

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/118013

発行日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(43) 国際公開日 **平成17年12月15日(2005.12.15)**

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)		A 6 1 L 27/00	V	4 C 0 8 1
A 6 1 F 2/06 (2006.01)		A 6 1 F 2/06		4 C 0 9 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

出願番号	特願2006-514093 (P2006-514093)	(71) 出願人	000002897 大日本印刷株式会社 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/009917		
(22) 国際出願日	平成17年5月31日(2005.5.31)	(71) 出願人	503382667 森田 育男 東京都板橋区蓮根3-20-3-309
(31) 優先権主張番号	特願2004-162900 (P2004-162900)	(74) 代理人	100101203 弁理士 山下 昭彦
(32) 優先日	平成16年6月1日(2004.6.1)	(74) 代理人	100104499 弁理士 岸本 達人
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	森田 育男 東京都板橋区蓮根三丁目20番3-309号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工血管およびその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞や組織の活動維持に必要な栄養を運搬可能な人工組織を提供することを主目的としている。

上記目的を達成するために、本発明は、生体組織の画像から血管の形状を抽出し、血管形状画像とする血管形状画像抽出工程と、

前記血管形状画像の各血管の形状を調整し、血管形成パターンを形成する血管形成パターン調整工程と、

細胞培養層に、血管細胞と接着性を有し、かつ前記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部と、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつ前記細胞接着部以外の領域に形成された細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養パターンを形成

する血管細胞培養パターン形成工程と、
前記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる血管細胞培養工程とを有することを特徴とする人工血管の製造方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体組織の画像から血管の形状を抽出し、血管形状画像とする血管形状画像抽出工程と

、
前記血管形状画像の各血管の形状を調整し、血管形成パターンを形成する血管形成パターン調整工程と、

細胞培養層に、血管細胞と接着性を有し、かつ前記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部と、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつ前記細胞接着部以外の領域に形成された細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養パターンを形成する血管細胞培養パターン形成工程と、

前記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる血管細胞培養工程とを有することを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項 2】

前記血管細胞培養パターン形成工程が、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着部および前記細胞接着阻害部を形成することができる前記細胞培養層にエネルギーを照射し、前記血管細胞培養パターンを形成する工程であることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の人工血管の製造方法。

【請求項 3】

請求の範囲第 1 項または請求の範囲第 2 項に記載の人工血管の製造方法により製造された人工血管を用いることを特徴とする人工組織の製造方法。

【請求項 4】

血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された 2 次元パターンからなる血管のパターンを有することを特徴とするフォトマスク。

【請求項 5】

血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された 2 次元パターンにより形成された血管のパターンを有することを特徴とする人工血管。

【請求項 6】

請求の範囲第 5 項に記載の人工血管を有することを特徴とする人工組織。

【請求項 7】

基材と、前記基材上に形成され、血管細胞と接着性を有する細胞接着部および前記血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害部からなるパターンを有する細胞培養層と、前記細胞接着部に接着した血管細胞とを有する血管細胞培養パターン基材であって、

前記細胞接着部が、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された 2 次元パターンからなる血管のパターン状に形成されていることを特徴とする血管細胞培養パターン基材。

【請求項 8】

基材と、前記基材上に剥離可能に設けられた血管内皮細胞とからなる血管内皮細胞パターン基材であって、前記血管内皮細胞が血管ネットワークを 2 次元で表現したパターン状に管形状となる線幅で形成されていることを特徴とする血管内皮細胞パターン基材。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、再生医療等の分野で用いられる人工血管に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。また、医療等の分野においては、生体から取り出した細胞、たんぱく質、糖質、脂質等を細胞工学等の手法により再組織化し、人工的に組織や臓器を作り出す試みもなされている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

ここで、一般的な動物細胞は、栄養等を供給されなければ死滅してしまうため、培養された細胞を人工組織等として用いる場合には、人工組織中に毛細血管を配し、その中に血液を流し、血管によって酸素や栄養分等を供給したり、老廃物を運び出すこと等が必要である。また、生体内の微小血管に梗塞が発生し、酸素や栄養分の供給、老廃物の運搬が充分に行われない疾患も存在する。

このような課題に対し、従来より例えば、非特許文献 1 ~ 3 に示されるような手法で、人工的に毛細血管の形成が試みられているが、いずれも無秩序に血管様の組織（キャピラリー）が形成されるのみで、人工組織の機能維持や微小血管の梗塞部位の治療に必要な量の血液を所望の場所へ送液できる毛細血管を形成することは困難であった。また、非特許文献 4 または 5 に示されるように、人工的な材料により血管を形成する方法も研究されているが、細い血管を形成することは困難であり、微小血管の梗塞部位の治療や人工組織の構築に用いることが可能なものとすることはできなかった。

10

【 0 0 0 4 】

一方、本発明者らは、細胞接着性または細胞接着阻害性を有する層の表面を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により変化させて、細胞接着部および細胞接着阻害部からなるパターンを形成し、この細胞接着部のみを高精密に細胞を接着させて、細胞をパターン状に培養させる方法を提案している。このパターンニング方法によれば、細胞接着部および細胞接着阻害部の境界で細胞が刺激され、その結果、パターン状に接着した細胞を配向したり、伸展状態への形態変化を強く促すことができる。本方法にて血管内皮細胞をパターン状に培養し、更に血管内皮細胞の血管組織化を誘導する足場材料と接触、転写することにより所望のパターンに沿った細い血管組織を形成することも可能となった。しかしながら、この血管を微小血管の梗塞部位の治療や前述の人工組織の構築に適した形状で形成させる技術は、まだ発明されていなかった。

20

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】D.E. Ingber 他, The Journal of Cell Biology (1989) p.317-

【非特許文献 2】B. J. Spargo 他, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1994) p.11070-

【非特許文献 3】R. Auerbach 他, Clinical Chemistry (2003) p.32-

【非特許文献 4】C.B. Weinberg 他, Science (1986) p.397-

30

【非特許文献 5】N.L. Heures 他, The FASEB Journal (1998) vol.12 p.47-

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

以上のことから、微小血管の梗塞部位の治療や人工的な組織、臓器の構築には、その機能を維持する為に必要な酸素や栄養素を効率的に供給したり、老廃物を送り出すことが不可欠であり、微小血管の梗塞部位の治療や生体外で構築された人工組織に適した形状で形成された人工血管の製造方法の提供が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

40

本発明は、生体組織の画像から血管の形状を抽出し、血管形状画像とする血管形状画像抽出工程と、上記血管形状画像の各血管の形状を調整し、血管形成パターンを形成する血管形成パターン調整工程と、細胞培養層に、血管細胞と接着性を有し、かつ上記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部と、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつ上記細胞接着部以外の領域に形成された細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養パターンを形成する血管細胞培養パターン形成工程と、上記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる血管細胞培養工程とを有することを特徴とする人工血管の製造方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

微小血管の梗塞部位の治療や生体外で構築された人工組織に適した人工血管の形状とし

50

て、生体組織中の血管の構造を模倣した形状がある。生体組織中では組織内の細胞が活動を行う為に必要な酸素、栄養分、老廃物を、血液を介し運搬している。

本発明によれば、上記血管細胞培養パターン形成工程において、血管細胞が生体組織の血管のパターン状に血管を形成出来るように調整した上記細胞接着部を形成することから、血管細胞培養工程において、血管細胞を培養することにより、生体組織中の血管のパターンと同様のパターン状に人工血管を形成することが可能となる。これにより、本発明により製造された人工血管を、例えば微小血管の梗塞部位や人工組織中に配置すること等によって、組織中の細胞に、生体組織と同様に血管から栄養を供給すること等が可能となる。また、本発明においては、上記血管形成パターン調整工程において、生体組織の画像から得られた血管形状画像を調整することから、上記血管細胞培養パターン形成工程および血管細胞培養工程により、効率よく目的とするパターン状に血管を形成することが可能となる。

10

【0009】

上記発明においては、上記血管細胞培養パターン形成工程を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着部および上記細胞接着阻害部を形成することができる。この場合、上記血管細胞培養パターンの形成の際に、細胞に悪影響を及ぼすような薬品を用いたり、複雑な工程を経ることなく、容易に、かつ高精細に血管細胞培養パターンを形成することができる、という利点を有する。

【0010】

本発明は、上記人工血管の製造方法により製造された人工血管を用いることを特徴とする人工組織の製造方法を提供する。本発明によれば、上記製造方法により製造された人工血管を用いることから、製造された人工組織中の細胞に、生体組織と同様に血管から栄養を供給すること等が可能となり、人工組織を種々の用途に用いることができるものとなる。

20

【0011】

また、本発明は、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された2次元パターンからなる血管のパターンを有することを特徴とするフォトマスクを提供する。

【0012】

本発明によれば、フォトマスクが血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された2次元パターンからなる血管のパターンを有することから、このフォトマスクを用いて、例えば細胞培養層をパターンニングして生体組織中の血管の形状に細胞と接着性を有する細胞接着部を形成し、血管内皮細胞をこの細胞接着部上で培養して管形状とすることができる。これにより、目的とするパターン状に人工血管を形成することができ、例えば生体組織の血管と同様のパターンを有する人工血管等を形成することができる。

30

【0013】

また、本発明は、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された2次元パターンにより形成された血管のパターンを有することを特徴とする人工血管を提供する。

【0014】

本発明の人工血管は、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された2次元パターンにより形成された血管のパターンを有することから、例えば生体組織に移植したり、人工組織に用いる等、種々の用途に利用することが可能な人工血管とすることができる。

40

【0015】

またさらに、本発明は上記人工血管を有することを特徴とする人工組織を提供する。

【0016】

本発明の人工組織は、生体組織の血管の形状を有する人工血管を有することから、生体組織中と同様に、細胞に栄養を供給したりすること等ができ、種々の用途に用いることが可能なものとなる。

【0017】

また、本発明は、基材と、上記基材上に形成され、血管細胞と接着性を有する細胞接着

50

部および上記血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害部からなるパターンを有する細胞培養層と、上記細胞接着部に接着した血管細胞とを有する血管細胞培養パターン基材であって、上記細胞接着部が、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された２次元パターンからなる血管のパターン状に形成されていることを特徴とする血管細胞培養パターン基材を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明の血管細胞培養パターン基材によれば、上記細胞接着部上で血管細胞を目的とするパターン状に高精細に培養することができる。

【 0 0 1 9 】

また、本発明は、基材と、上記基材上に剥離可能に設けられた血管内皮細胞とからなる血管内皮細胞パターン基材であって、上記血管内皮細胞が血管ネットワークを２次元で表現したパターン状に管形状となる線幅で形成されていることを特徴とする血管内皮細胞パターン基材を提供する。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の血管内皮細胞パターン基材においては、所定のパターン状に形成された血管内皮細胞が剥離可能に設けられていることから、この血管内皮細胞を剥離して、例えば人工組織等、種々の用途に用いることができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 1 】

本発明によれば、組織中の細胞に、生体組織と同様に血管から栄養を供給すること等が可能であり、種々の用途に用いることが可能な人工血管を効率よく目的とするパターン状に形成することができるという効果を奏するものである。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 本発明の人工血管の製造方法の一例を説明する説明図である。

【 図 2 】 本発明の人工血管の製造方法の一例を説明する説明図である。

【 図 3 】 本発明の人工血管の製造方法の血管細胞培養パターン形成工程の一例を説明する説明図である。

【 図 4 】 本発明の人工血管の製造方法の血管細胞培養パターン形成工程の一例を説明する説明図である。

30

【 図 5 】 本発明の血管細胞培養パターン基板の一例を説明する概略断面図である。

【 符号の説明 】

【 0 0 2 3 】

- 1 ... 細胞培養層
- 2 ... 細胞接着部
- 3 ... 細胞接着阻害部

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 4 】

本発明は、再生医療等の分野で用いられる人工血管とその製造方法、その人工血管を用いた人工組織やその製造方法、それらの製造の際に用いられるフォトマスク、および人工血管を形成するための血管細胞培養パターン基材に関するものである。以下、それぞれについて詳しく説明する。

40

【 0 0 2 5 】

A . 人工血管の製造方法

まず、本発明の人工血管の製造方法について説明する。本発明の人工血管の製造方法は、生体組織の画像から血管の形状を抽出し、血管形状画像とする血管形状画像抽出工程と、上記血管形状画像の各血管の形状を調整し、血管形成パターンを形成する血管形成パターン調整工程と、細胞培養層に、血管細胞と接着性を有し、かつ上記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部と、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつ上記細胞接着部以外の領域に形成された細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養

50

パターンを形成する血管細胞培養パターン形成工程と、上記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる血管細胞培養工程とを有するものである。

【0026】

本発明の人工血管の製造方法は、例えば図1に示すように、生体組織の画像(図1(a))から血管の形状を抽出し、血管形状画像(図1(b))とする血管形状画像抽出工程と、その血管形状画像(図1(b))の各血管の形状を調整し、血管形成パターン(図1(c))とする血管形成パターン調整工程と、例えば図2に示すように、細胞培養層1に、上記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部2と、それ以外の領域の細胞接着阻害部3とからなる血管細胞培養パターンを形成する血管細胞培養パターン形成工程(図2(a))と、その血管細胞培養パターンの細胞接着部2に血管細胞4を付着させて培養し、組織化させる血管細胞培養工程(図2(b))とを有するものである。

10

【0027】

ここで、本発明でいう生体組織とは、生体中に存在する血管とその他の細胞等により形成されている組織をいうこととし、例えば腎臓や肝臓等の臓器、眼底、皮膚等、各種器官をいうこととする。

【0028】

本発明によれば、上記血管細胞培養パターン形成工程において、細胞培養層に生体組織中の血管と同様のパターンである血管形成パターンの形状に、血管細胞と細胞接着性を有する細胞接着部を形成することから、血管細胞培養工程において、細胞接着部にのみ血管細胞を接着させて培養させることができ、細胞接着阻害部には血管細胞が接着しないものとしてすることができる。これにより、生体組織中の血管のパターンと同様のパターン状に人工血管を形成することが可能となり、この人工血管は、組織中の細胞に、例えば微小血管の梗塞部位や人工組織中に配置すること等によって、生体組織と同様に栄養を供給すること等が可能なものとしてすることができる。

20

【0029】

また、本発明においては、上記血管形成パターン調整工程において、生体組織の画像から得られた血管形状画像を、上記血管細胞培養パターン形成工程および血管細胞培養工程において、人工血管を形成しやすい形状等に調整することから、効率よく目的とするパターン状に人工血管を形成することが可能となり、製造効率等の面からも好ましいものとしてすることができる。

30

以下、本発明の人工血管の製造方法の各工程ごとに詳しく説明する。

【0030】

1. 血管形成画像抽出工程

まず、本発明の血管形成画像抽出工程について説明する。本発明の血管形成画像抽出工程は、生体組織の画像から血管の形状を抽出し、血管形状画像とする工程であり、生体組織の画像から血管の形状を抽出した画像を得ることが可能な方法であれば、その手法は特に限定されるものではない。

【0031】

本工程に用いられる生体組織の画像としては、生体内の組織を画像化したものであり、血管の形状が特定できるようなものであれば特に限定されるものではない。このような画像としては、例えば三次元的に撮影された画像であってもよいが、特に二次元的に撮影された画像であることが好ましい。二次元的に撮影された画像を用いることにより、後述する血管形成パターン調整工程における調整が容易となるからである。このような画像の撮影方法としては、例えば皮膚や眼底の血管写真のように直接生体組織中の血管を観察する方法や、直接生体組織の断面を撮影する方法等であってもよく、また目的とする生体組織の血管中に造影剤等を注入し、放射線を照射して画像化する方法や、MRI(核磁気共鳴映像法)等を用いてもよい。

40

【0032】

本工程においては、上述した生体組織の画像から、血管の画像のみを抽出する。上記の血管画像取得法の多くは血管以外の組織に由来するノイズ等を含む。そこで、血管の画像

50

のみを抽出する方法としては、生体組織の輪郭やノイズを除去するために、得られた画像に対し二値化処理や画像の膨張収縮処理を施し、血管の画像を取り出すことが一般的である。

【0033】

2. 血管形成パターン調整工程

次に、本発明における血管形成パターン調整工程について説明する。本発明における血管形成パターン調整工程は、上述した血管画像抽出工程により抽出された上記血管形状画像の各血管の形状を調整し、血管形成パターンを形成する工程である。本工程において、上記血管形状画像の血管の形状を調整することにより、後述する血管細胞培養パターン形成工程および血管細胞培養工程により形成される人工血管の形状が決定されることとなる。

10

【0034】

本工程における各血管の形状の調整としては、例えば上述した血管形状画像における血管の線幅の調整が挙げられる。本工程により血管形状画像の各血管の幅を、後述する血管細胞培養パターン形成工程および血管細胞培養工程において人工血管を形成するのに適した幅、すなわち、血管内皮細胞が管形状となる線幅に調整することによって、効率よく人工血管を形成することができるからである。このような血管形成パターンを用いて、後述する血管細胞培養パターン形成工程で形成される血管細胞培養パターンの血管の線幅としては、通常 $20\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ の範囲内、中でも $40\mu\text{m} \sim 80\mu\text{m}$ の範囲内、特に $50\mu\text{m} \sim 70\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。血管形状画像での血管太さが上記範囲よりも細かい場合は血管細胞培養パターンを血管形成に好適な太さに変更することが望ましい。なお、上記血管形状画像中の血管が上記範囲より太い場合等には、例えば上記範囲内の太さの分岐した数本の血管のパターンとし、必要な血液の流れを確保してもよい。この際、通常、各血管の線幅は、同一の線幅となるように形成される。またさらに、上記血管形状画像中の血管が上記範囲より太い場合、この血管パターン中に、補助パターンを形成してもよい。補助パターンとは、血管のパターン内に形成される微細なパターンであって、この補助パターンが形成された領域は、後述する血管細胞培養パターン形成工程により形成される血管細胞培養パターンにおいて、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害部とされる。なお、補助パターンは、上記血管のパターン状に形成された細胞接着部上に血管細胞を付着させた際、上記補助パターンに対応する細胞接着阻害部が、上記細胞

20

30

【0035】

一般的に、血管のパターンに対応する細胞接着部に血管細胞を付着させて血管細胞を培養し、組織を形成する場合、血管細胞は細胞接着部の外側から内側にかけて徐々に配列する。また組織の形成の際には、個々の血管細胞が形態変化をして配列することが必要であり、この血管細胞の形態変化についても、細胞接着部の端部から中央部にかけて徐々に行われるものである。そのため、細胞接着部の幅が太い場合には、細胞接着部の中央部での血管細胞の配列性が悪く、組織が形成されない場合や、細胞接着部の中央部に血管細胞が接着しない場合等がある。また、細胞接着部の中央部における血管細胞の形態変化性が悪い場合がある。そこで、上記補助パターンに対応する細胞接着阻害部を形成することにより、この細胞接着阻害部の端部からも血管細胞を配列させたり、形態変化をさせることが可能となるため、欠けや形態変化不良等を生じさせることがなく、目的とするパターン状に血管細胞を培養することができるのである。また、上記補助パターンに対応する細胞接着阻害部は、この細胞接着阻害部を挟んで隣り合う血管細胞どうしの接着を阻害しないように形成されることから、最終的に培養される血管細胞の幅としては、上記血管のパターンに対応する幅と同様の幅とすることができるのである。

40

【0036】

ここで、上記補助パターンは、上記血管のパターン内にライン状に形成されることが好

50

ましい。また、ラインの形状は特に限定されるものではなく、例えば直線状、曲線状、点線状、破線状等とすることができる。上記補助パターンラインの幅は、血管細胞培養パターンを形成した際に、対応する細胞接着阻害部の幅が $0.5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 、中でも $1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ の範囲内となるように形成されることが好ましい。上記範囲より幅が広い場合は、補助パターンに対応する細胞接着阻害部を挟んで隣接する血管細胞どうしが細胞接着阻害部上で相互作用することが困難となるので好ましくないからである。

【0037】

また、上記補助パターンは、例えばジグザグ状等、面内で凹凸パターンを有するように形成されていてもよい。この際、上記凹凸パターンの凹部端から凸部端までの距離の平均値は、上記血管のパターンに対応する細胞接着部に血管細胞を接着させた際に、血管細胞が細胞接着部のライン方向と同様の方向に整列する距離となるように形成すればよく、特に後述する血管細胞培養パターンを形成した際に、凹凸が $0.5\mu\text{m} \sim 30\mu\text{m}$ の範囲内となるように形成することが好ましい。なお、上記凹凸の凹部端から凸部端までの距離の平均の測定は、補助パターンに対応する細胞接着阻害部の端部の長さ $200\mu\text{m}$ の範囲における各凹凸の最底部から最頂部までの距離を測定し、その平均を算出した値とする。

10

【0038】

また、本工程においては、不鮮明な部分や微小な部分を補正する調整を行うことが好ましい。血管細胞培養パターンが、不鮮明な部分等を有する場合には、後述する血管細胞培養パターン形成工程および血管細胞培養工程において、目的とするパターン状に血管を形成することが困難となるからである。またこの際、不要な血管を除去する調整を行ってもよい。例えば血管形状画像が三次元的に撮影された画像である場合等、同一平面上にない血管の形状が血管形状画像中に存在する場合には、この部分を除去することが好ましいからである。

20

【0039】

また、血管形状画像は三次元で存在する血管を二次元で表すこととなるため、本来血管どうしの間隔が広いにもかかわらず、間隔が狭く表される場合や分岐の角度が本来の角度よりも鋭角に表される場合がある。このような場合にも、本工程において、血管間の間隔を広げる調整や分岐の角度を鈍角にする調整等を行うことができる。さらに、3次元の血管ネットワークを血管が交差しない二次元で表現するために、交差している血管の片方の端部を入れ替える調整を行うことができる。またさらに、血管が果たす機能を損なわず、より血流を良好なものとする場合等には、例えば生体組織中で曲線状に形成されている血管を、直線状とする等、血管の形状を調整してもよい。

30

【0040】

また、本発明により製造された人工血管を生体や人工組織に用いる際には、血液を人工血管に流して用いられることとなることから、生体中の血管と上記各血管とをつなぐための、上記血管形状画像中には存在しない血管を有するようなパターンとなるように調整をしてもよい。このような血管は、血液の流れる方向や、血管にかかる圧力等によって適宜、その太さや形成される位置は調整される。

【0041】

上述したような各血管の調整は、血管形状画像を画像処理すること等によって行うことができる。

40

【0042】

3. 血管細胞培養パターン形成工程

次に、本発明における血管細胞培養パターン形成工程について説明する。本発明における血管細胞培養パターン形成工程は、細胞培養層に、血管細胞と接着性を有し、かつ上記血管形成パターンの形状に形成された細胞接着部と、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつ上記細胞接着部以外の領域に形成された細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養パターンを形成する工程である。なお、上記血管形成パターンを用いて血管細胞培養パターンを形成する際、上記細胞培養部の大きさを上記血管形成パターンと等しい大きさとしてもよいが、例えば上記血管形成パターンを拡大または縮小した大き

50

さとなるように、細胞接着部を形成してもよい。これにより、一つの血管形成パターンで、様々な大きさの血管細胞培養パターンを形成することが可能となるからである。

【0043】

本工程において、細胞培養層に、上記細胞接着部と細胞接着阻害部とからなる血管細胞培養パターンを形成することにより、後述する血管細胞培養工程により血管細胞を上記血管形成パターン状に容易に培養することが可能となる。ここで、血管細胞と接着性を有するとは、血管細胞と良好に接着することをいい、血管細胞との接着性が、血管細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする血管細胞と良好に接着することをいう。また血管細胞と細胞接着阻害性を有するとは、血管細胞が接着することを阻害する性質を有することをいい、血管細胞との細胞接着阻害性が、血管細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする血管細胞と接着することを阻害することをいう。

10

【0044】

本工程に用いられる細胞培養層とは、この細胞培養層に細胞接着部および細胞接着阻害部からなる血管細胞培養パターンを形成可能な層であれば、特に限定されるものではなく、細胞接着性を有する層であってもよく、また細胞接着阻害性を有する層等であってもよい。また、本発明においては必要に応じて、細胞培養層は基材上に形成されていてもよい。

【0045】

本工程において、上記細胞接着部および細胞接着阻害部を有する血管細胞培養パターンを形成する方法としては、このようなパターンを形成することが可能な方法であれば、特に限定されるものではない。例えば上述した血管形成パターンのパターン状に遮光部を有するマスクを形成し、細胞接着性を有する細胞培養層に細胞接着阻害性を有する材料を印刷法等によりパターン状に塗布する方法や、細胞接着性を有する細胞培養層に、細胞接着阻害性を有する層を形成し、フォトリソグラフィ法等により細胞接着阻害部のパターン状にパターンングする方法等とすることもできる。また、上述した血管形成パターンのパターン状に開口部を有するマスクを形成し、細胞接着阻害性を有する細胞培養層に、細胞接着性を有する材料をパターン状に塗布して細胞接着部を形成する方法や、上記と同様にフォトリソグラフィ法により細胞接着部をパターンングして形成する方法等としてもよい。

20

【0046】

ここで、本発明においては、特にエネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着部および上記細胞接着阻害部を形成することができる上記細胞培養層にエネルギーを照射し、上記細胞培養パターンを形成することが好ましい。この場合、血管細胞に悪影響を与えるような薬剤等を用いることなく、かつ複雑な工程を行うことなく上記細胞接着部および細胞接着阻害部の形成を容易に行うことができるからである。なお、このようなエネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記血管細胞培養パターンを形成する方法としては、以下の6つの態様が挙げられる。以下、それぞれの態様ごとに説明する。

30

【0047】

(1) 第1の態様

まず、第1の態様としては、細胞培養層が、少なくとも光触媒および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層であり、この光触媒含有細胞接着層に、例えば上記血管形成パターンのパターン状に遮光部を有するフォトマスク等を用いてエネルギー照射することによって、上記血管細胞接着材料を分解または変性させて細胞接着阻害部を形成する場合である。

40

【0048】

本態様によれば、光触媒含有細胞接着層が光触媒と上記血管細胞接着材料とを含有することから、エネルギーが照射された領域を、血管細胞接着材料が分解または変性されて血管細胞と接着しない細胞接着阻害部とすることができる。一方、エネルギーが照射されていない領域は、血管細胞接着材料が残存していることから、血管細胞との接着性が良好な

50

細胞接着部とすることができる。

【0049】

また、本態様によれば、後述する血管細胞培養工程において、細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる際、細胞接着阻害部にエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した血管細胞を光触媒の作用により除去等することができる。これにより、より高精細なパターン状に血管を形成することができる、という利点も有する。

【0050】

以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層、および細胞接着阻害部の形成方法について説明する。

10

【0051】

a. 光触媒含有細胞接着層

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層は、光触媒と、上記血管細胞接着材料とを少なくとも含有するものであり、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により上記血管細胞接着材料が分解または変性されて細胞との接着性が低いものとなる層である。

【0052】

このような光触媒含有細胞接着層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着層形成用塗工液を基材上に塗布すること等により、行うことができる。この光触媒含有細胞接着層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

20

【0053】

この際、上記光触媒含有細胞接着層の膜厚としては、通常 $0.01\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層に用いられる各材料について説明する。

【0054】

(i) 血管細胞接着材料

まず、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される血管細胞接着材料について説明する。本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される血管細胞接着材料は、血管細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。

30

【0055】

本態様に用いられる血管細胞接着材料は、血管細胞との接着性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、血管細胞との接着性を有しなくなるものや、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有するものに変化するもの等が用いられる。

【0056】

ここで、上記のような血管細胞と接着性を有する材料には、物理化学的特性により血管細胞と接着性を有する材料と、生物化学的特性により血管細胞と接着性を有する材料との2種類がある。

40

【0057】

物理化学的特性により血管細胞と接着性を有する材料の、血管細胞との接着性を決定する物理化学的な因子としては、表面自由エネルギーや、静電相互作用等が挙げられる。例えば血管細胞との接着性が材料の表面自由エネルギーにより決定される場合には、材料が所定の範囲内の表面自由エネルギーを有すると血管細胞と材料との接着性が良好となり、その範囲を外れると血管細胞と材料との接着性が低下することとなる。このような表面自由エネルギーによる血管細胞の接着性の変化としては、例えば資料CMC出版 バイオマ

50

テリアルの最先端 筏 義人(監修) p. 109 下部に示されるような実験結果が知られている。このような因子により血管細胞との接着性を有する材料としては、例えば親水化ポリスチレン、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の表面の官能基が置換等されたり、分解されること等によって、表面自由エネルギーが変化し、血管細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとする事ができる。

【0058】

また、静電相互作用等により血管細胞と材料との接着性が決定される場合、例えば材料が有する正電荷の量等によって血管細胞との接着性が決定されることとなる。このような静電相互作用により血管細胞との接着性を有する材料としては、例えばポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記材料が分解または変性されることにより、例えば表面に存在する正電荷量を変化させることができ、血管細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとする事ができる。

10

【0059】

また、生物学的特性により血管細胞と接着性を有する材料としては、特定の血管細胞と接着性が良好なもの、または多くの血管細胞と接着性が良好なもの等が挙げられ、具体的には、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列含有ペプチド、YIGSR(チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン)配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の構造の一部を破壊したり、主鎖を破壊すること等によって、血管細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとする事ができる。

20

【0060】

このような血管細胞接着材料は、上記材料の種類等によって異なるものであるが、光触媒含有細胞接着層中に通常0.01重量%~95重量%、中でも1重量%~10重量%含有されることが好ましい。これにより、血管細胞接着材料を含有する領域を血管細胞との接着性が良好な領域とすることができるからである。

30

【0061】

(ii) 光触媒

次に、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される光触媒について説明する。本態様に用いられる光触媒は、上述した血管細胞接着材料を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性させることが可能なものであれば、特に限定されるものではない。

【0062】

ここで、後述するような酸化チタンに代表される光触媒の作用機構は、必ずしも明確なものではないが、光の照射によって生成したキャリアが、近傍の化合物との直接反応、あるいは、酸素、水の存在下で生じた活性酸素種によって、有機物の化学構造に変化を及ぼすものと考えられている。本態様においては、このキャリアが上述した血管細胞接着材料に作用を及ぼすものであると思われる。

40

【0063】

本態様に用いられる光触媒として、具体的には、光半導体として知られる例えば二酸化チタン(TiO_2)、酸化亜鉛(ZnO)、酸化スズ(SnO_2)、チタン酸ストロンチウム($SrTiO_3$)、酸化タングステン(WO_3)、酸化ビスマス(Bi_2O_3)、および酸化鉄(Fe_2O_3)を挙げることができ、これらから選択して1種または2種以上を混合して用いることができる。

50

【0064】

本態様においては、特に二酸化チタンが、バンドギャップエネルギーが高く、化学的に安定で毒性もなく、入手も容易であることから好適に使用される。二酸化チタンには、アナターゼ型とルチル型があり本態様ではいずれも使用することができるが、アナターゼ型の二酸化チタンが好ましい。アナターゼ型二酸化チタンは励起波長が380nm以下にある。

【0065】

このようなアナターゼ型二酸化チタンとしては、例えば、塩酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(石原産業(株)製STS-02(平均粒径7nm)、石原産業(株)製ST-K01)、硝酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(日産化学(株)製TA-15(平均粒径12nm))等を挙げることができる。

10

【0066】

光触媒の粒径は小さいほど光触媒反応が効果的に起こるので好ましく、平均粒径が50nm以下が好ましく、20nm以下の光触媒を使用するのが特に好ましい。

【0067】

本態様の光触媒含有細胞接着層における光触媒の含有量は、5~95重量%、好ましくは10~60重量%、さらに好ましくは20~40重量%の範囲で設定することができる。

これにより、光触媒含有細胞接着層のエネルギー照射された領域の血管細胞接着材料を分解または変性することが可能となるからである。

20

【0068】

ここで、本態様に用いられる光触媒は、例えば高い親水性を有すること等によって、血管細胞との接着性が低いものであることが好ましい。これにより、上述した血管細胞接着材料が分解等されて光触媒が露出した領域を、血管細胞との接着性が低い領域として用いることが可能となるからである。

【0069】

(iii) その他

本態様においては、光触媒含有細胞接着層中に、上記血管細胞接着材料や光触媒だけでなく、必要に応じて例えば、強度や耐性等を向上させるバインダ等を含有するものであってもよい。本態様においては、特にバインダとして、少なくともエネルギー照射された後に、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する材料が用いられることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着阻害部の血管細胞との接着性を低いものとすることができるからである。このような材料としては、例えばエネルギー照射される前から上記細胞接着阻害性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなるものであってもよい。

30

【0070】

本態様においては、特にエネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなる材料をバインダとして用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の領域においては、上記血管細胞接着材料の血管細胞との接着性を阻害することがなく、エネルギー照射された領域のみを、血管細胞との接着性が低いものとすることができるからである。

40

【0071】

このようなバインダとして用いられる材料としては、例えば主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような有機置換基を有するものが好ましく、例えば、(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)撥水性や撥油性に優れた反応性シリコンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができ、例えば特開2000-249821号公報に記載されているもの等を用いることができる。

50

【0072】

上記材料を血管細胞接着阻害材料として用いる場合、エネルギーが照射される前の水との接触角が $15^{\circ} \sim 120^{\circ}$ 、中でも $20^{\circ} \sim 100^{\circ}$ の範囲内となるものであることが好ましい。これにより、上記血管細胞接着材料の血管細胞との接着性を阻害することのないものとするができるからである。

【0073】

また、この血管細胞接着阻害材料にエネルギーが照射された場合には、水との接触角が 10° 以下となるものであることが好ましい。上記範囲とすることにより、高い親水性を有するものとすることができ、血管細胞との接着性を低いものとするができるからである。

10

【0074】

なお、ここでいう水との接触角は、水、もしくは同等の接触角を有する液体との接触角を接触角測定器（協和界面科学（株）製CA-Z型）を用いて測定（マイクロシリンジから液滴を滴下して30秒後）し、その結果から、もしくはその結果をグラフにして得たものである。

【0075】

また、本態様においては、エネルギーが照射された領域の濡れ性の変化を起こさせること等により、血管細胞との接着性が低下する、もしくはそのような変化を補助する分解物質等を含むものであってもよく、またその他の添加剤を含むしてもよい。

20

【0076】

このような分解物質や添加剤としては、例えば特開2000-249821号公報に記載されているもの等を用いることができる。

【0077】

本態様においては、このようなバインダ等は、光触媒含有細胞接着層中に5重量%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。

【0078】

また、本態様に用いられる基材としては、上記光触媒含有細胞接着層を形成することが可能なものであれば、特に限定されるものではない。このような基材としては、例えば金属、ガラス、シリコン等の無機材料、およびプラスチックで代表される有機材料等を用いることができる。

30

【0079】

また、基材の可撓性等は適宜選択される。また、上記基材の透明性は、上記血管細胞接着材料を分解または変性させるために照射されるエネルギーの照射方向等によって、適宜選択され、例えば基材が遮光部等を有しており、上記エネルギーの照射が、基材側から行われる場合等には、基材が透明性を有するものとされる。

【0080】

ここで、本態様においては、上記基材が照射されるエネルギーに対して透過性を有する場合、細胞接着部を形成する形状、すなわち上記血管形成パターンの形状に遮光部が形成されていてもよい。これにより、エネルギーを照射して細胞接着阻害部を形成する際に、フォトマスク等を用いることなく、基材裏面側から全面にエネルギーを照射することにより、目的とする領域のみの光触媒含有細胞接着層中の血管細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。このような遮光部としては、一般的に遮光部として用いられているものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

40

【0081】

b. 細胞接着阻害部の形成方法

次に、本態様における細胞接着阻害部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図3に示すように、基材11上に形成された上記光触媒含有細胞接着層12に、例えば上述した血管形成パターンの形状に遮光部を有するフォトマスク13等を用いて、エネルギー14を照射することにより（図3(a)）、エネルギー照射された領域の光触

50

媒含有細胞接着層 1 2 中の血管細胞接着性材料が分解または変性されて、血管細胞と接着性を有しない細胞接着阻害部 3 を形成することができ、エネルギー照射されていない領域を細胞接着部 2 とすることができる（図 3 (b) ）。この際、細胞接着阻害部には、光触媒、および血管細胞接着材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。

【 0 0 8 2 】

ここで、本態様でいうエネルギー照射（露光）とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、血管細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

【 0 0 8 3 】

通常このようなエネルギー照射に用いる光の波長は、400 nm 以下の範囲、好ましくは 380 nm 以下の範囲から設定される。これは、上述したように光触媒として用いられる好ましい光触媒が二酸化チタンであり、この二酸化チタンにより光触媒作用を活性化させるエネルギーとして、上述した波長の光が好ましいからである。

【 0 0 8 4 】

このようなエネルギー照射に用いることができる光源としては、水銀ランプ、メタルハライドランプ、キセノンランプ、エキシマランプ、その他種々の光源を挙げることができる。

【 0 0 8 5 】

上述したような光源を用い、フォトマスクを介したパターン照射により行う方法の他、エキシマ、YAG 等のレーザを用いて、上述したパターン状に描画照射する方法を用いることも可能である。また、上述したように、基材が細胞接着部と同じパターン状に遮光部を有する場合には、基材側からエネルギーを全面に照射することにより、行うことができる。この場合、フォトマスク等が必要なく、位置あわせ等の工程が必要ない、という利点を有する。

【 0 0 8 6 】

また、エネルギー照射に際してのエネルギーの照射量は、光触媒の作用によって血管細胞接着材料が分解または変性されるのに必要な照射量とする。

【 0 0 8 7 】

この際、光触媒が含有される層を加熱しながらエネルギー照射することにより、感度を上昇させることが可能となり、効率的に血管細胞接着材料を分解または変性させることができる点で好ましい。具体的には 30 ~ 80 の範囲内で加熱することが好ましい。

【 0 0 8 8 】

本態様におけるフォトマスクを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有細胞接着層側のいずれの方向からエネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有細胞接着層側からエネルギー照射を行う必要がある。

【 0 0 8 9 】

(2) 第 2 の態様

次に、第 2 の態様としては、細胞培養層が、少なくとも光触媒および、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層であり、この光触媒含有細胞接着阻害層に、例えば上記血管形成パターンのパターン状に開口部を有するフォトマスク等を用いてエネルギー照射することによって、上記血管細胞接着阻害材料を分解または変性させて細胞接着部を形成する場合である。

【 0 0 9 0 】

本態様においては、上記光触媒含有細胞接着阻害層が、光触媒と、上記血管細胞接着阻害材料を含有することから、細胞接着部を形成する領域に、血管形成パターンのパターン状にエネルギー照射することによって、層中に含有される光触媒の作用により、血管細胞接着阻害材料を分解または変性させることができ、エネルギーが照射された領域を血管細胞との接着性を有する細胞接着部とすることができるのである。またこの際、エネルギー

10

20

30

40

50

が照射されていない領域については、血管細胞接着阻害材料が残存しており、細胞接着阻害部とすることができるのである。

【0091】

以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層、および基材について説明し、さらに細胞接着部の形成方法について説明する。

【0092】

a. 光触媒含有細胞接着阻害層

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層は、光触媒および上記血管細胞接着阻害材料を含有する層であり、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、血管細胞接着阻害材料が分解または変性されて血管細胞との接着性を有するものとなる層である。

10

【0093】

このような光触媒含有細胞接着阻害層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液を基材上に塗布すること等により行うことができる。この光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

【0094】

この際、上記光触媒含有細胞接着阻害層の膜厚としては、通常 $0.01\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

20

【0095】

以下、上記光触媒含有細胞接着阻害層に用いられる材料について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒については、上述した第1の態様で用いられる光触媒と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0096】

(i) 血管細胞接着阻害材料

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層に含有される血管細胞接着阻害材料について説明する。

【0097】

本態様に用いられる血管細胞接着阻害材料は、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。

30

【0098】

本態様に用いられる血管細胞接着阻害材料は、このような細胞接着阻害性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞接着阻害性を有しなくなるものや、細胞接着性を示すものが用いられる。

【0099】

このような血管細胞接着阻害材料としては、例えば水和能の高い材料を用いることができる。水和能の高い材料は、周りに水分子が集まった水和層が形成され、通常、このような水和能の高い物質は水分子との接着性の方が血管細胞との接着性より高いことから、血管細胞は上記水和能の高い材料と接着することができず、血管細胞との接着性が低いものとなるのである。ここで、上記水和能とは、水分子と水和する性質をいい、水和能が高いとは、水分子と水和しやすいことをいうこととする。

40

【0100】

上記水和能が高く血管細胞接着阻害材料として用いられる材料としては、例えばポリエチレングリコールや、ベタイン構造等を有する両性イオン材料、リン脂質含有材料等が挙げられる。このような材料を上記血管細胞接着阻害材料として用いた場合、後述するエネルギー照射工程においてエネルギーが照射された際、光触媒の作用によって、上記血管細胞接着阻害材料が分解または変質等され、表面の水和層が離れることにより、上記細胞接

50

着阻害性を有しないものとするのできるのである。

【0101】

また、本態様においては、上記血管細胞接着阻害材料として、光触媒の作用により分解されるような、撥水性または撥油性の有機置換基を有する界面活性剤も用いることができる。このような界面活性剤としては、例えば、日光ケミカルズ(株)製NICKOL B L、B C、B O、B Bの各シリーズ等の炭化水素系、デュボン社製ZONYL FSN、F S O、旭硝子(株)製サーフロンS - 1 4 1、1 4 5、大日本インキ化学工業(株)製メガファックF - 1 4 1、1 4 4、ネオス(株)製フタージェントF - 2 0 0、F 2 5 1、ダイキン工業(株)製ユニダインD S - 4 0 1、4 0 2、スリーエム(株)製フロラードF C - 1 7 0、1 7 6等のフッ素系あるいはシリコン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

10

【0102】

このような材料を血管細胞接着阻害材料として用いて光触媒含有細胞接着阻害層を形成した際に、表面に上記血管細胞接着阻害材料が偏在することとなる。これにより、表面の撥水性や撥油性を高いものとすることができ、血管細胞との相互作用が小さく、血管細胞との接着性が低いものとするのできるのである。また、この層にエネルギー照射工程において、エネルギーが照射された場合には、光触媒の作用によって、容易に分解されて上記光触媒が露出し、上記細胞接着阻害性を有しないものとするのできるのである。

20

【0103】

本態様においては、上記血管細胞接着阻害材料として、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により血管細胞との接着性が良好となるものが用いられることが特に好ましく、このような血管細胞接着阻害材料としては、例えば撥油性や撥水性を有する材料が挙げられる。

【0104】

血管細胞接着阻害材料として、上記撥水性または撥油性を有する材料を用いた場合には、血管細胞接着阻害材料の撥水性または撥油性によって、血管細胞と血管細胞接着阻害材料との間における、例えば疎水性相互作用等の相互作用が小さく、血管細胞との接着性を低いものとするのできる。

【0105】

このような撥水性または撥油性を有する材料としては、例えば骨格が光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するもの等を挙げることができる。

30

【0106】

骨格が光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するものとしては、例えば、上述した第1の態様にバインダ等として用いられる(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)反応性シリコンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

40

【0107】

このような物質は、第1の態様においてバインダとして用いられる場合には、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等をエネルギー照射に伴う光触媒の作用により、高い割合で分解または変性させて、超親水性とすることにより、細胞接着阻害性を有する材料として用いられるが、本態様においては、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により完全には分解または変性等されない程度、エネルギーを照射することによって、エネルギーが照射された領域を血管細胞との接着性を有するものとするのできる。また、上記のオルガノポリシロキサン等とともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物を別途混合してもよい。

50

【0108】

上記撥水性や撥油性を有する材料を血管細胞接着阻害材料として用いる場合、通常、水との接触角が 80° 以上、中でも $100^\circ \sim 130^\circ$ 範囲内である材料を血管細胞接着阻害材料として用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の光触媒含有細胞接着阻害層を、血管細胞との接着性を低いものとするができるからである。なお、上記角度の上限は、平坦な基材上での血管細胞接着阻害材料の水との接触角の上限であり、例えば凹凸を有するような基材上での上記血管細胞接着阻害材料の水との接触角を測定した場合には、例えば、資料ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・アプライド・フィジックス、パート2、32巻、L614~L615、1993年 Ogawara、に示されるように上限が 160° 程度となる場合もある。

10

【0109】

また、この血管細胞接着阻害材料にエネルギーを照射し、血管細胞との接着性を有するものとする場合には、水との接触角が $10^\circ \sim 40^\circ$ 、中でも $15^\circ \sim 30^\circ$ の範囲内とするようにエネルギーが照射されることが好ましい。これにより、エネルギー照射された後の光触媒含有細胞接着阻害層の血管細胞との接着性を高いものとするができるからである。なお、ここでいう水との接触角は、上述した方法により得られるものである。

【0110】

このような血管細胞接着阻害材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%~95重量%、中でも1重量%~10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、血管細胞接着阻害材料を含有する領域を血管細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

20

【0111】

なお、上記血管細胞接着阻害材料は、界面活性を有することが好ましい。例えば、上記血管細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液等を塗布した後、乾燥させる際に、塗膜表面に偏在する割合が高まり、結果として良好な細胞接着阻害性を得られるからである。

【0112】

(ii) その他

また、本態様の光触媒含有細胞接着阻害層には、例えば層を形成する際の塗工性や、層を形成した際の強度や耐性等、必要とされる特性に合わせてバインダ等が含有されていてもよい。また、上記血管細胞接着阻害材料が上記バインダとしての機能を果たすものであってもよい。

30

【0113】

このようなバインダとしては、例えば主骨格が上記光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものを用いることができる。具体的には、有機置換基を有しない、もしくは接着性に影響を与えない程度の有機置換基を有するポリシロキサン等を挙げることができ、これらはテトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン等を加水分解、重縮合することにより得ることができる。

【0114】

本態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着阻害層中に5重量%~95重量%、中でも40重量%~90重量%、特に60重量%~80重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層の形成を容易としたり、光触媒含有細胞接着阻害層に強度を付与する等、特性を発揮することが可能となるからである。

40

【0115】

また、本態様においては特に、上記光触媒含有細胞接着阻害層中に、少なくともエネルギー照射された後に、血管細胞と接着性を有する血管細胞接着材料が含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギーが照射された領域である細胞接着部の血管細胞との接着性をより良好なものとするができるからである。このような血管細胞接着材料としては、上記バインダとして用いられるものであってもよく、

50

また、バインダと別に使用されるものであってもよい。また例えば、エネルギー照射される前から血管細胞と良好な接着性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、血管細胞と良好な接着性を有するものとなるものであってもよい。

【0116】

本態様においては、少なくともエネルギー照射された後に、上記血管細胞接着材料が血管細胞と良好な接着性を有するものであれば、血管細胞との接着が、例えば疎水性相互作用や、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力等の物理的相互作用により良好なものとされるものであってもよく、生物学的特性により、良好なものとされるものであってもよい。

【0117】

本態様においては、このような血管細胞接着材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギー照射された領域である細胞接着部の血管細胞との接着性をより良好なものとするができるからである。また、エネルギー照射される前から血管細胞と良好な接着性を有する材料を血管細胞接着材料として用いる場合には、エネルギー照射されない領域、すなわち細胞接着阻害部となる領域における上記血管細胞接着阻害材料の細胞接着阻害性を阻害しない程度含有されることが好ましい。

【0118】

また、本態様に用いられる基材は、上述した光触媒含有細胞接着阻害層を形成することが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、上記第1の態様で説明したような基材とすることができる。

【0119】

ここで、本態様においては、上記基材が照射されるエネルギーに対して透過性を有する場合、細胞接着阻害部とする領域に遮光部が形成されていてもよい。これにより、上記光触媒含有細胞接着阻害層にエネルギーを照射して、細胞接着部とする際に、フォトマスク等を用いる必要がなく、基材裏面側から全面にエネルギーを照射することにより、容易に細胞接着部を形成することができるからである。

【0120】

ここで、本態様に用いられる基材の種類や、上記遮光部の形成方法、種類等については、第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0121】

b. 細胞接着部の形成方法

次に、細胞接着部の形成方法について説明する。本態様においては、光触媒含有細胞接着阻害層に、例えば上述した血管形成パターンの形状に開口部を有するフォトマスク等を用いてエネルギーを照射する。これにより、エネルギー照射された領域の細胞接着阻害材料を分解または変性することができ、血管細胞との接着性を有する細胞接着部とすることができるからである。この際、細胞接着部には、光触媒や、血管細胞接着阻害材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。一方、エネルギーが照射されていない領域である血管細胞接着阻害材料が残存し、血管細胞との接着性を有しない細胞接着阻害部とすることができる。

【0122】

なお、このようなエネルギー照射の方法等については、上述した第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0123】

(3) 第3の態様

次に、第3の態様としては、細胞培養層が、血管細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着材料を含有する血管細胞接着層であり、かつ少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層上に形成されたものであって、この血管細胞接着層に、例えば上記血管形成パターンのパターン状に遮光部を有する

10

20

30

40

50

フォトマスク等を用いてエネルギー照射することにより、上記血管細胞接着材料を分解または変性させて細胞接着阻害部を形成する場合である。

【0124】

本態様においては、上記血管細胞接着層が、光触媒含有層上に形成されていることから、エネルギーを照射することによって、血管細胞接着層中の血管細胞接着材料が、隣接する光触媒含有層中の光触媒の作用により分解または変性されて、その領域の血管細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部を形成することが可能となるのである。この際、細胞接着阻害部には、例えば上記血管細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、血管細胞接着材料が少量含有されている、または血管細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは血管細胞接着層が完全に分解除去されて光触媒含有層が露出すること等となる。また、上記血管細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

10

【0125】

また、本態様によれば、後述する血管細胞培養工程において、細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる際、細胞接着阻害部にエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した血管細胞を光触媒の作用により除去等することができる。これにより、より高精細なパターン状に血管を形成することができる、という利点も有する。

20

【0126】

以下、本態様の各構成について説明する。なお、本態様に用いられる基材、および本態様における細胞接着阻害部の形成方法については、上述した第1の態様と同様であるので、ここでの説明は省略する。

【0127】

a. 血管細胞接着層

まず、本態様に用いられる血管細胞接着層について説明する。本態様に用いられる血管細胞接着層は、少なくとも細胞との接着性を有する血管細胞接着材料を有する層であり、一般的に血管細胞との接着性を有する層として用いられる層を用いることができる。

【0128】

具体的な血管細胞接着材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着層に用いられる血管細胞接着材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本態様の血管細胞接着層にも、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着層で説明した細胞接着阻害性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着阻害部の血管細胞との接着性を低いものとするのが可能となるからである。

30

【0129】

また、このような血管細胞接着層の形成は、上記血管細胞接着材料を含有する血管細胞接着層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により塗布すること等により行うことができ、第1の態様の光触媒含有細胞接着層の形成方法と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。なお、たんぱく質等の比較的高価な血管細胞接着材料を用いる場合等には、血管細胞接着層の形成に吸着法が適用される場合もある。

40

【0130】

なお、このような血管細胞接着層の膜厚は、通常 $0.001\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.01\mu\text{m} \sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

【0131】

b. 光触媒含有層

次に、本態様に用いられる光触媒含有層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層は、少なくとも光触媒を含有する層であれば、特に限定されるものではなく、光触媒のみからなる層であってもよく、またバインダ等、他の成分を含有する層等であってもよい。

50

【 0 1 3 2 】

本態様で使用する光触媒としては、第1の態様における光触媒含有細胞接着層に用いられるものと同様とすることができ、本態様においても特に酸化チタンが用いられることが好ましい。

【 0 1 3 3 】

ここで、光触媒のみからなる光触媒含有層を用いた場合には、上記血管細胞接着層中の血管細胞接着材料の分解または変性に対する効率が向上し、処理時間の短縮化等のコスト面で有利である。一方、光触媒とバインダとからなる光触媒含有層を用いた場合には、光触媒含有層の形成が容易であるという利点を有する。

【 0 1 3 4 】

光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、CVD法、真空蒸着法等の真空製膜法を用いる方法を挙げることができる。真空製膜法により光触媒含有層を形成することにより、均一な膜でかつ光触媒のみを含有する光触媒含有層とすることが可能であり、これにより血管細胞接着材料を均一に分解または変性させることが可能であり、かつ光触媒のみからなることから、バインダを用いる場合と比較して効率的に血管細胞接着材料を分解または変性させることが可能となる。

【 0 1 3 5 】

また、光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法の他の例としては、例えば光触媒が二酸化チタンの場合は、基材上に無定形チタニアを形成し、次いで焼成により結晶性チタニアに相変化させる方法等が挙げられる。ここで用いられる無定形チタニアとしては、例えば四塩化チタン、硫酸チタン等のチタンの無機塩の加水分解、脱水縮合、テトラエトキシチタン、テトライソプロポキシチタン、テトラ-n-プロポキシチタン、テトラブトキシチタン、テトラメトキシチタン等の有機チタン化合物を酸存在下において加水分解、脱水縮合によって得ることができる。次いで、400 ~ 500 における焼成によってアナターゼ型チタニアに変性し、600 ~ 700 の焼成によってルチル型チタニアに変性することができる。

【 0 1 3 6 】

また、バインダを用いる場合は、バインダの主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものが好ましく、例えばこのようなバインダとしては、上述した血管細胞接着層の項で用いられるオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

【 0 1 3 7 】

このようにオルガノポリシロキサンをバインダとして用いた場合は、上記光触媒含有層は、光触媒とバインダであるオルガノポリシロキサンを必要に応じて他の添加剤とともに溶剤中に分散して塗布液を調製し、この塗布液を基材上に塗布することにより形成することができる。使用する溶剤としては、エタノール、イソプロパノール等のアルコール系の有機溶剤が好ましい。塗布はスピンコート、スプレーコート、ディップコート、ロールコート、ビードコート等の公知の塗布方法により行うことができる。バインダとして紫外線硬化型の成分を含有している場合、紫外線を照射して硬化処理を行うことにより光触媒含有層を形成することができる。

【 0 1 3 8 】

また、バインダとして無定形シリカ前駆体を用いることができる。この無定形シリカ前駆体は、一般式 SiX_4 で表され、Xはハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

【 0 1 3 9 】

具体的には、テトラエトキシシラン、テトライソプロポキシシラン、テトラ-n-プロポキシシラン、テトラブトキシシラン、テトラメトキシシラン等が挙げられる。また、この場合には、無定形シリカの前駆体と光触媒の粒子とを非水性溶媒中に均一に分散させ、透明基材上に空気中の水分により加水分解させてシラノールを形成させた後、常温で脱水

10

20

30

40

50

縮重合することにより光触媒含有層を形成できる。シラノールの脱水縮重合を100以上で行えば、シラノールの重合度が増し、膜表面の強度を向上できる。また、これらの結着剤は、単独あるいは2種以上を混合して用いることができる。

【0140】

光触媒含有層中の光触媒の含有量は、5～60重量%、好ましくは20～40重量%の範囲で設定することができる。また、光触媒含有層の厚みは、0.05～10μmの範囲内が好ましい。

【0141】

また、光触媒含有層には上記の光触媒、バインダの他に、上述した血管細胞接着層に用いられる界面活性剤等を含有させることもできる。

【0142】

ここで、本態様においては上記光触媒含有層は、その表面は細胞との接着性が、例えば表面が親水性であること等によって細胞との接着性が低いことが好ましい。これにより、上記血管細胞接着層が分解等されて光触媒含有層が露出した場合に、その領域を細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

【0143】

また、本態様においては、上記光触媒含有層上に、細胞接着部を形成するパターン、すなわち血管形成パターンの形状に遮光部が形成されていてもよい。これにより、上記血管細胞接着層の全面にエネルギーを照射した場合に、遮光部が形成された領域上の光触媒は励起されず、遮光部が形成された領域以外の血管細胞接着層中に含有される血管細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。またこの場合、遮光部が形成されている領域の光触媒は励起されないことから、エネルギーが照射される方向が特に限定されない、という利点を有する。

【0144】

このような遮光部としては、第1の態様で説明したものと同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0145】

(4) 第4の態様

次に、第4の態様としては、細胞培養層が、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料を含有する血管細胞接着阻害層であり、かつ少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層上に形成されているものであって、この血管細胞接着阻害層に、例えば上記血管形成パターンのパターン状に開口部を有するフォトマスク等を用いてエネルギー照射することによって、上記血管細胞接着阻害材料を分解または変性させて細胞接着部を形成する場合である。

【0146】

本態様においては、上記血管細胞接着阻害層が光触媒含有層上に形成されていることから、血管細胞接着阻害層に、上記血管形成パターンの形状にエネルギー照射をすることにより、光触媒含有層中に含有される光触媒が励起され、血管細胞接着阻害層中の血管細胞接着阻害材料を分解または変性することができるので、細胞接着部を形成することができるのである。またこの際、エネルギーが照射されず、血管細胞接着阻害材料が残存する領域を細胞接着阻害部とすることができる。

【0147】

ここで、上記血管細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記血管細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着阻害部に含有される血管細胞接着阻害材料の量と比較して、血管細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記血管細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部中にはその血管細胞接着阻害材料が少量含有されている、または血管細胞接着阻害材料の分解物等が含有されていることや、血管細胞接着阻害材料が完全に分解されて光触媒含有層が露出すること等となる。また、上記血管細胞接着阻

10

20

30

40

50

害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていることとなる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射された後に、血管細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の血管細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞接着部のみに、高精細に血管細胞を接着させることが可能となるからである。

【0148】

以下、本態様に用いられる血管細胞接着阻害層について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒含有層については、上述した第3の態様で説明したものと同様のものを用いることができ、また本態様に用いられる基材、および細胞接着部の形成方法については、上記の第2の態様と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。

10

【0149】

a. 血管細胞接着阻害層

本態様に用いられる血管細胞接着阻害層は、上記光触媒含有層上に形成されるものであり、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料を含有するものであれば特に限定されるものではない。

【0150】

本態様においては、このような層が形成可能であれば、その形成方法等は特に限定されるものではなく、例えば、上記血管細胞接着阻害材料を含有する血管細胞接着阻害層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により上記光触媒含有層上に塗布することにより、形成することができる。また、このような血管細胞接着阻害層の膜厚は、通常0.01 μm ~1.0 μm 程度、中でも0.1 μm ~0.3 μm 程度とすることができる。

20

【0151】

ここで、本態様において形成される血管細胞接着阻害層に用いられる具体的な血管細胞接着阻害材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着阻害層に用いられる血管細胞接着阻害材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本態様の血管細胞接着阻害層にも、第2の態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層で説明した細胞接着性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着部の細胞との接着性を高いものとする

30

【0152】

(5) 第5の態様

また、第5の態様としては、細胞培養層が、血管細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着材料を含有する血管細胞接着層であり、この血管細胞接着層と、光触媒を含有する光触媒含有層とを対向させて配置し、例えば上記血管形成パターンパターン状に遮光部を有するフォトマスク等を用いてエネルギー照射することによって、上記血管細胞接着材料を分解または変性させて細胞接着阻害部を形成する場合である。

【0153】

本態様においては、血管細胞接着層と、上記光触媒含有層とを対向させて配置し、細胞接着阻害部を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒含有層中の光触媒の作用により、血管細胞接着層中の血管細胞接着材料が分解または変性されて、細胞接着阻害部を形成することが可能となるのである。

40

【0154】

また、本態様によれば、後述する血管細胞培養工程において、細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる際、細胞接着阻害部にエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した血管細胞を光触媒の作用により除去等することができる。これにより、より高精細なパターン状に血管を形成することができる、という利点も有する。

50

【 0 1 5 5 】

以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板と、その光触媒含有層側基板を用いて細胞接着阻害部を形成する方法について説明する。なお、本態様に用いられる血管細胞接着層については、上述した第3の態様で用いられるものと同様であるので、ここでの説明は省略する。

【 0 1 5 6 】

a . 光触媒含有層側基板

まず、本態様に用いられる光触媒を含有する光触媒含有層を有する光触媒含有層側基板について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層側基板としては、通常、光触媒を含有する光触媒含有層を有するものであり、通常、基体と、その基体上に光触媒含有層が形成されているものである。この光触媒含有層側基板は、例えばパターン状に形成された光触媒含有層側遮光部やプライマー層等を有していてもよい。以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板の各構成について説明する。

10

【 0 1 5 7 】

(i) 光触媒含有層

まず、光触媒含有層側基板に用いられる光触媒含有層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層は、光触媒含有層中の光触媒が、近接する血管細胞接着層中の血管細胞接着材料を分解または変性させるような構成であれば、特に限定されるものではなく、光触媒とバインダとから構成されているものであってもよく、光触媒単体で製膜されたものであってもよい。また、その表面の特性は特に親液性であっても撥液性であってもよい。

20

【 0 1 5 8 】

また、本態様において用いられる光触媒含有層は、基体上に全面に形成されたものであってもよく、またパターン上に形成されたものであってもよい。光触媒含有層をパターン状に形成することにより、細胞接着阻害部を形成するためにエネルギーを照射する際に、フォトマスク等を用いるパターン照射をする必要がなく、全面に照射することにより、血管細胞接着層に含有される血管細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部を形成することができるからである。この光触媒含有層のパターニング方法は、特に限定されるものではないが、例えばフォトリソグラフィ法等により行うことが可能である。

30

【 0 1 5 9 】

また、実際に光触媒含有層に面する血管細胞接着層上の部分のみの、血管細胞接着材料が分解または変性されるものであるので、エネルギーの照射方向は上記光触媒含有層と血管細胞接着層とが面する部分にエネルギーが照射されるものであれば、いかなる方向から照射されてもよく、さらには、照射されるエネルギーも特に平行光等の平行なものに限定されないという利点を有するものとなる。

【 0 1 6 0 】

ここで、本態様で用いられる光触媒含有層については、上述した第3の態様で説明した光触媒含有層と同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【 0 1 6 1 】

(ii) 基体

次に、光触媒含有層側基板に用いられる基体について説明する。通常、光触媒含有層側基板は、少なくとも基体とこの基体上に形成された光触媒含有層とを有するものである。この際、用いられる基体を構成する材料は、後述するエネルギーの照射方向や、得られるパターン形成体が透明性を必要とするか等により適宜選択される。

40

【 0 1 6 2 】

また本態様に用いられる基体は、可撓性を有するもの、例えば樹脂製フィルム等であってもよいし、可撓性を有しないもの、例えばガラス基板等であってもよい。これは、エネルギー照射方法により適宜選択されるものである。

【 0 1 6 3 】

50

なお、基体表面と光触媒含有層との密着性を向上させるために、基体上にアンカー層を形成するようにしてもよい。このようなアンカー層としては、例えば、シラン系、チタン系のカップリング剤等を挙げることができる。

【0164】

(iii) 光触媒含有層側遮光部

本態様に用いられる光触媒含有層側基板には、血管形成パターンのパターン状に形成された光触媒含有層側遮光部が形成されたものを用いても良い。このように光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板を用いることにより、エネルギー照射に際して、フォトマスクを用いたり、レーザ光による描画照射を行う必要がない。したがって、光触媒含有層側基板とフォトマスクとの位置合わせが不要であることから、簡便な工程とすることが可能であり、また描画照射に必要な高価な装置も不必要であることから、コスト的に有利となるという利点を有する。

【0165】

このような光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板は、基体と光触媒含有層との間に形成されていてもよく、また光触媒含有層上に形成されてもよい。また光触媒含有層が形成される側と反対側の面の基体上に形成してもよい。

【0166】

このような光触媒含有層側遮光部の形成方法は、特に限定されるものではなく、光触媒含有層側遮光部の形成面の特性や、必要とするエネルギーに対する遮蔽性等に応じて適宜選択されて用いられ、第1の態様で説明した基材上に設けられる遮光部と同様のものとするので、ここでの詳しい説明は省略する。また、上記基体と光触媒含有層との間に光触媒含有層側遮光部を形成する場合には、光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層との間にプライマー層を形成してもよい。このようなプライマー層としては、例えば特開2002-173205号公報に記載されているもの等を用いることができる。

【0167】

b. 細胞接着阻害部の形成方法

次に、本態様における細胞接着阻害部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図4に示すように、基材11上に形成された血管細胞接着層15と、光触媒含有層側基板21の光触媒含有層22とを、所定の間隙をおいて配置し、例えばフォトマスク13等を用いて、エネルギー14を所定の方向から照射する(図4(a))。これにより、エネルギー照射された領域の血管細胞接着材料が分解または変性されて、血管細胞と接着性を有しない細胞接着阻害部3が細胞接着部2中に形成されるのである(図4(b))。この際、細胞接着阻害部は、例えば上記血管細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその血管細胞接着材料が少量含有されている、または血管細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは血管細胞接着層が完全に分解除去されて基材が露出すること等となる。また、上記血管細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

【0168】

上記の配置とは、実質的に光触媒の作用が血管細胞接着層表面に及ぶような状態で配置された状態をいうこととし、実際に物理的に接触している状態の他、所定の間隔を隔てて上記光触媒含有層と血管細胞接着層とが配置された状態とする。この間隙は、200 μm 以下であることが好ましい。

【0169】

本態様において上記間隙は、パターン精度が極めて良好であり、光触媒の感度も高く、したがって血管細胞接着層中の血管細胞接着材料の分解または変性の効率が良好である点を考慮すると特に0.2 μm ~10 μm の範囲内、好ましくは1 μm ~5 μm の範囲内とすることが好ましい。このような間隙の範囲は、特に間隙を高い精度で制御することが可能である小面積の血管細胞接着層に対して特に有効である。

【0170】

10

20

30

40

50

一方、例えば300mm×300mm以上といった大面積の血管細胞接着層に対して処理を行う場合は、接触することなく、かつ上述したような微細な間隙を光触媒含有層側基板と血管細胞接着層との間に形成することは極めて困難である。したがって、血管細胞接着層が比較的大面積である場合は、上記間隙は、10～100μmの範囲内、特に50～75μmの範囲内とすることが好ましい。間隙をこのような範囲内とすることにより、パターンがぼやける等のパターン精度の低下の問題や、光触媒の感度が悪化して血管細胞接着材料を分解または変性させる効率が悪化する等の問題が生じることなく、さらに血管細胞接着材料の分解または変性にムラが発生しないといった効果を有するからである。

【0171】

このように比較的大面積の血管細胞接着層をエネルギー照射する際には、エネルギー照射装置内の光触媒含有層側基板と血管細胞接着層との位置決め装置における間隙の設定を、10μm～200μmの範囲内、特に25μm～75μmの範囲内に設定することが好ましい。設定値をこのような範囲内とすることにより、パターン精度の大幅な低下や光触媒の感度の大幅な悪化を招くことなく、かつ光触媒含有層側基板と血管細胞接着層とが接触することなく配置することが可能となるからである。

10

【0172】

このように光触媒含有層と血管細胞接着層表面とを所定の間隔で離して配置することにより、酸素と水および光触媒作用により生じた活性酸素種が脱着しやすくなる。すなわち、上記範囲より光触媒含有層と血管細胞接着層との間隔を狭くした場合は、上記活性酸素種の脱着がしにくくなり、結果的に血管細胞接着材料を分解または変性させる速度を遅くしてしまふ可能性があることから好ましくない。また、上記範囲より間隔を離して配置した場合は、生じた活性酸素種が血管細胞接着層に届き難くなり、この場合も血管細胞接着材料の分解または変性の速度を遅くしてしまふ可能性があることから好ましくない。

20

【0173】

このような極めて狭い間隙を均一に形成して光触媒含有層と血管細胞接着層とを配置する方法としては、例えばスペーサを用いる方法を挙げることができる。そして、このようにスペーサを用いることにより、均一な間隙を形成することができると共に、このスペーサが接触する部分は、光触媒の作用が血管細胞接着層表面に及ばないことから、このスペーサを上述した細胞接着部と同様のパターンを有するものとすることにより、スペーサの形成されていない部分のみの血管細胞接着材料を分解または変性させることができ、高精細に細胞接着阻害部を形成することができるのである。また、このようなスペーサを用いることにより、光触媒の作用により生じた活性酸素種が拡散することなく、高濃度で血管細胞接着層表面に到達することから、効率よく高精細な細胞接着阻害部を形成することができる。

30

【0174】

本態様においては、このような光触媒含有層側基板の配置状態は、少なくともエネルギー照射の間だけ維持されればよい。

【0175】

ここで、本態様でいうエネルギー照射（露光）とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、血管細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

40

【0176】

ここで、本態様において照射されるエネルギーの種類等については、上述した第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0177】

なお、本態様におけるフォトリソグラフィを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有層側基板のいずれの方向からエネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有層側基板側からエネルギー照射を行う必要がある。

【0178】

50

(6) 第6の態様

またさらに、第6の態様としては、細胞培養層が、血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料を含有する血管細胞接着阻害層でありこの血管細胞接着阻害層と、光触媒を含有する光触媒含有層とを対向させて配置し、例えば上記血管形成パターンのパターン状に開口部を有するフォトマスク等を用いてエネルギー照射することによって、上記血管細胞接着阻害材料を分解または変性させて細胞接着部を形成する場合である。

【0179】

本態様においては、上記血管細胞接着阻害層中に、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される血管細胞接着阻害材料が含有されていることから、血管細胞接着阻害層と光触媒含有層とを対向させて配置し、上記血管形成パターンの形状にエネルギーを照射することにより、光触媒含有層中の光触媒の作用により、血管細胞接着阻害層中の血管細胞接着阻害材料が分解または変性されて、血管細胞との接着性を有する細胞接着部を形成することができるのである。この際、エネルギーが照射されていない領域については、血管細胞接着阻害材料が残存することから、血管細胞との接着性を有しないものとすることができ、細胞接着阻害部として用いることができるのである。

10

【0180】

ここで、上記血管細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記血管細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着阻害部に含有される血管細胞接着阻害材料の量と比較して、血管細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記血管細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部中にはその血管細胞接着阻害材料が少量含有されている、または血管細胞接着阻害材料の分解物等が含有されている、または血管細胞接着阻害材料が完全に分解されて基材が露出すること等となる。また、上記血管細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていること等となる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射された後に、血管細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の血管細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞接着部のみに、高精細に血管細胞を接着させることが可能となるからである。

20

30

【0181】

なお、本態様に用いられる血管細胞接着阻害層は、上記第4の態様で説明した血管細胞接着阻害層と同様であり、光触媒含有層側基板およびその配置やエネルギーの照射方法等については、上記第5の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0182】

4. 血管細胞培養工程

次に、本発明における血管細胞培養工程について説明する。本発明における血管細胞培養工程は、上記血管細胞培養パターンの上記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させる工程である。本工程により、上記細胞接着部に血管細胞を付着させて培養し、組織化させることにより、人工血管を形成することができるのである。

40

【0183】

本工程用いられる血管細胞は、培養されて血管を組織する血管細胞であり、各生物、特にヒトや動物より得られた血管内皮細胞、ペリサイト、平滑筋細胞、血管内皮前駆細胞、平滑筋前駆細胞を意味し、特に血管内皮細胞等を用いることができる。また、血管内皮細胞とペリサイトとの共培養や血管内皮細胞と平滑筋細胞との共培養等の複数の種類の細胞の共培養とすることもできる。

【0184】

また、血管細胞を細胞接着部に接着させる方法としては、上記細胞接着部と細胞接着阻害部とを有する上記血管細胞培養パターンの上記細胞接着部のみに血管細胞を接着させる

50

ことが可能な方法であれば特に限定されるものではない。例えばインクジェットプリンタやマニピュレータ等で血管細胞を接着させる方法等であってもよいが、血管細胞懸濁液を播種して上記細胞接着部に血管細胞を接着させた後、不要となった細胞接着阻害部上の血管細胞をリン酸バッファで洗浄し、血管細胞を除去する方法が一般的に用いられる。このような方法としては、例えば参考文献“Spatial distribution of mammalian cells dictated by material surface chemistry”, Kevin E. Healy 他, Biotech. Bioeng. (1994) p.792等に記載されている方法を用いること等ができる。

【0185】

また、本発明においては、血管細胞接着部に接着した血管形状のまま、血管細胞をマトリゲルのような血管細胞の血管化を促進する足場材料に接触させることにより、人工血管を形成させることができる。またさらに、上記血管細胞接着部に血管細胞を接着させた基材を、例えば皮膚などの組織に直接接触させることにより、血管細胞を所望する形状にて被接触組織上に転写し、被接触組織を足場として血管を人工的に形成させることも可能である。

10

【0186】

更に、上記血管細胞接着部上で目的とするパターン状に形成した後、培地にbFGFやVEGF等の血管細胞の血管化を促す成長因子を追加すること等により、細胞培養層上で直接、人工血管を形成することもできるが、血管細胞の血管形成化を安定的に行う為には足場を用いる前者の手法を適用することが望ましい。

【0187】

B. 人工組織の製造方法

次に、本発明の人工組織の製造方法について説明する。本発明の人工組織の製造方法は、上述した「A. 人工血管の製造方法」により製造された人工血管を用いることを特徴とするものである。本発明によれば、上記製造方法により製造された人工血管を用いることから、生体組織中に存在する血管のパターンと同様のパターン状に形成された血管を有する人工組織とすることができる。したがって、本発明により製造される人工組織中の各組織が、この人工血管から栄養を供給等されるものとするのが可能となり、種々の用途に用いることが可能な人工組織することができるのである。

20

【0188】

本発明により製造される人工組織としては、上記人工血管を有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば生体中に存在する血管とその他の細胞等により形成されているものとすることができ、例えば腎臓、肝臓等の臓器、眼底や皮膚等、各種器官とすることができる。

30

【0189】

本発明において人工組織を製造する方法としては、例えば人工組織を形成する血管以外の細胞を培地上で培養して組織化させ、この細胞上に上記人工血管を配置する方法や、上記人工血管を培地上に配置し、その培地上に上記細胞を培養し、組織化させる方法等が挙げられる。本発明においては、このように形成された層を複数組み合わせ、人工組織としてもよい。

【0190】

またこの際、用いられる細胞としては、上記血管から酸素や栄養分等の供給を受けて活性となり、人工組織を構成することが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えば肝実質細胞、ランゲルハンス島細胞等の代謝機能を有する細胞種、あるいは脳細胞や神経細胞等、情報伝達系の細胞種等が挙げられる。なお、本発明の人工組織の製造に用いられる上記細胞としては、1種類に限定されるものではなく、複数種類の細胞を組み合わせ用いられるものであってもよい。

40

【0191】

なお、上記細胞を培養する培地等は、目的とする細胞により適宜選択されるものであり、一般的な細胞の培養に用いられるものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

50

【 0 1 9 2 】

C . フォトマスク

次に、本発明のフォトマスクについて説明する。本発明のフォトマスクとは、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された２次元パターンからなる血管のパターンを有することを特徴とするものである。

【 0 1 9 3 】

本発明によれば、フォトマスクが血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成されたパターンを有することから、このフォトマスクを用いて、例えば血管細胞接着層等を上記パターン状にパターンニングし、この細胞接着層上で血管内皮細胞を培養し、管形状とさせることによって、上記パターン状に形成された血管を形成することができる。したがって、このフォトマスクを用いて種々のパターンを有する血管を形成することができ、例えば上述した「A . 人工血管の製造方法」の血管細胞培養パターン形成工程で説明したような細胞培養層の露光に用いること等によって、生体組織の血管の形状と同様のパターンを有する血管を形成すること等ができるのである。

10

【 0 1 9 4 】

ここで、上記血管内皮細胞が管形状となる線幅とは、血管内皮細胞の種類にもよるが、通常 $20\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲内、中でも $40\ \mu\text{m} \sim 80\ \mu\text{m}$ の範囲内、特に $50\ \mu\text{m} \sim 70\ \mu\text{m}$ の範囲内とされることが好ましい。このような範囲内とすることにより、効率よく血管内皮細胞を管形状とすることができるからである。なお、本発明においては、上記フォトマスクを用いて露光する際、上記フォトマスクのパターンを拡大、または縮小して露光してもよい。この場合には、フォトマスクに形成される上記パターンの線幅は、上記範囲に限定されるものではなく、投影された像の血管のパターンの線幅が、上記範囲内となるように、フォトマスクの線幅が決定されていることが好ましい。

20

【 0 1 9 5 】

また、本発明のフォトマスクにおいては、例えば上記血管のパターンが遮光部となるように形成されたものであってもよく、また上記血管のパターンが開口部となるように形成されたものであってもよい。

【 0 1 9 6 】

またさらに、上記線幅で構成された２次元パターンからなる血管のパターンは、２次元で現された血管のパターンであれば特に限定されるものではなく、例えば生体組織の所定の断面で観察される血管のパターンとすること等ができる。上記血管のパターンを生体組織の血管のパターン状とする場合には、生体組織の血管のパターンとフォトマスクに形成されるパターンが同一となるように形成してもよく、また例えば血管の形成を容易とするために、フォトマスクに形成される各血管のパターンを調整してもよい。またさらに必要な血管の形状を加えたり、削除したもの等であってもよい。このような調整は、例えば「A . 人工血管の製造方法」の血管形成パターン調整工程で説明したような調整とすることができる。

30

【 0 1 9 7 】

なお、上記生体組織とは、生体中に存在する組織であり、血管とその他の細胞等により形成されている組織をいうこととし、例えば腎臓、肝臓等の臓器、眼底や皮膚等、血管を含む各種器官をいうこととする。

40

【 0 1 9 8 】

本発明においては、上述したようなフォトマスクを形成することが可能であれば、その形成方法は特に限定されるものではなく、フォトマスクの形成方法や、その材料等については、一般的なフォトマスクに用いられる方法や材料と同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【 0 1 9 9 】

D . 人工血管

次に、本発明の人工血管について説明する。本発明の人工血管は、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された２次元パターンにより形成された血管のパターンを有すること

50

を特徴とするものである。

【0200】

本発明によれば、上記人工血管が上記パターンにより形成されていることから、例えば生体組織中の血管と同様のパターンを有する人工血管等とすることができ、例えば微小血管の梗塞部位や人工組織中に配置すること等によって、生体組織に存在する血管と同様の機能を果たすものとするのが可能となる。

【0201】

ここで、血管内皮細胞が管形状となる線幅とは、本発明の人工血管を構成する血管内皮細胞の種類等にもよるが、通常20 μ m～100 μ mの範囲内、中でも40 μ m～80 μ mの範囲内、特に50 μ m～70 μ mの範囲内とされることが好ましい。これにより、血管内皮細胞が管形状となり、本発明の人工血管の形成が容易となるからである。

10

【0202】

また、上記線幅で構成された2次元パターンにより形成された血管のパターンとは、上記線幅のパターン状に血管内皮細胞を培養し、管形状とした血管のパターンとすることができ、例えば生体組織の所定の断面で観察される血管のパターンとすること等ができる。この際、上記血管のパターンを生体組織中に存在する血管と同一のパターン状としてもよいが、例えば生体組織中に存在する血管の形状の、血管の太さや位置等を調整したものや、人工組織または生体に存在する血管から血液を導入するための血管や、排出するための血管等を形成したパターン等とすることもできる。このような調整は、例えば「A.人工血管の製造方法」の血管形成パターン調整工程で説明したような調整とすることができる。

20

【0203】

なお、上記生体組織とは、生体中に存在する組織であり、血管とその他の細胞等により形成されている組織をいうこととし、例えば腎臓、肝臓等の臓器、眼底や皮膚等、血管を含む各種器官をいうこととする。なお、本発明において、このような人工血管の形成方法としては、上述した「A.人工血管の製造方法」において説明した方法等により形成することができ、また、本発明の人工血管の形成に用いられる材料についても、上述したものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0204】

E.人工組織

次に、本発明の人工組織について説明する。本発明の人工組織は、所望する機能を有する臓器由来の実質細胞に加え、上述した人工血管を有することを特徴とするものである。臓器の実質細胞のみからなる細胞塊の場合、塊の内部にある細胞に対し酸素、栄養分や老廃物の運搬がなされない為、内部の細胞が壊死する。本発明によれば、臓器の実質細胞に加え、人工血管を有する組織が形成可能となる為、組織を壊死させる事なく、機能させることが可能となる。したがって、本発明によれば、種々の用途に使用可能な人工組織とすることができるのである。

30

【0205】

本発明の人工組織は、上記血管を有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば生体中に存在する血管とその他の細胞等により形成されている組織とすることができ、例えば腎臓、肝臓等の臓器、眼底、皮膚等、各種器官とすることができる。

40

【0206】

なお、このような人工組織の製造方法については、上述した「B.人工組織の製造方法」において説明したものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0207】

F.血管細胞培養パターン基材

次に、本発明の血管細胞培養パターン基材について説明する。本発明の血管細胞培養パターン基材は、基材と、前記基材上に形成され、血管細胞と接着性を有する細胞接着部および前記血管細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害部からなるパターンを有する細

50

胞培養層と、前記細胞接着部上に接着した血管細胞とを有する血管細胞培養パターン基材であって、前記細胞接着部が、血管内皮細胞が管形状となる線幅で構成された2次元パターンからなる血管のパターン状に形成されていることを特徴とするものである。

【0208】

本発明の血管細胞培養パターン基材は、例えば図5に示すように、基材11と、その基材11上に形成され、所定のパターン状に形成された細胞接着部2および細胞接着障害部3からなるパターンを有する細胞培養層1と、その細胞接着部2上に接着した血管細胞4とを有するものである。

【0209】

本発明によれば、細胞培養層上に、所定のパターン状に細胞接着部が形成されており、それ以外の領域は細胞接着障害部とされていることから、細胞接着部上のみで高精細に血管細胞を培養することができる。これにより、目的とするパターン状に高精細に血管を形成することが可能な血管細胞培養パターン基材とすることができるのである。またさらに、上記細胞接着部の線幅が、血管内皮細胞が管形状となるような線幅とされていることから、培養された血管細胞を容易に管形状とし、効率よく人工血管を形成することができる血管細胞培養パターン基材とすることができる。

10

【0210】

ここで、血管内皮細胞が管形状となる線幅とは、細胞接着部上で培養され、組織化された血管細胞が管形状となる線幅であり、具体的には、上記血管細胞の種類等にもよるが、通常20 μm ~100 μm の範囲内、中でも40 μm ~80 μm の範囲内、特に50 μm ~70 μm の範囲内とされることが好ましい。これにより、上記細胞接着部上で培養された血管細胞によって人工血管を形成しやすくなるからである。

20

【0211】

また、上記線幅で構成された2次元パターンからなる血管のパターンとは、2次元で現された血管のパターンであれば特に限定されるものではなく、例えば生体組織の所定の断面で観察される血管のパターンとすること等ができる。この際、上記パターンの形状を、生体組織中に存在する血管と同一の形状としていてもよいが、例えば生体組織中に存在する血管の形状の、血管の太さや位置等を調整したものや、人工組織または生体に存在する血管から血液を導入するための血管や、排出するための血管等を形成したパターン等とすることもできる。

30

【0212】

ここで、本発明の血管細胞培養パターン基材に用いられる基材や、上記細胞接着部および細胞接着障害部を有する細胞培養層、および血管細胞については、上述した「A.人工血管の製造方法」の項で説明したものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

【0213】

上述したような血管細胞培養パターン基材を用いれば、基材と、上記基材上に剥離可能に設けられた血管内皮細胞とからなる血管内皮細胞パターン基材であって、上記血管内皮細胞が血管ネットワークを2次元で表現したパターン状に管形状となる線幅で形成されていることを特徴とする血管内皮細胞パターン基材を得ることができる。このような血管内皮細胞パターン基材においては、所定のパターン状に形成された血管内皮細胞が剥離可能に設けられていることから、この血管内皮細胞パターン基材から血管内皮細胞を剥離し、例えば人工組織等、種々の用途に用いることができる。

40

【0214】

なお、このような血管内皮細胞が剥離可能な血管内皮細胞パターン基材においては、培養ベースとして、血管内皮細胞に損傷を与えずこれを剥離可能なものが使用される。このような培養ベースとしては、細胞を弱い接着力で保持可能な表面を有する培養ベースが挙げられ、具体的には、ポリスチレン基材に対し細胞接着用のプラズマ処理を弱く施したもののや、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンやフルオロアルキルシランのように細胞接着阻害性を有する材料を基材表面に少量導入したものなどが挙げられる。この

50

ような少量導入の方法としては、材料を吸着処理などで基材に十分に導入した後、UV処理、オゾン処理、プラズマ処理で分解する方法、または材料を希薄に溶解した溶液を薄層コーティングする等の方法が挙げられる。導入の割合については接着させる細胞の種類、基材に導入する材料の種類により異なり調整を要する。

【0215】

また、温度応答性ポリマー材料、例えば、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドのように相転移温度以上の環境では疎水性、すなわち細胞接着性を有し、相転移温度以下の温度では親水性となり細胞接着性が失われる材料を、高分子やガラスの基材上に重合したものの等を用いることもできる。

【0216】

なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するもの、およびそれと均等なものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

【実施例】

【0217】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

【0218】

[実施例1]

<フォトマスク>

ヒト眼底の写真撮影を行い、生体内の血管像を得た。この画像をスキャナでコンピュータに取りこんだ。次に取りこんだ画像をScion Imageにて二値化、メジアンフィルタ処理によるノイズ除去、先鋭化処理した。二値化された血管画像から線パターンを抽出、ベクトル化し、更に線幅を60 μ mに統一することで血管形成に最適な血管細胞接着幅に調整された生体の血管形成パターンを作成した。

更に作成した血管形成パターンを再度ベクトル化し、通常の写真マスク作成手順と同様にレーザー描画機にて所望のパターンを有するフォトマスクを作成した。フォトマスクの作成に際しては血管部が透過部、血管部以外が遮光部とした。

【0219】

[実施例2]

<血管細胞培養パターン基材>

フルオロアルキルシランTSL8233(GE東芝シリコン)1.5g、テトラメトキシシランTSL8114(GE東芝シリコン)5.0g、 5.0×10^{-3} NHCl 2.4gを12時間混合し、これをイソプロピルアルコールで10倍希釈した。次に、この溶液2.0gを1000rpm、5秒でスピコーターにより10cm \times 10cmのソーダガラス基材に塗布し、その基材を150の温度で10分間乾燥させて、血管細胞接着阻害層とした。

次に、イソプロピルアルコールで3倍希釈した酸化チタンゾル液(石原産業STK-03)3.0gを光触媒含有層用組成物とした。前記光触媒含有層用組成物を、実施例1と同様の手法で作成した石英フォトマスクのパターン面上にスピコーターにより700rpm、3秒で塗布し、150で10分間の乾燥処理を行うことにより、透明な光触媒含有層を有するフォトマスクを形成した。

前記フォトマスクの光触媒含有層面と前記基材の血管細胞接着阻害層面との間隙が3 μ mとなるように配置し、フォトマスク側から水銀ランプ(波長365nm)により4J/cm²の照度で所定の時間紫外線露光を行い、幅60 μ mの細胞接着部を有する細胞培養パターンを得た。

【0220】

<血管細胞培養工程>

培養細胞として、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(Onodera M, Morita I, Mano Y, Murota S: Differential effects of nitric oxide on the activity of prostaglandin endo

10

20

30

40

50

peroxide h synthase-1 and-2 in vascular endothelial cells、Prostag Leukotress 62 : 161-167, 2000) で継代数 5 代から 20 代のものを用いた。

10 cm ディッシュでコンフレント状態になったウシ頸動脈由来血管内皮細胞を 0.05 % トリプシン - EDTA で処理して剥がした。コールターカウンター™ ZM (Coulter Counter) で細胞数を調べ、 10^6 個/ml とした。先に作成した細胞培養パターンを有する基材をオートクレーブにて滅菌した。培養液 (5 % ウシ胎児血清含有 MEM 培地) を含む培養ディッシュ (Heraeus Quadriprem™ 76 × 26 mm、1976 mm²) に上記細胞培養パターンが形成された基材を入れ、上記内皮細胞を 1 ウェル当たり 10^6 個/5 ml で播き、24 時間 CO₂ 細胞培養装置でインキュベートした。これにより、上記細胞培養パターン状に血管細胞が接着した、血管細胞培養パターン基材を得た。

10

【0221】

[実施例 3]

実施例 2 で作成したパターン状に血管細胞が接着した血管細胞培養パターン基材に対し、血管細胞の血管組織化足場材料として GFR マトリゲル (ベットン・ディッキンソン社製) 2 ml を基材の血管細胞接着面側に接触させ、37 °C で加温した。ゲルの固化後、基材とゲルとを培養液下にて CO₂ 細胞培養装置に入れ、血管細胞の組織化を行った。

24 時間経過後、作成された血管組織を位相差顕微鏡観察や細胞染色、免疫染色後に蛍光顕微鏡観察したところ、内部に腔を有する管組織の形成が確認された。

【0222】

[実施例 4]

実施例 2 と同様の手順でパターン状に血管細胞が接着した血管細胞培養パターン基材を、5 % ウシ胎児血清含有 MEM 培地に対しカルボシアニン蛍光色素 (DiI, Invitrogen 社) を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解した培地に浸漬し、37 °C で 1 時間培養した。その後、血管細胞培養パターン基材を 5 % ウシ胎児血清含有 MEM 培地に戻した。

20

【0223】

(生体組織への細胞導入)

免疫不全マウスを麻酔し、背部を切開し、作成した血管細胞が配列接着した基材を皮下移植した。移植部を縫合した。縫合 3 日後に移植部を再切開した上で尾部静脈から FITC-Dextran 溶解液を注射し血液を染色した。マウスに犠牲死手術を施し、移植組織部の DiI と FITC を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

30

観察の結果、移植組織部に蛍光標識された血管細胞が血管構造を形成したこと、蛍光色素を含む血液が血管構造内を流通していたことが確認された。

【0224】

[実施例 5]

マトリゲル 0.5 ml を滴下したシャーレに対し、実施例 2 で作成したパターン状に血管細胞が接着した血管細胞培養パターン基材の細胞接着面がゲルに接触するように重ね、ゲルを 37 °C に加温して固化した。基材とゲルとを培養液下にて CO₂ 細胞培養装置に入れ 24 時間培養し、血管細胞の組織化を行った。血管形成後、基材をゲルから剥離した。

前述の作業と並行し、マウス肝実質細胞を採取し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカルボシアニン蛍光色素 (DiO, Invitrogen 社) で染色後、5 % ウシ胎児血清含有 MEM 培地に戻し、蛍光染色したマウス肝実質細胞を得た。

40

上記の蛍光染色肝実質細胞を、人工血管を有するゲル上に播種、CO₂ 細胞培養装置に入れ 24 時間培養することで肝実質細胞をゲルに埋没させた後、ピンセットで組織をシャーレから剥離し、人工血管を有するゲル、肝実質細胞からなる組織片を作成した。

【0225】

(組織の評価)

免疫不全マウスを麻酔し、腹部を切開、肝臓の 1/3 を除去し肝機能障害モデルとした。次に前述の作業で作成した組織片をマウスの肝臓部に移植した。移植部を縫合し、14 日後にコリンエステラーゼ評価により肝機能の評価を行った結果、肝機能が肝臓の除去前

50

と同水準まで回復していることを確認した。

更に肝機能移植部を再切開し、移植組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。励起波長480nmにおける観察で移植した肝実質細胞が観察された。また、励起波長530nmにおける観察で、予め血管内皮細胞をパターンングした通りに、毛細血管が形成されていることが確認された。

【0226】

[比較例1]

免疫不全マウスを麻酔し、腹部を切開、肝臓の1/3を除去し肝機能障害モデルとした。組織片を移植せずに再び移植部を縫合し、14日後にコリンエステラーゼ評価により肝機能の評価を行った。その結果、肝機能が肝臓の除去前の4割程度に留まっていることを確認した。

10

【0227】

[比較例2]

マウス肝実質細胞を採取し、10 μ g/mlのカルボシアニン蛍光色素(DiO, Invitrogen社)で染色後、5%ウシ胎児血清含有MEM培地に戻し、蛍光染色したマウス肝実質細胞を得た。

上記の蛍光染色肝実質細胞を、血管細胞を有さないマトリゲル上に播種、CO₂細胞培養装置に入れ24時間培養することで肝実質細胞をゲルに埋没させた後、ピンセットで組織をシャーレから剥離し、肝実質細胞の埋没したゲル組織片を作成した。

20

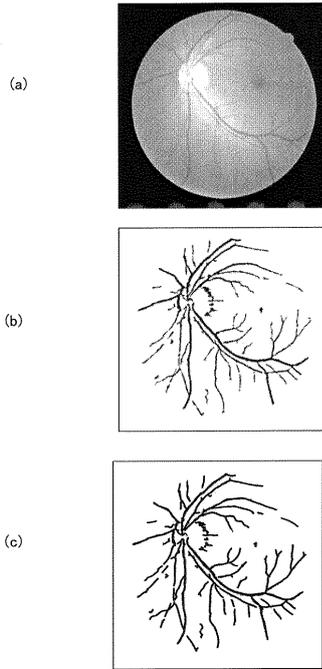
【0228】

(組織の評価)

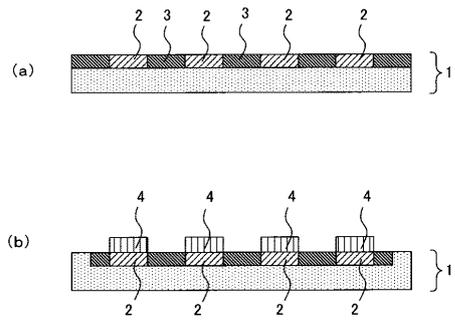
免疫不全マウスを麻酔し、腹部を切開、肝臓の1/3を除去し肝機能障害モデルとした。次に前述の作業で作成した組織片をマウスの肝臓部に移植した。移植部を縫合し、14日後にコリンエステラーゼ評価により肝機能の評価を行った結果、肝機能が肝臓の除去前の4割程度に留まっていることを確認した。

更に肝機能移植部を再切開し、移植組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。励起波長480nmにおける観察をしたところ、移植した肝実質細胞が殆ど見られず、移植細胞が殆ど壊死した事が確認された。

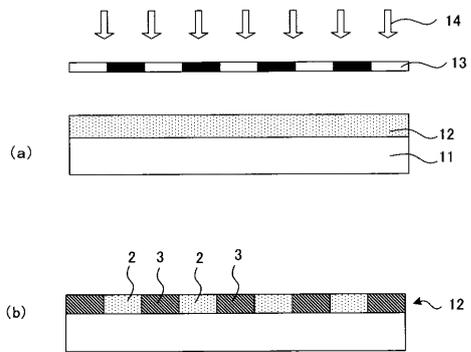
【 図 1 】



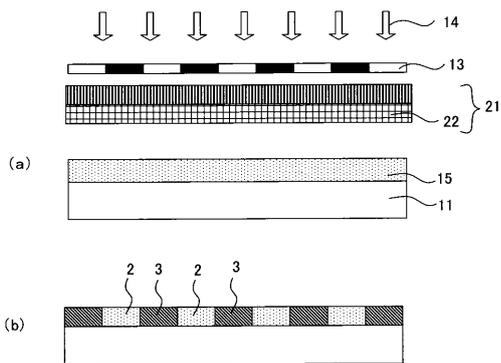
【 図 2 】



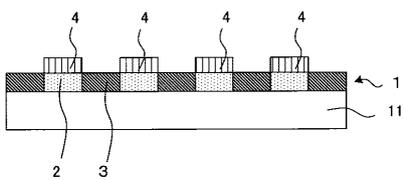
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/009917
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61L27/00, A61F2/06, C12N5/06		
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) Int.Cl ⁷ A61L27/00, A61F2/06, C12N5/06		
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 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2003-527615 A (President and Fellows of Harvard College), 16 September, 2003 (16.09.03), Full text & WO 01/070389 A & EP 1265994 A & US 2001/055882 A & US 6893850 B & US 2005/158880 A	5-8 1-4
A	WO 96/15223 A (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN), 23 May, 1996 (23.05.96), Full text & EP 800574 A & US 5962136 A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 03 August, 2005 (03.08.05)		Date of mailing of the international search report 23 August, 2005 (23.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/60356 A (CELLOMICS, INC.), 12 October, 2000 (12.10.00), Full text & EP 1166116 B & JP 2002-541458 A & US 2003/204316 A	1-8
A	JP 8-9960 A (NEC Corp.), 16 January, 1996 (16.01.96), Full text & US 5602029 A	1-8
A	JP 2-84174 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 26 March, 1990 (26.03.90), Full text (Family: none)	1-8
A	JP 10-243924 A (Nippon Telegraph And Telephone Corp.), 14 September, 1998 (14.09.98), Full text (Family: none)	1-8
P,A	JP 2005-143382 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 09 June, 2005 (09.06.05), Full text (Family: none)	1-8
P,A	JP 2005-160441 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 23 June, 2005 (23.06.05), Full text (Family: none)	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/009917
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl.7 A61L27/00, A61F2/06, C12N5/06		
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 (IPC)) Int.Cl.7 A61L27/00, A61F2/06, C12N5/06		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (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 請求の範囲の番号
X A	JP 2003-527615 A (プレジデント・アンド・フェ ローズ・オブ・ハーバード・カレッジ) 2003.09.16, 全文 &WO 01/070389 A &EP 1265994 A &US 2001/055882 A &US 6893850 B &US 2005/158880 A	5-8 1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 03.08.2005	国際調査報告の発送日 23.8.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 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) 八原 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9261

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/009917
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 請求の範囲の番号
A	WO 96/15223 A (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 1996.05.23, 全文 &EP 800574 A &US 5962136 A	1-8
A	WO 00/60356 A (CELLOMICS, INC.) 2000.10.12, 全文 &EP 1166116 B &JP 2002-541458 A &US 2003/204316 A	1-8
A	JP 8-9960 A (日本電気株式会社) 1996.01.16, 全文 &US 5602029 A	1-8
A	JP 2-84174 A (大日本印刷株式会社) 1990.03.26, 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 10-243924 A (日本電信電話株式会社) 1998.09.14, 全文 (ファミリーなし)	1-8
P, A	JP 2005-143382 A (大日本印刷株式会社) 2005.06.09, 全文 (ファミリーなし)	1-8
P, A	JP 2005-160441 A (大日本印刷株式会社) 2005.06.23, 全文 (ファミリーなし)	1-8

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 三宅 秀之

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内

Fターム(参考) 4C081 AB13 CD34 DA03 EA14

4C097 AA15 BB01 BB10 DD15 MM02 MM03 MM04

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。