

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6710000号  
(P6710000)

(45) 発行日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(24) 登録日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 M	3/00	(2006.01)	C 1 2 M	3/00	A

請求項の数 23 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2016-521133 (P2016-521133)	(73) 特許権者	504137912
(86) (22) 出願日	平成27年5月20日 (2015.5.20)		国立大学法人 東京大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/064524		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号	W02015/178427	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成30年4月9日 (2018.4.9)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	特願2014-104763 (P2014-104763)		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成26年5月20日 (2014.5.20)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
(出願人による申告)平成25年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業、ERATOバイオ融合プロジェクトに係る協働研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100150810
			弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロファイバ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (1) 細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの管状の細胞接着性層、
  - (2) 前記少なくとも1つの管状の細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆うハイドロゲルを含む外殻層、及び
  - (3) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う管状の細胞層
- を含み、

前記細胞接着性層の外周を覆うハイドロゲルが、アルギン酸ゲル又はアガロースゲルである、マイクロファイバ。

【請求項2】

前記細胞接着性ハイドロゲルが、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチドゲル、ラミニンゲル及びフィブリンゲル、並びにそれらの混合物からなる群から選択される、請求項1に記載のマイクロファイバ。

【請求項3】

外殻層の外径が20 μm ~ 500 μmである、請求項1又は2に記載のマイクロファイバ。

【請求項4】

前記細胞層を構成する細胞が、血管内皮細胞、リンパ管細胞及び尿細管細胞からなる群から選択される、請求項1~3のいずれか1項に記載のマイクロファイバ。

## 【請求項 5】

前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、少なくとも1つは、前記細胞層の細胞とは異なる細胞を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のマイクロファイバ。

## 【請求項 6】

前記少なくとも1つの細胞接着性層の数が1層である、請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロファイバ。

## 【請求項 7】

前記管状の細胞層の内側が、前記細胞層を構成する細胞の懸濁液で満たされた、請求項1～6のいずれか1項に記載のマイクロファイバ。

## 【請求項 8】

前記細胞の懸濁液が、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体に細胞を懸濁させて調製される、請求項7に記載のマイクロファイバ。

## 【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項に記載のマイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、マイクロファイバ。

## 【請求項 10】

マイクロファイバの製造方法であって、以下のステップ：

(i) 細胞懸濁液の層流を形成し；

(ii) 前記細胞懸濁液の層流の外周を覆う少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

(iii) 前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う外殻用ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

(iv) 前記外殻用ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、外殻用ハイドロゲルを含む外殻層を形成する；

(v) 細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、細胞接着性ハイドロゲルを含む細胞接着性層を形成する；そして

(vi) 前記細胞懸濁液中で細胞を培養して、前記細胞接着性層の内周を覆う管状の細胞層を形成すること

を含み、

前記外殻用ハイドロゲルが、アルギン酸ゲル又はアガロースゲルである、マイクロファイバの製造方法。

## 【請求項 11】

ステップ(v)が、ステップ(iv)の前若しくは後に行われるか、又はステップ(iv)と同時に進行される、請求項10に記載のマイクロファイバの製造方法。

## 【請求項 12】

前記細胞懸濁液が、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体に細胞を懸濁させて調製される、請求項10又は11に記載のマイクロファイバの製造方法。

## 【請求項 13】

前記細胞懸濁液中の細胞密度が、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL} \sim 1.0 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ である、請求項10～12のいずれか1項に記載のマイクロファイバの製造方法。

## 【請求項 14】

前記細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液及び前記外殻用ハイドロゲル調製用溶液が異なる条件でゲル化される、請求項10～13のいずれか1項に記載のマイクロファイバの製造方法。

## 【請求項 15】

前記細胞接着性ハイドロゲルが、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチド

10

20

30

40

50

ゲル、ラミニンゲル又はフィブリンゲル、並びにそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法。

【請求項 16】

前記外殻用ハイドロゲルが、アルギン酸ゲルである、請求項 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法。

【請求項 17】

前記細胞接着性ハイドロゲルがコラーゲンゲルである、請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法。

【請求項 18】

前記外殻層を除去することを含む、請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法。

10

【請求項 19】

前記管状の細胞層の内側の細胞懸濁液を除去するステップを含む、請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法。

【請求項 20】

請求項 10 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法を行うためのキットであって、

( i ) ゲル化されて細胞接着性ハイドロゲルが形成される、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液；

( i i ) ゲル化されてアルギン酸ゲル又はアガロースゲルが形成される、外殻用ハイドロゲル調製用溶液；及び

20

( i i i ) 細胞懸濁液を含む、前記キット。

【請求項 21】

請求項 10 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のマイクロファイバの製造方法を行うための装置であって、

( i ) 細胞懸濁液の層流を形成する細胞懸濁液導入管、

( i i ) 前記細胞懸濁液の層流の外周を覆う少なくとも 1 つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成する少なくとも 1 つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管、及び

30

( i i i ) 前記少なくとも 1 つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流のうち、中心軸から最遠部位に位置する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う外殻用ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成する外殻用ハイドロゲル調製用溶液導入管、を含む装置。

【請求項 22】

( i v ) 前記外殻用ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、外殻用ハイドロゲルを含む外殻層を形成する、外殻用ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、及び

( v ) 細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、細胞接着性ハイドロゲルを含む細胞接着性層を形成する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、を含む、請求項 21 に記載の装置。

40

【請求項 23】

前記外殻用ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域と前記細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域とが、同一領域又は異なる領域である、請求項 22 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞層を含むマイクロファイバ、当該マイクロファイバの製造方法、および当該製造方法を行うためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

臓器や組織の置換を目指した再生医療研究では、人工的な三次元細胞組織を構築する技術の開発が求められている。三次元細胞組織を形成するための基本ユニットとなり得るものとして、細胞外基質成分であるコラーゲンやフィブリンに細胞を混合したファイバ中心部（コア部）を、アルギン酸ゲルなどの外殻部（シェル部）で被覆した、コア・シェル構造を有するマイクロファイバが知られている（特許文献1）。当該マイクロファイバは、取扱いのための十分な機械的強度を有し、細胞の機能を維持した状態で三次元的な細胞組織を構築することが可能である。また、当該マイクロファイバは、神経細胞、筋肉細胞、繊維芽細胞及び上皮細胞を含む、様々な種類の細胞を用いて作製可能である。

【0003】

血管やリンパ管などの、管腔構造を有する生体内組織の人工的構築技術の開発も、再生医療研究において求められている。従来、細胞からなる血管様構造物を製造する方法として、コラーゲンゲルの塊の中に、型取りにより細長い孔を作製し、その内壁に血管内皮などの細胞を培養することで形成する方法が知られている。

【0004】

ここで、上述のマイクロファイバのコア部に細胞外基質成分と共に血管内皮細胞を導入して培養すると、マイクロファイバ中で当該血管内皮細胞が管腔を自発的に形成することが知られている（非特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2011/046105号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Nature Materials, vol.12, pp. 584-590, 2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、コア・シェル構造を有するマイクロファイバのコア部に細胞外基質成分と共に血管内皮細胞を導入して培養した場合、細胞層がランダムに形成され、一定の長さを有する連続的な管腔構造を形成することが困難であった。

【0008】

従って本発明は、十分な長さを有し、且つ細胞層によって連続的な管腔構造が形成された、マイクロファイバを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、細胞接着性ハイドロゲルを含むチューブ状の細胞接着性層、及び当該細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層からなるマイクロファイバの中空部に細胞懸濁液を通液し、その後細胞培養することで、当該細胞接着性層の内周を覆う、連続的な細胞層を形成し得ることを見出し、本発明に至った。

【0010】

すなわち本発明は、以下の態様を有する。

[ 1 ]

( 1 ) 細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、

( 2 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、及び

( 3 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う管状の細胞層を含む、マイクロファイバ。

[ 2 ]

10

20

30

40

50

前記細胞接着性ハイドロゲルが、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチドゲル、ラミニンゲル及びフィブリンゲル、並びにそれらの混合物からなる群から選択される、[ 1 ]に記載のマイクロファイバ。

[ 3 ]

前記高強度ハイドロゲルが、アルギン酸ゲル又はアガロースゲルである、[ 1 ]又は[ 2 ]に記載のマイクロファイバ。

[ 4 ]

外殻層の外径が20  $\mu\text{m}$  ~ 500  $\mu\text{m}$ である、[ 1 ] ~ [ 3 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバ。

[ 5 ]

前記細胞層を構成する細胞が、血管内皮細胞、リンパ管細胞及び尿細管細胞からなる群から選択される、[ 1 ] ~ [ 4 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバ。

[ 6 ]

前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、少なくとも1つは、前記細胞層の細胞とは異なる細胞を含む、[ 1 ] ~ [ 5 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバ。

[ 7 ]

前記少なくとも1つの細胞接着性層の数が1層である、[ 1 ] ~ [ 6 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバ。

[ 8 ]

[ 1 ] ~ [ 7 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、マイクロファイバ。

[ 9 ]

[ 1 ] ~ [ 7 ]のいずれか1つに記載のマイクロファイバの中空部が、前記細胞層を構成する細胞の懸濁液で満たされた、マイクロファイバ。

[ 10 ]

前記細胞の懸濁液が、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体に細胞を懸濁させて調製される、[ 9 ]に記載のマイクロファイバ。

[ 11 ]

[ 9 ]又は[ 10 ]に記載のマイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、マイクロファイバ。

[ 12 ]

( 1 ) 細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、  
 ( 2 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、  
 ( 3 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層、及び  
 ( 4 ) 中空部を満たす細胞懸濁液  
 を含む、マイクロファイバを製造する方法であって、以下のステップ：

( i ) 細胞懸濁液の層流を形成し；

( i i ) 前記細胞懸濁液の層流の外周を覆う少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

( i i i ) 前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う高強度ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

( i v ) 高強度ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、高強度ハイドロゲルを含む外殻層を形成する；

( v ) 細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、細胞接着性ハイドロゲルを含む細胞接着性層を形成する；そして

( v i ) 前記細胞懸濁液中で細胞を培養して、前記細胞層を形成すること

10

20

30

40

50

を含む、前記マイクロファイバの製造方法。

[ 1 3 ]

細胞懸濁液導入管、

前記細胞懸濁液導入管と同軸にある、少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管、

前記細胞懸濁液導入管及び前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管と同軸にある、高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管、

高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、及び

細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域

を備えるマイクロ流体装置を用いて、

( 1 ) 細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、

( 2 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、

( 3 ) 前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層、及び

( 4 ) 中空部を満たす細胞懸濁液

を含む、マイクロファイバを製造する方法であって、以下のステップ：

( i ) 細胞懸濁液導入管から細胞懸濁液を射出して、細胞懸濁液の層流を形成し；

( i i ) 少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管から、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液を射出して、前記細胞懸濁液の層流の外周を覆う少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

( i i i ) 前記高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管から、高強度ハイドロゲル調製用溶液を射出して、前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う高強度ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

( i v ) ( i ) ~ ( i i i ) で形成された層流の集合体を、高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域に通過させて、高強度ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、高強度ハイドロゲルを含む外殻層を形成する；

( v ) ( i ) ~ ( i i i ) で形成された層流の集合体を、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域に通過させて、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、細胞接着性ハイドロゲルを含む細胞接着性層を形成し、ここで本ステップは、ステップ ( i v ) の前若しくは後に行われるか、又はステップ ( i v ) と同時に行われ；そして

( v i ) 前記細胞懸濁液中で細胞を培養して、前記細胞層を形成すること

を含む、前記マイクロファイバの製造方法。

[ 1 4 ]

前記細胞懸濁液が、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体に細胞を懸濁させて調製される、[ 1 2 ] 又は [ 1 3 ] に記載のマイクロファイバの製造方法。

[ 1 5 ]

前記細胞懸濁液中の細胞密度が、 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL} \sim 1.0 \times 10^8 \text{ cells/mL}$  である、[ 1 2 ] ~ [ 1 4 ] のいずれか1つに記載のマイクロファイバの製造方法。

[ 1 6 ]

前記細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液及び前記高強度ハイドロゲル調製用溶液が異なる条件でゲル化される、[ 1 2 ] ~ [ 1 5 ] のいずれか1つに記載のマイクロファイバの製造方法。

[ 1 7 ]

前記細胞接着性ハイドロゲルが、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチドゲル、ラミニンゲル又はフィブリンゲル、あるいはそれらの混合物からなる群から選択される、[ 1 2 ] ~ [ 1 6 ] のいずれか1つに記載のマイクロファイバの製造方法。

10

20

30

40

50

[ 1 8 ]

前記高強度ハイドロゲルが、アルギン酸ゲル又はアガロースゲルである、[ 1 2 ] ~ [ 1 7 ] のいずれか 1 つに記載のマイクロファイバの製造方法。

[ 1 9 ]

前記細胞接着性ハイドロゲルがコラーゲンゲルであり、前記高強度ハイドロゲルがアルギン酸ゲルである、[ 1 2 ] ~ [ 1 8 ] のいずれか 1 つに記載のマイクロファイバの製造方法。

[ 2 0 ]

[ 1 2 ] ~ [ 1 9 ] のいずれか 1 つに記載の方法で製造された、マイクロファイバ。

[ 2 1 ]

[ 2 0 ] に記載のマイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、マイクロファイバ。

[ 2 2 ]

( 1 ) 細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも 1 つの細胞接着性層、  
 ( 2 ) 前記少なくとも 1 つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、及び  
 ( 3 ) 前記少なくとも 1 つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層  
 を含む、マイクロファイバを製造する方法であって、[ 1 2 ] ~ [ 1 9 ] のいずれか一つに記載の方法で製造されたマイクロファイバから細胞懸濁液を除去するステップを含む、前記方法。

[ 2 3 ]

[ 2 2 ] に記載の方法で製造された、マイクロファイバ。

[ 2 4 ]

[ 2 3 ] に記載のマイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、マイクロファイバ。

[ 2 5 ]

[ 1 2 ] ~ [ 1 9 ] のいずれか 1 つに記載のマイクロファイバの製造方法を行うためのキットであって、

( i ) ゲル化されて細胞接着性ハイドロゲルが形成される、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液；

( i i ) ゲル化されて高強度ハイドロゲルが形成される、高強度ハイドロゲル調製用溶液；

( i i i ) 細胞懸濁液；及び

( i v ) 前記マイクロファイバを製造するための説明書を含む、前記キット。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、十分な長さを有し、且つ細胞層によって連続的な管腔構造が形成された、マイクロファイバを提供することができる。当該マイクロファイバは、例えば生体内の血管やリンパ管などの管腔構造体の代替として機能することができ、再生医療などの分野で使用され得る。また、製造された本発明のマイクロファイバを、三次元組織内に組み込むことが可能である。例えば、血管内皮細胞を用いて製造された本発明のマイクロファイバを三次元組織内に組み込んで、血管ネットワークを簡易に作製し得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】実施例 1 ( a ) にしたがって製造された、マイクロファイバの様子を示した図である。

【図 2】実施例 1 ( b ) にしたがって、マイクロファイバの外殻層をアルギン酸リアーゼにより除去した様子を示した図である。左部が外殻層の除去前を示し、右部が外殻層の除

10

20

30

40

50

去後を示す。

【図3】実施例2にしたがって、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞とを共培養して製造されたマイクロファイバを示す図である。

【図4】実施例1にしたがって製造されたマイクロファイバの中空部が送液可能であることを示す図である。

【図5】三重の同軸の層流装置を用いて、細胞接着性層の数が1層である本発明のマイクロファイバを製造する方法を模式図として示した図である。

【図6】図5の層流装置を用いて製造されたマイクロファイバの断面図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の一態様は、(1)細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、(2)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、及び(3)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層を含む、中空マイクロファイバである。

【0014】

本明細書中、「マイクロファイバ」とは、例えば外径が10 $\mu\text{m}$ ~1mm程度の繊維状の構造体を意味しているが、外径は上記の範囲に特に限定されるわけではない。中心軸に対して垂直方向の断面形状としては、円形、楕円系、又は四角形や五角形などの多角形など多様な形状であってもよい。断面形状としては円形が好ましい。

【0015】

本明細書中、「中空マイクロファイバ」とは、マイクロファイバの一形態であって、中心軸を通る中空部分を有する。本発明の中空マイクロファイバの断面形状は、好ましくは円形である。その場合の中空部の直径は、特に限定されないが、好ましくは5 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ であり、より好ましくは5 $\mu\text{m}$ ~400 $\mu\text{m}$ であり、更に好ましくは5 $\mu\text{m}$ ~300 $\mu\text{m}$ であり、特に好ましくは5 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ である。

【0016】

本発明の中空マイクロファイバの外殻層の内径は、特に限定されないが、好ましくは10 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ であり、より好ましくは10 $\mu\text{m}$ ~400 $\mu\text{m}$ である。

【0017】

本発明の中空マイクロファイバの外殻層の外径は、特に限定されないが、好ましくは20 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ である。

【0018】

一実施形態において、本発明の中空マイクロファイバの中空部の直径は5 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ であり、外殻層の内径は10 $\mu\text{m}$ ~400 $\mu\text{m}$ であり、そして外殻層の外径は20 $\mu\text{m}$ ~500 $\mu\text{m}$ である。

【0019】

上記の中空マイクロファイバの中空部の直径、並びに外殻層の内径及び外径は、例えば位相差光学顕微鏡による画像からの計測値であって、当該マイクロファイバの数カ所における計測値の平均値として表される。

【0020】

本発明の中空マイクロファイバの長さは、特に限定されないが、好ましくは1mm~100cmであり、より好ましくは5mm~20cmである。

【0021】

本発明の中空マイクロファイバを構成する細胞接着性層は、基材として細胞接着性ハイドロゲルを含む。細胞接着性ハイドロゲルは、当該ゲル上に細胞が接着して培養されて細胞層を形成し得、そして細胞培養培地成分に対して十分な透過性を有し得る限り、特に限定されない。本発明のマイクロファイバが移植に使用された場合、当該細胞接着性ハイドロゲルは生体内細胞により分解又はリモデリングされ、長期的には生体組織に置換され得る。

10

20

30

40

50

## 【0022】

細胞接着性ハイドロゲルは、好ましくは、外的刺激によりゲル化したハイドロゲルである。外的刺激としては、生理的条件下における刺激、及び/又は細胞毒性を示さない刺激であり、例えば、金属イオン（例えばカルシウムイオン）の添加、酵素添加、pH変動、加熱、UV照射、放射線照射などが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0023】

細胞接着性ハイドロゲルは、好ましくは、細胞外基質成分である。或いは、本発明の細胞接着性ハイドロゲルは、好ましくは、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチドゲル、ラミニンゲル及びフィブリンゲル、並びにそれらの混合物からなる群から選択される。これらのうち、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチン、ペプチドゲル及びラミニンゲルは、例えば温度、pH及び/又は塩濃度を変更することによりゲル化される。フィブリンゲルは、モノマーであるフィブリノーゲンが酵素であるトロンピンと作用することによりゲル化される。

10

## 【0024】

細胞接着性層の調製にあたっては、水と混じりあう性質を有する水性有機溶媒、例えばエタノール、アセトン、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ジメチルホルムアミド、又はジメチルスルホキシドなどを添加してもよい。ハイドロゲルの強度を高めるために適宜の成分や溶媒を配合することもできる。このような観点から、例えば、ポリビニルアルコールハイドロゲルの調製のために溶媒としてジメチルスルホキシドを添加することも可能である。

20

## 【0025】

細胞接着性層には、例えば、細胞、タンパク質、脂質、糖類、核酸類、又は抗体などの生体成分の1種又は2種以上を添加することができる。細胞の種類は特に限定されないが、例えば、分化万能性を有するES細胞やiPS細胞、分化多能性を有する各種の幹細胞（造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など）、分化単一性を有する幹細胞（肝幹細胞、生殖幹細胞など）などのほか、分化した各種の細胞、例えば骨格筋細胞や心筋細胞などの筋細胞、大脳皮質細胞などの神経細胞、線維芽細胞、上皮細胞、肝細胞、膵細胞、皮膚細胞などを挙げるることができる。細胞接着性層は、細胞を細胞接着性層内で培養して得られる細胞培養物を含んでもよい。もっとも細胞や生体成分は上記に例示したものに限定されることはない。また、上記細胞や生体成分の由来も特に限定されないが、例えばヒト、マウス、ラット、イヌ又はサルなどの動物細胞由来である。上記の細胞の培養、細胞の維持や増殖、又は細胞の機能発現などに適した各種の成長因子、例えば上皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF）、インスリン様成長因子（IGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、神経成長因子（NGF）などを細胞接着性層に添加してもよい。成長因子を用いる場合には、成長因子の種類に応じて適宜の濃度を選択することができる。また、細胞接着性層には非生体成分を添加してもよい。例えば、カーボンナノファイバなどの繊維類、触媒物質など無機物質類、抗体などで被覆されたビーズ類、又はマイクロチップなどの人工物を添加することも可能である。

30

## 【0026】

本発明の中空マイクロファイバは、少なくとも1つの細胞接着性層を有する。各細胞接着性層は、連続的に積層された状態で存在する。各細胞接着性層の構成成分は、同一であっても異なってもよい。細胞接着性層の数は特に限定されないが、好ましくは1～5層であり、より好ましくは1～3層である。本発明の一実施形態において、細胞接着性層の数は1層である。

40

## 【0027】

細胞接着性層の厚みは、特に限定されないが、好ましくは、10 $\mu$ m～250 $\mu$ mである。また、当該細胞接着性層は通常、実質的に均一な厚みを有する。好ましくは、当該細胞接着性層は、 $\pm$ 5%の範囲内の厚さ均一性を有する。当該厚さ均一性は、例えば位相差光学顕微鏡により測定された、当該マイクロファイバの数力所における細胞接着性層の厚

50

さの計測値の平均値に対する、%変動値として計算される。

【0028】

本発明の中空マイクロファイバを構成する外殻層は、基材として高強度ハイドロゲルを含む。高強度ハイドロゲルは、被覆されるべき細胞接着性層より高い機械的強度を有するハイドロゲルであって、細胞培養培地成分に対して十分な透過性を有し得るものであれば、特に限定されない。ゲルの機械的強度については、当業者に周知の方法に従って、引っ張り試験機を水中で用いる方法などにより引っ張り強度や荷重強度などを測定することができる。高強度ハイドロゲル中に、生体成分や非生体成分を必要に応じて添加することもできる。

【0029】

高強度ハイドロゲルは、好ましくは外的刺激によりゲル化したハイドロゲルである。外的刺激としては、例えば、金属イオン（例えばカルシウムイオン）の添加、酵素処理、pH変動、加熱、UV照射、放射線照射などが挙げられるがこれらに限定されない。また、高強度ハイドロゲルを形成するための外的刺激は、細胞接着性ハイドロゲルを形成するための外的刺激と同一であっても異なってもよい。好ましくは、外的刺激は各々異なる。

【0030】

高強度ハイドロゲルは、好ましくは、本発明のマイクロファイバの形成後に当該マイクロファイバから化学反応および酵素反応などにより除去可能なハイドロゲルである。

【0031】

高強度ハイドロゲルは、より好ましくは、アルギン酸ゲル又はアガロースゲルである。アルギン酸ゲルは、カルシウムイオンの添加によりゲル化し、アルギン酸リアーゼなどを用いた酵素処理により、又はEDTAなどのキレート剤を適宜の濃度で作用させてカルシウムイオンを除去することにより除去可能である。また、アガロースゲルは温度によりゲル化し、酵素処理により除去可能である。

【0032】

外殻層の厚みは、特に限定されないが、好ましくは、 $5\ \mu\text{m} \sim 250\ \mu\text{m}$ である。また、当該外殻層は通常、実質的に均一な厚みを有する。好ましくは、当該外殻層は、 $\pm 5\%$ の範囲内の厚さ均一性を有する。当該厚さ均一性は、例えば位相差光学顕微鏡により測定された、当該マイクロファイバの数カ所における外殻層の厚さの計測値の平均値に対する、%変動値として計算される。

【0033】

細胞接着性層は、その構成成分組成が当該層上の任意の場所において同一であっても、又は異なってもよい。例えば、細胞接着性層の管をその中心軸を含むように軸方向で切断した場合、一方の細胞接着性層と他方の細胞接着性層との構成成分は同一であるが、その構成成分濃度が異なるように、細胞接着性層が形成されてもよい。このように、細胞接着性層をパターンニングすることで、1つの細胞接着性層中に異なる特性を有する部分が共存した、異方性を有する管状構造を形成し得る。同様に、外殻層は、その構成成分組成が当該層上の任意の場所において同一であっても、又は異なってもよい。例えば、外殻層の管をその中心軸を含むように軸方向で切断した場合、一方の外殻層と他方の外殻層との構成成分は同一であるが、その構成成分濃度が異なるように、外殻層が形成されてもよい。

【0034】

本発明の中空マイクロファイバにおいて使用される細胞接着性ハイドロゲル及び高強度ハイドロゲルの組み合わせは、好ましくは、細胞接着性ハイドロゲルがコラーゲンゲルであり、高強度ハイドロゲルがアルギン酸ゲルである。

【0035】

本発明の中空マイクロファイバを構成する細胞層における細胞の種類は、細胞接着性層上に接着して培養され得る細胞であれば、特に限定されない。好ましくは生体内管腔構造体を構成する性質を有する細胞、例えば、血管内皮細胞、リンパ管細胞又は尿細管細胞である。

【0036】

本発明の中空マイクロファイバを構成する細胞層は、好ましくは単層細胞層である。

【0037】

本発明の中空マイクロファイバを構成する細胞接着性層は、細胞層を構成する細胞とは異なる細胞を含んでもよい。例えば、細胞層を構成する細胞が血管内皮細胞であるとき、当該細胞層に隣接する細胞接着性層に血管平滑筋細胞を含めてもよい。この場合、血管内皮細胞からなる細胞層の外側を覆うように、血管平滑筋細胞からなる層が形成され得る。

【0038】

本発明の一態様は、本発明の中空マイクロファイバの中空部が、細胞層を構成する細胞の懸濁液で満たされた、マイクロファイバである。当該懸濁液は細胞毒性を有さないものであれば特に限定されないが、好ましくは、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体に細胞を懸濁させて調製される。

【0039】

本発明の一態様は、本発明の中空マイクロファイバから外殻層を除去することにより得ることができる、中空マイクロファイバである。また、本発明の他の実施形態は、本発明の中空マイクロファイバの中空部が細胞層を構成する細胞の懸濁液で満たされたマイクロファイバから、外殻層を除去することにより得ることができるマイクロファイバである。例えば、高強度ハイドロゲルとしてアルギン酸ゲルを採用し、細胞接着性ゲルとしてコーゲンゲルを採用した本発明のマイクロファイバの製造後、アルギン酸リアーゼなどを用いた酵素処理により、又はEDTAなどのキレート剤を適宜の濃度で作用させてカルシウムイオンを除去することにより、アルギン酸ゲルを含む外殻層のみを除去したマイクロファイバを調製することができる。

【0040】

本発明のマイクロファイバは、例えばシリコンチューブ内に吸引し、チューブの縦軸方向にゲルを伸張して保存することができる。ゲル化後のマイクロファイバを水中又は緩衝液中などに保存するとゲルを直線状に保つことが一般には困難になるが、マイクロファイバを水中又は緩衝液中などに入れた後、この水性媒体に内径100 $\mu$ m～数mm程度のシリコンチューブの先端を浸漬してシリコンチューブを吸引することにより、マイクロファイバが先端からシリコンチューブ内に吸引され、チューブの縦軸方向に伸張された直線状態でシリコンチューブ内に吸引される。この状態でゲルを保存することができ、さらに使用にあたってはマイクロファイバを内包したシリコンチューブを適宜の長さに切断して所望の長さのゲルを調製することが可能になる。保存にあたっては、必要に応じてチューブ内に防腐剤、pH調節剤、緩衝剤など適宜の薬剤を添加することができる。

【0041】

本発明の一態様は、(1)細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、(2)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、(3)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層、及び(4)中空部を満たす細胞懸濁液を含む、マイクロファイバを製造する方法であって、以下のステップ：

(i)細胞懸濁液の層流を形成し；

(ii)前記細胞懸濁液の層流の外周を覆う少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

(iii)前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う高強度ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し；

(iv)高強度ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、高強度ハイドロゲルを含む外殻層を形成する；

(v)細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液をゲル化し、細胞接着性ハイドロゲルを含む細胞接着性層を形成する；そして

10

20

30

40

50

(v i) 前記細胞懸濁液中で細胞を培養して、前記細胞層を形成することを含む、前記マイクロファイバの製造方法である。

【0042】

上記マイクロファイバの製造方法は、例えば、細胞懸濁液導入管、前記細胞懸濁液導入管と同軸にある、少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管、前記細胞懸濁液導入管及び前記少なくとも1つの細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管と同軸にある、高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管、高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域を備えるマイクロ流体装置(coaxial microfluidic device)を用いて行うことができる。

【0043】

図5は、三重の同軸の層流装置を用いて、細胞接着性層の数が1層である本発明のマイクロファイバを製造する方法の一例を模式図として示した図である。細胞懸濁液導入管2から細胞懸濁液1を射出して層流を形成し、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管4から細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液3を射出して、細胞懸濁液の層流の外周を覆う細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成し、そして高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管6から高強度ハイドロゲル調製用溶液5を射出して、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う高強度ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成する。形成された層流の集合体を、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液、および高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域8を通過させて、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液および高強度ハイドロゲル調製用溶液をそれぞれゲル化する。例えば、形成された層流の集合体をゲル化剤溶液7に導入することで、そして/又は、その他の外的刺激を付加することで、ゲル化され得る。そして、得られたマイクロファイバ中で細胞を培養し、細胞接着性層の内周を覆う細胞層を形成する。図6において、図5の装置を用いて得られるマイクロファイバの断面図を示す。

【0044】

細胞懸濁液導入管、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管及び高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管の材質は、特に限定されないが、例えばガラス、シリコンゴム、高分子樹脂、金属、セラミックなどである。その内径は、特に限定されないが、例えば0.1mm~10mmである。

【0045】

細胞接着性層の数が2層以上である本発明のマイクロファイバは、例えば、図5に示す細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管4と高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管6との間に、追加の細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管を設けて、そこから細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液を射出し、直前に配置された細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管からの射出で形成された細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流の外周を覆う細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流を形成することで製造することができる。

【0046】

細胞を懸濁させる液体は、細胞毒性を有さないものであって、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液の層流が細胞懸濁液の層流の外周を覆うように形成され得る程度の粘性を有するものであれば特に限定されない。粘度が10~500cP程度である液体が好ましい。より好ましくは、ポリエチレングリコール、グリセロール、アルギン酸エステル及びデキストラン、並びにそれらの混合物からなる群から選択される液体である。

【0047】

細胞懸濁液中の細胞密度は、製造されたマイクロファイバ中の細胞接着性層上で細胞が均一に培養され得る細胞密度であれば、特に限定されない。好ましくは、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL ~  $5.0 \times 10^8$  cells/mLであり、より好ましくは、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL ~  $1.0 \times 10^8$  cells/mLである。

【0048】

本発明のマイクロファイバの製造過程において、各溶液が層流を形成するように、各溶液の粘度及び流速を調節する必要がある。本明細書において「層流」とは、その流体の流

10

20

30

40

50

線が、当該流体の射出方向と平行なものをいう。また、隣接する流体の「層流」同士は、互いに混ざり合うことはなく、流線は規則正しい形で保たれる。

【 0 0 4 9 】

層流を形成する指標として、レイノルズ数がある。レイノルズ数は、下記式：

【 0 0 5 0 】

【 数 1 】

$$R e = v L / \nu$$

10

【 0 0 5 1 】

[ 式中、 $v$  は流速 (m/sec) であり、 $L$  は代表長さ (m) であり、 $\nu$  は動粘性係数 ( $m^2/sec$ ) である ]

で表される。

【 0 0 5 2 】

本発明の方法において、細胞懸濁液、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液、及び高強度ハイドロゲル調製用溶液の各流れのレイノルズ数は、層流を形成し得るために十分な値であれば特に限定されない。例えば、当該値が 2 0 0 0 以下である場合、いずれの液体も層流を形成し得る。

20

【 0 0 5 3 】

高強度ハイドロゲル調製用溶液、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化は、外的刺激の付加により行われる。好ましくは、外的刺激は、高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域においてそれぞれ付加される。高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域は、同一領域であっても異なる領域でもよい。外的刺激としては、例えば、金属イオン（例えばカルシウムイオン）の添加、酵素の添加、pH変動、加熱、UV照射、放射線照射などが挙げられるがこれらに限定されない。ゲル化条件は、細胞接着性ハイドロゲルと高強度ハイドロゲルとで、同一であっても異なっても良い。好ましくは、当該ゲル化は異なる条件で行われる。例えば、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液がコラーゲン溶液である場合、37 程度で数分から1時間の加熱を行うことによりコラーゲンゲルへとゲル化させる。また、高強度ハイドロゲル調製用溶液がアルギン酸ナトリウム溶液である場合、ゲル化剤溶液であるカルシウムイオンなどの金属イオンを含む水溶液（例えば塩化カルシウム水溶液）へアルギン酸ナトリウム溶液の層流を通過させることでアルギン酸ゲルへとゲル化させる。好ましくは、高強度ハイドロゲル調製用溶液のゲル化は、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化よりも速やかに行われる。それにより、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液が外殻層よりも外側に拡散することを防止し得る。

30

【 0 0 5 4 】

形成される細胞接着性層は、その構成成分組成が当該層上の任意の場所において同一であっても、又は異なってもよい。例えば、細胞接着性層の管をその中心軸を含むように軸方向で切断した場合、一方の細胞接着性層と他方の細胞接着性層との構成成分は同一であるが、その構成成分濃度が異なるように、細胞接着性層が形成されてもよい。このように、細胞接着性層をパターンニングすることで、1つの細胞接着性層中に異なる特性を有する部分が共存した、異方性を有する管状構造を形成し得る。このような管状構造は、例えば一方の細胞接着性層を形成するための細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液と他方の細胞接着性層を形成するための細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液との濃度が異なるように、これらの溶液の層流を形成することで作製され得る。同様に、形成される外殻層は、その構成成分組成が当該層上の任意の場所において同一であっても、又は異なってもよい。例えば、外殻層の管をその中心軸を含むように軸方向で切断した場合、一方の外殻層と他方の外殻層との構成成分は同一であるが、その構成成分濃度が異なるように、外殻層が形成さ

40

50

れてもよい。このような管状構造は、例えば一方の外殻層を形成するための高強度ハイドロゲル調製用溶液と他方の外殻層を形成するための高強度ハイドロゲル調製用溶液との濃度が異なるように、これらの溶液の層流を形成することで作製され得る。

【0055】

高強度ハイドロゲル調製用溶液、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化の後、マイクロファイバの中空部に細胞懸濁液として導入した細胞を培養して、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層を形成する。培養は、例えば形成されたマイクロファイバをそのまま細胞培養培地に浸漬して行われる。この場合、細胞培養培地に含まれる栄養成分は、外殻層及び細胞接着性層を拡散により通過可能である。細胞培養条件は特に限定されないが、例えば37℃にて24～72時間かけて行われる。

10

【0056】

本発明のマイクロファイバの製造方法に従えば、十分な長さ（例えば0.5cm～100cm）を有し、細胞層によって連続的な管腔構造が形成された、送液可能なマイクロファイバを製造することができる。当該マイクロファイバを形成する細胞接着性層及び外殻層はいずれも、実質的に均一な厚みを有する。

【0057】

本発明の一態様は、上記マイクロファイバの製造方法を行うためのキットであって、(i)ゲル化されて細胞接着性ハイドロゲルが形成される、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液；(ii)ゲル化されて高強度ハイドロゲルが形成される、高強度ハイドロゲル調製用溶液；(iii)細胞懸濁液；及び(iv)前記マイクロファイバを製造するための説明書を含む、前記キットである。

20

【0058】

本発明の一態様は、(1)細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、(2)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、及び(3)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層を含む、中空マイクロファイバを製造する方法である。このような中空マイクロファイバは、上記の方法で製造された、(1)細胞接着性ハイドロゲルを含む少なくとも1つの細胞接着性層、(2)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最遠位部に位置する細胞接着性層の外周を覆う高強度ハイドロゲルを含む外殻層、(3)前記少なくとも1つの細胞接着性層のうち、中心軸から最近位部に位置する細胞接着性層の内周を覆う細胞層、及び(4)中空部を満たす細胞懸濁液を含む、マイクロファイバから、細胞懸濁液を除去することで製造され得る。細胞懸濁液の除去方法は特に限定されないが、例えば中空部に細胞懸濁液以外の液体を送液することにより除去され得る。

30

【0059】

従来から知られる人工血管は、例えば合成ポリマーによるチューブであり、移植後において血栓による狭窄や材料の劣化が問題となる。一方、血管内皮細胞を使用して製造された本願発明の中空マイクロファイバは、血管構成成分で構成されているため、人工材料により製造された人工血管と比較して血栓形成リスクが極めて低いと期待される。また、生体由来成分で構成されているため、一旦生体組織と連結されれば、移植後に分裂した細胞またはレシピエントの細胞により逐次置き換わり、再移植の必要性が低減されると考えられる。さらに、移植部位周辺の生体内環境に応じて新たな血管ネットワークを自立的に形成し得る。

40

【0060】

また、本発明のマイクロファイバは、再生医療における移植用途に使用され得るが、当該用途に限定されない。例えば、本発明のマイクロファイバ、及び当該マイクロファイバを用いて作製された三次元組織を利用して、薬物動態モデル、がん転移のin vitroモデル系、血栓形成のin vitroモデル系などを構築することによって、薬物スクリーニングへも応用し得る。

【実施例】

50

## 【0061】

以下に示す実施例及び比較例を参照して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されるものでないことは言うまでもない。

## 【0062】

## 比較例 1

コラーゲンゲル及び血管内皮細胞を含むコア部、並びに当該コア部を覆うアルギン酸ゲルを含むシェル部からなるマイクロファイバの製造

非特許文献1に記載された方法で、二重の同軸の層流装置を用いて製造した。当該マイクロファイバを培養すると、血管内皮細胞からなる細胞層が自発的に形成されたが、細胞層がランダムに形成され、連続的な管腔構造を形成することはできなかった。

10

## 【0063】

## 実施例 1

(a) コラーゲンゲルを含む細胞接着性層、当該細胞接着性層の外周を覆うアルギン酸ゲルを含む外殻層、及び当該細胞接着性層の内周を覆う血管内皮細胞層を含むマイクロファイバの製造

図5に示す装置を用いて製造した。細胞懸濁液1として、血管内皮細胞のポリエチレングリコール溶液 ( $2.0 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ ) を調製し、細胞懸濁液導入管2から流速  $10 \mu\text{l/min}$  で射出して、当該溶液の層流を形成した。細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液3として、コラーゲン水溶液 ( $4 \text{ mg/mL}$ ) を調製し、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管4から流速  $200 \mu\text{l/min}$  で射出して、細胞懸濁液の層流の外周を覆うコラーゲン水溶液の層流を形成した。高強度ハイドロゲル調製用溶液5として、アルギン酸ナトリウム水溶液 ( $1.5 \text{ mg/mL}$ ) を調製し、高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管6から流速  $125 \mu\text{l/min}$  で射出して、コラーゲン水溶液の層流の外周を覆うアルギン酸ナトリウム水溶液の層流を形成した。得られる層流の集合体を、高強度ハイドロゲル調製用溶液、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル化領域8においてゲル化した。具体的には、ゲル化剤溶液7である塩化カルシウム水溶液 ( $100 \text{ mM}$ 、流速  $2500 \mu\text{l/min}$ ) に導入し、 $37^\circ\text{C}$  で15分間加熱し、マイクロファイバ(外殻層の内径:  $270 \mu\text{m}$ 、外殻層の外径:  $350 \mu\text{m}$ 、コラーゲン層の厚み:  $100 \mu\text{m}$ 。いずれも、位相差光学顕微鏡による画像からの計測値の平均値として計算された)を製造した。得られたマイクロファイバ中で細胞培養することにより、コラーゲン層の内周を均一に覆う単層の血管内皮細胞層が形成された。

20

30

## (b) 外殻層の溶解

(a) で得られたマイクロファイバにアルギン酸リアーゼを作用させることで、外殻層のアルギン酸ゲルを溶解した(図2)。

## 【0064】

## 実施例 2

血管平滑筋細胞及びコラーゲンゲルを含む細胞接着性層、当該細胞接着性層の外周を覆うアルギン酸ゲルを含む外殻層、及び当該細胞接着性層の内周を覆う血管内皮細胞層を含むマイクロファイバの製造

細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液3として、血管平滑筋細胞 ( $1.25 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ) を含むコラーゲン水溶液 ( $4 \text{ mg/mL}$ ) を調製し、細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管4から流速  $200 \mu\text{l/min}$  で射出して、細胞懸濁液の層流の外周を覆うコラーゲン水溶液の層流を形成すること以外は、実施例1と同様にして、マイクロファイバを製造した(外殻層の内径:  $270 \mu\text{m}$ 、外殻層の外径:  $350 \mu\text{m}$ 、コラーゲン層の厚み:  $100 \mu\text{m}$ 。いずれも、位相差光学顕微鏡による画像からの計測値の平均値として計算された)。得られたマイクロファイバ中で細胞培養することにより、単層の血管内皮細胞層の外側に血管平滑筋細胞層が積層されたマイクロファイバが得られた(図3)。

40

## 【0065】

## 実施例 3

50

実施例 1 で得られたマイクロファイバを狭窄したガラス管に挟むことにより、マイクロファイバの中空部に送液を行った。シリンジポンプを利用して流速  $1 \mu\text{L}/\text{min}$  で送液を行ったところ、形成した血管内皮層内の中空部に送液が可能であった。直径  $5 \mu\text{m}$  のポリスチレンビーズの分散液を送液したところ、光学顕微鏡でビーズが送液に伴い中空部を移動することを確認した（図 4 の上部（ $t = 0$  秒）と下部（ $t = 18$  秒）を参照。図中、矢印はポリスチレンビーズを示す）。

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明のマイクロファイバは、血管やリンパ管などの生体内管腔構造体の代替として好適に利用することができる。

10

【符号の説明】

【0067】

- 1 細胞懸濁液
- 2 細胞懸濁液導入管
- 3 細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液
- 4 細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液導入管
- 5 高強度ハイドロゲル調製用溶液
- 6 高強度ハイドロゲル調製用溶液導入管
- 7 ゲル化剤溶液
- 8 高強度ハイドロゲル調製用溶液、及び細胞接着性ハイドロゲル調製用溶液のゲル

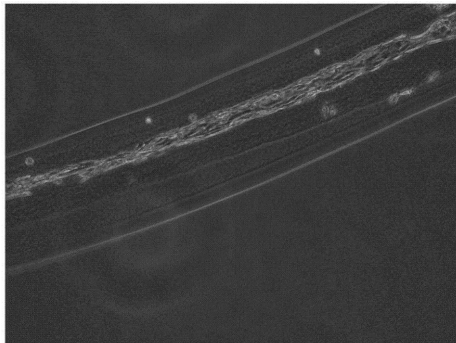
20

化領域

- 9 中空部
- 10 細胞層
- 11 細胞接着性層
- 12 外殻層

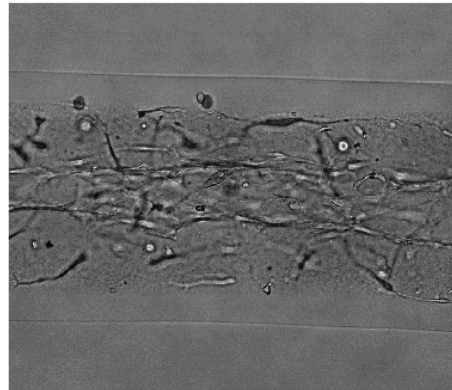
【図 1】

図1



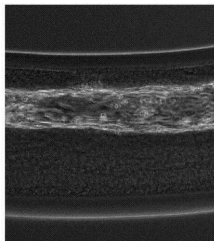
【図 3】

図3

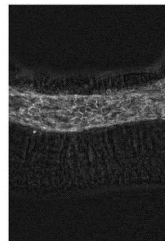


【図 2】

図2



高強度ハイドロゲル  
除去前

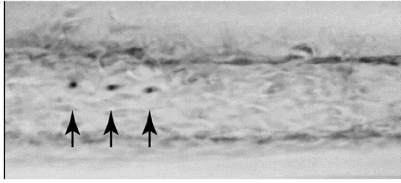


高強度ハイドロゲル  
除去後

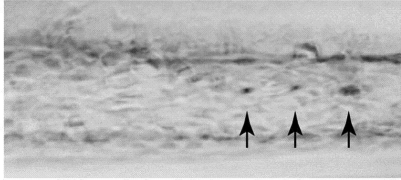
【 図 4 】

図4

t = 0 sec

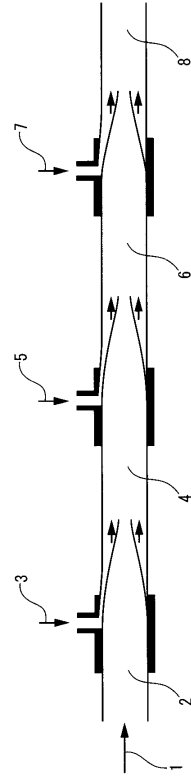


t = 18 sec



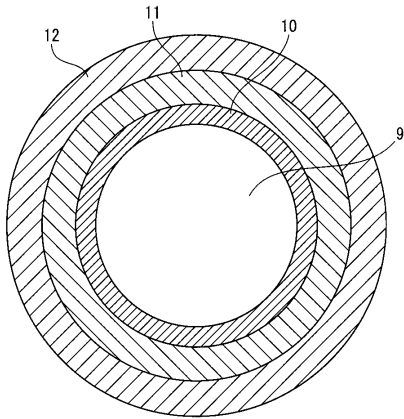
【 図 5 】

図5



【 図 6 】

図6



## フロントページの続き

- (74)代理人 100164563  
弁理士 佐々木 貴英
- (72)発明者 竹内 昌治  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 尾上 弘晃  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 三浦 重徳  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 特開2004-321484(JP,A)  
ONOE, H., et al., Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions, *Nature Materials*, 2013年, 12, pp.584-590  
HIRAYAMA, K., et al., 3D MICROFLUIDICS FORMED WITH HYDROGEL SACRIFICIAL STRUCTURES, 2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2012年, pp.200-203, URL, <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=6170125>  
尾上 弘晃ら, ボトムアップ組織工学, *生物工学会誌*, 2014年 4月25日, 92(4), pp.161-165  
LEE, K.H., et al., Synthesis of Cell-Laden Alginate Hollow Fibers Using Microfluidic Chips and Microvascularized Tissue, *small*, 2009年, 5(11), pp.1264-1268

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10  
C12N 1/00-5/28  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)