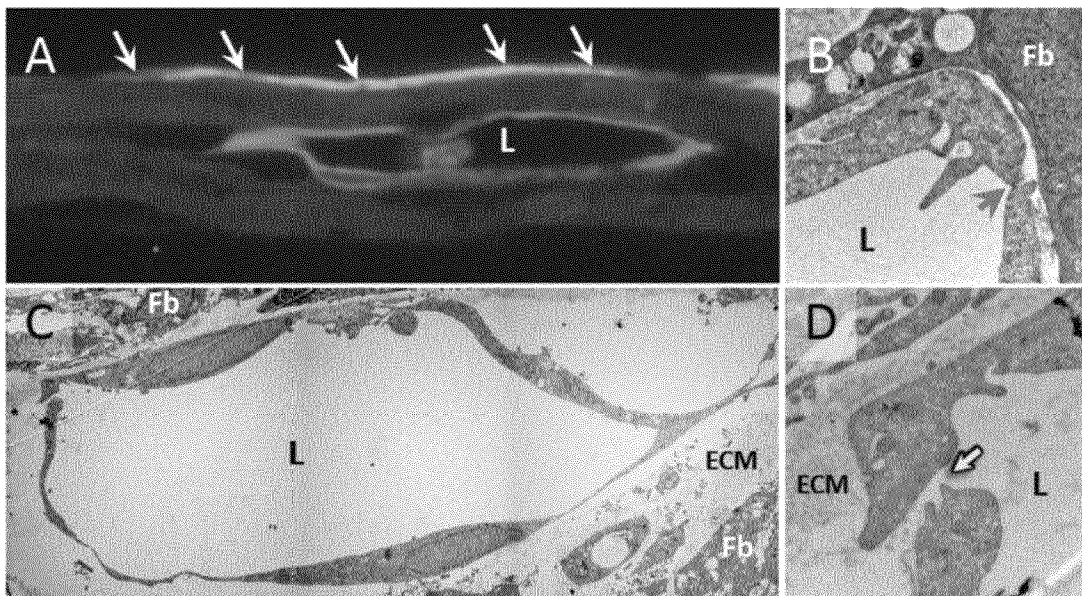
方法。

[請求項10] 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の人工腹膜組織を製造する、請求項 6 から 9 のいずれかに記載の人工腹膜組織の製造方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/073888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/071(2010.01) i, C12N11/02(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/071, C12N11/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUGA, H., et al., Construction of a Transplantable Tissue-Engineered Artificial Peritoneum, Eur. Surg. Res., 2004, 36, pp.323-330, particularly, summary, fig. 1 to 5	1-10
Y	SCHILTE, M.N., et al., FACTORS CONTRIBUTING TO PERITONEAL TISSUE REMODELING IN PERITONEAL DIALYSIS, Peritoneal Dialysis International, 2009, 29, pp.605-617, particularly, summary, fig. 1 to 2	1-10
Y	IWANICKI, M.P., et al., Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium, Cancer Discovery, 2011, 1(2), pp.144-157, particularly, summary, fig. 2, 7	1-10

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 17 November 2015 (17.11.15)	Date of mailing of the international search report 01 December 2015 (01.12.15)
--	---

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/JP2015/073888

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-77026 A (Terumo Corp.), 29 March 2007 (29.03.2007), paragraph [0005] (Family: none)	1-10
Y	PAOLO, N.D., et al., ATLAS OF PERITONEAL HISTOLOGY in Normal Conditions and During Peritoneal Dialysis, Peritoneal Dialysis International, 2000, 20(suppl.3), pp.S5-S96, particularly, page S9, left column, lines 1 to 16, fig. 8, 23	1-10
Y	JP 2005-608 A (Mitsuo OKANO), 06 January 2005 (06.01.2005), particularly, claims; examples (Family: none)	1-10
Y	WO 2014/115776 A1 (The University of Tokyo), 31 July 2014 (31.07.2014), particularly, claims; examples (Family: none)	1-10
Y	JP 2007-228921 A (Osaka University), 13 September 2007 (13.09.2007), particularly, claims; examples & US 2007/0207540 A1 particularly, claims; examples	1-10
Y	JP 2012-115254 A (Osaka University), 21 June 2012 (21.06.2012), particularly, claims; examples (Family: none)	1-10
Y	NISHIGUCHI, A., et al., Effects of angiogenic factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich cultures, Biomaterials, 2014.03.18, 35, pp.4739-4748, particularly, summary, fig. 1 to 7	1-10
Y	ASANO, Y., et al., Ultrastructure of blood and lymphatic vascular networks in three- dimensional cultured tissues fabricated by extracellular matrix nanofilm-based cell accumulation technique, Microscopy, 2014.06, 63(3), pp.219-226, particularly, summary, fig. 1 to 6	1-10
P,A	KAWANISHI, K., et al., Therapeutic Applications of Mesothelial Cell Sheets, Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2014.09.04, 19(1), pp.1-7	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/073888

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	Yoshiya ASANO et al., "Saibo Shusekiho ni yoru Sanjigen Jinko Fukumaku Model no Kaihatsu", Hirosaki Medical Journal, 06 April 2015 (06.04.2015), 66(1), page 94, ISSN 0439-1721, entire text	1-10
T	Yoshiya ASANO et al., "Three-dimensionally Fabricated Artificial Peritoneum Equipped with Blood and Lymphatic Capillary Networks", Kagaku Kogyo, 01 November 2015 (01.11.2015), 66(11), pages 824 to 830, ISSN 0451-2014	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N11/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/071, C12N11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2015年
 日本国実用新案登録公報 1996-2015年
 日本国登録実用新案公報 1994-2015年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
 CAplus/ MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KUGA, H., et al., Construction of a Transplantable Tissue-Engineered Artificial Peritoneum, Eur. Surg. Res., 2004, 36, pp.323-330, 特に要旨, 図1-5	1-10
Y	SCHILTE, M.N., et al., FACTORS CONTRIBUTING TO PERITONEAL TISSUE REMODELING IN PERITONEAL DIALYSIS, Peritoneal Dialysis International, 2009, 29, pp.605-617, 特に要旨, 図1-2	1-10

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

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 17.11.2015	国際調査報告の発送日 01.12.2015
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 荒木 英 則 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9736
--	--	----	------

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
Y	IWANICKI, M.P., et al., Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium, Cancer Discovery, 2011, 1(2), pp.144-157, 特に要旨, 図2, 図7	1-10
Y	JP 2007-77026 A (テルモ株式会社) 2007.03.29, 【0005】 (ファミリーなし)	1-10
Y	PAOLO, N.D., et al., ATLAS OF PERITONEAL HISTOLOGY in Normal Conditions and During Peritoneal Dialysis, Peritoneal Dialysis International, 2000, 20(suppl.3), pp.S5-S96, 特にS9 ページ左欄 1-16行, 図8、図23	1-10
Y	JP 2005-608 A (岡野光夫) 2005.01.06, 特に特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 2014/115776 A1 (国立大学法人東京大学) 2014.07.31, 特に請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2007-228921 A (国立大学法人大阪大学) 2007.09.13, 特に特許請求の範囲, 実施例 & US 2007/0207540 A1, 特に請求の範囲, 実施例	1-10
Y	JP 2012-115254 A (国立大学法人大阪大学) 2012.06.21, 特に特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	NISHIGUCHI, A., et al., Effects of angiogenic factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich cultures, Biomaterials, 2014.03.18, 35, pp.4739-4748, 特に要旨, 図1-7	1-10
Y	ASANO, Y., et al., Ultrastructure of blood and lymphatic vascular networks in three-dimensional cultured tissues fabricated by extracellular matrix nanofilm-based cell accumulation technique, Microscopy, 2014.06, 63(3), pp.219-226, 特に要旨, 図1-6	1-10
PA	KAWANISHI, K., et al., Therapeutic Applications of Mesothelial Cell Sheets, Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2014.09.04, 19(1), pp.1-7	1-10

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	浅野義哉ら, 細胞集積法による三次元人工腹膜モデルの開発, 弘前医学, 2015. 04. 06, 66(1), p. 94, ISSN 0439-1721, 全文	1 - 1 0
T	浅野義哉ら, 血管・リンパ管ネットワークを有する三次元人工腹膜 組織, 化学工業, 2015. 11. 01, 66(11), pp. 824-830, ISSN 0451-2014	1 - 1 0