(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
2011 年 9 月 9 日(09.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/108517 A1

(51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/054577

(22) 国際出願日: 2011 年 3 月 1 日(01.03.2011)

(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 2010-044023 2010 年 3 月 1 日(01.03.2010) JP
特願 2010-224628 2010 年 10 月 4 日(04.10.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士フイルム株式会社 (**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1060031 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 健太郎(**NAKAMURA Kentarou**) [JP/JP]; 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(**SIKs & Co.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

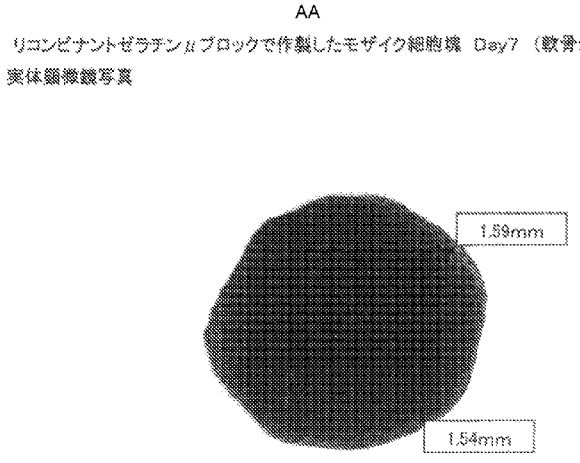
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: CELL STRUCTURE COMPRISING CELLS AND MACROMOLECULAR BLOCKS HAVING BIOCOMPATIBILITY

(54) 発明の名称 : 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞からなる細胞構造体

[図1]



AA Figure 1: Mosaic Cell Cluster Produced from Recombinant Gelatin μ-Block, Day 7 (Chondrogenic Differentiation Medium) Stereoscopic Microscope Photograph

(57) **Abstract**: Disclosed is a three-dimensional cell structure having a sufficient thickness for tissue regeneration and wherein cells are present evenly within the structure. The cell structure contains cells and macromolecular blocks having biocompatibility, and a plurality of said macromolecular blocks are disposed in gaps between said plurality of cells.

(57) 要約: 本発明の目的は、組織再生に十分な厚さを有し、かつ構造体中で細胞が均一に存在するような細胞３次元構造体を提供することである。本発明によれば、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含み、該複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックが配置されている、細胞構造体が提供される。

WO 2011/108517 A1

明　細　書

発明の名称 ：

生体親和性を有する高分子ブロックと細胞からなる細胞構造体

技術分野

[0001] 本発明は、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含む細胞構造体において該複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックがモザイク状に配置されている細胞構造体、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器の再生を計る再生医療の実用化が進められている。再生医療は、本来生体が持っている自然治癒能力だけでは回復出来なくなった生体組織を、細胞、足場、成長因子の三因子を使って元の組織と同じような形態や機能を再び作り出す新たな医療技術である。近年では、細胞を使った治療が徐々に実現されはじめてきた。例えば、自家細胞を用いた培養表皮や、自家軟骨細胞を用いた軟骨治療、間葉系幹細胞を用いた骨再生治療、筋芽細胞を用いた心筋細胞シート治療、角膜上皮シートによる角膜再生治療、神経再生治療などが挙げられる。これら新たな治療は、従来の人工物による代替医療（人工骨補填剤やヒアルロン酸注射）とは異なり、生体組織の修復・再生を図る為、高い治療効果を得られる。実際、一部、自家細胞を用いた培養表皮や培養軟骨といった製品が上市されてきた。

[0003] しかし、現在の技術では、主に、移植する細胞を薄いシート状にして移植したり、懸濁液の状態で移植するため、十分な厚みを有した組織を提供できない。生体組織は元来厚みを有するものであり、厚みを有するがために、心臓を拍動させるような筋力を可能としたり、関節軟骨にあって潤滑な動きを可能としている。細胞を用いた組織再生の全般においては、厚みを有した組織を提供できないことが大きな課題であると考えられている。

[0004] 例えば、細胞シートを用いた心筋の再生にあっては、厚みのある組織を再

生するには、細胞シートの多層構造体が必要であると考えられる。近年、岡野らは温度応答性培養皿を用いた細胞シートを開発した。細胞シートはトリプシンのような酵素処理が必要でないため、細胞と細胞との結合および接着蛋白が保持される。(非特許文献１から６)。このような細胞シート製造技術は、心筋組織の再生に有用であると期待される。ただし、これまでの細胞シートでは血管網の形成ができないため、十分な厚みのある組織の再生は困難であった(非特許文献５及び７)。その理由は、細胞シートに厚みを持たせることで、中心部の細胞への栄養供給が途絶えてしまい、細胞が死滅してしまうことにある。実際、岡野らは２００μｍ以上の厚みを実現することは不可能であると考え、細胞シートに血管網を形成すべく、血管内皮細胞を一緒に導入した細胞シートの開発を行っている（非特許文献８）。しかし、これは、目的の細胞のほかに、血管内皮細胞という別の細胞源を用意しなければならないことや、細胞シートに均一に血管を誘導することが困難であること、仮にこの手段で、栄養分の送達経路を提供出来たとしても、この手法では作製した栄養送達経路を外部の栄養送達経路と緻密に結合させねばならないことなど、多くの問題を抱えており、現実的な解決策とはなっていない。

[0005] また、骨再生においても、基材に培養細胞を付与した骨再生シートが開発されている。

間葉系幹細胞をシート状に培養した培養細胞シートと生分解性物質をシート状に形成した生分解シートとを積層してなる骨再生シート（特許文献１）が提案されている。また、多孔質シート上に間葉系細胞から分化させた間葉系組織前駆体細胞と細胞外基質とが付着している間葉系組織再生誘導用シートもある（特許文献２）。これらの発明は培養骨芽細胞の付着したシートを体内に入れ、体内での膜性骨化によって骨芽細胞から皮質骨を形成させる方法である。しかしながら、骨芽細胞様細胞は積層して培養することができないという問題があるため骨芽細胞層を用いたシートでは細胞層の厚さが１００μｍを超える再生シートを提供できなかった。その後、特許文献３では、培養手法の開発・最適化によって、２００μｍ以上の厚さのシートを形成で

きるとあるが、実際のところは２１０μｍ程度までの厚みしか提供できていない。

[0006] 以上のように、多くの組織修復において細胞を厚みのある組成物として提供することは困難な課題であった。その主たる原因は、細胞で構成された３次元構造体には、栄養分が拡散だけでは十分に浸透していかないことにある。それを解決する手段として、ひとつにはコラーゲンを用いたゲル包埋培養が考案された（非特許文献９）。しかし、ゲルに包埋した細胞では、細胞がゲル中心部から外側へと移動してしまうため、ゲル中で細胞が均一に存在せず、中心部の細胞密度が低くなることから、根本的に本課題を解決することはできていない。また、ゲル包埋で作製した細胞３次元構造体では、３次元構造体同士を結合・融合することができず、細胞播種時に作製したサイズ以上の３次元構造体を形成させることができない。従って、小さいゲルを作製してから、ゲル同士を融合させることで、均一に細胞が分布した構造体を作製する、という手段をとることもできない。

[0007] また、特許文献４では、無機セラミックスビーズで細胞を連結することにより、３次元培養が可能であると述べている。しかし、無機セラミックスでは、水分の保持・液交換・栄養の拡散・緩衝能が悪く、現実的に厚みを有した細胞組成物を提供することはできていない。実際、特許文献４の実施例においても、１５０～４６０μｍの粒子に細胞を接着させ、その周囲にＰＬＬＡの厚い不織布（１ｃｍ）を積層させて見かけの厚みを増やしているだけであり、実際の細胞含有層は、無機セラミックスビーズ表面上のせいぜい数十μｍ層でしかない。仮に細胞を有さない１ｃｍのＰＬＬＡ不織布を構造体と見なしたとしても、著しく不均一な細胞分布の構造体でしかない。このように、現在までは構造体中の細胞分布が不均一な細胞３次元構造体、実質の細胞層が薄い構造体しか提供することはできていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開２００３－２７５２９４号公報

特許文献2：特開２００６－１１６２１２号公報

特許文献3：特開２００９－２４０７６６号公報

特許文献4：特開２００４－２６７５６２号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Shimizu, T. et al., Circ. Res. 90, e40-48 (2002)

非特許文献2：Kushida, A. et al., J. Biomed. Mater. Res. 51, 216-223 (2000)

非特許文献3：Kushida, A. et al., J. Biomed. Mater. Res. 45, 355-362 (1999)

非特許文献4：Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A. & Okano, T., Tissue Eng. 7, 141-151 (2001)

非特許文献5：Shimizu, T et al., J. Biomed. Mater. Res. 60,110-117(2002)

非特許文献6：Harimoto, M. et al., J. Biomed. Mater. Res. 62, 464-470 (2002)

非特許文献7：Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A. & Okano, T., Biomaterials 24, 2309-2316 (2003)

非特許文献8：Inflammation and Regeneration vol.25 No.3 2005, p158-159. 第２６回　日本炎症・再生医学会　―炎症学と再生医学の融合を目指して― 岡野光夫

非特許文献9：Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. J Yang, J Richards,P Bowman, R Guzman, J Enami, K McCormick, S Hamamoto, D Pitelka, and S Nandi. PNAS July 1, 1979 vol. 76 no. 7 3401-3405

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、組織再生に十分な厚さを有し、かつ構造体中で細胞が均一に存在するような細胞構造体を提供することを課題とした。更に本発明は、目的

細胞以外の細胞を使用することなく製造可能な細胞構造体を提供することを課題とした。更に本発明は、細胞３次元構造体同士が自然に融合可能であるような細胞構造体を提供することを課題とした。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、生体親和性を有する高分子ブロック（生体親和性を有した高分子材料からなる塊）と細胞とをモザイク状に３次元配置することによって、外部から細胞３次元構造体の内部への栄養送達を可能とし、十分な厚みを有し、かつ構造体中で細胞が均一に存在するような細胞３次元構造体を形成することに成功した。さらに、上記細胞３次元構造体の外周部に存在する細胞の働きによって、細胞３次元構造体同士の自然融合が可能であることも見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0012] 即ち、本発明の態様は以下に関する。

〔１〕 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含み、該複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックが配置されている、細胞構造体。

〔２〕 該高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、〔１〕に記載の細胞構造体。

〔３〕 該高分子ブロックの大きさが１０μｍ以上３００μｍ以下である〔２〕に記載の細胞構造体。

〔４〕 厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の細胞構造体。

[0013] 〔５〕 厚さ又は直径が７２０μｍ以上１ｃｍ以下である、〔４〕に記載の細胞構造体。

〔６〕 前記高分子ブロックと前記細胞との比率が、細胞1個当り０．０００００１μｇ以上１．０μｇ以下である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の細胞構造体。

〔７〕 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートすることによって製造される、〔１〕から〔６〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔８〕　生体親和性を有する高分子が、生分解性材料である、〔１〕から〔７〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔９〕　生体親和性を有する高分子が、ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ＰＬＧＡ、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、コンドロイチン、セルロース、アガロース、カルボキシメチルセルロース、キチン、又はキトサンである、〔１〕から〔８〕の何れかに記載の細胞構造体。

[0014] 〔１０〕　生体親和性を有する高分子が、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、プロネクチン、ラミニン、テネイシン、フィブリン、フィブロイン、エンタクチン、トロンボスポンジン、又はレトロネクチンである、〔１〕から〔９〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔１１〕　生体親和性を有する高分子が架橋されている、〔１〕から〔１０〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔１２〕　架橋がアルデヒド類、縮合剤、又は酵素により施される、〔１１〕に記載の細胞構造体。

〔１３〕　生体親和性を有する高分子が、遺伝子組み換えゼラチンである、〔１〕から〔１２〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔１４〕　前記生体親和性を有する高分子が、細胞接着性シグナルを一分子中に２以上有する〔１３〕に記載の細胞構造体。

[0015] 〔１５〕　遺伝子組み換えゼラチンが、

式：Ａ－［（Gly－Ｘ－Ｙ）$_{n}$］$_{m}$－Ｂ

（式中、Ａは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示し、Ｂは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示し、ｎ個のＸはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ｎ個のＹはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ｎは３～１００の整数を示し、ｍは２～１０の整数を示す。なお、n個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい。）で示される、〔１３〕に記載の細胞構造体。

[0016] 〔１６〕　遺伝子組み換えゼラチンが、

式：Gly-Ala-Pro-［（Gly－Ｘ－Ｙ）$_{63}$］$_{3}$－Gly

（式中、63個のＸはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のＹはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい。）で示される、〔１３〕又は〔１５〕に記載の細胞構造体。

[0017] 〔１７〕　遺伝子組み換えゼラチンが、（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列、又は（２）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、〔１３〕から〔１６〕の何れかに記載の細胞構造体。

〔１８〕　生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程を含む、〔１〕から〔１７〕の何れかに記載の細胞構造体の製造方法。

〔１９〕　生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において培地交換を行う、〔１８〕に記載の方法。

〔２０〕　生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、培地を分化培地又は増殖培地に交換する、〔１９〕に記載の方法。

[0018] 〔２１〕　生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、生体親和性を有する高分子ブロックをさらに添加する、〔１８〕から〔２０〕の何れかに記載の方法。

〔２２〕　〔１８〕から〔２１〕の何れかに記載の方法により製造される、細胞構造体。

〔２３〕　〔１〕から〔１７〕の何れかに記載の細胞構造体の複数個を融合することによって得られる、細胞構造体。

〔２４〕　〔１〕から〔１７〕の何れかに記載の細胞構造体の複数個を融合する工程を含む、〔２３〕に記載の細胞構造体の製造方法。

[0019] 〔２５〕　生体親和性を有する複数個の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、

一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体を複数個融合させる工程を含む、細胞構造体の製造方法。

〔２６〕　前記高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、〔２５〕に記載の細胞構造体の製造方法。

〔２７〕　前記融合前の各細胞構造体の厚さ又は直径が１０μｍ以上１ｃｍ以下であり、前記融合後の厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、〔２５〕または〔２６〕に記載の細胞構造体の製造方法。

[0020] 〔２８〕　生体親和性を有する複数個の第一の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体に、更に、第二の高分子ブロックを添加しインキュベートする工程を含む、細胞構造体の製造方法。

〔２９〕　前記第一の高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、〔２８〕に記載の細胞構造体の製造方法。

〔３０〕　前記第二の高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、〔２８〕または〔２９〕に記載の細胞構造体の製造方法。

[0021] 〔３１〕　前記第二の高分子ブロックを添加しインキュベートした後の、厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、〔２８〕から〔３０〕のいずれかに記載の細胞構造体の製造方法。

〔３２〕　〔２５〕～〔３１〕のいずれかに記載の細胞構造体の製造方法により製造される、細胞構造体。

〔３３〕　細胞移植、細胞培養または毒性評価用途に使用する、〔３２〕に記載の細胞構造体。

発明の効果

[0022] 本発明の細胞構造体は、組織再生に十分な厚さを有し、かつ構造体中で細胞が均一に存在している。また本発明の細胞構造体は、目的細胞以外の細胞を使用することなく製造可能である。更に本発明の細胞構造体は、細胞構造体同士が自然に融合可能である。本発明の細胞構造体は、機能障害や機能不

全に陥った生体組織・臓器の再生を計る再生医療に有用である。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図１は、リコンビナントゼラチンμブロックで作製したモザイク細胞塊のＤａｙ７　（軟骨分化培地）の実体顕微鏡写真を示す。

[図2]図２は、天然ゼラチンμブロックで作製したモザイク細胞塊のＤａｙ７（軟骨分化培地）の実体顕微鏡写真を示す。

[図3]図３は、リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真（ＨＥ染色　×５倍）を示す。

[図4]図４は、リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真（ＨＥ染色　×１０倍）を示す。

[図5]図５は、リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真（ＨＥ染色　×４０倍）を示す。

[図6]図６は、モザイク細胞塊の融合を示す。

[図7]図７は、モザイク細胞塊の融合（３つのモザイク細胞塊を融合）のＨＥ染色切片写真（×５倍）を示す。

[図8]図８は、モザイク細胞塊の融合（３つのモザイク細胞塊を融合）のＨＥ染色切片写真（×１０倍）を示す。

[図9]図９は、モザイク細胞塊の融合（３つのモザイク細胞塊を融合）のＨＥ染色切片写真（×２０倍）を示す。

[図10]図１０は、モザイク細胞塊の融合（３つのモザイク細胞塊を融合）のＨＥ染色切片写真（×５倍）を示す。

[図11]図１１は、モザイク細胞塊の融合（３つのモザイク細胞塊を融合）のＨＥ染色切片写真（×１０倍）を示す。

[図12]図１２は、ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真（経時変化）を示す。

[図13]図１３は、ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真からの直径の経時変化を示す。

[図14]図１４は、ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真か

らの面積の経時変化を示す。

[図15]図１５は、ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真から計算で算出した体積（$4/3\pi r^3$）の経時変化を示す。

[図16]図１６は、リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片（Ｄａｙ７（増殖培地下）、×５倍）を示す。

[図17]図１７は、リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片（Ｄａｙ７（増殖培地下）、×１０倍）を示す。

[図18]図１８は、ボリュームアップしたＤａｙ２１（増殖培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加）のHE切片写真（×５倍）を示す。

[図19]図１９は、ボリュームアップしたＤａｙ２１（増殖培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加）HE切片写真（×４０倍）

[図20]図２０は、ボリュームアップしたＤａｙ２１（軟骨分化培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加）のHE切片写真（×５倍、×２０倍）を示す。

[図21]図２１は、ＧＡＧスペクトルデータを示す。

[図22]図２２は、モザイク細胞塊中のＧＡＧ産生量の経時変化を示す。

[図23]図２３は、モザイク細胞塊（Ｄａｙ７）中の細胞が産生・保持しているＡＴＰ量を示す。

[図24]図２４は、ＰＬＧＡμブロックで作製したモザイク細胞塊のＤａｙ２（増殖培地）の実体顕微鏡写真を示す。

[図25]図２５は、心筋細胞とリコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊が全体で同期拍動している様子を示す。

[図26]図２６は、ＧＦＰ発現ＨＵＶＥＣとリコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の蛍光顕微鏡写真、及び顕微鏡写真を示す。（５万ｃｅｌｌｓ＋０．０３ｍｇのモザイク細胞塊と、３０万ｃｅｌｌｓ＋０．２ｍｇのモザイク細胞塊）

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の細胞構造体は、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含み、該複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックが配置されていることを特徴とするものである。実施態様として、生体親和性を有する、複数個の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体が挙げられる。

[0025] 本発明にかかる高分子ブロックの形状は特に限定されるものではないが、例えば、不定形、球状、粒子状、粉状、多孔質状、繊維状、紡錘状、扁平状およびシート状であり、好ましくは、不定形、球状、粒子状、粉状および多孔質状であり、より好ましくは不定形である。不定形とは、表面形状が均一でないもののことを示し、例えば、岩のような凹凸を有する物を示す。

[0026] 本発明の細胞構造体は、複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックが配置されているが、ここで、「細胞間の隙間」とは、構成される細胞により、閉じられた空間である必要はなく、細胞により挟まれていればよい。なお、すべての細胞間に隙間がある必要はなく、細胞同士が接触している箇所があってもよい。高分子ブロックを介した細胞間の隙間の距離、即ち、ある細胞とその細胞から最短距離に存在する細胞を選択した際の隙間距離は特に制限されるものではないが、高分子ブロックの大きさであることが好ましく、好適な距離も高分子ブロックの好適な大きさの範囲である。

[0027] また、本発明にかかる高分子ブロックは、細胞により挟まれた構成となるが、すべての高分子ブロック間に細胞がある必要はなく、高分子ブロック同士が接触している箇所があってもよい。細胞を介した高分子ブロック間の距離、即ち、高分子ブロックとその高分子ブロックから最短距離に存在する高分子ブロックを選択した際の距離は特に制限されるものではないが、使用される細胞が１～数個集まった際の細胞の塊の大きさであることが好ましく、例えば、１０μｍ以上１０００μｍ以下であり、好ましくは１０μｍ以上１００μｍ以下であり、より好ましくは１０μｍ以上５０μｍ以下である。

[0028] （１）生体親和性を有する高分子材料

（１－１）高分子材料

本発明で用いる生体親和性を有する高分子は、生体に親和性を有するものであれば、生体内で分解されるか否かは特に限定されないが、生分解性材料で構成されることが好ましい。非生分解性材料として具体的には、ＰＴＦＥ、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエステル、塩化ビニル、ポリカーボネート、アクリル、ステンレス、チタン、シリコーン、ＭＰＣから選択される少なくとも１つ以上から成る材料を挙げることができる。生分解性材料としては、具体的にはポリペプチド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ＰＬＧＡ、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、コンドロイチン、セルロース、アガロース、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサンから選択される少なくとも１つ以上からなる材料を挙げることができる。上記の中でも、ポリペプチドが特に好ましい。尚、これら高分子材料には細胞接着性を高める工夫がなされていてもよく、具体的な方法としては１．「基材表面に対する細胞接着基質（フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン）や細胞接着配列（アミノ酸一文字表記で現わされる、ＲＧＤ配列、ＬＤＶ配列、ＲＥＤＶ配列、ＹＩＧＳＲ配列、ＰＤＳＧＲ配列、ＲＹＶＶＬＰＲ配列、ＬＧＴＩＰＧ配列、ＲＮＩＡＥＩＩＫＤＩ配列、ＩＫＶＡＶ配列、ＬＲＥ配列、ＤＧＥＡ配列、及びＨＡＶ配列）ペプチドによるコーティング」、２．「基材表面のアミノ化、カチオン化」、３．「基材表面のプラズマ処理、コロナ放電による親水性処理」といった方法が利用され得る。

[0029] ポリペプチドの種類は生体親和性を有するものであれば特に限定されないが、例えば、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、プロネクチン、ラミニン、テネイシン、フィブリン、フィブロイン、エンタクチン、トロンボスポンジン、レトロネクチンが好ましく、最も好ましくはゼラチン、コラーゲン、アテロコラーゲンである。本発明で用いるためのゼラチンとしては、天然ゼラチン、又は遺伝子組み換えゼラチンが好ましい。さらに好ましくは、遺伝子組み換えゼラチンである。ここでいう天然ゼラチンとは天然由来のコラーゲンより作られたゼラチンを意味する。遺伝子組み換え

ゼラチンについては、本明細書中後記する。

[0030] 本発明で用いる生体親和性を有する高分子の親水性値「１／ＩＯＢ」値は、０から１．０が好ましい。より好ましくは、０から０．６であり、さらに好ましくは０から０．４である。ＩＯＢとは、藤田穆により提案された有機化合物の極性/非極性を表す有機概念図に基く、親疎水性の指標であり、その詳細は、例えば、"Pharmaceutical Bulletin", vol.2, 2, pp.163-173 (1954)、「化学の領域」vol.11, 10, pp.719-725 (1957)、「フレグランスジャーナル」, vol.50, pp.79-82 (1981) 等で説明されている。簡潔に言えば、全ての有機化合物の根源をメタン（CH_4）とし、他の化合物はすべてメタンの誘導体とみなして、その炭素数、置換基、変態部、環等にそれぞれ一定の数値を設定し、そのスコアを加算して有機性値（ＯＶ）、無機性値（ＩＶ）を求め、この値を、有機性値をＸ軸、無機性値をＹ軸にとった図上にプロットしていくものである。有機概念図におけるＩＯＢとは、有機概念図における有機性値（ＯＶ）に対する無機性値（ＩＶ）の比、すなわち「無機性値（ＩＶ）／有機性値（ＯＶ）」をいう。有機概念図の詳細については、「新版有機概念図－基礎と応用－」（甲田善生等著、三共出版、２００８）を参照されたい。本明細書中では、ＩＯＢの逆数をとった「１／ＩＯＢ」値で親疎水性を表している。「１／ＩＯＢ」値が小さい（０に近づく）程、親水性であることを表す表記である。

本発明で用いる高分子の「１／ＩＯＢ」値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなることから、栄養成分の保持に有効に作用し、結果として、本発明の細胞３次元構造体（モザイク細胞塊）における細胞の安定化・生存しやすさに寄与するものと推定される。

[0031] 本発明で用いる生体親和性を有する高分子がポリペプチドである場合は、Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値で表される親疎水性指標において、０．３以下、マイナス９．０以上であることが好ましく、０．０以下、マイナス７．０以上であることがさらに好ましい。Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値は、『Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duva

ud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.;Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607』及び『Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.; ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.; Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).』の方法により得ることができる。

本発明で用いる高分子のＧＲＡＶＹ値を上記範囲とすることにより、親水性が高く、かつ、吸水性が高くなることから、栄養成分の保持に有効に作用し、結果として、本発明の細胞３次元構造体（モザイク細胞塊）における細胞の安定化・生存しやすさに寄与するものと推定される。

[0032] （１－２）架橋

本発明で用いる生体親和性を有する高分子材料は、架橋されているものでもよいし、架橋されていないものでもよいが、架橋されているものが好ましい。架橋方法としては、熱架橋、化学架橋、アルデヒド類（例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなど）による架橋、縮合剤（カルボジイミド、シアナミドなど）による架橋、酵素架橋、光架橋、ＵＶ架橋、疎水性相互作用、水素結合、イオン性相互作用など公知の方法を用いることができるが、グルタルアルデヒドを用いた架橋法、熱架橋法が好ましい。

[0033] 光架橋としては、光反応性基を導入した高分子への光照射、あるいは光増感剤の存在化での光照射によるものが挙げられる。光反応性基としては、例えば、シンナミル基、クマリン基、ジチオカルバミル基、キサンテン色素、カンファキノンが挙げられる。

[0034] 酵素による架橋を行う場合、酵素としては、高分子材料間の架橋作用を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはトランスグルタミナーゼおよびラッカーゼ、最も好ましくはトランスグルタミナーゼを用いて架橋を行うことができる。トランスグルタミナーゼで酵素架橋するタンパク質の具体例としては、リジン残基およびグルタミン残基を有するタンパク質であれ

ば特に制限されない。トランスグルタミナーゼは、哺乳類由来のものであっても、微生物由来のものであってもよく、具体的には、味の素（株）製アクティバシリーズ、試薬として発売されている哺乳類由来のトランスグルタミナーゼ、例えば、オリエンタル酵母工業（株）製、Upstate USA Inc.製、Biodesign International製など
のモルモット肝臓由来トランスグルタミナーゼ、ヤギ由来トランスグルタミナーゼ、ウサギ由来トランスグルタミナーゼなど、ヒト由来の血液凝固因子（Factor XIIIa、Haematologic Technologies, Inc.社）などが挙げられる。

[0035] 高分子材料の架橋には、高分子材料の溶液と架橋剤を混合する過程とそれらの溶液の反応する過程の２つの過程を有する。

[0036] 本発明において高分子材料を架橋剤で処理する際の混合温度は、溶液を混合できる限り特に限定されないが、好ましくは、０℃～１００℃であり、より好ましくは０℃～４０℃であり、更に好ましくは０℃～３０℃であり、更に好ましくは３℃～２５℃であり、更に好ましくは３℃～１５℃であり、更に好ましくは３℃～１０℃であり、特に好ましくは３℃～７℃である。

[0037] 高分子材料と架橋剤の反応過程では、温度を上昇させることができる。反応温度としては架橋が進行する限りは特に限定はないが、高分子材料の変性や分解を考慮すると実質的には－１００℃～２００℃であり、より好ましくは０℃～６０℃であり、より好ましくは０℃～４０℃であり、より好ましくは３℃～２５℃であり、より好ましくは３℃から１５℃であり、さらに好ましくは３℃～１０℃であり、特に好ましくは３℃～７℃である。

[0038] また、架橋剤を使用しなくても、高分子材料の架橋を行うことができる。当該架橋法は特に限定されるものではないが、具体的には熱架橋法が挙げられる。

[0039] 架橋剤を使用しない架橋法する際の反応温度は、架橋ができる限り特に限定されないが、好ましくは、－１００℃～５００℃であり、より好ましくは０℃～３００℃であり、更に好ましくは５０℃～３００℃であり、更に好ま

しくは１００℃～２５０℃であり、更に好ましくは１２０℃～２００℃である。

[0040] （１－３）遺伝子組み換えゼラチン

本発明にかかる遺伝子組み換えゼラチンとは遺伝子組み換え技術により作られたゼラチン類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは蛋白様物質を意味する。本発明で用いることができる遺伝子組み換えゼラチンは、コラーゲンに特徴的なGly-X-Yで示される配列（Ｘ及びＹはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す）の繰り返しを有するものが好ましい（複数個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい）。好ましくは、細胞接着シグナルを一分子中に２配列以上含まれている。本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンとしては、コラーゲンの部分アミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有する遺伝子組み換えゼラチンを用いることができ、例えばEP1014176A2、US6992172、WO2004-85473、WO2008/103041等に記載のものを用いることができるが、これらに限定されるものではない。本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンとして好ましいものは、以下の態様の遺伝子組み換えゼラチンである。

[0041] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンは天然のゼラチン本来の性能から、生体適合性に優れ、且つ天然由来ではないことでＢＳＥなどの懸念がなく、非感染性に優れている。また、本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンは天然のものに比して均一であり、配列が決定されているので、強度、分解性においても後述の架橋等によってブレを少なく精密に設計することが可能である。

[0042] 遺伝子組み換えゼラチンの分子量は2 KDa以上100 KDa以下であることが好ましい。より好ましくは2.5 KDa以上95KDa以下である。より好ましくは5 KDa以上90 KDa以下である。最も好ましくは、10 KDa以上90KDa以下である。

[0043] 遺伝子組み換えゼラチンは、コラーゲンに特徴的なＧｌｙ－Ｘ－Ｙで示される配列の繰り返しを有する。ここで、複数個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい。Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙ において、Ｇｌｙはグリシン、Ｘ及びＹは、任意のアミノ酸（好ましくは、グリシン以外の任意のアミノ酸）を表

す。コラーゲンに特徴的なＧＸＹ配列とは、ゼラチン・コラーゲンのアミノ酸組成および配列における、他のタンパク質と比較して非常に特異的な部分構造である。この部分においてはグリシンが全体の約３分の１を占め、アミノ酸配列では３個に１個の繰り返しとなっている。グリシンは最も簡単なアミノ酸であり、分子鎖の配置への束縛も少なく、ゲル化に際してのヘリックス構造の再生に大きく寄与している。Ｘ，Ｙであらわされるアミノ酸はイミノ酸（プロリン、オキシプロリン）が多く含まれ、全体の１０％～４５％を占めることが好ましい。好ましくはその配列の８０％以上、更に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上のアミノ酸がＧＸＹの繰り返し構造であることが好ましい。

[0044] 一般的なゼラチンは極性アミノ酸のうち、電荷を持つものと無電荷のものが１：１で存在する。ここで、極性アミノ酸とは具体的にシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、アルギニンを指し、このうち極性無電荷アミノ酸とはシステイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンを指す。本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンにおいては、構成する全アミノ酸のうち、極性アミノ酸の割合が１０～４０％であり、好ましくは２０～３０％である。且つ該極性アミノ酸中の無電荷アミノ酸の割合が５％以上２０％未満、好ましくは１０％未満であることが好ましい。さらに、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシン、システインのうちいずれか１アミノ酸、好ましくは２以上のアミノ酸を配列上に含まないことが好ましい。

[0045] 一般にポリペプチドにおいて、細胞接着シグナルとして働く最小アミノ酸配列が知られている（例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Ｖｏｌ．９、Ｎｏ．７（１９９０年）５２７頁）。本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンは、これらの細胞接着シグナルを一分子中に２以上有することが好ましい。具体的な配列としては、接着する細胞の種類が多いという点で、アミノ酸一文字表記で現わされる、ＲＧＤ配列、ＬＤＶ配列、ＲＥＤＶ配列、Ｙ

ＩＧＳＲ配列、ＰＤＳＧＲ配列、ＲＹＶＶＬＰＲ配列、ＬＧＴＩＰＧ配列、ＲＮＩＡＥＩＩＫＤＩ配列、ＩＫＶＡＶ配列、ＬＲＥ配列、ＤＧＥＡ配列、及びＨＡＶ配列の配列が好ましく、さらに好ましくはＲＧＤ配列、ＹＩＧＳＲ配列、ＰＤＳＧＲ配列、ＬＧＴＩＰＧ配列、ＩＫＶＡＶ配列及びＨＡＶ配列、特に好ましくはＲＧＤ配列である。ＲＧＤ配列のうち、好ましくはＥＲＧＤ配列である。細胞接着シグナルを有する遺伝子組み換えゼラチンを用いることにより、細胞の基質産生量を向上させることができる。例えば、細胞として、間葉系幹細胞を用いた軟骨分化の場合には、グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）の産生を向上させることができる。

[0046] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンにおけるＲＧＤ配列の配置として、ＲＧＤ間のアミノ酸数が０～１００の間、好ましくは２５～６０の間で均一でないことが好ましい。

[0047] この最小アミノ酸配列の含有量は、細胞接着・増殖性の観点から、タンパク質１分子中３～５０個が好ましく、さらに好ましくは４～３０個、特に好ましくは５～２０個である。最も好ましくは１２個である。

[0048] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンにおいて、アミノ酸総数に対するＲＧＤモチーフの割合は少なくとも０．４％であることが好ましく、遺伝子組み換えゼラチンが３５０以上のアミノ酸を含む場合に、３５０のアミノ酸の各ストレッチが少なくとも１つのＲＧＤモチーフを含むことが好ましい。アミノ酸総数に対するＲＧＤモチーフの割合は、更に好ましくは少なくとも０．６％であり、更に好ましくは少なくとも０．８％であり、更に好ましくは少なくとも１．０％であり、更に好ましくは少なくとも１．２％であり、最も好ましくは少なくとも１．５％である。遺伝子組み換えゼラチン内のＲＧＤモチーフの数は、２５０のアミノ酸あたり、好ましくは少なくとも４、更に好ましくは６、更に好ましくは８、更に好ましくは１２以上１６以下である。ＲＧＤモチーフの０．４％という割合は、２５０のアミノ酸あたり、少なくとも１つのＲＧＤ配列に対応する。ＲＧＤモチーフの数は整数であるので、０．４％の特徴を満たすには、２５１のアミノ酸からなるゼラチンは

、少なくとも２つのＲＧＤ配列を含まなければならない。好ましくは、本発明の遺伝子組み換えゼラチンは、２５０のアミノ酸あたり、少なくとも２つのＲＧＤ配列を含み、より好ましくは２５０のアミノ酸あたり、少なくとも３つのＲＧＤ配列を含み、さらに好ましくは２５０のアミノ酸あたり、少なくとも４つのＲＧＤ配列を含む。本発明の遺伝子組み換えゼラチンのさらなる態様としては、少なくとも４つのＲＧＤモチーフ、好ましくは６つ、より好ましくは８つ、さらに好ましくは１２以上１６以下のＲＧＤモチーフを含む。

[0049] また、遺伝子組み換えゼラチンは部分的に加水分解されていてもよい。

[0050] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンは、Ａ［（Ｇｌｙ－Ｘ－Ｙ）ｎ］ｍＢ の繰り返し構造を有することが好ましい。ｍとして好ましくは２～１０、好ましくは３～５である。ｎは３～１００が好ましく、１５～７０がさらに好ましく、５０～６５が最も好ましい。

[0051] 繰り返し単位には天然に存在するコラーゲンの配列単位を複数結合することが好ましい。ここで言う天然に存在するコラーゲンとは天然に存在するものであればいずれであっても構わないが、好ましくはI型、II型、III型、IV型、およびV型である。より好ましくは、I型、II型、III型である。別の形態によると、該コラーゲンの由来は好ましくは、ヒト、ウシ、ブタ、マウス、ラットである。より好ましくはヒトである。

[0052] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンの等電点は、好ましくは5～10であり、より好ましくは6～10であり、さらに好ましくは7～9.5である。

[0053] 好ましくは、遺伝子組み換えゼラチンは脱アミン化されていない。

好ましくは、遺伝子組み換えゼラチンはテロペプタイドを有さない。

好ましくは、遺伝子組み換えゼラチンは天然コラーゲンをコードする核酸により調製された実質的に純粋なコラーゲン用材料である。

[0054] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンとして特に好ましくは、

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列；又は

（２）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上（さらに好ましくは９

０％以上、最も好ましくは９５％以上）の相同性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列；

を有する遺伝子組み換えゼラチンである。

[0055] 本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンは、当業者に公知の遺伝子組み換え技術によって製造することができ、例えばEP1014176A2、US6992172、WO2004-85473、WO2008/103041等に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、所定の遺伝子組み換えゼラチンのアミノ酸配列をコードする遺伝子を取得し、これを発現ベクターに組み込んで、組み換え発現ベクターを作製し、これを適当な宿主に導入して形質転換体を作製する。得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、遺伝子組み換えゼラチンが産生されるので、培養物から産生された遺伝子組み換えゼラチンを回収することにより、本発明で用いる遺伝子組み換えゼラチンを調製することができる。

[0056] （１－４）生体親和性を有する高分子ブロック

本発明では、上記した生体親和性を有する高分子からなるブロック（塊）を使用する。高分子ブロックの製造方法は特に限定されないが、例えば、高分子からなる固形物を粉砕機（ニューパワーミルなど）を用いて粉砕した後に、ふるいでサイズ分けすることにより所望のサイズのブロックを取得することができる。

[0057] 高分子ブロックの大きさは、好ましくは１μｍ以上７００μｍ以下であり、より好ましくは１０μｍ以上７００μｍ以下であり、さらに好ましくは１０μｍ以上３００μｍ以下であり、さらに好ましくは２０μｍ以上１５０μｍ以下であり、特に好ましくは２５μｍ以上１０６μｍ以下である。また、高分子ブロックは上記のサイズを太さとするような、７００μｍ以上の長いひも状であってもよく、さらには上記のサイズを厚さとするようなシート状、ゲル状であってもよい。上記好適な範囲とすることにより、より構造体中で細胞がより均一に存在することができる。

[0058] （２）細胞

本発明で用いる細胞は、本発明の細胞構造体の目的に応じて適宜選択する

ことができ、その種類は特に限定されない。また、細胞は、細胞構造体の使用目的に応じて、１種でも、複数種の組合せて用いてもよい。使用する細胞として、好ましくは、動物細胞であり、より好ましくは脊椎動物由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞である。脊椎動物由来細胞（特に、ヒト由来細胞）の種類は、万能細胞、体性幹細胞、前駆細胞、又は成熟細胞の何れでもよい。万能細胞としては、例えば、ＥＳ細胞、ＧＳ細胞、又はｉＰＳ細胞を使用することができる。体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髄由来細胞、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、又は神経幹細胞を使用することができる。前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、皮膚、真皮、表皮、筋肉、心筋、神経、骨、軟骨、内皮、脳、上皮、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、口腔内、角膜、骨髄、臍帯血、羊膜、又は毛に由来する細胞を使用することができる。ヒト由来細胞としては、例えば、ＥＳ細胞、ｉＰＳ細胞、ＭＳＣ、軟骨細胞、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、間充織細胞、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞、神経細胞、肝細胞、ベータ細胞、線維芽細胞、角膜内皮細胞、血管内皮細胞、角膜上皮細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髄由来細胞、又は造血幹細胞を使用することができる。また、細胞の由来は、自家細胞又は他家細胞の何れでも構わない。複数種の細胞を組合せて使用する場合には、例えば、血管系の細胞と他の細胞が挙がられる。血管系の細胞とは、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、造血幹細胞等がある。血管系の細胞と他の細胞とを組合せることにより、血管を本発明の細胞構造体に誘導することができ、栄養、酸素等を供給することができる。

[0059] （３）細胞構造体

本発明においては、上記した生体親和性を有する高分子ブロックと上記した細胞とを用いて、複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックをモザイク状に３次元的に配置させることによって、外部から細胞３次元構造体の内部への栄養送達を可能とし、十分な厚みを有した細胞３次元構造体を形成することに成功した。同時に、細胞３次元構造体の外周部に存在する細胞

の働きによって、細胞３次元構造体同士の自然融合を可能とした。

[0060] 本発明の細胞構造体の厚さ又は直径は、本明細書中後記する方法により所望の厚さとすることが出来るが、下限としては、２１５μｍ以上であることが好ましく、４００μｍ以上がさらに好ましく、７３０μｍ以上であることが最も好ましい。厚さ又は直径の上限は特に限定されないが、使用上の一般的な範囲としては３ｃｍ以下が好ましく、２ｃｍ以下がより好ましく、１ｃｍ以下であることが更に好ましい。また、細胞構造体の　厚さ又は直径の範囲として、好ましくは、４００μｍ以上３ｃｍ以下、より好ましくは５００μｍ以上２ｃｍ以下、更に好ましくは７２０μｍ以上１ｃｍ以下である。なお、実施例では７２０μｍ以上の細胞構造体（図３）を作製したのち、融合させて８１３μｍの厚みを持つ細胞構造体を作製（図１０）した。本発明の細胞構造体は、高分子ブロックからなる領域と細胞からなる領域がモザイク状に配置されていることを特徴とする。尚、本明細書中における「細胞構造体の厚さ又は直径」とは、以下のことを示すものとする。細胞構造体中のある一点Ａを選択した際に、その点Ａを通る直線の内で、細胞構造体外界からの距離が最短になるように細胞構造体を分断する線分の長さを線分Ａとする。細胞構造体中でその線分Ａが最長となる点Ａを選択し、その際の線分Ａの長さのことを「細胞構造体の厚さ又は直径」とする。

[0061] 本発明の細胞構造体は、十分な厚みを有することができ、また、細胞が均一に存在できることから、細胞移植、細胞培養および毒性評価等に好適に用いることができる。これらの用途に本発明の細胞構造体を使用する際には、本発明の細胞構造体の厚さ又は直径は前記範囲とすることが好ましい。

[0062] また、後述する本発明の細胞構造体の製造方法での融合前の細胞構造体、または第二の高分子ブロック添加前の細胞構造体として、本発明の細胞構造体を使用する場合には、細胞構造体の厚さ又は直径の範囲として、好ましくは、１０μｍ以上１ｃｍ以下、より好ましくは１０μｍ以上２０００μｍ以下、更に好ましくは１５μｍ以上１５００μｍ以下、最も好ましくは、２０μｍ以上１３００μｍ以下である。

[0063] 本発明の細胞構造体は、細胞と高分子ブロックの比率は特に限定されないが、好ましくは細胞1個当りの高分子ブロックの比率が０．０００００００１μｇ以上１．０μｇ以下であることが好ましく、さらに好ましくは０．０００００１μｇ以上０．１μｇ以下、より好ましくは０．００００１μｇ以上０．０１μｇ以下、最も好ましくは０．００００２μｇ以上０．００６μｇ以下である。前記範囲とするこのより、より細胞を均一に存在させることができる。また、下限を上記範囲とすることにより、上記用途に使用した際に細胞の効果を発揮することができ、上限を上記範囲とすることにより、任意で存在する高分子ブロック中の成分を細胞に供給できる。ここで、高分子ブロック中の成分は特に制限されないが、後述する培地に含まれる成分が挙げられる。

[0064] （４）細胞構造体の製造方法

本発明の細胞構造体は、生体親和性を有した高分子材料からなる塊（「ブロック」）と、細胞とを交互に配置することにより製造できる。製造方法は特に限定されないが、好ましくは高分子ブロックを形成したのち、細胞を播種する方法である。具体的には、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートすることによって、本発明の細胞構造体を製造することができる。例えば、容器中、容器に保持される液体中で、細胞と、予め作製した生体親和性を有する高分子ブロックをモザイク状に配置する。配置の手段としては、自然凝集、自然落下、遠心、攪拌を用いることで、細胞と生体親和性基材からなるモザイク状の配列形成を、促進、制御することが好ましい。

[0065] 用いられる容器としては、細胞低接着性材料、細胞非接着性材料からなる容器が好ましく、より好ましくはポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレートからなる容器である。容器底面の形状は平底型、Ｕ字型、Ｖ字型であることが好ましい。

[0066] 上記の方法で得られたモザイク状細胞構造体は、例えば、

（１）別々に調整したモザイク状細胞塊同士を融合させる、又は

（２）分化培地又は増殖培地下でボリュームアップさせる、

などの方法により所望の大きさの細胞構造体を製造することができる。融合の方法、ボリュームアップの方法は特に限定されない。

[0067] 例えば、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、培地を分化培地又は増殖培地に交換することによって、細胞構造体をボリュームアップさせることができる。好ましくは、生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、生体親和性を有する高分子ブロックをさらに添加することによって、所望の大きさの細胞構造体であって、細胞構造体中に細胞が均一に存在する細胞構造体を製造することができる。

[0068] 前記別々に調整したモザイク状細胞塊同士を融合させる方法とは、具体的には、生体親和性を有する、複数個の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体を複数個融合させる工程を含む、細胞構造体の製造方法である。

[0069] 本発明の細胞構造体の製造方法にかかる「生体親和性を有する高分子ブロック（種類、大きさ等）」、「細胞」、「細胞間の隙間」、「得られる細胞構造体（大きさ等）」、「細胞と高分子ブロックの比率」等の好適な範囲は、前記本発明の細胞構造体に関する好適な範囲と同様である。

[0070] また、前記融合前の各細胞構造体の厚さ又は直径が１０μｍ以上１ｃｍ以下であり、前記融合後の厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下であることが好ましい。ここで、前記融合前の各細胞構造体の厚さ又は直径として、より好ましくは１０μｍ以上２０００μｍ以下、更に好ましくは１５μｍ以上１５００μｍ以下、最も好ましくは、２０μｍ以上１３００μｍ以下であり、また、記融合後の厚さ又は直径の範囲として、より好ましくは５００μｍ以上２ｃｍ以下、更に好ましくは７２０μｍ以上１ｃｍ以下である。

[0071] 前述した生体親和性を有する高分子ブロックをさらに添加することによっ

て、所望の大きさの細胞構造体を製造する方法とは、具体的には、生体親和性を有する、複数個の第一の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体に、更に、第二の高分子ブロックを添加しインキュベートする工程を含む細胞構造体の製造方法である。ここで、「生体親和性を有する高分子ブロック（種類、大きさ等）」、「細胞」、「細胞間の隙間」、「得られる細胞構造体（大きさ等）」、「細胞と高分子ブロックの比率」等の好適な範囲は、前記本発明の細胞構造体に関する好適な範囲と同様である。

[0072] ここで、融合させたい細胞構造体同士は、０以上５０μｍ以下の距離に設置することが好ましく、より好ましくは、０以上２０μｍ以下、更に好ましくは０以上５μｍ以下の距離である。細胞構造体同士を融合させる際、細胞の増殖・伸展によって細胞あるいは細胞が産生する基質が接着剤の役割を果たし、接合させることが考えられ、上記範囲とすることにより、細胞構造体同士の接着が容易となる。

[0073] 本発明にかかる第一の高分子ブロックの大きさは、好ましくは１μｍ以上７００μｍ以下であり、より好ましくは１０μｍ以上７００μｍ以下であり、さらに好ましくは１０μｍ以上３００μｍ以下であり、さらに好ましくは２０μｍ以上１５０μｍ以下であり、特に好ましくは２５μｍ以上１０６μｍ以下である。また、本発明にかかる第二の高分子ブロックの大きさも好ましくは１μｍ以上７００μｍ以下であり、より好ましくは１０μｍ以上７００μｍ以下であり、さらに好ましくは１０μｍ以上３００μｍ以下であり、さらに好ましくは２０μｍ以上１５０μｍ以下であり、特に好ましくは２５μｍ以上１０６μｍ以下である。

[0074] 本発明の細胞構造体の製造方法により得られる細胞構造体の厚さ又は直径の範囲として、好ましくは、４００μｍ以上３ｃｍ以下、より好ましくは５００μｍ以上２ｃｍ以下、更に好ましくは７２０μｍ以上１ｃｍ以下である。

[0075] 細胞構造体に、更に、第二の高分子ブロックを添加しインキュベートする際の、第二の高分子ブロックの添加するペースは、使用する細胞の増殖の速度に合わせて、適宜、選択することが好ましい。具体的には、第二の高分子ブロックを添加するペースが早いと細胞が細胞構造体の外側へと移動し、細胞の均一性が低くなり、添加のペースが遅いと、細胞の割合が多くなる箇所ができ、細胞の均一性が低くなるため、使用する細胞の増殖速度を考慮し、選択する。

[0076] 前記本発明の細胞構造体の製造方法により製造された細胞構造体は、所望の形状・サイズを形成させることができ、十分な厚みを有することができ、また、細胞が均一に存在できることから、細胞移植、細胞培養および毒性評価等に好適に用いることができる。

[0077] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0078] 実施例１：遺伝子組み換えゼラチン

遺伝子組み換えゼラチン（リコンビナントゼラチン）として以下記載のCBE3を用意した（ＷＯ2008-103041に記載）。

ＣＢＥ３

分子量：51.6kD

構造： GAP[(GXY)63]3G

アミノ酸数：571個

ＲＧＤ配列：１２個

イミノ酸含量：３３％

ほぼ１００％のアミノ酸がＧＸＹの繰り返し構造である。ＣＢＥ３のアミノ酸配列には、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシン及びシステインは含まれていない。ＣＢＥ３はＥＲＧＤ配列を有している。

等電点：9.34、GRAVY値：-0.682、１／ＩＯＢ値：0.323

[0079] アミノ酸配列（配列表の配列番号１）（WO2008／103041号公報の配列番号

３と同じ。但し末尾のＸは「Ｐ」に修正）

GAP(GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPK
GERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPI
GPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)3G

[0080] 実施例２：リコンビナントゼラチンμブロックの作製

基材ブロックとして、リコンビナントゼラチンＣＢＥ３を用いて、不定形のμブロックを作製した。１０００ｍｇのリコンビナントゼラチンを９４４８μＬの超純水に溶解し、１Ｎ　ＨＣｌを１５２μＬ添加後、終濃度１．０％となるように、２５％グルタルアルデヒドを４００μＬ添加し、５０℃で３時間反応させ、架橋ゼラチンゲルを作製した。この架橋ゼラチンゲルを、１Ｌの０．２Ｍグリシン溶液へ浸漬し、４０℃２時間振とうさせた。その後、架橋ゼラチンゲルを、５Ｌの超純水中で１時間振とう洗浄、超純水を新しい物へ置換し、再び洗浄１時間、を繰り返し、計６回洗浄した。洗浄後の架橋ゼラチンゲルを、－８０℃で５時間凍結させた後、凍結乾燥機（ＥＹＥＬＡ、ＦＤＵ－１０００）で凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥体を、ニューパワーミル（大阪ケミカル、ニューパワーミルＰＭ－２００５）で粉砕した。粉砕は、最大回転数で１分間×５回、計５分間の粉砕で行った。得られた粉砕物について、ステンレス製ふるいでサイズ分けし、２５～５３μｍ及び５３～１０６μｍのリコンビナントゼラチンμブロックを得た。

[0081] 実施例３：天然ゼラチンμブロックの作製

基材ブロックとして、天然ゼラチン（Ｎｉｐｐｉ、ニッピゼラチン・ハイグレードゼラチンＡＰＡＴ）を用いて、不定形のμブロックを作製した。１０００ｍｇの天然ゼラチンを９４４８μＬの超純水に溶解し、１Ｎ　ＨＣｌを１５２μＬ添加後、終濃度１．０％となるように、２５％グルタルアルデヒドを４００μＬ添加し、５０℃で３時間反応させ、架橋ゼラチンゲルを作製した。この架橋ゼラチンゲルを、１Ｌの０．２Ｍグリシン溶液へ浸漬し、４０℃２時間振とうさせた。その後、架橋ゼラチンゲルを、５Ｌの超純水中で１時間振とう洗浄、超純水を新しい物へ置換し、再び洗浄１時間、を繰り

返し、計６回洗浄した。洗浄後の架橋ゼラチンゲルを、－８０℃で５時間凍結させた後、凍結乾燥機（ＥＹＥＬＡ、ＦＤＵ－１０００）で凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥体を、ニューパワーミル（大阪ケミカル、ニューパワーミルＰＭ－２００５）で粉砕した。粉砕は、最大回転数で１分間×５回、計５分間の粉砕で行った。得られた粉砕物について、ステンレス製ふるいでサイズ分けし、２５～５３μｍ及び５３～１０６μｍの天然ゼラチンμブロックを得た。

[0082] 実施例４：リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の作製

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™ BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例２で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを１．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレート（住友ベークライト、底がＵ字型）に播種し、１８時間静置し、直径１ｍｍ程度の球状の、リコンビナントゼラチンμブロックとｈＭＳＣ細胞からなるモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．００２μｇの高分子ブロック）。その後、培地を軟骨分化培地（タカラバイオ：hMSC Differentiation BulletKit™,Chondrogenic、TGF-β3）（２００μＬ）へ置換した。Ｄａｙ７で、直径（＝厚さ）が１．５４ｍｍの球状に、モザイク細胞塊が形成された（図１）。なお、本モザイク細胞塊は、Ｕ字型のプレート中で作製するため、球状に作製されている。培地交換は、Ｄａｙ３、７、１０、１４、１７、２１で行う。

[0083] 実施例５：天然ゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の作製

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例３で作製した天然ゼラチンμブロックを１．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレートに播種し、１８時間静置し、直径１ｍｍ程度の球状の、天然ゼラチンμブロックとｈＭＳＣ細胞からなるモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．００２μｇの高分子ブロック

）。その後、培地を軟骨分化培地（タカラバイオ：hMSC Differentiation BulletKit™,Chondrogenic、TGF-β3）（２００μＬ）へ置換した。Ｄａｙ７で、直径（＝厚さ）１．３４ｍｍの球状に、モザイク細胞塊が形勢された（図２）。尚、本モザイク細胞塊は、Ｕ字型のプレート中で作製するため、球状に作製されている。

[0084] ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例３で作製した天然ゼラチンμブロックを最終濃度で０．００５ｍｇ／ｍＬ、０．０１ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２ｍｇ／ｍＬ、１．０ｍｇ／ｍＬ、２．０ｍｇ／ｍＬとなるように条件を振って作成した）後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレートに播種し、１８時間静置し、直径１ｍｍ弱・球状のモザイク細胞塊が作製できた（細胞1個当たり０．００００１、０．０００２、０．０００４、０．００２、０．００４μｇの高分子ブロック）。

[0085] 実施例６：標本解析

実施例４で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊について、組織切片を作製した。実施例４で作製した培地中のモザイク細胞塊に対して、培地を除去後、２００μＬのＰＢＳを加え洗浄し、ＰＢＳを除去した。この洗浄工程を２回繰り返した後、洗浄したモザイク細胞塊を１０%ホルマリンに浸漬し、２日間ホルマリン固定を行った。その後、パラフィンで包埋し、組織切片を作製した。切片はＨＥ染色（ヘマトキシリン・エオシン染色）し、細胞とゼラチンμブロックの状態を解析した。結果を図３、図４及び図５に示す。これにより、ゼラチンμブロックと、細胞がモザイク状に配置された３次元構造体が作製されていること、さらに細胞が正常な状態でモザイク細胞塊中に存在していることが確認できた。また、この断面切片から、少なくとも厚さ７２０μｍ以上のモザイク細胞塊が作製できていることが示された。

[0086] 実施例７：モザイク細胞塊の融合

実施例４で作製したモザイク細胞塊が、融合可能であるか、つまりモザイ

ク細胞塊を並べていくことで、自然融合し、より大きな３次構造体を形成できるかについて実施した。実施例４で作製した６日目のモザイク細胞塊２個、３個、及び４個をスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレート中で並べ、５日間培養を行った。その結果、モザイク細胞塊同士の間を、外周部に配された細胞が結合させることで、モザイク細胞塊が自然に融合することが明らかになった。図６に実体顕微鏡で撮像した写真を示す。融合開始日（Ｄａｙ６と記載）のモザイク細胞塊では、モザイク細胞塊同士が隣り合って配置されているだけであるが、融合開始から５日目（Ｄｙａ１１と記載）には、モザイク細胞塊間に新たな層が形成され、融合されていっている様子がわかる。また、図７，８，９，１０，１１には、該融合モザイク細胞塊の断面について、組織切片を作製し、ＨＥ染色した結果を示す（固定は１０%ホルマリン、包埋はパラフィン包埋）。細胞と、細胞により産生された細胞外基質で、モザイク細胞塊間に融合層が形成されており、モザイク細胞塊同士を融合、結合していることがわかる。これにより、本発明にて作製されるモザイク細胞塊は、自然に融合可能であり、融合させることで、より大きな構造体を形成できることが示された。従って、本発明を用いることで、厚さを有した細胞シート状に作製することも、より立体的な３次元構造体を作製することも可能であることが分かる。

[0087] 実施例８：リコンビナントゼラチンμブロックを用いた、増殖培地下のモザイク細胞塊作製

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™ BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例２で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを１．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレートに播種し、１８時間静置し、直径１ｍｍ球状のモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．００２μｇの高分子ブロック）。その後、培地を２００μＬへ増やし、３日毎に培地を交換し培養した。Ｄａｙ７で、直径（＝厚さ）１．３４ｍｍの球状に、モザイク細胞塊が形成された（尚、本モザイク細胞塊は、Ｕ字型のプ

レート中で作製するため、球状に作製される）。Ｄａｙ７のモザイク細胞塊の切片写真を図１６、１７に示す。この断面切片上で、厚さの薄い箇所でも、少なくとも６２４μｍ以上の厚みを達成していることが分かる。

[0088] 実施例９：モザイク細胞塊のボリュームアップ（増殖培地下で）

実施例８で作製した３日目（Ｄａｙ３）のモザイク細胞塊について、培地交換の際、実施例２で作製した０．１ｍｇのリコンビナントゼラチンμブロックを、増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™ BulletKit™）に懸濁して添加した。以後、Ｄａｙ７，１０，１４，１７，２１の培地交換に合わせ、０．１ｍｇずつのリコンビナントゼラチンμブロックを添加していった。

[0089] このモザイク細胞塊を実体顕微鏡で観察した際の径（異なる２つの直径の平均として算出）、及び撮像したモザイク細胞塊の面積、計算上の体積（上記で求めた直径から$4/3\pi r^3$で計算）、それぞれについての経時変化を図１２，１３，１４，１５に示した。その結果、最終的にDay２１で平均直径（＝厚さ）３．４１ｍｍの球状に形成された。これにより、少なくともサイズ３．４１ｍｍまでの大きさのモザイク細胞塊を作製可能であることが分かる。また、本手法によるボリュームアップを続けることで、そのサイズを大きくすることが可能であることが分かる。

[0090] この時の組織切片（ＨＥ染色）を図１８，１９に示した。細胞とリコンビナントゼラチンμブロックがモザイク状に配置されていることが分かる。また、モザイク細胞塊は３ｍｍ大であり、標本として小さいため、球の中央部をうまく断面にすることは困難を極めた。従って、切片として、球の最深部分を得られていないにも関わらず、当該検体のこの切片を採取した部分でも、厚みは、少なくとも１．１７ｍｍはあることが窺える。

[0091] Ｄａｙ７，１０，１４，１７，２１の培地交換の際、ゼラチンμブロックを追加せず、培養したものでは、図１２，１３，１４で示されるように直径が変わらない。ゼラチンμブロックを追加せず、培養したものでは、モザイク細胞塊の最外郭層に、増殖した細胞によって、細胞と細胞が産生した細胞外基質のみの層状構造が形成される。それにより、その細胞と産生細胞外基

質の層によって、栄養の拡散が阻まれる状態を形成してしまい、それ以上に細胞が増殖（球が大きくなる）することができなくなるためである。一方で、培地交換に合せて、随時ゼラチンμブロックを追加していった場合、ゼラチンμブロックが、増殖した細胞とともに常にモザイク状にはめ込まれることで、細胞が増殖しても、細胞とゼラチンμブロックからなるモザイク構造を維持し続けることが可能となる。それによって、ゼラチンμブロックで提供される栄養の供給経路が常に確保され、細胞と産生された細胞外基質で形成されてしまう外殻層が生成されず、モザイク細胞塊は大きくなれるのである。

[0092] 実施例１０：モザイク細胞塊のボリュームアップ（軟骨分化培地下で）

実施例４で作製した３日目（Ｄａｙ３）のモザイク細胞塊について、培地交換の際、実施例２で作製した０．１ｍｇリコンビナントゼラチンμブロック（０．１ｍｇ）を、軟骨分化培地（タカラバイオ：hMSC Differentiation BulletKit™,Chondrogenic、TGF-β3）に懸濁して添加した。以後、Ｄａｙ７，１０，１４，１７，２１の培地交換に合わせ、０．１ｍｇずつのリコンビナントゼラチンμブロックを添加していった。

[0093] このモザイク細胞塊を実体顕微鏡で観察した際の径（異なる２つの直径の平均として算出）、及び撮像したモザイク細胞塊の面積、計算上の体積（上記で求めた直径から$4/3\pi r^3$で計算）、それぞれについての経時変化を図１２，１３，１４，１５に示した。結果、最終的にDay２１で平均直径（＝厚さ）２．０５ｍｍの球状に形成された。これにより、少なくともサイズ２．０５ｍｍまでの大きさのモザイク細胞塊を作製可能であることが分かる。また、本手法によるボリュームアップを続けることで、そのサイズを大きくすることが可能であることが分かる。

[0094] この時の組織切片（ＨＥ染色）を図２０，２１に示した。細胞とリコンビナントゼラチンμブロックがモザイク状に配置されていることが分かる。また、モザイク細胞塊は２ｍｍ大であり、標本として小さいため、球の中央部をうまく断面にすることは困難を極めた。従って、切片として、球の最深部

分を得られていないにも関わらず、当該検体のこの切片を採取した部分でも、厚みは、少なくとも８９７μｍはあることが窺える。

[0095] Ｄａｙ７，１０，１４，１７，２１の培地交換の際、ゼラチンμブロックを追加せず、培養したものでは、図１２，１３，１４で示されるように直径が変わらない。ゼラチンμブロックを追加せず、培養したものでは、モザイク細胞塊の最外郭層に、増殖した細胞によって、細胞と細胞が産生した細胞外基質のみの層状構造が形成される。それにより、その細胞と産生細胞外基質の層によって、栄養の拡散が阻まれる状態を形成してしまい、それ以上に細胞が増殖（球が大きくなる）することが出来なくなる為である。一方で、培地交換に合せて、随時ゼラチンμブロックを追加していった場合、ゼラチンμブロックが、増殖した細胞とともに常にモザイク状にはめ込まれることで、細胞が増殖しても、細胞とゼラチンμブロックからなるモザイク構造を維持し続けることが可能となる。それによって、ゼラチンμブロックで提供される栄養の供給経路が常に確保され、細胞と産生された細胞外基質で形成されてしまう外殻層が生成されず、モザイク細胞塊は大きくなれるのである。

[0096] 実施例１１：モザイク細胞塊のＧＡＧ産生量の定量　（経時変化）

実施例４及び実施例５で作製したモザイク細胞塊（ｈＭＳＣ細胞＋リコンビナントゼラチン、ｈＭＳＣ細胞＋天然ゼラチン）、及び細胞のみで作製した細胞塊（実施例４と同様の手法で、ゼラチンブロックを入れずに作製した）、について、モザイク細胞塊中のグリコサミノグリカン量を定量した。測定は、（Farndale et al., Improved quantitation and sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochimica et Biophysica Acta 883 (1986) 173-177）のＤｉｍｅｔｙｌｍｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｂｌｕｅ　ｄｙｅを用いる方法で行い、試薬は硫酸化ＧＡＧ定量キット（生化学バイオビジネス）を用いた。５３０ｎｍの吸光を測定し、定量した。図２１に示すように、該手法によって、特徴的な吸収ピークが５２５－５３０ｎｍに見られることを確認している。

[0097] 経時でＧＡＧ量を定量した結果を図２２のグラフに示した。結果、ゼラチンμブロックを入れずに作製した細胞塊では、産生するグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）量が低いのに対して、天然ゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊、及びリコンビナントゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊については、産生するＧＡＧ量が極めて高かった。 これによって、実施例４及び実施例５で作製したモザイク細胞塊では、軟骨分化が促進されていること、また作製したモザイク細胞塊が細胞としての機能を有していること（ＧＡＧ産生能を有していること）が確認出来た。さらに、天然ゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊よりも、リコンビナントゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊では、産生するＧＡＧ量が有意に高かった。これによって、リコンビナントゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊は、天然ゼラチンμブロックよりも高い細胞活性、基質産生活性を維持できることが分かり、天然ゼラチンでは不可能であった基質量の産生が、リコンビナントゼラチンを用いることで達成出来ることが示された。

[0098] 実施例１２：モザイク細胞塊のＡＴＰ定量

各モザイク細胞塊中の細胞が産生・保持しているＡＴＰ（アデノシン三リン酸）量を定量した。ＡＴＰは生物全般のエネルギー源として知られ、ＡＴＰ合成量・保持量を定量することで、細胞の代謝活性の状態、活動状態を知ることができる。測定には、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を用いた。比較は、実施例４及び実施例５で作製したモザイク細胞塊（ｈＭＳＣ細胞＋リコンビナントゼラチン、ｈＭＳＣ細胞＋天然ゼラチン）、及び細胞のみで作製した細胞塊（実施例４と同様の手法で、ゼラチンブロックを入れずに作製した）、について、ともにＤａｙ７のもので、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏを用いて、各モザイク細胞塊中のＡＴＰ量を定量した。

[0099] 結果を、図２３に示した。これにより、ゼラチンμブロックを用いて作製したモザイク細胞塊では、細胞のみで作製された細胞塊よりも有意にＡＴＰ産生・保持量が高いことが分かった（ｐ＜０．０１）。これは、ゼラチンブ

ロックがモザイク状にはめ込まれることによって、ゼラチンブロックによるモザイク細胞塊中への栄養供給経路が提供され、細胞のみの塊よりも、細胞の代謝活性の高い状態が維持されることを示唆している。さらに、天然ゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊よりも、リコンビナントゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊では、ＡＴＰ産生・保持量が有意に高いことが分かった。これによって、リコンビナントゼラチンμブロックを入れて作製したモザイク細胞塊は、天然ゼラチンμブロックよりも高い細胞生存、内部でも細胞が生きていることが分かった。天然ゼラチンでは不可能であった細胞の生存向上が、リコンビナントゼラチンを用いることで達成出来ることが示された。

[0100] 実施例１３：ＰＬＧＡμブロックの作製

ＰＬＧＡ（乳酸・グリコール酸共重合体： Ｗａｋｏ、ＰＬＧＡ７５２０）０．３ｇをジクロロメタン（３ｍＬ）に溶解した。概ＰＬＧＡ溶解液を乾燥機（ＥＹＥＬＡ、ＦＤＵ－１０００）にて真空乾燥し、ＰＬＧＡの乾燥体を得た。ＰＬＧＡ乾燥体を、ニューパワーミル（大阪ケミカル、ニューパワーミルＰＭ－２００５）で粉砕した。粉砕は、最大回転数で１０秒×２０回の粉砕で行った。得られた粉砕物について、ステンレス製ふるいでサイズ分けし、２５～５３μｍ及び５３～１０６μｍのＰＬＧＡμブロックを得た。

ＰＬＧＡ：「１／ＩＯＢ」値：0.0552

[0101] 実施例１４：ＰＬＧＡを用いたモザイク細胞塊の作製

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™ BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例１３で作製したＰＬＧＡμブロックを加えた（最終濃度で０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２ｍｇ／ｍＬ、１．０ｍｇ／ｍＬ、２．０ｍｇ／ｍＬとなるように条件を振って作成した）後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレートに播種し、１８時間静置し、直径１ｍｍ弱・球状のモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．０００２、０．０００４、０．００２、０．００４μｇの高分子ブロック）。その後、培地を２００μＬへ増やし、３日毎に培地を交換し

培養した。尚、本モザイク細胞塊は、U字型のプレート中で作製するため、球状に作製される。Ｄａｙ２のＰＬＧＡモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真を図２４に示す。

[0102] 実施例１５：アガロースμブロックの作製

アガロース粉末５ｇを超純水（１００ｍＬ）に加え、電子レンジを用いて加熱し溶解した。得られた５%アガロース溶解液を常温に戻すことで固形物にして、－８０℃で５時間凍結させた後、凍結乾燥機（ＥＹＥＬＡ、ＦＤＵ－１０００）で凍結乾燥を行うことで、アガロースの凍結乾燥体を得た。アガロース凍結乾燥体を、ニューパワーミル（大阪ケミカル、ニューパワーミルＰＭ－２００５）で粉砕した。粉砕は、最大回転数で１０秒×２０回の粉砕で行った。得られた粉砕物について、ステンレス製ふるいでサイズ分けし、２５～５３μm及び５３～１０６μmのアガロースμブロックを得た。

ＩＯＢ値：3.18

[0103] 実施例１６：アガロースを用いたモザイク細胞塊の作製

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）を増殖培地（タカラバイオ：MSCGM-CD™ BulletKit™）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例１５で作製したアガロースμブロックを加えた（最終濃度で０．１ｍｇ／ｍＬ、１．０ｍｇ／ｍＬとなるように条件を振って作成した）後、１００μＬをスミロンセルタイトＸ９６Ｕプレートに播種し、１８時間静置し、直径１mm弱・球状のモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．０００２、０．００２μｇの高分子ブロック）。その後、培地を２００μＬへ増やし、３日毎に培地を交換し培養した。尚、本モザイク細胞塊は、U字型のプレート中で作製するため、球状に作製された。

[0104] 実施例１７：心筋細胞を用いたモザイク細胞塊の作製

新生児ＳＤラット心筋細胞（ｒＣＭＣ）を心筋細胞用培地（Primary Cell Co., Ltd：ＣＭＣＭ　心筋細胞用培養メディウム）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、実施例２で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを０．５、１．０、３．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、それぞれ１００μ

Ｌをスミロンセルタイト９６Ｕプレート（住友ベークライト、底がＵ字型）に播種し、１８時間静置し、直径１～２ｍｍ程度のリコンビナントゼラチンμブロックとｒＣＭＣ細胞からなるモザイク細胞塊を作製した（細胞1個当たり０．００１、０．００２、０．００６μｇの高分子ブロック）。培地交換は、Ｄａｙ３、７、１０、１４、１７、２１で行った。

[0105] Ｄａｙ１、Ｄａｙ３の段階で既にｒＣＭＣモザイク細胞塊は構造体全体として同期拍動していることが確認できた（図２５）。明細書中では、動画を示すことが困難であるため、図２５では、動画から０．２秒後の同一スポットを静止画像としてキャプチャ撮影した画像である。三角形で印を付けた部位を見ると二枚の絵で全体が動いていることが分かる。

[0106] これにより、心筋細胞を用いても本発明の細胞３次元構造体（モザイク細胞塊）が形成可能であることが確認出来たとともに、心筋細胞を用いたモザイク細胞塊においては、構造体全体として同期拍動するような細胞構造体が得られることが証明された。

[0107] 実施例１８：ＧＦＰ発現ＨＵＶＥＣ（ヒト臍帯静脈内皮細胞）を用いたモザイク細胞塊の作製

ＧＦＰを発現しているヒト臍帯静脈内皮細胞（ＧＦＰ－ＨＵＶＥＣ：Ａｎｇｉｏ－Ｐｒｏｔｅｏｍｉｅ社）を内皮細胞用培地（クラボウ：Ｍｅｄｉｕｍ ２００Ｓ、ＬＳＧＳ、抗菌剤ＧＡ溶液）にて５０万ｃｅｌｌｓ／ｍＬ調整し、実施例２で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを０．３、１．０、３．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、それぞれ１００μＬをスミロンセルタイト９６Ｕプレート（住友ベークライト、底がＵ字型）に播種した（細胞1個当たり０．０００６、０．００２、０．００６μｇの高分子ブロック）。また、同様にして、細胞を１５０万cellｓ／ｍＬに調整し、実施例２で作製したリコンビナントゼラチンμブロックを１．０ｍｇ／ｍＬとなるように加えた後、１００μＬ、２００μＬをスミロンセルタイト９６Ｕプレート（住友ベークライト、底がＵ字型）に播種したものも作製した。全てについて、１８時間静置し、直径１～２ｍｍ程度のリコンビナントゼラチン

μブロックとＧＦＰ－ＨＵＶＥＣ細胞からなるモザイク細胞塊を作製した。培地交換は、Ｄａｙ３、７、１０、１４、１７、２１で行った。

[0108] 図２６には、５万ｃｅｌｌｓ＋０．０３ｍｇのモザイク細胞塊と、３０万ｃｅｌｌｓ＋０．２ｍｇのモザイク細胞塊の顕微鏡写真、及び蛍光顕微鏡写真を示している。ＧＦＰ－ＨＵＶＥＣ細胞はＧＦＰの蛍光を発する為、蛍光顕微鏡によりモザイク細胞塊中の分布が理解しやすい。これによって、本発明の細胞３次元構造体（モザイク細胞塊）は血管内皮細胞を用いても作製可能であることが証明された。

[0109] また、本発明の細胞構造体（モザイク細胞塊）については、間葉系幹細胞、心筋細胞、血管内皮細胞といった多様な細胞で形成可能であることが実証された。同時に、リコンビナントゼラチンブロック、動物ゼラチンブロック、ＰＬＧＡブロック、アガロースブロックといった多様な高分子ブロックを用いて形成可能であることも示された。これにより、多様な細胞種と多様な高分子ブロック種において、本発明の細胞３次元構造体（モザイク細胞塊）が形成可能であることが証明された。

請求の範囲

[請求項1] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞とを含み、該複数個の細胞間の隙間に複数個の該高分子ブロックが配置されている、細胞構造体。

[請求項2] 該高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、請求項１に記載の細胞構造体。

[請求項3] 該高分子ブロックの大きさが１０μｍ以上３００μｍ以下である請求項２に記載の細胞構造体。

[請求項4] 厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞構造体。

[請求項5] 厚さ又は直径が７２０μｍ以上１ｃｍ以下である、請求項４に記載の細胞構造体。

[請求項6] 前記高分子ブロックと前記細胞との比率が、細胞1個当り０．０００００１μｇ以上１．０μｇ以下である請求項１～５のいずれか一項に記載の細胞構造体。

[請求項7] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートすることによって製造される、請求項１から６の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項8] 生体親和性を有する高分子が、生分解性材料である、請求項１から７の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項9] 生体親和性を有する高分子が、ポリペプチド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ＰＬＧＡ、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、コンドロイチン、セルロース、アガロース、カルボキシメチルセルロース、キチン、又はキトサンである、請求項１から８の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項10] 生体親和性を有する高分子が、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、プロネクチン、ラミニン、テネイシン、フィブリン、フィブロイン、エンタクチン、トロンボスポンジン、又はレトロ

ネクチンである、請求項１から９の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項11] 生体親和性を有する高分子が架橋されている、請求項１から１０の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項12] 架橋がアルデヒド類、縮合剤、又は酵素により施される、請求項１１に記載の細胞構造体。

[請求項13] 生体親和性を有する高分子が、遺伝子組み換えゼラチンである、請求項１から１２の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項14] 前記生体親和性を有する高分子が、細胞接着性シグナルを一分子中に２以上有する請求項１３に記載の細胞構造体。

[請求項15] 遺伝子組み換えゼラチンが、

式：Ａ－［（Gly－Ｘ－Ｙ）$_n$］$_m$－Ｂ

（式中、Ａは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示し、Ｂは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示し、ｎ個のＸはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ｎ個のＹはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、ｎは３～１００の整数を示し、ｍは２～１０の整数を示す。なお、n個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい。）で示される、請求項１３に記載の細胞構造体。

[請求項16] 遺伝子組み換えゼラチンが、

式：Gly-Ala-Pro-［（Gly－Ｘ－Ｙ）$_{63}$］$_3$－Gly

（式中、63個のＸはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のＹはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なっていてもよい。）で示される、請求項１３又は１５に記載の細胞構造体。

[請求項17] 遺伝子組み換えゼラチンが、（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列、又は（２）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有し、生体親和性を有するアミノ酸配列を有する、請求項１３から１６の何れか１項に記載の細胞構造体。

[請求項18] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をイ

ンキュベートする工程を含む、請求項１から１７の何れかに記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項19] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において培地交換を行う、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、培地を分化培地又は増殖培地に交換する、請求項１９に記載の方法。

[請求項21] 生体親和性を有する高分子ブロックと細胞含有培養液との混合物をインキュベートする工程において、生体親和性を有する高分子ブロックをさらに添加する、請求項１８から２０の何れか１項に記載の方法。

[請求項22] 請求項１８から２１の何れか１項に記載の方法により製造される、細胞構造体。

[請求項23] 請求項１から１７の何れかに記載の細胞構造体の複数個を融合することによって得られる、細胞構造体。

[請求項24] 請求項１から１７の何れかに記載の細胞構造体の複数個を融合する工程を含む、請求項２３に記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項25] 生体親和性を有する複数個の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体を複数個融合させる工程を含む、細胞構造体の製造方法。

[請求項26] 前記高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、請求項２５に記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項27] 前記融合前の各細胞構造体の厚さ又は直径が１０μｍ以上１ｃｍ以下であり、前記融合後の厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、請求項２５または２６記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項28] 生体親和性を有する複数個の第一の高分子ブロックと、複数個の細胞とを含み、該複数の細胞により形成される複数個の隙間の一部または

全部に、一または複数個の前記高分子ブロックが配置されている細胞構造体に、更に、第二の高分子ブロックを添加しインキュベートする工程を含む、細胞構造体の製造方法。

[請求項29] 前記第一の高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、請求項２８に記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項30] 前記第二の高分子ブロックの大きさが１μｍ以上７００μｍ以下である、請求項２８または２９に記載の細胞構造体の製造方法。

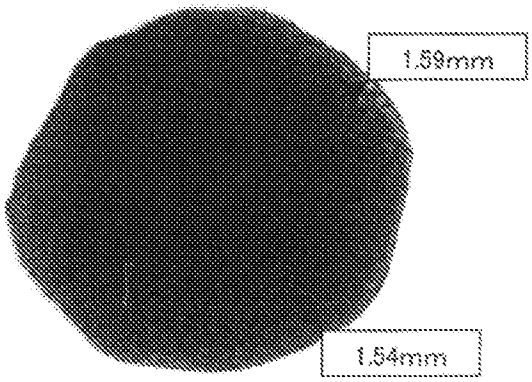
[請求項31] 前記第二の高分子ブロックを添加しインキュベートした後の、厚さ又は直径が４００μｍ以上３ｃｍ以下である、請求項２８から３０のいずれか一項に記載の細胞構造体の製造方法。

[請求項32] 請求項２５～３１のいずれか一項に記載の細胞構造体の製造方法により製造される、細胞構造体。

[請求項33] 細胞移植、細胞培養または毒性評価用途に使用する、請求項３２記載の細胞構造体。

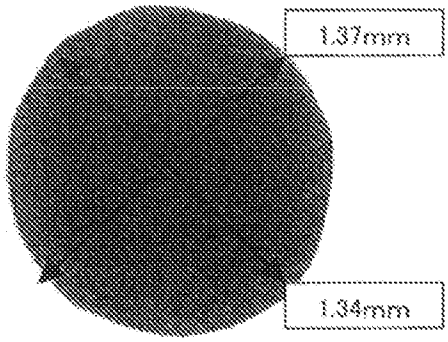
[図1]

図1 リコンビナントゼラチンμブロックで作製したモザイク細胞塊 Day7 （軟骨分化培地）
実体顕微鏡写真



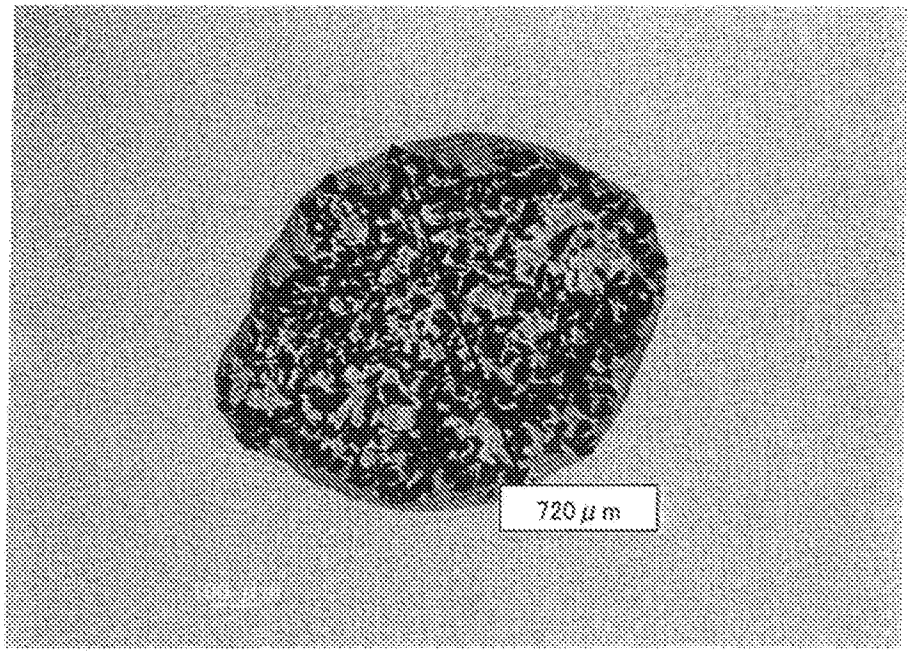
[図2]

図2 天然ゼラチンμブロックで作製したモザイク細胞塊 Day7 （軟骨分化培地）
実体顕微鏡写真



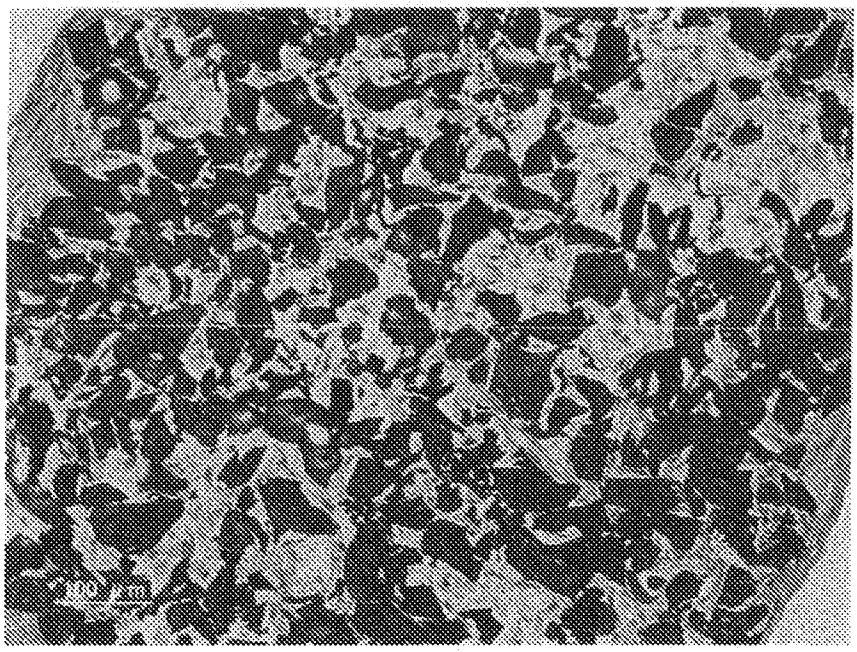
[図3]

図3 リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真 HE染色 ×5倍



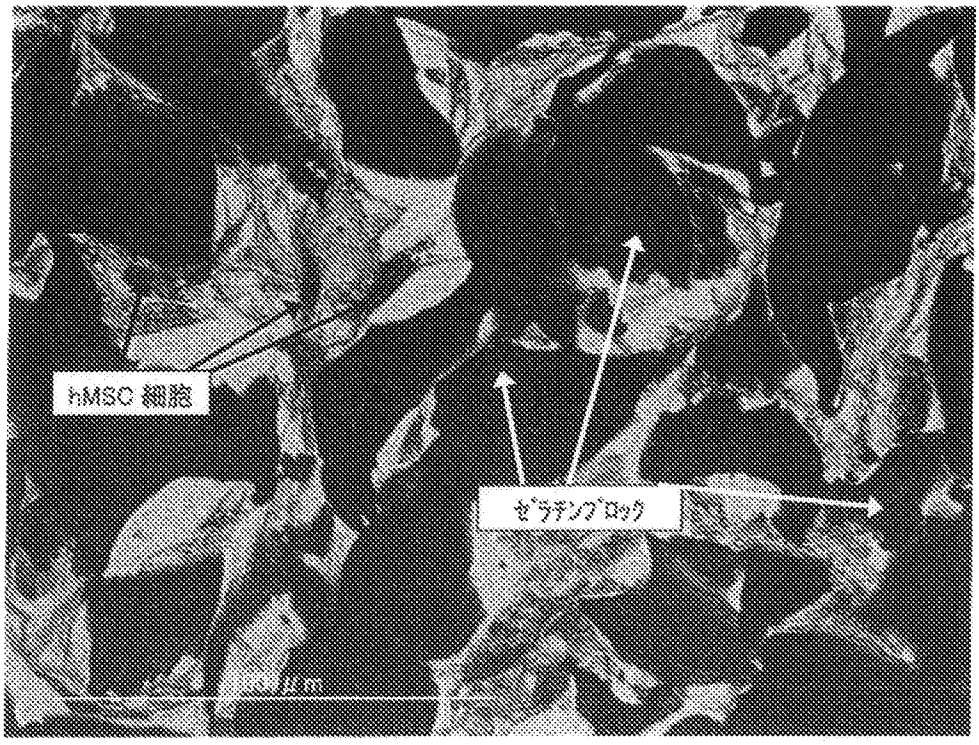
[図4]

図4 リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真 HE染色 ×10倍



[図5]

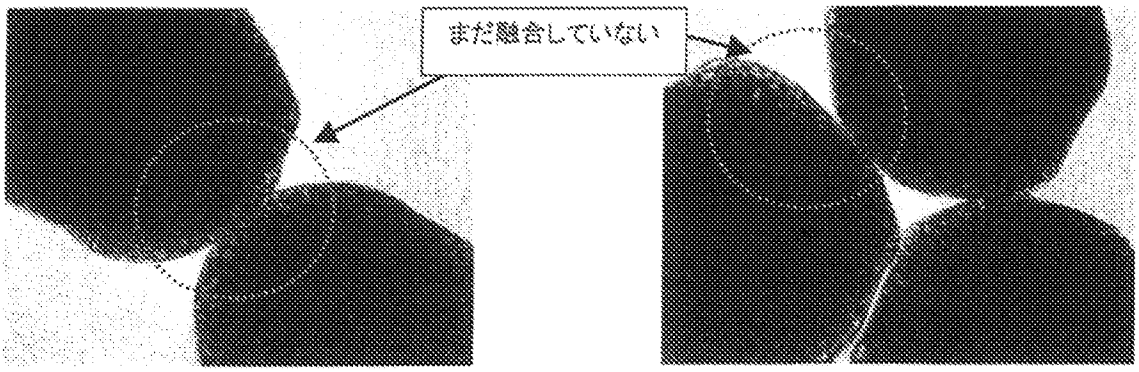
図6 リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片写真 HE染色 ×40倍



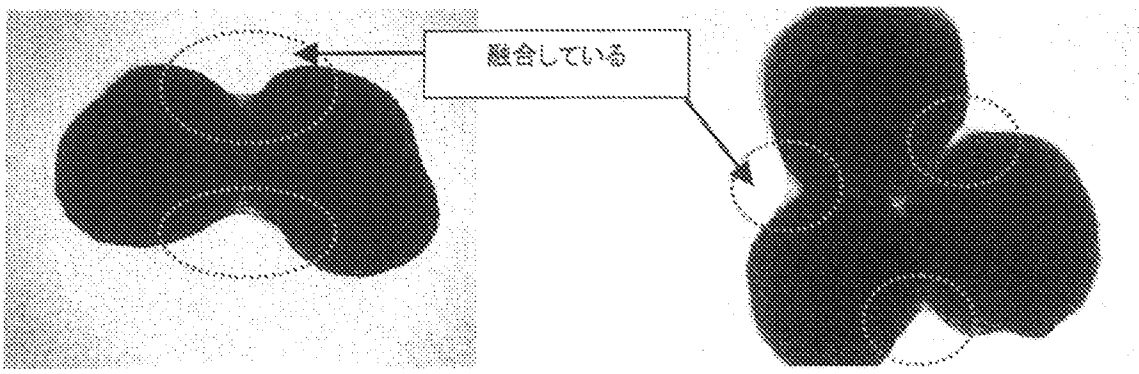
[図6]

図6 モザイク細胞塊の融合

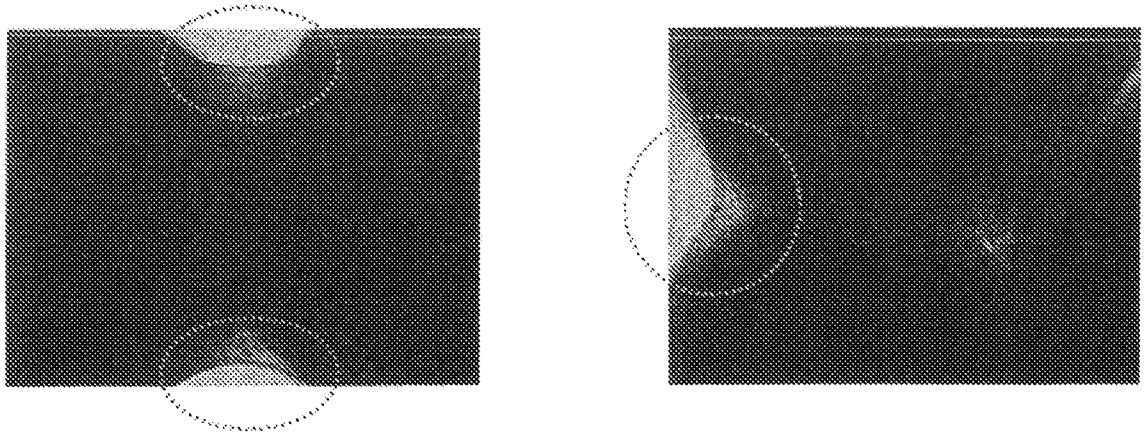
Day6 (融合初日)



Day11 (融合5日目)



Day11 (融合5日目)の拡大写真



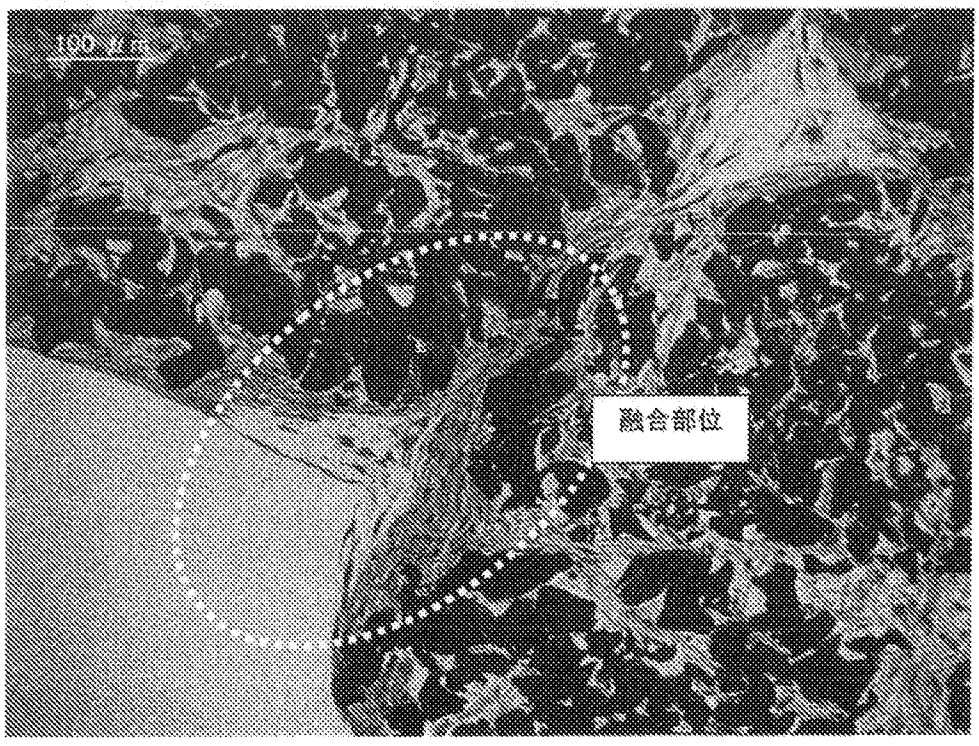
[図7]

図7 モザイク細胞塊の融合(3つのモザイク細胞塊を融合) HE染色切片写真 ×5倍



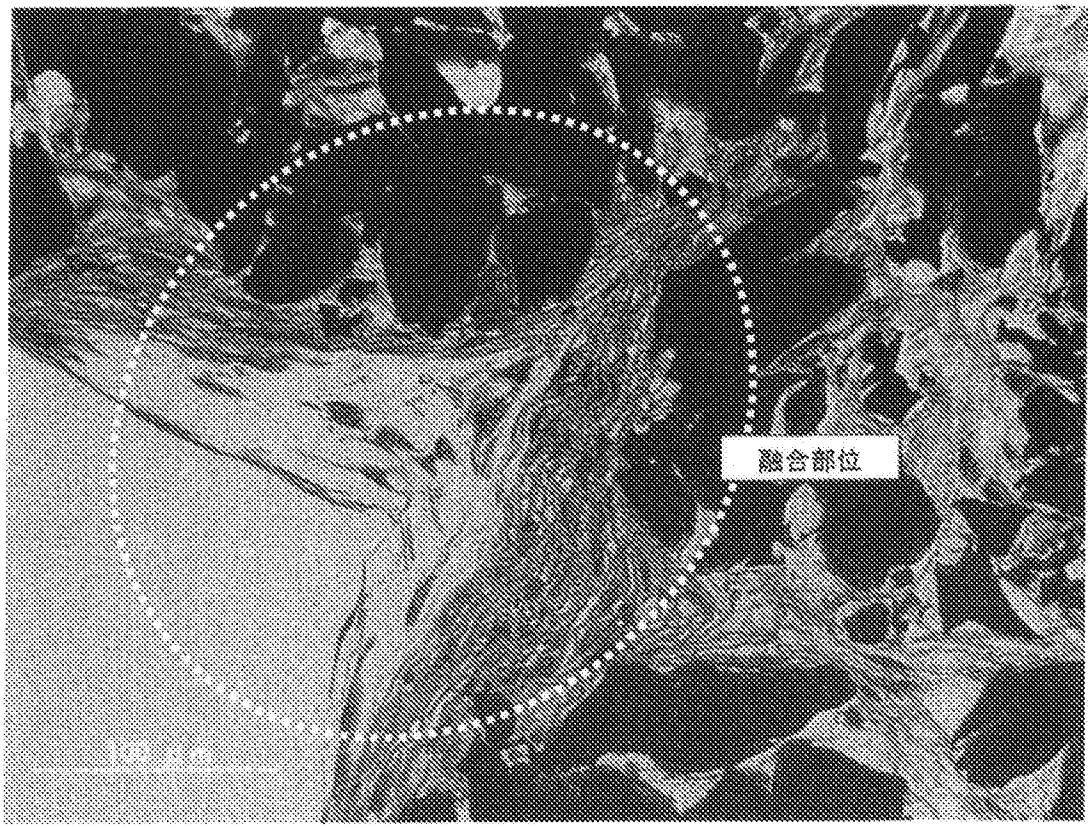
[図8]

図8 モザイク細胞塊の融合(3つのモザイク細胞塊を融合) HE染色切片写真 ×10倍



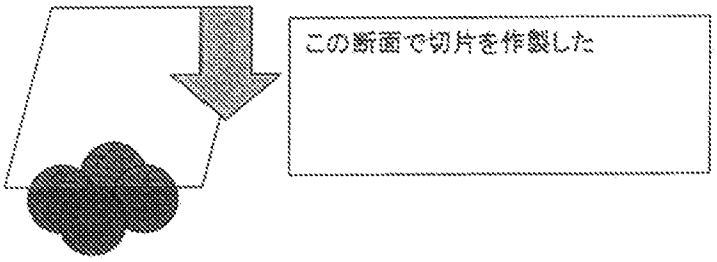
[図9]

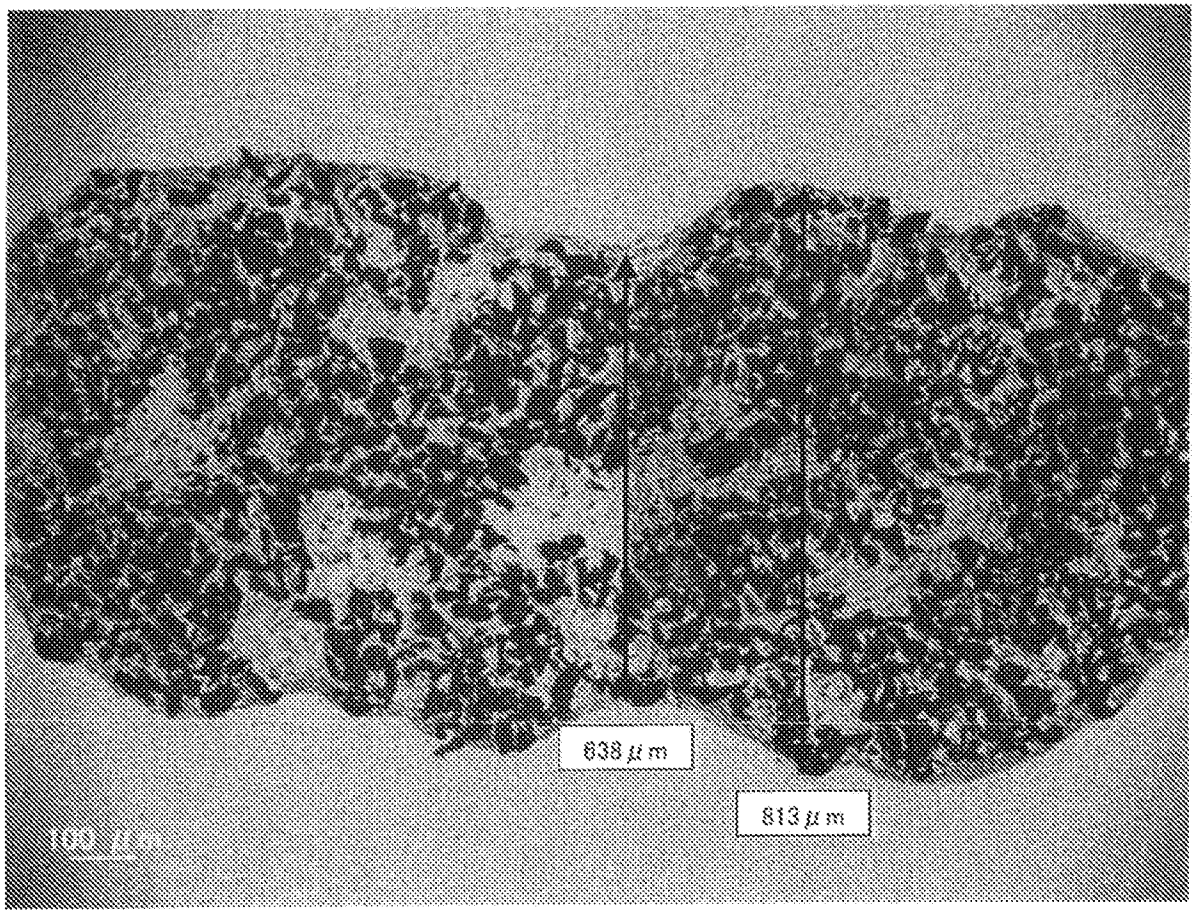
図9 モザイク細胞塊の融合(3つのモザイク細胞塊を融合) HE染色切片写真 ×20倍



[図10]

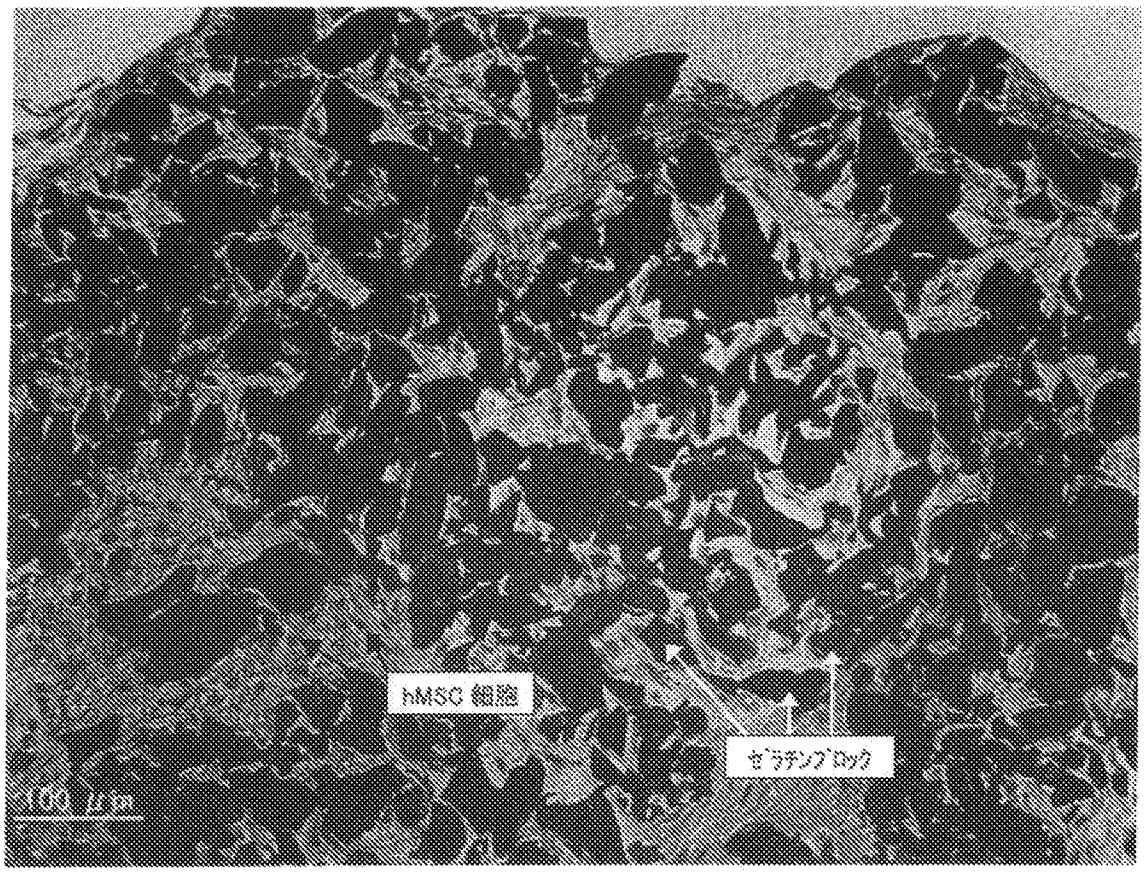
図10 モザイク細胞塊の融合(3つのモザイク細胞塊を融合) HE染色切片写真 ×5倍





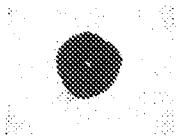
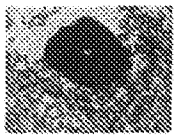
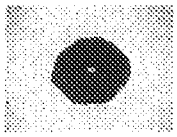
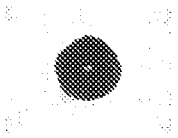
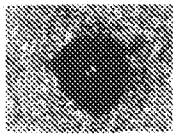
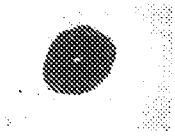
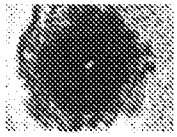
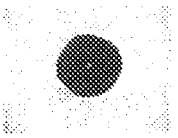
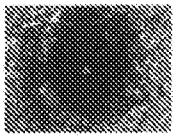
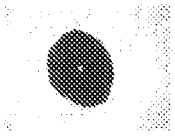
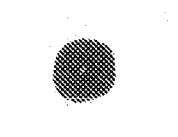
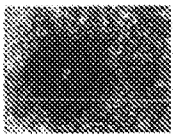
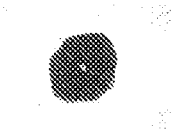
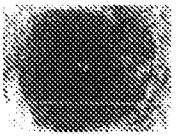
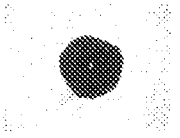
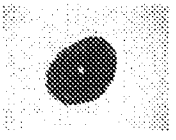
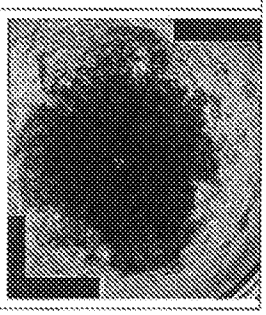
[図11]

図11 モザイク細胞塊の融合（3つのモザイク細胞塊を融合） HE染色切片写真 ×10倍



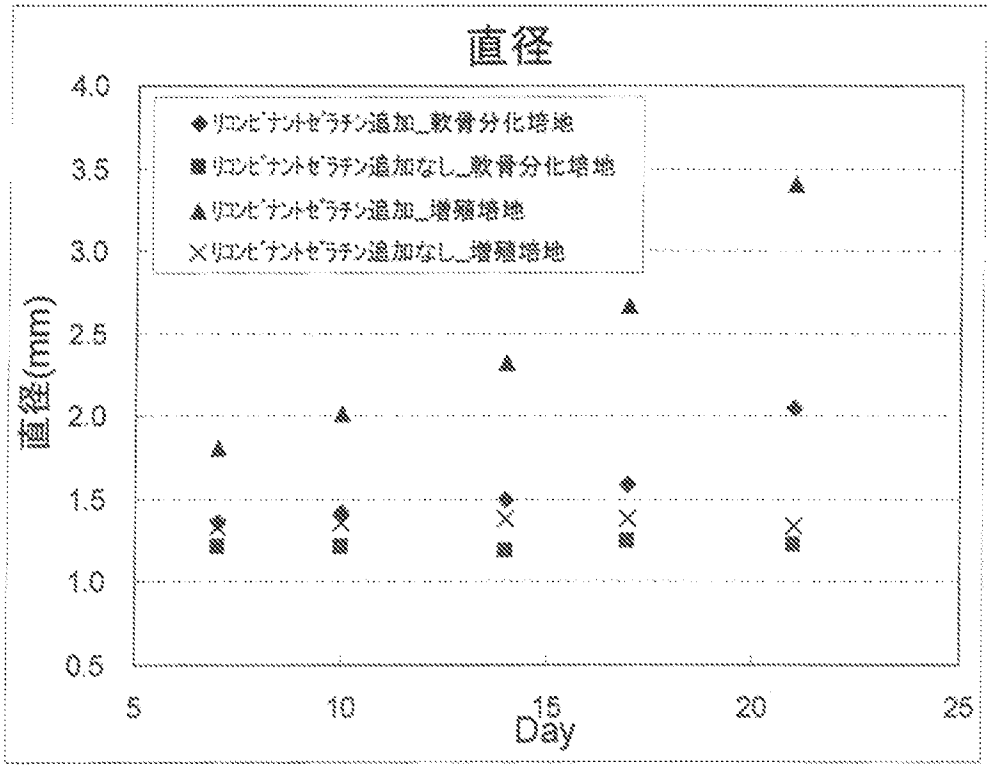
[図12]

図12 ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真、経時変化

	軟骨分化培地中 ゼラチンブロックを追加せず	軟骨分化培地中 リコンビナントゼラチンブロックを追加(培地交換の都度0.1mg)	増殖培地中 ゼラチンブロックを追加せず	増殖培地中 リコンビナントゼラチンブロックを追加(培地交換の都度0.1mg)
Day 7				
Day 10				
Day 14				
Day 17				
Day 21				

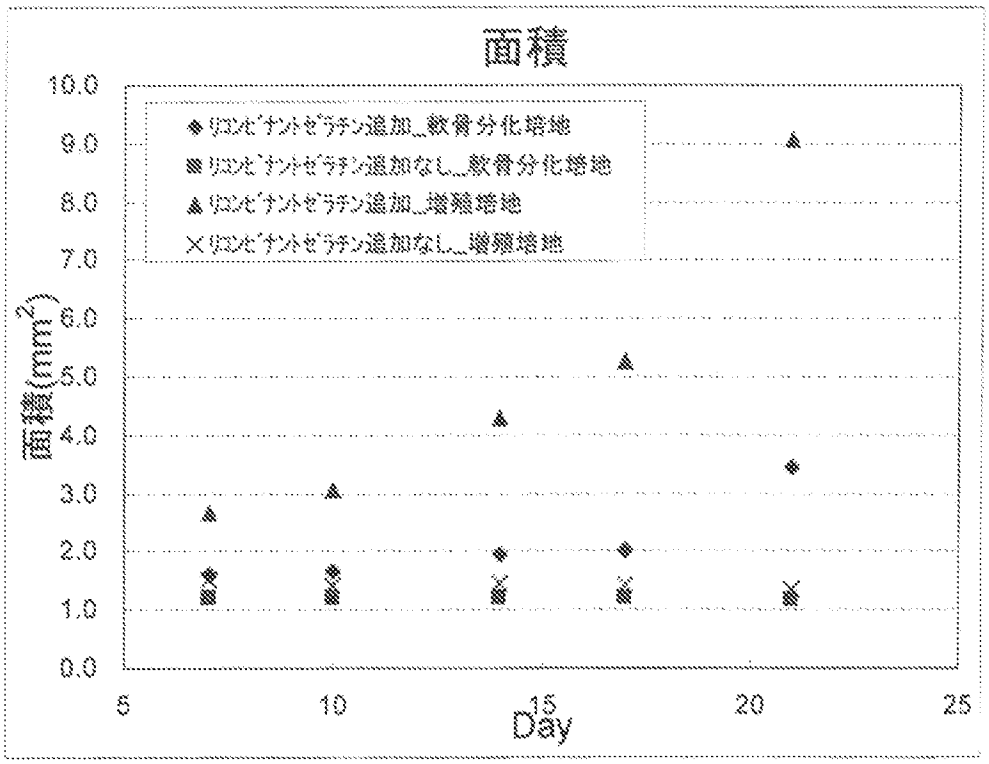
[図13]

図13 ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真から、直径の経時変化



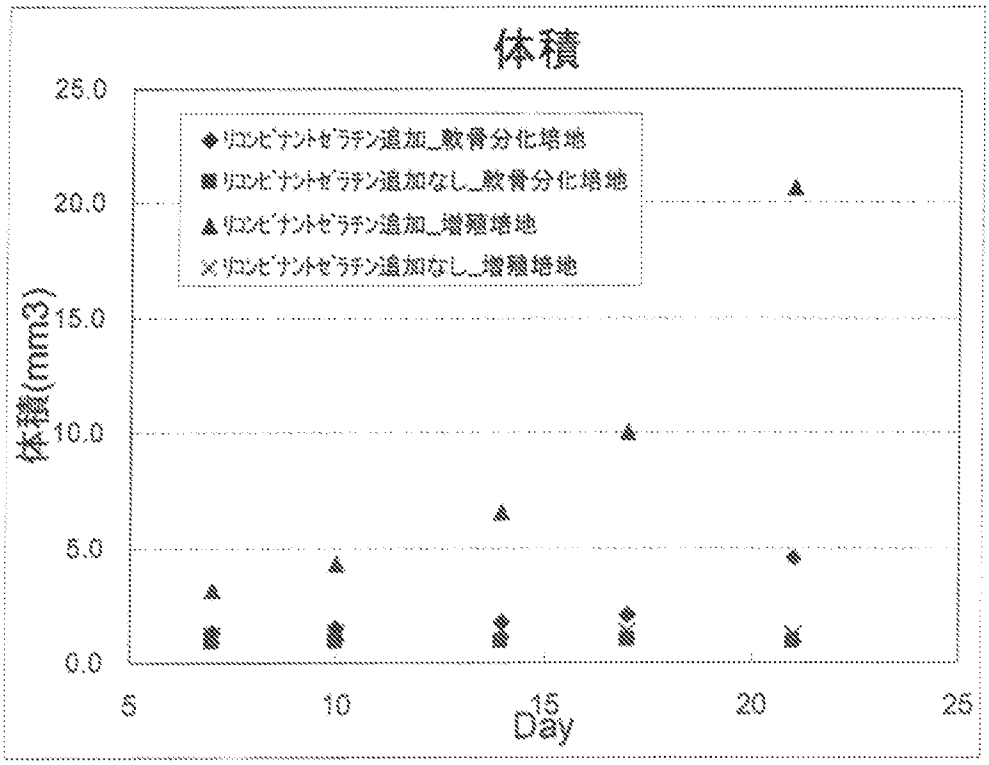
[図14]

図14 ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真から、面積の経時変化



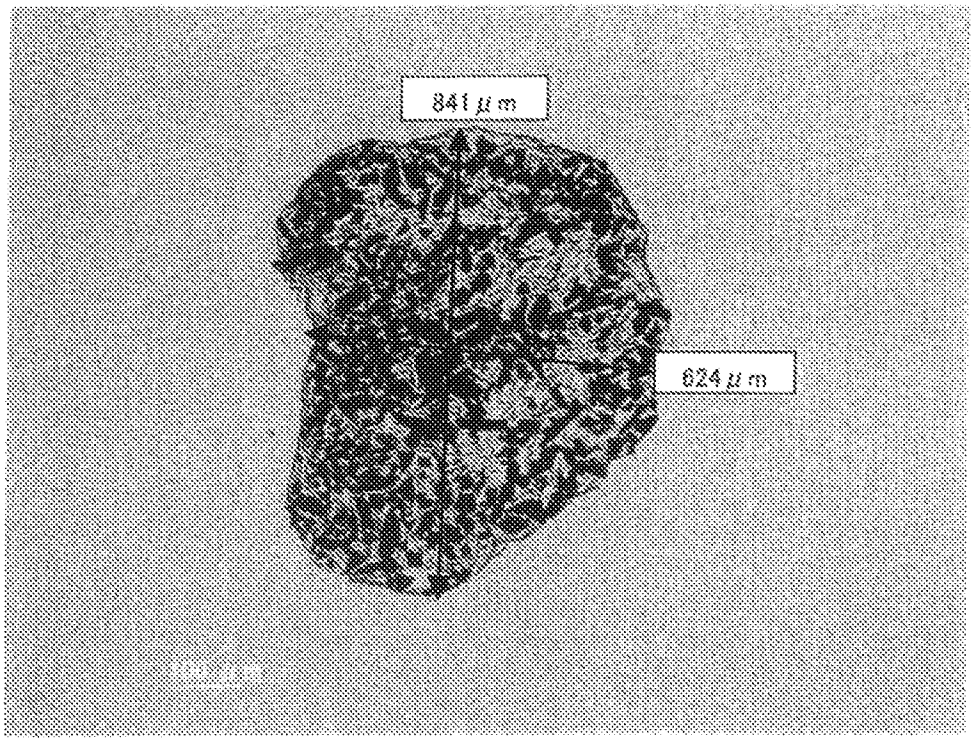
[図15]

図15 ボリュームアップしたモザイク細胞塊の実体顕微鏡写真から、計算で算出した体積(4/3πr³)の経時変化



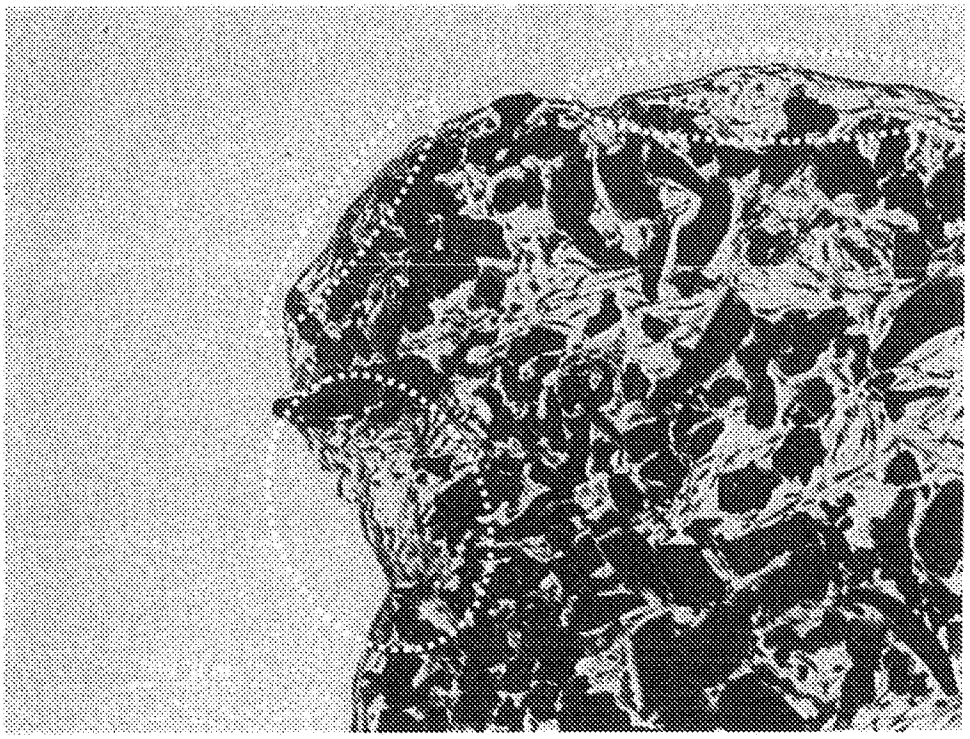
[図16]

図16 リコンビナントゼラチンμブロックを用いたモザイク細胞塊の切片 Day7(増殖培地下)×5倍



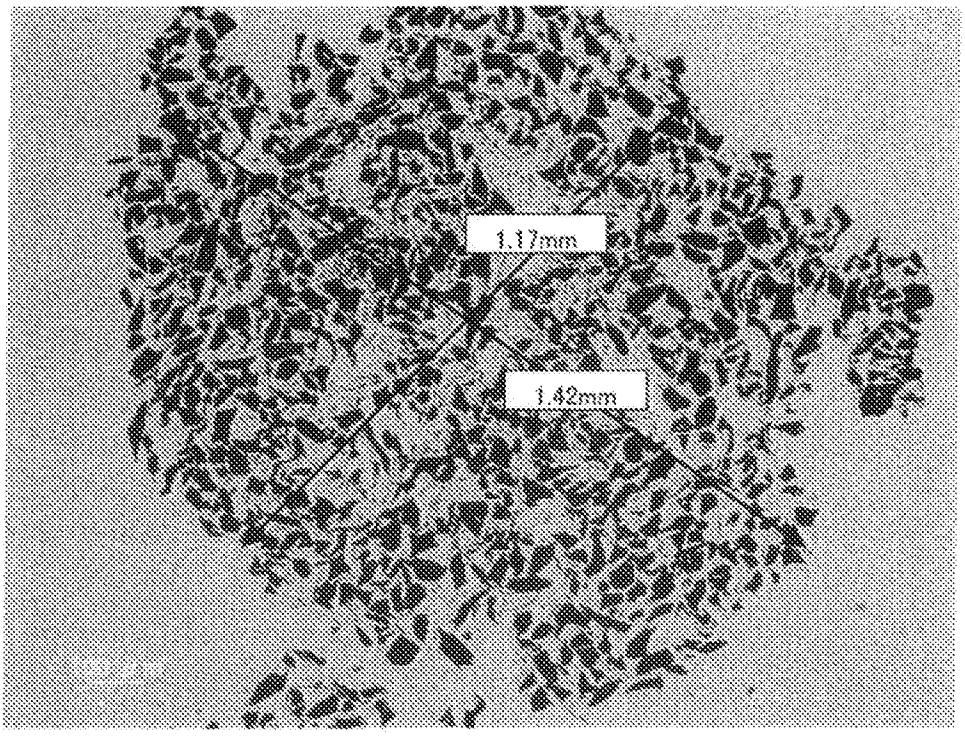
[図17]

図17 リコンビナントゼラチンゲルブロックを用いたモザイク細胞塊の切片 Day7(増殖培地下)×10倍



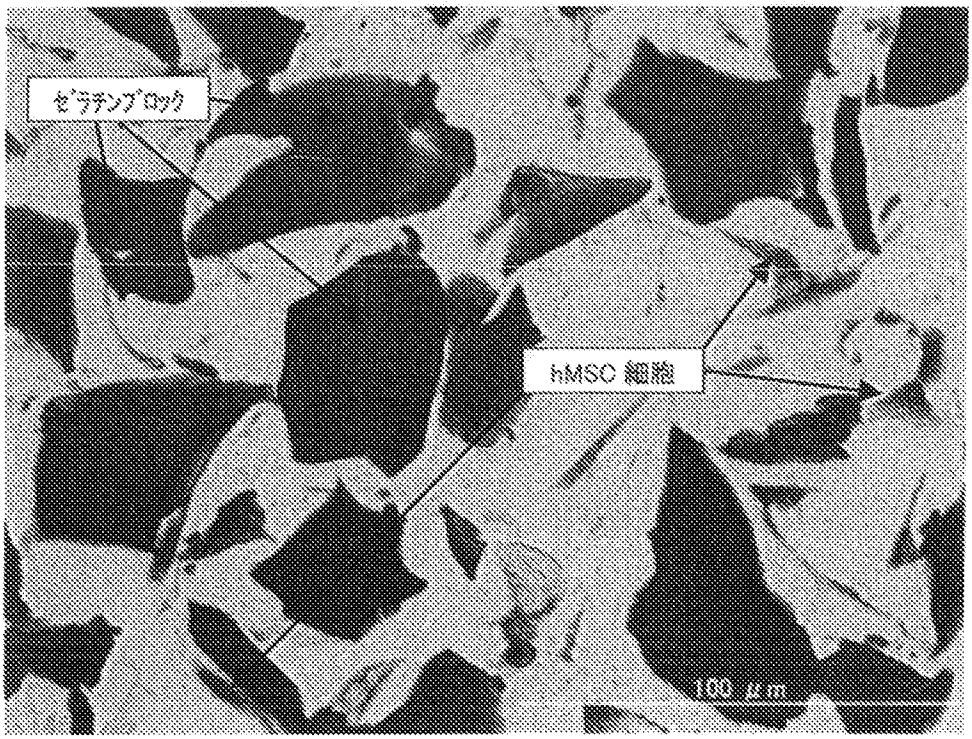
[図18]

図18 ボリュームアップしたDay21(増殖培地下でリコンビナントゼラチンゲルブロックを追加)HE 切片写真 ×5倍



[図19]

図19 ボリュームアップしたDay21(増殖培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加)HE 切片写真 ×40倍



[図20]

図20 ボリュームアップしたDay21(軟骨分化培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加)HE 切片写真
×5倍

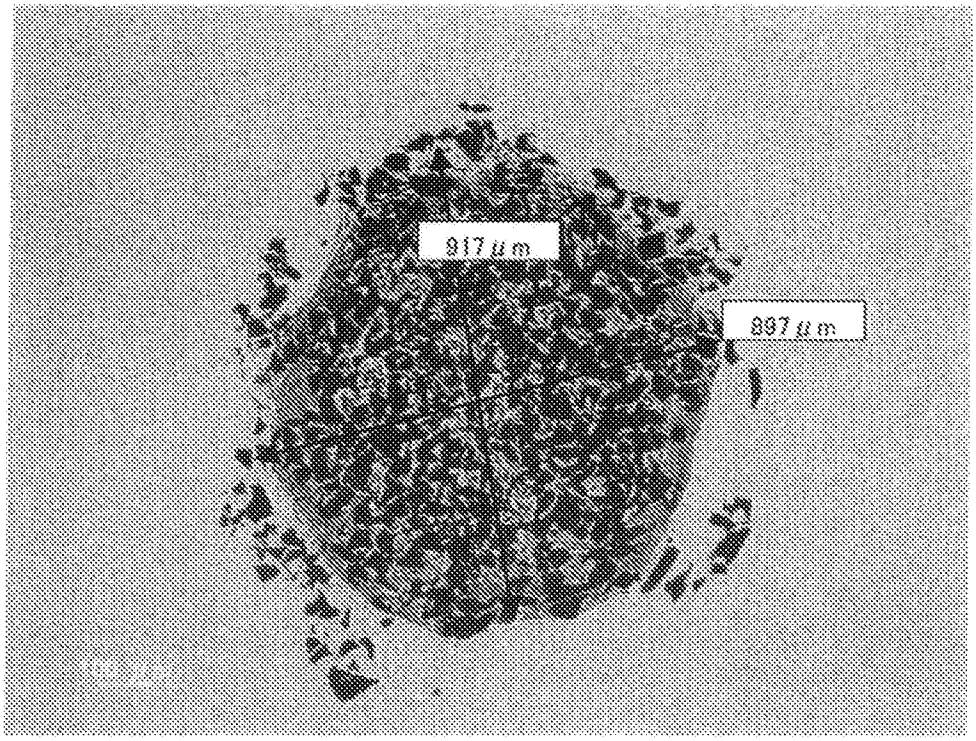
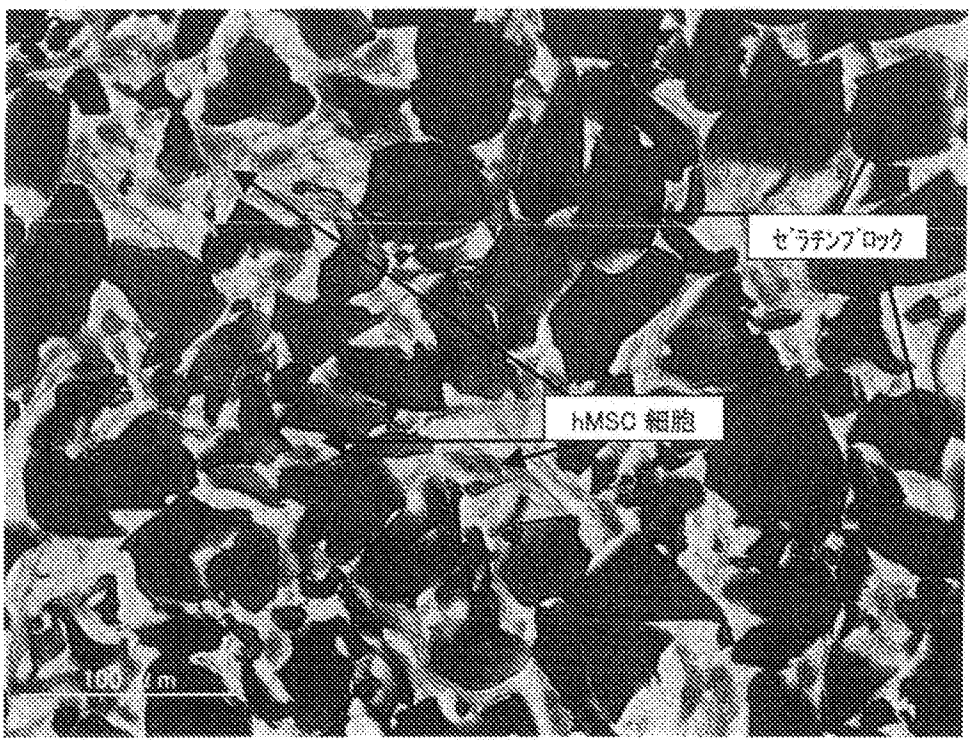
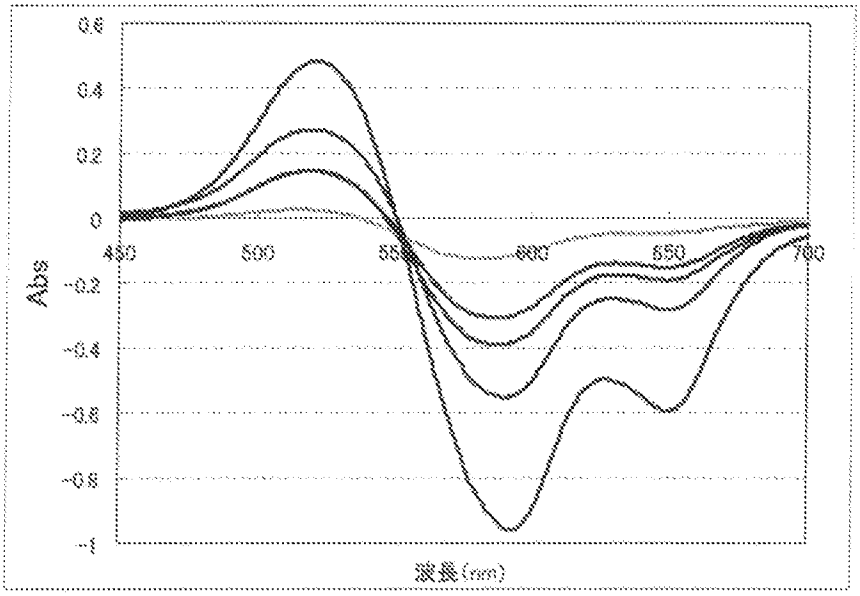


図20 ボリュームアップしたDay21(軟骨分化培地下でリコンビナントゼラチンブロックを追加)HE 切片写真
×20倍



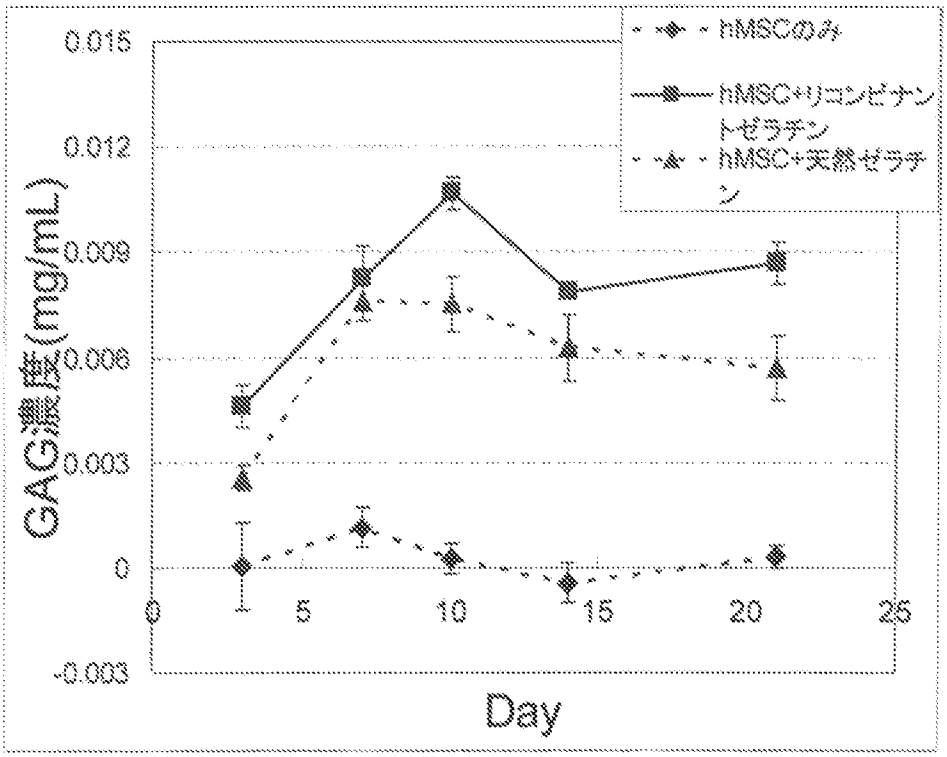
[図21]

図21 GAGスペクトルデータ



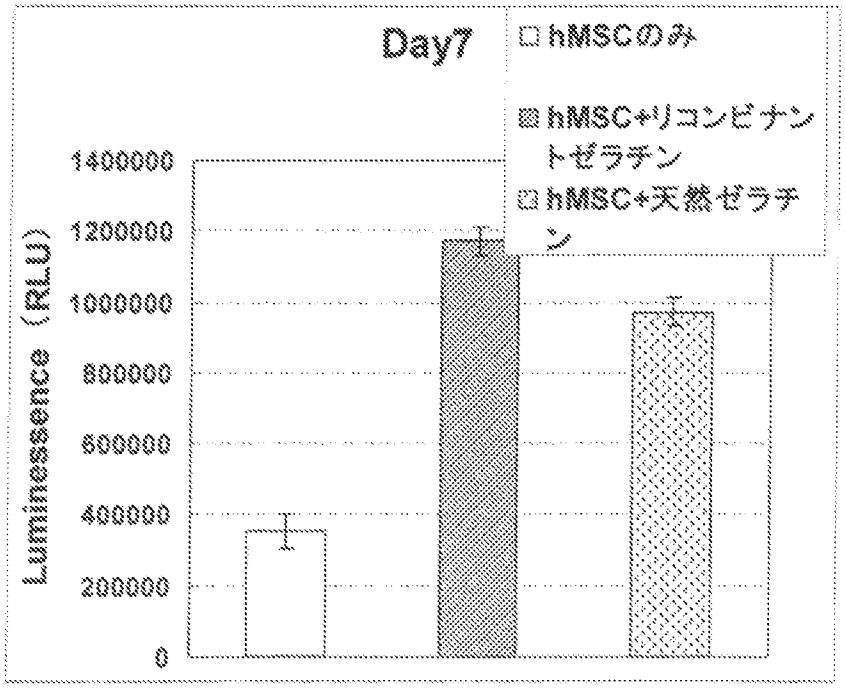
[図22]

図22 モザイク細胞塊中のGAG産生量 経時変化



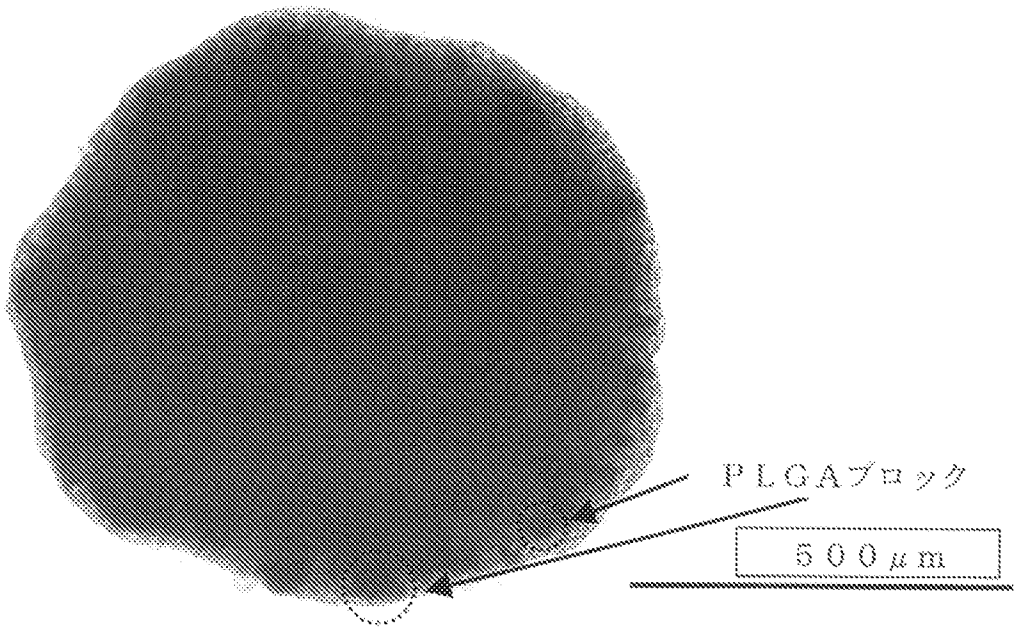
[図23]

図23 モザイク細胞塊(Day7)中の細胞が産生・保持しているATP量



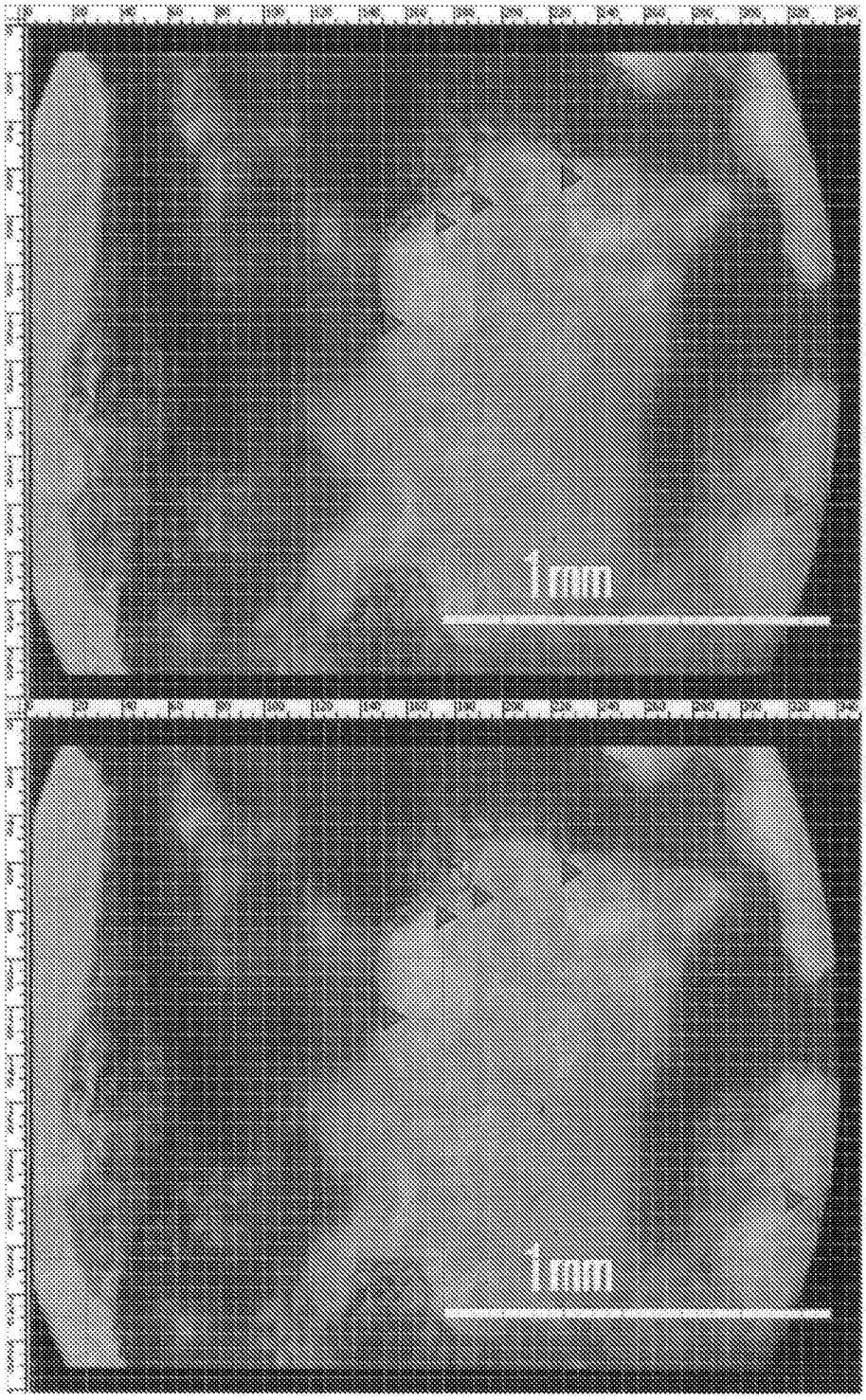
[図24]

図24 PLGAμブロックで作製したモザイク細胞塊のDay2(増殖培地)の実体顕微鏡写真



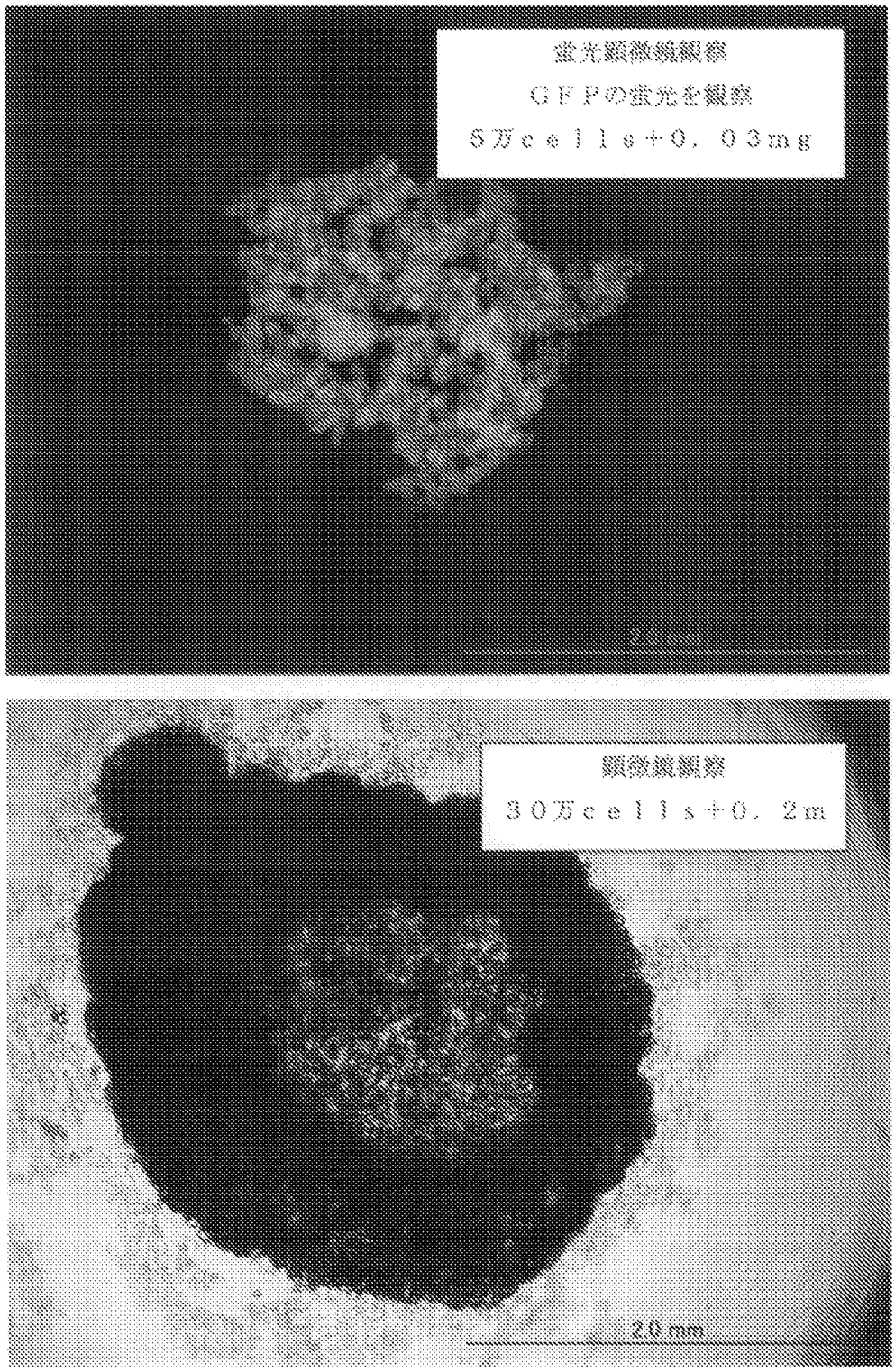
[図25]

図25



[図26]

図26


蛍光顕微鏡観察
ＧＦＰの蛍光を観察
５万ｃｅｌｌｓ＋０．０３ｍｇ
2.0 mm
顕微鏡観察
３０万ｃｅｌｌｓ＋０．２ｍ
2.0 mm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/054577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61L27/00(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)
A61L27/00

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/066468 A1 (Masayuki ISHIHARA), 28 May 2009 (28.05.2009), claims; examples (Family: none)	1,2,6-9, 18-26,28-30, 32,33
X Y	JP 2009-520501 A (Fujifilm Manufacturing Europe B.V.), 28 May 2009 (28.05.2009), claims; examples & WO 2007/073190 A1 & US 2009/0246282 A1 & EP 1801122 A1	1-15,18-33 16,17
X Y	JP 2004-267562 A (Advance Co., Ltd.), 30 September 2004 (30.09.2004), claims; paragraph [0004] (Family: none)	1-15,18-33 9-17

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

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

Date of the actual completion of the international search 19 April, 2011 (19.04.11)	Date of mailing of the international search report 26 April, 2011 (26.04.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/054577

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	JP 2009-112233 A (Nipro Corp.), 28 May 2009 (28.05.2009), claims; examples (Family: none)	1-15,18-33 16,17
Y	WO 2008/103041 A1 (FUJIFILM MANUFACTURING EUROPE B.V.), 28 August 2008 (28.08.2008), entire text & JP 2010-519251 A & US 2010/0119574 A1 & EP 1961411 A1	9-17
X Y	L. LAO, et al, Chitosan modified poly(L-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, vol.66, p.218-225	1-9,18-33 9-17
X Y	Y. N. WU, et al, Cartilaginous ECM component-modification of the micro-bead culture system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, Biomaterials, 2007, vol.28, p.4056-4067	1-8,18-33 9-17
X Y	H. J. CHUNG, et al, Injectable Cellular Aggregates Prepared from Biodegradable Porous Microspheres for Adipose Tissue Engineering, TISSUE ENGINEERING, 2009, vol.15, no.6, p.1391-1400	1-3,6-9, 18-33 9-17
X Y	I. GERCEK, et al, A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, vol. 86, p.1012-1022	1-3,6-9, 18-33 9-17
Y	JP 2008-228744 A (Osaka Prefecture University), 02 October 2008 (02.10.2008), paragraph [0060] & WO 2006/137546 A1	9-17
P,X	WO 2010/110067 A1 (Maruha Nichiro Foods, Inc.), 30 September 2010 (30.09.2010), entire text (Family: none)	1-15,18-33

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０５４５７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61L27/00(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.　A61L27/00

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	１９７１－２０１１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１１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(JDreamII)

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
X	WO 2009/066468 A1（石原　雅之）2009.05.28, 請求の範囲、実施例（ファミリーなし）	1, 2, 6-9, 18-26, 28-30, 32, 33
X Y	JP 2009-520501 A（フジフィルム　マニュファクチャリング　ユーロプ　ビー．ブイ．）2009.05.28, 特許請求の範囲、実施例 & WO 2007/073190 A1 & US 2009/0246282 A1 & EP 1801122 A1	1-15, 18-33 16, 17

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

国際調査を完了した日 １９．０４．２０１１	国際調査報告の発送日 ２６．０４．２０１１
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　４Ｃ　４０４３ 馬場　亮人 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

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	JP 2004-267562 A (株式会社アドバンス) 2004.09.30, 特許請求の範囲、【０００４】 (ファミリーなし)	1-15, 18-33 9-17
X Y	JP 2009-112233 A (ニプロ株式会社) 2009.05.28, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-15, 18-33 16, 17
Y	WO 2008/103041 A1 (FUJIFILM MANUFACTURING EUROPE B. V.) 2008.08.28, 全文 & JP 2010-519251 A & US 2010/0119574 A1 & EP 1961411 A1	9-17
X Y	L. LAO, et al, Chitosan modified poly(L-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, vol.66, p.218-225	1-9, 18-33 9-17
X Y	Y. N. WU, et al, Cartilaginous ECM component-modification of the micro-bead culture system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, Biomaterials, 2007, vol.28, p.4056-4067	1-8, 18-33 9-17
X Y	H. J. CHUNG, et al, Injectable Cellular Aggregates Prepared from Biodegradable Porous Microspheres for Adipose Tissue Engineering, TISSUE ENGINEERING, 2009, vol.15, no.6, p.1391-1400	1-3, 6-9, 18-33 9-17
X Y	I. GERCEK, et al, A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, vol. 86, p.1012-1022	1-3, 6-9, 18-33 9-17
Y	JP 2008-228744 A (公立大学法人大阪府立大学) 2008.10.02, 【００６０】 & WO 2006/137546 A1	9-17
P, X	WO 2010/110067 A1 (株式会社マルハニチロ食品) 2010.09.30, 全文 (ファミリーなし)	1-15, 18-33