

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 15 日(15.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/143669 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/07 (2010.01) C07K 1/24 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/056632
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 3 日(03.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-044119 2015 年 3 月 6 日(06.03.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 正明(SATO Masaaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 吉野 大輔(YOSHINO Daisuke); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 志村 光春(SHIMURA Mitsuharu); 〒1510051 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5-8-2 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AGGREGATED AND IMMOBILIZED CELLS USING AQUEOUS PLASMARIZED PROTEIN SOLUTION, AND AGGREGATED AND IMMOBILIZED CELLS PRODUCED BY SAID PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: プラズマ化タンパク質水性溶液を用いる細胞の集合固定物の生産方法、及び、当該生産方法による細胞の集合固定物

(57) Abstract: There is found a means for adhering cells or cell masses to each other with a protein such as an extracellular matrix protein to produce aggregated and immobilized cells. The purpose of the present invention is to apply the means for various purposes. Specifically, it is found that aggregated and immobilized cells can be produced by using an aqueous plasmarized protein solution in the form of mists or liquid droplets as an adhesion solution for cells or cell masses, wherein the aqueous plasmarized protein solution is produced by carrying out the plasmarization of an extracellular matrix protein by means of low-temperature plasma discharge preferably using a surface discharge-induced low-temperature plasma discharge device. This finding leads to the accomplishment of the present invention.

(57) 要約: 細胞又は細胞塊同士を細胞外マトリックスタンパク質等のタンパク質で接着させて、細胞同士の集合固定物を生産する手段を見出し、様々な応用に資することを目的とするものである。具体的には、好ましくは沿面放電による低温プラズマ放電装置を用いて、細胞外マトリックスタンパク質に対して低温プラズマ放電によるプラズマ化を行い、これにより得られたプラズマ化タンパク質水性溶液を、ミスト又は液滴として、細胞又は細胞塊同士の接着液として用いることにより、これらの細胞の集合固定物を得ることが可能であることを見出し、本発明を完成した。

WO 2016/143669 A1

明 細 書

発明の名称：

プラズマ化タンパク質水性溶液を用いる細胞の集合固定物の生産方法、及び、当該生産方法による細胞の集合固定物

技術分野

[0001] 本発明は、人為的な手段を施して得られる細胞調製物に関する発明であり、さらに具体的には、低温プラズマ放電により調製されるタンパク質水性溶液を用いる、細胞の集合固定物の生産方法、及び、当該生産方法にて生産される細胞の集合固定物に関する発明である。

背景技術

[0002] 細胞接着技術は、医療関連技術をはじめ、様々な分野でその重要性を増している。

[0003] 特に生きた状態の複数の細胞を固定化することにより、様々な応用に向けての可能性が認められる。

[0004] 例えば、ヒトを含め多細胞生物では、細胞は個々のみならず多細胞の集合体として様々な機能を発揮していることが知られており、この事実を利用した多細胞の集合体を薬剤の効能の試験に用いる試みがなされている。

[0005] 再生医療分野では、「細胞シート」に関する技術が大きく期待されている。

[0006] 細胞シート技術としては、角膜上皮幹細胞疲弊症の細胞シートによる角膜再生治療（非特許文献1）が知られており、この場合は1枚の角膜上皮細胞シートを患部に貼り付けるだけで角膜実質層に接着させることが可能である。

[0007] この他にも、心筋、歯周、軟骨等を対象にした臨床研究が行われており（非特許文献2、3）、特に近年ヒトiPS細胞を高効率に心筋細胞へ分化させる培養手法が確立され、ヒト心筋細胞シートを用いた基礎研究が行われている（非特許文献4）。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1 : Nishida K, et al., N Engl J Med, 351: 1187-1196, 2004
非特許文献2 : Haraguchi Y, et al., Stem Cells Transl Med, 1 : 136-141, 2012
非特許文献3 : Iwata T, et al., J Tissue Eng Regen Med, in press(2015)
非特許文献4 : Masuura K, et al., Biochem BiophysRes Commun, 425 : 321-327, 2012

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、細胞又は細胞塊同士を細胞外マトリックスタンパク質等のタンパク質で接着させて、細胞同士の固定物を生産する手段を見出し、様々な応用に資することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは上記の課題について検討を行い、タンパク質を含有する水性溶液を低温プラズマ放電によるプラズマ化を行うことによって得られるタンパク質水性溶液を、細胞又は細胞塊同士を接着液として用いることにより、驚くべきことに細胞又は細胞塊同士が生きた状態で接着した細胞固定物を生産することが可能であることを見出して、本発明を完成した。
- [0011] すなわち本発明は、低温プラズマ放電によりプラズマ化がなされているタンパク質水性溶液（以下、本発明の水性溶液ともいう）を、複数個の細胞又は細胞塊の表面に付着させた状態で、各々の細胞又は細胞塊同士を接触させることにより、これらの細胞又は細胞塊同士をタンパク質水性溶液の内容成分を介して接着させて集合固定物化することを特徴とする、複数細胞の集合固定物の生産方法（以下、本発明の生産方法ともいう）を提供する発明であり、さらに本発明の生産方法を行うことにより生産されることを特徴とする複数細胞の集合固定物（以下、本発明の細胞固定物ともいう）を提供する発

明である。なお、本発明の細胞固定物は、上記のように「生きた状態の細胞」の固定物とすることが可能であるが、それ以外の場合、具体的には「生きていない（死んだ）状態の細胞」を固定することも勿論可能であり、本発明の生産方法で接着させる「細胞又は細胞塊」、及び、本発明の細胞固定物を構成する「細胞」は、生きている細胞であっても、死んだ細胞であってもよい。死んだ細胞には、例えば、分離された細胞核等の細胞分離物も含まれる。

[0012] 上記の細胞又は細胞塊は、特に限定されず、単細胞生物そのものであっても良く、多細胞生物から分離されたものであっても良く、後述する医療分野や食品工業分野等の実用や研究に資する目的に応じて自由に選択することが可能である。真核単細胞生物又は真核多細胞生物細胞であっても、原核生物細胞であってもよい。

[0013] 上記の複数個の細胞又は細胞塊は、同一種の細胞であっても良いが、2種以上の細胞、又は、複数個の細胞塊は構成細胞が異なる2種以上の細胞塊とすることが可能であり、特に本発明は、2種以上の細胞や細胞塊を組み合わせることで接着対象とすることが容易に可能である点が優れている。

[0014] また、接着対象として選択される細胞種又は細胞塊の構成細胞として、元々接着能力が優れる上皮細胞又は表皮細胞とすることも可能であるが、強い接着能力が認められない内皮細胞とすることも可能であり、これらを組み合わせることも可能である。

[0015] すなわち、本発明の生産方法として、複数個の細胞、又は、複数個の細胞塊であって構成細胞が異なる2種以上の細胞塊に、上皮細胞又は表皮細胞が含まれている態様が認められ、これとは別個に又は組み合わせさせて、内皮細胞が含まれている態様が認められる。

[0016] また、細胞塊の好適な態様として「細胞シート」が挙げられる。この場合生産される複数細胞の集合固定物は、複数の細胞シート同士がシート面にて接着されている積層細胞シートが典型例である。積層される単位となる細胞シートは互いに同一の細胞で構成されていても、異なる細胞で構成されてい

てもよい。また、積層数は、2以上で必要に応じて適宜設定することができる。

[0017] 低温プラズマ放電には、沿面放電と誘電体バリア放電が含まれるが、本発明では沿面放電が好適である。

[0018] 本発明者らは、上記の本発明の水性溶液の調製において、特にこれに適した沿面放電装置を作製した。沿面放電は、一般的に「誘電体を挟んで印加電極と誘導電極が存在する場合に、印加電極から誘電体に沿ってなされる放電現象」として知られている。

[0019] 本発明の水性溶液に含有されるタンパク質は、細胞外マトリックスタンパク質を含むことが好適である。また、本発明の水性溶液中には、他の機能性物質を含有させることも可能である。当該機能性物質は、具体的な目的に応じて適宜選択されるべきものであり特に限定されないが、例えば、増殖因子、抗血栓因子、抗がん剤、免疫抑制剤、抗体、糖鎖、抗生物質等が挙げられる。

[0020] 本発明の水性溶液には、(1) 当該水性溶液がミスト化されている「ミスト型」、及び、(2) 当該水性溶液が液滴である「液滴型」、の2通りの態様が有り、それぞれの態様の調製方法は異なっている。また、(3) 本発明の水性溶液の調製を行うのに好適な沿面放電装置（本発明の装置）についての記載も行う。

[0021] ミスト型の水性溶液は、タンパク質水性溶液が低温プラズマ放電に接することにより、水に包まれたタンパク質分子の周りに過剰な電荷が供給され、電荷同士の反発力によって非常に細かい粒子（数十nm～数百nm程度の径）に弾けてミスト化した状態であると考えられる。ミスト型の水性溶液のイメージ図を図1（1）に示した。

[0022] 液滴型の水性溶液は、タンパク質分子を含有する水溶液中に、低温プラズマ放電により過剰に電荷が供給された状態であると考えられる。液滴型の水性溶液のイメージ図を図1（2）に示した。

[0023] 本発明の生産方法においては両形態の本発明の水性溶液を接着液として用

いることができるが、「液滴型」の方が、一般的に接着作業が簡便である。

[0024] (1) ミスト型の水性溶液の調製

ミスト型の水性溶液の調製は、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を、特定の送り速度で沿面放電による低温プラズマに接触させることにより、当該タンパク質、又は、当該タンパク質と他の機能性物質の分子を荷電化することによって、当該分子同士を反発させるプラズマミスト化を、下記(a)～(c)に従い行うことを特徴とする。

(a) 上記の沿面放電を行うための交流電圧の周波数は5～30kHz、印加電圧は2～4kVである。

(b) 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度は、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $5\text{mg}/\text{ml}$ である。

(c) 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の特定の送り速度は、 $3.0\sim 36\text{mm}/\text{分}$ である。

[0025] この送り速度単位である「 $\text{mm}/\text{分}$ 」は、「単位時間当たりのタンパク質水性溶液の送り容積(μl 又は $\text{mm}^3/\text{分}$)」を、「タンパク質水性溶液の導入場(後述)の当該水性溶液の進行方向に対して垂直方向の断面積(mm^2)」で割って算出される値である。よって、この「送り速度」と「当該断面積」から、「単位時間当たりのタンパク質水性溶液の送り容積」を算出することも容易に可能である。

[0026] ミスト型の水性溶液の調製における沿面放電の手段としては、後述する本発明の装置が好適である。この場合、タンパク質水性溶液の荷電化の場として用いられる導入場(後述)の、当該水性溶液の進行方向に対して垂直方向の断面積は、タンパク質水性溶液が歩留まり良くチャージされるために、好適な上限が定められる。例えば、当該導入場の形状が筒状の場合には、当該断面積は 30mm^2 以下であることが好適である。この筒状態様の場合の当該断面積の下限は特に限定されないが、 1mm^2 程度が好適である。また、当該導入場が、向かい合った板状の沿面放電体の間隙からなる場合は、当該向かい合った沿面放電体の印加電極板間の距離は 6mm 以下であることが好適で

あり、下限は特に限定されないが0.5 mm程度であることが好適である。

[0027] 沿面放電の発生機構である沿面放電体（後述）の印加電極と接地電極が重なり合っている部分の表面積も同様に、タンパク質水性溶液が歩留まり良くチャージされるために、ある程度は確保されていることが好適である。具体的には、タンパク質水性溶液の導入場の形状が筒状である場合は、上記断面積に対して好適には3～30倍、特に好適には3～10倍の当該表面積である。当該導入場が、向かい合った板状の沿面放電体の間隙からなる場合は、上記印加電極板間の距離に、好適には3～30倍、特に好適には3～10倍の距離を乗じて算出される表面積であることが好適である。

[0028] (2) 液滴型の水性溶液の調製

液滴型の水性溶液の調製は、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を、特定の送り速度で沿面放電による低温プラズマに接触させることにより、当該タンパク質、又は、当該タンパク質と他の機能性物質の分子の荷電化を、下記(a)～(c)に従い行うことを特徴とする。

(a) 上記の沿面放電を行うための交流電圧の周波数は5～30 kHz、印加電圧は7.5～18 kVである。

(b) 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度は、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～255 mg/ml である。

(c) 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の特定の送り速度は、36～180 $\text{mm}/\text{分}$ である。

[0029] 液滴型の水性溶液の調製における沿面放電の手段としても、後述する本発明の装置が好適である。この場合、タンパク質水性溶液の荷電化の場として用いられる導入場（後述）の、当該水性溶液の進行方向に対して垂直方向の断面積は、タンパク質水性溶液が歩留まり良くチャージされるために、好適な上限が定められる。例えば、当該導入場の形状が筒状の場合には、当該断面積は30 mm^2 以下であることが好適である。この筒状態様の場合の当該断面積の下限は特に限定されないが、1 mm^2 程度が好適である。また、当該導入場が、向かい合った板状の沿面放電体の間隙からなる場合は、当該向かい

合った沿面放電体の印加電極板間の距離は6 mm以下であることが好適であり、下限は特に限定されないが0.5 mm程度であることが好適である。

[0030] 沿面放電の発生機構である沿面放電体（後述）の印加電極と接地電極が重なり合っている部分の表面積も同様に、タンパク質水性溶液が歩留まり良くチャージされるために、ある程度は確保されていることが好適である。具体的には、タンパク質水性溶液の導入場の形状が筒状である場合は、上記断面積に対して好適には3～30倍、特に好適には3～10倍の当該表面積である。当該導入場が、向かい合った板状の沿面放電体の間隙からなる場合は、上記印加電極板間の距離に、好適には3～30倍、特に好適には3～10倍の距離を乗じて算出される表面積であることが好適である。

[0031] （3）本発明の装置

前述の本発明の装置は、タンパク質水性溶液の導入場が設けられ、当該導入場においてタンパク質水性溶液に沿面放電体から発生する低温プラズマ放電を作用させることにより、プラズマ化したタンパク質を生成するための沿面放電装置であって、当該沿面放電体は、面状の誘電体の表裏の一方において印加電極が、他方において接地電極がそれぞれ当該誘電体と接触状態で設けられており、当該誘電体の面上の当該印加電極の端部と当該接地電極の端部の一部又は全部が揃っているか、あるいは、当該接地電極の端部が当該印加電極の端部の一部又は全部からはみ出すように設けられている沿面放電体であって、当該沿面放電体の1個又は2個以上が、タンパク質水性溶液の導入場の雰囲気に対する接触面を印加電極面として設けられていることを特徴とする、沿面放電装置である。なお、「沿面放電体から発生する低温プラズマ放電」は、性質的には「誘電体バリア放電」と同様の低温プラズマ放電（大気圧で電子温度のみが高い非平衡プラズマ（後述））である。

[0032] 上記した「タンパク質水性溶液の導入場」とは、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液に、沿面放電体から発生する低温プラズマ放電を作用させるための場である。当該作用を行う前提として、プラズマ化がなされる前のタンパク質溶液を当該場に導入する必要がある。「導入」とは、当該場

にプラズマ化がなされる前のタンパク質溶液を入れる行為であり、具体的な手段を問わず、例えば、進入、注入等を含む。「タンパク質水性溶液の導入場」の構造は、導入されたプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液に対して、沿面放電による低温プラズマ放電を作用させることができる構造である限り、特に限定されないが、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を導入するための「導入口」と、プラズマ化したタンパク質を導出するための「導出口」が設けられていることが好適である。具体的な形状としては、筒状、中空平板状（当該導入場が、向かい合った板状の沿面放電体の間隙からなる）、ハニカム状、中空積層板状が例示できるが、筒状が好適である。筒状は、円筒状、多角筒状を含み、複数の筒状単位の長さ方向が揃った集合筒（ハニカム状等）であってもよいが、特に円筒状であることが好適である。

[0033] 「沿面放電体」は、「タンパク質水性溶液の導入場」の雰囲気に対して沿面放電作用により低温プラズマ放電を行う単位である。具体的には、当該沿面放電体は、面状の誘電体の表裏の一方において印加電極が、他方において接地電極がそれぞれ当該誘電体と接触状態で設けられており、当該誘電体の面上の当該印加電極の端部と当該接地電極の端部の一部又は全部が揃っているか、あるいは、当該接地電極の端部が当該印加電極の端部の一部又は全部からはみ出すように設けられていることを特徴とする、沿面放電を行う単位である。沿面放電は、この「揃っているか、又は、はみ出している端部の沿面の印加電極側」において発生する。以下、この印加電極側への沿面放電が行われる領域を「沿面放電部」ともいう。後述するように、印加電極側が接地電極側よりもはみ出している領域では、接地側に沿面放電が発生するが、この領域は「沿面放電部」からは除外される。誘電体の形状を示す「面状」とは、平面状であっても、曲面状であってもよい。曲面は、円柱曲面等の柱曲面、錐面等の可展面、球曲面、回転面等、特に限定されない。印加電極と接地電極がこのような誘電体の表裏にそれぞれ接触状態で設けられて、「沿面放電体」が構成される。

[0034] 上記のように「沿面放電体」においては、面状の誘電体の表裏の一方において印加電極が、他方において接地電極がそれぞれ当該誘電体と接触状態で設けられており、当該誘電体の面上の当該印加電極の端部と当該接地電極の端部の一部又は全部が揃っているか、あるいは、当該接地電極の端部が当該印加電極の端部の一部又は全部からはみ出すように設けられている。「印加電極と接地電極の端部と接地電極の端部が揃っているか、又は、接地電極の端部がはみ出している」における「はみ出し」の程度、すなわち、「接地電極端部が印加電極端部からはみ出す距離」は特に限定されず、本発明の装置における「タンパク質水性溶液の導入場」の形状等に応じて自由に設定できるが、一般的には当該距離を d とすると、好ましくは $0 < d \leq 5 \text{ mm}$ 、特に好ましくは $0 < d \leq 1 \text{ mm}$ ($d = 0$ は、端部が揃っている場合) である。ただし、 d が 5 mm を超えて、 10 mm や 20 mm 、さらにそれ以上であっても「沿面放電による低温プラズマの発生」という機能を発揮させることは可能である。このような沿面放電体の接地電極端部と印加電極端部が揃っているか、又は、接地電極端部がはみ出している「沿面放電体端部」において、「端部が揃っている、又は、接地電極端部がはみ出している」割合は、 100% であることが最も好ましいが、設計等によっては 80% 程度でも実用的であり、好適範囲内である。

[0035] 1 個又は 2 個以上の「沿面放電体」の印加電極面が、「タンパク質水性溶液の導入場」の雰囲気と接触する面である。当該導入場の雰囲気に接するように設けられる「沿面放電体」の数は、自由に設計することができる。「沿面放電体」の数を増減することによって、沿面放電による低温プラズマの発生箇所を、「タンパク質水性溶液の導入場」内において増減することができる。

[0036] 例えば、タンパク質水性溶液の導入場が筒状体の内部となっており、「沿面放電体」の 1 個又は 2 個以上が当該筒状体の全部又は一部を構成する態様が挙げられる。「沿面放電体」が 1 個の態様については後述する。例えば、筒状の誘電体の筒側面の 2 箇所以上に、印加電極（筒の内側）と接地電極（

筒の外側)を接触状態で、上記の端部における条件を満たした状態で相対して設けることにより、2個以上の沿面放電体が設けられた、筒内部をタンパク質水性溶液の導入場とする筒状構造の本発明の装置を構成することができる。当該2個以上の沿面放電体の配置としては、例えば、筒状体の長さ方向(両開口部を結ぶ方向)に間隔を設けて、複数の長さの短い筒状の沿面放電体を設けること等が挙げられるが、これに限定されるものではない。また、単一の沿面放電体の中に複数箇所の沿面放電部を設けることも可能である。

[0037] なお、「タンパク質水性溶液の導入場」を構成する一部を誘電体とする場合は、当該誘電体以外の構造部分は、絶縁物質であるか、又は、絶縁処理が施されることで、電氣的に絶縁状態が保たれていなければならない。本発明の装置の誘電体の内側面又は印加電極が形成する筒状構造の内側空間に向けての送液機構が設けられていることが好適である。

[0038] 前述のように、本発明の水性溶液の調製において、本発明の装置を沿面放電手段として用い、かつ、当該沿面放電装置の「タンパク質水性溶液の導入場」に向けて、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を特定の送り速度で送液して、当該導入場の内部に発生させた沿面放電の低温プラズマと接触させることにより、本発明の水性溶液の調製を効率的に行うことができる。この処理前のタンパク質水性溶液の送りは、上記の送液機構を介して行うことが好適である。

発明の効果

[0039] 本発明により、細胞又は細胞塊同士を効率的に、かつ、歩留まり良く接着する手段が提供される。本発明の生産方法は、本来接着性に乏しい内皮細胞等であっても、さらに細胞の培養環境を問わずに同種又は異種の細胞同士を、容易に生きたまま接着させて維持することが可能であり、例えば、細胞シートでは、同種又は異種の細胞からなる細胞シート同士を接着させて積層化することも容易である。また、後述する実施例に示す簡便な細胞シートの作成方法(例えば、Kikuchi, T. et al.: Biomaterials, 35, 2428 (2014))との組み合わせが容易であり、多種細胞に対して同時に3次元共培養を行うこ

とが必要な従来の3次元培養法等よりも短時間に接着工程を行うことが可能である。すなわち、本発明においては細胞間接着が容易であることから、細胞の接着を行うまでは、単一種の細胞をシート状や塊状に培養すれば良く、競合可能性のある異なる細胞の共培養を行う必要が無くなり、前提となる培養作業も簡便に済ませることができる。本発明により、同種又は異種の細胞からなる細胞シート等の細胞固定物を自在に生産する途が提供され、再生医療分野や食品工業分野における貢献は多大である。

[0040] 本発明の生産方法において、内皮細胞等の本来接着力が弱い細胞までも、細胞接着が極めて容易になる理由は、必ずしも明らかではない。敢えて推測すれば、過剰に荷電されたコラーゲン等の細胞外マトリックスタンパク質を含有する水性溶液の上に細胞シートや細胞塊を載置することで、細胞の足場が結合しやすくなるためとも考えられる。細胞は足場である焦点接着斑構成タンパク質のインテグリン（膜貫通タンパク質）を介して、細胞外マトリックスタンパク質と接着しており、このインテグリンと細胞外マトリックスは静電的に結合しているため、これにプラズマ化したタンパク質水性溶液が影響を与えることが考えられる。また、負電荷を有する細胞を、タンパク質水性溶液中の荷電したタンパク質が静電的に引き寄せることで、接着性をあげていることも考えられる。

図面の簡単な説明

[0041] [図1]本発明のプラズマ化タンパク質水性溶液のイメージ図であり、（1）はミスト型、（2）は液滴型である。

[図2]本発明に用いられる沿面放電の解説図である。

[図3]本発明の水性溶液の発生装置における、縦断面を主体とした解説図である。

[図4]本発明の水性溶液の発生装置の本体部分の縦断面図と横断面図である。

[図5]本発明の装置の実施例における、導出口近傍の沿面放電がなされる部分の拡大解説図である。

[図6(1)]M D C K細胞の細胞シート位相差顕微鏡像である。

[図6(2)]H U V E C s細胞モノレイヤーの位相差顕微鏡像である。

[図7]ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上における、プラズマ処理を行ったコラーゲン水溶液を用いた2層積層細胞シート作成の中間の状態を表す顕微鏡写真像である。

[図8(1)]ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ又はコラーゲンゲル上における、プラズマ処理を行ったコラーゲン水溶液を用いた2層積層細胞シート作成の中間の状態を表す顕微鏡写真像である。

[図8(2)]ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ又はコラーゲンゲル上における、無処理のコラーゲン水溶液を用いた2層積層細胞シート作成の中間の状態を表す顕微鏡写真像である。

[図9(1)]プラズマ化コラーゲンを接着液として用いて作成した4層の細胞積層シートの評価の結果を示す図面である。

[図9(2)]無処理のコラーゲン水溶液を接着液として用いて作成した4層の細胞積層シートの評価の結果を示す図面である。

発明を実施するための形態

[0042] [本発明の水性溶液]

本発明の水性溶液は、タンパク質水性溶液が低温プラズマ放電によりプラズマ化がなされたプラズマ化水性溶液である。

[0043] (1) 低温プラズマ

既に言及している「低温プラズマ」とは、電子温度 (T_e) が気体温度 (T_g) よりも明らかに大きく ($T_e/T_g > 100$)、 T_e と T_g とが平衡に達していないプラズマであり、別名で非平衡プラズマとして知られている。低温プラズマ放電とは、この低温プラズマを得るための放電であり、グロー放電、コロナ放電、誘電体バリア放電、沿面放電等が該当する。これらの中でも、沿面放電又は誘電体バリア放電を用いることが好ましい。

[0044] (1) - 1 : 沿面放電

沿面放電においては、交流電源から適切な周波数の交流電圧を、印加電極に印加することにより、印加電極において交流周期に同期して強い電界が形

成され、当該電界から放出された電子が誘電体の表面に付与される現象と、それらが再び印加電極に戻る現象が繰り返し起こることによりグロー状の低温プラズマ放電を得ることができる。

[0045] 沿面放電を発生させて、本発明の水性溶液を調製するための装置は、沿面放電を発生させるための本質的な設備、具体的には、交流電源、接地電極、誘電体、及び、印加電極が備わっていれば特に制限は認められず、具体的な処理目的に応じて自由に設計し、作製することができる。接地電極、誘電体、及び、印加電極は、互いに接しており、印加電極に交流電源から給電がなされ、接地電極にはアース線が接続されて接地がなされている。

[0046] 図2は、本発明で用いる沿面放電の原理の説明断面図である。この図面において、最も大きな面面積を有する板状の誘電体2の一方の面に、それよりも面面積の小さな、印加電極3と、他方の面に同接地電極4が、共に接触状態で維持されている。印加電極3は、交流電源5と電氣的に接続されており、交流電圧をこれらの印加電極に供給可能である。接地電極4は、アース線6が接続されて接地がなされている。図2に示した沿面放電では、接地電極4の誘電体2との接触面積の方が、印加電極3の誘電体2との接触面積よりも大きい。これが、上記の「沿面放電体」である。

[0047] 図2に示す沿面放電体は、印加電極3の辺縁部に低温プラズマ放電7を生成するもので、接地電極4の面面積が印加電極3の面面積よりも明らかに大きくなっているが、あくまでも低温プラズマ放電7は、印加電極3の辺縁部において発生する。上述したように、接地電極4と印加電極3の端部が重なり合っている場合と、接地電極4がはみ出している場合、当該はみ出し部分においては、低温プラズマ放電7は当該端部の辺縁の印加電極3側に発生する。逆に、印加電極3が接地電極4の端部からはみ出している部分においては、低温プラズマ放電7は当該端部の辺縁の接地電極4側に発生する。この接地側の低温プラズマ放電は、電荷が接地に流れてしまうため十分な荷電を行えず、タンパク質水性溶液のプラズマ化効果が薄れるので、本発明におけるタンパク質水性溶液に対するプラズマ化手段としては用いない。

[0048] 図2に示すような本発明で用いる沿面放電を行う場合の印加電圧として2～18kV、周波数は1～30kHzが好適であり、特に3～10kHzが好適である。周波数が1kHz未満であるとナノ秒オーダーのパルス性のマイクロ放電が持続出来ずに低温プラズマ放電が安定せず、結果として極度に高い電圧をかける必要があり、低温プラズマ自体の生成が困難な場合も想定される。また、30kHzを超えると、分極電界生成に至るまでに十分に必要な電圧の供給をさせ難くなり、その結果として低温プラズマの生成は困難となる。ただし、これらの印加電圧と周波数の条件は、あくまでも本発明への具体的な適用を考慮しない条件であり、本発明の適切な実施のための条件は、これらの条件とは若干異なっている。例えば、周波数が低すぎると低温プラズマ発生のために要求される電圧は高くなるが、特にミスト型の水性溶液の場合は印加電圧が高電圧になるとタンパク質の燃焼が顕在化してくる。

[0049] また、沿面放電を行うための気圧は、大気圧が最も好適であるが、それより低い気圧下でも可能である。ただし、大気圧より低い気圧で沿面放電を行う場合には、特殊な密閉容器が必要であり、化学種の生成効率の低下、紫外線の放出が問題となる。大気圧より高い気圧で沿面放電を行う場合には、圧力容器が必要であり、低温プラズマの生成自体が困難となる傾向がある。よって、大気圧以外の環境下において本発明を行う実益は乏しいといえる。あえて気圧の範囲を挙げれば、0.02MPa～大気圧程度である。

[0050] 誘電体の厚さ（接地電極が接した面と印加電極が接した面との距離）は、用いた交流電圧の周波数と電圧、さらに気圧や誘電体の素材等を勘案して、技術常識に従って選択することが可能であるが、概ね0.5～2.5mmが好適である。特にこの厚さが薄すぎると誘電体が焼き切れてしまう傾向が認められ、ガラスでは0.2mm、ポリマー類では0.5mm程度が厚さの下限として例示される。また、この厚さが厚すぎると、パッシェンの法則に従い低温プラズマ発生に必要な電圧が大きくなる。

[0051] 沿面放電における誘電体は、比誘電率が100以下程度の常誘電体が該当し、素材としては、ガラス類、フォスフェイト、酸化アルミニウム（アル

ミナ)、ニオブ酸マグネシウム酸バリウム、チタン酸ネオジウム酸バリウム、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、フッ化ビニリデン-三フッ化エチレン共重合体(VDF/TrFE)、シアン化ビニリデン酢酸ビニル共重合体(VDCN/Vac)等を例示できるが、これらに限定されるものではない。また、印加電極と接地電極は、同一であっても異なっても良く、アルミニウム電極、ステンレス電極、銅電極、マグネシウム電極、鉄電極、タングステン電極、白金電極等の金属電極等を用いることができるが、これらに限定されるものではない。適宜素材を複合化された電極を用いることも可能である。

[0052] (1) - 2 : 誘電体バリア放電

誘電体バリア放電は、無声放電、オゾナイザ放電、バリア放電、誘電体バリア交流放電等とも呼ばれる放電形態である。誘電体バリア放電は、電極間に誘電体を介在させ、交流電圧を印加したときのギャップで生じる放電である。放電が生じても誘電体の存在により電極に電荷が流れ込むことができず、誘電体上に電荷が蓄積するために逆電界が発生して、放電はグロー放電の形態で停止し、放電の最終段階であるアーク放電には移行しない。よって誘電体バリア放電では、グロー放電のような安定で持続的な放電を維持させることが可能である。特に誘電体バリア放電は、誘電体の存在により大気圧以上でも拡散したグロー状の放電を安定して得ることができる。

[0053] 誘電体バリア放電を発生させて、本発明の水性溶液を調製するための装置は、誘電体バリア放電を発生させるための本質的な設備、具体的には、交流電源、給電電極、誘電体、及び、接地電極が備わっていれば特に制限は認められず、具体的な処理目的に応じて自由に設計し、作製することができる。

[0054] 誘電体バリア放電においては、交流電源から適切な周波数の交流電圧を、誘電体を介し、給電電極と接地電極との間で印加することにより、これらの電極の間に形成されたギャップにおいてグロー状の低温プラズマ放電を得ることができる。上記の交流電圧の周波数は、10～100Hzのオーダーから30kHz程度の間が好適であり、特に1～10kHzが好適である。10～10

0 Hzのオーダーよりも小さくなると低温プラズマの生成に極度に高い電圧が必要となり、低温プラズマの生成自体が困難な場合も想定される。30 kHzを超えると低温プラズマの生成が困難になる。誘電体バリア放電の印加電圧は、数kV～数十kVであり、好適には大気圧下で5～30 kVである。

[0055] また、誘電体バリア放電における気圧は、大気圧が最も好適であるが、それより低い気圧下でも可能である。ただし、大気圧より低い気圧で誘電体バリア放電を行う場合には、特殊な密閉容器が必要であり、化学種の生成効率の低下、紫外線の放出が問題となる。大気圧より高い気圧で誘電体バリア放電を行う場合には、圧力容器が必要であり、低温プラズマの生成自体が困難となる傾向がある。よって、大気圧以外の環境下において本発明を行う実益は乏しいといえる。あえて気圧の範囲を挙げれば、0.02 MPa～大気圧程度である。

[0056] 上記の誘電体バリア放電において用いられる本質的な設備のうち、「給電電極」と「接地電極」は、同一であっても異なっても良く、具体的には、上述した沿面放電の「接地電極」と「印加電極」と同様である。さらに誘電体も、上述した沿面放電と同様である。

[0057] (2) 水性溶液

上記のようにして発生する低温プラズマに水性溶液を接触させて、当該溶液分子を荷電させることにより、本発明の水性溶液を調製することができる。

[0058] 低温プラズマに接触させる「水性溶液」とは、水を主体とする水性溶媒に、溶質としてタンパク質を溶解した溶液である。水性溶媒は、タンパク質が容易に溶解するのであれば水であっても良いが、タンパク質の種類によっては水に対して難溶性である場合もあり、そのような場合に適宜塩等を添加することによって、目的のタンパク質の溶解度を向上させることが可能となる場合が認められる。どのような塩等をどの程度の量添加するかについては、溶解させるタンパク質の種類に応じた常法に従うことで行うことができる。プラズマ化がなされる前の水性溶液におけるタンパク質濃度の下限は25 μ

g / m l 程度であることが好適であり、さらに好適には $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ 程度である。 $25 \mu\text{g} / \text{m l}$ よりもタンパク質濃度が小さいと対象物表面におけるタンパク質の定着密度も小さくなってしまい、所望するような生体親和性を十分に発揮させることが難しくなる。例えばタンパク質が水性溶媒に対して難溶性であり、大きなタンパク質濃度を確保することが難しい場合には、重複して定着処理を行うことにより単回の定着密度の薄さを補うことも可能である。上限値は、所望する本発明の水性溶液の形態により異なる。すなわち、当該形態がミスト型である場合にはタンパク質の濃度が高すぎるとミスト化が困難になるため、 $3 \text{mg} / \text{m l}$ 程度が上限となる。これに対して液滴型の場合には特に限定されず、溶解可能限度までタンパク質濃度を設定することが可能であり、多くの場合 $255 \text{mg} / \text{m l}$ 以下程度であることが好適である。

[0059] 「タンパク質」には、ペプチドを含み、さらに糖タンパク質も含まれる。用いるタンパク質の種類は特に限定されないが、細胞外マトリックスタンパク質を含むことが好ましい。また、細胞外マトリックスタンパク質以外であっても、ポリリジン等の天然由来のポリアミノ酸も好適である。

[0060] 細胞外マトリックスタンパク質としては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン等のタンパク質；フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等の糖タンパク質；ゼラチン等の加工タンパク質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0061] さらに、本発明の水性溶液中には、「他の機能性物質」を含有させることも可能であり、当該機能性物質として、例えば、増殖因子、抗血栓因子、抗がん剤、免疫抑制剤、抗体、糖鎖、抗生物質等が挙げられることは、上述した通りである。

[0062] [本発明の水性溶液の調製方法]

上述したように、本発明の水性溶液には、(1) ミスト型、及び、(2) 液滴型、の2通りの態様が存在し、これらの態様は、印加電圧等の印加条件、さらに水性溶液のタンパク質濃度と送り速度をコントロールすることによ

り峻別して調製することができる。以下、沿面放電を行う本発明の装置の一実施態様を、図面を用いて開示を行い、当該装置を用いる本発明の水性溶液の調製方法について、これらの２種類の態様毎に説明する。

[0063] (１) ミスト型の水性溶液の調製方法

図３は、沿面放電を行う本発明の装置１における、縦断面を主体としたミスト型の水性溶液を調製する場合の解説図であり、図４（１）は、その本体部分１０である。図４（２）は、（１）の実線Ａ－Ａ’での横断面図である。さらに、図５は本発明の装置１の沿面放電がなされる、本体部分１０の導出口１０８近傍の壁断面の拡大解説図である。

[0064] 本体部分１０は、誘電体管１０１、印加電極１０２、及び、接地電極１０３で構成されており、印加電極１０２は、誘電体管１０１内側面の最下部近傍を残して当該内側面全面に密着しており、印加電極１０２は、その端部が接地電極１０３と誘電体管１０１の重なり合っている部分をはみ出さないように、誘電体管１０１の外側面の最下部近傍を残して当該外側面の下領域の一部の側面を取り巻き密着し、アース線１０５を介して電氣的な接地がなされている。「タンパク質水性溶液の導入場」１０７は、このような筒状の本体部分１０の内部である。当該導入場１０７の雰囲気、印加電極１０２が接触している。当該導入場１０７には、導入場１０７と外部の雰囲気が流通可能な導出口１０８が設けられている。導出口１０８は、本例では導入場１０７の筒口である。

[0065] 印加電極１０２は、導電線１４’等を介して交流電源と電氣的に接続されている。誘電体管１０１の外側面の残りの上部分には絶縁体１０４が取り巻き密着しており、接地電極１０３についての電氣的遮断が、本体部分１０の上部に向けてなされている。

[0066] 交流電源には、印加電圧、周波数等を調整可能とするために、ファンクションジェネレーター１３と増幅器１４、さらにモニター用のオシロスコープ１５が備わっており、それぞれは導電線１３’、１４’、及び、１５’で連結されて、印加電極１０２と電氣的に接続されている。

[0067] 当該交流電源に基づく交流電圧は、印加電極 102 に向けて印加される。そして、特に印加電極 102 における接地電極 103 と向かい合っている部分の辺縁部に交流周期に同期して強い電界が形成され、その部分から放出された電子が誘電体 101 に付与される現象と、それらが再び印加電極 102 に戻る現象が繰り返し起こり、当該辺縁部において低温プラズマ 106 が発生する。図 5 において、外側面において誘電体管 101 の側壁と密着している接地電極 103 の端部 1031 と、内側面において誘電体管 101 の側壁と密着している印加電極 102 の端部 1021 は重なり合うか、又は、僅かに接地電極 103 の端部 1031 がはみ出している。そして、接地電極 103 の反対側の端部 1032 は、筒の長さ方向において接地電極 102 よりも明らかに長い印加電極 102 の他端 1021 からは大きく引っ込んでいる。このような状態で通電を行うと、低温プラズマ 106 は、導出口 108 近傍の印加電極の端部 1021 の辺縁に大きく発生し、その一部により印加電極 102 の表面の導出口 108 側の一部が覆われる。反対側の端部 1032 の辺縁部には低温プラズマ 106' が発生するが、前述のようにこれは、タンパク質水性溶液のプラズマ化には用いられない。

[0068] 次に送液機構についての説明を行う。管状の本体部分 10 の 2 カ所の開口部のうち、絶縁体 104 が設けられている側、すなわち上部に封止栓 17 が挿入され、本体部分 10 の内側面の印加電極 102 を圧した状態で封止がなされている。さらに当該封止栓 17 においては、T 字型の中空の導管 16 における腕の一つ (162) が、封止栓 17 の素材による圧力を受けた状態で貫通固定されている。導管 16 の他の 2 つの腕のうち、一方 161 は、導管 114 を介してシリンジポンプ 11 の注射器 110 の外筒 111 に気密状態で連結されており、他方はエアポンプ 12 と気密状態で連結されている。

[0069] シリンジポンプ 11 は、注射器 110 及び支持台 115 からなっている。注射器 110 は、一端がつば部 1112 を伴って開放し、他端に液体導出口 1111 が設けられている外筒 111、及び、一端には気密性を保った状態で外筒 111 の内部を長さ方向に摺動可能な摺動体 1121 が設けられ、好

ましくは他端に押圧部 1 1 2 2 が設けられた内部棒 1 1 2、からなっており、外筒 1 1 1 の中にプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液 1 1 3 が適量入った状態で、内部棒 1 1 2 の一端が差し込まれている。この状態から内部棒 1 1 2 を矢印 B の方向に押し込むと、外筒内の水性溶液 1 1 3 は、液体導出部 1 1 1 1 を介して、導管 1 1 4 へと押し出される。一方、支持台 1 1 5 の台座 1 1 5 1 には、案内棒 1 1 5 2 の固定部 1 1 5 3 と 1 1 5 3' が設けられ、押し込み部 1 1 5 4 は棒上を移動可能な状態で、案内棒 1 1 5 2 で貫通されて案内支持されている。固定部 1 1 5 3 は、注射器 1 1 0 の外筒 1 1 1 を安定な状態で載置可能な凹部 1 1 5 5 が設けられている。注射器 1 1 0 の外筒 1 1 1 を当該凹部に載置し、内部棒 1 1 2 の他端の押圧部 1 1 2 2 を押し込み部 1 1 5 4 に宛がって、当該押し込み部 1 1 5 4 を案内棒 1 1 5 2 で案内させつつ矢印 B 方向に押し込むことにより、安定して上記の水性溶液 1 1 3 の導管 1 1 4 への導出を行うことができる。無論のこと、このような支持台を用いずに注射器 1 1 0 を直接手に持って上記の導出を行うことも可能であり、さらに、他のポンプ機構を用いることも可能である。

[0070] このようにして、シリンジポンプ 1 1 に封入されたプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液 1 1 3 が内部棒 1 1 2 の押圧による矢印 B 方向への圧力により T 字型の導管 1 6 に向けて押し出され、さらにエアポンプ 1 2 による矢印 C 方向への圧力により、導管 1 6 の開口部 1 6 2 に向けて押し出される。そして本体 1 0 内に押し出されたプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液 1 1 3' は、ほぼ印加電極 1 0 2 により形成される筒状構造の内側空間に向けて送液され、印加電極 1 0 2 の露出表面から当該内側空間に向けて周回状に形成される低温プラズマ 1 0 6 と接触し、所望するミスト状の本発明の水性溶液 1 8 が生成し、導入場 1 0 7 の導出口 1 0 8 から外部に向けて吐き出される。

[0071] 上記の例示された設備等に基づき、ミスト型の水性溶液の調製方法は前述のように、下記 (a) ~ (c) に従い行うことを特徴とするものである。

[0072] (a) 沿面放電を行うための交流電圧の周波数は 5 ~ 3 0 k H z、好適

には5～10kHzである。この周波数が5kHz未満であると低温プラズマ生成に必要な電圧値が過度に大きくなってしまい、タンパク質自体の燃焼が問題となる傾向が強くなり、30kHzを超えると低温プラズマの生成が困難となる。また、印加電圧は2～8V、好適には2～4kVである。この印加電圧が2kV未満であると荷電が不十分となってしまいタンパク質溶液のミスト化が困難となる。8kVを超えると、上記のようにタンパク質等が燃えてしまう比率が多くなり過ぎてミスト化が非効率となる。

[0073] (b) プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度は、上述した通りに $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $5\text{mg}/\text{ml}$ であり、好適には $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $3\text{mg}/\text{ml}$ である。

[0074] (c) 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の送り速度は、3.0～36mm/分である。この送り速度の意味については上記した。

[0075] その他の条件としては、場の圧力は大気圧が好適であり、ガスは、空気その他、ヘリウム、アルゴン等の不活性ガス等を選択することが可能であるが、空気が好適である。また、誘電体の厚さ（接地電極が接した面と印加電極が接した面との距離）については、上述した通りである。

[0076] (2) 液滴型の水性溶液の調製方法

液滴型の水性溶液の調製方法について繰り返せば、当該方法は、上述したプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を、特定の条件で低温プラズマに接触させることにより、当該タンパク質、又は、当該タンパク質と他の機能性物質の分子の荷電化をする、タンパク質水性溶液の調製方法である。

[0077] 液滴型の水性溶液は、上述したミスト型の水性溶液の調製に用いられる装置を用いて調製することが可能であり、周波数と印加電圧についての条件(a)は、印加電圧の範囲がミスト型と異なり、7.5～18kV、好適には7.5～16kVである。

[0078] このような印加電圧の下限値と上限値を規定した理由は、特に(c)の送り速度がミスト型よりも大きいことにより、印加電圧の範囲がミスト型より

も高くなるからである。プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度（b）についての条件は、上述した通りにミスト型のような濃度上限の制約は認められず、敢えて示せば上限は 255 mg/ml 程度である。（c）のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の送り速度は、 $36\sim180\text{ mm/分}$ である。

[0079] 場の圧力、ガスの種類、誘電体の厚さの条件は、ミスト型と同様である。

[0080] [本発明の生産方法と細胞固定物]

本発明の生産方法を行って細胞固定物とする対象となる細胞又は細胞塊は、特に限定されず、原核生物、真核生物細胞、さらにこれらの細胞に由来する改変細胞等が挙げられ、幹細胞であっても可能である。1種のみならず2種以上の細胞の組み合わせであってもよい。上述した「複数個の細胞又は細胞塊の表面への本発明の水性溶液の付着」の方式は特に限定されず、複数個の細胞の固定化の態様や目的に応じて自由に選択することができる。代表的な態様として、水性溶液がミスト型であれば、細胞又は細胞塊の表面への吹き付け、ミスト雰囲気との接触等が挙げられる。この接触として、細胞又は細胞塊のミスト雰囲気内への静置の他、細胞又は細胞塊の動きを伴ったミスト雰囲気との接触を行うこともできる。液滴型であれば、細胞又は細胞塊表面への流し掛け、水性溶液への細胞又は細胞塊の浸漬、細胞又は細胞塊表面への水性溶液の塗布等が挙げられる。いずれの態様においても本発明の水性溶液は、低温プラズマによる構成分子の荷電のために表面張力が極端に低くなっており、接触により容易に細胞表面に水性溶液を均等平坦に付着させることができる。1回の接触量の目安は、本発明の水性溶液のタンパク質濃度に依存するが、ミスト型の場合は $2\text{ }\mu\text{l/cm}^2$ 以上の接触表面の単位面積当たりの水性溶液の残存量となるように設定することが好適である。液滴型の場合は $48\text{ }\mu\text{l/cm}^2$ 以上の接触表面の単位面積当たりの水性溶液の残存量となるように設定することが好適である。

[0081] このようにして表面に本発明の水性溶液を付着させた細胞又は細胞塊同士を接触させることにより、これらの細胞又は細胞塊同士を接着させて、所望

する本発明の細胞固定物を得ることができる。

[0082] 生きた細胞同士を接着させる場合は、これらの過程は細胞を活かし続ける環境下で行うことが好ましい。そのため、これらの過程を細胞が乾燥させずに、かつ、短時間のうちに行って、その後、生産された細胞固定物を細胞生存条件下、好適には細胞培養条件下、又は、冷凍保存条件下、に置いて細胞の生存を維持することが好ましい。

[0083] 本発明の生産方法により得られる細胞固定物（本発明の細胞固定物）は、その用途は特に限定されない。例えば、医療分野、食品工業分野等の実用や研究に用いることが可能である。

[0084] 例えば、生体組織同士の接着の補助や促進のために、特定の細胞に本発明を適用して細胞固定物として用いることができる。具体的には、心筋細胞、血管由来細胞、筋肉由来細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、中皮細胞、肝細胞、角膜由来細胞等を、本発明の生産方法を用いて、シート状、塊状等となるように固定化させて、これを本発明の細胞固定物として所望の用途に用いることができる。特に、内皮細胞に関しては、血管系内皮細胞を中心に下記例示を行うが、これらに限定されるものではない。

[0085] 上述したように、本発明の生産方法において用いられる、細胞、又は、細胞塊を構成する細胞は、特に限定されず、単細胞生物そのものであっても良く、多細胞生物から分離されたものであっても良く、後述する医療分野や食品工業分野等の実用や研究に資する目的に応じて自由に選択することが可能である。真核単細胞生物又は真核多細胞生物細胞であっても、原核生物細胞であってもよい。また例えば、直接生体から分離した細胞や細胞株であっても、幹細胞〔ES細胞（embryonic stem cell）やiPS細胞（induced pluripotent stem cell）〕であっても、幹細胞に誘導をかけて事後的に分化させた細胞であっても、遺伝子導入により形質転換した細胞であってもよい。

[0086] ヒトの細胞の細胞固定物は、再生医療分野で非常に重要であるが、本発明の適用対象となるヒト細胞は特に限定されず、例えば、元々強い接着能力を

有する上皮細胞や表皮細胞のみならず、接着力が弱い内皮細胞も適用対象とすることができる。当該内皮細胞を例示すれば、例えば、臍帯静脈内皮細胞、冠状動脈内皮細胞、伏在静脈内皮細胞、肺静脈内皮細胞、肺動脈内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚血管内皮細胞、膀胱微小血管内皮細胞、心臓微小血管内皮細胞、皮膚微小リンパ管内皮細胞、腸間膜血管内皮細胞、腎臓糸球体内皮細胞、リンパ管内皮細胞、乳房微小血管内皮細胞、卵巣微小血管内皮細胞、胎盤微小血管内皮細胞、前立腺微小血管内皮細胞、網膜微小血管内皮細胞、小腸微小血管内皮細胞、甲状腺血管内皮細胞、肝臓類洞内皮細胞等の血管系内皮細胞；角膜内皮細胞、腎臓内皮細胞、脾臓内皮細胞等が挙げられる。

[0087] その他、酵母類を固定した本発明の細胞固定物を用いた、発酵の効率化、高質化、個性化の研究と実用化；特定の酵素を伴う細胞を本発明の細胞固定物として基質と接触させた場合の、当該酵素反応の効率化の研究と実用化；生体内部組織の足場（本発明によるものに限定されない）に対象となる再生対象細胞を本発明の細胞固定物として生着させた場合の、細胞の再生の内容と効率の研究と実用化；等が挙げられるが、これらはあくまでも一例である。なお、本発明の生産方法による細胞又は細胞塊同士の接着自体は、当該細胞等を生きたまま接着させることが可能な技術であるが、本発明の細胞固定物の使用時に必ず当該細胞等が生きている必要は無い場合もある。例えば、上記のように特定の酵素の存在を重要視する細胞固定物の場合には、細胞等が必ずしも生きていることを要求されない場合がある。

実施例

[0088] 以下、本発明の実施例を開示する。％は、特に断らない限りは対象に対する質量％である。

[0089] 〔低温プラズマ発生装置の作製と本発明の水性溶液の調製〕

低温プラズマ発生装置を図3、4に基づいて作製した。

[0090] 誘電体管101としては、両端が開放したガラス管（外径8mm、内径6mm）を用い、印加電極102及び接地電極103は、共にアルミニウムシ

ートテープ（厚さ $90\mu\text{m}$ ）を金属棒でガラス管壁面にこすりつけるように延ばして用いた。よって、印加電極103の厚みを考慮した管の内径も 6mm に近似される（以下、同様である）。絶縁体104としては絶縁テープ（カプトン（登録商標）・ポリイミドテープ：東レ・デュポン社）を用いて、本体部分10を構築した。T字型の導管16としてはガラス管を用い、封止栓17はゴム栓を用いた。その他の部品や装置は、市販されている製品を、多少の細工をしつつ用いて、低温プラズマ発生装置を作製した。上記した本装置の印加電極には、液滴型の調製を目的として、場合のピーク電圧 8kV 、周波数 5kHz を印加して、当該低温プラズマ発生装置の本体部分の接地電極103の誘電体101に対する接触面積に相当する、印加電極102の内周回面における沿面放電を行い、低温プラズマを発生させ、これに対して、コラーゲン含有水性溶液〔当該水性溶液 1ml あたり、 3mg/ml コラーゲン水溶液（Thermo Scientific社）を 0.67ml 、10倍濃度のMedium 199（Thermo Scientific社）を 0.1ml 、 1mol/l の水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業）を 0.017ml 、及び、超純水を 0.213ml 含有する〕を、シリンジポンプによる押圧により、T字型導管を介して本体部分に送液して流入させ、上記の低温プラズマと接触させて、液滴型の本発明のタンパク質水性溶液の調製を行った。送り容積は $1000\mu\text{l/分}$ （同じく、送り速度は 35.6mm/分 ）としたところ、所望する液滴型のタンパク質の水性溶液が得られることが確認された。なお、低温プラズマが発生する沿面放電体の表面積（沿面放電体の印加電極と接地電極が重なり合っている面面積）は接地電極103の誘電体101に対する接触面積として近似され、 94mm^2 であった。

[0091] [細胞シートの作成試験]

(1) 2層の細胞シート

2層細胞シート（接着層は1層）の作成を行い、当該2層細胞シートにおける細胞の接着と生育の評価を行った。

[0092] 当該2層細胞シートの構成細胞としては、上層を(i) Madin-Darby canine kidney cells; MDCK細胞, イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株(東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンク)、下層を(ii) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs (Cell Application社))として構成して作成した。具体的には、(i)細胞シート作成用感熱培養基材(UpperCell (登録商標); セルシード社)を用いて作成した、単層のMDCK細胞シートを、(ii) 0.1%ゼラチンコートプラスチックディッシュ上で培養したHUVECs細胞モノレイヤー、若しくは、コラーゲンゲル上で培養したHUVECs細胞モノレイヤー、に対して面同士を接触させることで、2層細胞シートの作成を試みた。この面同士の接触の接着液として、前記実施例の液滴型のプラズマ処理が施されたコラーゲン(Life Technologies社)水溶液を用いた。これと共に、コラーゲン水溶液を使用せずに直接細胞同士を接触させた系、及び、非プラズマ化コラーゲン水溶液を使用した系を対照として用いた。

[0093] (a) MDCK細胞シートの作成

上記のUpperCell (3.5cmディッシュ)に、MDCK細胞を $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞播種し、37℃でオーバーコンフルエントとなるまで培養を行った。培地は、DMEM (Gibco社)に10%FBS、1%のペニシリン・ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。培養完了後、一旦培地の除去を行い、乾燥防止のために同じ培地を50 μ l上層した。次いで、CellShifter™をMDCK細胞層上に被せて20℃で30分間培養した後、CellShifterと一緒にMDCK細胞層を剥がして、MDCK細胞の細胞シートを作成した。この段階の細胞シートの位相差顕微鏡像を図6(1)に示した。当該細胞シートは、MDCK細胞が均等に配置された細胞シートであることが確認できる。

[0094] (b) HUVECs細胞モノレイヤーの作成

0.1%のゼラチンコーティングが施された3.5cmプラスチックディッシュ(Iwaki社)、又は、コラーゲンゲル(Gibco社)上に、H

U V E C s 細胞を $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞播種し、 37°C でオーバーコンフルエントとなるまで培養を行った。培地は、Medium 199 (Gibco 社) に 20% のウシ胎児血清 (FBS : Gibco 社)、1% のペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco 社)、 $10 \mu\text{g}/\text{l}$ のヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF ; AUSTRAL Biologicals 社) を添加したものをを用いた。この段階のモノレイヤー (プラスチックディッシュ上) の位相差顕微鏡像を図 6 (2) に示した。当該モノレイヤーは、H U V E C s 細胞が均等に配置されたモノレイヤーであることが確認できる。

[0095] (c) 細胞シートの接着

上記 (b) のプラスチックディッシュ上の H U V E C s 細胞モノレイヤーの上から、上記 (a) の M D C K 細胞シートを細胞側から被せてこれらの面同士を接触させた。その際、上記のように、(i) コラーゲン水溶液は用いずに、直接細胞同士を接触させた系、(ii) 本発明のプラズマ化タンパク質水溶液である液滴型のプラズマ化コラーゲン水溶液を、予め H U V E C s 細胞モノレイヤーの上にかけてから M D C K 細胞シートの接触を行った系、(i ii) 当該プラズマ化処理を施していないコラーゲン水溶液を、予め H U V E C s 細胞モノレイヤーの上にかけてから M D C K 細胞シートの接触を行った系、に分けて上記の細胞接触を行った。

[0096] 上記の細胞接触の後、 37°C で 30 分間インキュベートを行い、次いで、Cell Shifter 上に $100 \mu\text{l}$ の培地を垂らし、30 秒ほど馴染ませてから、培養物の上から Cell Shifter を引き剥がして除去した後、上記の H U V E C s 細胞用の培地を系に加えて、 37°C で 24 時間培養を行った。図 7 に参考のために、ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上における、上記 $37^\circ\text{C} \cdot 30$ 分インキュベート後の液滴型プラズマ化処理を行ったコラーゲン水溶液を用いた系の状態を表す顕微鏡写真像を示す。M D C K 細胞シートにたまたま認められた空隙部分の写真である。他の部分は、全面が M D C K 細胞に覆われていた。上側 2 つの写真 (左が 4 倍、右が 10 倍) が H U V E C s 細胞にフォーカスした写真であり、下側 2 つの写

真（左が4倍、右が10倍）がMDC K細胞にフォーカスした写真である。
両細胞同士がしっかりと接着している様子が分かる。

[0097] (d) 結果

(i) コラーゲン水溶液を用いない系では、ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上であっても、コラーゲングル上であっても、MDC K細胞シートはH U V E C sモノレイヤーに全く貼り付かなかった。

[0098] (ii) プラズマ化処理を行ったコラーゲン水溶液

上記の37℃・24時間培養後も、ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上であっても、コラーゲングル上であっても、MDC K細胞又はH U V E C s細胞の剥離や変質は認められなかった。図8（1）に液滴型プラズマ化処理コラーゲンでの上記培養後の4倍の間隙部分の顕微鏡像を示す。左図がゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上における当該顕微鏡像であり、右図がコラーゲングル上における当該顕微鏡像である。

[0099] (iii) 無処理のコラーゲン水溶液

上記の37℃・24時間培養後において、コラーゲングル上の系には変化が認められなかったが、ゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上の系では、MDC K細胞シートが半剥離状態になってしまっていることが認められた。図8（2）に無処理コラーゲンでの上記培養後の4倍の間隙部分の顕微鏡像を示す。左図がゼラチンコーティングプラスチックディッシュ上における当該顕微鏡像であり、右図がコラーゲングル上における当該顕微鏡像である。

[0100] (iv) 小括

これらの結果より、プラズマ化処理をおこなったコラーゲン水溶液を用いた系では、MDC K細胞とH U V E C s細胞が安定して付着した、2層のヘテロな細胞積層シートを作成することができると認められた。これに対して、無処理の系の場合は、ゼラチンコーティングディッシュの系の場合には細胞シートの剥がれが認められ、付着される細胞の種類による相性や、培養の際に用いる細胞外マトリックスの種類に依存して2層のヘテロな細胞積

層シート作成の歩留まりが大きく変わることが分かった。

[0101] この実施例の系の場合、元々接着力の弱い内皮細胞であるH U V E C s細胞を用いており、特にこのような系の場合であっても、本発明により歩留まりの良い安定した細胞接着性が認められ、本発明の有用性が明らかになった。

[0102] (2) 多層の細胞シート

(a) 4層の細胞シートの作成

本発明の有用性をさらに検証するために、「H U V E C s – M D C K – H U V E C s – M D C K」の4層の積層細胞シートにおける本発明のプラズマ処理コラーゲン水溶液を用いた結果について詳しく検証を行う。

[0103] この4層の細胞シートの作成に際しては、上記(1)(a)の要領で作成した、「M D C K細胞シート」と、(1)(b)の要領で作成した「H U V E C s細胞モノレイヤー」、さらに上記(1)(a)の「M D C K細胞」に代えて、「H U V E C s細胞」を用いて作成した「H U V E C s細胞シート」(ただし、H U V E C s細胞の播種の前に、U p C e l lに0.1%ゼラチン溶液をコートした)を用いた。具体的には、上記の要領で、コラーゲンゲル(G i b c o)上に培養した単層の(i) H U V E C s細胞モノレイヤーの上から、(ii) M D C K細胞シート、(iii) H U V E C s細胞シート、及び、(iv) M D C K細胞シート、の順に積層した。この各々の積層工程を行う際に、各細胞シート層の間に接着液として、無処理のコラーゲン溶液、又は、液滴型のプラズマ処理を施したコラーゲン溶液を、積層の際の被覆がなされる各々の細胞シートの上から250 μ lを塗布した。積層工程終了後、当該4層積層のヘテロな細胞シートを、上記のH U V E C s細胞用の培養液にて24時間培養後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業社)を用いて固定処理(30分静置・室温)を行った。固定後、P B Sにより3回洗浄を行い、1%ブロックエース(D Sファーマバイオメディカル社)と0.1%T r i r o n X – 1 0 0 (和光純薬工業社)の混合液を用いて、膜透過処理と抗体非特異的吸着抑制(ブロッキング)処理(30分

静置・室温)を行った。その後、1%ブロッカー含有のPBSにより100倍に希釈した1次抗体(CD31抗体(Abcam社)、Histone1抗体(Santa Cruz Biotechnologies社))を添加し、4°Cにて24時間静置した。PBSにより3回洗浄を行い、PBSで200倍に希釈した2次抗体(Alexa Fluor 488、633抗体(Thermo Fisher Scientific社))を添加し、再び4°Cにて24時間静置した。その後PBSにより3回洗浄を行い、Alexa Fluor 546-Phalloidin(Thermo Fisher Scientific社)を用いてアクチン細胞骨格の染色(30分静置・室温)を行った。さらにPBSにより3回洗浄を行い、PBSに浸した状態で保存、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞シート積層構造体の蛍光染色像を撮影した。図9に液滴型のプラズマ化処理を施したコラーゲン水溶液を用いた場合の結果と、無処理のコラーゲンを用いた結果を示す。図9(1)がプラズマ化コラーゲンを用いた系における結果であり、図9(2)が無処理のコラーゲンを用いた系における結果である。

[0104] (b) 結果

図9(1)に示すように、プラズマ化処理コラーゲン溶液を接着液として用いた場合はCD31(血管内皮細胞マーカー)にて4層のうち2層を分けることができ、積層した各細胞シートが綺麗な4層を形成していることが認められた(yz断面像より)。また、それぞれの層のxy断面を見ると、HUECs細胞の層では、管腔形成により血管網が構築されていることが認められた。一方、無処理のコラーゲン溶液を接着液として用いた場合は、4層の境界がわかりにくく、特に内皮細胞であるHUECs細胞の層の接着性が悪い傾向が認められた。

[0105] 上記(1)の2層の細胞シートの実施例の「コラーゲングル」を用いた例の顕微鏡像からは、プラズマ化コラーゲン水溶液を施した場合と、無処理のコラーゲン水溶液を施した場合の差異が、必ずしも外観として明らかではなかった。しかしながら、本実施例により、「ゼラチンコーティングデッシュ

」のみならず、「コラーゲンゲル」を用いた場合も、プラズマ化コラーゲン水溶液を接着液として用いた方が接着した細胞同士の血管創生を介したネットワーク化が促進され、経時的な生体への歩留まり良い生着を見込むことが可能であり、ヘテロ型の細胞シートとして優れていることが明らかになった。

[0106] 上述したように、本発明においては細胞間接着が容易であることから、細胞の接着を行うまでは、単一種の細胞をシート状や塊状に培養すれば良く、競合可能性のある異なる細胞の共培養を行う必要が無くなり、前提となる培養作業も簡便に済ませることが可能であり、従来の3次元培養法等よりも短時間に接着工程を行うことが可能であることが明らかになった。

[0107] このように、本発明のプラズマ化を施したコラーゲンを細胞の接着液として用いることにより、内皮型細胞等の本来接着性が弱い細胞を含めても、自在な組合せの細胞同士を容易に接着させることが可能になることが分かった。さらに、これはシート型のみならず、他の形態、例えばヘテロ型細胞塊でも同様であることは明らかである。

符号の説明

- [0108] 1 : 本発明の装置
2 : 原理図における誘電体
3 : 原理図における印加電極
4 : 原理図における接地電極
5 : 原理図における交流電源
6 : 原理図におけるアース線
7 : 原理図における低温プラズマ放電
10 : 本発明の装置の本体部分
101 : 誘電体管
102 : 印加電極
1021 : 印加電極の導出口側の端部
1022 : 印加電極の非導出口側の端部

- 103 : 接地電極
- 1031 : 接地電極の導出口側の端部
- 1032 : 接地電極の非導出口側の端部
- 104 : 絶縁体
- 105 : アース線
- 106 : 低温プラズマ放電
- 106' : 接地電極側の低温プラズマ放電
- 107 : タンパク質水性溶液の導入場
- 108 : 導出口
- 11 : シリンジポンプ
- 110 : 注射器
- 111 : 外筒
- 1111 : 液体導出部
- 1112 : つば部
- 112 : 内部棒
- 1121 : 摺動体
- 1122 : 押圧部
- 113、113' : プラズマ化がなされる前の水性溶液
- 114 : 導管
- 115 : 支持台
- 1151 : 台座
- 1152 : 案内棒
- 1153、1153' : 案内棒の固定部set
- 1154 : 押し込み部
- 1155 : 外筒の載置部
- 12 : エアポンプ
- 13 : ファンクションジェネレーター
- 14 : 増幅器

- 15 : オシロスコープ
- 13'、14'、15' : 導電線
- 16 : T字型導管
- 161、162 : T字型導管の腕
- 17 : 封止栓
- 18 : プラズマ化がなされたミスト状の水溶性溶液

請求の範囲

- [請求項1] 低温プラズマ放電によりプラズマ化がなされているタンパク質水性溶液を、複数個の細胞又は細胞塊の表面に付着させた状態で、各々の細胞又は細胞塊同士を接触させることにより、これらの細胞又は細胞塊同士をタンパク質水性溶液の内容成分を介して接着させて集合固定物化することを特徴とする、複数細胞の集合固定物の生産方法。
- [請求項2] 複数個の細胞は2種以上の細胞であり、かつ、複数個の細胞塊は構成細胞が異なる2種以上の細胞塊であることを特徴とする、請求項1に記載の生産方法。
- [請求項3] 複数個の細胞、又は、複数個の細胞塊は構成細胞が異なる2種以上の細胞塊に、上皮細胞又は表皮細胞が含まれていることを特徴とする、請求項1又は2に記載の生産方法。
- [請求項4] 複数個の細胞、又は、複数個の細胞塊は構成細胞が異なる2種以上の細胞塊に、内皮細胞が含まれていることを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の生産方法。
- [請求項5] 細胞塊は、細胞シートであることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の生産方法。
- [請求項6] 複数細胞の集合固定物は、複数の細胞シート同士がシート面にて接着されている積層細胞シートであることを特徴とする、請求項5に記載の生産方法。
- [請求項7] 前記タンパク質水性溶液に含有されるタンパク質は、細胞外マトリックスタンパク質を含むことを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の生産方法。
- [請求項8] 細胞外マトリックスタンパク質は、コラーゲンであることを特徴とする、請求項7に記載の生産方法。
- [請求項9] 前記タンパク質水性溶液に、さらに他の機能性物質が含有されていることを特徴とする、請求項7又は8に記載の生産方法。
- [請求項10] 他の機能性物質は、増殖因子、抗血栓因子、抗がん剤、免疫抑制剤

、抗体、糖鎖、又は、抗生物質であることを特徴とする、請求項 9 に記載の生産方法。

[請求項11] 前記タンパク質水性溶液がミスト化されていることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の生産方法。

[請求項12] 前記タンパク質水性溶液が液滴であることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の生産方法。

[請求項13] 前記タンパク質水性溶液のミスト化は、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を、特定の送り速度で沿面放電による低温プラズマに接触させることにより、当該タンパク質、又は、当該タンパク質と他の機能性物質の分子を荷電化することによって、当該分子同士を反発させるプラズマミスト化であり、下記（１）～（３）に従い行うことを特徴とする、請求項 11 に記載の生産方法。

（１） 上記の沿面放電を行うための交流電圧の周波数は 5 ～ 30 kHz、印加電圧は 2 ～ 4 kV である。

（２） 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $5 \text{mg}/\text{ml}$ である。

（３） 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の特定の送り速度は、3.0 ～ 36 mm/分である。

[請求項14] 前記タンパク質水性溶液の液滴化は、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を、特定の送り速度で沿面放電による低温プラズマに接触させることにより、当該タンパク質、又は、当該タンパク質と他の機能性物質の分子の荷電化を、下記（１）～（３）に従い行うことを特徴とする、請求項 12 に記載の生産方法。

（１） 上記の沿面放電を行うための交流電圧の周波数は 5 ～ 30 kHz、印加電圧は 7.5 ～ 18 kV である。

（２） 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液のタンパク質濃度は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $255 \text{mg}/\text{ml}$ である。

（３） 上記のプラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液の特定

の送り速度は、36～180mm/分である。

[請求項15] タンパク質水性溶液のミスト化、又は、液滴化は、「タンパク質水性溶液の導入場が設けられ、当該導入場においてタンパク質水性溶液に沿面放電体から発生する低温プラズマ放電を作用させることにより、プラズマ化したタンパク質を生産するための沿面放電装置であって、当該沿面放電体は、面状の誘電体の表裏の一方において印加電極が、他方において接地電極がそれぞれ当該誘電体と接触状態で設けられており、当該誘電体の面上の当該印加電極の端部と当該接地電極の端部の一部又は全部が揃っているか、あるいは、当該接地電極の端部が当該印加電極の端部の一部又は全部からはみ出すように設けられている沿面放電体であって、当該沿面放電体の1個又は2個以上が、タンパク質水性溶液の導入場の雰囲気に対する接触面を印加電極面として設けられていることを特徴とする、沿面放電装置」を沿面放電手段として用い、かつ、当該沿面放電装置のタンパク質水性溶液の導入場に向けて、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を特定の送り速度で送液して、当該導入場の内部に発生させた低温プラズマと接触させて行われることを特徴とする、請求項13又は14に記載の生産方法。

[請求項16] 上記沿面放電装置におけるタンパク質水性溶液の導入場において、プラズマ化がなされる前のタンパク質水性溶液を導入するための導入口、及び、プラズマ化したタンパク質の導出口が設けられていることを特徴とする、請求項15に記載の生産方法。

[請求項17] 上記沿面放電装置におけるタンパク質水性溶液の導入場が筒状体の内部となっており、沿面放電体の1個又は2個以上が当該筒状体の全部又は一部を構成することを特徴とする、請求項15又は16に記載の生産方法。

[請求項18] 上記沿面放電装置における筒状体の全部又は一部を構成する沿面放電体の数は1個であることを特徴とする、請求項17に記載の生産方

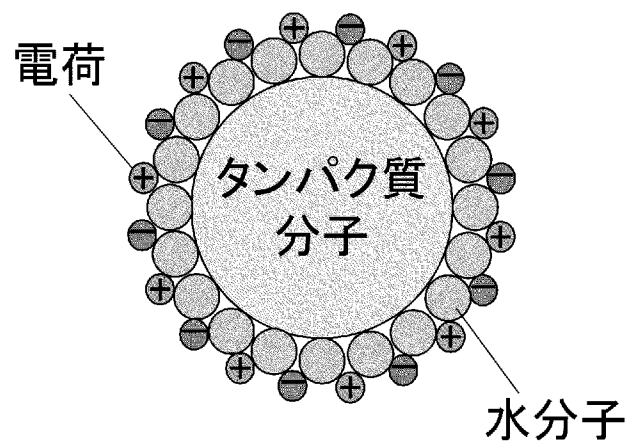
法。

[請求項19] 上記沿面放電装置のタンパク質水性溶液の導入場に向けての送液機構が設けられていることを特徴とする、請求項15～18のいずれかに記載の生産方法。

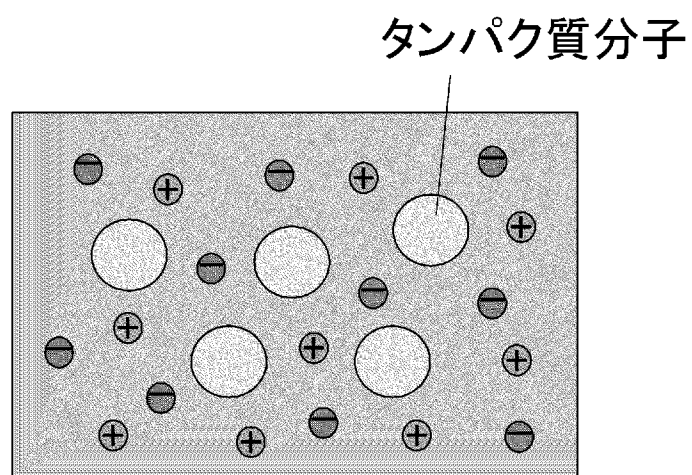
[請求項20] 請求項1～19のいずれかに記載の生産方法を行うことにより生産されることを特徴とする、複数細胞の集合固定物。

[図1]

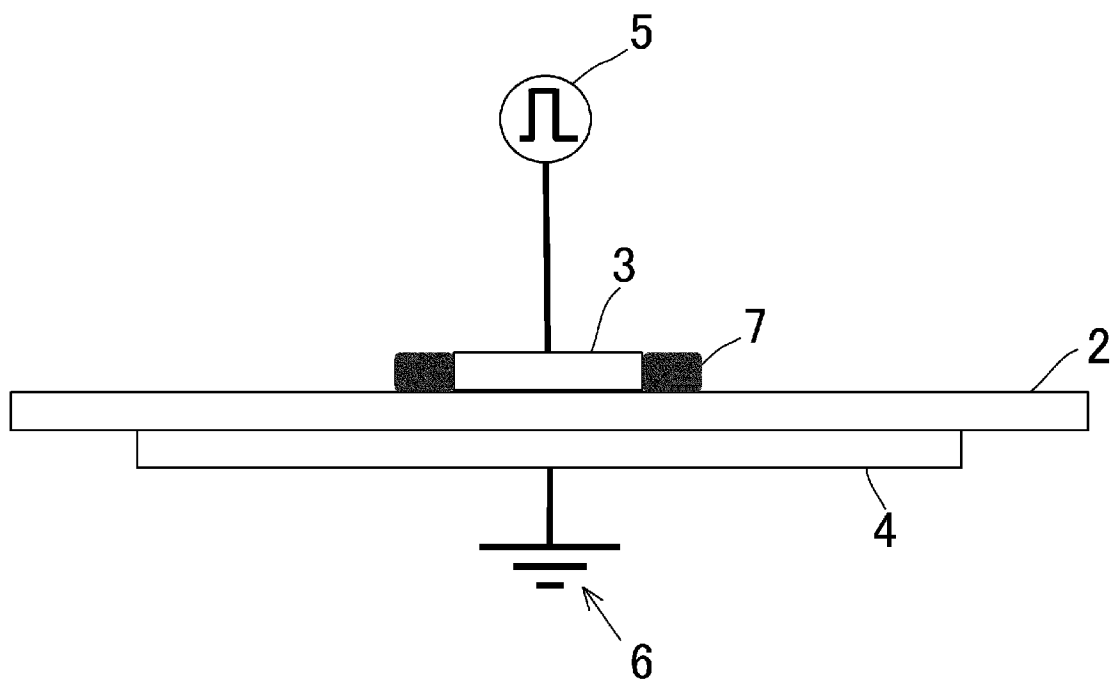
(1)



(2)

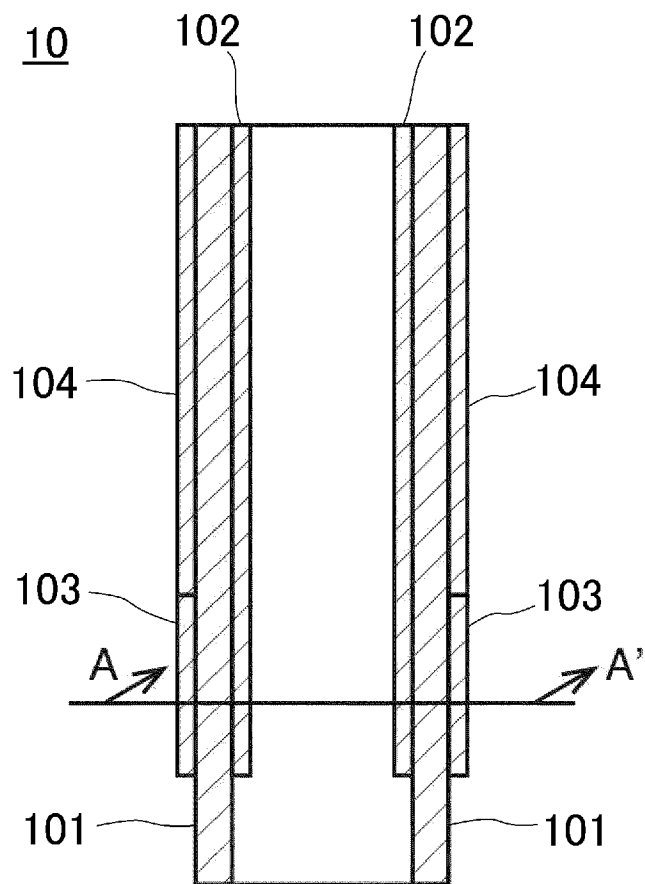


[図2]

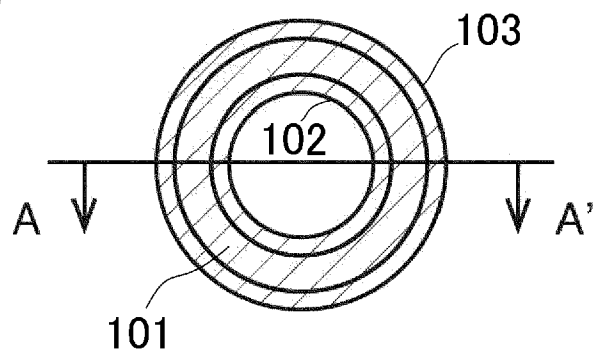


[図4]

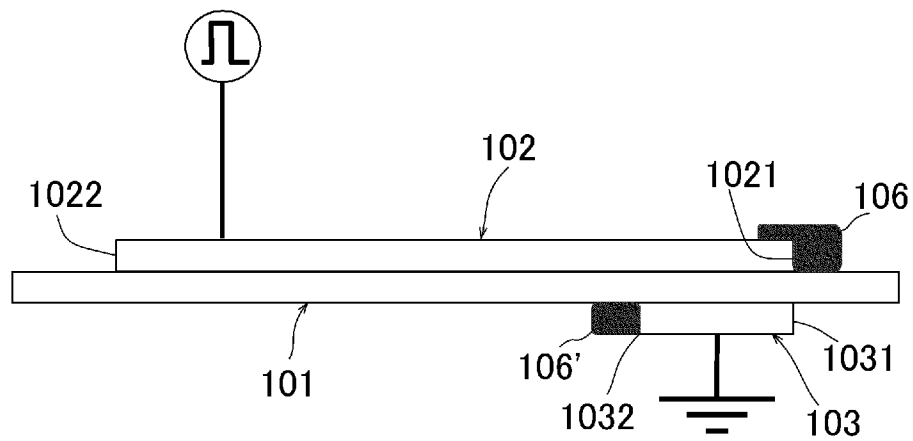
(1)



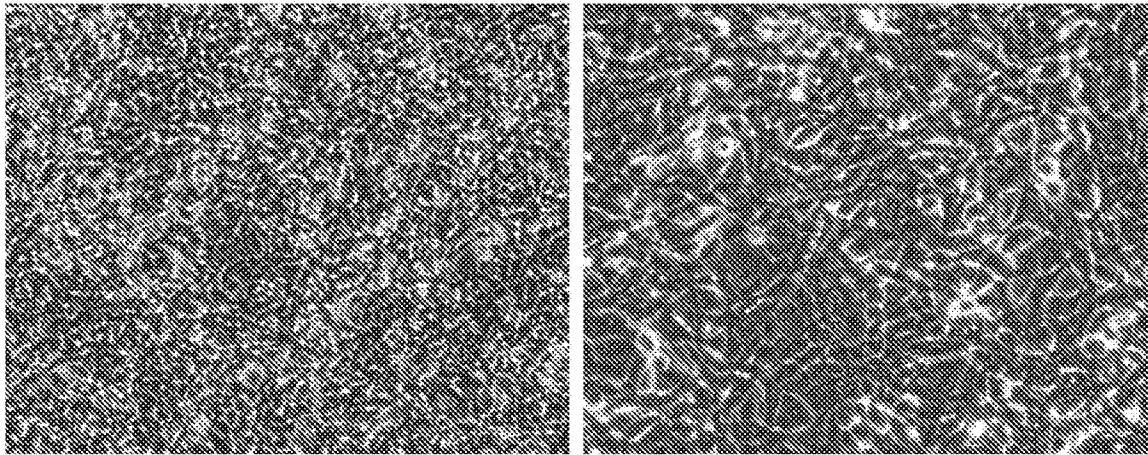
(2)



[図5]



[図6(1)]

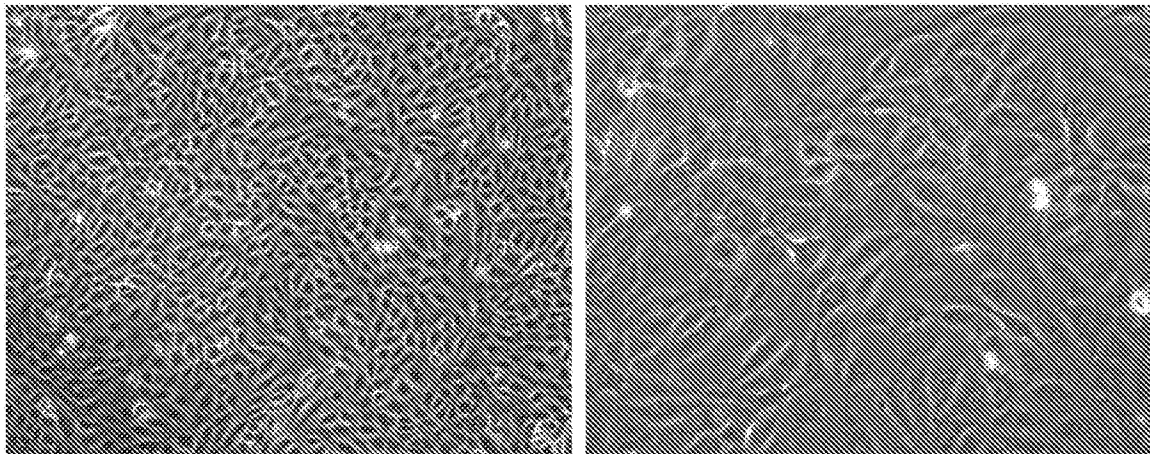


X4 対物レンズ

X10 対物レンズ

MDCK

[図6(2)]



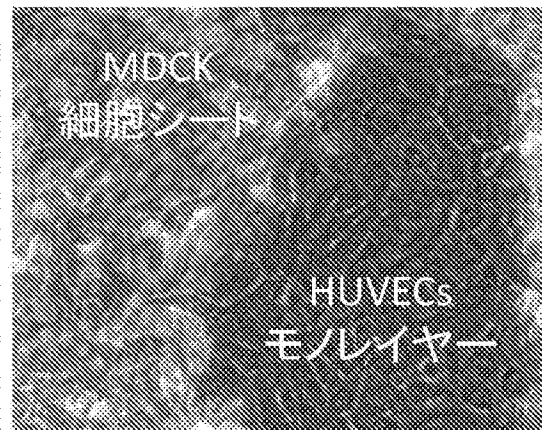
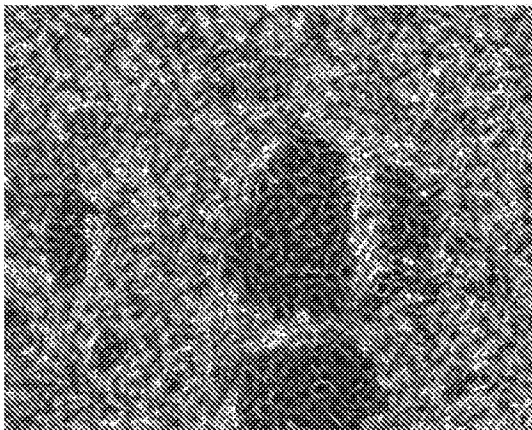
X4 対物レンズ

X10 対物レンズ

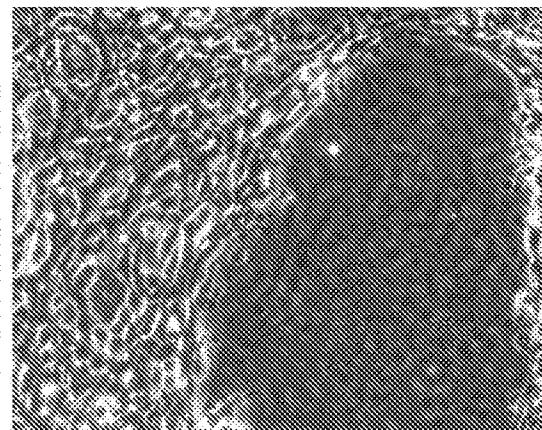
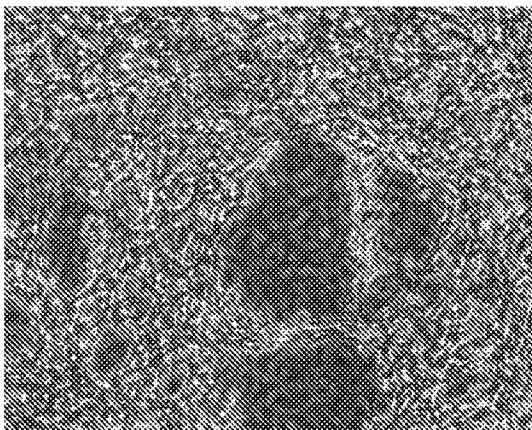
HUVECs

[図7]

HUVECsにフォーカス



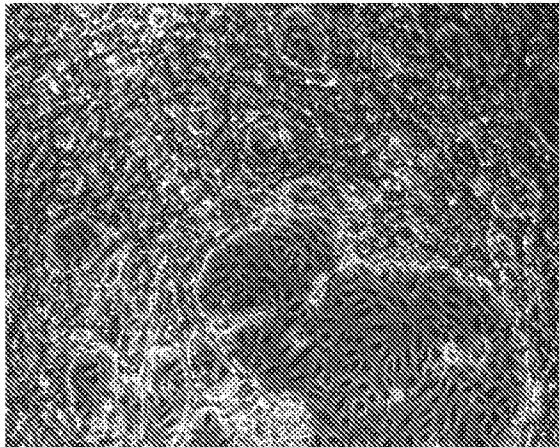
MDCKにフォーカス



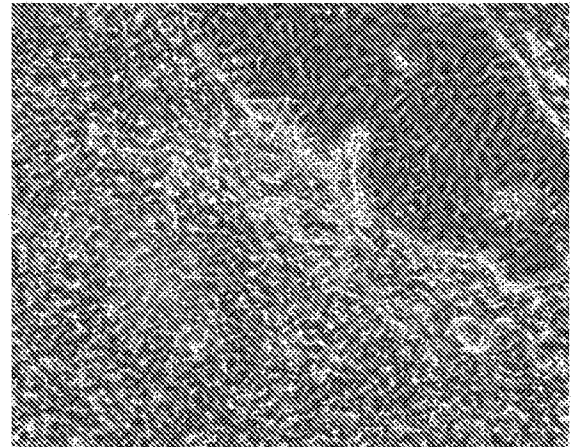
X4 対物レンズ

X10 対物レンズ

[図8(1)]

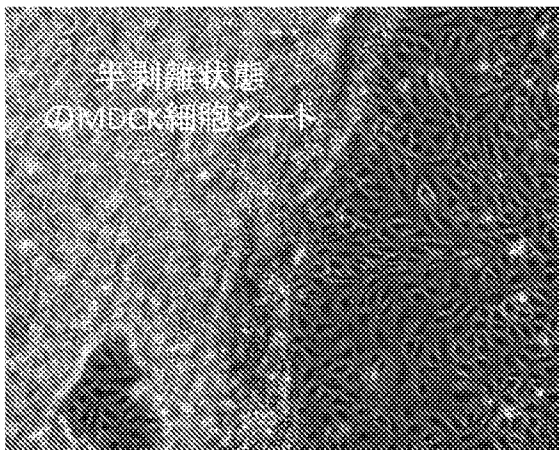


ゼラチンコートディッシュ上の
HUVECsにMDCK細胞シートを
接着しようとした場合 (x4対物レンズ)

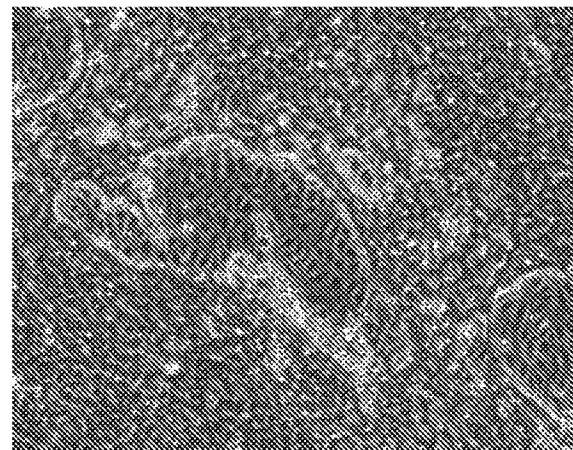


コラーゲンゲル上の
HUVECsにMDCK細胞シートを
接着しようとした場合 (x4対物レンズ)

[図8(2)]



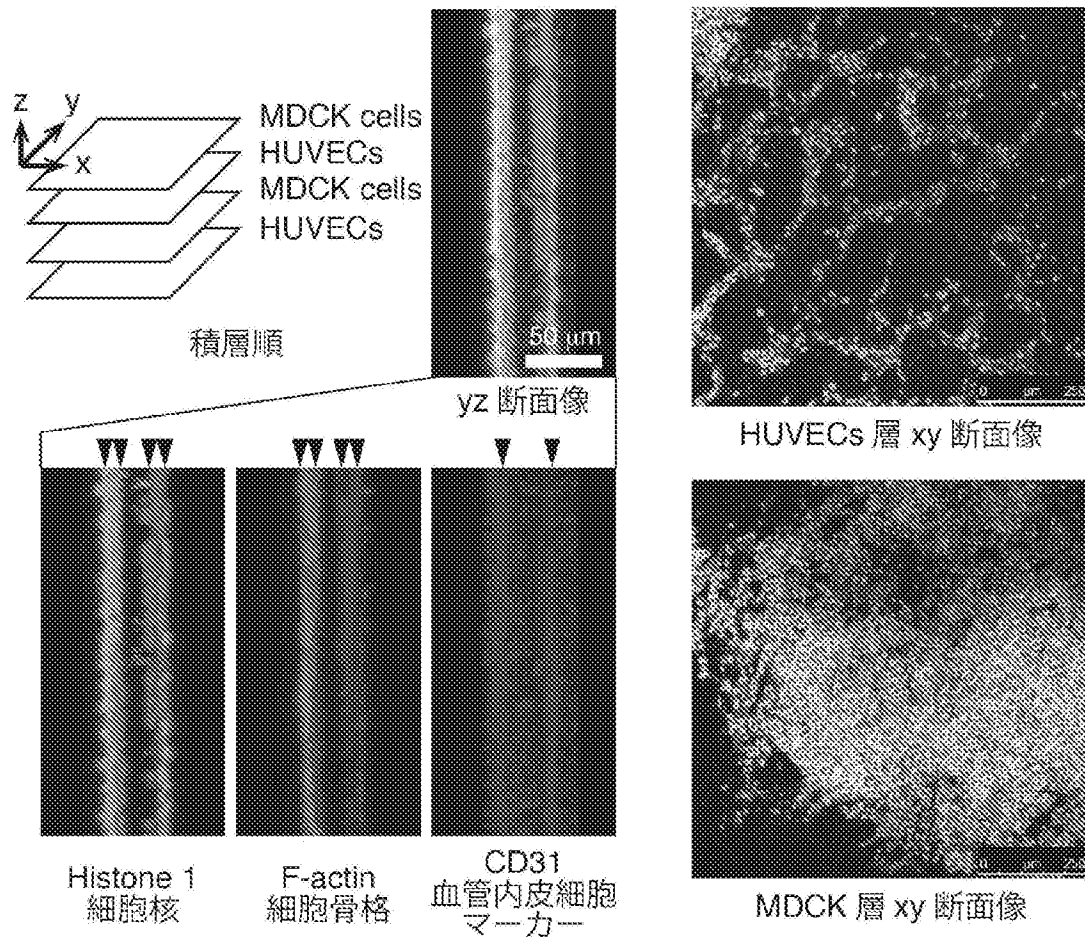
ゼラチンコートディッシュ上の
HUVECsにMDCK細胞シートを
接着しようとした場合 (x4対物レンズ)



コラーゲンゲル上の
HUVECsにMDCK細胞シートを
接着しようとした場合 (x4対物レンズ)

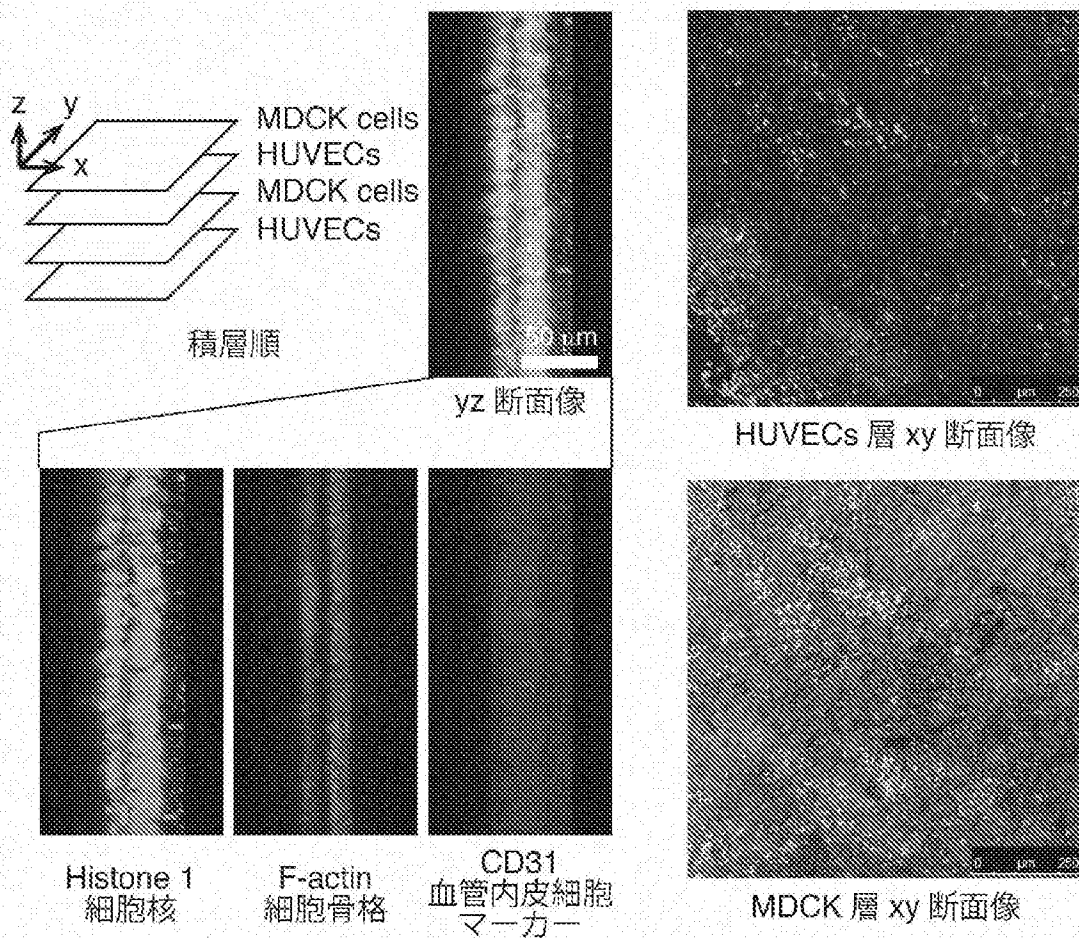
[図9(1)]

(1) プラズマ化コラーゲン溶液を用いた細胞シートの接着評価



[図9(2)]

(2) 無処理コラーゲン溶液を用いた細胞シートの接着評価



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C07K1/24(2006.01)n, C07K14/78(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/07, C12N1/00, C12N5/071, C07K1/24, C07K14/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 2012/118099 A1 (Tokyo Women's Medical University), 07 September 2012 (07.09.2012), claims; paragraphs [0015] to [0018] & US 2014/0072599 A1 paragraphs [0026] to [0028]; claims & EP 2682134 A1 paragraphs [0015] to [0018]; claims	<u>20</u> 1-19
<u>X</u> A	WO 2006/093151 A1 (Cellseed Inc.), 08 September 2006 (08.09.2006), claims; paragraphs [0010] to [0016] & US 2008/0226692 A1 paragraphs [0010] to [0020]; claims & EP 1857126 A1 paragraphs [0010] to [0016]; claims	<u>20</u> 1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May 2016 (17.05.16)

Date of mailing of the international search report
31 May 2016 (31.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056632

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-210156 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 29 July 2003 (29.07.2003), entire text; claims (Family: none)	1-20
P,X	WO 2015/079759 A1 (Osaka University), 04 June 2015 (04.06.2015), paragraphs [0006] to [0029] & JP 2015-100334 A	20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C07K1/24(2006.01)n,
C07K14/78(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/07, C12N1/00, C12N5/071, C07K1/24, C07K14/78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2012/118099 A1 (学校法人 東京女子医科大学) 2012.09.07, [特許請求の範囲]、[0 0 1 5] - [0 0 1 8] & US 2014/0072599 A1 :[0026]-[0028], Claims & EP 2682134 A1 :[0015]-[0018], Claims	20 1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

3 1 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 9 5 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2006/093151 A1 (株式会社セルシード) 2006. 09. 08, [特許請求の範囲]、[0 0 1 0] – [0 0 1 6] & US 2008/0226692 A1 :[0010]-[0020], Claims & EP 1857126 A1 :[0010]-[0016], Claims	<u>20</u> 1-19
A	JP 2003-210156 A (住友ベークライト株式会社) 2003. 07. 29, 全文、【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-20
P, X	WO 2015/079759 A1 (国立大学法人大阪大学) 2015. 06. 04, [0 0 0 6] – [0 0 2 9] & JP 2015-100334 A	20