



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202016288 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：108123011

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01)

C12N5/00 (2006.01)

C07K14/78 (2006.01)

(30)優先權：2018/06/29 日本

2018-125164

(71)申請人：國立研究開發法人量子科學技術研究開發機構(日本) NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (JP)

日本

(72)發明人：田口光正 TAGUCHI, MITSUMASA (JP)；大山智子 OYAMA, TOMOKO (JP)；木村敦 KIMURA, ATSUSHI (JP)；大山廣太郎 OYAMA, KOTARO (JP)；石原弘 ISHIHARA, HIROSHI (JP)；下川卓志 SHIMOKAWA, TAKASHI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：14 共 74 頁

(54)名稱

細胞培養用水凝膠、凝膠套組、細胞培養物之製造方法、及細胞培養用水凝膠之製造方法

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種於將水凝膠用於支架之細胞培養中，可降低因混入至支架之原料中之未詳之生長因子所產生之增殖活性，且控制基因表現之技術。

本發明提供一種細胞培養用水凝膠，其細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1 活性換算計為 100 pg/mL 以下，彈性模數為 0.1 ~ 500 kPa，且具有親水性高分子之放射線交聯結構。



202016288

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細胞培養用水凝膠、凝膠套組、細胞培養物之製造方法、及細胞培養用水凝膠之製造方法

【中文】

本發明之課題在於提供一種於將水凝膠用於支架之細胞培養中，可降低因混入至支架之原料中之未詳之生長因子所產生之增殖活性，且控制基因表現之技術。

本發明提供一種細胞培養用水凝膠，其細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1活性換算計為100 pg/mL以下，彈性模數為0.1～500 kPa，且具有親水性高分子之放射線交聯結構。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞培養用水凝膠、凝膠套組、細胞培養物之製造方法、及細胞培養用水凝膠之製造方法

【技術領域】

【0001】

本發明係關於一種細胞培養用水凝膠、凝膠套組、細胞培養物之製造方法、及細胞培養用水凝膠之製造方法。

【先前技術】

【0002】

藉由細胞培養用支架材料控制細胞之基因表現之技術之開發於再生醫學或藥物開發、癌症治療領域中成為緊要之課題。於細胞培養中通常使用之塑膠或玻璃皿之情形時，由於與生物體內環境相差較遠，故而存在培養細胞之形質不同於生物體內細胞之課題。因此，為了於更接近之生物體內環境中進行細胞培養，現在使用於塑膠或玻璃等市售之基材塗佈以聚丙烯醯胺凝膠等合成樹脂作為主體之高分子凝膠而成者(使硬度接近生物體內軟組織而成者)、或於其上塗佈膠原蛋白等蛋白質而成者(於化學組成上模擬生物體內環境而成者)等。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

【0003】

[非專利文獻1]田口光正、「藉由新材料明膠凝膠所實現之對再生醫學之挑戰-運用量子束微細加工技術之細胞操作元件之開發-」、放射線利用

論壇2017 in 高崎(2017)

[非專利文獻2]A. J. Engler et al., "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." Cell, 126, 677 (2006)

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0004】

然而，若使用市售之支架材料(塗佈劑)進行細胞培養，則存在不同批次之細胞培養結果不同，產生再現性較低之不良情況之情形。進而，若於支架材料之製造時使用交聯劑，則存在於支架材料中殘存未反應之單體或交聯劑之情形，被指出存在該未反應之交聯劑溶出至細胞培養培養基中而產生細胞毒性之虞。

【0005】

本發明係鑒於上述狀況而成者，其目的在於提供一種於將水凝膠用於支架之細胞培養中，可降低因混入至支架之原料中之未詳之生長因子所產生之增殖活性，且控制基因表現之技術。

[解決問題之技術手段]

【0006】

本發明人對起因於上述細胞培養支架材料(市售之塗佈劑)之批次差而導致細胞培養結果之再現性降低之現象進行了銳意研究，結果確認：存在於上述塗佈劑中混入生長因子之情形，該生長因子之種類及其活性對細胞培養結果產生較大影響。並且，確立了藉由放射線照射而降低支架材料中之生長因子之活性且形成支架之方法、以及細胞培養物之製造方法。

【0007】

再者，以下，所謂本發明中之「生長因子」，係與作為對細胞培養結果產生影響之因子之「細胞增殖因子」表示相同含義，具體而言，可例示纖維母細胞增殖因子-1等。

【0008】

根據本發明，提供以下之發明。

【0009】

(1)一種細胞培養用水凝膠，其細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1活性換算計為100 pg/mL以下，

彈性模數為0.1～500 kPa，且

具有親水性高分子之放射線交聯結構。

【0010】

(2)如(1)中記載之細胞培養用水凝膠，其中上述細胞增殖活性以NIH-3T3細胞之使用細胞計數套組(Cell Counting Kit)-8之28小時培育中之增殖活性而言，與藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠相比未達105%。

【0011】

(3)如(1)或(2)中記載之水凝膠，其中上述親水性高分子為蛋白質。

【0012】

(4)如(1)至(3)中任一項記載之水凝膠，其相對於上述水凝膠，包含1質量%以上且30質量%以下之選自由膠原蛋白、膠原蛋白肽、及明膠所組成之群中之1種以上。

【0013】

(5)如(1)至(4)中任一項記載之水凝膠，其於表面具有凹部及/或平行

溝。

【0014】

(6)如(1)至(5)中任一項記載之水凝膠，其係用以後續添加與上述水凝膠不同體之生理活性因子。

【0015】

(7)如(1)至(5)中任一項記載之水凝膠，其調配有選自由分化誘導因子、接著因子、趨化性因子及細胞外基質所組成之群中之1種以上之因子。

【0016】

(8)一種凝膠套組，其包含如(1)至(5)中任一項記載之水凝膠、及與上述水凝膠不同體之生理活性因子。

【0017】

(9)一種細胞培養物之製造方法，其藉由使細胞與如(1)至(5)中任一項記載之水凝膠接觸而培養細胞。

【0018】

(10)如(9)中記載之製造方法，其中作為上述水凝膠，選擇具有對應於所需之基因表現之彈性模數及/或表面形狀之水凝膠而使用。

【0019】

(11)如(10)中記載之製造方法，其中上述基因表現係與細胞之分化相關之基因表現、或與細胞之生長相關之基因表現。

【0020】

(12)如(9)至(11)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為黑色素產生細胞。

【0021】

(13)如(9)至(11)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為來自腹腔之吞噬細胞。

【0022】

(14)如(9)至(11)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為心肌細胞。

【0023】

(15)如(9)至(11)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為乳癌細胞。

【0024】

(16)如(9)至(11)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為子宮癌細胞。

【0025】

(17)如(9)至(16)中任一項記載之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為細胞塊。

【0026】

(18)一種細胞培養用水凝膠之製造方法，其係細胞培養用水凝膠之製造方法，且

包括對包含親水性高分子0.1～70質量%之水溶液

照射劑量1～1000 kGy之放射線之照射步驟，

上述照射後之水凝膠之細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1活性換算計為100 pg/mL以下，

上述照射後之水凝膠之彈性模數為0.1～500 kPa，

上述照射後之水凝膠具有親水性高分子之放射線交聯結構。

【0027】

(19)如(18)中記載之細胞培養用水凝膠之製造方法，其中上述照射後之水凝膠之上述細胞增殖活性以NIH-3T3細胞之使用細胞計數套組-8之28小時培育中之增殖活性而言，與藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠相比未達105%。

【0028】

(20)如(18)或(19)中記載之製造方法，其中上述包含親水性高分子之水溶液包含細胞增殖因子0以上且1000 ng/mL以下。

【0029】

(21)如(18)至(20)中任一項記載之製造方法，其進而包含繼上述照射步驟之後將pH值調整至6～8之pH值調整步驟。

【0030】

(22)如(21)中記載之製造方法，其中上述pH值調整步驟係使用緩衝溶液、培養基、及水之任一者之調整步驟。

【0031】

(23)如(18)至(22)中任一項記載之製造方法，其進而包含按壓表面具有特定之間隔之平行溝之壓模之表面加工步驟。

【0032】

(24)如(18)至(23)中任一項記載之製造方法，其中上述親水性高分子為蛋白質。

【0033】

(25)如(18)至(24)中任一項記載之製造方法，其中上述照射後之水凝

膠相對於該水凝膠，包含1質量%以上且30質量%以下之選自由膠原蛋白、膠原蛋白肽、及明膠所組成之群中之1種以上。

【0034】

(26)如(18)至(25)中任一項記載之製造方法，其進而包含於上述照射後添加生理活性因子之步驟。

[發明之效果]

【0035】

根據本發明，提供一種穩定地控制細胞培養中之基因表現而製造細胞培養物之製造技術。

【圖式簡單說明】

【0036】

圖1係表示 γ 射線劑量與彈性模數之關係之圖。

圖2係表示FGF1添加量與增殖活性之關係之圖。

圖3係表示FGF1添加量與增殖活性之關係之圖。

圖4係表示FGF1添加量與增殖活性之關係之圖。

圖5(a)～(c)係表示來自小鼠腹腔之吞噬細胞培養中之分化控制之圖。

圖6(a)～(d)係表示來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10細胞培養中之形態控制之圖。

圖7(a)～(e)係表示來自人子宮頸癌之HeLa細胞培養中之形態控制之圖。

圖8係表示來自人子宮頸癌之HeLa細胞培養中之增殖率之圖。

圖9係表示放射線照射後之pH值調整處理對水凝膠中之FGF1濃度產

生之影響之圖。

圖10係表示有無對包含FGF1之水凝膠進行放射線照射後之pH值調整處理對使用水凝膠之細胞培養後之細胞增殖活性產生之影響之圖。

圖11係表示放射線照射之劑量對水凝膠中之高分子濃度產生之影響之圖。

圖12(A)~(C)係表示對本發明之一態樣之水凝膠後添加層黏連蛋白之結果之圖。

圖13係表示使用本發明之一態樣之水凝膠培養來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10細胞之結果之圖。

圖14係表示使用本發明之一態樣之水凝膠培養來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10細胞之結果之圖。

【實施方式】

【0037】

以下，對本發明之實施形態進行說明。

【0038】

(1)細胞培養用水凝膠

本發明之細胞培養用水凝膠(細胞培養支架用水凝膠)係細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1活性換算計為100 pg/mL以下，並且彈性模數為0.1~500 kPa，且具有親水性高分子之放射線交聯結構之細胞培養用水凝膠。

以下，亦將本發明之細胞培養用水凝膠簡稱為「本發明之水凝膠」。

【0039】

於本發明中，所謂水凝膠，係內包水，且硬化為凝膠狀者，係例如

蛋白質等親水性高分子之構成分子以相互架橋之方式進行交聯而構成。如下所述，藉由放射線進行之交聯係利用放射線所具有之固有之較高能量者，由於無需所謂交聯劑(例如亦稱為熱交聯劑(聚合起始劑)、紫外線交聯劑(光聚合起始劑))，故而構成完全不含交聯劑之放射線交聯結構。

藉由具有該放射線交聯結構，即便於放置於細胞培養條件下之情形時，亦可保持水凝膠狀態。

【0040】

作為上述水凝膠，典型而言，可較佳地使用10質量%以上(較佳為30質量%以上)之含水率者。含水率之上限並無特別限定，例如只要於99質量%以下適當設定即可。

【0041】

又，作為上述水凝膠，可較佳地使用相對於水凝膠之親水性高分子之含量例如為1質量%以上、較佳為3質量%以上者。相對於水凝膠之親水性高分子之含量之上限並無特別限定，可較佳地使用例如為50質量%以下、較佳為40質量%以下者。

【0042】

(親水性高分子之放射線交聯結構)

所謂放射線交聯，並無特別限定，藉由放射線照射，於高分子鏈上產生活性點，使以此為起點之高分子鏈鍵結為X型或T型，藉此形成三維之網狀結構(network structure)。放射線交聯之特徵在於不使用交聯劑等添加劑，於室溫或其以下之溫度下進行，被應用於材料之凝膠化、耐熱性之提高、形狀記憶性之賦予等。

【0043】

又，親水性高分子係與公知之親水性高分子同樣者。具體而言，係指於分子中具有親水性基之高分子。

【0044】

作為上述親水性基，例如可例示羥基、胺基、羧基、醚基、醯基、磺基。即，上述親水性高分子係於分子中具有至少1個以上、較佳為2個以上之該親水性基之高分子。

【0045】

又，上述親水性高分子之分子量並無特別限定，例如只要適當選擇150至2,000,000之範圍之高分子而使用即可。典型而言，可適當選擇1,000至1,000,000之範圍之高分子而使用。再者，若為組成相同之高分子，則存在分子量越大，水凝膠之彈性模數越大之傾向。再者，於本說明書中，只要未特別說明，則「分子量」意指重量平均分子量。再者，該重量平均分子量只要藉由先前公知之尺寸排除層析圖而測定即可。

【0046】

作為上述親水性高分子，例如可列舉蛋白質、肽、多糖類、核酸等來自天然物之親水性高分子、或其衍生物。再者，所謂來自天然物，意指可藉由自天然物(地球資源、典型為生物、例如動物、植物、菌)進行提取或精製而獲取，並不限於其本身為天然物。例如，以來自天然物之提取物或精製物作為原料進行人工合成而成之合成蛋白質包含於上述來自天然物之親水性高分子(以下亦稱為天然高分子)。再者，此處所謂合成蛋白質包含以利用細胞之蛋白質合成系合成之蛋白質及以無細胞蛋白質合成系合成之蛋白質之任一者。

【0047】

作為上述來自天然物之親水性高分子之具體例，例如可列舉：糊精、葡聚糖、甲殼素、幾丁聚醣、瓊脂、瓊脂糖、結冷膠、三仙膠、刺梧桐樹膠、角叉菜膠、纖維素、澱粉等多糖類、膠原蛋白、明膠、血纖維蛋白、白蛋白、層黏連蛋白、角蛋白、卵白蛋白、肌凝蛋白、球蛋白、肽等蛋白質、DNA或RNA等核酸等。

再者，上述來自天然物之親水性高分子可僅使用單一之亞型作為水凝膠之原料，亦可組合複數種不同之亞型而作為水凝膠之原料。例如膠原蛋白已知有I型膠原蛋白、II型膠原蛋白、III型膠原蛋白、IV型膠原蛋白、V型膠原蛋白等亞型。因此，可組合該等亞型中之1種或2種以上之亞型之膠原蛋白而使用。I型膠原蛋白於生物體內存在最多，故而就可相對廉價地獲取之方面而言較佳。又，IV型膠原蛋白係存在於皮膚之基底膜之膠原蛋白，就可相對簡便地獲取之方面而言較佳。

此處，所謂上述蛋白質，意指複數個胺基酸藉由肽鍵進行鍵結而成之高分子，不受構成該蛋白質之胺基酸之個數限定。例如，包含含有2個或3個以上之胺基酸之肽。再者，於本說明書中特別提及「肽」之情形時，係指包含2個以上且2,000個以下之胺基酸之高分子。

【0048】

又，作為上述來自天然物之親水性高分子(天然高分子)之衍生物，並無特別限定，例如可列舉以低級烷基、低級烷氧基烷基、或羥基低級烷基對該來自天然物之高分子進行取代而成之衍生物。具體而言，可例示選自由低級烷基取代纖維素衍生物、低級烷氧基烷基取代纖維素衍生物、羥基低級烷基取代纖維素衍生物、低級烷氧基烷基取代幾丁聚醣衍生物、低級烷氧基烷基取代甲殼素衍生物、低級烷氧基烷基取代澱粉衍生物及低級烷

氧基烷基取代角叉菜膠衍生物所組成之群中之天然高分子衍生物。

【0049】

再者，上述親水性高分子亦可為人工合成之合成高分子(合成樹脂)。可無特別限制地使用先前公知之親水性高分子，例如可列舉選自由聚環氧乙烷、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、聚丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺及聚乙二醇所組成之群中之合成高分子。或又，具有人工設計之序列之高分子亦可包含於該合成分子。例如，可列舉具有人工設計之序列之人工蛋白質(包含肽)、核酸、多糖。

【0050】

上述水凝膠可為上述親水性高分子中之僅1種相互交聯(鍵結)而成者，亦可為2種或3種以上之親水性高分子相互交聯(鍵結)而成者。

【0051】

雖無特別限定，但就實現於接近對象細胞之生存環境之環境中之培養之觀點而言，若為以培養來自動物之細胞之目的使用之情形，則較佳為選擇來自動物之親水性高分子或其衍生物，更佳為自生物體(動物生物體)進行提取或精製而獲得之親水性高分子(以下亦稱為來自生物體之高分子)或其衍生物。例如，可採用自生物體提取之精製度較低之蛋白質材料作為上述親水性高分子。具體而言，可使用複數種亞型之膠原蛋白之混合物、或例如膠原蛋白與層黏連蛋白之複數種蛋白質之混合物、或例如蛋白質與多糖類、蛋白質與核酸之不同高分子之混合物作為細胞培養支架用水凝膠之原料高分子。

例如，於將在上述細胞培養支架用水凝膠上培養之細胞移植至生物體內之情形時，考慮到移植用之細胞群中混入支架用水凝膠之可能性，較

佳為選擇生物體相容性之親水性高分子。作為該生物體相容性之親水性高分子，例如可列舉上述來自生物體之高分子。例示為明膠、膠原蛋白之以蛋白質為主體之高分子可藉由移植體(供體)之膠原蛋白酶或蛋白酶等酶而分解、吸收，故而作為用以培養移植用細胞之支架用水凝膠之原料而較佳。

【0052】

(彈性模數)

彈性模數(以下有時為了方便起見而稱為硬度)係藉由依據JIS K 6272等之公知之應力-應變(Stress-Strain)曲線之測定方法而定義者，例如藉由壓縮彈性模數而測定。即，本發明之水凝膠係包含壓縮彈性模數為0.1～500 kPa之水凝膠者。若為以哺乳動物之細胞作為對象之細胞培養支架用水凝膠，則可較佳地使用壓縮彈性模數較佳為1 kPa～200 kPa、更佳為3 kPa～60 kPa之範圍之水凝膠。

【0053】

培養細胞係自生物體內之各種組織分離出之細胞。此處，組織之彈性模數各不相同，已知若為骨則為GPa以上，若為軟骨則為MPa以上(例如1～100MPa左右)，若為軟組織則為0.1～500 kPa(例如50 kPa左右)。即，為了於接近活體內之環境中培養對象之培養細胞，要求使用反映該對象細胞之來源組織之彈性模數之彈性模數之支架材料進行活體外培養。

【0054】

換言之，於欲於細胞培養中培養所需之細胞之情形時，成為支架之水凝膠可配合分離出所需之細胞之來源組織之彈性模數而選擇其彈性模數。具體而言，壓縮彈性模數為0.1～500 kPa之本發明之水凝膠適於培養

來自神經或肌肉等軟組織之細胞。

【0055】

(細胞增殖活性)

又，本發明之細胞培養支架用水凝膠係降低天然高分子基材(以下有時以蛋白質進行例示)中所含之生長因子之影響以可獲得穩定之細胞培養結果者。生長因子之影響可藉由使用纖維母細胞增殖因子-1(FGF1)作為評價用生長因子而定量地進行定義。

具體而言，本發明之水凝膠之細胞增殖活性以FGF1活性換算計為100 pg/mL以下，較佳為50 pg/mL以下、更佳為10 pg/mL以下。

【0056】

如上所述，生長因子之影響可藉由測定評價用細胞之增殖而定量地進行定義。例如，可以於使用NIH-3T3細胞系中評價之細胞增殖活性作為指標。具體而言，使用自胎鼠皮膚分離出之培養細胞即NIH-3T3細胞(以下有時稱為3T3細胞)作為評價用細胞之情形時之增殖活性與使用事先確認過無生長因子之活性(典型而言不含生長因子)之親水性高分子所製作之水凝膠相比可未達105%。

【0057】

上述親水性高分子中無生長因子之活性例如可藉由使用高效液相層析質譜分析裝置(LC-MS)等進行純度試驗而確認。又，可藉由利用報告分析(reporter assay)，確認有可能含有之生長因子之活性等方法而確認。

又，亦可使用藉由實施將親水性高分子暴露於酸性(或鹼性)之環境下、於高溫條件下進行加熱等失活處理而使有可能混入之生長因子之活性失去之高分子。例如，已知有藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原

蛋白(Nippi股份有限公司製造之Tri-D)藉由該酸處理而使生長因子之活性失去，故而可採用Tri-D膠原蛋白作為參考用之支架。

上述增殖活性可使用細胞增殖測定試劑(例如細胞計數套組-8，同仁化學研究所股份有限公司製造)而測定，亦可使用市售之細胞計數器對培養前後之細胞數進行測定、比較、或使用血球計算儀於顯微鏡下對培養前後之細胞數進行測定、比較。

又，用以評價上述增殖活性之細胞培養時間並無特別限定，例如只要以28小時之培養(於培育24小時之後進行4小時之顯色反應)進行評價即可。

【0058】

具體而言，可藉由在細胞培養支架用水凝膠上播種特定數(特定量)之特定之評價用細胞，並培養特定時間而評價。作為簡便之評價，可藉由測定特定波長下之基於吸光光度法之吸光度，而由事先求出之吸光度-細胞數之相關曲線圖(校準曲線)推定細胞數。此時，於細胞播種時，預先添加水溶性四唑鎢鹽(例如 $C_{20}H_{13}N_6O_{11}S_2Na$)，藉此可利用特定波長下之吸光度之增加測定伴隨於細胞增殖之還原反應，而再現性良好地評價細胞數之增加。該測定亦可使用普通銷售之測定套組、細胞計數套組-8(同仁化學研究所股份有限公司製造)而進行。又，吸光度之測定可使用微盤讀取器、吸光度計、分光光度計之任一者。

【0059】

於本發明之細胞培養支架用水凝膠中，使用3T3細胞作為評價用細胞，以5,000 cells/well之濃度對複數個孔各播種90 μ L，進行24小時預培養(培養條件：5%二氧化碳氛圍、37℃)。繼而，各添加10 μ L/well之包含

水溶性四唑鎢鹽溶液之細胞計數套組-8。其後，於培育箱內進行4小時正式培養，進行顯色反應(培養條件：5%二氧化碳氛圍、37℃)。繼而，藉由微盤讀取器測定450 nm之吸光度(合計培育28小時)。

此處，將利用同樣方法之由不含生長因子之高純度之天然高分子製作之凝膠(例如藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠)作為參考樣品，與該450 nm下之吸光度進行比較。若細胞增殖則吸光度增加，利用該事實，將合計培育28小時之樣品中之吸光度除以參考樣品之吸光度，以百分率(%)表示，藉此可定義增殖活性。本發明之細胞培養支架用水凝膠係藉由此種評價方法而定義者，係於28小時培育中具有未達105%之增殖活性者。

即，於本發明之細胞培養支架用水凝膠之較佳之一實施態樣中，NIH-3T3細胞之使用細胞計數套組-8之28小時培育中之增殖活性與藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠相比未達105%。

【0060】

再者，上述生長因子之影響亦可藉由使用纖維母細胞增殖因子-1(FGF1)作為評價用生長因子而定量地進行定義。例如，製作向所需之細胞培養支架用水凝膠中添加特定量之FGF1而成之參考用水凝膠，與利用上述參考用水凝膠將細胞培養特定時間時之細胞增殖率之校準曲線進行比較，藉此可將混入至目標之細胞培養支架用水凝膠中之生長因子之活性換算成FGF1量而評價。

或又，亦可以向培養液中添加FGF1進行培養時之細胞增殖率作為校準曲線進行比較，藉此將混入至目標之細胞培養支架用水凝膠中之生長因子之活性換算成FGF1量而評價。

【0061】

本發明之細胞培養支架用水凝膠降低成為基材之天然高分子中所含之生長因子之影響。具體而言，細胞增殖活性被抑制為以FGF1換算計為100 pg/mL以下之較低活性，因此可穩定地控制基因表現或分化狀態。較佳為若將上述定義下之增殖活性值抑制得較低而未達105%，則可更穩定地控制基因表現或分化狀態。

【0062】

如此般，本發明之水凝膠係具有適於所需之細胞培養之彈性模數，並且降低了親水性高分子基材中所含之生理活性因子(生長因子)之影響者，於用於細胞培養支架時，可穩定地控制基因表現或分化狀態。

尤其於使用來自天然物(典型而言來自生物體)之親水性高分子之蛋白質作為親水性高分子之情形時，蛋白質中所含之來自生物體之生理活性因子(生長因子)容易對培養結果產生影響，但本發明之水凝膠即便於使用上述蛋白質作為親水性高分子之情形時，亦降低來自生物體之生理活性因子(生長因子)之影響。

【0063】

[本發明之水凝膠之較佳之態樣]

以下，對本發明中較佳之態樣進行說明。

【0064】

作為較佳之一實施態樣，亦可於水凝膠之細胞培養面形成所需之形狀之凹凸。例如可為具有平行溝、凹部(大致圓狀之凹部等)、及該等之組合者。

此處，構成平行溝之溝可為直線，亦可為虛線。平行溝之間隔為任

意，可較佳地使用 $0.5 \sim 1000 \mu\text{m}$ 。平行溝之間隔可為一定，亦可為可變。平行溝凹部之深度為任意，可較佳地使用 $0.5 \sim 500 \mu\text{m}$ 。

上述凹部設為任意之形狀即可，例如可為點狀。可設為例如直徑 $10 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ 之大致圓形狀(典型而言為圓)。根據此種凹部，可將複數個細胞(例如細胞群、菌落、受精卵)補足於凹部而培養。

又，亦可形成例如直徑 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 之凹部。藉由將凹部之直徑設為該範圍，可限制能夠補足於該凹部之細胞數。亦可形成例如直徑 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 之凹部。

具有此種凹部之培養用支架可適當地用於以下目的：每1個凹部隔離、保持平均 $1 \sim 10$ 個左右(典型而言平均 $1 \sim 3$ 個、較佳為平均1個)之細胞進行培養。

【0065】

本發明之水凝膠適於細胞塊(橢球體(spheroid)、球體(sphere))培養。於用於細胞塊培養之情形時，可於本發明之水凝膠中設置對應於細胞塊之直徑之大小之凹部，例如可設置直徑 $50 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、直徑 $100 \sim 800 \mu\text{m}$ 、直徑 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 、直徑 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ 之凹部。關於凹部之深度，距水凝膠表面之最深距離可為 $10 \sim 1000 \mu\text{m}$ 。設置於水凝膠之凹部可為1個，亦可為複數個(例如 $2 \sim 10000$ 個)。於設置複數個凹部之情形時，相鄰之凹部彼此之間隔之最長距離可為 $10 \sim 10000 \mu\text{m}$ 。

【0066】

又，作為另一較佳之一實施態樣，亦可將水凝膠之彈性模數設為不均一。例如，可以於厚度方向變得不均一之方式進行設定。例如，可以由彈性模數不同之複數個水凝膠層構成之方式進行設定，亦可製成以如下方

式進行設定之梯度凝膠：將細胞培養面之彈性力設定得較低且於深度方向(厚度方向)彈性力變高。如此般，藉由以於厚度方向彈性模數變得不均一(典型而言降低細胞培養面之彈性模數)之方式進行設定，例如細胞容易滲入至水凝膠中，可實現立體培養。

或者，亦可以彈性模數於水平方向變得不均一之方式進行設定。例如，可設置彈性模數與周圍不同之部位，亦可製成以於特定方向彈性模數緩緩降低之方式進行設定之梯度凝膠。如此般，藉由以於水平方向彈性模數變得不均一之方式進行設定，例如可用於將喜好特定之彈性模數之支架之細胞分離之方法。

【0067】

又，作為另一較佳之一實施態樣，本發明之水凝膠可為包含較先前高濃度之高分子之凝膠。例如，相對於水凝膠，可包含1質量%以上且30質量%以下之高分子。具體而言，相對於本發明之水凝膠，可包含1質量%以上且30質量%以下之選自由膠原蛋白或明膠或膠原蛋白肽所組成之群中之1種以上。

上述濃度高於通常之中和膠原蛋白或市售之來自生物體提取物之水凝膠(基質膠等)中所含之濃度。根據本發明，藉由放射線照射，可獲得包含此種高濃度之高分子之水凝膠。

包含上述濃度之高分子之水凝膠可藉由使適當調整濃度之各高分子之溶液視需要進行空氣飽和後進行放射線照射而獲得。水凝膠之製造方法之條件可採用下述[(4)細胞培養用水凝膠之製造方法]中列舉者。

【0068】

[對本發明之水凝膠之各種生理活性因子之後添加]

藉由向本發明之水凝膠中添加(後添加)與該水凝膠不同體之生理活性因子，可選擇性地且以所需之程度對水凝膠賦予對應於所添加之成分之所需之作用。因此，本發明亦包含用以後續添加與水凝膠不同體之生理活性因子之水凝膠。再者，作為後添加至水凝膠中之生理活性因子，可例示細胞增殖因子、分化誘導因子、接著因子、趨化性因子、細胞外基質等，可添加選自該等中之1種以上。

【0069】

後添加至本發明之水凝膠中之細胞增殖因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：肝細胞增殖因子、來自血小板之生長因子、粒細胞菌落刺激因子、上皮生長因子、血管內皮細胞增殖因子、鹼性纖維母細胞增殖因子、胰島素用生長因子、轉化生長因子、神經生長因子、骨形成因子等。

【0070】

後添加至本發明之水凝膠中之分化誘導因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：活化素、TGF β 2、HGF(肝細胞生長因子)、Dex(地塞米松)、Rac1(RAS-相關C3肉毒桿菌毒素底物1)、Zfp521(鋅指蛋白521)等。

【0071】

後添加至本發明之水凝膠中之接著因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：整合素、腎連蛋白(nephronectin)、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白、肌腱蛋白(tenascin)、Fibulin、EMILIN、QBRICK、骨橋蛋白、polydom、MAEG、血纖維蛋白原等。

【0072】

後添加至本發明之水凝膠中之趨化性因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：CCL21、fMLP、白三烯B4、IL-8、C5a、白三烯B4(LTB4)、血小板活化因子(PAF)等。

【0073】

後添加之細胞外基質並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：膠原蛋白、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白、彈力蛋白、多糖類等。

【0074】

後添加至本發明之水凝膠中之生理活性因子(細胞增殖因子、分化誘導因子、接著因子、趨化性因子、細胞外基質等)之量等並無特別限定，根據後添加之因子之種類等適當選擇。

【0075】

本發明亦包含對上述本發明之水凝膠調配選自由分化誘導因子、接著因子、趨化性因子、及細胞外基質所組成之群中之1種以上之因子而成之水凝膠。該等分化誘導因子、接著因子、趨化性因子、及細胞外基質只要自作為後添加之生理活性因子所例示者中適當選擇而調配即可。

【0076】

[包含本發明之水凝膠之凝膠套組]

藉由向本發明之水凝膠中添加(後添加)與該水凝膠不同體之生理活性因子(例如細胞增殖因子及/或細胞外基質)，可選擇性地且以所需之程度對水凝膠賦予對應於所添加之成分之所需之作用。因此，本發明亦包含含有本發明之水凝膠、及與該水凝膠不同體之生理活性因子(例如細胞增殖因

子及/或細胞外基質)之凝膠套組。該等凝膠套組中所含之生理活性因子可例示細胞增殖因子、分化誘導因子、接著因子、趨化性因子、細胞外基質等，可為選自該等中之1種以上。

【0077】

可含於本發明之凝膠套組中之細胞增殖因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：肝細胞增殖因子、來自血小板之生長因子、粒細胞菌落刺激因子、上皮生長因子、血管內皮細胞增殖因子、鹼性纖維母細胞增殖因子、胰島素用生長因子、轉化生長因子、神經生長因子、骨形成因子等。

【0078】

可含於本發明之凝膠套組中之分化誘導因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：活化素、TGF β 2、HGF(肝細胞生長因子)、Dex(地塞米松)、Rac1(RAS-相關C3肉毒桿菌毒素底物1)、Zfp521(鋅指蛋白521)等。

【0079】

可含於本發明之凝膠套組中之接著因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：整合素、腎連蛋白、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白、肌腱蛋白、Fibulin、EMILIN、QBRICK、骨橋蛋白、polydom、MAEG、血纖維蛋白原等。

【0080】

可含於本發明之凝膠套組中之趨化性因子並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：CCL21、fMLP、白三烯B4、IL-8、C5a、白三烯B4(LTB4)、血小板活化因子(PAF)等。

【0081】

可含於本發明之凝膠套組中之細胞外基質並無特別限定，可列舉用於細胞培養等之任意之成分。作為此種成分，可列舉：膠原蛋白、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白、彈力蛋白、多糖類等。

【0082】

本發明之凝膠套組中之本發明之水凝膠、及與該水凝膠不同體之生理活性因子(例如細胞增殖因子及/或細胞外基質)之質量比等並無特別限定，根據凝膠套組之用途等而適當選擇。

【0083】

本發明之凝膠套組之使用方法並無特別限定，可於所需之時機向本發明之水凝膠中添加與該水凝膠不同體之生理活性因子(例如細胞增殖因子及/或細胞外基質)後，供給至下述細胞培養物之製造等。添加之方法等根據凝膠套組之用途、或生理活性因子(例如細胞增殖因子及細胞外基質)之種類等而適當選擇。

【0084】**(2)細胞培養物之製造方法**

本發明之細胞培養物之製造方法係藉由以本發明之水凝膠作為支架，與欲培養之細胞接觸而培養細胞之方法。尤其是作為水凝膠，較佳為選擇具有對應於所需之基因表現或分化狀態之彈性模數及/或表面形狀之水凝膠而使用。該基因表現可為與細胞之分化相關之基因表現、或與細胞之生長相關之基因表現。

【0085】

再者，所謂「對應於所需之基因表現或分化狀態之彈性模數及/或表

面形狀」，根據所表現之基因之種類而適當選擇。

例如，於所表現之基因為三聚氰胺基因之情形時，對應於用於基因表現之細胞之較佳之凝膠之彈性模數及表面形狀如以下所述。

於使用來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10細胞之情形時：水凝膠之彈性模數較佳為5～48 kPa，表面形狀較佳為平坦。

於使用來自人子宮頸癌之HeLa細胞之情形-1時：為了形成HeLa細胞橢球體，水凝膠之彈性模數較佳為1 kPa～30 kPa(更佳為大致5 kPa)，表面形狀較佳為平坦。

於使用來自人子宮頸癌之HeLa細胞之情形-2時：為了使HeLa細胞採用二維形態，水凝膠之彈性模數較佳為30 kPa～500 kPa左右(更佳為大致48 kPa)，表面形狀較佳為平坦。或者，水凝膠之彈性模數較佳為5 kPa～500 kPa以上左右(更佳為5 kPa～48 kPa)，表面形狀較佳為具有平行溝(較佳為溝之寬度為1 μm ～10 μm 之線狀凹凸、更佳為溝之寬度為5 μm 之線狀凹凸)。

【0086】

於支架用水凝膠上培養之細胞並無特別限定，可選擇所需之細胞。例如，可例示：來自人之細胞、來自人以外之哺乳類之細胞、來自哺乳類以外之動物之細胞、來自植物之細胞等。該細胞可為細胞株(cell line)或初代培養細胞，亦可為導入有特定之基因之基因導入細胞。例如，可於ES細胞或iPS細胞等多能性幹細胞之製造、或分化誘導中較佳地應用本發明之細胞培養支架用水凝膠。

【0087】

再者，此處所謂「細胞」不限定於單一細胞相互獨立而存在之狀

態，可包含複數個細胞集合而成之細胞群(例如細胞叢(cell cluster)、組織)。即，可於菌落培養、細胞塊(橢球體、球體)培養、組織培養等各種培養中利用本發明之水凝膠作為培養支架。

【0088】

如下述之實施例所示，可培養各種動植物之細胞，例如：黑色素產生細胞、來自腹腔之吞噬細胞、心肌細胞、神經細胞、肝臟細胞、腎臟細胞、胰臟細胞、幹細胞、抗體產生細胞、破骨細胞、上皮細胞、纖維母細胞、乳癌細胞、乳腺癌細胞、腦腫瘤細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、胰臟癌細胞、肌母細胞、各種幹細胞(ES細胞等)等。作為培養對象之細胞中可包含組織片等。

【0089】

具體而言，例如關於來自小鼠腹腔之吞噬細胞之培養，藉由使用具有16 kPa左右(典型而言為13~19 kPa左右)之彈性模數之水凝膠作為支架，可不進行分化而於未分化之情況下使細胞增殖，作為未分化細胞而製造。

又，例如關於來自人子宮頸癌之HeLa細胞之培養，藉由使用具有1~16 kPa前後之彈性模數之水凝膠作為支架，可使細胞三維地增殖，製造細胞塊(橢球體、球體)。

【0090】

培養細胞之環境可為公知之環境條件，例如可為5%CO₂、37℃之氛圍中之培養。又，作為培養裝置(環境裝置)，可使用公知之CO₂培育箱。

所培養之細胞培養物可利用公知之方法自上述支架分取。

【0091】

即，本發明可提供：黑色素產生細胞培養用之細胞培養支架用水凝膠、用以培養來自腹腔之未分化吞噬細胞之細胞培養用水凝膠、心肌細胞培養用之水凝膠、破骨細胞培養用之水凝膠、上皮細胞培養用之水凝膠、纖維母細胞培養用之水凝膠、乳癌細胞培養用之水凝膠、乳腺癌細胞培養用之水凝膠、腦腫瘤細胞培養用之水凝膠、子宮癌培養用之水凝膠、胰臟癌細胞培養用之水凝膠、iPS細胞培養用之水凝膠、ES細胞培養用之水凝膠、MUSE細胞培養用之水凝膠、幹細胞培養用之水凝膠、神經細胞培養用之水凝膠、血球細胞培養用之水凝膠、肌母細胞培養用之水凝膠。

【0092】

(3)細胞培養支架用水凝膠之前驅物

本發明之細胞培養支架用水凝膠之前驅物係包含親水性高分子、例如蛋白質0.1～70質量%之水溶液。

再者，上述前驅物中之親水性高分子之濃度並無特別限定，藉由對高濃度之前驅物照射放射線，每單位體積產生之放射線交聯之比率增大，故而彈性模數較高之水凝膠之含水率容易降低。因此，可根據所要求之彈性模數與含水率決定前驅物中之親水性高分子之濃度。

【0093】

水凝膠之前驅物亦可包含生理活性因子、例如生長因子。即，可提供即便於作為水凝膠之前驅物之水溶液中含有生理活性因子，亦可藉由放射線之作用而降低上述因子之活性之水凝膠。

【0094】

此處，作為上述親水性高分子，亦可使用來自天然物之高分子(天然高分子，典型而言為來自生物體之高分子)。所謂天然高分子，係指基於

上述定義者。例示為多細胞動物之細胞外基質中大量含有之膠原蛋白、或使膠原蛋白進行熱改性而成之明膠、膠原蛋白肽等。

【0095】

上述來自天然物之高分子存在包含來自生物體之生理活性因子(生長因子)之情況。尤其是來自生物體之親水性高分子、尤其是自生物體分離出之蛋白質存在包含生理活性因子(生長因子)之可能性。生長因子於前驅物進行交聯而形成水凝膠後亦以某種程度之量殘存，於將水凝膠用作支架之細胞培養中，成為使包含培養細胞之基因表現或分化狀態之細胞培養結果變得不穩定、或阻礙其之要素。

因此，作為基材，較佳為生長因子較少，換言之純度較高之高分子(例如蛋白質)。另一方面，為了大量精製高純度之蛋白質，亦存在耗費巨大成本之生產上之課題。

【0096】

再者，作為生長因子，包含促進細胞之增殖或分化之鹼性纖維母細胞增殖因子(basic fibroblast growth factor：bFGF或FGF2)、上皮生長因子(Epidermal growth factor：EGF)、類胰島素生長因子(Insulin-like growth factor：IGF)、轉化生長因子(Transforming growth factor：TGF)、神經生長因子(Nerve growth factor：NGF)、來自血小板之生長因子(Platelet-derived growth factor：PDGF)、骨形成因子(bone morphogenetic protein：BMP)、肝細胞增殖因子(Hepatocyte growth factor：HGF)、血管內皮細胞增殖因子(Vascular endothelial growth factor：VEGF)、粒細胞菌落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor：G-CSF)等。

【0097】

然而，藉由對水凝膠前驅物適當地實施下述之放射線照射步驟、及生理活性因子之活性降低處理(典型而言為pH值調整處理步驟)，即便於天然高分子中某種程度地包含生長因子，亦可於將水凝膠用作支架之細胞培養中穩定地進行培養細胞之基因表現。具體而言，作為一例，於以劑量5 kGy之放射線照射作為前提之情形時，前驅物中可包含換算為纖維母細胞生長因子時具有與0~1000 ng/mL之纖維母細胞生長因子同程度之增殖活性之生長因子。於一實施態樣中，可包含具有與0~500 ng/mL之纖維母細胞生長因子同程度之增殖活性之生長因子。又，於其他實施態樣中，可包含具有與0~100 ng/mL之纖維母細胞生長因子同程度之增殖活性之生長因子。又，於其他實施態樣中，可包含具有與0~10 ng/mL之纖維母細胞生長因子同程度之增殖活性之生長因子。

又，放射線劑量之增加能夠使可容許之生長因子之量增加。因此，於以劑量超過5 kGy之放射線照射作為前提之情形時，前驅物中可包含換算為纖維母細胞生長因子時具有與超過1000 ng/mL之纖維母細胞生長因子同程度之增殖活性之生長因子。

【0098】**(4)細胞培養用水凝膠之製造方法**

本發明之細胞培養用水凝膠(細胞培養支架用水凝膠)之製造方法係包含對上述前驅物照射劑量1~1000 kGy之放射線之步驟之細胞培養支架用水凝膠之製造方法。藉由該製造方法，可較佳地製造本發明之水凝膠。

此處，所謂放射線，係包含波長短於紫外線之電磁波、及電子束、離子束之概念，電磁波包含X射線、 γ 射線。放射線照射裝置可使用公知

之該等放射線之產生裝置。

【0099】

(放射線照射步驟)

於放射線照射步驟中，對前驅物連續地或斷續地使用放射線照射裝置，照射劑量1~1000 kGy之放射線。劑量之下限可為2 kGy以上、5 kGy以上、10 kGy以上、100 kGy以上、500 kGy以上，劑量之上限可為500 kGy以下、300 kGy以下、200 kGy以下、100 kGy以下。於一實施態樣中，可較佳地使用劑量5~200 kGy之放射線照射。

此處，所謂劑量，係將放射線之每單位時間之照射量進行時間積分所得者，可藉由針對各放射線所銷售之劑量計而測定。再者，於放射線照射裝置中，照射能量較理想為設定為100 keV至10 MeV左右。

藉由對前驅物之放射線照射，親水性高分子(例如蛋白質)部分地開裂而產生自由基，並且產生交聯反應，藉此以內包水之方式生成凝膠(水凝膠之生成)。若放射線之照射結束，則交聯反應亦立刻停止。反應時之交聯密度依賴於所照射之放射線之劑量，其結果，凝膠之彈性模數亦依賴於放射線之劑量。

又，親水性高分子之交聯密度越高，則含水率越低(水凝膠中之親水性高分子之含有率越高)。因此，水凝膠中之親水性高分子之含有率亦依賴於所照射之放射線之劑量。

【0100】

將針對來自牛之明膠與來自豬之明膠調查 γ 射線之劑量與經交聯之水凝膠之彈性模數之例示於圖1。可知根據明膠之種類不同，傾向略微不同，但於0~100 kGy之 γ 射線劑量之間，劑量與彈性模數處於大致直線關

係。換言之，可根據所要求之水凝膠之彈性模數決定放射線之劑量。

【0101】

再者，於進行放射線照射時，較理想為環境溫度為 $4\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、前驅物中之溶氧濃度為 $0\sim 40\text{ mg/L}$ 。

上述放射線照射時之環境溫度只要根據親水性高分子之性質適當設定即可。例如，若為使用膠原蛋白之情形，則可藉由在 $4\sim 25^{\circ}\text{C}$ 左右之低溫下照射放射線而高效率地進行放射線交聯，若為使用明膠之情形，則可藉由在 $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ 之溫度環境下照射放射線而高效率地進行放射線交聯。

又，放射線照射中之前驅物之溶氧具有捕捉自由基之效果。換言之，藉由將前驅物中之溶氧濃度設為高濃度，交聯密度降低，結果可降低水凝膠之彈性模數。作為具體之方法，例如可藉由在氧濃度較高之環境下照射放射線、於高氧濃度下放置上述前驅物、對上述前驅物通入氧氣等方法而增大上述前驅物中之溶氧濃度。

又，藉由將前驅物中之溶氧濃度設為低濃度，交聯密度提高，結果可提高水凝膠之彈性模數。作為具體之方法，可藉由在氮氣環境下照射放射線、對上述前驅物通入氮氣等方法而降低上述前驅物中之溶氧濃度。

【0102】

又，藉由在高氧濃度下對溶氧濃度較低之前驅物進行放射線照射，可於與氧相接之面(典型而言為細胞培養面)及其以外之部分改變溶氧濃度。藉由該等氧濃度之控制，亦能夠僅將水凝膠之供於細胞培養之表面(僅與所培養之細胞接觸之表面)設為所需之彈性模數，將其以外之部分設為高於表面之彈性模數。例如，於平板狀之水凝膠之情形時，可將基底部分設為較高之彈性模數，僅將供於細胞培養之面設為較低之彈性模數。

【0103】

如以上所述，細胞培養支架用水凝膠之製造方法係包含照射放射線之步驟(劑量1～1000 kGy)者。放射線照射步驟係藉由特定之放射線照射使親水性高分子產生交聯而對其賦予特定之彈性模數者。此時，放射線所具有之較高之能量亦作用於水凝膠前驅物內之生長因子，而可降低該生長因子之活性。即，藉由放射線照射，起到親水性高分子之交聯與生理活性因子之活性降低之兩者之效果，故而可以簡便之方法提供支架用水凝膠。藉由放射線照射製造支架用水凝膠之製造方法於上述前驅物中所含之生理活性因子之活性相對較低之情形時尤佳。進而，上述放射線照射就可對細胞培養支架用水凝膠進行殺菌(滅菌)之觀點而言亦優異。

【0104】

(放射線照射前後之各種處理)

細胞培養支架用水凝膠之製造方法可進而包含降低生理活性因子(例如生長因子)之活性之處理。

例如，藉由對利用放射線照射而交聯之水凝膠進行pH值之調整處理(pH值調整步驟)，可降低該水凝膠中之生理活性因子(例如生長因子)之活性。藉由在放射線照射後，使用鹼性之溶液或緩衝溶液將pH值調整至pH值＝6～8，而可作為生理活性因子之活性得到降低之細胞培養之支架使用。

【0105】

作為可於放射線照射後之pH值調整步驟中使用之鹼性溶液或緩衝溶液，可選擇各種市售之緩衝溶液(例如PBS(phosphate buffer saline，磷酸鹽緩衝液))或培養基、或者水。培養基中可包含酚磺酞(酚紅)。

例如，可使用：達爾伯克改良伊格爾培養基(DMEM)、伊格爾最低必需培養基(MEM)、伊格爾最低必需培養基 α 改良型(α -MEM)、格拉斯哥(glasgow)最低必需培養基(GMEM)、Iscove改良達爾伯克培養基、營養混合物F-12 Ham(Ham's F-12)、RPMI-1640等。

【0106】

作為放射線照射後之pH值調整步驟之溫度條件，並無特別限定，可於較佳為4～60℃、更佳為32～38℃下進行。

【0107】

作為上述生理活性因子之活性降低處理，亦可進行加熱處理。生理活性因子可藉由暴露於高溫環境下而不可逆地失去其活性。該加熱處理可於進行上述放射線照射步驟之前、或放射線照射步驟後之任一時機實施。例如，藉由對放射線照射前之前驅物實施加熱處理，可降低前驅物中之生理活性因子之活性。並無特別限定，只要於50℃以上加熱1分鐘以上即可。再者，加熱溫度之上限並無特別限定，例如只要設為60℃以下即可，加熱時間之上限只要設為5分鐘以下即可。

【0108】

又，作為上述生理活性因子之活性降低處理，亦可於照射放射線之前，實施事先將前驅物之pH值設為pH值5以下(較佳為pH值4以下)之酸處理、或設為pH值8以上(較佳為pH值9以上)之鹼處理。生理活性因子可藉由暴露於酸環境下或鹼環境下而不可逆地失去其活性。即，藉由實施該酸處理或鹼處理，可降低前驅物中之生理活性因子之活性。

【0109】

該等生理活性因子之活性降低處理之方法只要根據親水性高分子之

性質適當選擇即可。

例如，若為選擇明膠作為親水性高分子之情形，則可較佳地採用對前驅物進行加熱處理之方法。藉由採用該方法，可同時實現於水溶液中溶解明膠之處理、及生理活性因子之活性降低處理，而可簡便地製造細胞培養支架用水凝膠。

又，例如，若為選擇膠原蛋白作為親水性高分子之情形，則較佳為對進行放射線照射所得之水凝膠進行pH值調整處理。典型而言，若將膠原蛋白暴露於高溫環境下則容易改性，易變得難以進行利用放射線照射之交聯。因此，相較於放射線照射前之前驅物之加熱處理，較佳為選擇放射線照射後之生長因子之活性降低處理(例如pH值調整處理、加熱處理)。

【0110】

如以上所述，細胞培養支架用水凝膠之製造方法之較佳之實施態樣係包含照射放射線之步驟、及降低生理活性因子之活性之步驟者。藉由具有放射線照射步驟與生理活性因子之活性降低步驟之兩步驟，可大幅減少前驅物中所含之生長因子，可將上述定義下之水凝膠之增殖活性抑制為未達105%。

【0111】

此處，具有放射線照射步驟與生理活性因子之活性降低步驟之兩步驟之本發明之水凝膠製造方法發揮2個步驟之生長因子削減作用之累計以上之效果。即，於欲僅藉由放射線照射將生長因子之活性降低至特定水準以下之情形時，可能存在因放射線之照射而超過水凝膠所要求之彈性模數之情況。即，生長因子之活性減少係作用於增大放射線劑量之方向，故而於欲獲得例如神經細胞之培養的數kPa程度之彈性模數較小之凝膠時成為

障礙。

又，若僅藉由生理活性因子之活性降低處理，則存在難以將生長因子之活性減少至所需之水準之情形。

因此，藉由具有放射線照射步驟與生理活性因子之活性降低步驟之兩步驟，可有效地減少生長因子之活性，且容易同時獲得所需之細胞培養所需之彈性模數之確保。進而，作為上述生理活性因子之活性降低步驟，上述pH值調整就可將細胞培養用支架材料之pH值設為最適於細胞培養之pH值之方面而言較佳。

再者，上述生理活性因子之活性降低處理可僅採用1種，亦可組合2種以上之處理而實施。

【0112】

如此般，藉由進行放射線照射步驟與生理活性因子之活性降低步驟之兩步驟之處理，即便於前驅物中某種程度地包含生長因子，亦可穩定地進行培養細胞之基因表現或分化狀態之控制。具體而言，如上所述，前驅物中可包含生長因子0～1000 ng/mL。藉此，作為親水性高分子，無需使用高度精製之原料，可使用普通流通之親水性高分子(例如蛋白質)，可使材料之選擇幅度擴大，並且材料成本亦降低。

【0113】

除了上述之放射線照射步驟、生理活性因子之活性失活步驟以外，亦可加上對水凝膠表面之形狀進行加工之表面加工步驟。該表面加工步驟可例示對水凝膠前驅物按壓特定形狀之壓模之方法。本發明之水凝膠前驅物之彈性模數相對較低，故而藉由在壓抵壓模之情況下進行放射線照射，可將壓模之形狀轉印至水凝膠。該壓模之表面形狀只要設為對應於所需之

水凝膠之細胞培養面之形狀之形狀即可。例如可例示具有特定之間隔之平行溝之壓模、具有特定之大小及間隔之凸部之壓模。於細胞培養中，平行溝具有對細胞賦予一定之形態、一定之活動方向性之效果。又，將壓模之凸部轉印至水凝膠而成之凹部於細胞培養中可發揮如下效果：起到對特定之細胞進行隔離、保持之作為微孔之作用。

【0114】

壓模之材質只要為非水溶性之材料則並無特別限制，可使用矽、玻璃、合成樹脂等。壓模於按壓後剝離，故而較佳為可撓性者，較理想為合成樹脂。

構成平行溝之溝可為直線，亦可為虛線。平行溝之間隔為任意，可較佳地使用 $0.5 \sim 1000 \mu\text{m}$ 。平行溝之間隔可為一定，亦可為可變。平行溝之深度為任意，可較佳地使用 $0.5 \sim 500 \mu\text{m}$ 。

【0115】

上述凸部設為任意之形狀即可，例如設為點狀即可。可設為例如直徑 $10 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ 之大致圓形狀(典型而言為圓)。藉由轉印此種凸部，可形成直徑 $10 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ 之凹部。根據此種凹部，可將複數個細胞(例如細胞群、菌落、受精卵)補足於凹部而培養。

又，亦可轉印例如直徑 $10 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 之凸部而形成直徑 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 之凹部。藉由將凹部之大小設為該範圍，可限制能夠補足於該凹部之細胞數。亦可轉印例如直徑 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 之凸部而形成直徑 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 之凹部。

具有此種凹部之培養用支架可較佳地用於以下目的：每1個凹部隔離、保持平均 $1 \sim 10$ 個左右(典型而言平均 $1 \sim 3$ 個、較佳為平均1個)之細胞

進行培養。

【0116】

基於以上之方面，於一實施形態中，製造用以培養纖維母細胞、子宮頸癌細胞之彈性模數5～60 kPa之水凝膠(膠原蛋白凝膠)之情形時，對以下之條件之試樣進行 γ 射線照射，且進行pH值調整處理。

親水性高分子(膠原蛋白)之分子量：600,000以下(例如200,000～600,000、較佳為400,000～500,000)

親水性高分子(膠原蛋白)溶液之濃度：0.1～5.0質量%

溶氧濃度：0～8 mg/L

γ 射線劑量：1～100 kGy(較佳為2～50 kGy)、

γ 射線照射時之溶液溫度為4～37℃(較佳為4～25℃)、

pH值調整處理：DMEM培養基、於37℃下進行10～180分鐘。

【0117】

又，於其他實施形態中，製造用以培養黑色素產生細胞、來自腹腔之吞噬細胞、心肌細胞、破骨細胞、上皮細胞、纖維母細胞、心肌細胞、乳癌細胞、乳腺癌細胞、腦腫瘤細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、胰臟癌細胞、肌母細胞之彈性模數1～200 kPa之水凝膠(明膠凝膠)之情形時，製備以下之條件之試樣，選擇預處理後之 γ 射線照射。

親水性高分子(明膠)之分子量：200,000以下(例如100,000～170,000)

親水性高分子(明膠)溶液之濃度：0.1～70質量%

溶氧濃度：0～8 mg/L

γ 射線劑量：1～300 kGy(較佳為2～200 kGy)

γ 射線照射時之溶液溫度為4~37℃(較佳為10~30℃)。

pH值調整處理：DMEM培養基、於50℃下進行10~180分鐘。

【0118】

如上述[包含本發明之水凝膠之凝膠套組]所示，藉由向本發明之水凝膠中添加生理活性因子，可對水凝膠賦予對應於所添加之成分之所需之作用。

因此，亦可於放射線照射步驟後進行添加生理活性因子之步驟。

所添加之生理活性因子(例如細胞增殖因子及細胞外基質)之詳細係與上述[包含本發明之水凝膠之凝膠套組]中說明者同樣。

[實施例]

【0119】

以下，列舉實施例進行具體說明，但本發明並不限定於該等實施例。

【0120】

再者，以下亦將對未進行放射線照射之凝膠進行之pH值調整處理稱為「中和pH值調整處理」，亦將對放射線照射後之凝膠進行之pH值調整處理稱為「照射後pH值調整處理」。

【0121】

(參考例1)對包含生長因子之蛋白質之放射線照射處理之影響、以及放射線照射處理及照射後pH值調整處理之影響

製作以下之2種水凝膠，由抗體染色之螢光強度對水凝膠中之生長因子之存在量進行評價。再者，凝膠2相當於本發明之水凝膠。

(凝膠1-1)對包含生長因子之蛋白質照射 γ 射線者

(凝膠1-2)對包含生長因子之蛋白質照射 γ 射線後進行pH值調整處理(照射後pH值調整處理)者

【0122】

<材料及方法>

對高純度之來自牛真皮之I型膠原蛋白溶液(Nippi股份有限公司製造之膠原蛋白凝膠細胞培養套組Tri-D，以下同樣)添加以0、30、300、3000 ng/mL之各濃度添加有作為生長因子之纖維母細胞增殖因子-1(FGF1，R&D Systems公司，232-FA-025/CF)之DMEM培養基。混合比係設為膠原蛋白溶液：DMEM=2：1。繼而，將所得之混合物於玻璃底皿中各加入100 μ L，迅速於CO₂培育箱內升溫至37℃使膠原蛋白纖維化。

藉由上述操作，獲得包含0、10、100、1000 ng/mL之FGF1之中和膠原蛋白凝膠作為包含生長因子之蛋白質。

將各中和膠原蛋白凝膠利用FGF1抗體(Santa Cruz Biotechnology公司，sc-55520)及二次抗體(Invitrogen公司，A32723)進行染色，於同一條件下進行螢光觀察，藉此獲得FGF1含量不同之中和膠原蛋白凝膠與螢光強度之關係、即校準曲線。

然後，分別獲得對包含1000 ng/mL之FGF1之中和膠原蛋白凝膠照射1 kGy之 γ 射線者(相當於凝膠1-1)、及對包含1000 ng/mL之FGF1之中和膠原蛋白凝膠照射1 kGy之 γ 射線後藉由PBS於37℃以上將pH值調整為7.4者(相當於凝膠1-2)。針對該等凝膠，與上述同樣地進行免疫染色並計測螢光強度。

【0123】

<結果>

將免疫染色後之螢光強度之計測結果示於圖9。再者，於圖9中，螢光強度之值越高，則意味著凝膠中之FGF1濃度越高。

如圖9所示，任一凝膠中之FGF1濃度均得到降低。進而，凝膠1-2之螢光強度低於凝膠1-1，低於檢測極限(200 ng/mL)。由該等可知，藉由在放射線照射後進行pH值調整，可進一步降低FGF1濃度，即便於原料中以1000 ng/mL之高濃度包含FGF1，亦可將其量降低至檢測極限以下。

【0124】

(參考例2)將包含生長因子之蛋白質用於支架原料之情形時之NIH-3T3細胞之增殖活性之評價(中和pH值調整處理之影響)

對包含生長因子之蛋白質進行pH值調整處理後，藉由升溫製成水凝膠支架，於支架上培養作為來自胎鼠皮膚之纖維母細胞的3T3細胞，評價增殖活性。

【0125】

<材料及方法>

作為高純度之膠原蛋白溶液，準備高純度之來自牛真皮之I型膠原蛋白溶液，以0、10、100 ng/mL之各濃度向其中添加FGF1。將其向96孔微盤中加入10 μ L，添加5 μ L之無色DMEM培養基，於CO₂培育箱內升溫至37℃，進行pH值調整處理以使pH值=7.1~7.5。藉此，使膠原蛋白溶液中之膠原蛋白纖維化，獲得中和膠原蛋白凝膠。該中和膠原蛋白凝膠相當於對包含生長因子之蛋白質進行中和pH值調整處理而成者。

以該中和膠原蛋白凝膠作為支架，以5,000 cells/well之濃度播種90 μ L之3T3細胞，培養24小時，各添加10 μ L/well之細胞計數套組-8(同仁化學研究所股份有限公司製造)。其後，於培育箱內進行4小時顯色反應，利

用微盤讀取器測定450 nm之吸光度。

【0126】

<結果>

於圖2中，將未添加FGF1之情形設為100%而表示基於FGF1之濃度之吸光度之變化、即增殖活性之變化。可知，對應於FGF1之濃度上升，增殖活性上升，3T3細胞受到生長因子之影響。

本結果表示於將包含1個以上之既知或未詳之生長因子之來自生物體之蛋白質材料用作培養基材之情形時，細胞培養受到生長因子之影響。

又，表示生長因子之抑制於藉由利用5 μ L之DMEM培養基之pH值調整處理時不充分。

【0127】

(參考例3)將包含生長因子之蛋白質用於支架原料之情形時之3T3細胞之增殖活性之評價(放射線照射處理之影響)

以包含生長因子之蛋白質作為前驅物，照射 γ 射線，培養作為來自胎鼠皮膚之纖維母細胞的3T3細胞，評價增殖活性。

【0128】

<材料及方法>

以0、1、10 ng/mL之濃度向包含10%之胎牛血清(FBS)之無色DMEM溶液中添加纖維母細胞增殖因子(FGF1)，照射5 kGy之 γ 射線後，於96孔微盤中各加入10 μ L，進而以5,000 cells/well之濃度播種90 μ L之3T3細胞。培養24小時，各添加10 μ L/well之細胞計數套組-8，其後於培育箱內進行4小時顯色反應，利用微盤讀取器測定450 nm之吸光度。

【0129】

<結果>

於圖3中，將未添加FGF1之情形設為100%而表示基於FGF1之濃度之吸光度之變化、即增殖活性之變化。可知，對應於FGF1之濃度上升，增殖活性上升，3T3細胞受到生長因子之影響。

本結果表示即便將對包含1個以上之既知或未詳之生長因子之來自生物體之材料照射 γ 射線者用於培養基材，細胞亦會受到來自基材之生長因子之影響，培養結果不穩定。

又，表示生長因子之抑制藉由5 kGy之 γ 射線照射處理時不充分。

【0130】

(實施例1)將包含生長因子之蛋白質用於支架原料之情形時之3T3細胞之增殖活性之評價(放射線照射處理及照射後pH值調整處理之影響)

以包含生長因子之蛋白質作為前驅物，照射 γ 射線，製造水凝膠，於37℃以上進行pH值調整處理，將所得者作為支架，培養作為來自胎鼠皮膚之纖維母細胞的3T3細胞，評價增殖活性。

【0131】

<材料及方法>

以0、10、100 ng/mL之濃度向高純度之來自牛真皮之I型膠原蛋白溶液中添加FGF1，向96孔微盤中各加入10 μ L，照射5 kGy之 γ 射線後，添加無色DMEM培養基，於37℃下進行pH值調整處理以使pH值成為7.1～7.5(照射後pH值調整處理)。將用於pH值調整處理之無色DMEM培養基去除後，以5,000 cells/well之濃度播種90 μ L之3T3細胞，培養24小時，各添加10 μ L/well之細胞計數套組-8。其後於培育箱內進行4小時顯色反應，利用微盤讀取器測定450 nm之吸光度。

【0132】**<結果>**

於圖4中，將未添加FGF1之情形設為100%而表示基於FGF1之濃度之吸光度之變化、即增殖活性之變化。可知，增殖活性無關於FGF1之濃度均未達105%，3T3細胞未受到生長因子之影響。

本結果表示於對包含1個以上之既知或未詳之生長因子之來自生物體之材料照射 γ 射線，於37℃以上進行pH值調整處理後用於培養之情形時，即，將藉由本發明獲得之水凝膠用於培養基材之情形時，培養細胞不受基材中所含之生長因子之影響，培養結果穩定。

又，本結果及上述(參考例1)表示即便將包含生長因子之蛋白質用於原料，亦可藉由放射線照射處理及pH值調整處理(照射後pH值調整處理)，使生長因子不活化至不對細胞培養結果產生影響之水準。

【0133】

(實施例2)水凝膠支架中之來自小鼠腹腔之吞噬細胞之培養

藉由光學顯微鏡直接觀測播種、培養於水凝膠支架之來自小鼠腹腔之吞噬細胞之增殖。由所得之圖像觀測吞噬細胞之增殖之情況。

【0134】**<材料及方法>**

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得明膠水溶液。進而，將該溶液移至35 mm皿中，於溫度20℃下進行物理凝膠化、空氣飽和後，於溫度25℃、劑量率10 kGy/h、劑量20 kGy之條件下照射 γ 射線。由壓縮試驗之應力-應變曲線確認，作為所得之水凝膠之明膠交聯體之彈性模數為16 kPa。

向所得之水凝膠中投入RPMI-10%FCS培養基及1,000,000之小鼠腹腔吞噬細胞群，於5%CO₂下以37℃進行培養，定期地利用相位差顯微鏡觀察生育狀態。

再者，小鼠腹腔吞噬細胞群係將向小鼠腹腔內投予巰基乙酸酯培養基，4天後自小鼠採取之腹腔滲出細胞於聚苯乙烯培養皿內之包含10%FCS之RPMI培養基中培養1天，分取附著於培養皿之細胞，進而培養7天後，以胰蛋白酶自培養皿剝離而製備者。

【0135】

<結果>

於圖5中表示所得之顯微鏡像。若使用通常之培養實驗中使用之聚苯乙烯皿，則吞噬細胞群中之幾乎所有之細胞發生分化，於皿表面擴散且牢固地附著，失去增殖能力，即便移植於生物體亦立即失去活動能力。擴散之細胞之表面所分散之球形細胞係增殖能力較高之低分化細胞，雖適於移植，但所得之數量較少(圖5(a))。

另一方面，若於彈性模數16 kPa之明膠交聯體上培養吞噬細胞群，則極少一部分之細胞附著於表面且細長地延伸(圖5(b)，細長之線狀之細胞)，大多數之細胞維持其球形如串珠般附著於其表面。進而進行培養，球形細胞之數量因持續增殖而增加(圖5(c))，亦可大量製備能夠移植之具有增殖能力之球狀之低分化細胞。

顯示本發明之水凝膠能夠增殖低分化或未分化之細胞群，係與再生醫學中之細胞源之製備密切相關者。

【0136】

(實施例3)水凝膠支架中之黑色素瘤細胞之培養

藉由光學顯微鏡直接觀測播種、培養於水凝膠支架上之黑色素瘤細胞之增殖、及由黑色素產生引起之著色。進而，藉由吸光度測定黑色素產生量。

【0137】

<材料及方法>

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得明膠水溶液。進而，將該溶液移至35 mm皿中，於溫度20℃下進行物理凝膠化、空氣飽和後，於溫度25℃、劑量率10 kGy/h、劑量10、20、40 kGy之條件下照射 γ 射線。由壓縮試驗之應力-應變曲線確認，作為所得之水凝膠之明膠交聯體之彈性模數分別為約5、約16、約48 kGy。分別於所得之明膠交聯體上與通常之培養實驗中使用之塑膠皿上培養來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10細胞，其後經時地利用光學顯微鏡進行觀察以及黑色素產生量之定量。黑色素產生量係將所回收之細胞利用PBS洗淨後，藉由1% Triton X100存在下之可用性蛋白質量、及以1N NaOH於85℃下處理30分鐘時可溶化之黑色素量而算出。

【0138】

<結果>

於圖6中表示所得之顯微鏡像。根據所觀察之像，於塑膠皿上進行2D培養之細胞中未確認到明確之黑色素產生(圖6(a))，但於明膠交聯體上培養之細胞於彈性模數5~48 kPa之任一情況下均形成細胞塊(橢球體)，藉由細胞塊確認產生高密度之黑色素(圖6(b)~(d))。

又，由定量分析之結果表示，黑色素於2D培養條件下幾乎未產生，但於明膠交聯體上之培養中經時地顯著產生。又，亦確認明膠交聯體之硬

度對該產生量產生影響。

本結果表示藉由水凝膠之彈性模數，可與生物體內同樣地調變細胞之基因表現，與藥物開發或癌症治療研究密切相關。

【0139】

(實施例4)水凝膠支架中之來自人子宮頸癌之HeLa細胞之培養(1)

藉由光學顯微鏡直接觀測播種、培養於具有平滑、及賦予有5 μm 之線狀凹凸(平行溝)之微細結構之表面之水凝膠支架上之來自人子宮頸癌之癌細胞即HeLa細胞之形態。由所得之圖像計測細胞之尺寸(接著面積)、縱橫比、旋轉。

【0140】

<材料及方法>

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50°C下充分攪拌，獲得明膠水溶液。進而，將該溶液移至35 mm皿中，於溫度20°C下進行物理凝膠化、空氣飽和後，於溫度25°C、劑量率10 kGy/h、劑量10 kGy及40 kGy之條件下照射 γ 射線。由壓縮試驗之應力-應變曲線確認，所得之明膠交聯體之彈性模數分別為5 kPa與48 kPa。

又，於水溶液上按壓具有5 μm 之線狀凹凸(平行溝)之壓模，與上述同樣地照射放射線，製作彈性模數相同(分別為5 kPa與48 kPa)，且於表面具有5 μm 之線狀凹凸之水凝膠支架。

分別於所得之4種水凝膠支架表面上、及通常之培養實驗中使用之聚苯乙烯皿表面上培養HeLa細胞，利用光學顯微鏡進行觀察。

【0141】

<結果>

於圖7中表示所得之顯微鏡像。由所觀察之像可知，上皮系細胞之HeLa於硬度5 kPa之平滑之水凝膠上三維地形成細胞塊(圖7(a))。另一方面，可知於硬度48 kPa之平滑之水凝膠上二維地伸展，且顯示間質系樣之形態(圖7(b))。

又，可知即便為5 kPa之彈性模數，若具有5 μm 之線狀凹凸，則亦回應其形狀而使形態發生變化(圖7(d))。於具有5 μm 之線狀凹凸之彈性模數48 kPa之情形時，亦與5 kPa之彈性模數之情形同樣地使形態發生變化(圖7(e))。

另一方面，於不使用水凝膠支架而於聚苯乙烯皿上進行培養之情形時，二維地伸展，且顯示鋪路石狀之上皮系樣形態(圖7(c))。

該等結果表示水凝膠之彈性模數與表面形狀(表面之微細結構)之兩者對細胞之基因表現產生影響。

【0142】

繼而，將對彈性模數5~67 kPa之水凝膠(培養表面平滑)、及聚苯乙烯皿中之細胞培養之增殖率進行調查之結果示於圖8(將培養開始時設為1，於第1~3天進行計測)。由圖8可知，彈性模數5~67 kPa之水凝膠之任一者均可以與通常之塑膠皿同等之速度培養細胞。即，細胞之增殖率直接表示可僅控制基因表現。

本結果表示細胞之基因表現或分化狀態可藉由水凝膠之彈性模數或表面形狀而控制，與再生醫學中之細胞源之製備密切相關。

【0143】

(實施例5)水凝膠支架中之來自人子宮頸癌之HeLa細胞之培養(2)

於空氣氛圍且溫度25℃下，以劑量率10 kGy/次對在與實施例4相同之條件下製作之明膠水溶液照射1~20次總劑量計為10~200 kGy之2

MeV之電子束。於所得之蛋白質交聯體上播種來自子宮頸癌之癌細胞，結果觀測到與實施例4同樣之基於彈性模數之形態變化。

本結果表示即便進行電子束照射，亦可與 γ 射線照射同樣地進行基於劑量之水凝膠之彈性模數之調整，能夠實現基因表現之控制。即，表示不限於如 γ 射線之電磁波，本發明可擴大至所有之放射線。

【0144】
(實施例6～21)

於以下之條件之水凝膠支架上進行各種細胞之培養試驗，調查基因表現能力。將結果示於表1。

【0145】

[表1]

	水凝膠原料	水凝膠之彈性模數(kPa)	水凝膠支架之表面形狀	培養細胞種	可見於培養細胞中之基因表現
實施例6	明膠	200	平坦	破骨細胞	抑制細胞之分化
實施例7	明膠	5～67	平坦	狗上皮細胞	基於硬度之形態變化
實施例8	明膠	5～67	線狀凹凸 (1～50 μ m)	狗上皮細胞	依照形狀之形態變化
實施例9	明膠	5～67	平坦	小鼠纖維母細胞	基於硬度之形態變化
實施例10	明膠	5～67	線狀凹凸 (1～50 μ m)	小鼠纖維母細胞	依照形狀之形態變化
實施例11	明膠	16～67	線狀凹凸 (1～10 μ m)	大鼠心肌細胞	心肌搏動之方向控制
實施例12	明膠	5、48	平坦	人乳癌細胞	橢球體形成
實施例13	明膠	48	平坦	人乳腺癌細胞	橢球體形成
實施例14	明膠	5、48	平坦	人腦腫瘤細胞	三維網狀結構形成
實施例15	明膠	5、48	平坦	人子宮癌細胞	基於硬度之形態變化
實施例16	明膠	5、48	平坦	人胰臟癌細胞	橢球體形成
實施例17	明膠	5、48	平坦	人轉移性胰腺癌細胞	橢球體形成
實施例18	膠原蛋白	23～53	平坦	來自子宮頸癌之癌細胞	基於硬度之形態變化
實施例19	膠原蛋白	53	線狀凹凸 (1～50 μ m)	來自子宮頸癌之癌細胞	依照形狀之形態變化
實施例20	肽	0.9～9	平坦	來自子宮頸癌之癌細胞	橢球體形成
實施例21	明膠	150	線狀凹凸 (1～50 μ m)	肌母細胞	依照形狀之形態變化

如表1所示，表示雖根據培養細胞之種類而顯示不同之回應，但藉由適當選擇水凝膠支架之彈性模數及/或表面形狀，可控制基因表現。

【0146】

(參考例3)放射線交聯與化學交聯後之殘存胺基酸之比較

向分子量150,000之豬明膠10質量%中添加蒸餾水90質量%，於25℃、空氣氛圍(氧含量約21%，大氣壓)下攪拌10分鐘，獲得溶氧濃度8 mg/L之明膠水溶液。

於空氣氛圍、溫度25℃下，於Co60照射施設中，以劑量率10 kGy/h、劑量60 kGy對該水溶液照射γ射線，獲得放射線交聯明膠凝膠。

又，向上述明膠水溶液中添加等量作為化學交聯劑之戊二醛之水溶液(0.48重量%)，於40℃下反應12小時後，利用100 mM之甘胺酸水溶液於50℃下洗淨1小時，獲得化學交聯明膠凝膠。

將藉由各自之方法所得之交聯明膠凝膠於30℃下真空乾燥24小時，取約1 mg置於1.5 mL之小型瓶中。於氮飽和條件下且於110℃下藉由鹽酸水解24小時。

作為參考，未交聯之明膠亦同樣地水解。其後，利用氫氧化鈉進行中和，藉由4-氟-7-硝基苯并呋咭對各胺基酸進行螢光標記，藉由HPLC進行定性、定量測定。

【0147】

[表2]

	戊二醛交聯凝膠(%)	放射線交聯凝膠(%)
殘留離胺酸	23	41
殘留苯基丙胺酸	78	65

*表中之數值表示將未處理之明膠中之具有胺基之離胺酸及苯基丙胺酸之莫耳數設為100(%)之情形時之各交聯凝膠之離胺酸及苯基丙胺酸殘存率。

【0148】

分析之結果如表2所示，可明確與未處理之明膠相比，於戊二醛處理時離胺酸減少至20%左右，但於 γ 射線照射時保留至40%左右。進而，認為於放射線照射時，形成具有微秒之壽命之中間物之苯基丙胺酸參與交聯。

【0149】

以上，關於本發明之細胞培養用水凝膠、細胞培養物之製造方法、細胞培養用水凝膠之製造方法，包括實施例在內進行了說明。上述說明僅表示本發明之基本之構成態樣，可進行各種應用。

例如亦可將本發明之細胞培養用水凝膠用作內置於細胞培養器(細胞培養容器)之支架。

又，於本發明之細胞培養物之製造方法中培養之細胞可為用於移植等治療用之細胞之培養者，又，亦可為用於藥理試驗用(例如藥物之篩選用)之細胞之培養者。又，亦可將該等細胞培養物用於治療(例如再生醫學)、使用細胞培養物之藥理試驗方法(例如篩選方法)。

又，於細胞培養用水凝膠之製造方法中，平行溝之形成並非僅可藉由上述溝形成步驟而形成。於放射線照射步驟中，放射線為束狀，若為可掃描之放射線照射裝置，則亦可藉由放射線照射之有無而製作。例如，進行二維平面之光柵掃描，對奇數線進行放射線照射，對偶數線不進行放射線照射，反覆進行此操作，藉此可形成具有平行溝之水凝膠支架。於進行使用該製造方法之溝形成之情形時，可無需使用壓模之溝形成。

【0150】

(實施例22)關於由本發明之製造方法所得之水凝膠中之細胞增殖因子之含量之評價

製作以下之2種水凝膠，以該等作為支架培養3T3細胞，比較細胞增殖活性，藉此評價細胞增殖因子之含量。再者，凝膠22-2相當於由本發明之製造方法所得之水凝膠。

(凝膠22-1)包含規定量之生長因子之蛋白質

(凝膠22-2)以包含規定量之生長因子之蛋白質作為原料進行放射線照射處理及pH值調整處理(照射後pH值調整處理)者

【0151】

<材料及方法>

以0、0.015、0.3、1.5、3、30 ng/mL之各濃度對高純度之來自牛真皮之I型膠原蛋白溶液加入添加有FGF1之DMEM培養基。混合比係設為膠原蛋白溶液：DMEM = 2：1。將所得之混合物於96孔微盤中各加入40 μ L，迅速於CO₂培育箱內升溫至37℃，使膠原蛋白纖維化。

藉由上述操作，獲得包含0、0.005、0.1、0.5、1、10 ng/mL之FGF1之中和膠原蛋白凝膠作為包含生長因子之蛋白質。該中和膠原蛋白凝膠相當於凝膠22-1。

又，對包含各種濃度之FGF1之中和膠原蛋白凝膠照射1 kGy之 γ 射線後，添加DMEM培養基，於37℃下將pH值調整為7.1～7.5，獲得水凝膠。該水凝膠相當於凝膠22-2。

以5,000 cells/well之濃度分別對凝膠22-1及凝膠22-2播種60 μ L之3T3細胞，培養48小時，各添加10 μ L/well之細胞計數套組-8。其後，於培育箱內進行1小時顯色反應，利用微盤讀取器測定450 nm之吸光度。

【0152】

<結果>

於圖10中表示對應於中和膠原蛋白凝膠中之FGF1濃度之吸光度之變化、即細胞增殖活性之變化。再者，於圖10中，吸光度之值越高，意味著凝膠之細胞增殖活性越高。

如圖10所示，凝膠22-1與凝膠22-2相比凝膠之細胞增殖活性明顯較高。

又，於凝膠22-2中，無關於作為原料而調配之FGF1濃度，均未見增殖活性之增加傾向，若與由凝膠22-1所得之校準曲線進行比較，則凝膠中之FGF1相當於100 pg/mL以下。即，凝膠22-2之細胞增殖活性以FGF1活性換算計為100 pg/mL以下，該量明顯少於市售之來自生物體提取物之水凝膠(基質膠等)中之細胞增殖因子量。

【0153】

(實施例23)含有高濃度蛋白質之水凝膠之製作

藉由放射線照射，由調配有高濃度之蛋白質(膠原蛋白、明膠、或膠原蛋白肽)之溶液製作水凝膠，評價該凝膠中之高分子濃度。

【0154】

<材料及方法>

製備以下之3種溶液。

(1)膠原蛋白溶液

將來自豬真皮之I型膠原蛋白溶液(新田明膠製造之Collagen BM，639-30861)製備成濃度5 wt%，獲得膠原蛋白水溶液。

(2)明膠溶液

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得明膠水溶液。

(3) 膠原蛋白肽溶液

向蒸餾水1 L中添加豬膠原蛋白肽10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得膠原蛋白肽水溶液。

【0155】

將上述溶液分別移至35 mm皿中，膠原蛋白溶液及明膠溶液係於溫度20℃下進行空氣飽和，膠原蛋白肽溶液係於4℃下進行空氣飽和。繼而，於溫度15℃、劑量率10 kGy/h之條件下照射劑量5 kGy至60 kGy之 γ 射線。

由所得之水凝膠之乾燥前後之重量評價水凝膠中之高分子濃度。

【0156】

<結果>

於圖11中表示相對於放射線照射量之水凝膠中之高分子濃度。如圖11所示，放射線照射量越增加，則水凝膠中之高分子濃度越增加。該結果意味著作為水凝膠之原料之膠原蛋白、明膠、或膠原蛋白肽藉由放射線照射而凝膠化，形成高分子。藉由上述方法所得之水凝膠中之高分子濃度高於通常之中和膠原蛋白凝膠或來自生物體提取物之水凝膠(基質膠等)中之高分子濃度(通常為1%以下)。由該結果可知，可藉由放射線照射量調整水凝膠中之高分子濃度。

【0157】

(實施例24)向水凝膠中之特定成分之添加

如上所述，根據本發明，可獲得原料中所含之生長因子量經降低之水凝膠。於本例中研究於向如此般獲得之水凝膠中添加特定成分之情形時，該成分是否於水凝膠上發揮功能。具體而言，向水凝膠中添加作為細

胞外基質之層黏連蛋白(參與細胞之接著、增殖、分化之蛋白質)，評價凝膠中是否包含層黏連蛋白。

【0158】

<材料及方法>

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得明膠水溶液。進而，將該溶液移至35 mm皿中，於溫度20℃下進行物理凝膠化及空氣飽和後，於溫度25℃、劑量率10 kGy/h、劑量20 kGy之條件下照射 γ 射線，獲得水凝膠(未塗佈層黏連蛋白之水凝膠)。

向所得之水凝膠中添加1 mL溶解於超純水之0.1 mg/mL之層黏連蛋白(Invitrogen 23017-015)，於4℃下保管一晚，獲得塗佈有層黏連蛋白之水凝膠。

繼而，於5%CO₂下且於37℃下，於未塗佈層黏連蛋白之凝膠、及塗佈有層黏連蛋白之凝膠之各者上培養大鼠海馬神經細胞，定期地觀察生育狀態。其後，利用層黏連蛋白抗體(Abcam ab11575)及二次抗體(Invitrogen A32731)進行染色，藉由螢光觀察確認層黏連蛋白是否含於水凝膠中。

【0159】

<結果>

於圖12中表示螢光觀察之結果。於圖12中，(A)為未塗佈層黏連蛋白之凝膠之觀察結果，(B)為塗佈有層黏連蛋白之凝膠之觀察結果。若層黏連蛋白塗佈發揮功能(即，若凝膠中包含層黏連蛋白)，則海馬神經細胞接著於凝膠。

如(A)所示，於未塗佈之凝膠上，神經細胞未接著。相對於此，於

(B)所示之塗佈有層黏連蛋白之凝膠上，海馬神經細胞接著，將突起拉長。

再者，圖12(C)係於塗佈有層黏連蛋白之凝膠中，以螢光染色確認實際塗佈有層黏連蛋白之結果。

由以上之結果可知，即便對本發明之水凝膠添加特定成分(生長因子等)，該成分亦於水凝膠上發揮功能。

【0160】

(實施例25)利用水凝膠之單細胞之捕捉與培養

使用賦予有100～200 μm 見方之凹形狀之水凝膠作為支架，向凹部播種黑色素瘤細胞，藉由光學顯微鏡經時地觀測其情況。

【0161】

<材料及方法>

向蒸餾水1 L中添加豬明膠10 wt%，於50℃下充分攪拌，獲得明膠水溶液。進而，將該溶液移至皿中，按壓具有100～200 μm 見方、高度100 μm 之凸結構之壓模，於溫度20℃下進行物理凝膠化及空氣飽和後，於溫度15℃、劑量率5 kGy/h、劑量20 kGy之條件下照射 γ 射線，製作於表面具有凹形狀之水凝膠。

向所得之水凝膠之凹部播種來自小鼠惡性黑色素瘤之B16F10黑色素瘤細胞後，利用光學顯微鏡經時地進行觀察。

【0162】

<結果>

圖13係使用賦予有100 μm 見方之凹形狀之水凝膠之培養結果，係剛播種細胞後之狀態。如圖13所示，黑色素瘤細胞係將細胞逐個補足於凹形

狀之凹處。

由該結果可知，藉由本發明之水凝膠能夠進行1個細胞之捕捉及其培養。再者，雖未顯示資料，但對水凝膠賦予之凹部之形狀不限於四角形，任意之形狀均可進行培養。

【0163】

又，圖14係使用賦予有100 μm 見方之凹形狀之水凝膠之培養結果，係細胞播種後8天後之狀態。如圖14所示，可獲得來自黑色素瘤細胞之黑色素產生量不同之橢球體。儘管培養條件未發生變化，但可獲得黑色素產生量不同之橢球體，其意味著各黑色素瘤細胞之基因表現互不相同。

由該結果可知，藉由本發明之水凝膠，可於水凝膠支架上逐一個別地培養細胞，而製作具有不同之基因表現之細胞塊。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種細胞培養用水凝膠，其細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1 活性換算計為100 pg/mL以下，
彈性模數為0.1～500 kPa，且
具有親水性高分子之放射線交聯結構。

【第2項】

如請求項1之細胞培養用水凝膠，其中上述細胞增殖活性以NIH-3T3 細胞之使用細胞計數套組-8之28小時培育中之增殖活性而言，與藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠相比未達105%。

【第3項】

如請求項1或2之水凝膠，其中上述親水性高分子為蛋白質。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之水凝膠，其相對於上述水凝膠，包含1質量%以上且30質量%以下之選自由膠原蛋白、膠原蛋白肽、及明膠所組成之群中之1種以上。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之水凝膠，其於表面具有凹部及/或平行溝。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之水凝膠，其係用以後續添加與上述水凝膠不同體之生理活性因子。

【第7項】

如請求項1至5中任一項之水凝膠，其調配有選自由分化誘導因子、

接著因子、趨化性因子及細胞外基質所組成之群中之1種以上之因子。

【第8項】

一種凝膠套組，其包含如請求項1至5中任一項之水凝膠、及與上述水凝膠不同體之生理活性因子。

【第9項】

一種細胞培養物之製造方法，其藉由使細胞與如請求項1至5中任一項之水凝膠接觸而培養細胞。

【第10項】

如請求項9之製造方法，其中作為上述水凝膠，選擇具有對應於所需之基因表現之彈性模數及/或表面形狀之水凝膠而使用。

【第11項】

如請求項10之製造方法，其中上述基因表現係與細胞之分化相關之基因表現、或與細胞之生長相關之基因表現。

【第12項】

如請求項9至11中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為黑色素產生細胞。

【第13項】

如請求項9至11中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為來自腹腔之吞噬細胞。

【第14項】

如請求項9至11中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為心肌細胞。

【第15項】

如請求項9至11中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為乳癌細胞。

【第16項】

如請求項9至11中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為子宮癌細胞。

【第17項】

如請求項9至16中任一項之細胞培養物之製造方法，其中上述細胞培養物為細胞塊。

【第18項】

一種細胞培養用水凝膠之製造方法，其係細胞培養用水凝膠之製造方法，且

包括對包含親水性高分子0.1～70質量%之水溶液

照射劑量1～1000 kGy之放射線之照射步驟，

上述照射後之水凝膠之細胞增殖活性以纖維母細胞增殖因子-1活性換算計為100 pg/mL以下，

上述照射後之水凝膠之彈性模數為0.1～500 kPa，

上述照射後之水凝膠具有親水性高分子之放射線交聯結構。

【第19項】

如請求項18之細胞培養用水凝膠之製造方法，其中上述照射後之水凝膠之上述細胞增殖活性以NIH-3T3細胞之使用細胞計數套組-8之28小時培育中之增殖活性而言，與藉由酸處理而提取之來自牛真皮之I型膠原蛋白凝膠相比未達105%。

【第20項】

如請求項18或19之製造方法，其中上述包含親水性高分子之水溶液包含細胞增殖因子0以上且1000 ng/mL以下。

【第21項】

如請求項18至20中任一項之製造方法，其進而包含繼上述照射步驟之後將pH值調整至6～8之pH值調整步驟。

【第22項】

如請求項21之製造方法，其中上述pH值調整步驟係使用緩衝溶液、培養基、及水之任一者之調整步驟。

【第23項】

如請求項18至22中任一項之製造方法，其進而包含按壓表面具有特定之間隔之平行溝之壓模之表面加工步驟。

【第24項】

如請求項18至23中任一項之製造方法，其中上述親水性高分子為蛋白質。

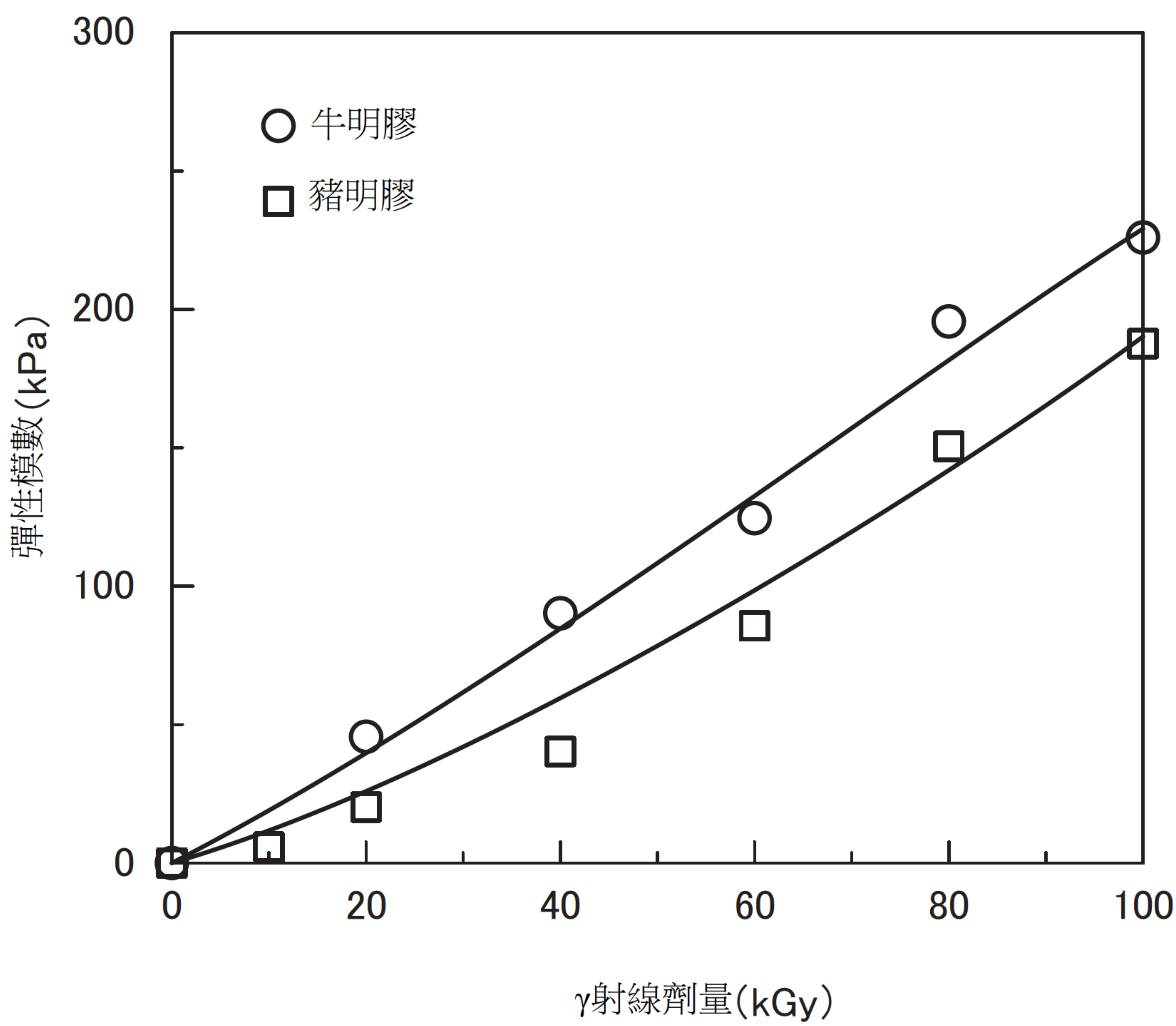
【第25項】

如請求項18至24中任一項之製造方法，其中上述照射後之水凝膠相對於該水凝膠，包含1質量%以上且30質量%以下之選自由膠原蛋白、膠原蛋白肽、及明膠所組成之群中之1種以上。

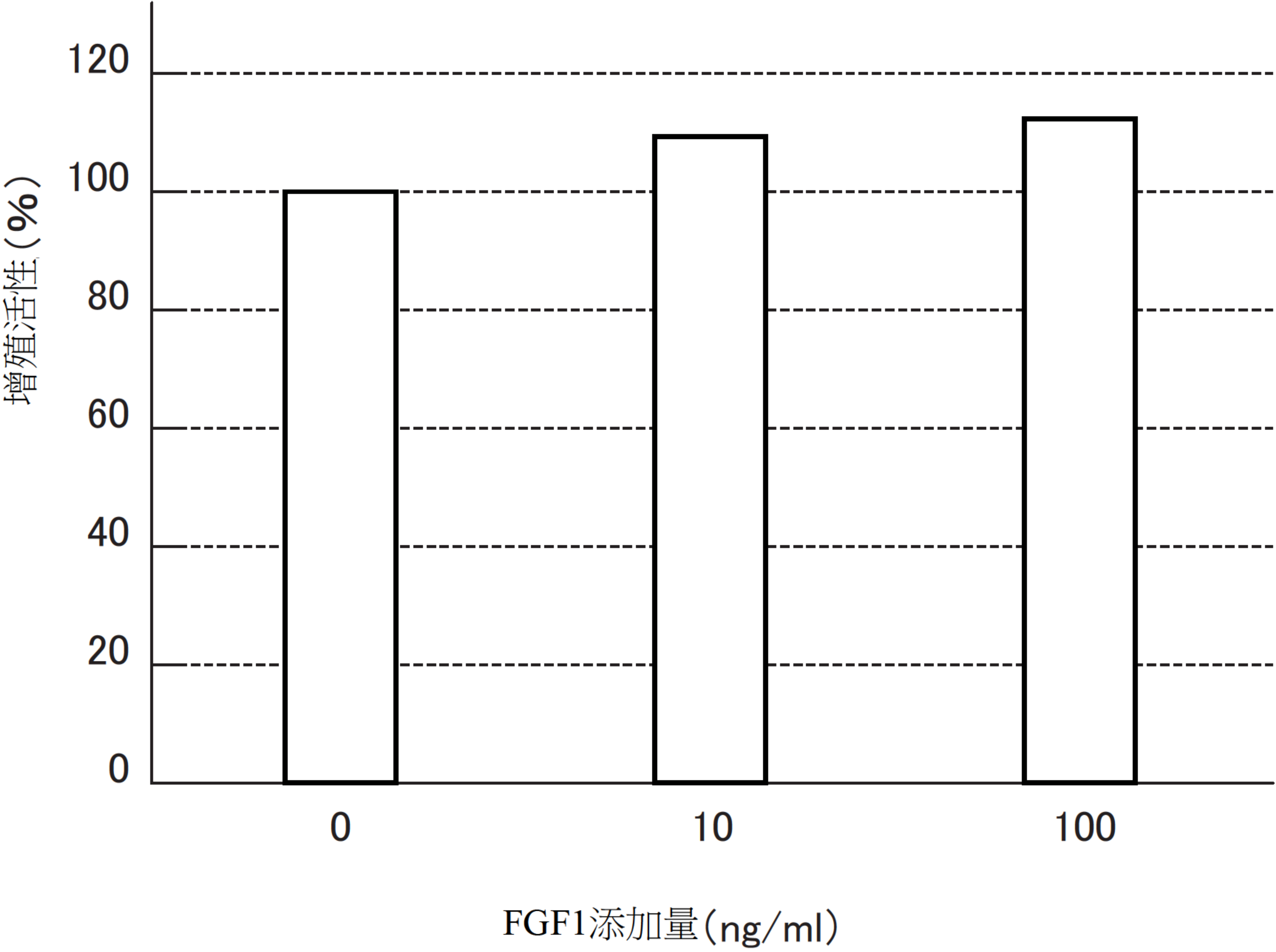
【第26項】

如請求項18至25中任一項之製造方法，其進而包含於上述照射後添加生理活性因子之步驟。

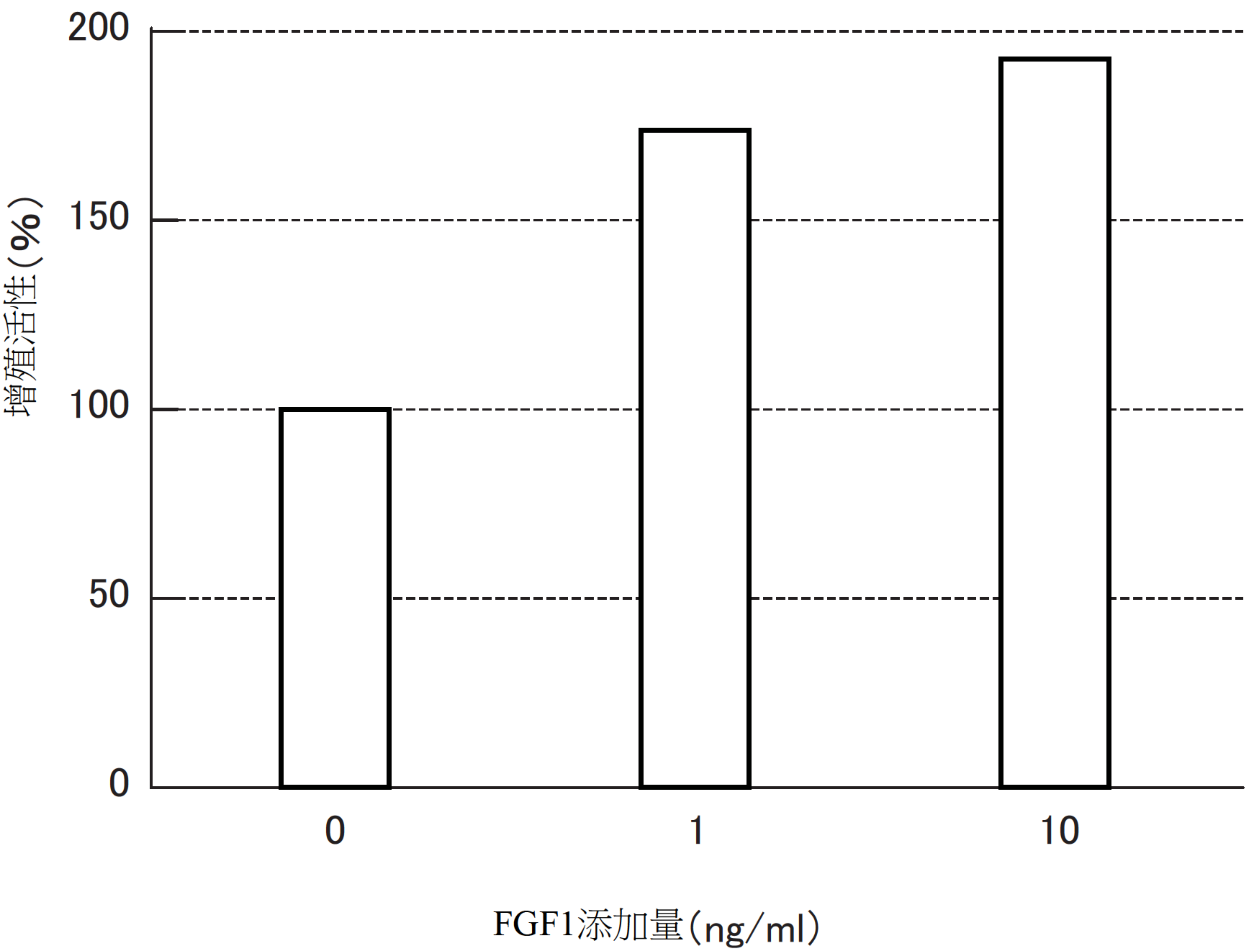
【發明圖式】



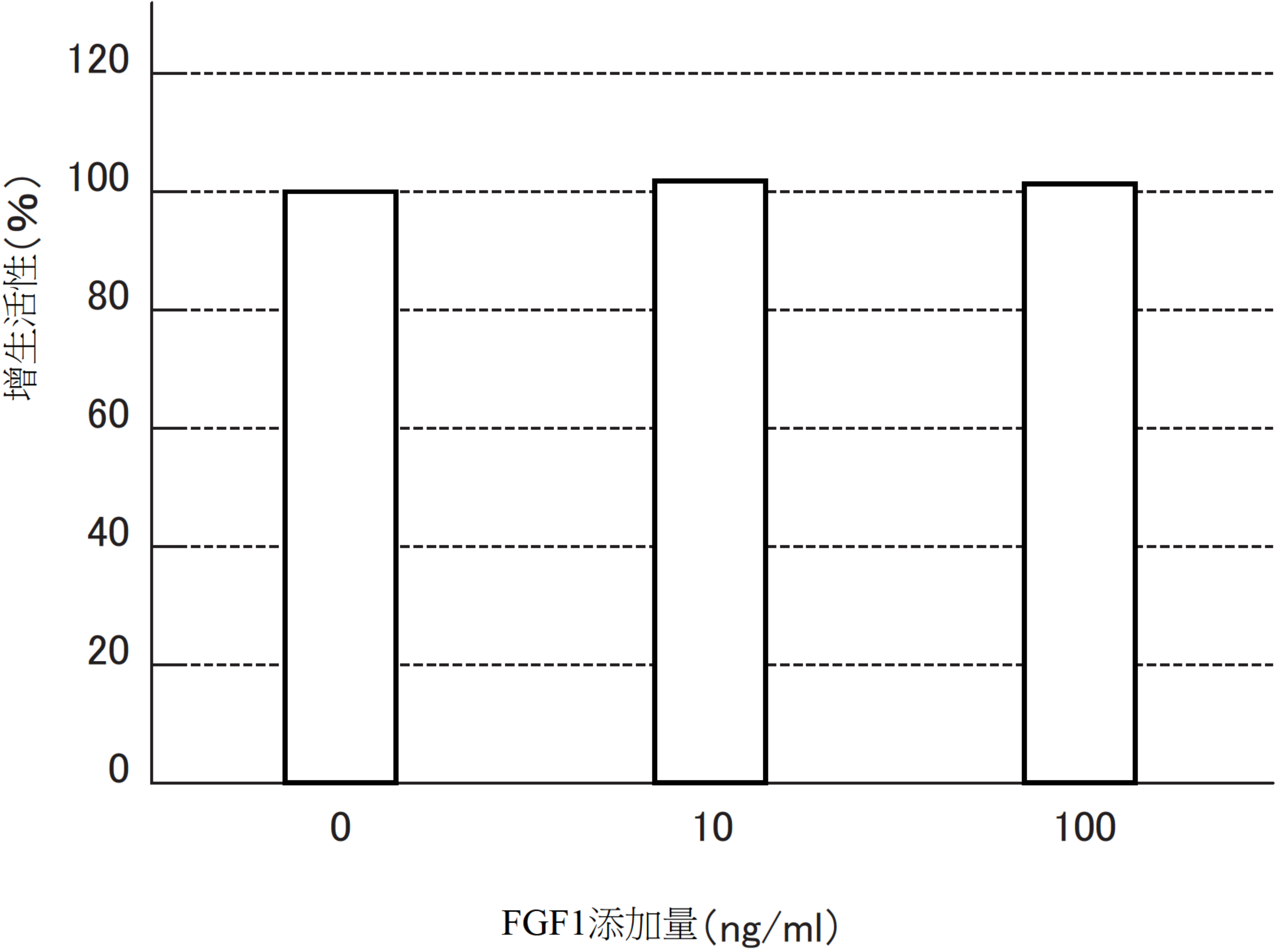
【圖1】



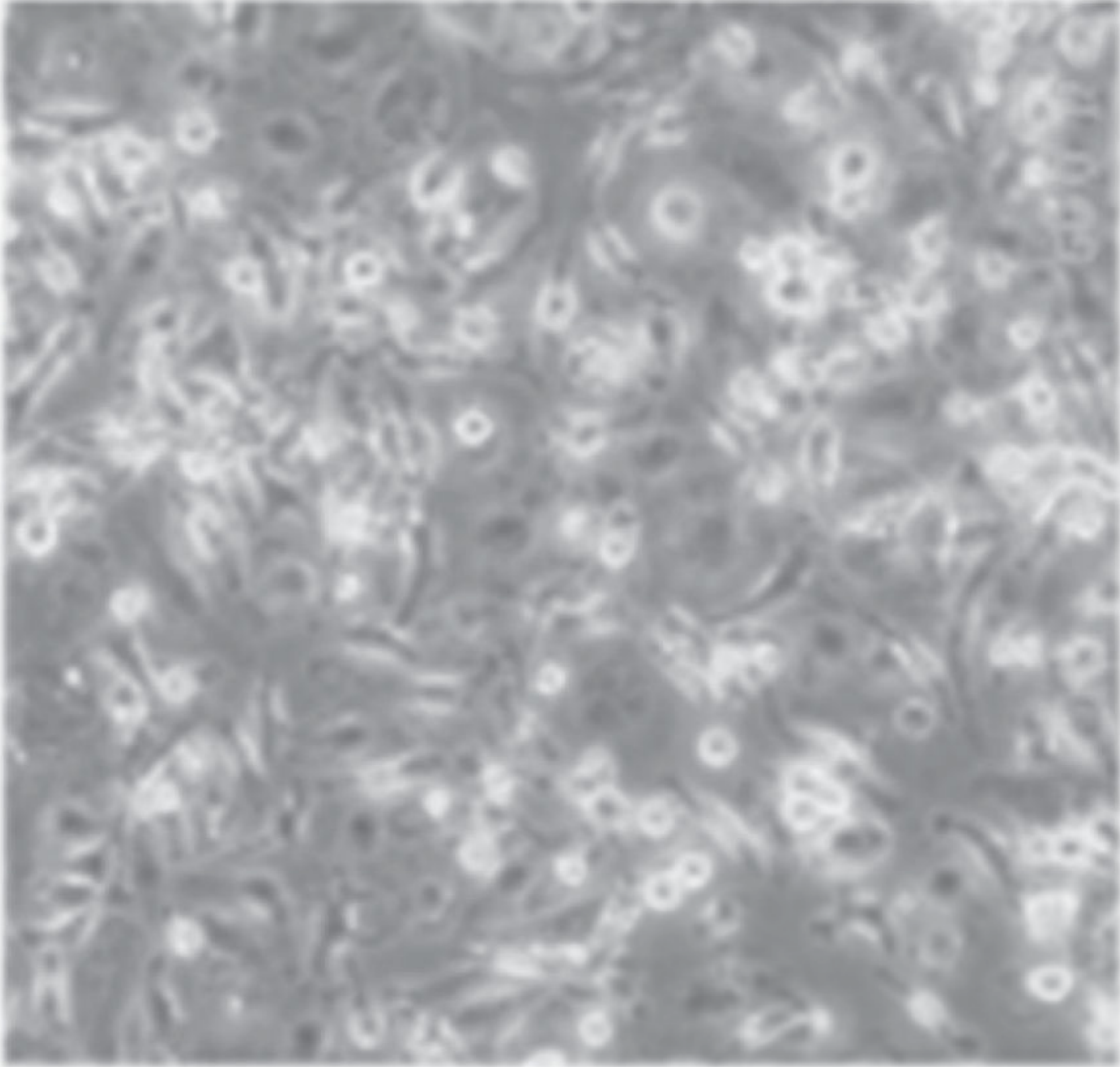
【圖2】



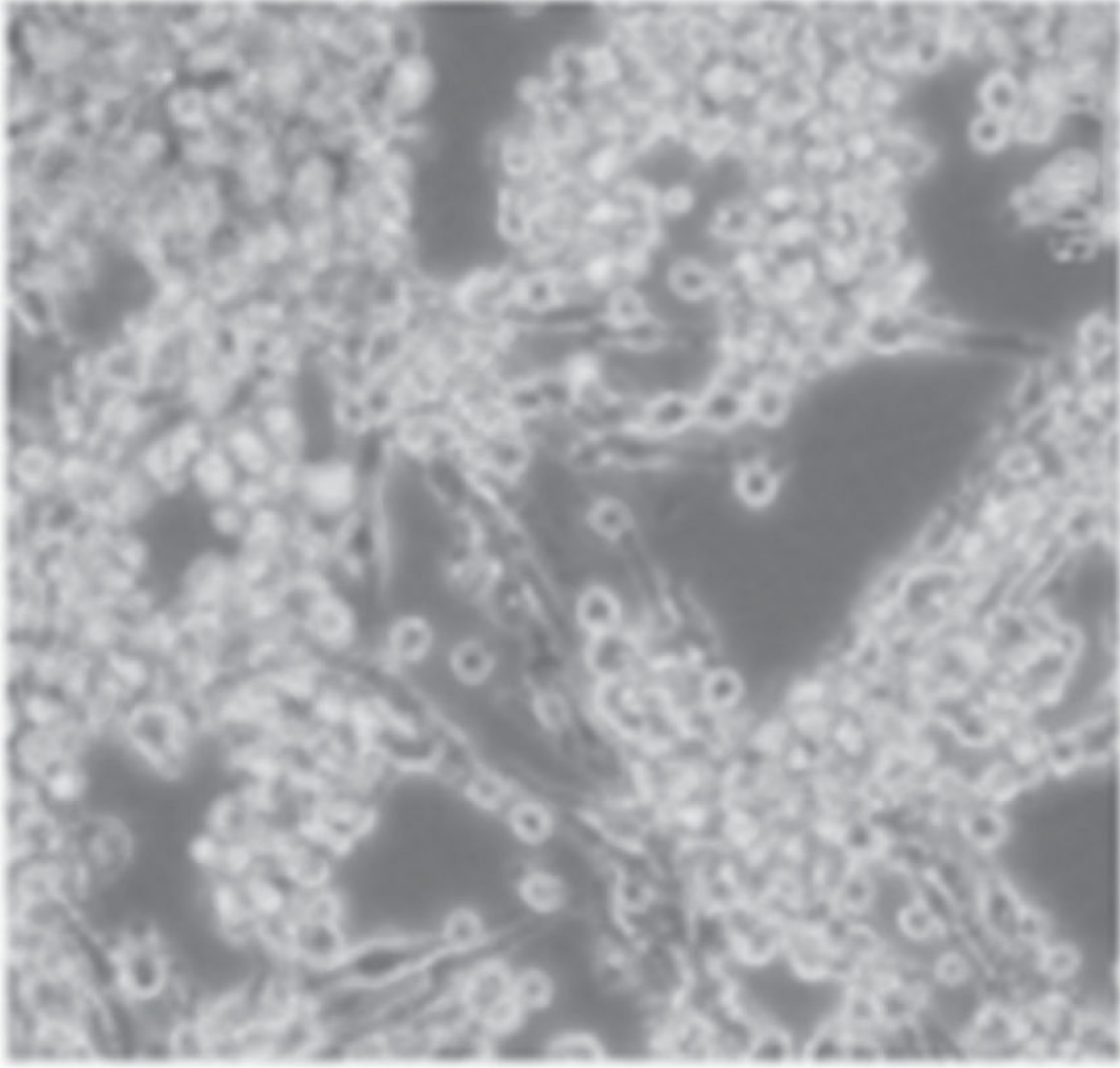
【圖3】



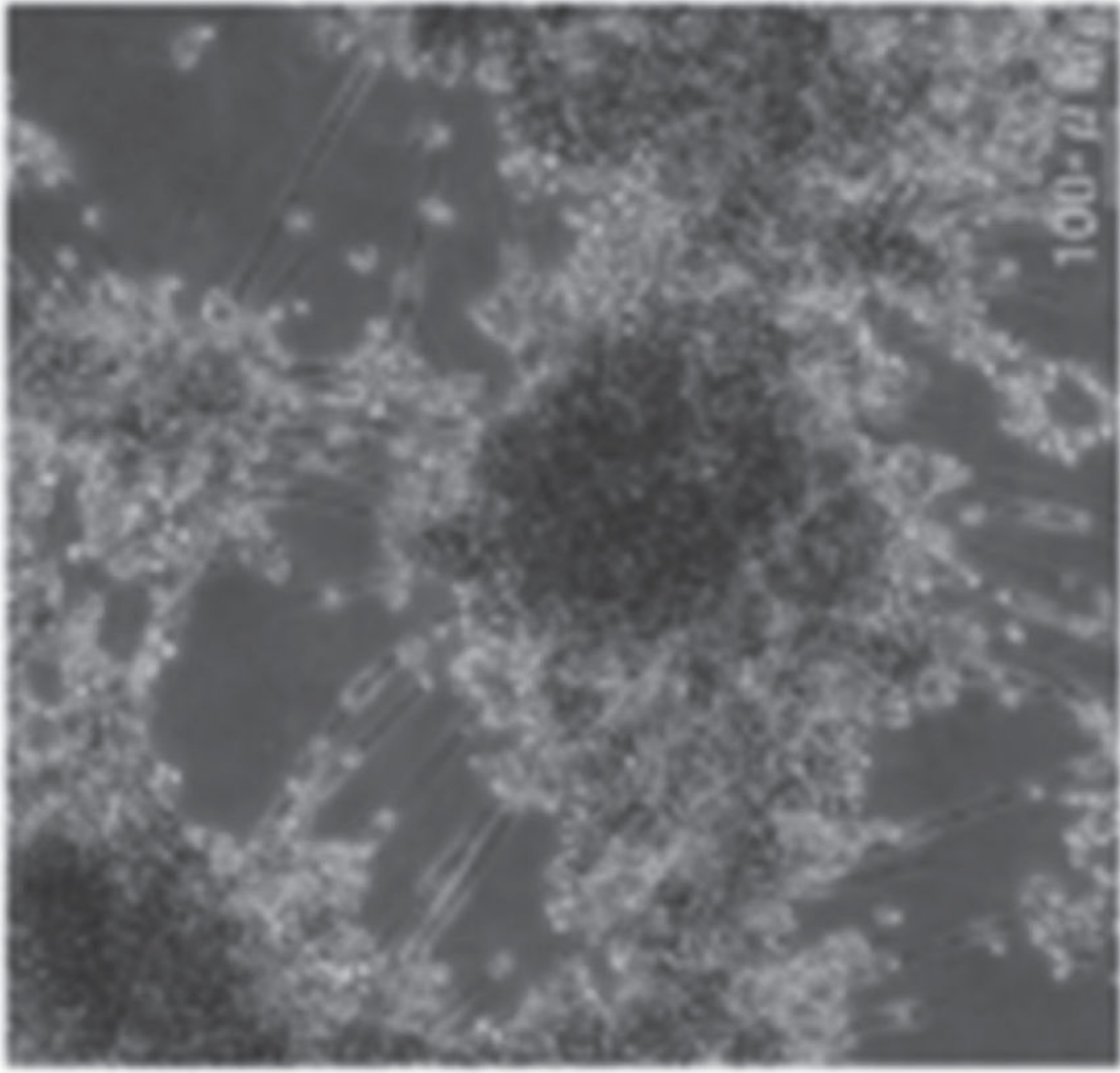
【圖4】



(a)聚苯乙烯皿上之培養
培養第4天
(拍攝倍率10倍)

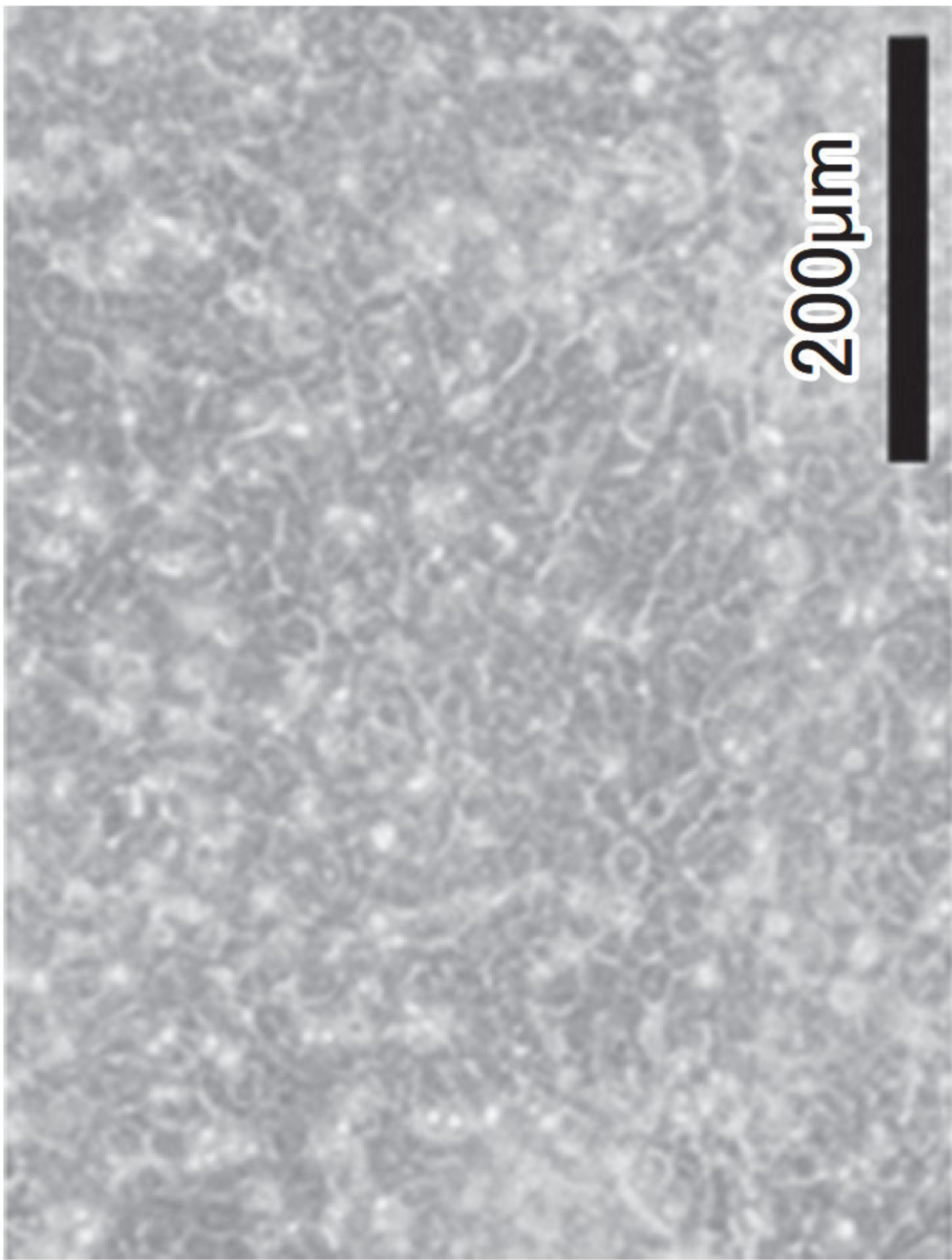


(b)水凝膠(16 kPa)上之培養
培養第4天
(拍攝倍率10倍)

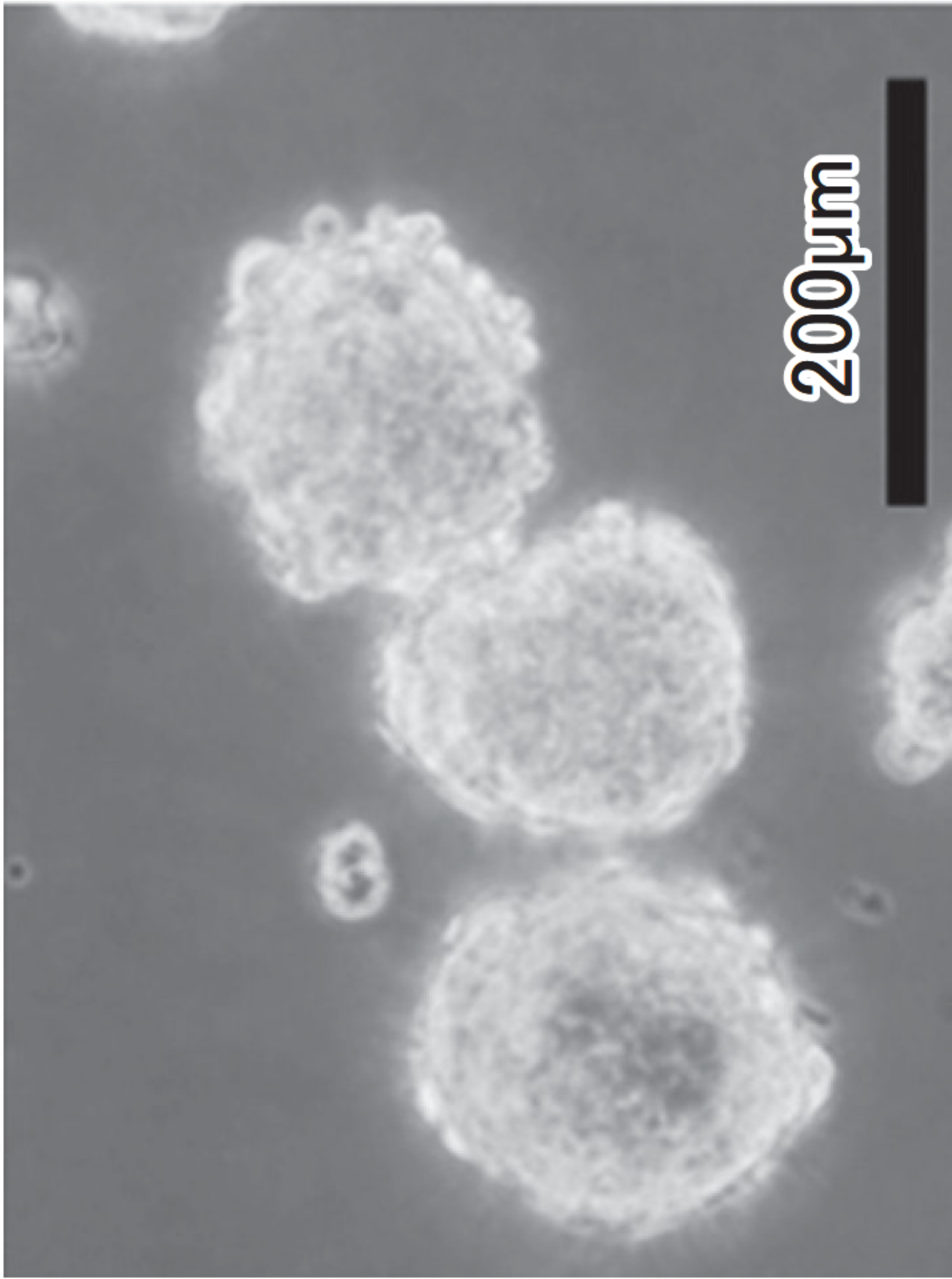


(c)水凝膠(16 kPa)上之培養
培養第8天
(拍攝倍率4倍)

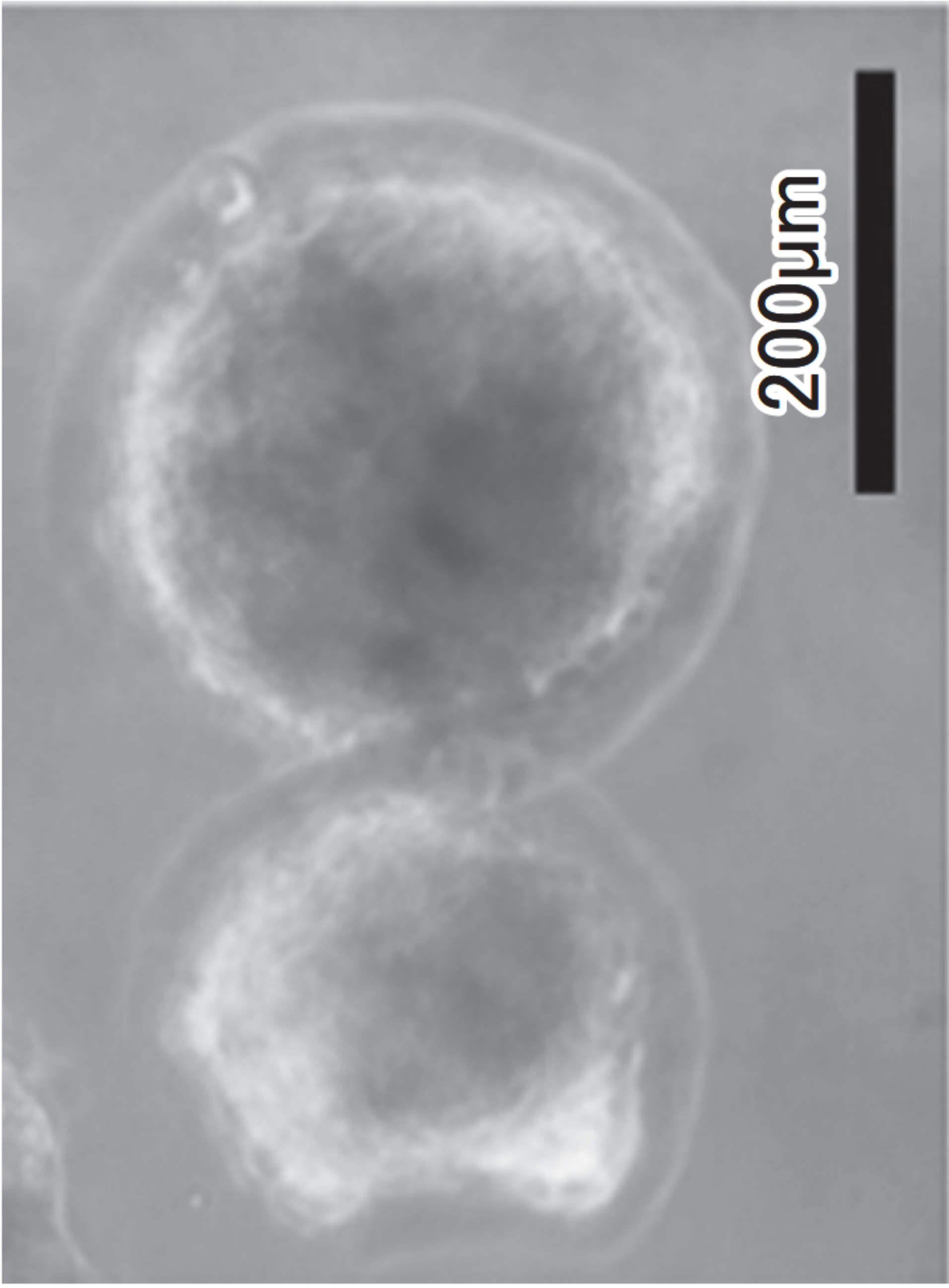
【圖5】



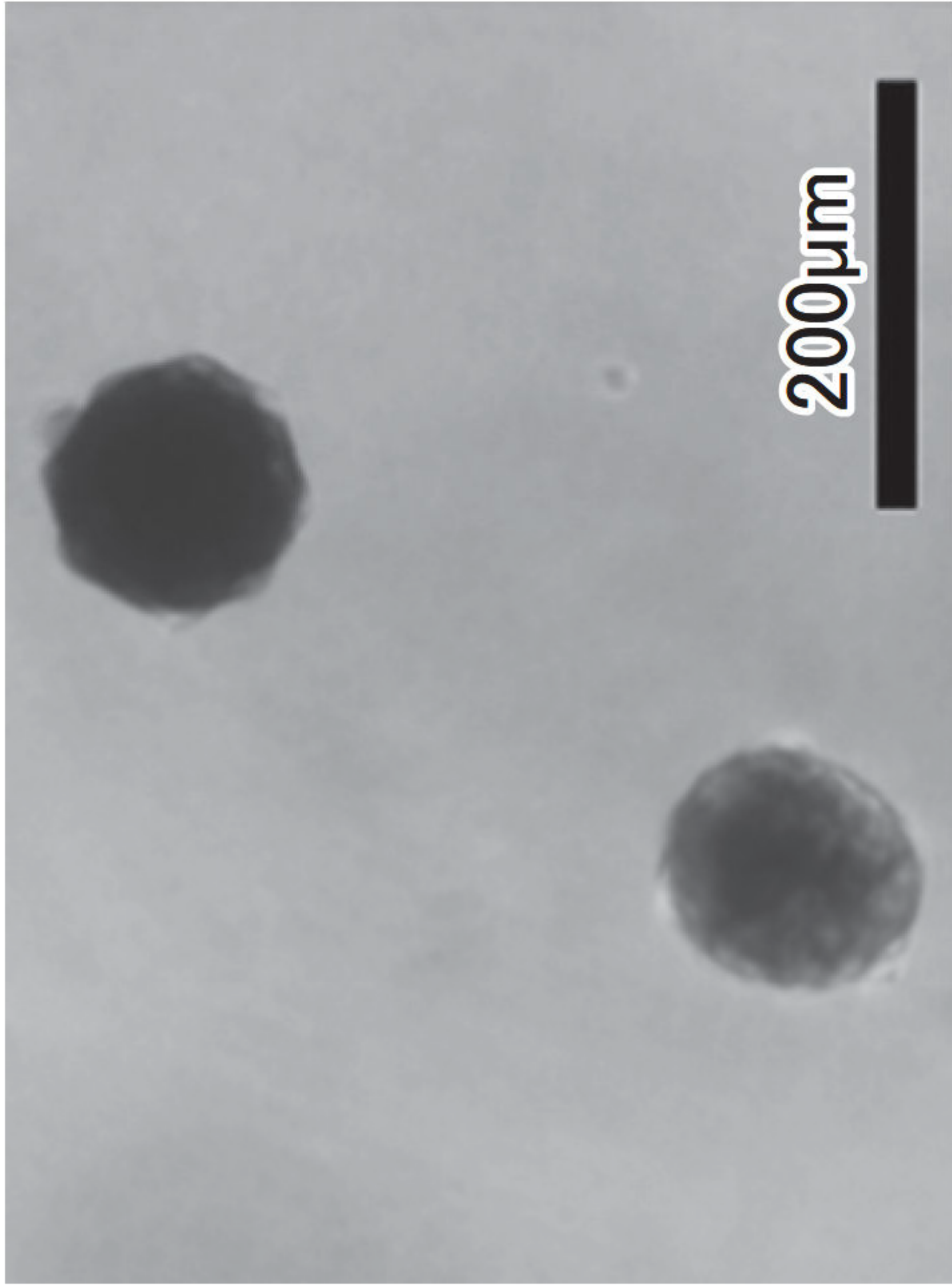
(a)皿上之培養



(b)水凝膠(5 kPa)上之培養

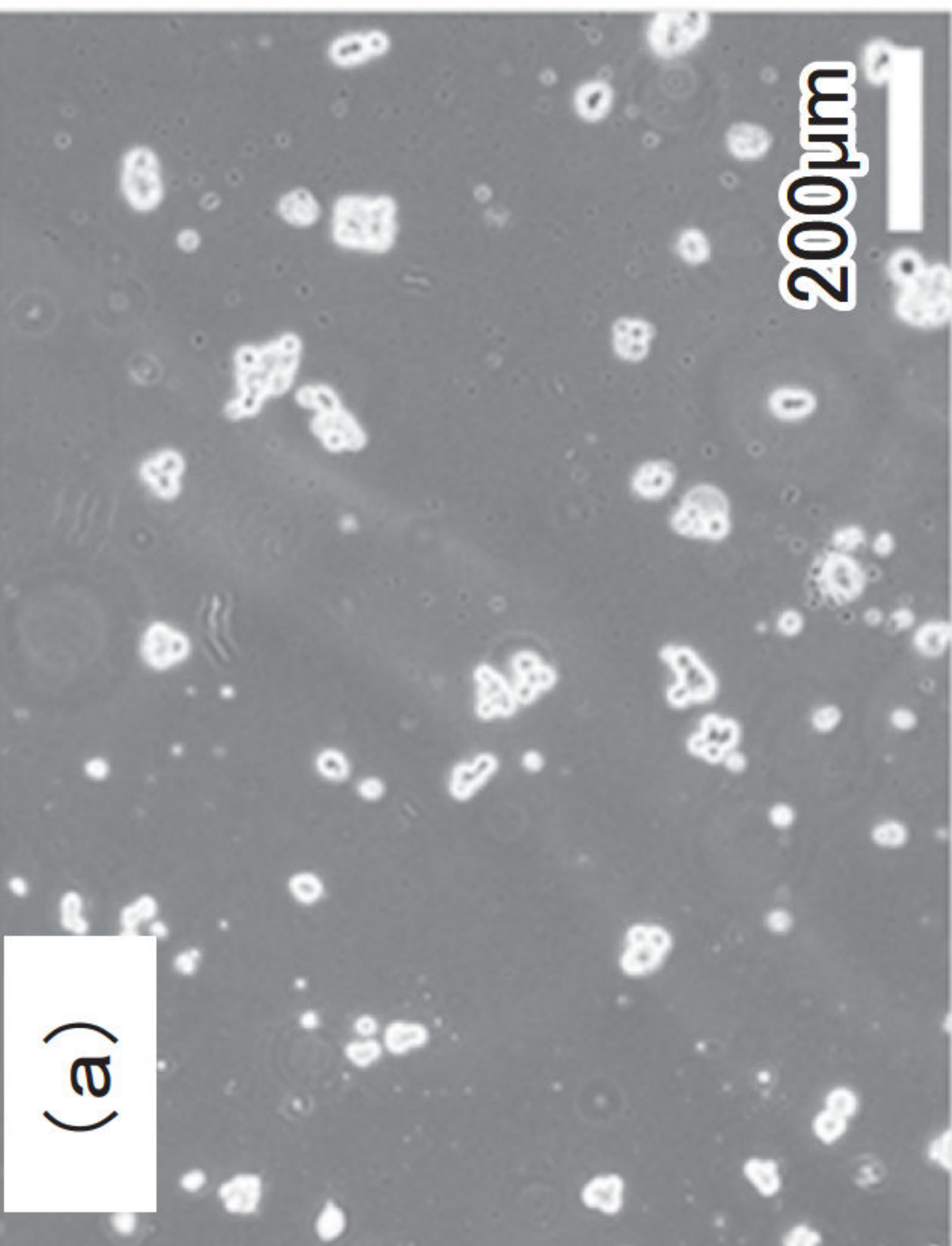
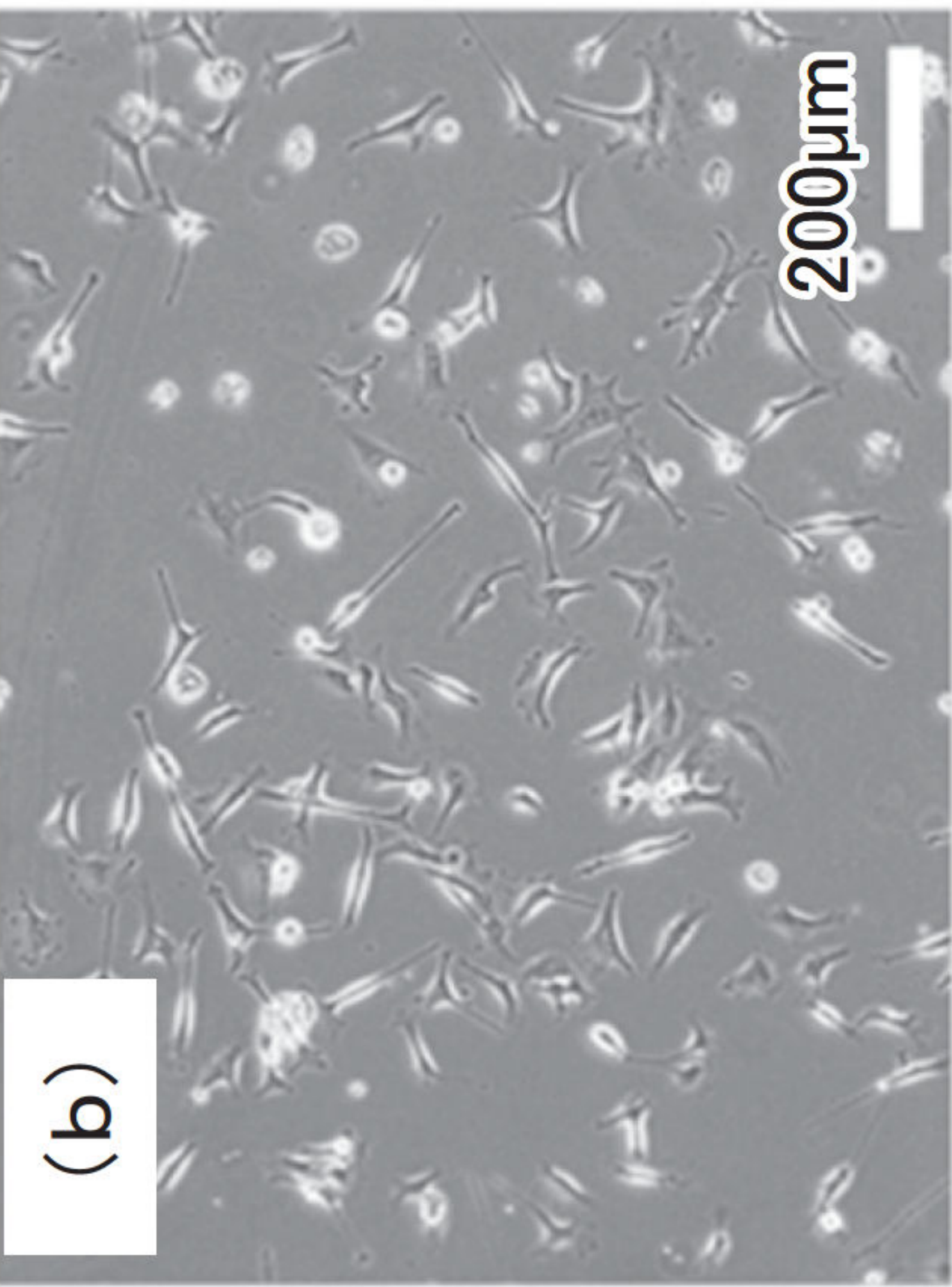
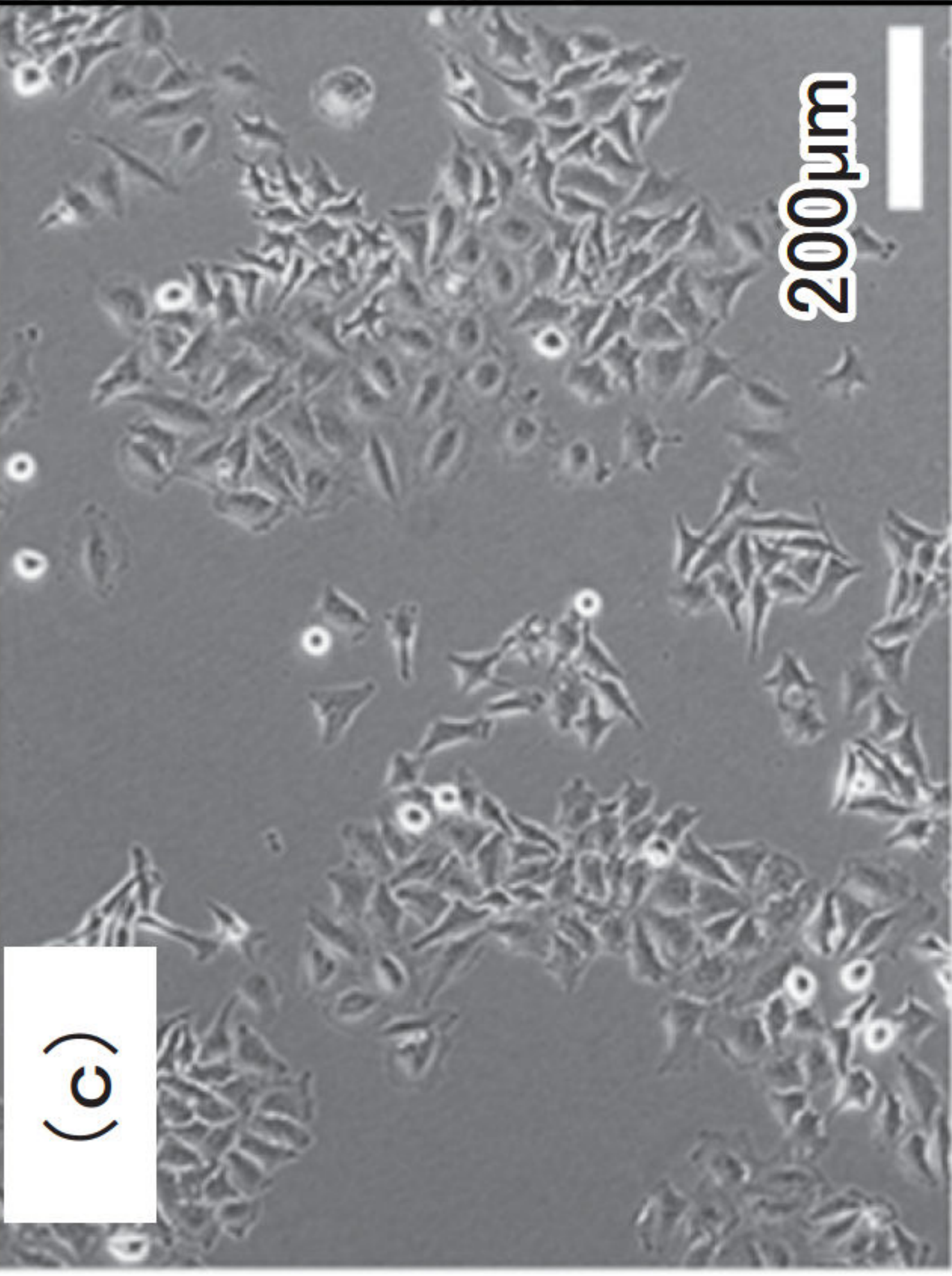
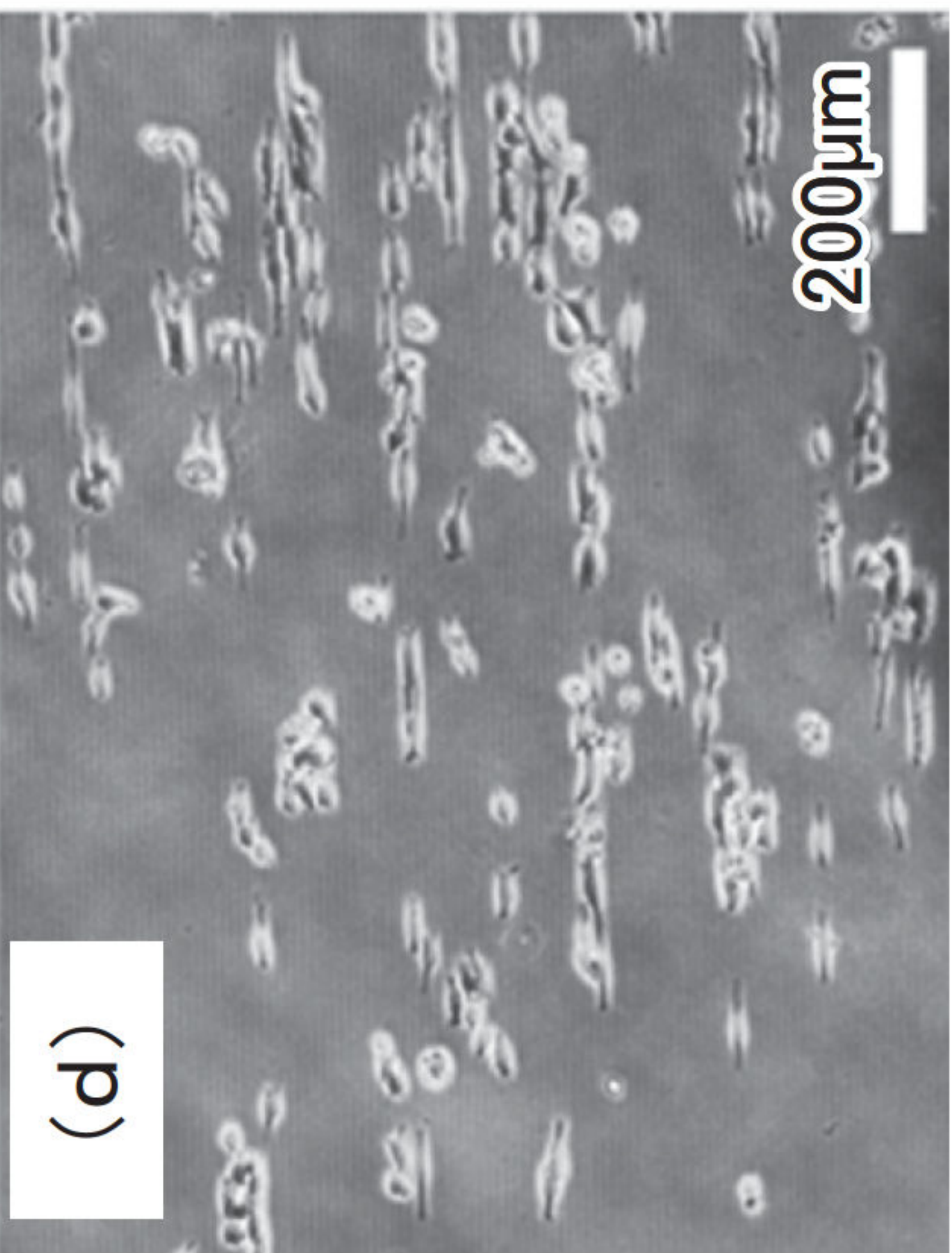
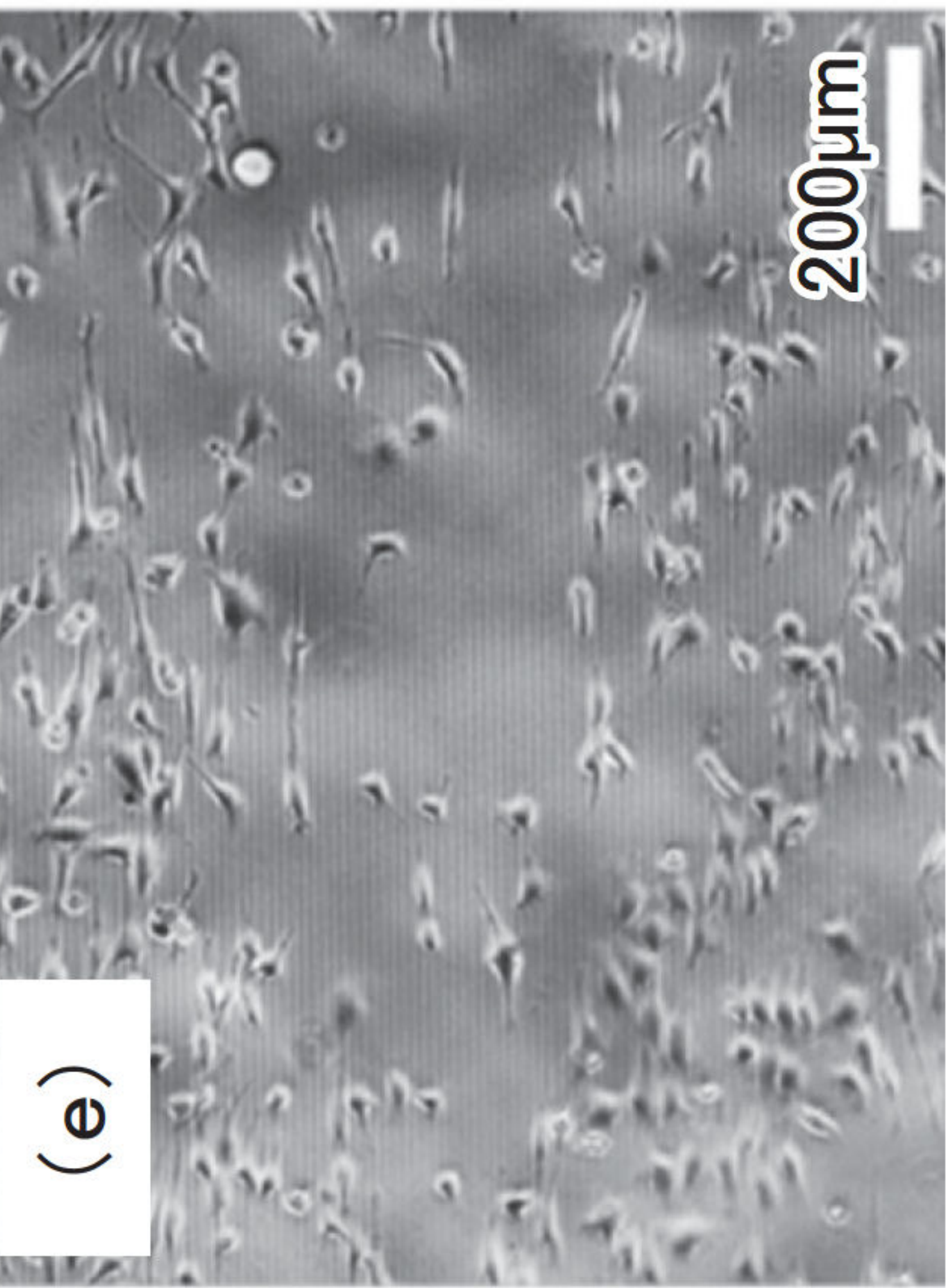


(c)水凝膠(16 kPa)上之培養

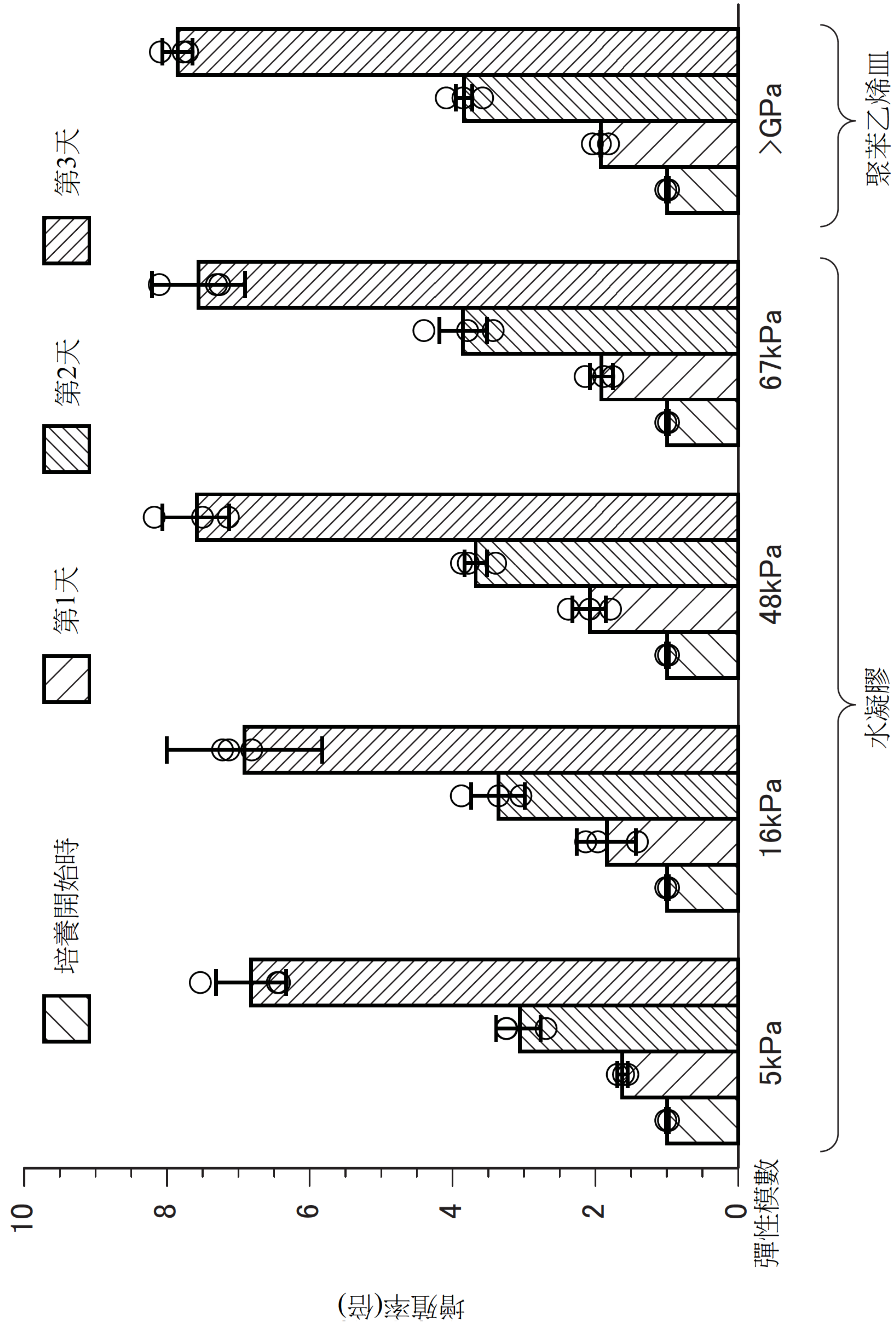


(d)水凝膠(48 kPa)上之培養

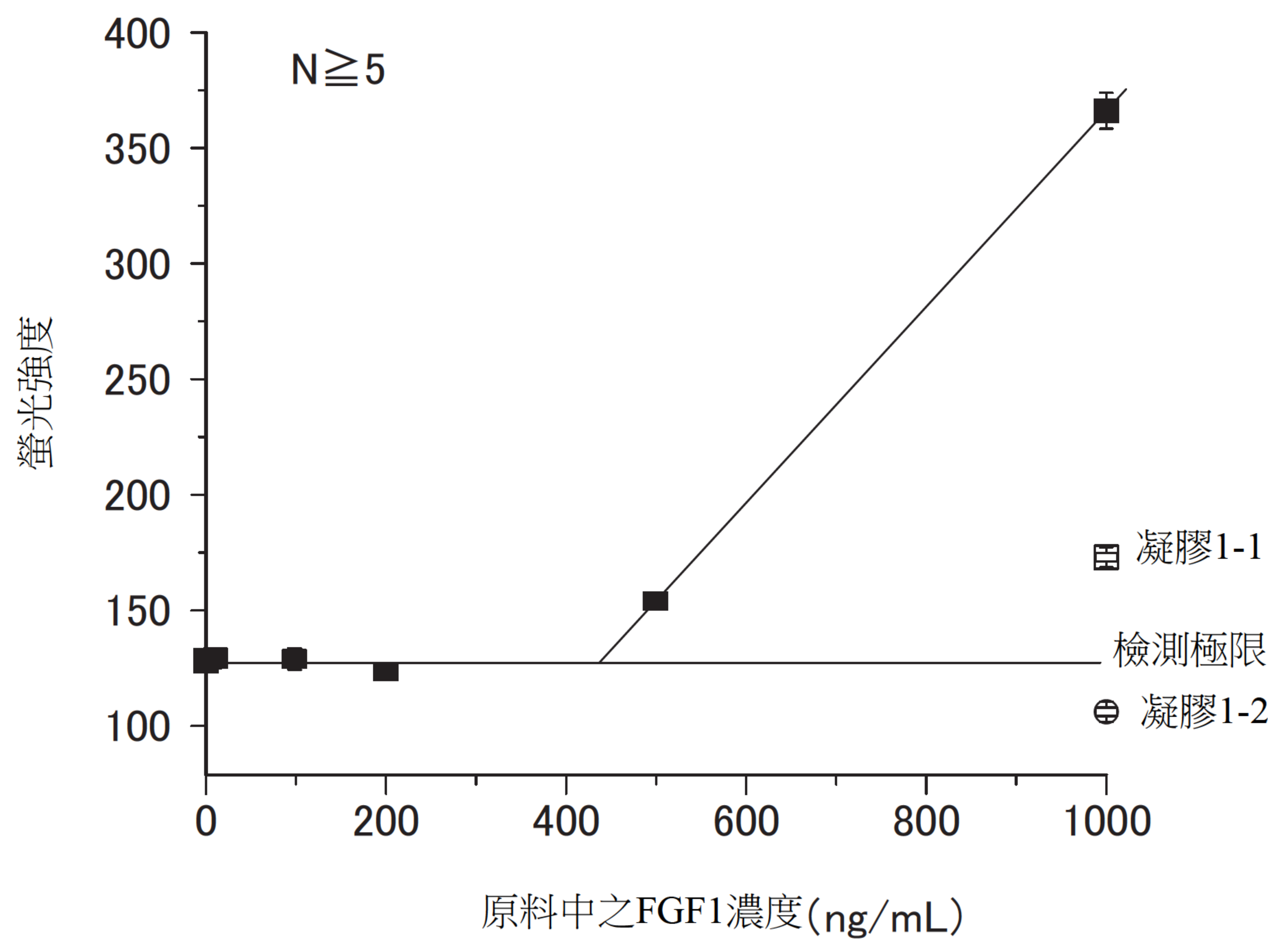
【圖6】

	水凝膠 (5kPa)	水凝膠 (48kPa)	聚苯乙烯皿
平滑表面 (未處理表面)上之培養	(a)	(b)	(c)
5 µm線表面上之培養	(d)	(e)	

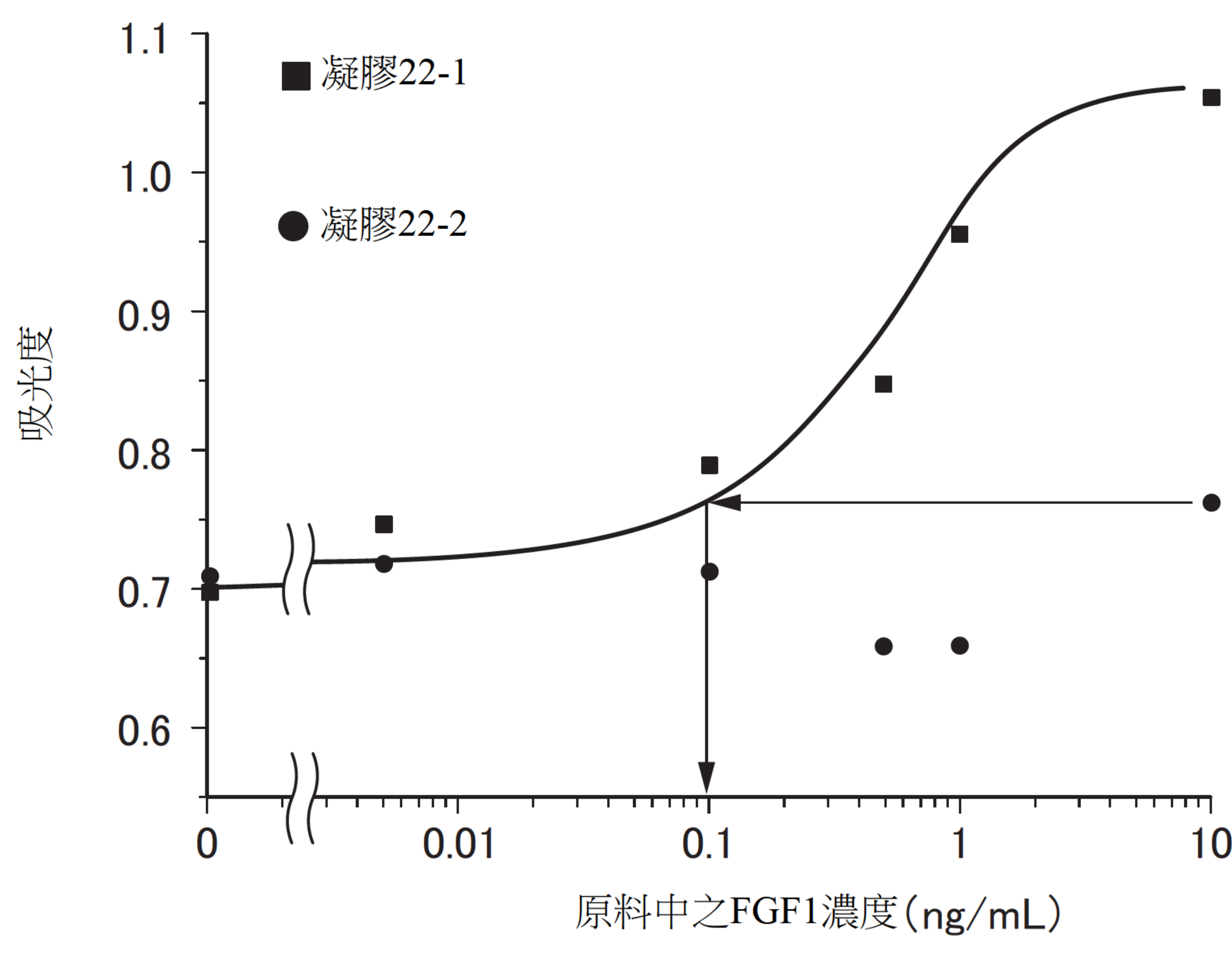
【圖7】



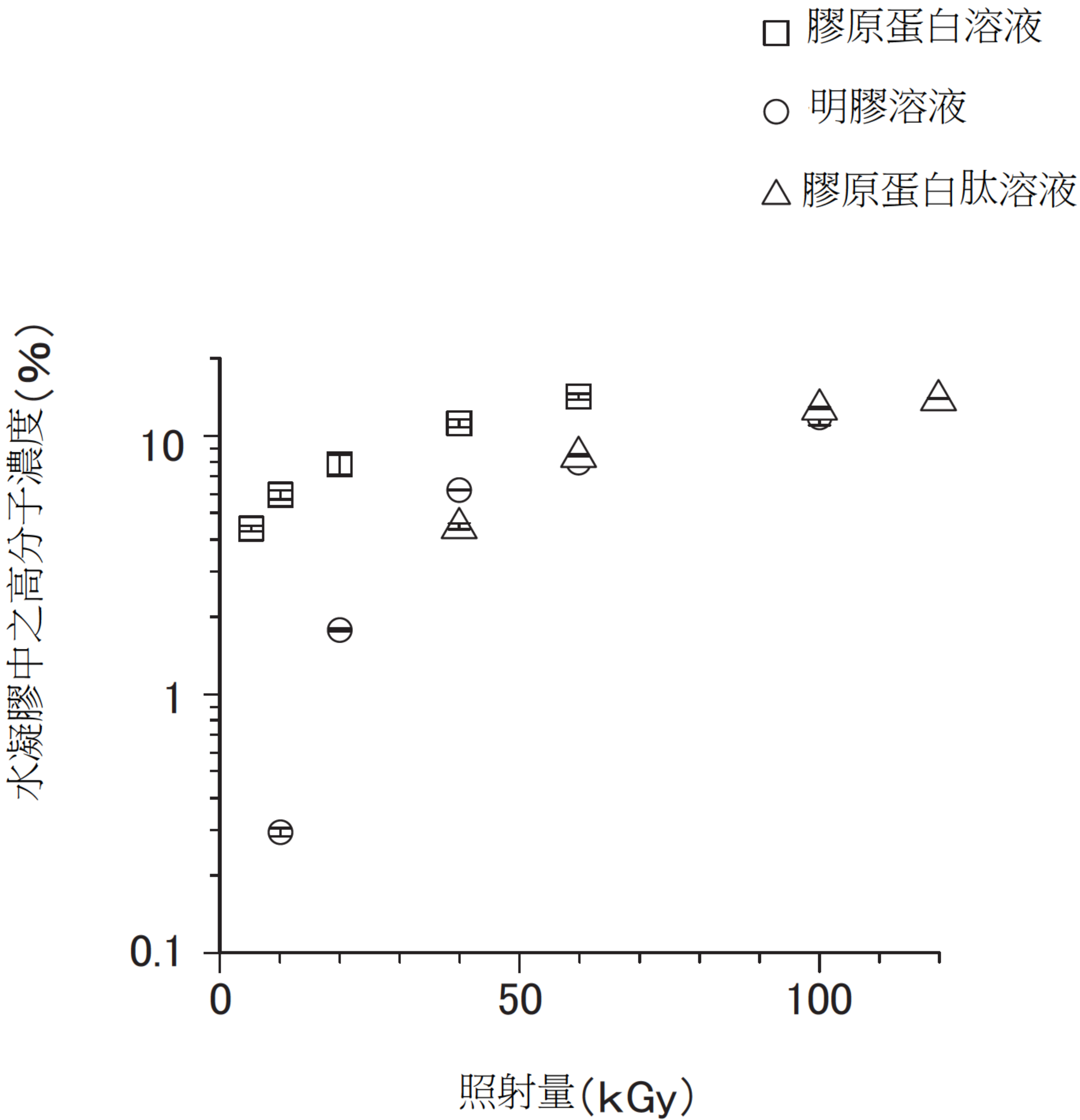
【圖8】



【圖9】

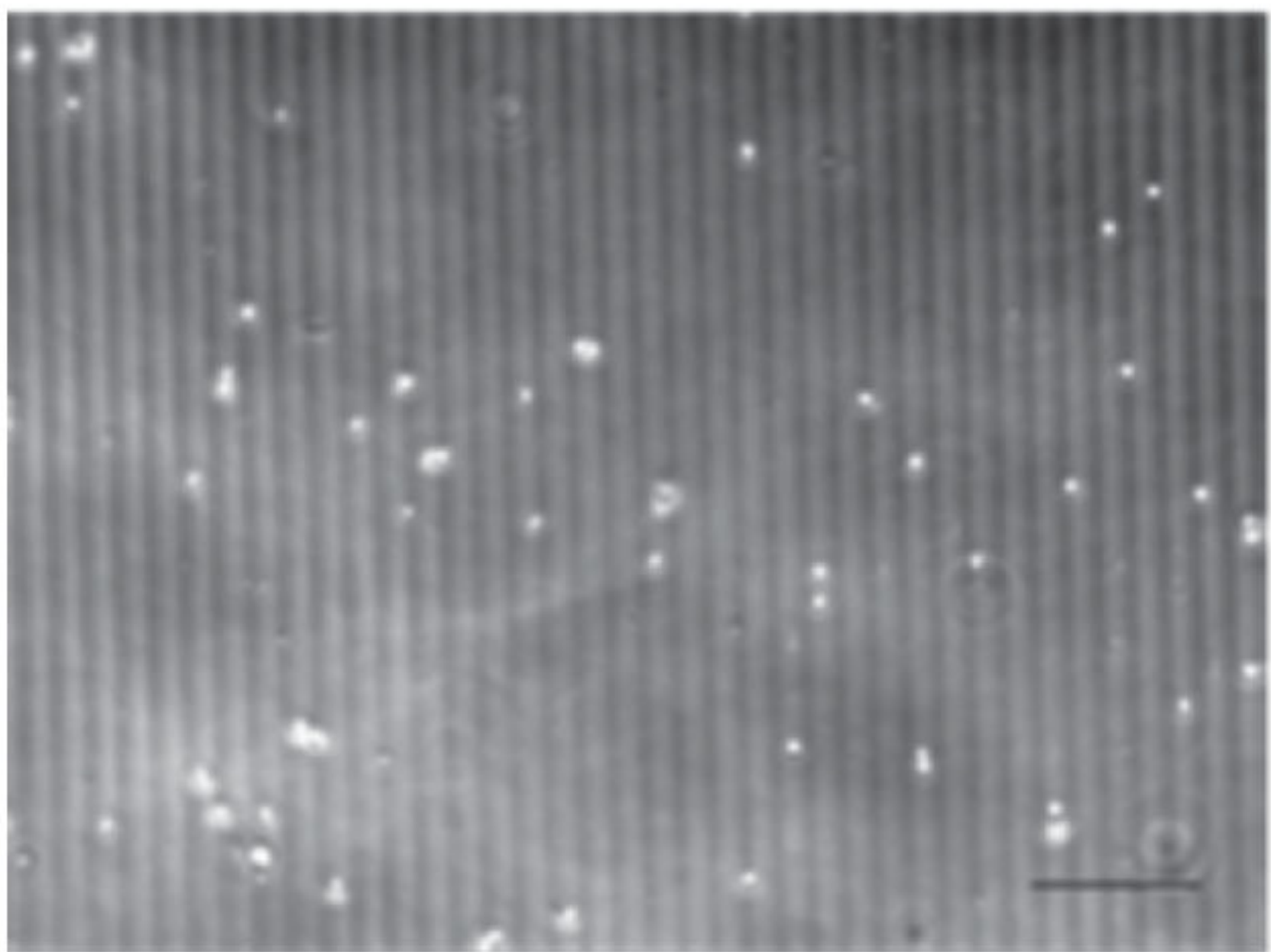


【圖10】

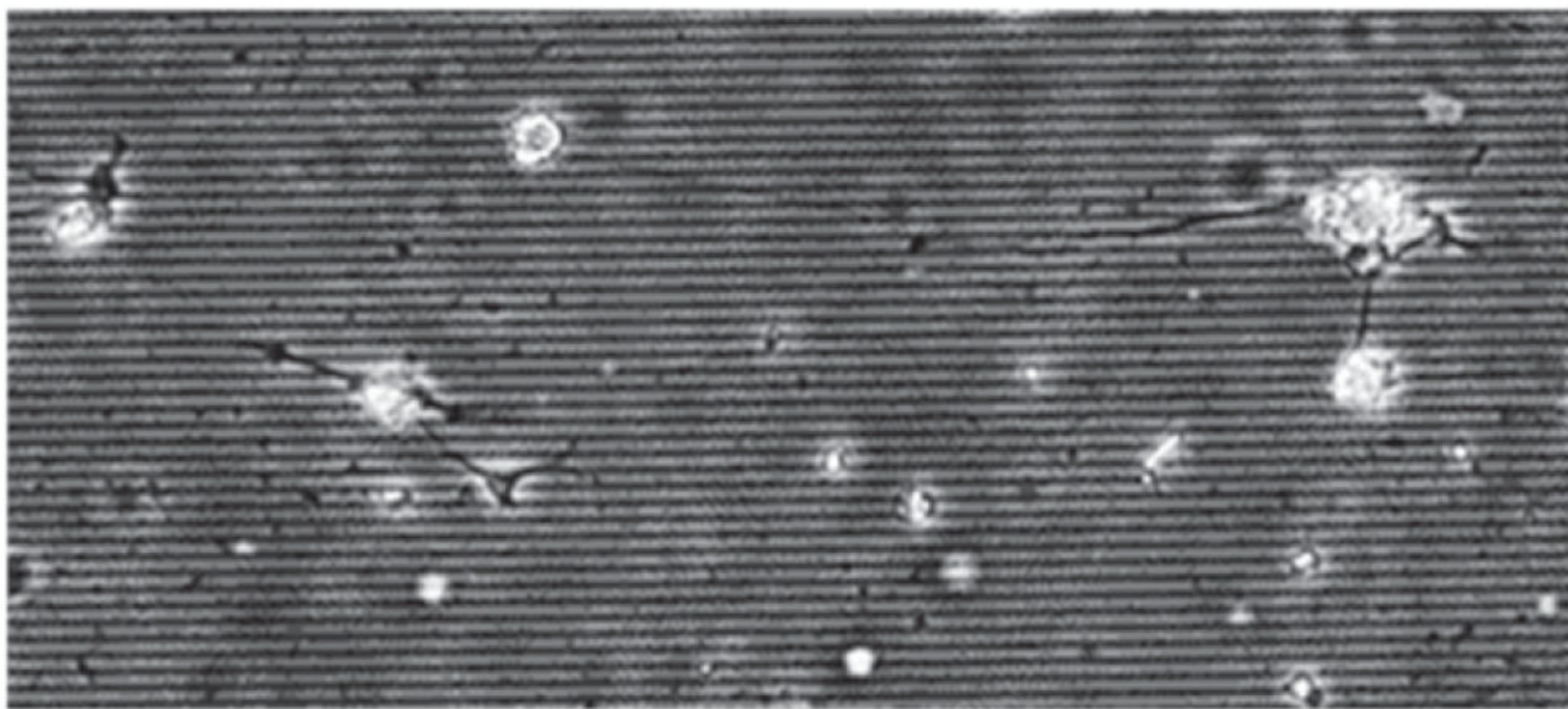


【圖11】

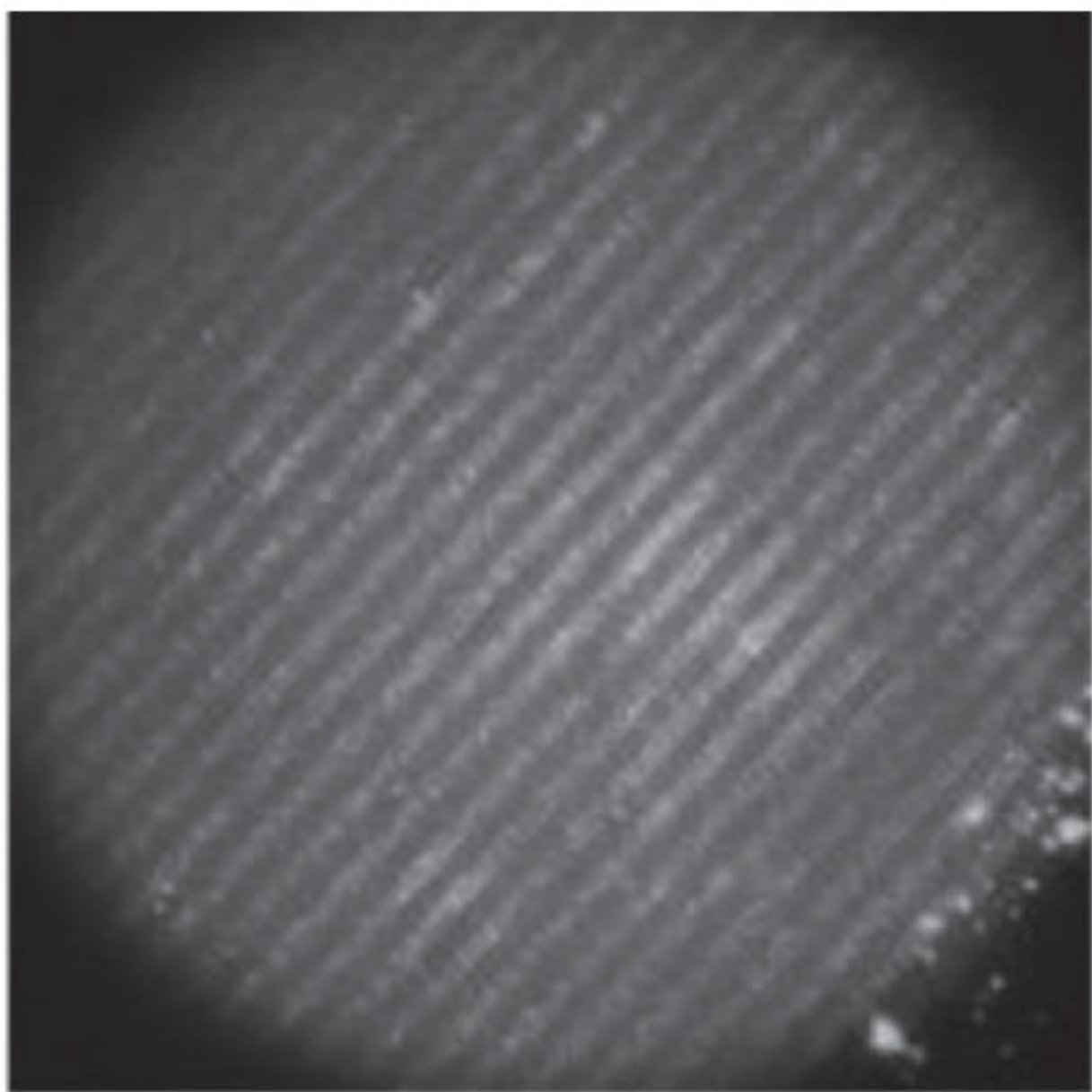
(A)層黏連蛋白塗佈 無



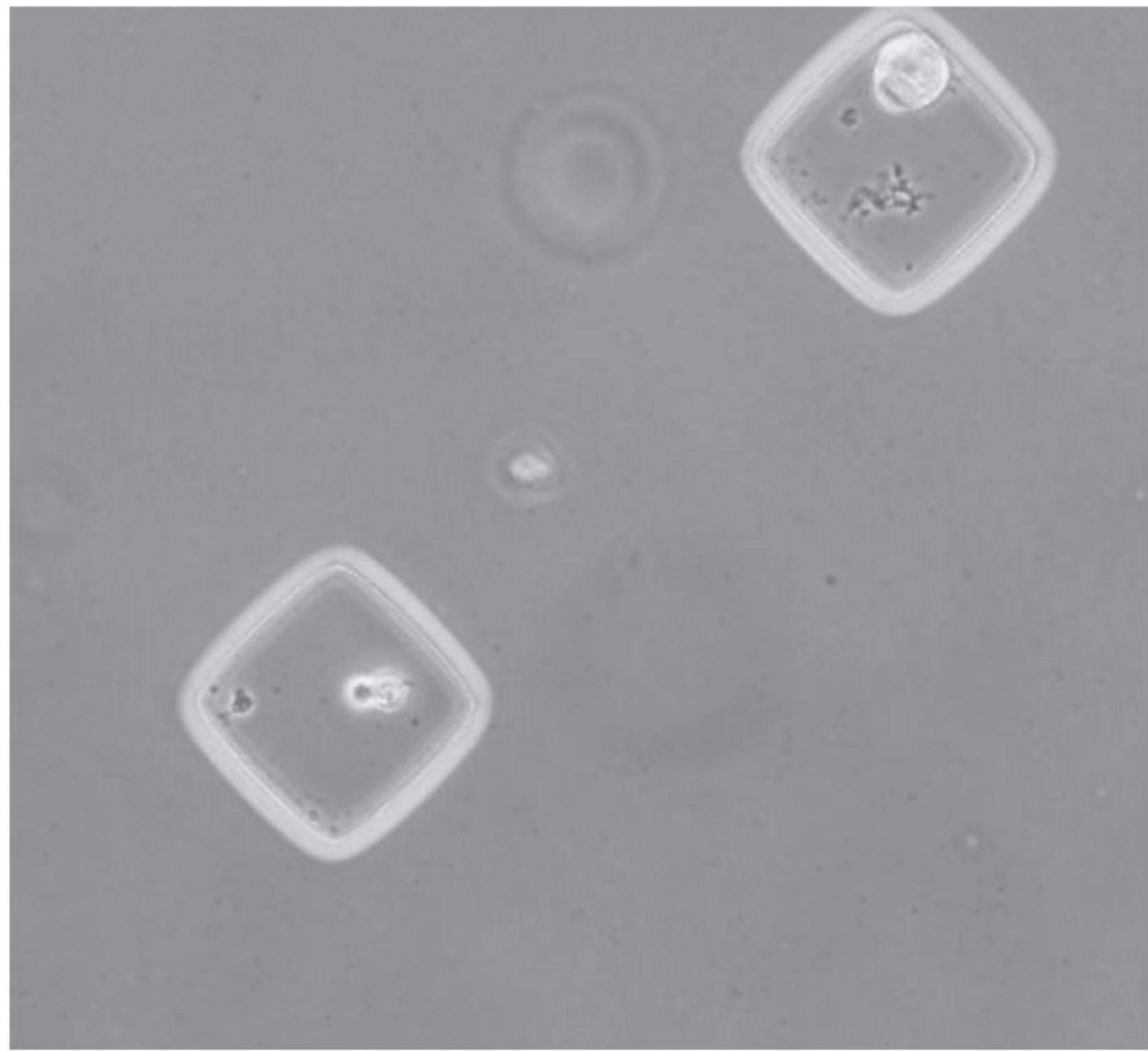
(B)層黏連蛋白塗佈 有



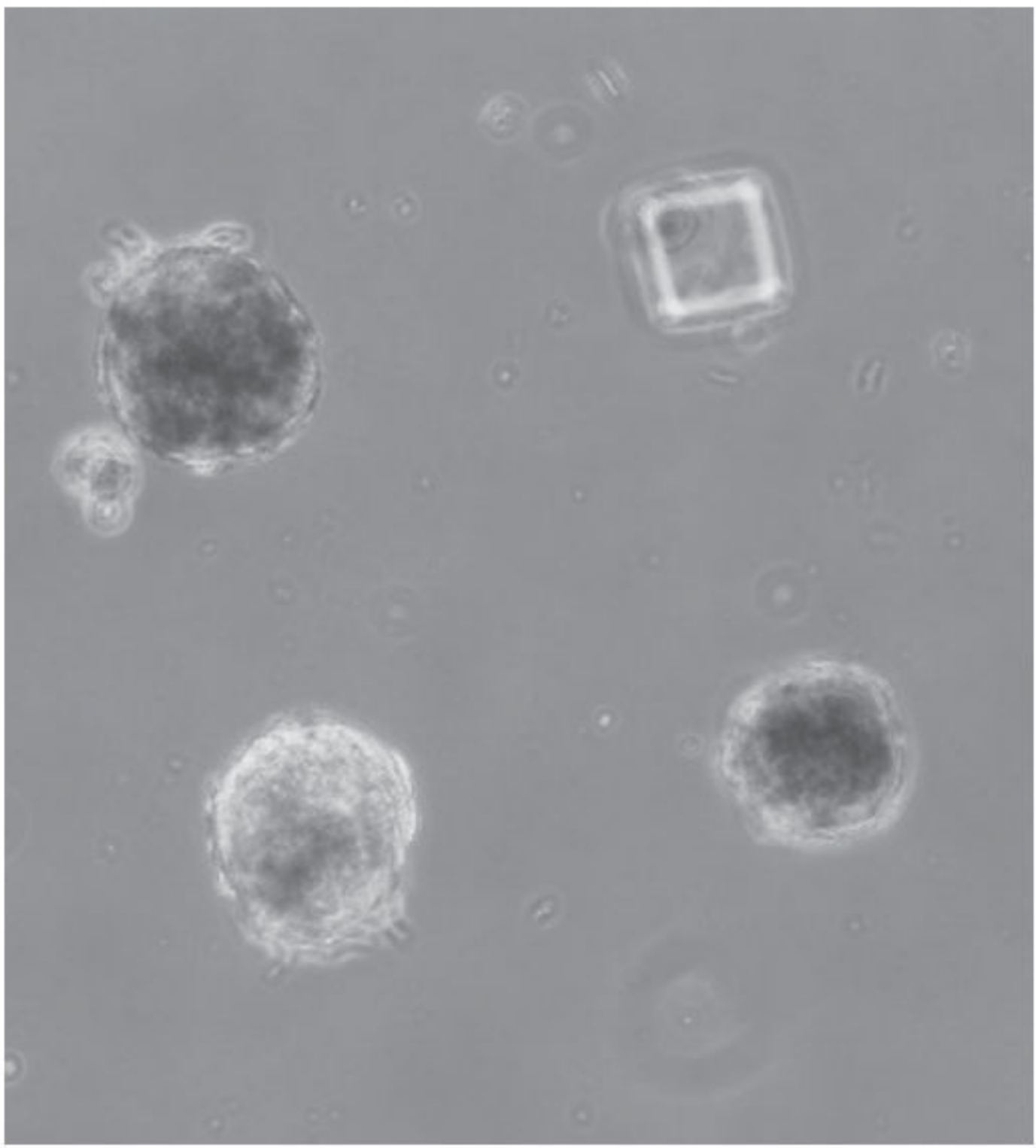
(C)



【圖12】



【圖13】



【圖14】