(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7650468号
(P7650468)

(45)発行日　令和7年3月25日(2025.3.25)

(24)登録日　令和7年3月14日(2025.3.14)

(51)国際特許分類		FI		
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	
C12N	*1/20 (2006.01)*	C12N	1/20	A
C12Q	*1/02 (2006.01)*	C12Q	1/02	
G01N	*33/50 (2006.01)*	G01N	33/50	Z

請求項の数　10　（全28頁）

(21)出願番号　特願2021-546571(P2021-546571)
(86)(22)出願日　令和2年8月27日(2020.8.27)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/032446
(87)国際公開番号　WO2021/054079
(87)国際公開日　令和3年3月25日(2021.3.25)
審査請求日　令和5年6月29日(2023.6.29)
(31)優先権主張番号　特願2019-168577(P2019-168577)
(32)優先日　令和1年9月17日(2019.9.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000003193
ＴＯＰＰＡＮホールディングス株式会社
東京都台東区台東１丁目５番１号
(73)特許権者　504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘１番１号
(74)代理人　100088155
弁理士　長谷川 芳樹
(74)代理人　100113435
弁理士　黒木 義樹
(74)代理人　100169063
弁理士　鈴木 洋平
(74)代理人　100211100
弁理士　福島 直樹
(72)発明者　北野 史朗

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞構造体及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

結合組織構造体、及び該結合組織構造体上に配置された上皮構造体を備える細胞構造体と、前記細胞構造体の内部に、又は前記細胞構造体の前記上皮構造体と接するように配置された細菌と、を備え、

前記結合組織構造体が、断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞と、を含み、

前記断片化された細胞外マトリックス成分の少なくとも一部が前記第一の細胞間に配置されており、

前記上皮構造体が、上皮細胞を含み、

前記断片化された細胞外マトリックス成分の平均長が１００ｎｍ以上２００μｍ以下であり、

前記断片化された細胞外マトリックス成分の含有量が、１．０×10^6ｃｅｌｌｓの前記第一の細胞に対して、０．１～１００ｍｇである、細菌含有歯肉モデル。

【請求項２】

前記間葉系細胞が、線維芽細胞を含む、請求項１に記載の細菌含有歯肉モデル。

【請求項３】

前記断片化された細胞外マトリックス成分が、断片化されたコラーゲン成分を含む、請求項１又は２に記載の細菌含有歯肉モデル。

【請求項４】

前記第一の細胞が血管内皮細胞を更に含み、
前記結合組織構造体が前記第一の細胞間に血管網を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の細菌含有歯肉モデル。
【請求項５】
前記結合組織構造体が前記間葉系細胞間に血管網を有する、請求項４に記載の細菌含有歯肉モデル。
【請求項６】
前記細菌が歯周病菌である、請求項１～５のいずれか一項に記載の細菌含有歯肉モデル。
【請求項７】
断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞とを接触させること、及び、前記第一の細胞を培養することを行うことで、結合組織構造体を形成させる第一の工程、
前記結合組織構造体に、上皮細胞を含む第二の細胞を接触させること、及び、前記結合組織構造体及び前記第二の細胞を培養することを行うことで、前記結合組織構造体上に上皮構造体を形成させて、細胞構造体を得る第二の工程、並びに、
前記細胞構造体の前記上皮構造体に、細菌を接触させる工程を備え、
前記断片化された細胞外マトリックス成分の平均長が１００ｎｍ以上２００μｍ以下であり、
前記第一の細胞と接触させる際の前記断片化された細胞外マトリックス成分の量が、１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓの細胞に対して、０．１～１００ｍｇである、細菌含有歯肉モデルの製造方法。
【請求項８】
前記第一の細胞が、血管内皮細胞を含む、請求項７に記載の細菌含有歯肉モデルの製造方法。
【請求項９】
前記細菌を接触させる工程後に、前記細胞構造体及び細菌を培養して、前記細菌を前記細胞構造体の内部に移動させる工程を備える、請求項７又は８に記載の細菌含有歯肉モデルの製造方法。
【請求項１０】
請求項１～６のいずれか一項に記載の細菌含有歯肉モデルを用いて細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法であって、細胞構造体の上皮構造体に細菌を接触させた後に、前記細胞構造体及び／又は前記細菌の挙動を評価する工程を含む、細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞構造体及びその製造方法に関する。本発明はまた、細菌含有組織モデル及びその製造方法並びに細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法にも関する。
【背景技術】
【０００２】
人工的に生体組織を模した構造体を作製する手法として、例えば、コラーゲンを含む被膜でコートされた細胞を三次元に配置して、三次元組織体を形成することを含む、三次元組織体を製造する方法（特許文献１）、細胞をカチオン性物質及び細胞外マトリックス成分と混合して混合物を得て、得られた混合物から細胞を集めて、基材上に細胞集合体を形成することを含む、立体的細胞組織の製造方法（特許文献２）等が知られている。また、本発明者らは、細胞と断片化された外因性コラーゲンを接触させることで、比較的少ない細胞数で、厚さが１ｍｍ以上である、サイズが大きい三次元組織体を製造する方法（特許文献３）を提案している。これらのような三次元組織体は、実験動物の代替品、移植材料等としての利用が期待されている。
【先行技術文献】

【特許文献】
【０００３】
【文献】国際公開第２０１５／０７２１６４号
【文献】国際公開第２０１７／１４６１２４号
【文献】国際公開第２０１８／１４３２８６号
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
本発明の目的は、より生体組織に近い細胞構造体及びその製造方法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】
【０００５】
すなわち、本発明は、例えば以下の各発明に関する。
［１］結合組織構造体と、該結合組織構造体上に配置された上皮構造体とを備え、結合組織構造体が、断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞とを含み、断片化された細胞外マトリックス成分の少なくとも一部が第一の細胞間に配置されており、上皮構造体が、上皮細胞を含む、細胞構造体。
［２］間葉系細胞が、線維芽細胞を含む、［１］に記載の細胞構造体。
［３］断片化された細胞外マトリックス成分が、断片化されたコラーゲン成分を含む、［１］又は［２］に記載の細胞構造体。
［４］第一の細胞が血管内皮細胞を更に含み、結合組織構造体が細胞間に血管網を有する、［１］～［３］のいずれかに記載の細胞構造体。
［５］結合組織構造体が間葉系細胞間に血管網を有する、［４］に記載の細胞構造体。
［６］［１］～［５］のいずれかに記載の細胞構造体と、細胞構造体の内部に、又は細胞構造体の上皮構造体と接するように配置された細菌とを備える、細菌含有組織モデル。
［７］細菌が歯周病菌である、［６］に記載の細菌含有組織モデル。
［８］断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞とを接触させること、及び、第一の細胞を培養することを行うことで、結合組織構造体を形成させる第一の工程、並びに、結合組織構造体に、上皮細胞を含む第二の細胞を接触させること、及び、結合組織構造体及び第二の細胞を培養することを行うことで、結合組織構造体上に上皮構造体を形成させて、細胞構造体を得る第二の工程を備える、細胞構造体の製造方法。
［９］第一の細胞が、血管内皮細胞を含む、［８］に記載の細胞構造体の製造方法。
［１０］第一の細胞と接触させる際の断片化された細胞外マトリックス成分の量が、１．０×10^{6}ｃｅｌｌｓの細胞に対して、０．１～１００ｍｇである、［８］又は［９］に記載の細胞構造体の製造方法。
［１１］［８］～［１０］のいずれかに記載の製造方法により得られる細胞構造体の上皮構造体に、細菌を接触させる工程を備える、細菌含有組織モデルの製造方法。
［１２］細菌を接触させる工程後に、細胞構造体及び細菌を培養して、細菌を細胞構造体の内部に移動させる工程を備える、［１１］に記載の細菌含有組織モデルの製造方法。
［１３］［１］～［５］のいずれかに記載の細胞構造体の上皮構造体に細菌を接触させた後に、細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する工程を含む、細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法。
【発明の効果】
【０００６】
本発明によれば、より生体組織に近い細胞構造体及びその製造方法を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【０００７】
【図１】ヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ）染色した細胞構造体の顕微鏡観察結果を示す写真である。

【図２】細胞構造体中の結合組織における血管網の形成を示す写真である。
【図３】歯周病菌の生着及び浸潤の確認結果（Ｉｍａｇｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ）を示す写真である。
【図４】Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの血管網を有する細胞構造体に対する生着及び浸潤の確認結果を示す写真である。
【図５】血管網と共局在するＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの定量評価結果を示すグラフである。
【図６】歯肉モデル組織内部に浸潤したＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの数の定量評価結果を示すグラフである。
【図７】Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ感染後のＩＬ－６分泌量の評価結果を示すグラフである。
【図８】Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが上皮構造体を透過する挙動の評価方法を示す図である。
【図９】Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが上皮構造体を透過する挙動の評価結果を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【０００８】
以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。
【０００９】
＜細胞構造体＞
本実施形態に係る細胞構造体は、結合組織構造体と、該結合組織構造体上に配置された上皮構造体とを備える。本実施形態に係る細胞構造体において、結合組織構造体は、断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞と、を含み、断片化された細胞外マトリックス成分の少なくとも一部が第一の細胞間に配置されている。本実施形態に係る細胞構造体において、上皮構造体は、上皮細胞を含む。
【００１０】
細胞構造体は、例えば、生体組織モデルとして用いることができる。生体組織モデルの具体例として、例えば、歯肉モデル、口腔粘膜モデル、皮膚モデル、角膜モデル等が挙げられる。
【００１１】
本明細書において「細胞構造体」とは、細胞外マトリックス成分を介して細胞が三次元的に配置されている細胞の集合体であって、細胞培養によって人工的に作られる集合体を意味する。細胞構造体の形状は特に制限はなく、例えば、シート状、球体状、楕円体状、直方体状等が挙げられる。ここで、生体組織は、汗腺、リンパ管、脂腺等を含み、構成が細胞構造体より複雑である。そのため、細胞構造体と生体組織とは容易に区別可能である。
【００１２】
（細胞）
本明細書において「細胞」は、特に限定されないが、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、マウス、ラット等の哺乳類動物に由来する細胞であってよい。細胞の由来部位も特に限定されず、骨、筋肉、内臓、神経、脳、骨、皮膚、血液等に由来する体細胞であってもよく、生殖細胞であってもよい。さらに、細胞は、幹細胞であってもよく、また、初代培養細胞、継代培養細胞及び細胞株細胞等の培養細胞であってもよい。
【００１３】
本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能及び多分化能を有する細胞を意味する。幹細胞には、任意の細胞腫に分化する能力を持つ多能性幹細胞と、特定の細胞腫に分化する能力を持つ組織幹細胞（体性幹細胞とも呼ばれる）が含まれる。多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、体細胞由来ＥＳ細胞（ｎｔＥＳ細胞）及び人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）が挙げられる。組織幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（例えば、脂肪幹細胞、骨髄由来幹細胞）、造血幹細胞及び神経幹細胞が挙げられる。脂肪幹

細胞としては、例えば、ヒト脂肪幹細胞（ＡＤＳＣ）が挙げられる。

【００１４】

細胞構造体は、トリプシンの濃度０．２５％、温度３７℃、ｐＨ７．４、反応時間１５分でトリプシン処理を行った後の残存率が７０％以上であってよく、８０％以上であってよく、９０％以上であってよい。このような細胞構造体は、培養中又は培養後において酵素による分解が起きにくく、安定である。上記残存率は、例えば、トリプシン処理の前後における細胞構造体の質量から算出できる。

【００１５】

上記細胞構造体は、コラゲナーゼの濃度０．２５％、温度３７℃、ｐＨ７．４、反応時間１５分でコラゲナーゼ処理を行った後の残存率が７０％以上であってよく、８０％以上であってよく、９０％以上であってよい。このような細胞構造体は、培養中又は培養後における酵素による分解が起きにくく、安定である。

【００１６】

上記細胞構造体の厚さは１０μｍ以上であることが好ましく、１００μｍ以上であることがより好ましく、１０００μｍ以上であることが更により好ましい。このような細胞構造体は、生体組織により近い構造であり、実験動物の代替品、及び移植材料として好適なものとなる。細胞構造体の厚さの上限は、特に制限されないが、例えば、１０ｍｍ以下であってもよいし、３ｍｍ以下であってもよいし、２ｍｍ以下であってもよいし、１．５ｍｍ以下であってもよいし、１ｍｍ以下であってもよい。

【００１７】

ここで、「細胞構造体の厚さ」とは、細胞構造体がシート状、又は直方体状である場合、主面に垂直な方向における両端の距離を意味する。上記主面に凹凸がある場合、厚さは上記主面の最も薄い部分における距離を意味する。

【００１８】

細胞構造体が球体状である場合、その直径を意味する。細胞構造体が楕円体状である場合、その短径を意味する。細胞構造体が略球体状又は略楕円体状であって表面に凹凸がある場合、厚さは、細胞構造体の重心を通る直線と上記表面とが交差する２点間の距離であって最短の距離を意味する。

【００１９】

［結合組織構造体］

結合組織構造体は、断片化された細胞外マトリックス成分及び第一の細胞を含む。断片化された細胞外マトリックス成分の少なくとも一部は、第一の細胞間に配置されている。細胞構造体において、断片化された細胞外マトリックス成分を用いることにより、より高密度の細胞外マトリックス分子を含む結合組織構造体の形成が可能であり、より厚い結合組織構造体が形成されやすくなる。

【００２０】

（断片化された細胞外マトリックス成分）

本明細書において「細胞外マトリックス成分」とは、複数の細胞外マトリックス分子によって形成されている細胞外マトリックス分子の集合体である。細胞外マトリックスとは、生物において細胞の外に存在する物質を意味する。細胞外マトリックスとしては、細胞の生育及び細胞集合体の形成に悪影響を及ぼさない限り、任意の物質を用いることができる。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、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン及びフィブリリン等が挙げられるが、これらに限定されない。細胞外マトリックス成分は、これらの１種単独で用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。細胞外マトリックス成分は、例えば、コラーゲン成分を含んでいてよく、コラーゲン成分であってもよい。本実施形態における細胞外マトリックス成分は、動物細胞の外に存在する物質、すなわち動物の細胞外マトリックス成分であることが好ましい。なお、細胞外マトリックス分子は、細胞の生育及び細胞集合体の形成に悪影響を及ぼさない限り、上述の細胞外マトリックス分子の改変体及びバリアントであってもよく、化学合成ペプチド等のポリペプチドであってもよい。

【００２１】
「断片化」とは、細胞外マトリックス成分の集合体をより小さなサイズにすることを意味する。断片化された細胞外マトリックス成分は、解繊された細胞外マトリックス成分を含んでもよい。解繊された細胞外マトリックス成分は、上述の細胞外マトリックス成分を物理的な力の印加により解繊した成分である。例えば、解繊は、細胞外マトリックス分子内の結合を切断しない条件で行われるものである。
【００２２】
断片化された細胞外マトリックス成分の形状は任意の形状とすることができる。具体例としては、線維状、紡錘状、不定形、球状、粒状、粉状、扁平状及びシート状が挙げられるが、これらに限定されない。生物内における細胞外マトリックス成分の形状と同一又は類似する形状であることが好ましい。例えば、細胞外マトリックス成分がコラーゲンである場合には、線維状であることが好ましい。
【００２３】
コラーゲン成分等の細胞外マトリックス成分を断片化する方法は特に制限はないが、物理的な力の印加によって断片化してよい。細胞外マトリックス成分を断片化する方法は、例えば、塊状の細胞外マトリックス成分を細かく砕く方法であってよい。細胞外マトリックス成分はそのまま断片化されてもよい。つまり、細胞外マトリックス成分は、固相で断片化されてもよい。また、細胞外マトリックス成分は、水性媒体中で断片化されてもよい。物理的な力の印加による細胞外マトリックス成分の断片化は、例えば、超音波式ホモジナイザー、撹拌式ホモジナイザー、及び高圧式ホモジナイザー等を用いて行うことができる。撹拌式ホモジナイザーを用いる場合、細胞外マトリックス成分をそのままホモジナイズしてもよいし、生理食塩水等の水性媒体中でホモジナイズしてもよい。また、ホモジナイズする時間、回数等を調整することでミリメートルサイズ、ナノメートルサイズの断片化された細胞外マトリックス成分を得ることも可能である。
【００２４】
断片化された細胞外マトリックス成分のサイズは、例えば、電子顕微鏡によって個々の断片化された細胞外マトリックス成分を解析することによって求めることが可能である。繊維状の断片化された細胞外マトリックス成分のサイズは、長手方向の長さとしてよく、繊維状以外の形状の断片化された細胞外マトリックス成分は、断片化された細胞外マトリックス成分における一端と他端とを結ぶ直線の最大長さとしてよい。
【００２５】
断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズは、１００ｎｍ以上４００μｍ以下であってよく、１００ｎｍ以上２００μｍ以下であってよい。一実施形態において、断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズは、厚い組織が形成しやすくなる観点から、５μｍ以上４００μｍ以下であってよく、１０μｍ以上４００μｍ以下であってよく、１００μｍ以上４００μｍ以下であってよい。他の実施形態において、断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズは、１００μｍ以下であってよく、５０μｍ以下であってよく、３０μｍ以下であってよく、１５μｍ以下であってよく、１０μｍ以下であってよく、１μｍ以下であってよく、１００ｎｍ以上であってよい。断片化された細胞外マトリックス成分全体のうち、大部分の断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズが上記数値範囲内であることが好ましい。具体的には、断片化された細胞外マトリックス成分全体のうち、５０％以上の断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズが上記数値範囲内であることが好ましく、９５％の断片化された細胞外マトリックス成分の平均サイズが上記数値範囲内であることがより好ましい。断片化された細胞外マトリックス成分は、平均サイズが上記範囲内である断片化されたコラーゲン成分であることが好ましい。
【００２６】
断片化された細胞外マトリックス成分の平均長は、１００ｎｍ以上４００μｍ以下であってよく、１００ｎｍ以上２００μｍ以下であってよい。一実施形態において、断片化された細胞外マトリックス成分の平均長は、厚い組織が形成しやすくなる観点から、５μｍ以上４００μｍ以下であってよく、１０μｍ以上４００μｍ以下であってよく、１００μ

m以上４００μm以下であってよい。他の実施形態において、断片化された細胞外マトリックス成分の平均長は、１００μm以下であってよく、５０μm以下であってよく、３０μm以下であってよく、１５μm以下であってよく、１０μm以下であってよく、１μm以下であってよく、１００nm以上であってよい。断片化された細胞外マトリックス成分全体のうち、大部分の断片化された細胞外マトリックス成分の平均長が上記数値範囲内であることが好ましい。具体的には、断片化された細胞外マトリックス成分全体のうち、５０％以上の断片化された細胞外マトリックス成分の平均長が上記数値範囲内であることが好ましく、９５％の断片化された細胞外マトリックス成分の平均長が上記数値範囲内であることがより好ましい。断片化された細胞外マトリックス成分は、平均長が上記範囲内である断片化されたコラーゲン成分であることが好ましい。

【００２７】

断片化された細胞外マトリックス成分の平均径は、５０ｎm～３０μmであってよく、４μm～３０μmであってよく、５μm～３０μmであってよい。断片化された細胞外マトリックス成分は、平均径が上記範囲内である断片化されたコラーゲン成分であることが好ましい。

【００２８】

断片化された細胞外マトリックス成分の平均長及び平均径は、光学顕微鏡等によって個々の断片化された細胞外マトリックス成分を測定し、画像解析することによって求めることが可能である。本明細書において、「平均長」は、測定した試料の長手方向の長さの平均値を意味し、「平均径」は、測定した試料の長手方向に直交する方向の長さの平均値を意味する。

【００２９】

細胞外マトリックス成分がコラーゲン成分である場合、断片化された細胞外マトリックス成分は「断片化コラーゲン成分」とも称される。「断片化コラーゲン成分」とは、線維性コラーゲン成分等のコラーゲン成分を断片化したものであって、三重らせん構造を維持しているものを意味する。断片化コラーゲン成分の平均長は、１００ｎm～２００μmであることが好ましく、２２μm～２００μmであることがより好ましく、１００μm～２００μmであることがさらにより好ましい。断片化コラーゲン成分の平均径は、５０ｎm～３０μmであることが好ましく、４μm～３０μmであることがより好ましく、２０μm～３０μmであることがさらにより好ましい。

【００３０】

断片化された細胞外マトリックス成分の少なくとも一部は分子間又は分子内で架橋されていてよい。細胞外マトリックス成分は、細胞外マトリックス成分を構成する細胞外マトリックス分子の分子内又は分子間で架橋されていてよい。

【００３１】

架橋する方法としては、例えば、熱、紫外線、放射線等の印加による物理架橋、架橋剤、酵素反応等による化学架橋等による方法が挙げられるが、その方法は特に限定されない。細胞の生育を妨げない観点からは、物理架橋が好ましい。架橋（物理架橋及び化学架橋）は、共有結合を介した架橋であってよい。

【００３２】

細胞外マトリックス成分がコラーゲン成分を含む場合、架橋は、コラーゲン分子（三重らせん構造）の間で形成されていてもよく、コラーゲン分子によって形成されたコラーゲン細繊維の間で形成されていてもよい。架橋は、熱による架橋（熱架橋）であってよい。熱架橋は、例えば、真空ポンプを使って減圧下で、加熱処理を行うことにより実施することができる。コラーゲン成分の熱架橋を行う場合、細胞外マトリックス成分は、コラーゲン分子のアミノ基が、同一又は他のコラーゲン分子のカルボキシ基とペプチド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）を形成することにより、架橋されていてよい。

【００３３】

細胞外マトリックス成分は架橋剤を使用することによっても、架橋させることができる。架橋剤は、例えば、カルボキシル基とアミノ基を架橋可能なもの、又はアミノ基同士を

架橋可能なものであってよい。架橋剤としては、例えば、アルデヒド系、カルボジイミド系、エポキシド系及びイミダゾール系架橋剤が経済性、安全性及び操作性の観点から好ましく、具体的には、グルタルアルデヒド、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、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－４－エチル）カルボジイミド・スルホン酸塩等の水溶性カルボジイミドを挙げることができる。

【００３４】

架橋度の定量は、細胞外マトリックス成分の種類、架橋する手段等に応じて、適宜選択することができる。架橋度は、１％以上、２％以上、４％以上、８％以上、又は１２％以上であってよく、３０％以下、２０％以下、又は１５％以下であってもよい。架橋度が上記範囲にあることにより、細胞外マトリックス分子が適度に分散することができ、また、乾燥保存後の再分散性が良好である。

【００３５】

細胞外マトリックス成分中のアミノ基が架橋に使用される場合、架橋度は、Ａｃｔａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｉａ，２０１５，ｖｏｌ．２５，ｐｐ．１３１－１４２等に記載されているＴＮＢＳ（２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸）法に基づき定量することが可能である。ＴＮＢＳ法による架橋度が、上述の範囲内であってもよい。ＴＮＢＳ法による架橋度は、細胞外マトリックスが有するアミノ基のうち架橋に使われているアミノ基の割合である。細胞外マトリックス成分がコラーゲン成分を含む場合、ＴＮＢＳ法により測定される架橋度が上記範囲内であることが好ましい。

【００３６】

架橋度は、カルボキシル基を定量することにより、算出してもよい。例えば、水に不溶性の細胞外マトリックス成分の場合、ＴＢＯ（トルイジンブルーＯ）法により定量してもよい。ＴＢＯ法による架橋度が、上述した範囲内であってもよい。

【００３７】

細胞構造体における細胞外マトリックス成分含有率は、結合組織構造体の乾燥重量を基準として、０．０１～９０質量％であってよく、１０～９０質量％であることが好ましく、１０～８０質量％であることが好ましく、１０～７０質量％であることが好ましく、１０～６０質量％であることが好ましく、１～５０質量％であることが好ましく、１０～５０質量％であることが好ましく、１０～３０質量％であることがより好ましく、２０～３０質量％であることがより好ましい。

【００３８】

ここで、「細胞構造体における細胞外マトリックス成分」とは、細胞構造体を構成する細胞外マトリックス成分を意味し、内因性細胞外マトリックス成分に由来していてもよく、外因性細胞外マトリックス成分に由来していてもよい。

【００３９】

「内因性の細胞外マトリックス成分」とは、細胞外マトリックス産生細胞が産生する細胞外マトリックス成分を意味する。細胞外マトリックス産生細胞としては、例えば、上述した線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞等の間葉系細胞が挙げられる。内因性細胞外マトリックス成分は、線維性であってもよいし、非線維性であってもよい。

【００４０】

「外因性の細胞外マトリックス成分」とは、外部から供給される細胞外マトリックス成分を意味する。本実施形態に係る細胞構造体は、外因性の細胞外マトリックス成分である断片化された細胞外マトリックス成分を含む。外因性の細胞外マトリックス成分は、由来となる動物種が内因性の細胞外マトリックス成分と同じであっても異なっていてもよい。由来となる動物種としては、例えば、ヒト、ブタ、ウシ等が挙げられる。また、外因性の細胞外マトリックス成分は、人工の細胞外マトリックス成分であってもよい。

【００４１】

細胞外マトリックス成分がコラーゲン成分である場合には、外因性の細胞外マトリックス成分は「外因性コラーゲン成分」とも称され、外部から供給されるコラーゲン成分を意味する「外因性コラーゲン成分」は、複数のコラーゲン分子によって形成されている、コ

ラーゲン分子の集合体であり、具体的には、線維性コラーゲン、非線維性コラーゲン等が挙げられる。外因性コラーゲン成分は、線維性コラーゲンであることが好ましい。上記線維性コラーゲンは、コラーゲン線維の主成分となるコラーゲン成分を意味し、例えば、Ｉ型コラーゲン、ＩＩ型コラーゲン、ＩＩＩ型コラーゲンが挙げられる。上記線維性コラーゲンは、市販されているコラーゲンを用いてもよく、その具体例としては、日本ハム株式会社製のブタ皮膚由来Ｉ型コラーゲンが挙げられる。外因性の非線維性コラーゲンとしては、例えば、ＩＶ型コラーゲンが挙げられる。

【００４２】

外因性の細胞外マトリックス成分において、由来する動物種は、細胞とは異なっていてよい。また、細胞が、細胞外マトリックス産生細胞を含む場合、外因性の細胞外マトリックス成分において、由来する動物種は、細胞外マトリックス産生細胞とは異なっていてもよい。つまり、外因性の細胞外マトリックス成分は、異種細胞外マトリックス成分であってよい。

【００４３】

すなわち、細胞構造体が内因性細胞外マトリックス成分及び断片化された細胞外マトリックス成分を含む場合、上記細胞構造体を構成する細胞外マトリックス成分含有率は、内因性細胞外マトリックス成分及び断片化された細胞外マトリックス成分の合計量を意味する。上記細胞外マトリックス含有率は、得られた細胞構造体の体積、及び脱細胞化した細胞構造体の質量から算出することが可能である。

【００４４】

例えば、細胞構造体に含まれる細胞外マトリックス成分がコラーゲン成分である場合、細胞構造体におけるコラーゲン成分を定量する方法としては、例えば、以下のようなヒドロキシプロリンを定量する方法が挙げられる。細胞構造体を溶解した溶解液に、塩酸（ＨＣｌ）を混合し、高温で所定の時間インキュベートした後に室温に戻し、遠心分離した上澄みを所定の濃度に希釈することでサンプルを調製する。ヒドロキシプロリンスタンダード溶液をサンプルと同様に処理した後、段階的に希釈してスタンダードを調製する。サンプル及びスタンダードのそれぞれに対してヒドロキシプロリンアッセイバッファ及び検出試薬で所定の処理をし、５７０ｎｍの吸光度を測定する。サンプルの吸光度をスタンダードと比較することでコラーゲン成分量を算出する。なお、細胞構造体を、高濃度の塩酸に直接懸濁して溶解した溶解液を遠心分離して上澄みを回収し、コラーゲン成分定量に用いてもよい。また、溶解させる細胞構造体は、培養液から回収したままの状態であってもよいし、回収後に乾燥処理を行い、液体成分を除去した状態で溶解させてもよい。但し、培養液から回収したままの状態の細胞構造体を溶解してコラーゲン成分定量を行う場合、細胞構造体が吸収している培地成分、及び実験手技の問題による培地の残りの影響で、細胞構造体重量の計測値がばらつくことが予想されるため、組織体の重量及び単位重量あたりに占めるコラーゲン成分量を安定して計測する観点からは、乾燥後の重量を基準とすることが好ましい。

【００４５】

コラーゲン成分量を定量する方法として、より具体的には、例えば、以下のような方法が挙げられる。

（サンプルの調製）

凍結乾燥処理を行った細胞構造体の全量を６ｍｏｌ／Ｌ　ＨＣｌと混合し、ヒートブロックで９５℃、２０時間以上インキュベートした後、室温に戻す。１３０００ｇで１０分遠心分離した後、サンプル溶液の上澄みを回収する。後述する測定において結果が検量線の範囲内に収まるように６ｍｏｌ／Ｌ　ＨＣｌで適宜希釈した後、２００μＬを１００μＬの超純水で希釈することでサンプルを調製する。サンプルは３５μＬ用いる。

【００４６】

（スタンダードの調製）

スクリューキャップチューブに１２５μＬのスタンダード溶液（１２００μｇ／ｍＬ　ｉｎ　ａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）と、１２５μＬの１２ｍｏｌ／ｌ　ＨＣｌを加え混合し、

ヒートブロックで９５℃、２０時間インキュベートした後、室温に戻す。１３０００ｇで１０分遠心分離した後、上澄みを超純水で希釈して３００μｇ／ｍＬのＳ１を作製し、Ｓ１を段階的に希釈してＳ２（２００μｇ／ｍＬ）、Ｓ３（１００μｇ／ｍＬ）、Ｓ４（５０μｇ／ｍＬ）、Ｓ５（２５μｇ／ｍＬ）、Ｓ６（１２．５μｇ／ｍＬ）、Ｓ７（６．２５μｇ／ｍＬ）を作製する。４ｍｏｌ／ｌ　ＨＣｌ９０μＬのみのＳ８（０μｇ／ｍＬ）も準備する。

【００４７】

（アッセイ）

３５μＬのスタンダード及びサンプルをそれぞれプレート（ＱｕｉｃｋＺｙｍｅ　Ｔｏｔａｌ　Ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ａｓｓａｙキット付属、ＱｕｉｃｋＺｙｍｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）に加える。７５μＬのアッセイバッファ（上記キット付属）をそれぞれのウェルに加える。シールでプレートを閉じ、２０分シェイキングしながら室温でインキュベートする。シールをはがし、７５μＬのｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔ（ｒｅａｇｅｎｔ　Ａ：Ｂ＝３０μＬ：４５μＬ、上記キット付属）をそれぞれのウェルに加える。シールでプレートを閉じ、シェイキングで溶液を混合し、６０℃で６０分インキュベートする。氷上で十分に冷まし、シールをはがして５７０ｎｍの吸光度を測定する。サンプルの吸光度をスタンダードと比較することでコラーゲン成分量を算出する。

【００４８】

細胞構造体中に占めるコラーゲン成分を、その面積比又は体積比によって規定してもよい。「面積比又は体積比によって規定する」とは、例えば細胞構造体中のコラーゲン成分を既知の染色手法（例えば、抗コラーゲン抗体を用いた免疫染色、又はマッソントリクローム染色）等で他の組織構成物と区別可能な状態にした上で、肉眼観察、各種顕微鏡及び画像解析ソフト等を用いて、細胞構造体全体に占めるコラーゲン成分の存在領域の比率を算出することを意味する。面積比で規定する場合、細胞構造体中の如何なる断面もしくは表面によって面積比を規定するかは限定されないが、例えば細胞構造体が球状体等である場合には、その略中心部を通る断面図によって規定してもよい。

【００４９】

例えば、細胞構造体中のコラーゲン成分を面積比によって規定する場合、その面積の割合は、上記細胞構造体の全体の面積を基準として０．０１～９９％であり、１～９９％であることが好ましく、５～９０％であることが好ましく、７～９０％であることが好ましく、２０～９０％であることが好ましく、５０～９０％であることがより好ましい。「細胞構造体におけるコラーゲン成分」については、上述したとおりである。細胞構造体を構成するコラーゲン成分の面積の割合は、内因性コラーゲン成分及び外因性コラーゲン成分を合わせた面積の割合を意味する。コラーゲン成分の面積の割合は、例えば、得られた細胞構造体をマッソントリクロームで染色し、細胞構造体の略中心部を通る断面の全体の面積に対する、青く染色したコラーゲン成分の面積の割合として算出することが可能である。

【００５０】

（第一の細胞）

第一の細胞は、本実施形態に係る細胞構造体において、結合組織構造体を構成する細胞である。第一の細胞は、少なくとも間葉系細胞を含む。間葉系細胞としては、線維芽細胞、骨細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋細胞、腱細胞、脂肪細胞、毛乳頭細胞、歯髄細胞等の結合組織の細胞、並びに上記の細胞に分化する能力を有する細胞等が挙げられる。内因性の細胞外マトリックス成分が分泌され、結合組織構造体の結合力がより一層強くなる観点から、間葉系細胞は、好ましくは線維芽細胞を含む。

【００５１】

間葉系細胞の含有率は、結合組織構造体における全細胞数に対して、例えば、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。

【００５２】

本実施形態における細胞構造体は、断片化された細胞外マトリックス成分及び間葉系細

胞を含む結合組織構造体を備えることにより、例えば、細胞間の高い接着性を発現することができる。この結果として、本実施形態に係る細胞構造体は、より生体組織に近い構造体であることができる。

【００５３】

第一の細胞は、間葉系細胞以外の他の細胞を更に含んでいてもよい。当該他の細胞としては、血管内皮細胞、大腸がん細胞（例えば、ヒト大腸がん細胞（ＨＴ２９））、肝がん細胞等のがん細胞、心筋細胞、リンパ管内皮細胞、神経細胞、樹状細胞、肝細胞、接着性細胞（例えば、免疫細胞）、平滑筋細胞（例えば、大動脈平滑筋細胞（Ａｏｒｔａ－ＳＭＣ））、膵島細胞、角化細胞（例えば、ヒト表皮角化細胞）等が挙げられる。第一の細胞は、より生体組織に近い細胞構造体が形成可能になる観点から、血管内皮細胞を含んでいてよい。

【００５４】

本明細書において「血管内皮細胞」は、血管内腔の表面を構成する扁平状の細胞を意味する。血管内皮細胞としては、例えば、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）が挙げられる。

【００５５】

血管内皮細胞の含有率は、結合組織構造体における全細胞数に対して、例えば、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。

【００５６】

（細胞間の血管網）

第一の細胞が血管内皮細胞を含む場合、結合組織構造体は、細胞間に血管網を有することができる。結合組織構造体は、間葉系細胞間に血管網を有することが好ましい。「細胞間に血管網を有する」とは、生体組織と同様に、分岐した血管が細胞を取り囲むように細胞と細胞の間に延びた構造を有することを意味する。

【００５７】

本実施形態に係る細胞構造体は、生体組織のように細胞間に血管網を形成させることができるため、厚みのある細胞構造体であっても長期間維持できることが期待される。また、血管網を有することができる細胞構造体は、哺乳類等に移植した際に生着しやすくなることも期待される。

【００５８】

生体組織と同様の血管網が形成されているか否かについては、例えば、生体組織における血管の分岐数及び／又は血管の分岐間の長さ及び／又は血管の直径の多様性に基づき判断することができる。例えば、生体組織における血管の分岐数の平均値に対する、細胞構造体における血管の分岐数の平均値が、８０％以上１５０％以下、８５％以上１３０％以下、又は９０％以上１２０％以下である場合に、生体組織における血管の分岐数と類似していると判断してもよい。

【００５９】

例えば、結合組織構造体における血管の分岐数の平均値が、２．５以上４．５以下、又は３．０以上４．２以下である場合に、生体組織における血管の分岐数と類似していると判断してもよい。例えば、生体組織における血管の分岐間の長さの平均値に対する、結合組織構造体における血管の分岐間の長さの平均値が、８０％以上１５０％以下、８５％以上１３０％以下、又は９０％以上１２０％以下である場合に、生体組織における血管の分岐間の長さと類似していると判断してもよい。生体組織においては、太い血管及び細い血管の両方が観察される。そこで、例えば、生体組織と同様に直径の太いもの（例えば、１０μｍ以上２５μｍ未満）と細いもの（例えば、０μｍ超１０μｍ未満）の両方が観察された場合には、生体組織における血管の直径と同様の多様性を有すると判断してもよい。また、例えば、０μｍ超２５μｍ未満に血管直径全体の６０％以上、７０％以上又は８０％以上が分布している場合に、生体組織における血管の直径と同様の多様性を有すると判断してもよい。

【００６０】
［上皮構造体］
上皮構造体は、第二の細胞を含む。第二の細胞は、本実施形態に係る細胞構造体において、上皮構造体を構成する細胞である。第二の細胞は、少なくとも上皮細胞を含む。上皮細胞としては、例えば、ヒト歯肉上皮細胞が挙げられる。上皮細胞は、例えば、ヒト歯肉上皮細胞が形質転換された不死化上皮細胞であってもよい。
【００６１】
第二の細胞は、上皮細胞以外の他の細胞を更に含んでいてもよい。当該他の細胞としては、血管内皮細胞、脂肪細胞、大腸がん細胞（例えば、ヒト大腸がん細胞（ＨＴ２９））、肝がん細胞等のがん細胞、心筋細胞、リンパ管内皮細胞、神経細胞、樹状細胞、肝細胞、接着性細胞（例えば、免疫細胞）、平滑筋細胞（例えば、大動脈平滑筋細胞（Ａｏｒｔａ－ＳＭＣ））、膵島細胞、角化細胞（例えば、ヒト表皮角化細胞）等が挙げられる。
【００６２】
上皮細胞の含有率は、上皮構造体における全細胞数に対して、例えば、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。
【００６３】
＜細胞構造体の製造方法＞
本実施形態に係る細胞構造体の製造方法は、断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞とを接触させること、及び、第一の細胞を培養することを行うことで、結合組織構造体を形成させる第一の工程、並びに、結合組織構造体に、上皮細胞を含む第二の細胞を接触させること、及び、結合組織構造体及び第二の細胞を培養することを行うことで、結合組織構造体上に上皮構造体を形成させて、細胞構造体を得る第二の工程を備える。
【００６４】
［第一の工程］
第一の工程では、断片化された細胞外マトリックス成分と、間葉系細胞を含む第一の細胞とを接触させること（第一の接触工程）、及び、第一の細胞を培養すること（第一の培養工程）をこの順に行うことで、結合組織構造体を形成させる。
【００６５】
結合組織構造体は、断片化された細胞外マトリックス成分及び第一の細胞を含む。断片化された細胞外マトリックス成分及び第一の細胞については上述したとおりであってよい。
【００６６】
断片化された細胞外マトリックス成分は、水性媒体に分散させることにより、水性媒体中で細胞と接触しやすくなり、結合組織構造体の形成を促進し得る。
【００６７】
（第一の接触工程）
断片化された細胞外マトリックス成分と、第一の細胞とは、水性媒体中で接触させてよい。断片化された細胞外マトリックス成分と、第一の細胞とを接触させる方法としては、断片化された細胞外マトリックス成分を含有する水性媒体と、第一の細胞を含有する水性媒体と、を混合する方法、断片化された細胞外マトリックス成分を含有する水性媒体に第一の細胞を添加する方法、第一の細胞を含む培養液に断片化された細胞外マトリックス成分を含有する水性媒体を加える方法、断片化された細胞外マトリックス成分を含有する水性媒体に第一の細胞を加える方法、予め用意した水性媒体に、断片化された細胞外マトリックス成分及び第一の細胞をそれぞれ加える方法等の方法が挙げられるが、これらに限られるものではない。
【００６８】
水性媒体は、例えば、液状の培地であってよい。培地は特に制限はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な培地を選択できる。培地としては、例えば、Ｅａｇｌｅ’ｓ ＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ、Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ培地（ＭＥＭ）、Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓ

ｅｎｔｉａｌ培地、ＲＰＭＩ、及びＧｌｕｔａＭａｘ培地等が挙げられる。培地は、血清を添加した培地であってもよいし、無血清培地であってもよい。培地は、二種類の培地を混合した混合培地であってもよい。

【００６９】

断片化された細胞外マトリックス成分と第一の細胞との接触は、水性媒体中で第一の細胞の層を形成させた後に行われるものであってもよい。つまり、第一の接触工程は、水性媒体中で第一の細胞の層を形成させた後、断片化された細胞外マトリックス成分を接触させることにより行われてもよい。第一の細胞の層を細胞外マトリックス成分と接触させる前に形成することで、下層部の細胞密度が高い結合組織構造体を作製することができる。

【００７０】

断片化された細胞外マトリックス成分は上述した方法により得ることができる。断片化された細胞外マトリックス成分は、細胞外マトリックス成分を水性媒体中で断片化することにより得られるものであってよい。すなわち、本実施形態に係る製造方法は、第一の工程の前に、細胞外マトリックス成分を水性媒体中で断片化する工程（断片化工程）を備えていてよい。水性媒体は、上述の断片化された細胞外マトリックス成分を含有する水性媒体と同様であってよい。

【００７１】

断片化された細胞外マトリックス成分は、上記例示したものであってよく、断片化されたコラーゲン成分を含んでいてよい。

【００７２】

本実施形態に係る製造方法は、断片化工程前に細胞外マトリックス成分を加熱して、細胞外マトリックス成分の少なくとも一部を架橋する工程を備えていてもよいし、断片化工程後かつ接触工程前に、細胞外マトリックス成分を加熱して、細胞外マトリックス成分の少なくとも一部を架橋する工程を備えていてよい。

【００７３】

架橋する工程において、細胞外マトリックス成分を加熱する際の温度（加熱温度）及び時間（加熱時間）は適宜定めることができる。加熱温度は、例えば１００℃以上であってよく、２００℃以下であってよく、２２０℃以下であってよい。加熱温度は、具体的には、例えば、１００℃、１１０℃、１２０℃、１３０℃、１４０℃、１５０℃、１６０℃、１７０℃、１８０℃、１９０℃、２００℃、２２０℃等であってよい。加熱時間（上記加熱温度で保持する時間）は、加熱温度により適宜設定することができる。加熱時間は、例えば、１００℃～２００℃で加熱する場合、６時間以上７２時間以下であってよく、より好ましくは２４時間以上４８時間以下である。架橋する工程では、溶媒非存在下で加熱してよく、また、減圧条件下で加熱してもよい。

【００７４】

本実施形態に係る製造方法は、断片化工程後に、断片化された細胞外マトリックス成分を乾燥する乾燥工程を備えていてよい。

【００７５】

乾燥工程では、断片化された細胞外マトリックス成分を乾燥する。乾燥は、例えば、凍結乾燥法により実施してよい。断片化工程後に、乾燥工程を行うことで、断片化された細胞外マトリックス成分及び水性媒体を含む液から、水性媒体が除去される。水性媒体が除去されるとは、断片化された細胞外マトリックス成分中に一切の水分が付着していないことを意味するものではなく、上述の一般的な乾燥手法により、常識的に達することができる程度に水分が付着していないことを意味する。

【００７６】

間葉系細胞の含有率は、第一の接触工程における第一の細胞の全細胞数に対して、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上、又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。

【００７７】

第一の接触工程において、第一の細胞は、血管内皮細胞を更に含むことが好ましい。血

管内皮細胞を更に含む第一の細胞と、断片化された細胞外マトリックス成分とを用いることによって、細胞間に血管網を有する結合組織構造体を形成させることができる。

【００７８】

血管内皮細胞の含有率は、第一の接触工程における第一の細胞の全細胞数に対して、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上、又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。

【００７９】

間葉系細胞と血管内皮細胞の細胞数の比（間葉系細胞／血管内皮細胞）は、特に制限されず、例えば、１００／１～１／１００であってよく、５０／１～１／５０であってよく、２０／１～１／１であってよく、１０／１～１／１であってよく、８／１～１／１であってよく、７／１～１．２／１であってよく、６／１～１．５／１であってよく、５／１～２／１であってよく、３／１～２／１であってもよい。

【００８０】

第一の接触工程における細胞外マトリックス成分の濃度は、目的とする結合組織構造体の形状、及び厚さ、細胞構造体の形状及び厚さ、並びに、培養器のサイズ等に応じて適宜決定できる。例えば、第一の接触工程における水性媒体中の細胞外マトリックス成分の濃度は、０．１～９０質量％であってもよいし、１～３０質量％であってもよい。

【００８１】

第一の細胞と接触させる際の断片化された細胞外マトリックス成分の量は、例えば、１．０×10^6ｃｅｌｌｓの細胞に対して、０．１～１００ｍｇ、０．５～５０ｍｇ、０．８～２５ｍｇ、１．０～１０ｍｇ、１．０～５．０ｍｇ、１．０～２．０ｍｇ、又は１．０～１．８ｍｇであってよく、０．７ｍｇ以上、１．１ｍｇ以上、１．２ｍｇ以上、１．３ｍｇ以上又は１．４ｍｇ以上であってよく、７．０ｍｇ以下、３．０ｍｇ以下、２．３ｍｇ以下、１．８ｍｇ以下、１．７ｍｇ以下、１．６ｍｇ以下又は１．５ｍｇ以下であってもよい。

【００８２】

第一の接触工程において、断片化された細胞外マトリックス成分と第一の細胞との質量比（細胞外マトリックス成分／細胞）は、１／１～１０００／１であることが好ましく、９／１～９００／１であることがより好ましく、１０／１～５００／１であることがさらに好ましい。

【００８３】

（第一の培養工程）

第一の細胞を培養する方法は、特に制限はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な培養方法で行うことができる。例えば、培養温度は２０℃～４０℃であってもよく、３０℃～３７℃であってもよい。培地のｐＨは、６～８であってもよく、７．２～７．４であってもよい。培養時間は、１日～２週間であってもよく、１週間～２週間であってもよい。

【００８４】

第一の培養工程における培地中の細胞密度は、目的とする結合組織構造体の形状、厚さ、培養器のサイズ等に応じて適宜決定できる。例えば、第一の培養工程における培地中の細胞密度は、１～10^8ｃｅｌｌｓ／ｍＬであってよく、10^3～10^7ｃｅｌｌｓ／ｍＬであってよい。また、第一の培養工程における培地中の細胞密度は、第一の接触工程における水性媒体中の細胞密度と同じであってもよい。

【００８５】

第一の接触工程後かつ第一の培養工程前に、水性媒体中における細胞外マトリックス成分と第一の細胞とを共に沈降させる工程を更に含んでもよい。このような工程を行うことで、結合組織構造体における細胞外マトリックス成分及び細胞の分布が、より均一になる。具体的な方法としては、特に制限はないが、例えば細胞外マトリックス成分と細胞とを含む培養液を遠心操作する方法が挙げられる。

【００８６】

［第二の工程］

第二の接触工程では、結合組織構造体に、上皮細胞を含む第二の細胞を接触させること（第二の接触工程）、及び、結合組織構造体及び第二の細胞を培養すること（第二の培養工程）を行うことで、結合組織構造体上に上皮構造体を形成させて、細胞構造体を得る。

【００８７】

結合組織構造体に、上皮細胞を含む第二の細胞を接触させる前に、必要に応じて、結合組織構造体にコラーゲン（例えば、ＩＶ型コラーゲン）を接触させてもよい。この場合、結合組織体上に上皮構造体が配置された細胞構造体がより一層形成されやすくなる。例えば、コラーゲンを含む溶液（コラーゲン溶液）中に、結合組織構造体を保持することによって結合組織構造体にコラーゲンを接触させることができる。結合組織構造体は、例えば３７℃で、２０分間以上コラーゲン溶液中に保持してよい。コラーゲン溶液中のコラーゲン濃度は、例えば、０．０１～０．１０ｍｇ／ｍＬ又は０．０２～０．０６ｍｇ／ｍＬであってよい。

【００８８】

結合組織構造体と、第二の細胞とは、水性媒体中で接触させてよい。結合組織構造体と、第二の細胞とを接触させる方法としては、結合組織構造体を含有する水性媒体と、第二の細胞を含有する水性媒体と、を混合する方法、結合組織構造体を含有する水性媒体に第二の細胞を添加する方法、第二の細胞を含む培養液に結合組織構造体を含有する水性媒体を加える方法、結合組織構造体を含有する水性媒体に第二の細胞を加える方法、予め用意した水性媒体に、結合組織構造体及び細胞をそれぞれ加える方法等の方法が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【００８９】

水性媒体は、例えば、液状の培地であってよい。培地は特に制限はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な培地を選択できる。培地は、第一の工程で使用した培地と同種の培地であってもよく、異種の培地であってもよい。培地としては、例えば、Ｅａｇｌｅ’ｓ ＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ、Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ培地（ＭＥＭ）、Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ培地、ＲＰＭＩ、及びＧｌｕｔａＭａｘ培地等が挙げられる。培地は、血清を添加した培地であってもよいし、無血清培地であってもよい。培地は、二種類の培地を混合した混合培地であってもよい。

【００９０】

第二の接触工程において、上皮細胞の含有率は、第二の細胞の全細胞数に対して、５％以上、１０％以上、１５％以上、２０％以上、２５％以上、又は３０％以上であってよく、９５％以下、９０％以下、８０％以下、又は７５％以下であってよい。

【００９１】

（第二の培養工程）

結合組織構造体及び第二の細胞を培養する方法は、特に制限はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な培養方法で行うことができる。例えば、培養温度は２０℃～４０℃であってもよく、３０℃～３７℃であってもよい。培地のｐＨは、６～８であってもよく、７．２～７．４であってもよい。培養時間は、１日～２週間であってもよく、１週間～２週間であってもよい。

【００９２】

培地は特に制限はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な培地を選択できる。培地は、例えば上述した培地であってよい。

【００９３】

第二の培養工程における培地中の細胞密度は、目的とする細胞構造体の形状、厚さ、培養器のサイズ等に応じて適宜決定できる。例えば、第二の培養工程における培地中の細胞密度は、１～10^8ｃｅｌｌｓ／ｍＬであってよく、10^3～10^7ｃｅｌｌｓ／ｍＬであってよい。また、第二の培養工程における培地中の細胞密度は、第二の接触工程における水性媒体中の細胞密度と同じであってもよい。

【００９４】

本実施形態に係る製造方法により製造される細胞構造体は、培養中の収縮率が２０％以

下であることが好ましく、１５％以下であることがより好ましく、１０％以下であることがさらに好ましい。上記収縮率は、例えば、以下の式で算出できる。式中Ｌ１は、培養後１日目の細胞構造体のもっとも長い部分の長さを示し、Ｌ３は、培養後３日目の細胞構造体における対応する部分の長さを示す。

収縮率（％）＝｛（Ｌ１－Ｌ３）／Ｌ１｝×１００

【００９５】

上記の例では収縮率を、培養後１日目の細胞構造体と培養３日目の細胞構造体から算出しているが、培養の終了時点を含む培養期間の任意の時点での細胞構造体から算出してもよい。例えば、培養後１日目の細胞構造体と培養２日目の細胞構造体から算出してもよく、培養後１日目の細胞構造体と培養５日目の細胞構造体から算出してもよく、培養後１日目の細胞構造体と培養８日目の細胞構造体から算出してもよい。

【００９６】

第二の培養工程の後、さらに第三の細胞を接触させる工程、及び第三の細胞を培養する工程を含んでもよい。第三の細胞は、上述した細胞と同種であってよく、異種であってもよい。これにより、三層構造の細胞構造体を作製することができる。また、さらに、接触工程及び培養工程を繰り返し含むことで複数層の細胞構造体を作製することができ、より複雑な生体に近い組織を作製することもできる。

【００９７】

第二の接触工程後かつ第二の培養工程前に、水性媒体中における結合組織構造体と第二の細胞とを共に沈降させる工程を更に含んでもよい。このような工程を行うことで、細胞構造体における細胞外マトリックス成分及び細胞の分布が、より均一になる。具体的な方法としては、特に制限はないが、例えば結合組織構造体と第二の細胞とを含む培養液を遠心操作する方法が挙げられる。

【００９８】

＜細胞構造体の用途＞

本実施形態に係る細胞構造体は、例えば、移植用とすることができる。本実施形態に係る細胞構造体は、生体組織のように細胞間に血管網を有することができる。これにより、哺乳類等の動物に移植した際に生着しやすくなることも期待される。

【００９９】

移植対象である動物は特に制限されないが、例えば、哺乳類であってよく、ヒトであってもよく、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、マウス及びラット等の非ヒト動物であってよい。

【０１００】

本実施形態に係る移植方法は、本実施形態に係る細胞構造体を動物に移植することを含む。移植することの前に、移植する動物を準備すること及び／又は上述した方法により細胞構造体を作製することをさらに含んでもよい。移植方法は特に制限されず、移植対象等に合わせて適宜公知の外科的方法等により行うことができる。本実施形態に係る細胞構造体は、例えば、組織再構築に適用することができる。

【０１０１】

本実施形態に係る非ヒトモデル動物を製造する方法は、本実施形態に係る細胞構造体を非ヒト動物に移植することを含む。移植することの前に、移植する非ヒト動物を準備すること及び／又は上述した方法により細胞構造体を作製することをさらに含んでもよい。本実施形態に係る非ヒトモデル動物は、動物実験に用いて得られたデータをヒトへ当てはめるために利用することができる。非ヒトモデル動物を製造するためには、移植物（移植片）に対する拒絶を抑制した非ヒト動物、例えば、免疫力が低下又は免疫不全である非ヒト動物を用いることが好ましい。

【０１０２】

本実施形態に係る細胞構造体自体も、実験動物の代替品、移植材料等として適用することができ、具体例としては、上述したような、組織再構築、病理学的なインビトロモデル、医薬品、化粧品、或いは薬用化粧品のスクリーニング（薬剤の評価）、医薬品、化粧品

、或いは薬用化粧品のアッセイスクリーニング等に適用することができる。
【０１０３】
＜細菌含有組織モデル＞
本実施形態に係る細胞構造体は、より生体組織に近いものであるため、当該細胞構造体に細菌を配置することにより、生体組織における細菌の挙動（例えば、細菌の生着及び／又は浸潤）及び／又は細菌が細胞構造体に与える影響（例えば、細胞構造体中の細菌と接触した細胞の周囲に位置する細胞の挙動）を評価するための組織モデルとして好適に用いることができる。
【０１０４】
本発明の一実施形態として、本実施形態に係る細胞構造体と、細胞構造体の内部に、又は細胞構造体の上皮構造体と接するように配置された細菌とを備える細菌含有組織モデルが提供される。
【０１０５】
細菌は歯肉、口腔、皮膚並びに角膜等の組織に付着し、組織に対して作用し得る細菌であれば特に限定されない。細菌の具体例としては、例えば、歯周病菌、口腔細菌等であってよい。例えば、細菌が歯周病菌である場合、細菌含有組織モデルは、歯周病菌評価モデルとして用いることもできる。歯周病菌としては、例えば、Ｐｒｏｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ、Ａｇｇｒｅｇａｔｉｂａｃｔｅｒ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｃｃｌｕｓ ａｃｔｉｎｏ－ｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｆｏｒｓｙｔｈｕｓ等が挙げられる。
【０１０６】
＜細菌含有組織モデルの製造方法＞
本実施形態に係る細菌含有組織モデルの製造方法は、上述した細胞構造体の上皮構造体に、細菌を接触させる工程を備える。
【０１０７】
当該細菌含有組織モデルの製造方法は、細菌を接触させる工程後に、細胞構造体及び細菌を培養して、細菌を細胞構造体の内部に移動させる工程を更に備えていてよい。移動させる工程では、細胞構造体の上皮構造体内部、及び／又は細胞構造体の結合組織構造体の内部に細菌を移動させてよい。
【０１０８】
＜細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法＞
本発明の一実施形態として、上述した細胞構造体の上皮構造体に細菌を接触させた後に、細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する工程（評価工程）を含む、細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法が提供される。当該方法は、評価工程前に、上述した細胞構造体の上皮構造体に細菌を接触させる工程（接触工程）を含んでいてよい。
【０１０９】
細胞構造体及び／又は細菌の挙動を評価する方法において、評価工程及び／又は接触工程は、化学物質（例えば、医薬品）の存在下で行われてよい。例えば、評価工程は、細胞構造体を医薬品等に暴露した環境下、又は、細胞構造体に医薬品等を投与した環境下において行われてよい。評価工程では、細菌と接触させた細胞の周囲に位置する細胞への影響を評価してもよい。評価工程では、細菌の生着及び／又は浸潤を評価してよい。例えば、評価工程では、細菌が細胞構造体に浸潤する経路を評価することができる。
【０１１０】
評価工程は、例えば、細胞構造体の上皮構造体に細菌を接触させた直後の細胞構造体及び／又は細菌と、細菌を接触させてから所定時間（例えば、１～７２時間、２～４８時間、２～２４時間、３～８時間もしくは４～６時間）経過後の細胞構造体及び／又は細菌とを比較することにより行うことができる。例えば、細菌に含まれている核酸を染色し、細菌と接触させた細胞構造体の断面画像を取得し、取得した断面画像を比較することにより、細菌が細胞構造体の内部に移動したかどうかを評価することができる。本実施形態に係

る評価する方法により、例えば、上皮構造体若しくは結合組織構造体の内部に、又は細胞構造体の血管網に移動したかどうかを評価することができる。

【０１１１】

評価工程では、例えば、細胞構造体の挙動として、細胞構造体から分泌される炎症性サイトカイン量を評価することができる。炎症性サイトカインは、例えば、インターロイキン－６（ＩＬ－６）であってよい。炎症性サイトカイン量を評価する方法として、例えば後述する実施例に記載の方法を用いることができる。

【実施例】

【０１１２】

以下、実施例を挙げて本発明についてさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【０１１３】

＜試験例１：解繊されたコラーゲン成分の作製＞

凍結乾燥体であるブタ皮膚由来Ｉ型コラーゲン（日本ハム株式会社製）を１０倍濃度のリン酸緩衝生理食塩水（×１０　ＰＢＳ）に分散させて、Ｉ型コラーゲンの分散液を調製した。Ｉ型コラーゲンの分散液をホモジナイザーを用いて５分間ホモジナイズして、解繊されたコラーゲン（以下、「ＣＭＦ」ともいう。）を得た。得られたＣＭＦの平均長は、２２．５μｍであり、平均径は約４．４μｍであった。

【０１１４】

ＣＭＦの長手方向の長さ及び長手方向に直交する方向の長さを電子顕微鏡によって個々のＣＭＦを解析することで求めた。平均長及び平均径は、３９１個のサンプルを測定したときの平均値を示す。

【０１１５】

得られたＣＭＦを無血清培地（ＤＭＥＭ）で洗浄し、ＣＭＦの培地分散液を得た。得られたＣＭＦの培地分散液は、室温で１週間保存できた。後述する実施例において使用したＣＭＦは、同様の方法で得られたＣＭＦを用いた。

【０１１６】

＜試験例２：細胞構造体の作製＞

細胞構造体の作製において用いた細胞、試薬及び作製方法等は以下のとおりである。

・不死化ヒト歯肉上皮細胞（Ｅｐｉ４）
・培養培地：Ｈｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２（ＫＵＲＡＢＯ　ＫＫ２１５０Ｓ）
・ヒト歯肉線維芽細胞（ＨＧＦ）
・培地：ＤＭＥＭ　１０％　ＦＢＳ　ｐ／ｓ
・ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）：Ｌｏｎｚａ製　ＣＣ－２５１７
・培地：ＥＧＭ２ＭＶ（Ｌｏｎｚａ　ＣＣ－３２０２）
・Ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ：ＡＴＣＣ製　３３２７７
・培地：５％羊血寒天培地（ベクトンディッキンソン，　２５２２０１）
・Ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓのプロテアーゼ欠損株：ＡＴＣＣの株を遺伝子ノックダウン
・Ａｎｔｉ－ＣＤ３１抗体（Ｄａｋｏ、　ｍ０８２３）
・ＤＡＰＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　６２２４８）
・Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７　ファロイジン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａ２２２８７）
・Ａｎｔｉ－Ｐｒｏｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖｌｉｓ（Ｐ．ｇｉｎｇｉｖｌｉｓ）抗体

【０１１７】

歯肉由来上皮細胞（Ｅｐｉ４）、ＨＧＦ、Ｐ．Ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ（ＡＴＣＣ）のプロテアーゼ欠損株（ＡＴＣＣの株を遺伝子ノックダウン）は、大阪大学歯学部より提供されたものを使用した。細胞類の前培養はすべて標準的な手法に沿って実施した。

【０１１８】

（結合組織構造体の作製）

日本ハム株式会社製のブタ皮膚由来Ｉ型コラーゲン４ｍｇ（５分間のホモジナイゼーシ

ョンにより解繊したもの）と、正常ヒト歯肉線維芽細胞（ＨＧＦ）１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓと、ＨＵＶＥＣ５．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓとを、Ｄ－ＭＥＭ（和光純薬工業株式会社製）とＥＧＭ２ＭＶとを１：１で混ぜた混合培地に懸濁し、得られた懸濁液を２４ウェルインサート（コーニング社製）に添加し、インサート外側に混合培地を添加して、一晩培養した。これにより結合組織構造体を作製した。その後、毎日培地交換を行い、培養を行った。

【０１１９】

（上皮構造体の作製）

結合組織構造体の形成から７日後にインサートの培地を吸い取り、０．０４ｍｇ／ｍＬのコラーゲンタイプＩＶ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製）で結合組織構造体の表面をコートし、不死化ヒト歯肉上皮細胞（Ｅｐｉ４）を１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／３００μｌ／インサートになるように調整し、結合組織構造体上にＥｐｉ４を播種した。インサートの外側にＤ－ＭＥＭとＥＧＭ２ＭＶとＨｕｍｅｄｉａ（倉敷紡績株式会社製）を１：１：１で混ぜた混合培地を１ｍｌ入れ、３７℃で１時間インキュベート後、インサートの外側に混合培地を１ｍＬ追加し、一晩培養した。これにより、結合組織構造体及び上皮構造体を備える細胞構造体を作製した。この細胞構造体を後述する生着及び浸潤評価用の細胞構造体として用いることとした。

【０１２０】

Ｅｐｉ４を播種した後、１日培養した後、細胞構造体をパラホルムアルデヒドで固定してから薄切切片化し、ヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ）染色を実施した。ＨＥ染色による細胞構造体の観察結果を図１に示す。作製された細胞構造体は、結合組織構造体（図１のａ）と、結合組織構造体上に配置された上皮構造体（図１のｂ）とからなるものであることが確認された。作製された細胞構造体において、組織収縮及び組織割れは確認されなかった。

【０１２１】

作製された細胞構造体の結合組織構造体の細胞間には、ＣＭＦが配置されていることが確認された。抗ＣＤ３１抗体（Ｄａｋｏ製）による免疫染色により、作製された細胞構造体の結合組織構造体中には、血管網の形成が確認された（図２）。

【０１２２】

＜試験例３：細胞構造体の作製及び浸潤評価＞

細胞構造体がＨＵＶＥＣを含まないこと（結合組織構造体を形成させる際にＨＵＶＥＣを用いなかったこと）以外は試験例２に記載の方法と同様にして得られた評価用の細胞構造体に対して、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを２．０×１０^{7}ｃｅｌｌｓ播種した。Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは、寒天培地上で培養したものを培地から剥離してから、上皮構造体を作製したときと同じ混合培地から抗生物質を除いた培地に懸濁し、上皮構造体の上に播種した。

【０１２３】

細菌を播種した直後及び播種後（感染後）４時間経過した時点の評価用構造体の観察結果を図３に示す。図３のａは、結合組織構造体を示し、図３のｂは上皮構造体を示す。図３（Ｂ）中の矢印は、細菌を示す。図３中のスケールバーは５０μｍを示す。

【０１２４】

図３に示すように、細菌は、結合組織構造体及び上皮構造体の内部に移動していることが示された。

【０１２５】

＜試験例４：Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの生着及び浸潤の確認＞

細胞構造体がＨＵＶＥＣを含まないこと（結合組織構造体を形成させる際にＨＵＶＥＣを用いなかったこと）以外は試験例２に記載の方法と同様にして得られた評価用の細胞構造体を使用した。当該評価用の細胞構造体に対して、播種量を２．４×１０^{7}ｃｅｌｌｓとしたこと以外は試験例３に記載の方法と同様にして、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを播種した。

【０１２６】
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを播種してから２４時間及び４８時間経過した細胞構造体をインサートから剥離し、ＤＮＡ抽出及びリアルタイムＰＣＲを実施した。ＤＮＡ抽出は、Ｚｙｍｏ　ｒｅｓｅｒｃｈ製Ｒ２０８１を説明書通りの方法で、使用して実施した。リアルタイムＰＣＲは、キット（ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤＲ　Ｐｒｏｂｅ　ｑＰＣＲ　ＲＴ　Ｓｅｔ（ＴＯＹＯＢＯ製））を説明書通りの方法で使用して実施した。
【０１２７】
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは、野生型（Ｗｉｌｄ　ｔｙｐｅ）と、プロテアーゼを欠損させた変異型（Δｋｐｇ　ｒｇｐＡ　ｒｇｐＢ）の２種を使用した。結果を表１に示す。表１中の「Ｎ．Ｄ．」は検出されなかったことを示す。
【０１２８】
生体における歯肉組織は、細胞間の強固な接着によってバリア性を有しているために、歯周病菌（Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ）が歯肉組織へ浸潤するには、プロテアーゼによって細胞間接着に寄与するタンパク質が分解される必要があることが知られている。本試験の結果によれば、表１に示すように、プロテアーゼが欠損した歯周病菌を用いた場合には、浸潤した細菌数が有意に減少した。このことから、ＣＭＦを用いて作製された細胞構造体に歯周病菌がよく浸潤するにはプロテアーゼの発現が必要であることが示されたほか、ＣＭＦを用いて作製された細胞構造体がより生体に近い組織モデルであることが示された。
【０１２９】
【表１】

サンプル	インキュベート時間		STDEV (24h)	STDEV (48h)
	24h	48h		
コントロール（P. gingivalis なし）	N.D.	N.D.	―	―
野生型(ATCC 33277)	46787140	40875716	9206623	14159581
変異型(Δkpg rgpA rgpB)	13623747	5101111	3996801	166698

【０１３０】
＜試験例５：接着因子の発現状態の確認（ｑＲＴ－ＰＣＲ）＞
細胞構造体がＨＵＶＥＣを含まないこと（結合組織構造体を形成させる際にＨＵＶＥＣを用いなかったこと）以外は試験例２に記載の方法と同様にして得られた評価用の細胞構造体をＣＭＦありのサンプルとして使用した。
【０１３１】
ＣＭＦを用いなかったこと、及び、細胞構造体がＨＵＶＥＣを含まないこと（結合組織構造体を形成させる際にＨＵＶＥＣを用いなかったこと）以外は、試験例２に記載の方法と同様にして得られた評価用の細胞構造体をＣＭＦなしのサンプルとして使用した。
【０１３２】
Ｅｐｉ４を播種してから１日培養した細胞構造体をインサートから剥離し、ｍＲＮＡ抽出及びリアルタイムＰＣＲを実施した。ｍＲＮＡの抽出は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製ＰｕｒｅＬｉｎｋ^{TM} ＲＮＡ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔを説明書通りの方法で使用して実施した。リアルタイムＰＣＲは、キット（ＳＹＢＲＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｒｅａｌｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＴＯＹＯＢＯ製））を説明書通りの方法で使用して実施した。
【０１３３】
接着因子の発現状態の確認結果を表２に示す。表２に示されるように、ＣＭＦを用いた場合には、ＣＭＦを用いなかった場合と比べ、接着因子の発現量が高くなっており、より生体に近い歯肉モデルとなっていることが示された。なお、０^{*1}は０．０００００４５９６を示し、０^{*2}は０．０００００８６４９を示し、０^{*3}は０．０００００４０６を示す。
【０１３４】

【表２】

	相対値（CMFあり）	相対値（CMFなし）	STDEV（CMFあり）	STDEV（CMFなし）
Claudin-1	1	0.059	0.449	0.025
ZO-1	1	0[*1]	0.082	0[*3]
E-cadherin	1	0.04	0.212	0.005
Occludin-1	1	0.001	0.257	0.002
Collagen IV	1	0[*2]	0.027	0
Laminin	1	0.135	0.36	0.051

【０１３５】
＜試験例６：血管網を有する細胞構造体の作製＞
１．Ｉ型コラーゲン溶液（１０ｍｇ／ｍＬ）の調製
遠沈管に凍結乾燥したブタ皮膚由来Ｉ型コラーゲン（日本ハム株式会社提供）５０ｍｇを分取し、５ｍＬの１０ｘＰＢＳ（ｐＨ７．４）を加え、６分間ホモジナイズした。１００００ｒｐｍで３分間遠心し、ピペッティングとｖｏｌｔｅｘを行い、再度１００００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引した後、ＤＭＥＭ（血清不含）を５ｍＬ加え、沈殿をしっかりとピペッティングし、１００００ｒｐｍで３分間遠心した。その後、上清を吸引除去し、８％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭをホモジナイズしたＩ型コラーゲンの含有量が１０ｍｇ／ｍＬになるように添加した。懸濁後、エッペンチューブに必要量分取した。得られた解繊されたコラーゲン（ＣＭＦ）の平均長は、２２．５μｍであり、平均径は約４．４μｍであった。
【０１３６】
２．血管網を有する結合組織構造体（結合組織層）の構築
ＨＧＦ（１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｔｉｓｓｕｅ）及びＨＵＶＥＣ（５．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｔｉｓｓｕｅ）とＩ型コラーゲンを１０ｍｇ／ｍＬの濃度で含むＩ型コラーゲン溶液を混合し、インサートへ播種した。インサートの外側に８％ＦＢＳ／ＤＭＥＭとＥＧＭ－２（Ｌｏｎｚａ）混合培地（１：１）０．５ｍＬを加え、１５分間１１００ｘｇで遠心し、３７℃で培養した。翌日、２４ｗｅｌｌインサートを６ｗｅｌｌプレートへ移し、８％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭとＥＧＭ－２混合培地（１：１）１２ｍＬ中で１週間培養した。
【０１３７】
３．上皮構造体（上皮細胞層）の構築
結合組織構造体のインサート内側の培地を吸引し、インサート内側にＩＶ型コラーゲンを０．０４ｍｇ／ｍＬの濃度で含むＰＢＳ（ＩＶ型コラーゲン溶液）を加え、３７℃で２０分以上インキュベートした。この間に、ＩＨＧＥ　ｃｅｌｌｓの細胞懸濁液を８％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ：ＥＧＭ－２：２％ＦＢＳ含有ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＧ２（クラボウ）＝１：１：１で混合したものを用いて調製した。インサート内側のＩＶ型コラーゲン溶液と外側の培地を吸引後、内側に上皮細胞を播種、外側に混合培地を添加し、３７℃で１時間静置した。その後、さらに外側に混合培地を添加し、２４ｗｅｌｌインサートの場合は内側と外側をつなげ、一晩培養した。これにより、結合組織構造体上に上皮構造体が配置された細胞構造体からなる歯肉モデル組織を構築した。
【０１３８】
４．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの培養
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ　ＡＴＣＣ　３３２７７を、血液寒天培地（ＢＤ）に接種し、３７℃、嫌気的条件下で維持培養した。対数増殖期への増殖培養は、ｈｅａｍｉｎ（５μｇ／ｍＬ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）及びｍｅｎａｄｉｏｎｅ（１μｇ／ｍＬ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）添加ｔｒｙｐｔｉｃａｓｅ　ｓｏｙｂｒｏｔｈ（ＴＢＳ）培地

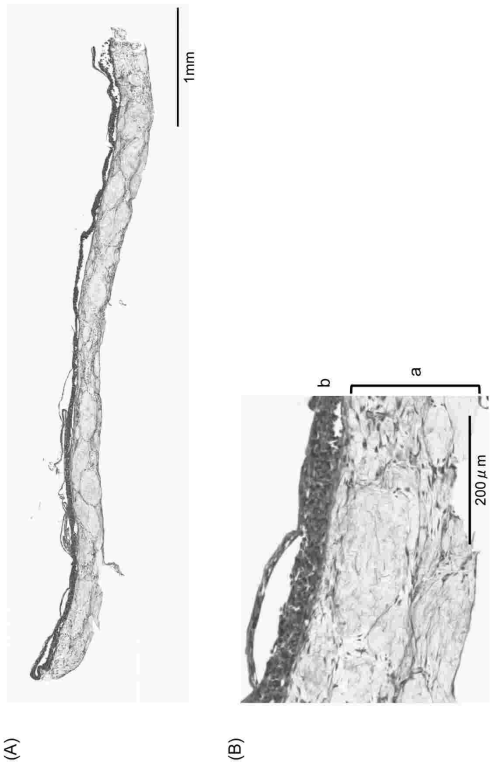
（ＢＤ）を用いて行った。
【０１３９】
５．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの感染
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを２．４ｘ１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｔｉｓｓｕｅになるように抗生物質不含８％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ：ＥＧＭ－２：２％ＦＢＳ含有ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＧ２（クラボウ）＝１：１：１混合培地で調整し、歯肉モデル組織に投与した。投与後、３７℃の５％CO_2インキュベーター内で培養した。
【０１４０】
６．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの免疫組織化学解析
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ感染歯肉モデル組織の切片をａｎｔｉ－Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｉｎ ｒａｂｂｉｔ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で４℃，一晩インキュベートした。その後、ｈｏｒｓｅ ｒａｄｉｓｈ ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ ＩｇＧ（株式会社ニチレイバイオサイエンス）で処理後、３，３’－ｄｉａｍｉｎｏｂｅｎｚｉｄｉｎｅ ｓｕｂｓｔｒａｔｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＤＡＫＯ）で発色させた。対比染色は、ｈａｅｍａｔｏｘｙｌｉｎで行った。
【０１４１】
７．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ ｉｎｖａｓｉｏｎ ａｓｓａｙ
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは－Ｂａｃｓｔａｉｎ－ＣＴＣ Ｒａｐｉｄ Ｓｔａｉｎｉｎｇ ｋｉｔ（株式会社 同仁化学研究所）を用いて染色した。Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓをＰＢＳに懸濁し、懸濁液を５－ｃｙａｎｏ－２，３－ｄｉｔｏｌｙｌ ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＣＴＣ）及びＥｎｈａｎｃｉｎｇ ｒｅａｇｅｎｔ Ｂとともに３７℃，３０分間インキュベートした。歯肉モデル組織をＰＢＳで洗浄後、染色されたＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを歯肉モデル組織に投与し、３７℃の５％CO_2インキュベーター内で共培養した。
【０１４２】
Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは、歯肉モデル組織への投与前に蛍光色素でラベルした。ラベルには、－Ｂａｃｓｔａｉｎ－ＣＴＣ Ｒａｐｉｄ Ｓｔａｉｎｉｎｇ Ｋｉｔ（ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ）を用いた。本キットは、呼吸活性を代表する電子伝達により細胞内に生じるＮＡＤ（Ｐ）Ｈを検出する。ＣＴＣはこのＮＡＤ（Ｐ）Ｈにより還元され蛍光性ホルマザン（λｅｘ＝４３０，４８０ｎｍ付近、λｅｍ＝６２０～６４０ｎｍ）となる。この蛍光性ホルマザンは細胞に沈着して観察されることから、個々の細胞での観察が可能である。キットに含まれるエンハンサーは、ＮＡＤ（Ｐ）ＨによるＣＴＣの還元反応を促進するため、高感度な検出が可能になる。
【０１４３】
図４は、ａｎｔｉ－ＣＤ３１ ａｎｔｉｂｏｄｙとＣＴＣでラベリングしたＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの画像である。図４は、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが血管網構造と共局在していることを示している。図４に示す写真から、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは歯肉モデル組織の血管網構造へ侵入できたことが明らかになった。トリプシン様活性を持つ酵素であるジンジパインを欠損させた細胞株（Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ ΔｋｇｐΔｒｇｐＡΔｒｇｐＢ）を感染させた歯肉モデル組織でも共局在を示すシグナルが観察されたが、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ ＷＴに感染したモデルよりも低レベルのシグナルであった。上記の結果は、ジンジパインがＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの歯肉組織の深部への移動と毛細血管の浸潤に関与している可能性が高いことを示唆している。
【０１４４】
図４で示される画像の他に同様の画像を２枚取得し（計３枚）、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが血管網構造と共局在している領域の面積値をそれぞれＩｍａｇｅ Ｊを用いて解析し、平均値を算出した。算出結果を図５に示す。図５に示すように、図４の画像から確認された結果と同様、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは血管網内部に浸潤していることが確認された。Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓによる血管網内部への浸潤はジンジパイン欠損株よりも

ＷＴが顕著であった。図５中、＊は、有意差があることを示す（ｐ＜０．０５）。
【０１４５】
図６は、歯肉モデル組織内部に浸潤したＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの数の定量評価結果を示す。試験例６の「５．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの感染」の後の歯肉モデル組織中のＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの数をリアルタイムＰＣＲにより計測した。リアルタイムＰＣＲは、試験例４と同様の方法で実施した。＊は、有意差があることを示す（ｐ＜０．０５）。
【０１４６】
図７は、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ感染後のＩＬ－６の分泌量の評価結果を示す。試験例６の「５．Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの感染」の後の歯肉モデル組織において、組織から分泌されるＩＬ－６の量を測定し、比較した。ＩＬ－６は、炎症の指標として一般的に用いられるサイトカインである。一般的には、ＩＬ－６量の上昇は、炎症が起きている、つまり感染していることを示す。
【０１４７】
図７で示されるグラフによると、ＷＴを播種したものは、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを播種しなかったもの、及びジンジパイン欠損株と比較してＩＬ－６量が低下しているが、これはジンジパインがＩＬ－６を分解する作用があるためと考えられる。ジンジパイン欠損株は、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを播種しなかったものと比べてＩＬ－６が上昇しており、図４に示すデータ及び図６に示すＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの数の定量評価結果と合わせて考えると、感染が起こっていることが示されている。
【０１４８】
ＩＬ－６は、ＥＬＩＳＡにより定量した。Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを歯肉モデル組織に感染させた後、６時間後、２４時間後、４８時間後に培養上清を回収し、培養上清中のＩＬ－６量をＥＬＩＳＡ ＭＡＸ ｋｉｔｓ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いて、マニュアル通りに測定した。図７中、＊は、有意差があることを示す（ｐ＜０．０５）。
【０１４９】
図８～９はそれぞれ上皮細胞層をＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが透過する挙動の観察方法及び観察結果を示す図である。
【０１５０】
生体において、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓは、歯肉組織の表面から結合組織層に移動するために、上皮細胞層を貫通する必要がある。一部の細菌は脂質ラフトと相互作用して宿主細胞への侵入を促進することが知られている。以下の実験により、脂質ラフトがＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの上皮細胞層への浸透に関与している可能性があることと、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが歯肉組織のより深い領域への移動のための主要な経路として、細胞間ではなく細胞内を経由する可能性があることを確認した。
【０１５１】
図８はＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが上皮細胞層を透過する挙動を観察する方法を示す。当該方法では、細胞の原形質膜からコレステロールを可逆的に除去することができる物質であるメチル―β―シクロデキストリン（ＭβＣＤ）を用いた。
【０１５２】
まず、１．０×１０^{6}個のＩＨＧＥ細胞を、３μｍの気孔率の２４ウェルプレートトランスウェル（Ｃｏｒｎｉｎｇ製）に播種し、Ｈｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２培地中で１日培養し、上皮細胞層のみからなる上皮構造体（上皮細胞層組織）を作製した（図８のＡ）。
【０１５３】
次に、ＭβＣＤをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に溶解し、ＭβＣＤの終濃度が５０ｍＭまたは１００ｍＭのＭβＣＤ溶液を得た。続いて、上記のＭβＣＤ溶液をＨｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２培地に混合した（培地中のＭβＣＤの終濃度：０．５ｍＭまたは１．０ｍＭ）。上皮細胞層組織をＰＢＳで洗浄した後、上記のＭβＣＤを含有するＨｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２培地をトランスウェル内の上皮細胞層組織に添加し、上皮細胞層組織をＨｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２培地中で３７℃で３０分間インキュベートした。

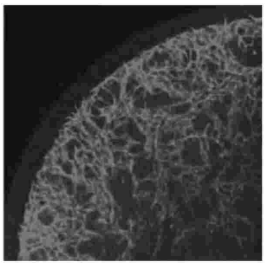
【０１５４】
続いて、上記と同様の手順によりＣＴＣ標識Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを準備し、ＣＴＣ標識Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓを上皮細胞層組織に感染させた（図８のＢ）。感染させた後ＭβＣＤを含有するＨｕｍｅｄｉａ－ＫＧ２培地で３７℃でインキュベートを行い、感染の２４時間及び４８時間後に、ＣＴＣ標識Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが上部トランスウェルから上皮細胞層組織を貫通した下部の２４ウェルプレートへ浸透した量を、分光蛍光光度計ＦＰ－８５００（ＪＡＳＣＯ製）を用いて分析した（図８のＣ）。分析結果を図９に示す。
【０１５５】
上皮細胞層組織をＭβＣＤで処理した構造体では、処理を行わなかった構造体と比べてＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの浸透量が大幅に増加した。この効果は、濃度依存的に強くなることが確認された。これらの結果は、脂質ラフトがＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが上皮細胞層を遊走することに関与していることを示す。また、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓが、歯肉組織の深い領域への移動のための主要な経路として、細胞間経路ではなく細胞内経路を使用する可能性があることを示唆している。

【図面】

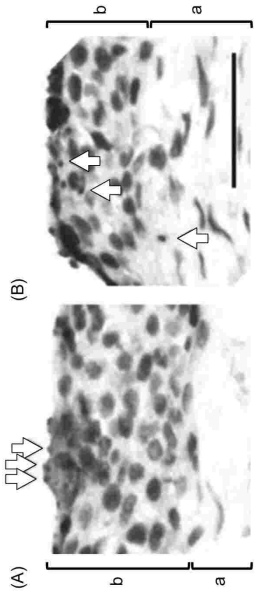
【図１】


1mm
b
a
200μm
(A)
(B)

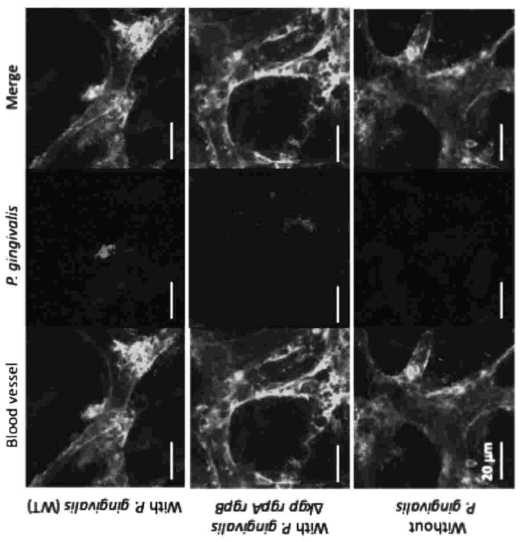
【図２】



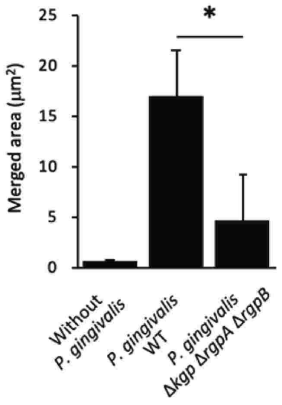
【図３】


b
a
(B)
(A)
b
a

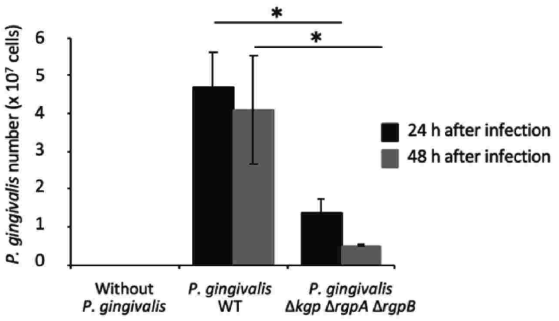
【図４】


Merge
P. gingivalis
Blood vessel
20 μm
Without P. gingivalis
With P. gingivalis ΔIgp rgpA rgpB
With P. gingivalis (WT)

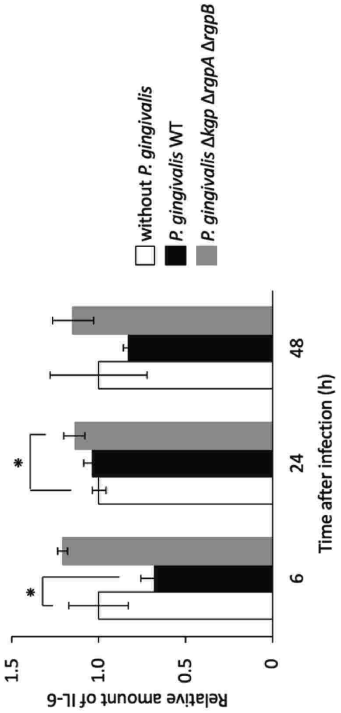
【図５】


Merged area (μm²)
25
20
15
10
5
0
*
Without P. gingivalis
P. gingivalis WT
P. gingivalis Δkgp ΔrgpA ΔrgpB

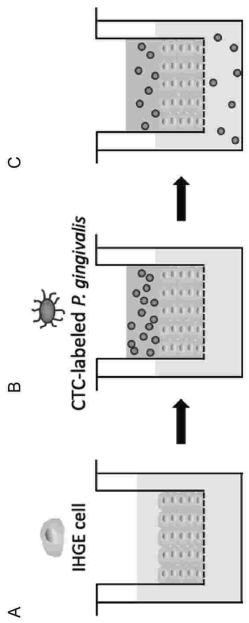
【図６】


P. gingivalis number (x 10⁷ cells)
6
5
4
3
2
1
0
*
*
24 h after infection
48 h after infection
Without P. gingivalis
P. gingivalis WT
P. gingivalis Δkgp ΔrgpA ΔrgpB

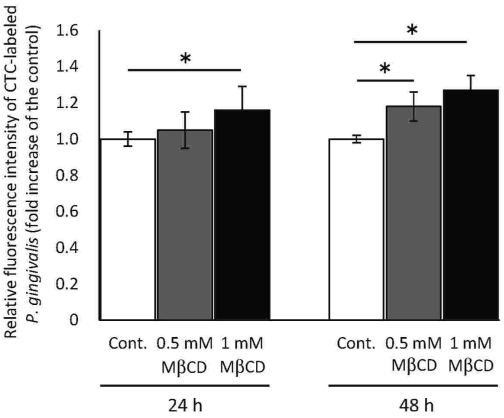
【図７】


without P. gingivalis
P. gingivalis WT
P. gingivalis Δkgp ΔrgpA ΔrgpB
Relative amount of IL-6
1.5
1.0
0.5
0
*
*
6
24
48
Time after infection (h)

【図８】


A
IHGE cell
B
CTC-labeled P. gingivalis
C

【図９】


Relative fluorescence intensity of CTC-labeled
P. gingivalis (fold increase of the control)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
*
Cont.
0.5 mM MβCD
1 mM MβCD
Cont.
0.5 mM MβCD
1 mM MβCD
24 h
48 h

フロントページの続き

東京都台東区台東１丁目５番１号 凸版印刷株式会社内
(72)発明者 入江 新司
東京都台東区台東１丁目５番１号 凸版印刷株式会社内
(72)発明者 松▲崎▼ 典弥
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 佐々木 尚子
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 天野 敦雄
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 竹内 洋輝
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献
国際公開第２０１８／１４３２８６（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／０９３４７７（WO，Ａ１）
特開２０１０－１７２２４７（ＪＰ，Ａ）
特表２００８－５０８９６８（ＪＰ，Ａ）
中国特許出願公開第１０９９７１７０４（ＣＮ，Ａ）
特表２０１０－５０２１７５（ＪＰ，Ａ）
特開２０１８－０８３７９４（ＪＰ，Ａ）
J. Periodontol., 2012, 83(2), pp.242-247
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018, 495(4), pp.2383-2389, Epub 2017 Dec 24

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １／００－７／０８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）