

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-215519

(P2007-215519A)

(43) 公開日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/04 (2006.01)	C 1 2 M 3/04	4 B O 2 9
C 1 2 N 11/02 (2006.01)	C 1 2 N 11/02	4 B O 3 3
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B O 6 5
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/04 A	4 C O 8 1
	A 6 1 L 27/00 V	
審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 18 頁)		

(21) 出願番号 特願2006-42208 (P2006-42208)
 (22) 出願日 平成18年2月20日 (2006.2.20)

(71) 出願人 306037311
 富士フイルム株式会社
 東京都港区西麻布2丁目26番30号
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 戸田 悟
 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内
 Fターム(参考) 4B029 AA01 AA21 BB11 BB15 BB20
 CC02 CC08 CC11 DG08
 4B033 NA16 NB02 NB13 NB33 NB43
 NB48 NB49 NB57 NB58 NB63
 ND12 NG05 NH04
 4B065 AA90X BC41 BC46 CA44 CA60
 4C081 AB11 AB31 AB36 CD011 CD091
 CD122 CD152 CD34 DC03

(54) 【発明の名称】 細胞培養担体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】乾燥状態においてカールすることがなく、かつ濡れ性が改善された細胞培養担体の提供。さらに、安定的かつ容易に細胞を重層する技術、及び細胞層を重層した場合に上部層と下部層の細胞とを十分に接着することができる技術、また培養中の細胞の状態を直接観察でき、かつ培養した細胞を短時間で剥離することができる、透明性のある細胞培養担体の提供。

【解決手段】高分子含水ゲル層を含む多層構造の細胞培養担体であって、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を有することを特徴とする細胞培養担体。親水性層は天然ポリマー、合成ポリマーまたはその混合ポリマーを含有し、高分子含水ゲルはキトサンである。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高分子含水ゲル層を含む多層構造の細胞培養担体であって、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を有することを特徴とする細胞培養担体。

【請求項 2】

請求項 1 記載の細胞培養担体であって、親水性層が天然ポリマー、合成ポリマーまたはその混合ポリマーを含有することを特徴とする細胞培養担体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養担体において、高分子含水ゲルがキトサンである細胞培養担体。

10

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞培養担体において、該細胞培養担体がさらにアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を含み、該ゲル層が高分子含水ゲル層と隣接している細胞培養担体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の細胞培養担体において、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層がアルギン酸ゲル層である細胞培養担体。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の細胞培養担体において、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲルがアルギン酸カルシウムゲルである細胞培養担体。

20

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の細胞培養担体において、細胞培養面側最表面が細胞接着性ゲル層である細胞培養担体。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の細胞培養担体において、細胞接着性ゲルがゼラチン及び / 又はコラーゲンを含むゲルである細胞培養担体。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の細胞培養担体において、細胞接着性ゲルが細胞接着性コラーゲンゲルである細胞培養担体。

【請求項 10】

30

請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の細胞培養担体において、細胞接着性ゲルが細胞接着因子で修飾されている細胞培養担体。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の細胞培養担体において、細胞接着因子がフィブロネクチン、ラミニン、又はビトロネクチンである細胞培養担体。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の細胞培養担体において、該細胞培養担体が電子線、 γ 線、紫外線のいずれか又は複数を照射することで滅菌されている細胞培養担体。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の細胞培養担体を用いて細胞を培養する工程を含む細胞の培養方法。

40

【請求項 14】

請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理により細胞シートを得る工程を含む細胞培養方法。

【請求項 15】

可溶化処理を、キレート剤を含みかつ多価金属カチオンが 2 . 6 m M 以下である培地を用いて行う請求項 14 に記載の細胞培養方法。

【請求項 16】

請求項 14 又は 15 に記載の細胞培養方法で得られる細胞シート。

50

【請求項 17】

請求項 4 ~ 12 のいずれか一項に記載の細胞培養担体を用いて細胞を培養する工程を含む細胞の培養方法により得られる細胞培養物を他の細胞培養担体上でさらに培養する工程を含む細胞転写法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の細胞転写法により得られる細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理により得られる細胞培養物又は細胞シート。

【請求項 19】

可溶化処理を、キレート剤を含みかつ多価金属カチオンが 2 . 6 m M 以下である培地を用いて行う請求項 18 に記載の細胞培養物又は細胞シート。

10

【請求項 20】

請求項 17 に記載の細胞転写法により得られる細胞培養物を他の培養細胞上に培養する工程を含む細胞重層化法。

【請求項 21】

請求項 4 ~ 12 のいずれか一項に記載の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物を他の培養細胞上に培養する工程を含む細胞重層化法。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の細胞重層化法により得られる細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理により得られる重層化細胞培養物又は重層化細胞シート。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養の技術に関し、具体的には、細胞培養担体、該細胞培養担体を利用した細胞の培養方法、該培養方法により得られる細胞培養物、該細胞培養物を利用した細胞層の重層化方法、該重層化方法により得られる重層化した細胞層に関する。

【背景技術】

【0002】

キトサンやゼラチンなどの親水性高分子ゲルは、生体に類似した構造を持ち、温度、酸性・アルカリ性等の外部条件によって膨張、収縮する性質を有するため、人工筋肉などの人工臓器・組織への応用、内部に薬剤を封入して放出量をコントロールする医療分野への応用のみならず、各種サイトカイン等を含むゲルとして細胞を培養する際に細胞成長の足場としての利用も試みられている。

30

【0003】

親水性高分子ゲルの中でも温度応答性高分子であるポリN-イソプロピルアクリルアミド（以下「PNIPAM」と称する）は、低温では膨潤して液状であるが、34 付近で相転移し急激に収縮しゲル化する。従来、培養細胞の階層化を行なうに当たり、37 の温度条件下、ゲル化したPNIPAM上で培養した細胞をPNIPAMごと別の細胞層に重ね、その後34 以下に下げることによりPNIPAMを液状化させて取り除き、細胞同士を直接重ねるという手法が取られていた（特許文献1：特公平6-104061号公報；非特許文献1：清水達也、岡野光夫、バイオサイエンスとバイオインダストリー、58(12)、851頁(2000)；非特許文献2：大和雅之、岡野光夫、臨外、56(1)、53頁(2001)；非特許文献3：大和雅之、岡野光夫、Materials Integration、13(2)、58頁(2000)；非特許文献4：大和雅之、串田愛、岡野光夫、蛋白質・核酸・酵素、45(10)、72頁(2000)；非特許文献5：大和雅之、廣瀬志弘、播元正美、岡野光夫、蛋白質・核酸・酵素、45(13)、162頁(2000)）。

40

【0004】

PNIPAM上で細胞培養を行った場合、通常、細胞は単層状に成長する。この際、隣り合った細胞同士ではコラーゲン等の細胞外マトリックス（Extracellular Matrix）（以下「ECM」と称する）が形成される。そして、細胞が増殖するためには、ECMに接着する必要がある。しかし、細胞の上部及び細胞と基底層であるPNIPAM間は他の細胞と接着しておらず、

50

細胞接着に必要なECMは形成されない。

【0005】

従って、PNIPAM上で培養した単層の細胞層同士を重層し、細胞層を34以下の条件下でPNIPAMを可溶化して取り除き、細胞同士が直接接するように重ねても、上部に重ねた細胞は、増殖するための足場が十分でなく、従って安定した増殖は望むことができなかった。また、液状化したPNIPAMが細胞毒として作用するため細胞の正常な成長を阻害する現象も認められるため、細胞の階層化の手段としては極めて不向きで不安定な技術であった。

【0006】

上記の手法の問題点の解決のため、各種ゲル上に細胞外マトリックス成分を重層化しゲル化させた培地での細胞培養、及び重層後に不要となったゲルを容易に除去できるような培地を使用した培養系の確立につき検討が続けられていた。特許第3261456号公報（特許文献2）においては、多孔質膜と該多孔質膜上にアルギン酸ゲル層と細胞外マトリックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層を形成させたことを特徴とする細胞培養担体が提案されている。しかし、この細胞培養担体では、細胞外マトリックス層が厚く、乾燥膜の状態で細胞培養担体を保管することが不可能であった。また、細胞の重層化操作にも邪魔になり安定に重層化細胞を得られない問題があった。さらに、該特許公報に記載されている多孔質膜は透明性がなく、細胞培養中に生きた細胞の育成状況を目視又は顕微鏡等により直接観察することができないため、シャーレ上に置いた細胞培養担体の周りのシャーレ上での細胞の育成状態から細胞担体上の細胞の状況を同等状態である類推していたが、細胞培養担体の周りのシャーレ上での細胞の育成状態は、細胞担体上の細胞の状態と必ずしも一致せず、細胞の増殖が不足していたり、オーバーコンフルエントであったりする問題点があった。したがって、細胞の育成状態を確実に把握するために、通常の細胞培養で用いるシャーレのような透明性を有する細胞培養担体が望まれていた。

【0007】

また、該特許公報に記載されている方法ではアルギン酸ゲル層の溶解にEDTA水溶液を用いて培養細胞を細胞培養担体から剥離しているが、このときのEDTA水溶液の侵襲により細胞がダメージを受ける問題があった。したがって、培養細胞を細胞培養担体から剥離する際の細胞へのダメージを可能な限り少なくすることのできる細胞培養担体が望まれていた。

【0008】

特開2005-10537号公報（特許文献3）には、細胞へのダメージを可能な限り少なくした細胞培養担体および細胞培養方法が記載されているが、細胞培養担体が乾燥状態においてカールすることにより細胞培養容器に設置の際に取り扱い性が悪い場合がある。また、濡れ性が悪い場合があり培地をはじくことにより、細胞の接着や育成を阻害する懸念があった。

【0009】

【特許文献1】特公平6-104061号公報

【特許文献2】特許第3261456号公報

【特許文献3】特開2005-10537号公報

【非特許文献1】清水達也、岡野光夫、バイオサイエンスとバイオインダストリー、58(12)、851頁(2000)

【非特許文献2】大和雅之、岡野光夫、臨外、56(1)、53頁(2001)

【非特許文献3】大和雅之、岡野光夫、Materials Integration、13(2)、58頁(2000)

【非特許文献4】大和雅之、串田愛、岡野光夫、蛋白質・核酸・酵素、45(10)、72頁(2000)

【非特許文献5】大和雅之、廣瀬志弘、播元正美、岡野光夫、蛋白質・核酸・酵素、45(13)、162頁(2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、乾燥状態においてカールすることがなく、かつ濡れ性が改善された細胞培養担体を提供することを目的とする。さらに本発明は、安定的かつ容易に細胞を重層する技術、及び細胞層を重層した場合に上層部の細胞と下層部の細胞とを十分に接着することができる技術を提供し、これにより、皮膚などの一部組織を除き *in vitro* 条件下では困難とされてきた細胞の階層化技術に道を開くことを目的とする。具体的には、本発明は、培養中の細胞の状態を直接観察でき、かつ培養した細胞層を短時間で剥離することができる、透明性のある細胞培養担体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行い、高分子含水ゲル層を含む多層構造の細胞培養担体において、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を設けることによって、乾燥状態においてカールすることがなく、かつ濡れ性が改善された細胞培養担体を提供できることを見出した。本発明はこれらの知見を基に完成されたものである。

【0012】

すなわち本発明によれば、高分子含水ゲル層を含む多層構造の細胞培養担体であって、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を有することを特徴とする細胞培養担体が提供される。本発明の好ましい態様によれば、上記の細胞培養担体において親水性層が天然ポリマー、合成ポリマーまたはその混合ポリマーを含有する細胞培養担体が提供される。

【0013】

本発明の好ましい態様によれば、上記の細胞培養担体において高分子含水ゲルがキトサンである細胞培養担体が提供される。本発明のさらに好ましい態様によれば、上記いずれかの細胞培養担体において、該細胞培養担体がさらにアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を含み、該ゲル層が高分子含水ゲル層と隣接している細胞培養担体；アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲルがアルギン酸カルシウムゲルである該細胞培養担体；上記いずれかの細胞培養担体において、細胞培養面側最表面が細胞接着性ゲル層である細胞培養担体；細胞接着性ゲルがゼラチン及び／又はコラーゲンを含むゲルである該細胞培養担体；細胞接着性ゲルが細胞接着性コラーゲンゲルである該細胞培養担体；細胞接着性ゲルが細胞接着因子で修飾されている該細胞培養担体；細胞接着因子がフィブロネクチン、ラミニン、又はビトロネクチンである該細胞培養担体；及び上記いずれかの細胞培養担体において、該細胞培養担体が電子線、 γ 線、紫外線のいずれか又は複数を照射することで滅菌されている細胞培養担体が提供される。

【0014】

本発明の別の観点からは、上記いずれかの細胞培養担体を用いて細胞を培養する工程を含む細胞の培養方法が提供され、さらに、上記いずれかの細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理により細胞シートを得る工程を含む細胞培養方法；可溶化処理を、キレート剤を含みかつ多価金属カチオンが2.6 mM以下である培地を用いて行う該細胞培養方法；及び上記いずれかの細胞培養方法で得られる細胞シートが提供される。

【0015】

本発明のさらに別の観点からは、上記いずれかの細胞培養担体を用いて細胞を培養する工程を含む細胞の培養方法により得られる細胞培養物を他の細胞培養担体上でさらに培養する工程を含む細胞転写法；該細胞転写法により得られる細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理により得られる細胞培養物又は細胞シート；可溶化処理を、キレート剤を含みかつ多価金属カチオンが2.6 mM以下である培地を用いて行う該細胞培養物又は細胞シート；上記の細胞転写法により得られる細胞培養物を他の培養細胞上に培養する工程を含む細胞重層化法；上記いずれかの細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物を他の培養細胞上に培養する工程を含む細胞重層化法；及び該細胞重層化法により得られる細胞培養物におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオ

10

20

30

40

50

ンを含むゲル層の可溶化処理により得られる重層化細胞培養物又は重層化細胞シートが提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、乾燥状態においてカールすることがなく、かつ濡れ性が改善された細胞培養担体が提供される。また本発明によれば、細胞培養中の細胞の生きた状態を直接観察でき、細胞層の重層化を容易に行なうことができる細胞培養担体が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

細胞培養担体とは、高分子含水ゲル層を含む多層構造の細胞培養担体であって、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を有するものを意味する。本発明の細胞培養担体の形状は特に限定されないが、シート状であるのが好ましい。

【0018】

本発明の細胞培養担体は、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に親水性層を有することを特徴とする。本明細書においては、層を膜という場合もある。

【0019】

本発明において、高分子含水ゲルとは、特に水には溶解しないが高分子中に水を含み系全体にわたって2次元的又は3次元的支持構造を有する吸水性高分子をいう。本発明において水には溶解しないとは、室温における中性pHでの水への実質的溶解度が0.5g/水100g以下である場合をいい、好ましくは0.1g/水100g以下であり、さらに実質的に溶解しないことが最も好ましい。ここで、室温は20～30の範囲をいい、好ましくは25である。また、中性pHとはpH5～9の範囲をいい、好ましくはpH6～8の範囲である。本発明においては、高分子含水ゲル層として、キレート剤等の物質を層中に拡散させることにより該層の一方の面から他方の面にキレート剤を到達させることができるものを用いる。また、本発明においては、高分子含水ゲル層として、該層の一方の面から他方の面にアルギン酸ゲル等のアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲルは到達させないものを用いる。本発明で用いる高分子含水ゲル層は、このような層である限り特に限定されず、合成高分子であっても、天然高分子、生体高分子であってもよい。高分子含水ゲルの例としては、架橋アクリルアミドゲル、架橋アクリル酸ゲル、寒天、架橋ゼラチン、架橋デキストラン、キトサン、シリカゲルなどがあげられるが、キトサンを用いることが好ましい。

【0020】

本発明の細胞培養担体においては、「高分子含水ゲル層」は支持体であるのが好ましい。ここで、細胞培養担体において支持体であるとは、多層構造の細胞培養担体を作製する際の基盤となる層であることをいう。

【0021】

本発明における高分子含水ゲル層の厚さは0.01 μ m以上20 μ m以下であることを特徴とする。好ましくは0.1 μ m以上10 μ m以下、更に好ましくは0.5 μ m以上5 μ m以下である。高分子含水ゲル層が薄すぎると十分な膜を形成できず破れや裂けや穴が空いてしまうという問題が生じ、高分子含水ゲル層が厚すぎると培地成分や剥離操作時のキレート剤成分の拡散が遅く、細胞に悪影響を及ぼすという問題が生じる。

【0022】

本発明の細胞培養担体における高分子含水ゲル層は、一般的に知られている種々のゲル膜の作製方法を用いて作製することができる。例えば、高分子溶液をキャストする方法（キャスト法）やバーコーターで塗布する方法（バーコート法）、ギャップコーターで塗布する方法（ギャップコート法）などが挙げられるが、これらのうちバーコート塗布法、ギャップコート塗布法が好ましい。

【0023】

本発明に用いられる高分子含水ゲルは、後述の本明細書で定義する溶液状態での粘度が100 mPa $\cdot$ s以上50000 mPa $\cdot$ s 以下のものを用いることができるが、300 mPa $\cdot$ s 以上30000 mPa $\cdot$ s 以下であることが好ましく、さらに600 mPa $\cdot$ s 以上20000 mPa $\cdot$ s 以下であるこ

10

20

30

40

50

とが好ましい。

【0024】

同一条件で調製した高分子溶液の粘度は、高分子の分子量の指標となるものであり、粘度の数値が大きいものほど高分子量であることを意味する。本明細書で定義するゲルの溶液状態での粘度とは、該高分子12 gを1質量%の酢酸水溶液1000 gに添加したゲル化前の溶液を、25℃にてB型粘度計で測定したときの粘度をいう。粘度が低いとき、すなわち分子量が小さいときは、作製された高分子含水ゲル層の強度が弱いことが示唆される。また、低粘であることから該層の作製時に溶液が流れだして膜厚が不均一になったり、溶液の最表面のみが乾燥して皮膜を形成する皮張り現象を起こしたり、溶媒の乾燥に時間がかかったりする。一方、粘度が高すぎる場合、すなわち分子量が高すぎる場合、作製された高分子含水ゲル膜の強度はあるが、該膜の作成時に流延性がなく膜厚が不均一になる、又は塗膜が形成できないと言った不具合が生じる。粘度が上記の範囲である高分子含水ゲルを用いることにより、強度が高いとともに、上記の一定の厚さである高分子含水ゲル層を得ることができる。

10

【0025】

本発明において高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面（即ち、高分子含水ゲル層をはさんで細胞培養面側最表面とは反対側の面）に設けられる親水性層は、親水性高分子からなる層であり、親水性高分子とは、特に水には溶解しないが高分子中に水を含み系全体にわたって2次元的又は3次元的な支持構造を有する吸水性高分子をいう。本発明において水には溶解しないとは、室温における中性pHでの水への実質的溶解度が0.5 g/水100 g以下である場合をいい、好ましくは0.1 g/水100 g以下であり、さらに実質的に溶解しないことが最も好ましい。ここで、室温は20～30℃の範囲をいい、好ましくは25℃である。また、中性pHとはpH5～9の範囲をいい、好ましくはpH6～8の範囲である。

20

【0026】

本発明において親水性高分子としては、ゲル層としたときにキレート剤等の物質を層中に拡散させることにより該層の一方の面から他方の面にキレート剤を到達させることができるものを用いる。また、本発明においては、親水性高分子をゲル層としたときに、該層の一方の面から他方の面にアルギン酸ゲル等のアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲルは到達させることができないものを用いる。本発明で用いる親水性高分子は、上記の条件を満たす限り特に限定されず、天然ポリマー（天然高分子、生体高分子）、合成ポリマーまたはその混合ポリマーであってもよい。親水性高分子の例としては、架橋アクリルアミドゲル、架橋アクリル酸ゲル、寒天、架橋ゼラチン、架橋デキストラン、架橋アガロース、キトサン、シリカゲルなどがあげられるが、架橋アクリルアミドゲル、架橋ゼラチン、架橋デキストランを用いることが好ましい。

30

本発明で、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に設けられる親水性層に用いられる親水性高分子は単独で用いても、複数の親水性高分子を混合して用いても良い。

【0027】

本発明の高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面に設けられる親水性層には、必要に応じて添加剤を含有することができる。添加剤としては、親水性層の形成または/および細胞培養を妨げるものでなければ制限はなく、例えば、硬膜剤、増粘剤、界面活性剤、静電除去剤、pH調整剤、膨潤剤、調湿剤などが挙げられる。これらの添加剤は、無機物でも有機物でもよく、また低分子化合物でも高分子化合物でもオリゴマーでもよい。

40

【0028】

本発明における高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層の厚さは好ましくは0.01 μm以上50 μm以下であり、より好ましくは0.1 μm以上25 μm以下であり、更に好ましくは0.5 μm以上15 μm以下である。該層が薄すぎると十分な含水性が得られずカールを改善できないという問題が生じ、該層が厚すぎるとカールは改善されるものの

50

、培地成分の透過が遅く細胞に悪影響を及ぼしたり、剥離操作時のキレート剤成分の拡散が遅く、剥離性が悪くなるという問題が生じる。

本明細書において層の厚さは、特に言及のない限り十分に乾燥した状態で計測したものを示す。本明細書においては、この層の厚さを「乾燥膜厚」ということもある。層の厚さの計測は、電子顕微鏡断面像、マイクロメータ膜厚計、エリプソメーター、角度可変XPS、光干渉式膜厚計などを用いて行うことができ、好ましくはマイクロメータ膜厚計、電子顕微鏡断面像、光干渉式膜厚計を用いて行うことができる。

【0029】

本発明の細胞培養担体における高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層は高分子含水ゲル上に、一般的に知られている種々のゲル膜の作製方法を用いて作製することができる。例えば、高分子溶液をキャストする方法（キャスト法）やバーコーターで塗布する方法（バーコート法）、ギャップコーターで塗布する方法（ギャップコート法）などが挙げられるが、これらのうちバーコート塗布法、ギャップコート塗布法が好ましい。

10

【0030】

本発明に用いられる高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層を形成する親水性高分子は、溶液状態での粘度が10 mPa・s以上50000 mPa・s以下のものを用いることができるが、30 mPa・s以上30000 mPa・s以下であることが好ましく、さらに60 mPa・s以上20000 mPa・s以下であることが好ましい。

【0031】

本発明の好ましい態様として、高分子含水ゲル層がアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層と隣接しているものが挙げられる。アニオン性多糖類としては、アルギン酸、デキストラン硫酸、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルデキストラン、ヒアルロン酸などが挙げられるが、アルギン酸が好ましく用いられる。

20

【0032】

アルギン酸は、褐藻類の細胞壁構成多糖又は細胞間充填物質として天然に存在しており、これらを原料として採取可能である。原料褐藻類の具体例としては、ヒバマタ目ダービリア科ダービリア属（例えば*D.potatorum*）、ヒバマタ目ヒバマタ科アスコフィラム属（例えば*A.nodosum*）、コンブ目コンブ科コンブ属（例えばマコンブ、ナガコンブ）、コンブ目コンブ科アラメ属（例えばアラメ）、コンブ目コンブ科カジメ属（例えばカジメ、ウロメ）、コンブ目レソニア科レソニア属（例えば*L.flavikans*）の褐藻類を例示できる。また、市販のアルギン酸を使用することもできる。アルギン酸のG/Mの比は特に限定されないが、G/Mの比が大きいほどゲル形成能が大きいので、G/Mの比は大きい方が好ましく、具体的には0.1~1であるのが好ましく、0.2~0.5であるのがさらに好ましい。

30

【0033】

「アルギン酸ゲル」とは、アルギン酸の分子中のカルボン酸基と多価金属イオンとがキレート構造を形成してゲル化したものを意味し、「アルギン酸ゲル層」とは、層状のアルギン酸ゲルを意味する。アルギン酸は、グルクロン酸（G）とマンヌロン酸（M）よりなるブロック共重合体であり、Mブロックが有するポケット構造に多価金属カチオンが侵入してエッグボックスを形成し、ゲル化すると考えられている。アルギン酸のゲル化を引き起こし得る多価金属カチオンの具体例としては、バリウム（Ba）、鉛（Pb）、銅（Cu）、ストロンチウム（Sr）、カドミウム（Cd）、カルシウム（Ca）、亜鉛（Zn）、ニッケル（Ni）、コバルト（Co）、マンガン（Mn）、鉄（Fe）、マグネシウム（Mg）等の金属イオンを例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオンを例示できる。また、「アルギン酸ゲル」はアルギン酸とカチオン残基を有する有機高分子化合物のポリイオンコンプレックスゲルでもよい。ここでいうカチオン残基を有する有機高分子化合物の例としては、ポリリジン、キトサン、ゼラチン、コラーゲンなどの複数のアミノ基を有する化合物が挙げられる。

40

【0034】

アルギン酸のゲル化は、常法に従って行なうことができる。アルギン酸のゲル化は、例

50

えばイオン交換を利用して行なうことができる。例えば、アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを添加すると速やかにイオン交換が生じ、アルギン酸カルシウムゲルが得られる。より具体的には、0.2~5%アルギン酸ナトリウム水溶液を、高分子含水ゲル層上に塗布後0.01~1.0 M 塩化カルシウム水溶液中に浸漬して塩化カルシウムをしみ込ませ、20~30 で3分~3時間放置することによりアルギン酸カルシウムゲル層が得られる。このように高分子含水ゲルを用いてアルギン酸のゲル化を行なえば、高分子含水ゲル層と該ゲル層上に形成されたアルギン酸ゲル層とを含む細胞培養担体を得ることができる。

【0035】

本発明の細胞培養担体におけるアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の厚さは0.01 μ m以上50 μ m以下であることが好ましく、0.1 μ m以上10 μ m以下が好ましく、0.5 μ m以上8 μ m以下であることがさらに好ましい。アルギン酸ゲル層の固形分量が少なすぎると十分な膜状の層を形成できず穴が空いてしまい、多すぎると乾燥膜でのカールや割れの発生、培養工程での変形やアルギン酸ゲル溶解工程での溶解不良といった問題が生じる。

【0036】

本発明の細胞培養担体上に形成された培養細胞層は、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化処理することにより細胞シートとして剥離させることができる。細胞シートは培養細胞層及び好ましくは後述の細胞接着性層を含む。アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理は、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を構成するカチオン成分を除去することにより実施でき、カチオン種が多価金属イオンの場合は、培養細胞層が形成された細胞培養担体を1)リン酸などの多価金属カチオンと錯形成するもしくは難溶性塩を形成するイオンが添加された培地に浸漬する、2)キレート剤水溶液が添加された培地に浸漬する、3)多価金属イオンが低減された培地に浸漬する、又は4)該細胞の培養培地中の多価金属イオンをキレート剤によって隠蔽する方法によって実施できる。通常、細胞培養用の培地にはリン酸イオンが多く存在する。従って、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理は、多価金属カチオン濃度が通常細胞培養に用いられる最小培地における多価金属カチオンの濃度よりも少なく、かつキレート剤を含む培地を用いて行うことが好ましい。具体的には該濃度は2.6 mM以下であることが好ましく、3 μ M以下がより好ましく、さらに好ましくは0.5 μ M以下であり、実質的に0であることが最も好ましい。また、該キレート剤の濃度は2.3 mM以上かつ26000 mM以下が好ましく、2.3 mM以上かつ2600 mM以下がさらに好ましい。上記のように多価金属カチオン濃度を低減した培地を用いることにより、キレート剤の細胞への侵襲を低減したアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化が可能である。

【0037】

本発明で用いられるキレート剤としては、例えば、エチレンジアミンジオルトヒドロキシフェニル酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、ジヒドロキシエチルグリシン、エチレンジアミン二酢酸、エチレンジアミンニプロピオン酸、イミノ二酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、1,3-ジアミノプロパノール四酢酸、トリエチレントトラミン六酢酸、トランスシクロヘキサジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸(edta)、グリコールエーテルジアミン四酢酸、0,0'-ビス(2-アミノエチル)エチレングリコール-N,N,N',N'-四酢酸(egta)、エチレンジアミンテトラキスメチレンホスホン酸、ジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸、ニトリロトリメチレンホスホン酸、1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸、1,1-ジホスホノエタン-2-カルボン酸、2-ホスホノブタン-1,2,4-トリカルボン酸、1-ヒドロキシ-1-ホスホノプロパン-1,3,3-トリカルボン酸、カテコール-3,5-ジスルホン酸、ピロリン酸ナトリウム、テトラポリリン酸ナトリウム、ヘキサメタリン酸ナトリウム、1-ヒドロキシプロピリデン-1,1-ジホスホン酸、1-アミノエチリデン-1,1-ジホスホン酸やこれらの塩が挙げられる。これらのうち好ましいものとしてはedta、egta、エチレンジアミンテトラホスホン酸、1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸が挙げら

れる。

【0038】

さらに、上記のアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化処理する際の培地においては、カチオン性アミノ酸の濃度が、通常細胞培養に用いられる最小培地におけるカチオン性アミノ酸濃度より少ない濃度であることが好ましい。具体的には、該濃度は1.0 mM以下であることが好ましく、2 μ M以下がより好ましく、さらに好ましくは0.5 μ M以下であり、実質的に0であることが最も好ましい。カチオン性アミノ酸成分とは、L-Lysin (Lys)、L-Arginine (Arg)、L-Histidine (His)、L-Cystine (Cys) 及びこれらの塩をいう。

【0039】

アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理は、上記のいずれかの可溶化処理用培地に一回又は複数回浸漬することにより実施すればよい。複数回の場合は用いる可溶化処理用培地は同一でも異なってもよい。

【0040】

キレート剤を用いたアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理の際、すなわち培養細胞層が形成された細胞培養担体を可溶化処理用の培地に浸漬する際には、高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層側からキレート剤がしみこむように行うのが好ましい。これによって、高分子含水ゲルおよび高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層と、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層とを容易に分離することができ、培養された細胞層を含む細胞シートを、高分子含水ゲルおよび高分子含水ゲル層の細胞培養面側に対して反対側の面の親水性層から容易に剥離させることができる。アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層の可溶化処理によってアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を完全に除去する必要はなく、可溶化されなかったアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層が残っていてもよいが、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層はできるだけ可溶化して除去するのが好ましい。

【0041】

本発明の別の好ましい態様としては、細胞培養面側最表面が細胞接着性ゲル層である細胞培養担体が挙げられる。「細胞接着性ゲル層」とは、層状の細胞接着性を有するハイドロゲルを意味し、細胞毒性が無く、通常の培養条件で細胞が付着するゲルであれば天然、合成の化合物いずれでもよいが、好ましくは層状の細胞外マトリックス成分ゲルである。細胞外マトリックスは、一般的には「動物組織中の細胞の外側に存在する安定な生体構造物で、細胞が合成し、細胞外に分泌・蓄積した生体高分子の複雑な会合体」と定義されており（生化学辞典（第3版）p.570, 東京化学同人（株））、細胞を物質的に支持する役割や細胞の活性を調節する役割（すなわち細胞外の情報を細胞に伝えその活性に変化を与える役割）等を担っている。「細胞外マトリックス成分」とは、細胞外マトリックスの構成成分を意味し、その具体例としては、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸など）、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、ゼラチン等を例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、コラーゲン、アテロコラーゲン、マトリゲル（IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸よりなるゲル）、ヒアルロン酸、及びゼラチンを例示できる。細胞外マトリックス成分は、常法に従って得ることができる。また、市販の細胞外マトリックス成分を使用してもよい。細胞接着性成分のゲル化は、常法に従って行なうことができる。これらの細胞外マトリックスは単独で用いてもよいし、2種以上を混合して用いてもよく、または2種以上を積層して用いてもよい。例えば、細胞接着性成分がコラーゲンである場合には、0.3~0.5%コラーゲン水溶液を37℃で10~20分間インキュベーションすることにより、コラーゲンゲルを得ることができる。細胞外マトリックス成分のゲル化の際には、必要に応じてゲル化剤を使用してもよい。

【0042】

本発明における細胞接着性ゲル層の厚さは0.005 μ m以上5.0 μ m以下であり、0.005 μ m

10

20

30

40

50

以上 $1.0\mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $0.005\mu\text{m}$ 以上 $0.5\mu\text{m}$ 以下がさらに好ましい。本発明の細胞接着性ゲル層が厚いと乾燥時に層に亀裂が発生するばかりか、細胞の転写が著しく困難になる。

【0043】

本発明の細胞培養担体の細胞接着性ゲル層をさらに細胞接着因子で表面修飾してもよい。細胞接着因子としては、特に限定はなく一般的に知られているものが使用でき、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどがある。

【0044】

アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層上に細胞接着性ゲル層を形成させる際には、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層と細胞接着性成分ゲル層とを別々に作製した後、両者を重ねてもよいが、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層上に細胞接着性成分含有水溶液を添加した後、該水溶液をゲル化させるのが好ましい。細胞接着性ゲル層は脱着を行なうのに十分な物理的強度を有していないため、細胞接着性ゲル層を形成させた容器（例えばディッシュ、シャーレ等）から細胞接着性ゲル層を剥離するのは困難だからである。また、極薄層の細胞接着性ゲル層は、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を再簿接着性成分の溶液に浸漬すること（浸漬法）や塗布すること（塗布法）、又はキャストすること（キャスト法）で簡便に得ることができるが、本発明の細胞培養担体の作成ではこれらのいずれの方法を用いてもよい。このうちキャスト法が好ましく用いられる。例えば、アルギン酸ゲル上にコラーゲンゲル層を形成する場合には、市販の $0.3\sim 0.5\%$ コラーゲン水溶液を必要により適当な濃度に希釈し、上記の方法で作成したアルギン酸カルシウムゲル上にこの溶液をキャストし、乾燥させることで、アルギン酸ゲル上にコラーゲンゲル層が形成したものが得られる。

【0045】

本発明の細胞培養担体上に形成された培養細胞層は、上述のようにアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化処理することにより細胞シートとして剥離させることができる。本発明の細胞培養担体としては、その際の操作性を向上させるために、細胞接着性ゲル層と反対側の親水性層の面に、物理的な補強治具を設けてもよい。物理的な補強治具の材質は、細胞に影響を与えない材質であれば特に限定はないが、金属類（たとえば鉄、ステンレス、チタン、金など）、プラスチック類（たとえばポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリルなど）、陶器などの無機材料類などであり、ステンレス、チタン、プラスチック類が好ましい。

【0046】

物理的な補強治具は、本発明の細胞培養担体の取り扱い性を向上させることができればいかなる形状をしていてもよいが、板状であることが好ましく、厚さは $0.1\mu\text{m}$ 以上 10mm 以下であり、好ましくは $1\mu\text{m}$ 以上 1mm 以下であり、さらに好ましくは $10\mu\text{m}$ 以上 $200\mu\text{m}$ 以下である。

【0047】

物理的な補強治具は、細胞観察用に本発明の細胞培養担体が見える部分があればその形状は特に限定はないが、円、多角形（三角形、四角形、六角形など）、又はその組み合わせ（扇型など）等が例として挙げられる。そのなかで、円に近い形状であることが好ましい。また、細胞観察用に本発明の細胞培養担体が見える部分は1個でも複数でもよい。また補強治具を接着した面の判別を容易にするために、非対称な形状であることが好ましい。

【0048】

物理的な補強治具は、細胞培養に影響を及ぼさない限りいかなる方法で高分子ゲル膜に接着させてもよい。たとえば、高分子ゲル膜を作製した後市販の接着剤（たとえばアロニアルファ、ボンドなど）を使用して接着させる方法や高分子ゲル膜を作成する際に補強治具を未乾燥状態の高分子ゲル膜におくことで接着させてもよい。

【0049】

物理的な補強治具は、その材質にもよるが、補助治具の縁が鋭利である場合がある。こ

の場合、補助治具の鋭い縁によって細胞培養担体が破けるばかりでなく、取り扱う作業者にも危険を及ぼす懸念がある。したがって、鋭い縁をなくすことが好ましい。鋭い縁をなくす方法として、細胞培養に支障がない限りいかなる方法を用いてもよいが、物理的な研磨（たとえば、やすりなどで磨くなど）や化学処理（たとえば、ケミカルエッチングなど）する方法が挙げられる。本発明において、物理的な補強治具はステンレス製の場合、ケミカルエッチングなどの化学処理を行うことが好ましい。

【0050】

本発明の細胞培養担体上に形成された培養細胞層を細胞シートとして剥離させる際の操作性を向上させるために、細胞培養面側最表面に細胞接着性ゲル層を有する細胞培養担体においては、該細胞培養面側最表面の一部に該細胞接着性ゲル層未修飾部分、すなわち該細胞接着性ゲル層が形成されていない部分を設けてもよい。細胞接着性ゲル層未修飾部分は、高分子含水ゲル層又はアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層となる。細胞接着性ゲル層未修飾部分を設けることによって、高分子含水ゲル層と細胞接着性ゲル層を剥離する際の取り扱い性を向上させることができる。すなわち、細胞接着性ゲル層未修飾部分の高分子含水ゲル層をピンセットなどでつかむことにより細胞接着性ゲル層に触れないで高分子含水ゲル層を取り除くことができるため、細胞に悪影響が少ない。細胞接着性ゲル層未修飾部分は、本発明の細胞培養担体における高分子含水ゲル層の隅の部分であることが好ましい。

10

【0051】

細胞接着性ゲル層未修飾部分を設ける方法としては細胞培養に支障がない限りいかなる方法を用いてもよいが、例えば一般的に良く知られているマスキング法が挙げられる。すなわち、高分子含水ゲル層上で細胞接着性ゲル層未修飾とする部分をあらかじめ別材料で覆い、該高分子含水ゲル層を細胞接着性ゲル成分で修飾した後、覆っていた別材料を除去することによって、細胞接着性ゲル層未修飾部分を設ける方法である。

20

【0052】

細胞接着性ゲル層未修飾部分を設けるために覆う別材料の材質は、細胞培養に支障がない限りいかなる材質のものを用いてもよく、例えばシリコンゴム、市販のマスキングテープやセロテープ（登録商標）、プラスチック類（例えばポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリルなど）、金属類（例えば鉄、ステンレス、チタン、金など）などが挙げられるが、シリコンゴム、市販のマスキングテープが好ましい。

30

【0053】

細胞接着性ゲル層未修飾部分の形状は、細胞培養に支障がない限り特に限定はないが、円もしくは多角形（三角形、四角形、六角形）又はこれらの組み合わせ（扇型など）であることが好ましく、三角形、扇形であることが好ましい。細胞接着性ゲル層未修飾部分の大きさは、細胞培養に支障がない限り特に限定はないが、円相当で直径0.1 mm以上10 mm以下、好ましくは1 mm以上5 mm以下である。

【0054】

本発明の細胞培養担体を用いて、培養し得る細胞の具体例としては、繊維芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、肝細胞、小腸上皮細胞、表皮角化細胞、骨芽細胞、骨髓間葉細胞等を例示でき、好ましいものとしては繊維芽細胞を例示できる。細胞の培養の際には、通常、細胞濃度1～1.5万cells/mlの培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を細胞接着性ゲル層上に添加する。細胞の培養条件は、培養する細胞に従って適宜選択し得る。細胞接着性ゲル層上で細胞を培養する場合には、通常、細胞接着性ゲル層上にコンフルエントな単層の細胞層が形成されるまで行なう。

40

【0055】

本発明の細胞培養担体を用いた細胞の培養は具体的には次のようにして行なうことができる。細胞培養担体をシャーレ等の内部に設置し、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加して5分浸漬後培地交換することを3回繰り返したのち12～24時間放置し、培養液を細胞培養担体中に浸潤させる。シャー

50

レ内の培養液を捨て、細胞培養担体の細胞接着性ゲル層上に細胞を播き、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加する。37で1～2時間放置し、細胞接着性ゲル層に保持（接着）させた後、37で培養を続ける。培養の際には、必要に応じて培養液を交換してもよい。通常は培養0.5～2日ごとに培養液を交換する。

【0056】

本発明の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物は、本発明の細胞培養担体と該細胞培養担体に保持された細胞層とを含む。「細胞培養担体に保持された細胞層」は、好ましくは細胞接着性ゲル層上に形成された細胞層である。

【0057】

アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化処理して得られる細胞シートは、細胞層を含んでいるので、細胞層の重層化及び転写に使用できる。細胞層の重層化の際には、本発明の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物を細胞培養面が向き合うように予め培養した細胞上に荷重をかけた状態又はかけない状態で重ね、さらに培養した後、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化してもよいし、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化して得られる細胞シート同士を重層化してもよいし、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化して得られる細胞シートを別に作製した細胞層に重層化してもよい。また、上記の方法などにより重層化した細胞層を含む細胞シート又は細胞培養物を、さらに別に作製した細胞層に重層化してもよい。別に作製した細胞層としては、本発明の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物の細胞層でもよく、他の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物の細胞層でもよく、また細胞シートでもよい。重層化する細胞層の細胞の種類は、同一であっても異なっているてもよい。重層化する細胞層の数は特に限定されないが、通常1～10、好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3である。

【0058】

細胞層の転写の際には、別の細胞培養用基材上に本発明の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物を細胞培養面が別の細胞培養用基材側になるように荷重をかけた状態又はかけない状態で載せ、さらに培養した後、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化してもよいし、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化して得られる細胞シートを他の媒体に転写してもよい。また、転写される細胞培養物は重層化細胞培養物であってもよい。

【0059】

好ましい重層化ならびに転写方法としては、本発明の細胞培養担体を用いて培養された細胞培養物を予め培養した細胞上もしくは別の細胞培養基材上で培養したのちアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を可溶化する方法が挙げられる。

【0060】

荷重をかけた状態の細胞の培養法とは、細胞が転写される細胞もしくは基材にムラが生じない程度に充分荷重がかけられていればいかなる方法でもよい。ここで、荷重をかける際に細胞が密閉されると窒息をすることから、転写する側もしくは受ける側の少なくとも一方の細胞培養基材が水透過性のゲルや親水性高分子ゲルもしくはこれらの組み合わせでできていることが好ましい。また、ムラ無く転写するには細胞面を十分に覆う状態で荷重をかける必要があるが、均一に接触することで酸素の拡散を妨害することとなるため、不織布（ナイロン、ポリエステル、ステンレスなど）等を介して酸素の拡散を妨げないで荷重することが好ましい。

【0061】

荷重をかけた細胞の培養法の荷重は 0.1 g/cm^2 以上 50 g/cm^2 以下であることが好ましく、 0.5 g/cm^2 以上 10 g/cm^2 以下であることがさらに好ましい。荷重をかけた細胞の培養の時間は充分な細胞の転写が実現できれば制限はないが4時間以上72時間以下が好ましく、6時間以上48時間以下がさらに好ましい。本発明においては、荷重をかけない状態で培養することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0062】

本発明の細胞培養担体を作製する際、密着性を改善する目的で、カルボジイミド類を含んだ調製液を用いてもよい。カルボジイミド類及びN-ヒドロキシコハクイミドはいかなる層の調製液に添加してもよいが、アニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層調製液もしくは予め高分子含水ゲルに含浸させておくこと、あるいはアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層塗布後に塩化カルシウムと共溶解した液に浸漬することが好ましい。該カルボジイミド類は水溶性のものが好ましく、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩などが挙げられる。該カルボジイミドを用いる場合その濃度としては0.01 mg/l以上200 g/l以下が好ましい。このときN-ヒドロキシコハクイミドを触媒として使用してもよく、濃度としては該カルボジイミドに対して1質量%以上50質量%以下が好ましい。本発明においては、特に必要がない限りカルボジイミドは用いないことが好ましい。

【0063】

本発明の細胞培養担体は、いかなる方法で滅菌されてもよいが、電子線、 γ 線、X線、紫外線などの放射線による滅菌が好ましく用いられ、電子線、 γ 線、紫外線がさらに好ましく用いられ、電子線滅菌が特に好ましい。本発明の電子線滅菌の照射線量としては0.1 kGy以上65 kGy以下が好ましく、1 kGy以上40 kGy以下が特に好ましい。EOG滅菌などの化学滅菌、高圧蒸気ガス滅菌などの高熱をかける滅菌は細胞接着性層やアニオン性多糖類及び多価金属イオンを含むゲル層を分解するため好ましくない。このように滅菌した細胞培養担体は無菌条件下であれば長期間に渡って室温保管が可能である。本発明の滅菌法は単独もしくは複数種の組み合わせで実施されてもよく、同一種の滅菌法を繰り返し使用してもよい。

【0064】

重層化する細胞層として、例えば、血管内皮細胞層、肝細胞層を使用すれば、肝臓の3次元組織構造物を構築できる。この3次元組織構造物は、*in vitro*における薬物の透過性試験へ適用できるとともに、動物実験代替モデルや移植用臓器へ応用できる。重層化した細胞層は、細胞層を構成する細胞の種類に応じた培養条件で培養することができる。培養の際には、例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地等の培地を使用できる。

【0065】

以下の実施例により本発明を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】

【0066】

〔実施例1〕細胞培養担体Aの作製

イナートゼラチン（新田ゼラチン製）20 gを1500 gの蒸留水に徐々に添加したのち40で2時間攪拌して溶解した。4%のN,N-エチレンビス（ビニルスルホンアセトアミド）水溶液 15 mlを添加した後すぐにポリエチレンテレフタレートフィルム（縦20 cm、横18 cm、フィルム厚195 μ m）上にアプリケータで乾燥膜厚1.5 μ mとなるように塗布し、30にて一晩乾燥させた。

【0067】

このゼラチン膜上に、ダイキトサン100D（大日精化工業株式会社製）6 gを1質量%の酢酸水溶液500 gに徐々に添加して室温で7時間攪拌して溶解し、富士写真フィルム製ミクロフィルターFG-30でろ過したこの水溶液をアプリケータで乾燥膜厚4 μ mとなるように塗布し、37にて一晩乾燥させた。

【0068】

乾燥させた膜を、1.9質量%の水酸化ナトリウムのメタノール溶液に30分間浸漬し、引き続きPBS（Dulbecco's Phosphate buffered Saline）溶液に30分間浸漬した。その後、蒸留水に30分浸漬して架橋ゼラチン/キトサンゲル膜を得た。得られた膜を室温で1晩乾燥後、ビニール袋に入れ保存した。

【 0 0 6 9 】

この架橋ゼラチン / キトサン膜上に、さらに、2 質量 % のキミカアルギン B-1 水溶液 (株式会社キミカ製) をウェット塗布膜厚 300 μm となるように塗布した。この塗布物を 0.3 M の塩化カルシウムを含む 25 % メタノール水溶液に 30 分浸漬したのち、流水で 30 分洗浄して架橋ゼラチン / キトサン / アルギン酸カルシウム積層ゲル膜を得た。

【 0 0 7 0 】

上記で得られた乾燥させていない架橋ゼラチン / キトサン / アルギン酸カルシウム積層ゲル膜上にシリコンゴムとアルミ金属製 (内径縦 12 cm、横 7 cm、厚み 5 mm) の枠を置いた。Cellmatrix I-P (新田ゼラチン社製) 8 ml に 10 倍濃縮された Ham's F-12 培地 1 ml を添加して氷冷下で 3 分間スターラー混合した混合物に、氷冷下で緩衝液 (NaHCO_3 の 2.2 g 又は 4.7 g を 0.05 N NaOH 水溶液 100 ml に溶解したもの) を 1 ml 添加して泡立っていないように混合した溶液を、上記枠内に 6.5 ml キャストした。これを 37 °C で 3 時間ゲル化させたのち蒸留水で洗浄後乾燥させて架橋ゼラチン / キトサン / アルギン酸カルシウム積層 / コラーゲン層修飾膜を得た。

【 0 0 7 1 】

上記で得た架橋ゼラチン / キトサン / アルギン酸カルシウム積層 / コラーゲン層修飾膜上にフィブロネクチン (伊藤ハム製ウシ血漿由来) を 1 mg / 1 ml となるように溶解し、この水溶液をフィブロネクチンの固形分濃度が 10 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ となるようにキャストし、室温にて乾燥した。出来上がった細胞培養担体をビニール袋に入れ、室温にて保存した。このようにして、細胞培養担体 A を作成した。

【 0 0 7 2 】

架橋ゼラチンの変わりに、架橋ポリアクリルアミド、架橋デキストランを用いても同様の細胞培養担体が作成できた。

【 0 0 7 3 】

また、比較サンプルとして、架橋ゼラチン層を有しないで作成、架橋ゼラチンの変わりにポリメチルメタクリレートを溶剤を用いて塗布作製した以外はサンプル A と同様に作製したサンプルをそれぞれ B、C として準備した。

【 0 0 7 4 】

〔 実施例 2 〕 細胞培養担体の評価

実施例 1 で得られた細胞培養担体の取り扱い性を以下の方法を用いて評価した。

(1) カールの評価

細胞培養担体を幅 2 cm、長さ 5 cm の短冊状に裁断し、25 ~ 50 % にて平面上に 1 時間放置した後のサンプルの状態を下記基準で評価した。

【 0 0 7 5 】

- ・・・・短冊がカールしないで平面である。
 - ・・・短冊に若干カールが見られ、平面上から 3 mm 浮き上がる部分がある。
 - ・・・・短冊に若干カールが見られ、平面上から 3 mm 以上浮き上がる部分がある。
 - ×・・・短冊のカールが激しく、平面上から浮き上がる部分が 5 mm 以上である。
- および ○ を許容範囲とした。

【 0 0 7 6 】

(2) サンプルの親疎水性の評価

細胞培養担体を幅 2 cm、長さ 10 cm の短冊状に裁断し、25 ~ 50 % にて 1 時間放置した後の細胞接着性表面と反対側表面の接触角を測定し、下記基準で評価した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 7 7 】

- ・・・・接触角が 30 ~ 60 度である。
 - ・・・接触角が 60 ~ 70 度である。
 - ・・・・接触角が 70 ~ 90 度である。
 - ×・・・接触角が 90 度以上である。
- および ○ を許容範囲とした。

【 0 0 7 8 】

【 表 1 】

表 1

サンプル	細胞培養表面と反対側の層	カール	親疎水性	備考
A-1	架橋ゼラチン	◎	◎	本発明
A-2	架橋ポリアクリルアミド	◎	◎	本発明
A-3	架橋デキストラン	◎	◎	本発明
B	なし	△	△	比較例
C	ポリメチルメタクリレート	×	×	比較例

10

【 0 0 7 9 】

〔 実施例 3 〕 細胞培養担体の滅菌

上記で得られた架橋ゼラチン / キトサン / アルギン酸カルシウム積層 / コラーゲン層修飾膜をUV滅菌1、2、3時間、電子線滅菌20、40、60、80、100 kGyの6種類の滅菌を施したところ、いずれも菌が確認されなかった。このとき、滅菌処理を施していないサンプルからは8000個 / m²の菌が確認された。

20

【 0 0 8 0 】

〔 実施例 4 〕 細胞培養担体を用いた細胞の培養

(1) 細胞の培養

実施例 1 で得られた細胞培養担体をコラーゲン層が上向になるように置いたポリスチレン製細胞培養用シャーレ及びポリスチレン製細胞培養用シャーレ (比較例) につき、UV滅菌もしくは電子線滅菌を施し、さらに培地を添加して5分浸漬後培地交換することを3回繰り返した後、培地を細胞培養担体中に浸潤させた。なお、培地としてはEagle最小培地 (10%牛胎児血清) を使用した。

【 0 0 8 1 】

予め培養しておいたBAE (ウシ大動脈血管内皮細胞) 細胞をトリプシン処理で回収し、細胞濃度を35000 cell/mlに調製した。上記のシャーレ内の培地を捨てた後、この細胞液を細胞数7000 cell/cm²となるようにシャーレ内に播種し培地を添加した。これらをCO₂インキュベーターを用いて37℃で3日間培養した。

30

【 0 0 8 2 】

(2) 結果

用いた細胞培養担体のうち、本発明の細胞培養担体を底面に置いたポリスチレン製細胞培養用シャーレは、透明性を有することから細胞培養中の細胞の生育状態が詳細に観察でき、細胞接着性や毒性に問題はなく、ポリスチレン製細胞培養用シャーレのみのサンプルとほぼ同様の状態であった。

40

【 0 0 8 3 】

細胞の種類をHEPG2 (ヒト肝癌由来細胞)、CHL (チャイニーズハムスター肺由来細胞) やCV-1 (アフリカミドリザル腎臓由来細胞) に変更しても同様の結果が得られた。

【 0 0 8 4 】

〔 実施例 5 〕 細胞層の剥離、転写

実施例 1 で得た細胞培養担体を用いて実施例 4 のように培養したサンプルを下記の可溶化処理用培地に37℃で20分間浸漬したのちの細胞培養担体からの細胞接着性層の剥離状況を観察した。次いで、剥離した細胞接着性層シートをポリスチレン製細胞培養用シャーレ上に置き培地を添加したのち、CO₂インキュベーターを用いて37℃で3日間培養し、光学顕微鏡で観察した。。なお、剥離状況及び細胞生存率の評価は下記の基準に従って行った

50

。結果を表 2 に示す。

【 0 0 8 5 】

< 可溶化処理用培地 >

(a)Eagle最小培地

(b)Eagle最小培地に、Eagle最小培地中に存在するカルシウムイオン、マグネシウムイオンの総モル数に対して200モル%の 1 - ヒドロキシエチリデン - 1,1 - ジホスホン酸を添加したもの

【 0 0 8 6 】

< 剥離状況の評価基準 > 、○を許容範囲とした。

：高分子含水ゲル層から細胞接着層が自然と浮くように剥離する。

10

○：細胞接着層をピンセットで引っ張ることで高分子含水ゲル層から容易に剥離できる。

：細胞接着層をピンセットで引っ張ることで高分子含水ゲル層から剥離できるが、剥離しない部分がある。

×：細胞接着層をピンセットで引っ張っても高分子含水ゲルから剥離しない。

【 0 0 8 7 】

< 細胞生存率の評価基準 > 、○を許容範囲とした。

：90%以上の細胞は生きている。

○：70%以上の細胞は生きている。

：40%以上の細胞は生きている。

×：生きている細胞が40%以下である。

20

【 0 0 8 8 】

【表 2】

表 2

サン プル	細胞培養表面と反対側の層	剥離液 (a) (比較例) 剥離性／細胞生存率	剥離液 (b) (本発明) 剥離性／細胞生存率	備考
A-1	架橋ゼラチン	×／◎	◎／◎	本発明
A-2	架橋ポリアクリルアミド	×／◎	◎／◎	本発明
A-3	架橋デキストラン	×／◎	◎／◎	本発明
B	なし	×／○	◎／○	比較例
C	ポリメチルメタクリレート	×／×	○／×	比較例

30

【 0 0 8 9 】

表 2 の結果から分かるように、本発明の細胞培養担体は、良好な剥離性を示し、細胞の生存率も高かった。

40

【 0 0 9 0 】

〔実施例 6〕細胞層の重層培養

UV滅菌を3時間施したポリスチレン製細胞培養用シャーレに実施例 4 と同様に下記の細胞を培養した。

- ・ CHL (チャイニーズハムスター肺由来細胞)
- ・ BRL (Buffalo Rat Liver 3A, ATCC No. : CRL 1442)
- ・ BAE (ウシ大動脈血管内皮細胞)
- ・ ラット初代肝細胞

【 0 0 9 1 】

シャーレ上に培養した上記各 3 種の細胞上に、実施例 5 の剥離液 (b) を用いて実施例 5

50

と同様に細胞の転写を行い、重層化細胞を得た。この重層化細胞を培地中7日間または14日間培養したのち、トリパンブルーで染色して光学顕微鏡で状況を確認したところ、本発明の領域においていずれの重層化細胞も良好に培養されていることがわかった。