



(10) 申请公布号 CN 116848231 A

(43) 申请公布日 2023.10.03

(21) 申请号 202280013493.5

甲斐美穗 荒卷直希

(22) 申请日 2022.02.08

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(30) 优先权数据

11256

2021-018430 2021.02.08 JP

专利代理师 田川婷

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2023.08.04

C12N 5/071 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/004813 2022.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/168984 JA 2022.08.11

(71) 申请人 国立大学法人长崎大学

地址 日本长崎县

申请人 泰尔茂株式会社

(72) 发明人 丸屋安广 山口峻 金高贤悟

江口晋 东美树 大桥文哉

权利要求书1页 说明书18页 附图4页

(54) 发明名称

用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物

(57) 摘要

本发明的目的在于提供用于预防或处置胰痿的手段。通过提供下述片状细胞培养物及下述用于预防或处置胰痿的方法,从而实现上述课题,所述片状细胞培养物是用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物,胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面,并介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合,所述方法包括:利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤;及介由片状细胞培养物使胰脏的切面与小肠肠壁液密地结合的步骤。

1. 片状细胞培养物,其是用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物,胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面,并介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合。

2. 如权利要求1所述的片状细胞培养物,其中,胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

3. 如权利要求2所述的片状细胞培养物,其中,通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,从而胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的片状细胞培养物,其中,胰管为主胰管及/或副胰管。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的片状细胞培养物,其中,小肠为十二指肠或空肠。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的片状细胞培养物,其中,胰脏的切面、小肠肠壁的贯穿孔、及/或片状细胞培养物的贯穿孔通过外科处置而形成。

7. 如权利要求6所述的片状细胞培养物,其中,外科处置为胰头十二指肠切除术。

8. 如权利要求1~7中任一项所述的片状细胞培养物,其用于预防或处置胰痿。

9. 如权利要求1~8中任一项所述的片状细胞培养物,其包含骨骼肌成肌细胞。

10. 如权利要求1~9中任一项所述的片状细胞培养物,其包含含有凝胶及/或聚合物的增强层。

11. 用于预防或处置胰痿的方法,所述方法包括:利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤;及介由片状细胞培养物使胰脏的切面与小肠肠壁液密地结合的步骤。

12. 如权利要求11所述的方法,所述方法还包括下述步骤:介由片状细胞培养物使胰管与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

13. 如权利要求12所述的方法,所述方法还包括下述步骤:通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,从而介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔使胰管及小肠的各内腔连通。

14. 如权利要求11~13中任一项所述的方法,其中,利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤是通过移植设备进行的。

用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物等。

背景技术

[0002] 近年来,为了修复损伤的组织等,进行了移植各种细胞的尝试。例如,为了修复因心绞痛、心肌梗塞等缺血性心脏病而导致损伤的心肌组织,尝试利用了胎儿心肌细胞、骨骼肌成肌细胞、间充质干细胞、心脏干细胞、ES细胞、iPS细胞等(非专利文献1)。

[0003] 作为上述尝试的一环,开发出了利用支架(scaffold)形成的细胞结构物、使细胞形成为片状而得的片状细胞培养物(专利文献1、非专利文献2)。

[0004] 关于片状细胞培养物在治疗中的应用,已开展了下述研究:针对由烧伤等导致的皮肤损伤的培养表皮片的利用、针对角膜损伤的角膜上皮片状细胞培养物的利用、针对食管癌内窥镜切除的口腔黏膜片状细胞培养物的利用等,其一部分已进入临床应用的阶段。

[0005] 作为这样的应用之一,提出了在消化道等器官的损伤的治愈中利用片状细胞培养物的方案。例如专利文献2中记载了,为了治愈或预防因吻合口瘘等发生的自消化道损伤部的漏出,利用包含间充质干细胞的片状细胞培养物。另外,非专利文献3、4中记载了,在胰瘘、胃穿孔的模型动物中,可以在它们的治愈中使用骨骼肌成肌细胞片。

[0006] 胰瘘是指胰液从胰脏漏出,例如可能因胰腺炎、外伤而发生,另外也可能因胰脏的外科处置后在缝合部位产生贯穿孔而发生。漏出的胰液与消化液、胆汁混合而可能被激活,将漏出部位周边的组织溶解,从而能够引发炎症。另外,也存在下述情况:胰瘘将漏出部位周边的血管溶解,引起出血,由此导致严重的预后。

[0007] 专利文献3中记载了,源自经甘露糖处理的脂肪组织的间充质干细胞片在大鼠胰瘘模型中发挥出优异的治疗效果。具体而言,记载了在切出切口的大鼠胰脏的胰切断端贴附前述间充质干细胞片,结果作为胰瘘指标的腹水的淀粉酶值下降,另外,关于腹水的脂肪酶值,也显示出同样的倾向。

[0008] 另一方面,近年来,也进行了下述尝试:将促进生物体组织的愈合的片状主体部夹在胰实质的切面周边与空肠的肠壁之间,将胰实质的切面周边与空肠的肠壁接合(专利文献4)。另外,还进行了下述尝试:将生物降解性片配置于空肠与胰实质之间,将空肠与胰实质缝合,由此促进空肠、胰实质、胰管之间的愈合(专利文献5)。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特表2007-528755号公报

[0012] 专利文献2:国际公开第2017/130802号

[0013] 专利文献3:日本专利第6332800号公报

[0014] 专利文献4:日本特开2019-162405号公报

[0015] 专利文献5:国际公开第2019/156230号

[0016] 非专利文献

- [0017] 非专利文献1:Haraguchi Y.等人,Stem Cells Transl.Med.,1(2),136-141(2012)
- [0018] 非专利文献2:Sawa Y.等人,Surg.Today,42(2),181-184(2012)
- [0019] 非专利文献3:Tanaka T.等人,J.Gastroenterol.,48(9),1081-1089(2013)
- [0020] 非专利文献4:Tanaka S.等人,Surg.Today.,47(1),114-121(2017)

发明内容

[0021] 发明所要解决的课题

[0022] 本发明的目的在于提供用于预防或处置胰瘘的手段。

[0023] 用于解决课题的手段

[0024] 本申请的发明人在对用于预防或处置胰瘘的方法进行研究的过程中,认为在胰脏的外科处置后在缝合部位中产生贯穿孔等,缝合部位的液密性变差,由此胰液会从缝合部位漏出。并且,为了维持该缝合部位的液密性而进行了深入研究,结果发现,通过利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖,介由片状细胞培养物使胰脏的切面与小肠肠壁液密地结合,从而能够在胰脏的外科处置后维持缝合部位的液密性,基于该见解进一步继续研究,结果完成了本发明。

[0025] 即本发明涉及以下的内容。

[0026] [1]片状细胞培养物,其是用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物,胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面,并介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合。

[0027] [2]如[1]的片状细胞培养物,其中,胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

[0028] [3]如[2]的片状细胞培养物,其中,通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,从而胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通。

[0029] [4]如[1]~[3]的片状细胞培养物,其中,胰管为主胰管及/或副胰管。

[0030] [5]如[1]~[4]的片状细胞培养物,其中,小肠为十二指肠或空肠。

[0031] [6]如[1]~[5]的片状细胞培养物,其中,胰脏的切面、小肠肠壁的贯穿孔、及/或片状细胞培养物的贯穿孔通过外科处置而形成。

[0032] [7]如[6]的片状细胞培养物,其中,外科处置为胰头十二指肠切除术。

[0033] [8]如[1]~[7]的片状细胞培养物,其用于预防或处置胰瘘。

[0034] [9]如[1]~[8]的片状细胞培养物,其包含骨骼肌成肌细胞。

[0035] [10]如[1]~[9]的片状细胞培养物,其包含含有凝胶及/或聚合物的增强层。

[0036] [11]用于预防或处置胰瘘的方法,其包括:利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤;及介由片状细胞培养物使胰脏的切面与小肠肠壁液密地结合的步骤。

[0037] [12]如[11]的方法,其还包括下述步骤:介由片状细胞培养物使胰管与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

[0038] [13]如[12]的方法,其还包括下述步骤:通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,从而介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔使胰管及小肠

的各内腔连通。

[0039] [14]如[11]~[13]的方法,其中,利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤是通过移植设备进行的。

[0040] 发明效果

[0041] 根据本发明,能够在胰脏的外科处置后维持缝合部位的液密性,能够预防或处置胰瘘。特别地,根据本发明,能够在胰头十二指肠切除术的处置后维持缝合部位的液密性,能够预防或处置胰瘘。此外,根据本发明,不仅能够预防或处置胰瘘,而且由于腹腔内的缝合部位以外的部位处不发生粘连,也不发生炎症,因此能够改善胰脏的外科处置的预后。并且,根据本发明,通过利用片状细胞培养物,也能够在胰脏的外科处置后促进缝合部位的生物体组织的愈合。

附图说明

[0042] [图1]图1示出制备的片状细胞培养物。

[0043] [图2]图2示出对照组的胰头十二指肠切除术的施术部位。

[0044] [图3]图3示出片处置组的胰头十二指肠切除术的施术部位。将胰头部和十二指肠乳头部肛门侧一并切除,对十二指肠残端进行端-端吻合,将片状细胞培养物移植于胰头切除面后(由图3的A的虚线包围的区域),将远侧的十二指肠与胰实质进行吻合(图3的B)。

[0045] [图4]图4的A示出对照组的、自胰头十二指肠切除术起3天后摘取的十二指肠与胰实质的吻合部位的HE染色图像(x200)。箭头表示出血及浓缩的蛋白质。图4的B及C示出片处置组的、自片状细胞培养物的移植起3天后摘取的片状细胞培养物的移植部位的HE染色图像(x200)。虚线所夹的区域表示片状细胞培养物。图4的D表示片处置组的、自片状细胞培养物的移植起3天后摘取的片状细胞培养物的移植部位的抗结蛋白(DESMIN)抗体免疫染色图像(x200)。虚线所夹的区域表示片状细胞培养物。

[0046] [图5]图5示出自胰头十二指肠切除术3天后的(腹水的淀粉酶值)/(血清的淀粉酶值)(图5的A)及(腹水的脂肪酶值)/(血清的脂肪酶值)(图5的B)。各图表示对照组(n=9)及片处置组(n=5)的箱形图,上端的条表示最大值,箱的上端、内部及下端的线分别表示第三四分位数、第二四分位数(中位数)及第一四分位数,下端的条表示最小值,图中的值表示两组间的p值(Mann-Whitney的U检验)。

[0047] 本说明书中,除非另行定义,本说明书中使用的全部技术术语及科学术语均具有与本领域技术人员通常所理解的意思相同的含义。本说明书中提及的所有专利、申请及其他出版物、信息均通过引用全部援引至本说明书中。

具体实施方式

[0048] [用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物]

[0049] 本发明的一个方面涉及片状细胞培养物(有时记为“本发明的片状细胞培养物”),其是用于覆盖胰脏的切面的片状细胞培养物,胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面,并介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合。

[0050] 一个方式中,胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

[0051] 一个方式中,通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,

从而胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通。

[0052] 一个方式中,胰管为主胰管及/或副胰管。一个方式中,小肠为十二指肠或空肠。

[0053] 一个方式中,胰脏的切面、小肠肠壁的贯穿孔、及/或片状细胞培养物的贯穿孔通过外科处置而形成。

[0054] 一个方式中,外科处置为胰头十二指肠切除术。

[0055] 一个方式中,本发明的片状细胞培养物用于预防或处置胰瘘。

[0056] 一个方式中,本发明的片状细胞培养物包含骨骼肌成肌细胞。

[0057] 一个方式中,本发明的片状细胞培养物包含含有凝胶及/或聚合物的增强层。

[0058] 胰脏是分泌胰液、并将胰液送入十二指肠的外分泌腺。胰脏的十二指肠侧的部位被称为胰头部,脾脏侧的部位被称为胰尾部,胰头部与胰尾部之间的部位被称为胰体部。胰脏在其内部具有将胰液运送至十二指肠的胰管。多个分支状的细胰管从胰尾部到胰头部汇合而成为主胰管(及副胰管),与十二指肠连接。人的情况下,主胰管在与十二指肠连接之前,与从胆囊运送胆汁的胆总管汇合。胰管与十二指肠肠壁连接,向十二指肠的内腔排出胰液。胰管的开口部朝向十二指肠的内腔隆起,被称为十二指肠乳头。

[0059] 本发明中,胰脏可以为任意生物的胰脏,没有限定,例如为人、非人灵长类、啮齿目(小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔、犬、猫、猪、马、牛、山羊、绵羊等哺乳动物的胰脏。

[0060] 另外,胰脏也可以称为在其内部具有胰管、主胰管、副胰管等管腔的器官。消化液等生物体液在上述管腔内流通。根据本发明,胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合,另外,胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合,由此能够在胰脏的外科处置后维持所述管腔的缝合部位的液密性。由此,能够预防或处置在上述管腔内流通的消化液等生物体液从缝合部位向胰脏、小肠的外部漏出。特别地,根据本发明,能够在胰头十二指肠切除术的处置后维持上述管腔的缝合部位的液密性。由此,能够预防或处置在上述管腔内流通的消化液等生物体液从缝合部位向胰脏、小肠的外部漏出。

[0061] 本发明中,所谓“胰脏的切面”,是指在任意部位在胰脏中切出切口、及/或在任意部位将胰脏切断,由此产生的截面及/或片段的截面。胰脏的切面例如为在胰头部与胰体部之间将胰脏切断,由此产生的片段的截面。一个方式中,胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面,此处,胰管的切面例如为主胰管及/或副胰管的切面。

[0062] 本发明中,“覆盖胰脏的切面”是指利用片状细胞培养物覆盖胰脏的整个切面。片状细胞培养物的大小与胰脏的切面相同、或者为超过其的大小,可以恰好覆盖胰脏的整个切面、或者将胰脏的整个切面覆盖且具有多余的边缘部。该边缘部也可以进一步将胰脏的切面的周边覆盖。

[0063] 本发明中,片状细胞培养物可以具有贯穿孔,所谓“覆盖胰脏的切面”,包括利用在任意位置具有贯穿孔的片状细胞培养物覆盖胰脏的整个切面这一情况。此时,片状细胞培养物以其贯穿孔与胰管的切面的内腔部分的位置相匹配的方式配置。

[0064] 本发明中,“片状细胞培养物”是指细胞相互连接成为片状的培养物。细胞彼此可以直接(包括经由粘附分子等细胞要素的方式)及/或经由中间物而相互连接。作为中间物,只要是至少能够将细胞彼此物理性(机械性)地连接的物质即可,没有特别限定,例如,可举出胞外基质等。中间物优选为源自细胞的物质,特别优选为来源于构成细胞培养物的细胞的物质。细胞至少被物理性(机械地)地连接,也可以进一步被功能性地连接,例如化学性连

接、电连接。片状细胞培养物可以由1个细胞层构成的培养物(单层),也可以是由2个以上的细胞层构成的培养物(层叠(多层)体,例如2层、3层、4层、5层、6层等)。另外,片状细胞培养物可以具有:细胞不呈现明确的层结构而厚度超出单个细胞厚度的三维结构。例如,在片状细胞培养物的垂直截面中,细胞也可以不在水平方向上均匀地排列而以不均匀(例如镶嵌状)地配置的状态存在。

[0065] 片状细胞培养物优选不包含支架(支承体)。在该技术领域,支架有时被用于使细胞贴附在其表面上及/或其内部以维持片状细胞培养物的物理一体性,例如,已知有聚偏氟乙烯(PVDF)制的膜等,但本发明的片状细胞培养物即使没有上述支架也能够维持其物理一体性。另外,本发明的片状细胞培养物优选仅由源自构成片状细胞培养物的细胞的物质形成,不含除这些物质以外的物质。

[0066] 构成片状细胞培养物的细胞只要是能够形成片状细胞培养物的细胞即可,没有特别限定,例如,包括贴壁细胞(贴附性细胞)。贴壁细胞包含例如贴壁性的体细胞(例如,心肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞、胰细胞、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、滑膜细胞、软骨细胞等)及干细胞(例如,成肌细胞、心脏干细胞等组织干细胞、胚胎干细胞、iPS(induced pluripotent stem,诱导性多能干)细胞等多能性干细胞、间充质干细胞等)等。体细胞可以是由干细胞、尤其是iPS细胞分化而来的细胞(源自iPS细胞的贴壁细胞)。作为构成片状细胞培养物的细胞的非限定例,例如,可举出成肌细胞(例如,骨骼肌成肌细胞等)、间充质干细胞(例如,源于骨髓、脂肪组织、外周血、皮肤、发根、肌肉组织、子宫内膜、胎盘、脐带血的细胞等)、心肌细胞、成纤维细胞、心脏干细胞、胚胎干细胞、iPS细胞、滑膜细胞、软骨细胞、上皮细胞(例如,口腔黏膜上皮细胞、视网膜色素上皮细胞、鼻黏膜上皮细胞等)、内皮细胞(例如,血管内皮细胞等)、肝细胞(例如,肝实质细胞等)、胰细胞(例如,胰岛细胞等)、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞等。作为源自iPS细胞的贴壁细胞的非限定例,可举出源自iPS细胞的心肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞、胰细胞、肾细胞、肾上腺细胞、牙周韧带细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、滑膜细胞、软骨细胞等。

[0067] 本发明中,“骨骼肌成肌细胞”是指存在于骨骼肌中的成肌细胞。骨骼肌成肌细胞在本技术领域是熟知的,可以由骨骼肌利用任意的已知方法(例如,日本特开2007-89442号公报中记载的方法等)来制备,也可以商业获得(例如Lonza、Cat#CC-2580)。骨骼肌成肌细胞并无限定,例如可以通过CD56、 α 7整联蛋白、肌球蛋白重链IIa、肌球蛋白重链IIb、肌球蛋白重链IIc(IIx)、MyoD、Myf5、Myf6、肌细胞生成素(Myogenin)、结蛋白、PAX3等标志物进行鉴定。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性。此外在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是CD56阳性及结蛋白阳性。骨骼肌成肌细胞可以来源于具有骨骼肌的任意生物而并无限定,可以源于例如人、非人灵长类、啮齿目动物(小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔、犬、猫、猪、马、牛、山羊、绵羊等哺乳动物。在一个方式中,骨骼肌成肌细胞是哺乳动物的骨骼肌成肌细胞。在特定方式中,骨骼肌成肌细胞是人骨骼肌成肌细胞。另外,骨骼肌成肌细胞可以从任意的骨骼肌采集。在一个方式中,本发明的骨骼肌成肌细胞是源自大腿部、颈部、腹部的骨骼肌成肌细胞。

[0068] 构成片状细胞培养物的细胞可以来源于能够利用片状细胞培养物进行治疗的任意生物。所述生物不受限定,例如,包括人、非人灵长类、犬、猫、猪、马、山羊、绵羊、啮齿目动

物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔等。另外,构成片状细胞培养物的细胞的种类数并无特别限定,可以仅由1种细胞构成,也可以使用两种以上的细胞。在形成片状细胞培养物的细胞为2种以上的情况下,最多的细胞的含有比率(纯度)在片状细胞培养物的形成完成时为50%以上,优选为60%以上,更优选为70%以上,进一步优选为75%以上。

[0069] 细胞可以是源自异种的细胞,也可以是源自同种的细胞。此处,所谓“源自异种的细胞”,在片状细胞培养物被用于移植的情况下,是指来源于与其受体为不同的种的生物的细胞。例如,受体为人时,来源于猴、猪的细胞等属于源自异种的细胞。另外,“源自同种的细胞”是指来源于与受体为相同的种的生物的细胞。例如,受体为人时,人细胞属于源自同种的细胞。源自同种的细胞包括自源细胞(也称为自身细胞或自体细胞,即来源于受体的细胞)和同种非自源细胞(也称为异体细胞)。自源细胞由于进行移植也不发生排斥反应,因此在本发明中是优选的。但是,也可以利用源自异种的细胞、同种非自源细胞。利用源自异种的细胞、同种非自源细胞时,为了抑制排斥反应,有时需要进行免疫抑制处理。需要说明的是,本说明书中也有时将自源细胞以外的细胞、即源自异种的细胞和同种非自源细胞记载为非自源细胞。在本发明的一个方式中,细胞为自体细胞或异体细胞。在本发明的一个方式中,细胞为自体细胞。在本发明的另一方式中,细胞为异体细胞。

[0070] 片状细胞培养物可以用已知的任意方法(例如参见专利文献1、日本特开2010-081829号公报、日本特开2011-110368号公报等)来制造。典型而言,片状细胞培养物的制造方法包括:将细胞接种于培养基材上的步骤、将已接种的细胞进行片化的步骤、将所形成的片状细胞培养物从培养基材剥离的步骤,但并不限于此。可以在将细胞接种于培养基材上的步骤之前进行将细胞冷冻的步骤及将细胞解冻的步骤。进一步地,也可以在将细胞解冻的步骤之后进行洗涤细胞的步骤。上述各步骤可以用适合制造片状细胞培养物的已知的任意方法来进行。片状细胞培养物的制造方法可以包括制造片状细胞培养物的步骤,在该情况下,制造片状细胞培养物的步骤可以包括上述片状细胞培养物的制造方法涉及的1个或2个以上的步骤作为子步骤。在某一方式中,不包括在将细胞解冻的步骤之后、将细胞接种于培养基材上的步骤之前使细胞增殖的步骤。

[0071] 对于培养基材而言,只要细胞能在其上形成细胞培养物,则并无特别限制,例如,包括各种材质的容器、容器中的固态或半固态的表面等。容器优选为不允许培养液等液体透过的结构及材料。作为所述材料,并无限定,可举出例如聚乙烯、聚丙烯、Teflon(注册商标)、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸甲酯、尼龙6,6、聚乙烯醇、纤维素、硅、聚苯乙烯、玻璃、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、金属(例如,铁、不锈钢、铝、铜、黄铜)等。另外,容器优选具有至少1个平坦的面。作为所述容器的例子,并无限定,可举出例如具备由能够形成细胞培养物的培养基材构成的底面和非透液性的侧面的培养容器。作为所述培养容器的特定例,并无限定,可举出细胞培养皿、细胞培养瓶等。容器的底面可以为透明,也可以为不透明。若容器的底面为透明,则能够从容器的背侧进行细胞的观察、计数等。另外,容器可以在其内部具有固态或半固态的表面。作为固态的表面,可举出上述这样的各种材料的培养板、容器等,作为半固态的表面,可举出凝胶、软质的聚合物基质等。培养基材可以使用上述材料来制作,也可以利用市售的培养基材。作为优选的培养基材,并无限定,可举出例如适于片状细胞培养物的形成的、具有粘附性表面的基材。具体而言,可举出具有亲水性表面的基材,例如在该表面上包被了经电晕放电处理的聚苯乙烯、胶原蛋白凝胶(collagen gel)、

亲水性聚合物等亲水性化合物的基材；另外，还可举出在表面上包被了胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白(laminin)、玻连蛋白(Vitronectin)、蛋白多糖(proteoglycan)、糖胺多糖(glycosaminoglycan)等胞外基质、钙黏着蛋白家族(cadherin family)、选择素家族(seletin family)、整合素家族(integrin family)等细胞粘附因子等基材等。另外，上述基材已有市售(例如，Corning(注册商标)TC处理培养皿(TC-Treated Culture Dish)、Corning等)。培养基材可以整体或部分透明，也可以不透明。

[0072] 培养基材可以在表面被覆有响应刺激(例如，温度、光)而物性发生变化的材料。作为所述材料，并无限定，例如可以使用下述已知材料：由(甲基)丙烯酰胺化合物、N-烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如，N-乙基丙烯酰胺、N-正丙基丙烯酰胺、N-正丙基甲基丙烯酰胺、N-异丙基丙烯酰胺、N-异丙基甲基丙烯酰胺、N-环丙基丙烯酰胺、N-环丙基甲基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基甲基丙烯酰胺、N-四氢糠基丙烯酰胺、N-四氢糠基甲基丙烯酰胺等)、N,N-二烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如，N,N-二甲基(甲基)丙烯酰胺、N,N-乙基甲基丙烯酰胺、N,N-二乙基丙烯酰胺等)、具有环状基团的(甲基)丙烯酰胺衍生物(例如，1-(1-氧代-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-丙烯基)-吗啉、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吗啉等)、或乙烯基醚衍生物(例如，甲基乙烯基醚)的均聚物或共聚物形成的温度响应性材料，具有偶氮苯基的光吸收性高分子、三苯甲烷无色氢氧化物(triphenylmethane leucohydroxide)的乙烯基衍生物与丙烯酰胺系单体的共聚物、及包含螺苯并吡喃的N-异丙基丙烯酰胺凝胶等光响应性材料等(例如，参见日本特开平2-211865号公报、日本特开2003-33177号公报)。通过对这些材料施加规定的刺激，可以使其物性(例如，亲水性、疏水性)变化，从而促进附着在该材料上的细胞培养物的剥离。被覆有温度响应性材料的培养皿已有市售(例如，CellSeed Inc.的UpCell(注册商标))，可以将其用于片状细胞培养物的制造方法中。

[0073] 培养基材可以为各种形状，优选为平坦。另外，其面积没有特别限定，例如，可以为约 1cm^2 ~约 200cm^2 、约 2cm^2 ~约 100cm^2 、约 3cm^2 ~约 50cm^2 等。例如，作为培养基材，可举出直径10cm的圆形的培养皿。该情况下，面积成为 56.7cm^2 。

[0074] 培养基材可以涂覆(被覆或包被)有血清。通过使用涂覆有血清的培养基材，可以形成密度更高的片状细胞培养物。所谓“涂覆有血清”，是指在培养基材的表面附着有血清成分的状态。所述状态并无限定，例如，可以通过用血清对培养基材进行处理而获得。利用血清的处理包括使血清与培养基材接触、及根据需要孵育规定的时间。

[0075] 作为血清，可以使用异种血清及/或同种血清。关于异种血清，在将片状细胞培养物用于移植的情况下，其表示来源于与受体为不同的种的生物的血清。例如，受体为人的情况下，来源于牛、马的血清(例如，胎牛血清(FBS、FCS)、小牛血清(CS)、马血清(HS))等属于异种血清。另外，“同种血清”是指来源于与受体为相同的种的生物的血清。例如，受体为人的情况下，人血清即为同种血清。同种血清包括自身血清(也称为自体血清，即来源于受体的血清)、及来源于受体以外的同种个体的同种异体血清。需要说明的是，在本说明书中，有时也将自身血清以外的血清(即，异种血清和同种异体血清)记载为非自身血清。

[0076] 关于用于涂覆培养基材的血清，可以为市售的血清，或通过常规方法由从所期望的生物采集的血液进行制备。具体而言，例如可举出下述方法，即，将采集的血液于室温放

置约20分钟~约60分钟左右使其凝固,将其在约1000×g~约1200×g左右的条件下离心分离,并采集上清液的方法等。

[0077] 在培养基材上进行孵育时,血清可以使用原液,也可以稀释后使用。稀释可以使用任意介质进行,例如,可以不受限定地使用水、生理盐水、各种缓冲液(例如,PBS、HBSS等)、各种液体培养基(例如,DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等进行。关于稀释浓度,只要血清成分能够附着于培养基材上即可,没有特别限定,例如为约0.5%~约100%(v/v),优选为约1%~约60%(v/v),更优选为约5%~约40%(v/v)。

[0078] 关于孵育时间,也是只要血清成分能够附着于培养基材上即可,没有特别限定,例如,为约1小时~约72小时,优选为约2小时~约48小时,更优选为约2小时~约24小时,进一步优选为约2小时~约12小时。关于孵育温度,也是只要血清成分能够附着于培养基材上即可,没有特别限定,例如,为约0℃~约60℃,优选为约4℃~约45℃,更优选为室温~约40℃。

[0079] 孵育后可以将血清弃置。作为血清的弃置方法,可以采用利用移液器等的抽吸、倾析(decantation)等惯用的液体弃置方法。在本发明的优选方式中,在弃置血清后,可以使用无血清洗涤液洗涤培养基材。作为无血清洗涤液,只要是不含血清、且不对已附着于培养基材的血清成分产生不良影响的液体介质,则并无特别限定,例如,可以不受限制地使用水、生理盐水、各种缓冲液(例如,PBS、HBSS等)、各种液体培养基(例如,DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等进行。作为洗涤方法,可以采用惯用的培养基材洗涤方法,例如可以不受限制地采用在培养基材上添加无血清洗涤液、搅拌规定时间(例如,约5秒钟~约60秒钟)后弃置的方法等。

[0080] 本发明中,也可以用生长因子涂覆培养基材。此处,“生长因子”是指较之其不存在的情况而言能促进细胞的增殖的任意物质,例如,包括上皮细胞生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等。关于利用生长因子的培养基材的涂覆方法、弃置方法及洗涤方法,除了孵育时的稀释浓度例如为约0.0001μg/mL~约1μg/mL、优选为约0.0005μg/mL~约0.05μg/mL、更优选为约0.001μg/mL~约0.01μg/mL之外,基本与血清相同。

[0081] 本发明中,也可以用甾体药物涂覆培养基材。此处,“甾体药物”是指具有甾核的化合物中可能会对生物体造成肾上腺皮质功能障碍、库欣综合征等不良影响的化合物。作为所述化合物,并无限定,例如,包括皮质醇、泼尼松龙、去炎松(triamcinolone)、地塞米松、倍他米松等。对于利用甾体药物的培养基材的涂覆方法、弃置方法及洗涤方法而言,除了孵育时的稀释浓度以外,基本与血清相同,关于前述稀释浓度,对于地塞米松而言,例如为约0.1μg/mL~约100μg/mL,优选为约0.4μg/mL~约40μg/mL,更优选为约1μg/mL~约10μg/mL。

[0082] 培养基材可以用血清、生长因子及甾体药物中的任一种进行涂覆,也可以用这些成分的任意组合(即,血清与生长因子、血清与甾体药物、血清与生长因子与甾体药物、或者生长因子与甾体药物的组合)进行涂覆。在用多种成分进行涂覆的情况下,可以将这些成分混合并同时涂覆,也可以通过各自分开的步骤进行涂覆。

[0083] 对于培养基材,可以在用血清等进行涂覆后立即接种细胞,也可以在涂覆后预先

保存,然后接种细胞。经涂覆的基材可以通过保持于例如约4℃以下、优选约-20℃以下、更优选约-80℃以下来进行长期保存。

[0084] 细胞向培养基材上的接种可以以已知的任意方法及条件进行。关于细胞向培养基材上的接种,例如可以通过将培养液中悬浮有细胞的细胞悬浮液注入培养基材(培养容器)而进行。关于细胞悬浮液的注入,可以使用滴管(spuit)、移液器等适合于细胞悬浮液的注入操作的器具。

[0085] 接种可以以约 7.1×10^5 个/cm²~约 3.0×10^6 个/cm²、约 7.3×10^5 个/cm²~约 2.8×10^6 个/cm²、约 7.5×10^5 个/cm²~约 2.5×10^6 个/cm²、约 7.8×10^5 个/cm²~约 2.3×10^6 个/cm²、约 8.0×10^5 个/cm²~约 2.0×10^6 个/cm²、约 8.5×10^5 个/cm²~约 1.8×10^6 个/cm²、约 9.0×10^5 个/cm²~约 1.6×10^6 个/cm²、约 1.0×10^6 个/cm²~约 1.6×10^6 个/cm²等的密度进行。

[0086] 构成本发明的片状细胞培养物的细胞(有时记为“片形成细胞”)参照上文的详细叙述。本发明的片状细胞培养物无需包含应用组织的细胞,当然也可以包含该组织中不存在的细胞。因此,一个方式中,本发明的片状细胞培养物包含异位细胞、即在应用组织中原本不存在的细胞。一个优选方式中,如上述那样应用本发明的片状细胞培养物的是胰脏及小肠的组织的损伤,作为此时的异位细胞,例如可举出骨骼肌成肌细胞等来源于横纹肌的细胞、间充质干细胞等。一个更优选的方式中,本发明的片状细胞培养物包含骨骼肌成肌细胞。骨骼肌成肌细胞可以来源于大腿、颈部、腹部等的横纹肌。

[0087] 在由横纹肌组织制备骨骼肌成肌细胞的情况下,所制备的细胞群包含成纤维细胞。在制造本发明的片状细胞培养物时,使用由横纹肌组织制备的包含骨骼肌成肌细胞的细胞群的情况下,该细胞群包含一定量的成纤维细胞。成纤维细胞是本技术领域中所熟知的,可以通过TE-7(例如,参照Rosendaal等人,J Cell Sci.1994;107(Pt1):29-37、Goodpaster等人,J Histochem Cytochem.2008;56(4):347-58等)等标志物进行鉴定。

[0088] 一个方式中,形成本发明的片状细胞培养物的细胞包含由横纹肌组织制备的骨骼肌成肌细胞。因此,本发明的片状细胞培养物的制造所使用的细胞群中可包含骨骼肌成肌细胞及成纤维细胞。一个方式中,本发明的片状细胞培养物的制造所使用的细胞群的CD56阳性率可以为50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上,优选为60%以上。

[0089] 本发明的片状细胞培养物的制造中使用的细胞群可包含成纤维细胞,但成纤维细胞的含有率过高时,骨骼肌成肌细胞的含有率会下降,不优选。因此,一个方式中,本发明的片状细胞培养物的制造中使用的细胞群的TE7阳性率可以为50%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下,优选为40%以下。

[0090] 本发明的片状细胞培养物的制造中使用的细胞群也可以包含除了骨骼肌成肌细胞及成纤维细胞以外的细胞,但上述细胞优选尽可能少。因此,CD56阳性率及TE7阳性率的合计值越高越好,例如可以为80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上等,优选为90%以上。

[0091] 本发明的片状细胞培养物的厚度没有特别限定。在使用单层的片作为片状细胞培养物的情况下,其厚度通常具有单个细胞以上的厚度,根据片形成细胞的种类的不同,厚度也有所不同,一个方式中,本发明的片状细胞培养物具有30μm以上的厚度,一个优选方式中,具有50μm以上的厚度。作为本发明的片状细胞培养物的厚度的范围,例如可举出30μm~

200 μm , 优选可举出50 μm ~150 μm , 更优选可举出60 μm ~100 μm 等。在使用层叠的片作为片状细胞培养物的情况下, 成为不超过前述单层片的厚度 \times 层叠张数的厚度。因此, 作为一个方式, 例如在使用将5张单层片层叠而成的片的情况下, 其厚度为150 μm 以上, 优选为250 μm 以上, 另外, 作为厚度的范围, 例如可举出150 μm ~1000 μm 、优选250 μm ~750 μm 、更优选300 μm ~500 μm 等。

[0092] 因此, 本发明的片状细胞培养物的厚度例如可举出30 μm ~1000 μm 、优选50 μm ~750 μm 、50 μm ~500 μm 、60 μm ~500 μm 等。

[0093] 在某个方式中, 本发明的片状细胞培养物有时非常脆弱, 难以操作。因此, 出于使操作简便、降低破损风险的目的, 本发明的片状细胞培养物可以还具有增强层。作为增强层, 只要能够在不损害本发明的片状细胞培养物的功能的情况下增强结构, 则可以为任意的增强层, 例如, 可以为包含凝胶及/或聚合物的增强层, 由于是移植于生物体内的物质, 因此优选为例如包含生物相容性凝胶、聚合物等的生物相容性的增强层。

[0094] 作为能够在本发明的增强层中使用的凝胶(优选生物相容性凝胶), 只要是在导入至生物体内时不对生物体造成不良影响的凝胶, 则可以为任意凝胶, 例如可举出纤维蛋白凝胶、纤维蛋白原凝胶、明胶凝胶、胶原蛋白凝胶等, 但并不限于此。

[0095] 作为能够在本发明的增强层中使用的聚合物、优选生物相容性聚合物, 只要是在导入至生物体内时不对生物体造成不良影响的聚合物, 则可以为任意聚合物, 例如可举出聚乳酸、聚二氧六环酮(Polydioxanone)、聚糖乙内酰胺(Poliglecaprone)、胶原蛋白等, 但并不限于此。

[0096] 包含生物相容性凝胶的增强层的形成方法可以使用本技术领域已知的方法。作为上述方法, 例如可举出: 在片状细胞培养物上喷雾生物相容性凝胶、聚合物或成为其材料的成分的方法; 在片状细胞培养物上层叠溶胶状的生物相容性物质而凝胶化的方法; 浸渍于液状的凝胶后使凝胶固化的方法; 等等, 此外, 还可列举日本特开2016-52271号公报等中记载的方法等, 但并不限于此。

[0097] 增强层是用于使本发明的片状细胞培养物的操作简便且降低破损风险的物质, 因此优选具有一定以上的强度, 优选还具有弹性。作为包含凝胶、聚合物的结构物的强度的已知评价单位, 例如可举出凝胶强度(jelly strength)等, 作为片状结构物的强度的已知评价单位, 例如可举出拉伸断裂荷重等。关于凝胶强度的测定方法, 记载于例如JIS K 6503等中。拉伸断裂荷重是指将片状细胞培养物等的两端在水平方向上拉伸直至断裂为止的最大荷重, 其测定方法例如记载于日本特开2016-52272号公报等中。

[0098] 作为本发明的片状细胞培养物的增强层, 例如作为拉伸断裂荷重, 可以为约0.010N以上、约0.015N以上、约0.020N以上、约0.025N以上、约0.030N以上、约0.035N以上、约0.040N以上、约0.045N以上等, 另外, 可以为约0.010N~约0.200N、约0.015N~约0.100N、约0.020N~约0.50N等范围, 但不限于此。具有增强层的片状细胞培养物与不具有增强层的片状细胞培养物相比, 强度可成为约1.5倍以上、约2倍以上、约3倍以上、约4倍以上、约5倍以上、约6倍以上、约7倍以上、约8倍以上、约9倍以上、约10倍以上, 另外, 可成为约1.5倍~约20倍、约2倍~约15倍、约2.5倍~约10倍等范围。

[0099] 在应用具有增强层的片状细胞培养物的情况下, 优选以增强层不与应用部位直接接触的方式进行应用。即, 优选以使片状细胞培养物位于应用部位与增强层之间的方式进

行应用。

[0100] 片状细胞培养物在应用部位的应用可以使用本技术领域中的已知任意设备及/或方法来实施。

[0101] 一个方式中,在将本发明的片状细胞培养物应用于组织时,可以与促进治愈、愈合的其他组合物及/或移植片等一并应用。作为促进治愈、愈合的其他组合物及/或移植片,例如,可举出带蒂大网膜片等包含带蒂血管的移植片、纤维蛋白凝胶、Adspray(注册商标)等,但不限于此。一个优选方式中,本发明的片状细胞培养物与包含带蒂血管的移植片一起应用。作为包含带蒂血管的移植片的典型例,例如可举出带蒂大网膜片等。

[0102] 所述促进治愈、愈合的其他组合物及/或移植片可以为独立于本发明的片状细胞培养物之外的其他组合物或移植片,也可以例如组装入片状细胞培养物或增强层等中。

[0103] 在本发明的片状细胞培养物与独立的促进治愈、愈合的其他组合物及/或移植片一起应用的情况下,所述组合物及/或移植片可以在片状细胞培养物的应用之前进行应用,也可以在片状细胞培养物的应用之后进行应用。在片状细胞培养物的应用之前应用其他组合物及/或移植片的情况下,以位于应用部位与片状细胞培养物之间的方式进行应用。即,首先,将其他组合物及/或移植片应用于应用部位,然后在其上应用片状细胞培养物(任选地包含增强层)。当在片状细胞培养物的应用之后进行应用的情况下,针对应用部位在片状细胞培养物(任选地包含增强层)上进行应用。即,首先,将片状细胞培养物应用于应用部位,然后在其上应用其他组合物及/或移植片。

[0104] 作为组织再生的机制,认为是例如:片状细胞培养物在损伤部位持续地释放担负血管生成、细胞的保护、修复等作用的VEGF、HGF等细胞因子、胶原蛋白等的旁分泌效果引起的;及/或所应用的周围组织的前体细胞、干细胞激活而得到促进胶原蛋白产生等的自分泌效果;等等。

[0105] 就本发明的片状细胞培养物的大小而言,只要能够将生物体组织的规定部位覆盖即可,没有特别限定,例如,片状细胞培养物的形状为圆形的情况下,其直径为10~55mm、15~50mm、20~45mm、25~40mm、或30~35mm,从覆盖胰脏的切面的观点考虑,优选为30~35mm。

[0106] 小肠是继胃之后、与大肠连接的消化道。胃侧的部位被称为十二指肠,大肠侧的部位被称为回肠,十二指肠与回肠之间的部位被称为空肠。十二指肠在弯曲成C字状的同时将胰脏的胰头部包围。胰脏的胰管的开口部朝向十二指肠的内腔隆起,被称为十二指肠乳头。从该开口部供给胰液及胆汁。

[0107] 本发明中,所谓“小肠肠壁”,是指将小肠的肠管的内侧与外侧隔开的、小肠的任意部位的壁。小肠肠壁由浆膜、外纵肌层、内环肌层、黏膜下组织、黏膜肌层、黏膜固有层、黏膜上皮等构成。一个方式中,小肠肠壁为十二指肠肠壁、空肠肠壁或回肠肠壁。

[0108] 本发明中,所谓“液密地结合”,是指生物体组织的不同部位彼此以生物体组织内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。本发明中,“液密性”是指生物体组织的不同部位彼此液密地结合的性质。该结合可使用缝合线、医疗用缝合器、缝合粘接剂等任意的医疗器具或医疗器械来进行,从液密性的观点考虑,优选使用缝合线来进行。例如,生物体组织的不同部位彼此在它们结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线缝合,以生物体组织内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。

[0109] 本发明中,所谓“介由片状细胞培养物液密地结合”,是指生物体组织的不同部位彼此在夹着片状细胞培养物的状态下以生物体组织内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。即,通过该结合,形成“生物体组织的部位-片状细胞培养物-生物体组织的部位”这样彼此紧密地结合的结构。此时,关于一个生物体组织的部位,其与其他部位结合的部分或面全部由片状细胞培养物覆盖。另外,该结合可使用缝合线、医疗用缝合器、缝合粘接剂等任意的医疗器具或医疗器械来进行,从液密性的观点考虑,优选使用缝合线来进行。例如,生物体组织的不同部位彼此与片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以生物体组织内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。

[0110] 本发明中,所谓“胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合”,是指胰脏的切面及小肠肠壁在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。即,通过该结合,形成“胰脏的切面-片状细胞培养物-小肠肠壁”这样彼此紧密地结合的结构。此时,胰脏的整个切面由片状细胞培养物覆盖。另外,该结合可使用缝合线、医疗用缝合器、缝合粘接剂等任意的医疗器具或医疗器械来进行,从液密性的观点考虑,优选使用缝合线来进行。例如,胰脏的切面及小肠肠壁与片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0111] 本发明中,所谓“胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合”,是指胰管及小肠肠壁的贯穿孔在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。即,通过该结合,形成“胰管-片状细胞培养物-小肠肠壁的贯穿孔”这样彼此紧密地结合的结构。此时,就胰管而言,在胰脏的切面处作为胰管的截面而露出,该截面由胰管壁及内腔部分构成,结果胰管壁及内腔部分全部由片状细胞培养物覆盖。另外,该结合可使用缝合线、医疗用缝合器、缝合粘接剂等任意的医疗器具或医疗器械来进行,从液密性的观点考虑,优选使用缝合线来进行。例如,胰管及小肠肠壁的贯穿孔与片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。此时,以胰管的切面及小肠肠壁的贯穿孔各自的大小相等的方式,胰管及小肠肠壁的贯穿孔彼此紧密地结合。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0112] 一个方式中,“胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合”与“胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合”一起形成。

[0113] 一个方式中,在胰脏的整个切面由本发明的片状细胞培养物覆盖的状态下,胰脏的切面与小肠肠壁在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线而缝合,以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。换言之,胰脏的切面、本发明的片状细胞培养物及小肠肠壁依次配置,在彼此紧密地结合的状态下固定。此时,胰脏的切面和小肠肠壁与存在于胰脏的切面与小肠肠壁之间的本发明的片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线而缝合,以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0114] 一个方式中,胰管的切面的内腔部分的位置与小肠肠壁的贯穿孔相匹配地配置。

此时,就胰管而言,在胰脏的切面处作为胰管的截面而露出,该截面由胰管壁及内腔部分构成,结果胰管壁及内腔部分全部由片状细胞培养物覆盖。胰管及小肠肠壁的贯穿孔与片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。此时,以胰管的切面及小肠肠壁的贯穿孔各自的大小相等的方式,胰管及小肠肠壁的贯穿孔彼此紧密地结合。此时,若通过物理作用、生化反应等任意的效应而在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,则胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0115] 本发明中,所谓“贯穿孔”,是指从生物体组织的表面的某部位贯穿至生物体组织的表面的另一部位的穿孔。贯穿孔例如为从小肠肠壁的外侧表面的任意部位贯穿至小肠肠壁的内侧表面的任意部位的穿孔。一个方式中,贯穿孔是从小肠肠壁的外侧表面的任意部位相对于小肠肠壁垂直地贯穿小肠肠壁的穿孔。一个方式中,贯穿孔是从十二指肠肠壁的外侧表面的任意部位相对于十二指肠肠壁垂直地贯穿十二指肠肠壁的穿孔。一个方式中,贯穿孔是从空肠肠壁的外侧表面的任意部位相对于空肠肠壁垂直地贯穿空肠肠壁的穿孔。生物体组织中可以存在多个贯穿孔。贯穿孔可以是从小肠肠壁的外侧表面的任意部位贯穿至片状细胞培养物的表面的另一部位的穿孔。

[0116] 就贯穿孔的大小而言,只要贯穿孔与生物体组织的规定部位结合即可,没有特别限定,例如,贯穿孔的直径为0.5~7mm、0.6~6mm、0.7~5mm、0.8~4mm、0.9~3mm、或1~2mm。从使胰管与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合的观点考虑,贯穿孔的直径优选为1~2mm。

[0117] 本发明中,所谓“在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔”,是指:通过物理作用、生化反应等任意的效应,以胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通的方式,在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔。所谓物理作用,是指利用钳子等任意的医疗器具或医疗器械,在胰管的切面的内腔部分处对片状细胞培养物进行的刺、穿孔、贯穿等。所谓生化反应,是指:基于胰液等生物体液的、在胰管的切面的内腔部分处的片状细胞培养物的溶解、降解、消化等。此时,片状细胞培养物在胰管的切面的内腔部分以外不与胰液等生物体液接触,因此在胰管的切面的内腔部分以外不发生片状细胞培养物的溶解、降解、消化等,片状细胞培养物残留。上述片状细胞培养物的溶解、降解、消化等能在片状细胞培养物的移植后数小时~数天左右进行。例如,本发明的片状细胞培养物不包含增强层的情况下,上述片状细胞培养物的溶解、降解、消化等能在片状细胞培养物的移植后数小时左右进行。例如,本发明的片状细胞培养物包含含有凝胶及/或聚合物的增强层的情况下,上述片状细胞培养物的溶解、降解、消化等能在片状细胞培养物的移植后数小时~数天左右进行。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0118] 一个方式中,胰管及小肠肠壁的贯穿孔在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。即,通过该结合,形成“胰管-片状细胞培养物-小肠肠壁的贯穿孔”这样彼此紧密地结合的结构。此时,就胰管而言,在胰脏的切面处作为胰管的截面而露出,该截面由胰管壁及内腔部分构成,结果胰管壁及内腔部分全部由片状细胞培养物覆盖。此时,以胰管的切面及小肠肠壁的贯穿孔各自的大小相等的方式,胰管及小肠肠壁的贯穿孔彼此紧密地结合。此时,若通过物理作用、生化反应等任

意的效应而在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,则胰管及小肠的各内腔介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔而连通。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0119] 另一方面,本发明的片状细胞培养物可以在覆盖胰脏的切面之前在任意位置具有贯穿孔。此时,将片状细胞培养物以其贯穿孔与胰管的切面的内腔部分的位置相匹配的方式配置,从而能够介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔使胰管及小肠的各内腔连通。此时,以胰管的切面及小肠肠壁的贯穿孔各自的大小相等的方式,胰管及小肠肠壁的贯穿孔彼此紧密地结合。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0120] 一个方式中,胰管及小肠肠壁的贯穿孔在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合。即,通过该结合,形成“胰管-片状细胞培养物-小肠肠壁的贯穿孔”这样彼此紧密地结合的结构。此时,就胰管而言,在胰脏的切面处作为胰管的截面而露出,该截面由胰管壁及内腔部分构成,结果胰管壁及内腔部分全部由片状细胞培养物覆盖。此时,片状细胞培养物在覆盖胰脏的切面之前在任意的位置具有贯穿孔。此时,片状细胞培养物以其贯穿孔与胰管的切面的内腔部分的位置匹配的方式配置,由此能够介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔使胰管及小肠的各内腔连通。此时,以胰管的切面及小肠肠壁的贯穿孔各自的大小相等的方式,胰管及小肠肠壁的贯穿孔彼此紧密地结合。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0121] 本发明中,所谓“胰管及小肠的各内腔连通”,是指胰管及小肠的各内腔以物理方式连接,胰管的内腔内的胰液等生物体液能够流入小肠的内腔的状态。胰管可以为主胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0122] 本发明中,所谓“外科处置”,是指使用外科设备、手术刀等将生物体组织的规定部位切开,并实施治疗处置。外科处置例如可举出开腹手术、内窥镜手术、胰头十二指肠切除术等,但不限于此。

[0123] 本发明中,所谓“胰头十二指肠切除术”,是指对在胆管、胰头部、十二指肠等产生的肿瘤等进行切除的手术方式。在该手术中,进行胃、十二指肠、胆管、胆囊、胰头部等的切除,针对切除后的十二指肠、空肠,进行切除后的胃、胆管、胰脏等的吻合。该手术在日本国内每年实施1万例左右,但由于是极复杂且高级的手术方式,同时实施手术的时间长,因此产生并发症的情况不少。例如,已知会由于在手术后的吻合部中产生贯穿孔而发生胰瘘。

[0124] 本发明中,“胰瘘”是指胰液从胰脏漏出,例如,可能因胰腺炎、外伤而发生,另外也可能因胰脏的外科处置后在缝合部位产生贯穿孔而发生。漏出的胰液与消化液、胆汁混合而可能被激活,将漏出部位周边的组织溶解,从而可引起炎症。另外,也存在下述情况:胰瘘将漏出部位周边的血管溶解,引起出血,由此导致严重的预后。

[0125] 本发明中,所谓“愈合”,是指受到损伤的器官、组织彼此通过缝合等而彼此结合,从而治愈。愈合可以为胰脏的外科处置后的缝合部位的生物体组织的愈合。特别地,愈合可以为胰脏的外科处置后的缝合部位的胰脏及小肠的愈合。

[0126] 例如,在胰脏的切面及小肠肠壁与片状细胞培养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线而缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合的情况下,愈合可以为胰脏的外科处置后的缝合部位的胰脏的切面及小肠肠壁的愈合。例如,在胰管及小肠肠壁的贯穿孔与片状细胞培

养物一起在它们相结合的部分或面的边缘部等处通过缝合线而缝合,在夹着片状细胞培养物的状态下以胰脏及小肠内的消化液等生物体液不漏出的方式彼此紧密地结合的情况下,愈合可以为胰脏的外科处置后的缝合部位的胰管及小肠肠壁的贯穿孔的愈合。胰管可以为胰管或副胰管。小肠可以为十二指肠或空肠。

[0127] 根据本发明,胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合、愈合,另外,胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合、愈合,由此能够在胰脏的外科处置后维持上述管腔的缝合部位的液密性。由此,能够在缝合部位防止贯穿孔的产生,因此能够预防或处置在上述管腔内流通的消化液等生物体液从缝合部位向胰脏、小肠的外部漏出。特别地,根据本发明,能够在胰头十二指肠切除术的处置后维持上述管腔的缝合部位的液密性。由此,能够在缝合部位防止贯穿孔的产生,因此能够预防或处置在上述管腔内流通的消化液等生物体液从缝合部位向胰脏、小肠的外部漏出。

[0128] 另外,根据本发明,通过利用片状细胞培养物,能够在胰脏的外科处置后促进缝合部位的生物体组织的愈合。

[0129] 本发明中,所谓“粘连”,是指原本分开的器官、组织彼此因外伤、炎症等而彼此结合。例如,已知若因开腹手术、阑尾炎、子宫内膜异位症等炎症等而产生粘连,则会产生肠梗阻、不孕症、慢性骨盆疼痛等并发症。

[0130] 本发明中,所谓“腹腔内的缝合部位以外的部位”,是指胰脏与小肠的缝合部位以外的腹腔内的任意部位、即原本分开的器官、组织的任意部位。例如,在胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合、愈合的情况下,腹腔内的缝合部位以外的部位为胰脏的切面与小肠肠壁的缝合部位以外的腹腔内的任意部位(例如,腹腔壁、小肠、大肠等任意部位)。例如,在胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合、愈合的情况下,腹腔内的缝合部位以外的部位为胰管与小肠肠壁的贯穿孔的缝合部位以外的腹腔内的任意部位(例如,腹腔壁、小肠、大肠等任意部位)。

[0131] 本发明中,所谓“腹腔内的缝合部位以外的部位处的粘连”,是指胰脏与小肠的缝合部位相对于胰脏与小肠的缝合部位以外的腹腔内的任意部位、即原本分开的器官、组织的任意部位而言的结合。例如,在胰脏的切面介由片状细胞培养物与小肠肠壁液密地结合、愈合的情况下,腹腔内的缝合部位以外的部位处的粘连为胰脏的切面与小肠肠壁的缝合部位相对于胰脏的切面与小肠肠壁的缝合部位以外的腹腔内的任意部位(例如,腹腔壁、小肠、大肠等任意部位)而言的结合。例如,在胰管介由片状细胞培养物与小肠肠壁的贯穿孔液密地结合、愈合的情况下,腹腔内的缝合部位以外的部位处的粘连为胰管与小肠肠壁的贯穿孔的缝合部位相对于胰管与小肠肠壁的贯穿孔的缝合部位以外的腹腔内的任意部位(例如,腹腔壁、小肠、大肠等任意部位)而言的结合。

[0132] 根据本发明,不仅预防或处置胰瘘,而且腹腔内的缝合部位以外的部位处不发生粘连,也不发生炎症,因此能够改善胰脏的外科处置的预后。

[0133] [用于预防或处置胰瘘的方法]

[0134] 本发明的另一方面涉及用于预防或处置胰瘘的方法(有时记为“本发明的处置方法”),所述方法包括:利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤;及介由片状细胞培养物使胰脏的切面与小肠肠壁液密地结合的步骤。

[0135] 一个方式中,本发明的处置方法还包括下述步骤:介由片状细胞培养物使胰管与

小肠肠壁的贯穿孔液密地结合。

[0136] 一个方式中,本发明的处置方法还包括下述步骤:通过在胰管的切面的内腔部分处在片状细胞培养物中形成贯穿孔,从而介由片状细胞培养物及小肠肠壁的各贯穿孔使胰管及小肠的各内腔连通。

[0137] 一个方式中,利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的步骤是通过移植设备进行的。

[0138] 本发明中,所谓“移植设备”,是指能够利用片状细胞培养物将包括胰实质及胰管的各切面在内的胰脏的切面覆盖的、任意医疗器械。移植设备例如为能够支承片状细胞培养物、能够剥离片状细胞培养物的、具备平面结构的医疗器械,从在腹腔内操作的观点考虑,优选在内窥镜手术中能够插通于经腹腔地插入到体腔内的筒状体的形态。

[0139] [用于制造本发明的片状细胞培养物的方法]

[0140] 本发明的另一方面涉及用于制造本发明的片状细胞培养物的方法(有时记为“本发明的制造方法”),所述制造方法包括:(i)将包含片形成细胞的细胞群接种于培养基材上的步骤;(ii)将步骤(i)中接种的细胞群进行片化,形成片状细胞培养物的步骤;及(iii)将步骤(ii)中形成的片状细胞培养物从培养基材剥离的步骤。

[0141] [包含本发明的片状细胞培养物的组合物等]

[0142] 本发明的另一方面涉及包含本发明的片状细胞培养物的、组合物(例如,药物组合物等)、移植片及医疗制品等(有时记为“本发明的组合物等”)。

[0143] 本发明的组合物等在本发明的片状细胞培养物之外,还可包含各种追加成分。上述追加成分例如为药学上可容许的载体、提高片状细胞培养物的存活性、植活性及/或功能性等的成分、对于生物体组织的再生、治愈、及/或愈合或其促进等有用的成分、及/或移植片等。本领域技术人员精通上述追加成分,能够适当选择已知的任意追加成分并加以使用。另外,本发明的组合物等在本发明的片状细胞培养物之外,也可以并用前述的追加成分。

[0144] 一个方式中,本发明的组合物等用于覆盖胰脏的切面。

[0145] 一个方式中,本发明的组合物等用于预防或处置胰痿。

[0146] [在用于预防或处置胰痿的药物的制造中的用途]

[0147] 本发明的另一方面涉及本发明的片状细胞培养物、或本发明的组合物等在用于预防或处置胰痿的药物的制造中的用途(有时记为“在本发明的药物的制造中的用途”)。

[0148] [用于预防或处置胰痿的用途]

[0149] 本发明的另一方面涉及本发明的片状细胞培养物、或本发明的组合物等在用于预防或处置胰痿中的用途(有时记为“本发明的用途”)。

[0150] 参照以下的例子更详细地对本发明进行说明,但其表示本发明的特定具体例,本发明不限于这些。

[0151] 实施例

[0152] 例1.片状细胞培养物的制备

[0153] (1)细胞的准备

[0154] 在全身麻醉下采集猪下肢的横纹肌,用包含胶原酶和胰蛋白酶的酶消化液对所采集的组织进行处理,使其分散为单一细胞。将上述细胞在37°C、5%CO₂的条件下、在含有20%FBS的MCDB131培养基中培养至汇合。

[0155] (2) 片状猪骨骼肌成肌细胞培养物的制备

[0156] 在例2所示的胰头十二指肠切除术的当天,将(1)中培养的细胞回收,以 2.2×10^7 个接种于60mm的温度响应性培养皿(UpCell(注册商标),CellSeed制)中,在含有20%FBS的DMEM/F12培养基中培养12小时。然后,通过将温度降低至20℃,从而将自体的片状细胞培养物(片状猪骨骼肌成肌细胞培养物)从温度响应性培养皿剥离并回收(图1)。向回收的片状细胞培养物中添加纤维蛋白凝胶,形成纤维蛋白凝胶的增强层。

[0157] 例2. 基于片状细胞培养物的胰痿的预防

[0158] (1) 对照组的胰头十二指肠切除术

[0159] 针对在例1中采集了横纹肌的猪,在全身麻醉下进行胰头十二指肠切除术,作为对照组(n=9)。对照组的胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面。将对照组的胰脏的切面在不介由片状细胞培养物的情况下与十二指肠肠壁直接缝合。

[0160] 具体而言,将胰头部和十二指肠乳头侧一并切除,对十二指肠残端进行端-端吻合,将远侧的十二指肠与胰实质进行吻合(图2)。更详细而言,将距十二指肠的乳头侧2cm口侧~2cm肛门侧和胰头部一并切除,针对切断的十二指肠的残端,使用4-0合成吸收性单丝带针缝合线,利用Gambie法进行端-端吻合。然后,针对胰脏和十二指肠,使用4-0合成吸收性单丝两端带针缝合线,利用改良Blumgart法(不包括胰管吻合)进行压接吻合。需要说明的是,为了进行临床化学检查,将CV导管及腹水引流管留置在猪体内。

[0161] (2) 片处置组的胰头十二指肠切除术

[0162] 针对在例1中采集了横纹肌的猪,使用例1中制备的片状细胞培养物,在全身麻醉下进行胰头十二指肠切除术,作为片处置组(n=5)。片处置组的胰脏的切面包括胰实质及胰管的各切面。以覆盖片处置组的胰脏的整个切面的方式移植例1中制备的片状细胞培养物。在自上述移植起数分钟后,将胰脏的切面介由片状细胞培养物与十二指肠肠壁缝合。

[0163] 具体而言,将胰头部和十二指肠乳头侧一并切除,对十二指肠残端进行端-端吻合,将片状细胞培养物移植于胰头切除面后(由图3的A的虚线包围的区域),将远侧的十二指肠与胰实质进行吻合(图3的B)。更详细而言,将距十二指肠的乳头侧2cm口侧~2cm肛门侧和胰头部一并切除,针对切断的十二指肠的残端,使用4-0合成吸收性单丝带针缝合线,利用Gambie法进行端-端吻合。然后,将片状细胞培养物移植于胰脏切除面(胰管切开而露出)。进而,针对胰脏和十二指肠,使用4-0合成吸收性单丝两端带针缝合线,利用改良Blumgart法(不包括胰管吻合)进行压接吻合。需要说明的是,为了进行临床化学检查,将CV导管及腹水引流管留置在猪体内。

[0164] (3) 胰头十二指肠切除术后的病理组织学检查

[0165] 在自片状细胞培养物的移植起3天后,再次在全身麻醉下将对照组及片处置组开腹,在对照组中,摘取十二指肠与胰实质的吻合部位,在片处置组中,摘取片状细胞培养物的移植部位(胰脏的切面与十二指肠肠壁之间的缝合部位),供于病理组织学检查。图4的A示出对照组的、自胰头十二指肠切除术起3天后摘取的十二指肠与胰实质的吻合部位的HE染色图像(x200)。箭头表示出血及浓缩的蛋白质。图4的B及C示出片处置组的、自片状细胞培养物的移植起3天后摘取的片状细胞培养物的移植部位的HE染色图像(x200)。虚线所夹的区域表示片状细胞培养物。图4的D示出片处置组的、自片状细胞培养物的移植起3天后摘取的片状细胞培养物的移植部位的抗结蛋白抗体免疫染色图像(x200)。虚线所夹的区域表

示片状细胞培养物。

[0166] 结果可知,在所摘取的片状细胞培养物的移植部位,片状细胞培养物以与胰实质(胰脏的切面的一部分)及十二指肠(十二指肠肠壁的一部分)密合的状态残留(图4的B~D的虚线所夹的区域)。另外,片状细胞培养物的移植部位以外的部位处不发生粘连,也不发生炎症(未图示)。需要说明的是,图4的B~D中,与片状细胞培养物相邻的均匀的层为纤维蛋白凝胶的增强层。

[0167] (4)胰头十二指肠切除术后的临床化学检查

[0168] 在对照组及片处置组中,介由留置在猪体内的CV导管,在自胰头十二指肠切除术起0、1及3天后采集静脉血,利用通常方法制备血清。另外,在对照组及片处置组中,介由留置在猪体内的腹水引流管,在自胰头十二指肠切除术起1及3天后采集腹水。将上述血清及腹水供于临床化学检查,对各自的淀粉酶值及脂肪酶值进行测定。

[0169] 结果,在自胰头十二指肠切除术起3天后,相对于对照组(n=9),片处置组(n=5)中,显示出腹水的淀粉酶值及腹水的脂肪酶值降低的倾向(未图示)。需要说明的是,图5示出按照人胰痿的临床评价方法、自胰头十二指肠切除术起3天后的(腹水的淀粉酶值)/(血清的淀粉酶值)(图5的A)及(腹水的脂肪酶值)/(血清的脂肪酶值)(图5的B)。另外,在自胰头十二指肠切除术起1天后,相对于对照组(n=9),片处置组(n=5)中,显示出腹水的淀粉酶值及腹水的脂肪酶值降低的倾向(未图示)。

[0170] 由以上的结果可知,根据本发明,能够在胰脏的外科处置后维持缝合部位的液密性,能够预防或处置胰痿。特别地,根据本发明,能够在胰头十二指肠切除术的处置后维持缝合部位的液密性,能够预防或处置胰痿。此外,根据本发明,不仅预防或处置胰痿,而且在腹腔内的缝合部位以外的部位处不发生粘连,也不发生炎症,因此能够改善胰脏的外科处置的预后。并且,根据本发明,通过利用片状细胞培养物,也能够在胰脏的外科处置后促进缝合部位的生物体组织的愈合。

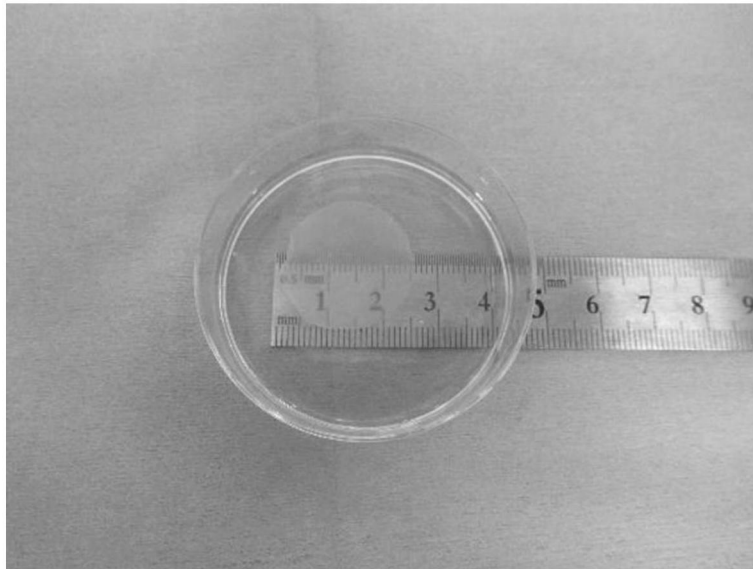


图1

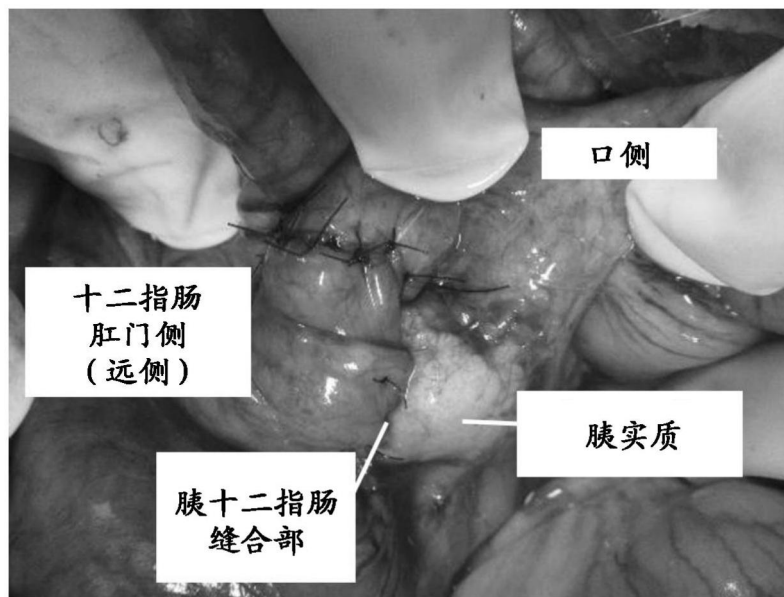
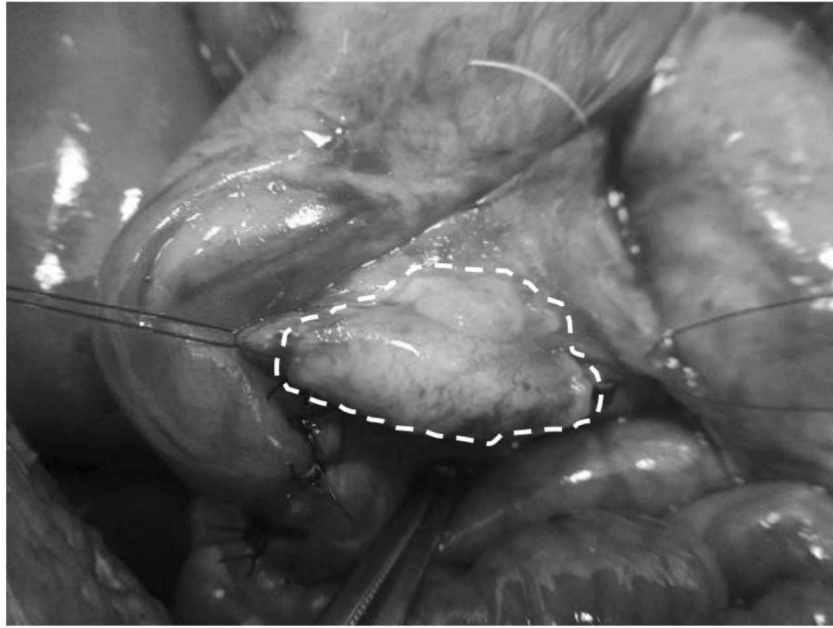


图2

A



B

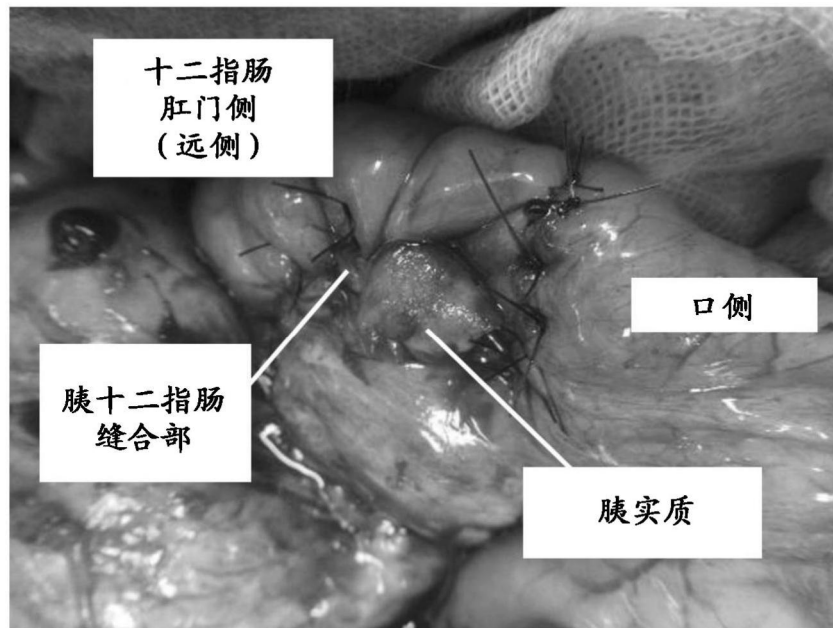


图3

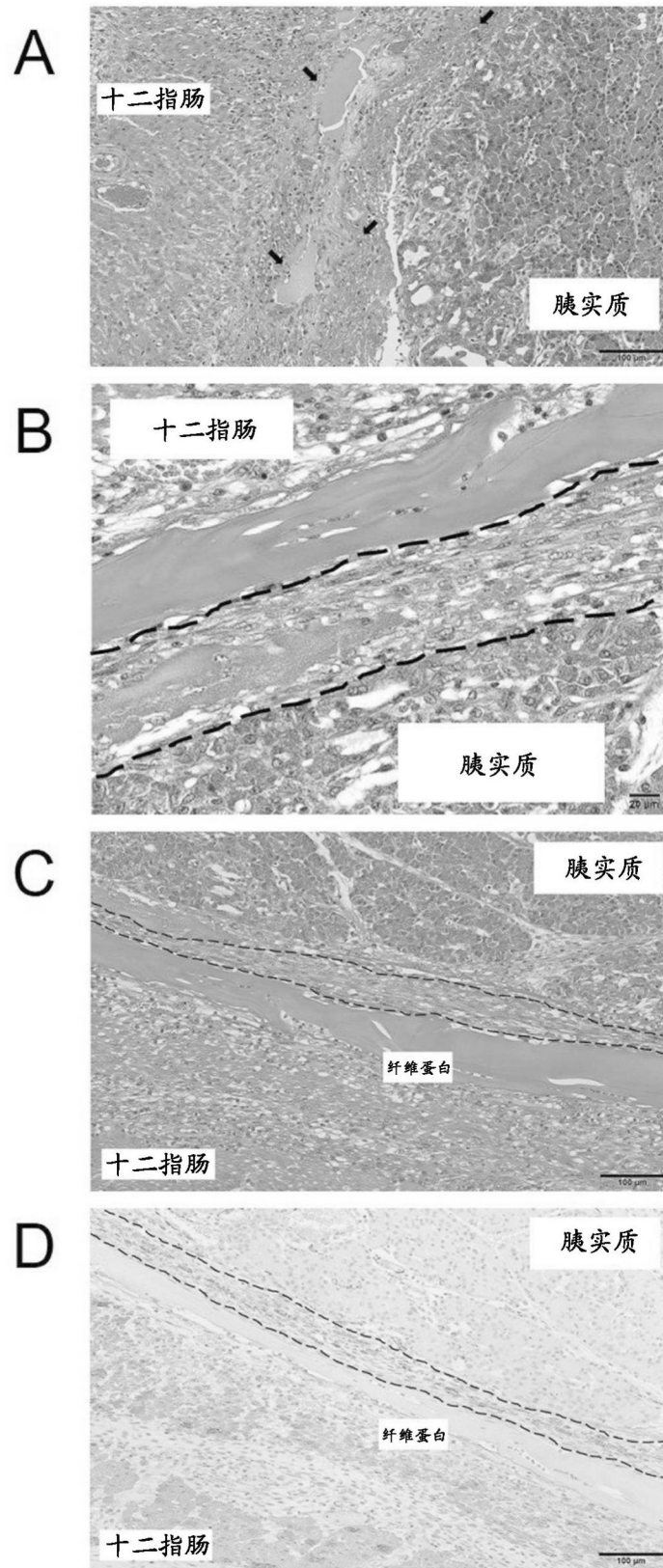


图4

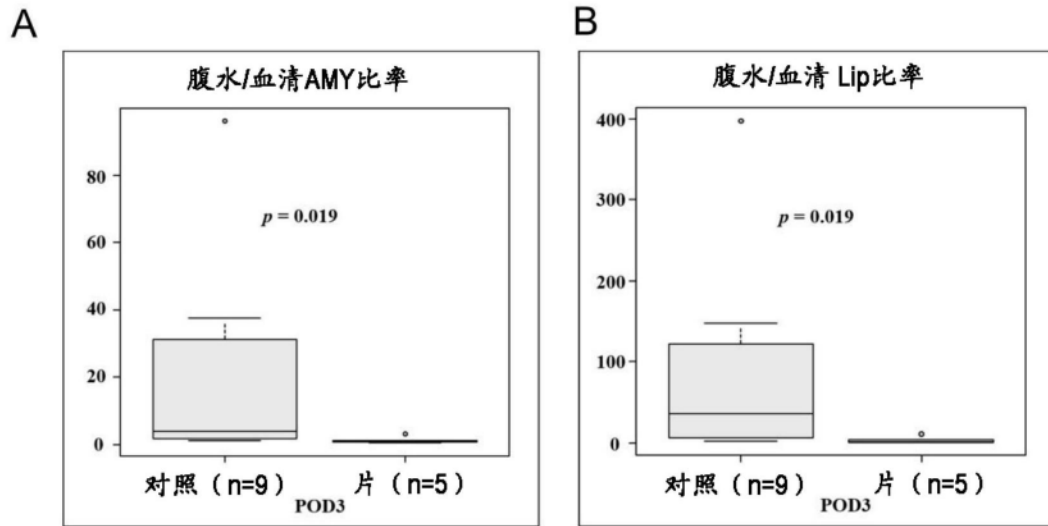


图5