

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5846550号
(P5846550)

(45) 発行日 平成28年1月20日 (2016. 1. 20)

(24) 登録日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 M 3/00 (2006. 01) C 1 2 M 3/00 A
C 1 2 N 5/071 (2010. 01) C 1 2 N 5/00 2 O 2 A

請求項の数 10 (全 15 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2011-102759 (P2011-102759) (22) 出願日 平成23年5月2日 (2011. 5. 2) (65) 公開番号 特開2012-231743 (P2012-231743A) (43) 公開日 平成24年11月29日 (2012. 11. 29) 審査請求日 平成26年4月21日 (2014. 4. 21)</p>	<p>(73) 特許権者 301023238 国立研究開発法人物質・材料研究機構 茨城県つくば市千現一丁目2番地1 (72) 発明者 小林 尚俊 茨城県つくば市千現一丁目2番地1 独立 行政法人物質・材料研究機構内 (72) 発明者 吉川 千晶 茨城県つくば市千現一丁目2番地1 独立 行政法人物質・材料研究機構内 審査官 北村 悠美子</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】短繊維足場材料、短繊維-細胞複合凝集塊作製方法及び短繊維-細胞複合凝集塊

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

平均長が $10\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$ であり、かつ、平均直径が $200\ \text{nm} \sim 4\ \mu\text{m}$ である紡糸ファイバーからなり、前記紡糸ファイバーの表面にポリマーブラシが形成されている、培養液中に添加することにより細胞とともに凝集する短繊維足場材料。

【請求項2】

前記ポリマーブラシは親水性の材料で形成された、請求項1に記載の短繊維足場材料。

【請求項3】

中空状である、請求項1または2に記載の短繊維足場材料。

【請求項4】

電界紡糸繊維を切断した、請求項1から3の何れかに記載の短繊維足場材料。

【請求項5】

請求項1から4の何れかに記載の短繊維足場材料及び細胞を分散させた培養液中で培養を行うことにより、前記短繊維足場材料及び細胞を含む短繊維-細胞複合凝集塊を形成する、短繊維-細胞複合凝集塊作製方法。

【請求項6】

前記培養液は血清と成長因子の少なくとも何れかを含む、請求項5に記載の短繊維-細胞複合凝集塊作製方法。

【請求項7】

培養中に外部場を印加することにより前記短繊維に配向性を持たせる、請求項6に記載

の短繊維 - 細胞複合凝集塊作製方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 4 の何れかに記載の短繊維足場材料と細胞とが凝集した、多孔質の短繊維 - 細胞複合凝集塊。

【請求項 9】

表面と内部との間の循環系を提供する、径が 8 nm 以上の経路が形成されている、請求項 8 に記載の短繊維 - 細胞複合凝集塊。

【請求項 10】

前記短繊維が配向性を有する、請求項 8 または 9 に記載の短繊維 - 細胞複合凝集塊。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞の培養に関し、より詳細には厚みを持った形状に細胞を培養するための短繊維足場材料、短繊維 - 細胞複合凝集塊作製方法及び短繊維 - 細胞複合凝集塊に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞培養を行う際に細胞をその上に担持するための基材は、多様な構成が従来から開発されてきた。そのような基材の中で、再生医療用や細胞から産生される有用産物を取り出すバイオリアクターなどの用途においては、立体形状のもの、つまり三次元足場として、基本的には多孔質の物質や繊維の集塊などを所望の形状に加工することにより、細胞が内部に入り込んで繁殖できる空所を有する物体として形成される。再生医療用の三次元足場の例は、例えば非特許文献 1 ~ 3 に示されている。

20

【0003】

そのような三次元足場を用いて細胞培養を行う際に足場内部まで細胞が入り込むようにするため、足場表面に細胞を付着させることで細胞の移動や増殖で足場内部まで細胞を浸潤させたり、あるいは培養液に分散させた細胞を加圧や吸引により強制的に足場内部へ送り込むなどの方法が使用されている。

【0004】

しかし、細胞の自発的な浸潤を待つ方法では、細胞を足場内部まで十分に入り込ませるのが困難であり、それが可能であったとしても長時間を要するという問題がある。また、強制的に細胞を足場内部へ送り込む方法でも、やはり内部まで均一に細胞を分散させるのは困難である。具体的には、足場内部への経路が「袋小路」的な構造を取っている場合には、そのような経路が通る領域へ細胞を送り込むことはできず、また経路の径は培養液だけではなく細胞も十分に通過可能な大きさである必要があり、この条件が満足されない狭窄部から先の領域へは細胞が入り込むことができないという問題がある。更には、個々の三次元足場の形状に合わせて足場全体に渡ってそのような加圧・吸引力を印加するために使用する治具を準備するのは煩雑であり、また準備時間・費用を要する。

30

【0005】

足場を利用した三次元的な細胞培養における上述の問題を回避するため、足場を使用せずに細胞単独で凝集させることにより、三次元の細胞組織を培養、作製することも行われる。しかし、このようにして作製された細胞凝集体では、何らかの手段で細胞組織内への循環系を別途提供しない限り、細胞密度が高くなりすぎて内部での酸素や栄養補給が不足するため、組織内部の細胞が死滅するという問題点がある。表面までの距離が、活発な細胞では 100 μm 以上、あまり活発でない細胞でも 500 μm 以上になるとこのような細胞の死滅が起こるため、このような方法は非常に薄いあるいは小さな細胞組織の作製にしか適用できない。

40

【0006】

また、培養液中で足場材料としての微粒子と細胞とを混ぜることで凝集させる方法も使用されている。このような凝集塊においては、個々の微粒子の周囲に細胞が付着したものが相互に結合することによって、凝集が行われる。従って、微粒子は上述した予め所定の

50

形状に形成した三次元足場とは異なり、細胞とともに凝集することによって始めて一定の形状を持つようになる。しかしながら、このような場合でも微粒子は凝集塊、つまり細胞組織を培養する基材となっているため、このような微粒子も足場ということができる。

【0007】

しかし、この微粒子が混在する細胞組織においても、組織内部へ酸素や栄養を供給する循環系を形成するのは困難であるため、微粒子足場材料を使用する本方法も、細胞だけを凝集させる方法について上で指摘した問題点に関しては解決を与えるものではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、上述した従来技術の問題点を解決し、内部の細胞が死滅しないように表面から内部へのガス交換や栄養補給のため等に有用な経路として機能する空隙が自己形成された細胞組織を形成できるようにすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一側面によれば、平均長が $10\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$ であり、かつ、平均直径が $200\ \text{nm} \sim 4\ \mu\text{m}$ である紡糸ファイバーからなり、前記紡糸ファイバーの表面にポリマーブラシが形成されている、培養液中に添加することにより細胞とともに凝集する電界紡糸ファイバーからなる短繊維足場材料が提供される。

また、前記ポリマーブラシを親水性の材料で形成してよい。

また、短繊維を中空状としてよい。

また、短繊維は電界紡糸繊維を切断したものであってよい。

本発明の他の側面によれば、上述の短繊維足場材料及び細胞を分散させた培養液中で培養を行うことにより、前記短繊維足場材料及び細胞を含む短繊維 - 細胞複合凝集塊を形成する、短繊維 - 細胞複合凝集塊作製方法が与えられる。

ここで、前記培養液は血清と成長因子の少なくとも何れかを含んでよい。

また、培養中に外部場を印加することにより前記短繊維に配向性を持たせてよい。

本発明の更に他の側面によれば、上述の短繊維足場材料と細胞とが凝集した、多孔質の短繊維 - 細胞複合凝集塊が与えられる。

ここで、表面と内部との間の循環系を提供する、径が $8\ \text{nm}$ 以上の経路が形成されていてよい。

また、前記短繊維が配向性を有してよい。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、内部への循環経路が確保された厚みのある細胞集塊（組織）を、簡単かつ短時間で形成、培養することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の一実施例の短繊維の作製方法を説明する図。

【図2】本発明の一実施例の短繊維の作成過程において、ポリマーブラシ形成前（a）と形成後（b）の繊維の走査型電子顕微鏡（SEM）像。

【図3】本発明の一実施例の短繊維の作成過程において、繊維の切断時間の違いによる短繊維の外観の違いを示すSEM像。（a）は液 - 液界面においてホモジナイザーで1時間切断した状態を、（b）は同じく3時間切断した状態を示す。

【図4】本発明の一実施例の短繊維 - 細胞複合凝集塊のSEM像。

【図5】本発明の一実施例で使用した細胞のみが平面状に多数分布した状態のSEM像。

【図6】図4に示した本発明の一実施例の短繊維 - 細胞複合凝集塊の組織切片染色サンプルの高倍率の位相差顕微鏡写真。

【図7】図4に示した本発明の一実施例の短繊維 - 細胞複合凝集塊の組織切片染色サンプルの低倍率の位相差顕微鏡写真。

10

20

30

40

50

【図8】図4に示した本発明の一実施例の短繊維 - 細胞複合凝集塊の組織切片染色サンプルの高倍率の通常の光学顕微鏡写真。

【図9】図4に示した本発明の一実施例の短繊維 - 細胞複合凝集塊の組織切片染色サンプルの低倍率の通常の光学顕微鏡写真。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の一形態においては、上述の微粒子を足場として利用する代わりに、紡糸された繊維を切断して得られる短繊維を利用する。なお、ここで使用する培養液には、短繊維以外に、細胞に栄養を与えるための血清、成長因子など、細胞培養に使用される任意の成分を含むことができる。短繊維足場材料は微粒子に比べてかなり大きなアスペクト比を有するため、細胞とともに凝集させると、微粒子の場合とは異なり、短繊維同士が密集することなく、短繊維間にかかなりの隙間を残した状態で凝集が起こる。従って、このようにして形成された組織は多数の孔が自己形成される多孔質状となるので、かなり大きな組織の場合でも表面から内部までの酸素や栄養の供給、また細胞からの老廃物や有用産物の外部への放出のための循環系として機能する多数の経路が提供される。なお、二次元足場として短繊維を使用することは非特許文献4に記載があるが、本願のように短繊維が細胞とともに多孔質の三次元形状として凝集することはない。また、非特許文献5にはマイクロトームで切断したファイバーと細胞との相互作用が論じられているが、ここでは裁断された短繊維を磁界によって操作することで細胞間にこの短繊維を掛け渡すことが開示されているだけで、細胞の培養については言及がない。

【0013】

また、足場が微粒子ではなく高いアスペクト比を有する短繊維であるため、例えば培養中に特定方向の圧力をかけるなどの外部場を与えることによって、出来上がる組織中のこれらの短繊維に配向性を持たせる（つまり、組織内の多数の短繊維の方向がランダムではなく、全体として向きが揃うようにする）ことができる。これにより、出来上がる細胞組織にも、例えば特定の方向に伸びたり、あるいは方向によって力学的特性が異なるなどの方向性を持たせることができる。

【0014】

短繊維のサイズとしては、平均長さが2 μm ~ 5 mmの範囲が好ましく、10 μm ~ 500 μm の範囲が更に好ましい。また、その平均直径は50 nm ~ 30 μm の範囲が好ましく、200 nm ~ 4 μm の範囲が更に好ましい。短繊維長が過度に長い場合には繊維の絡み合いが起こり十分な分散状態が得られにくいという問題がある。逆に短すぎる場合には初期の細胞密度の制御や異方性の制御が難しく微粒子を用いた時と差異がなくなる。また、繊維径が小さすぎると、細胞同士の接着を抑制できず、大きな細胞凝集塊を作成した際、内部への栄養供給が担保されない。逆に、繊維径が大きすぎると、形成細胞凝集塊における細胞の占める割合が少なくなるため、高機能な細胞凝集塊を得にくくなるという問題がある。

【0015】

短繊維は、各種素材からのナノファイバーの製造が簡便に行える電界紡糸によって作製された長い繊維を切断することで得ることができる。切断は、例えば液 - 液界面に繊維を置いてホモジナイザーなどの回転刃によりこれを行うことができる。もちろん、使用したいファイバー原料を所望の直径に紡糸できるのであれば、他の紡糸方法を採用することもできる。

【0016】

また、表面に適切なポリマーブラシを形成した短繊維を使用することにより、短繊維表面を親水性にして水中への分散性を向上させたり、細胞との親和性を向上させるためのナノファイバー表面の修飾を行うことなど、短繊維表面に足場として更に好適な特性を持たせることができる。

【0017】

また、中空系などのチューブ状の短繊維を使用することで、厚みがある組織中の細胞密

10

20

30

40

50

度を高くした場合でも組織内部への酸素や栄養の供給と老廃物や有用産物の放出を担う循環系の循環効率の低下を軽減することができる。

【実施例】

【0018】

[短繊維足場材料の作製]

まず、図1(a)に示す反応により、原始移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を有する4-ビニルベンゼン-2-ブロモプロピオネート(4-vinylbenzyl-2-bromopropionate)(VBP)とスチレン(ST)のランダム共重合を行った。得られた共重合体であるポリ(ST-r-VBP)($M_n = 105200$ 、 $M_w / M_n = 2.82$)を用いて電界紡糸を行い、直径 $593 \text{ nm} \pm 74 \text{ nm}$ の電界紡糸ファイバー(不織布)を得た。このようにして得られた電界紡糸ファイバーのSEM像を図2(a)に示す。

10

【0019】

次に、この不織布を含むスチレンスルホン酸ナトリウム(styrene sodium sulfonate)(SSNa)、フリー開始剤、 Cu(I)Br 、 Cu(II)Br_2 、2,2'-ビピリジン(2,2'-bipyridine)の1/3v/v%メタノール/水の溶液をAr雰囲気下、30で加熱した。重合後、フリーポリマーの M_n 、 M_w / M_n をGPC測定により決定した。 M_n は重合率に対して直線的に増加し、重合率から算出される理論分子量とほぼ一致した。分子量分布も1.2程度と比較的狭く、重合がリビング的に進行していることが確認された。 M_n 、グラフト量、および表面積から、グラフト密度は約 $0.22 \text{ chains} / \text{nm}^2$ (表面占有率 30%)と算出され、処理後のファイバーが、図1(b)の右端に示すように、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム(PSSNa)が電界紡糸ファイバー表面から伸びている濃厚ポリマーブラシであることが確認できた。また、その直径は $597 \pm 11 \text{ nm}$ と、わずかに増加した。このようにして作製されたところの、濃厚ポリマーブラシが形成された電界紡糸ファイバーのSEM像を図2(b)に示す。ポリマーブラシを付与方法自体は公知であるのでこれ以上説明しない。必要であれば、例えば非特許文献6を参照されたい。なお、非特許文献7はブラシ構造をシェルにもつコアシェル電界紡糸ファイバーと細胞との相互作用について論じているが、本願のような短繊維化して細胞培養を行うことについては何の開示もない。

20

【0020】

さらに、得られた濃厚ブラシ被覆ファイバーを水とヘキサンの液-液界面に置き、この状態でホモナイザーにより切断した。切断時間と共に長さが短くなり、かつ長さが揃ってくる(標準偏差が小さくなる)ことが確認された。図3(a)に1時間切断後の、また図3(b)に3時間の切断を行った後の電界紡糸ファイバーのSEM像を示す。切断3時間の短繊維化ファイバー(平均長 = $11 \mu\text{m}$ 、標準偏差 $17 \mu\text{m}$)は水中で良く分散することが確認された。この分散性は、親水性PSSNaブラシ(表面組成)と短繊維化(構造)によるものである。ラジカル重合が可能な水溶性高分子電解質となり得るスチレン系、アクリル系のホモポリマーあるいは水溶性を維持できる範囲でのこれらモノマーとの共重合体であれば同様の効果が期待される。

30

【0021】

[短繊維足場材料を使用した細胞組織培養]

上述のようにして作製した短繊維足場材料を使用し、以下のようにしてこの足場材料とヒヨコ角膜実質細胞とから構成された細胞組織を得た。

40

得られた短繊維を消毒用のアルコールを用いて簡易的に滅菌を行った後に、遠心操作によりアルコールを除去し、その後24時間リン酸化緩衝液で十分に洗浄し残存アルコールを除去した。遠心沈降操作の後、クレーベン内において滅菌状態を維持した状態でリン酸化緩衝液を除去し、その後、10%血清を含むEagle MEM培地を加え、さらに2時間ほど分散攪拌することで、短繊維懸濁培地を得た。短繊維が約 $5 \text{ mg} / \text{ml}$ となるように調整した短繊維懸濁培地 3 ml に $100,000$ 細胞/ ml の濃度の細胞分散液 3 ml を加え、十分にピペティングすることにより細胞と短繊維の分散を行った。その後、この混合溶液を細胞培養用シャーレに播種し、炭酸ガスインキュベーター内で37度、4

50

8時間培養を行ない短繊維 - 細胞複合凝集塊を得た。

【0022】

上のようにして得られた短繊維 - 細胞複合凝集塊のSEM像を図4に示す。図4から容易にわかるように、周囲に細胞が付着した多数の短繊維が結合しまた絡み合うことにより、多数の空孔を有して表面から内部までの循環系を提供する経路が形成された短繊維 - 細胞複合凝集塊が得られた。なお、比較のため、図5には、ここで使用された細胞のみが平面状に多数分布した状態のSEM像を示す。

【0023】

図4に示した3次元組織体(細胞 - 短繊維複合凝集塊)に関して内部状態を観察するため、細胞 - 短繊維複合凝集塊をパラフィンで包埋後、定法を用いて厚さ5 μ mの組織切片を連続的に作成し、細胞をヘマトキシリン、エオジン染色で染色した。その組織染色サンプルの位相差顕微鏡写真を図6及び図7に、また通常の光学顕微鏡写真を図8及び図9に示す。図6及び図8は夫々図7及び図9に比べて高倍率で撮影したものである。この結果から、図4で形成が確認された細胞 - 短繊維複合凝集塊では、凝集塊の内部まで細胞が分散しており、これだけ大きな塊の内部においても48時間後において細胞の生着が確認された。

【産業上の利用可能性】

【0024】

以上詳細に説明したように、本発明の短繊維足場材料を用いることにより、細胞を培養して従来に比べて大きな組織を簡単に形成することができるため、医学、薬学、生物学その他の広い分野への応用が期待される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】H. Kobayashi et al., "Nanofiber-based scaffolds for tissue engineering" (World Scientific Publishing Co. Ltd.) 2008, 182.

【非特許文献2】Ikada Y. Tissue engineering: Fundamentals and Applications, ELSEVIER, Ltd, Oxford, UK.

【非特許文献3】J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, D. Farson "Electrospinning for tissue engineering scaffolds", Mat. Sci. Eng. C 2007, 27, 504

【非特許文献4】J. Jo, E. Lee, D. Shin, H. Kim, H. Kim, Y. Koh, J. Jang J. Biomed. Mater. Res. Part B. 2009, 91B, 213.

【非特許文献5】O. Kriha, M. Becker, M. Lehmann, D. Kriha, J. Kriegelstein, M. Yosef, S. Schlecht, R. B. Wehrspohn, J. H. Wendorff, A. Greiner Adv. Mater. 2007, 19, 2483.

【非特許文献6】Tsuji, Y.; Ohno, K.; Yamamoto, S.; Goto, A.; Fukuda, T. Adv. Polym. Sci., 2006, 197, 1. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

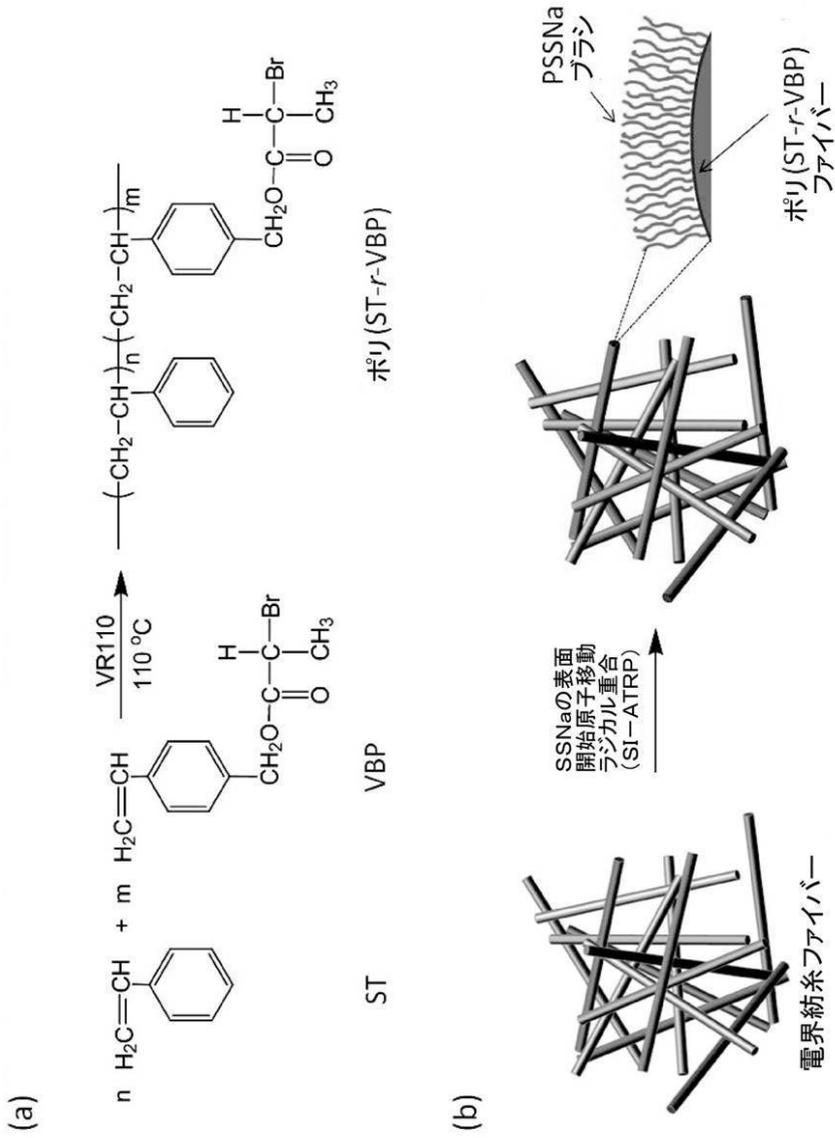
【非特許文献7】X. Y. Sun, R. Shankar, H. G. Borner, T. K. Chosh, R. Spontak Adv. Mater. 2007, 19, 87-91.

10

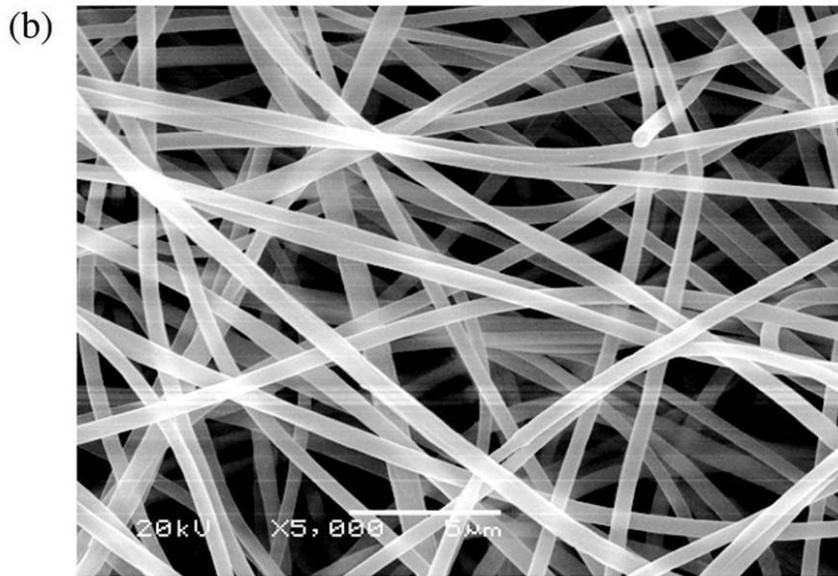
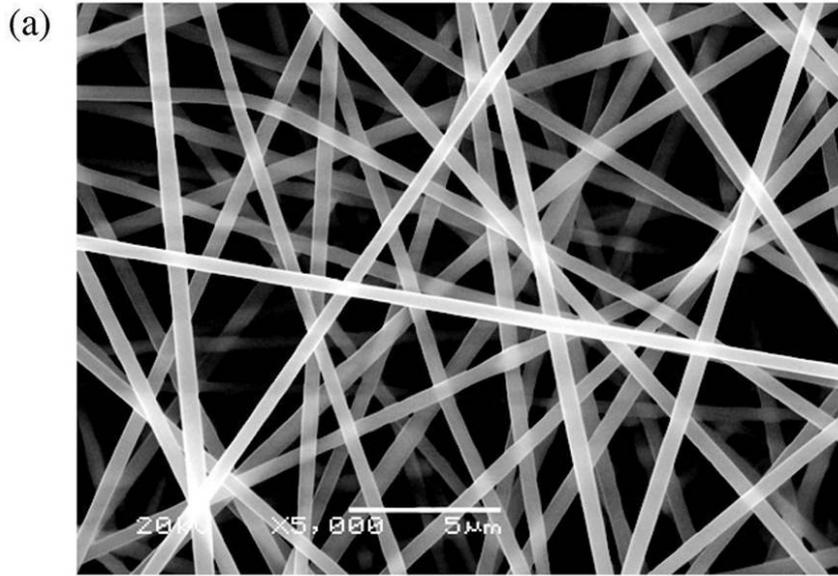
20

30

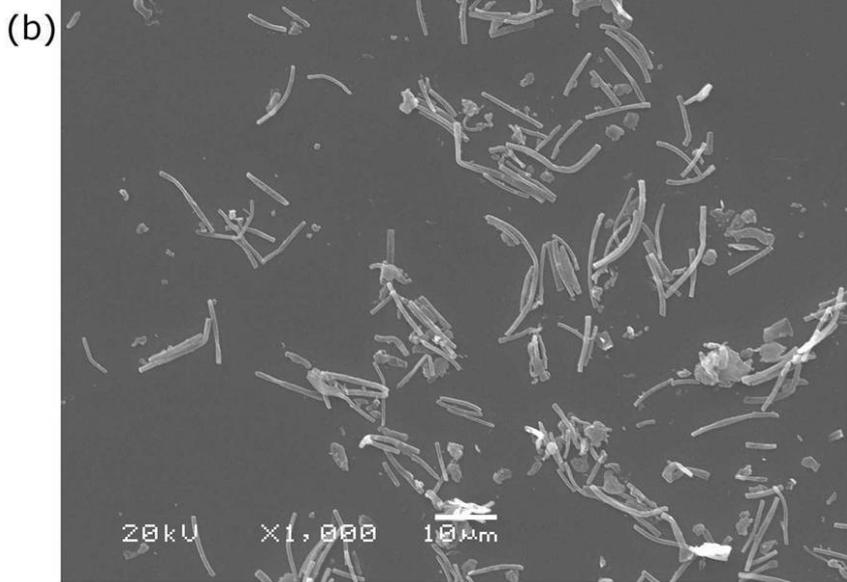
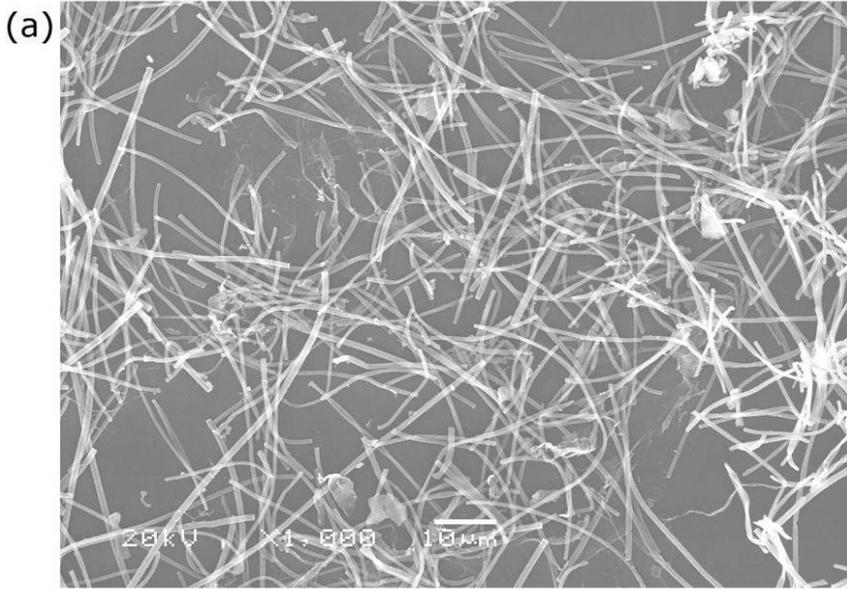
【 図 1 】



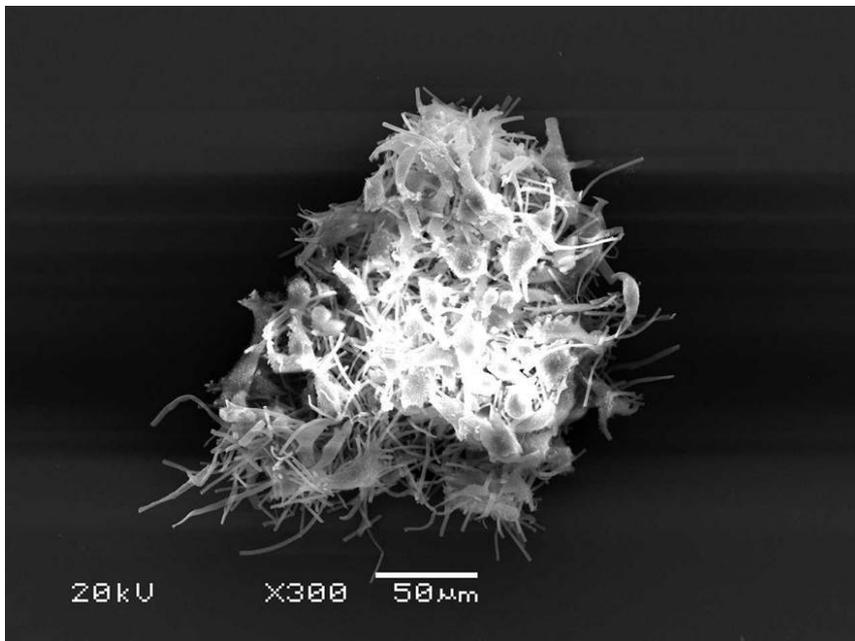
【 図 2 】



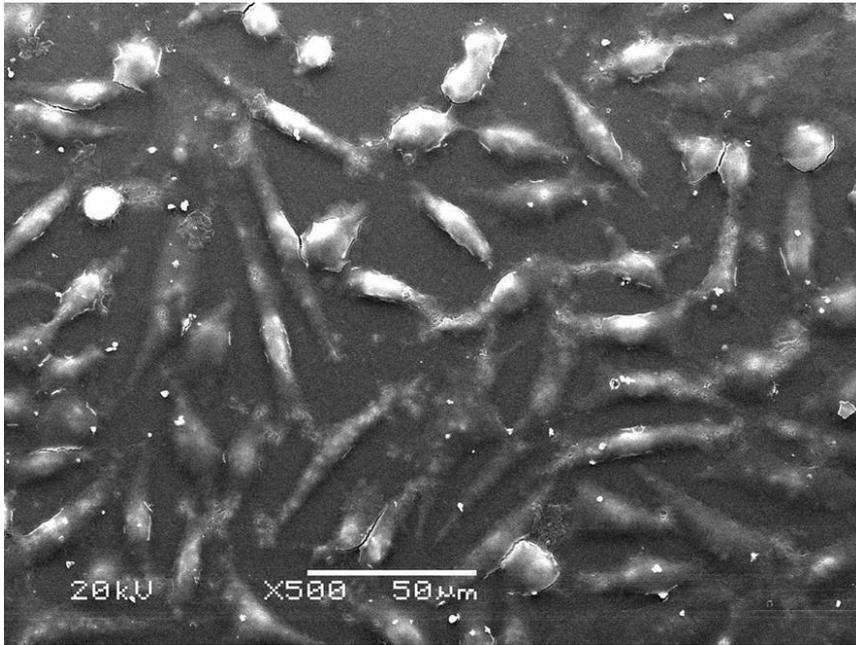
【 図 3 】



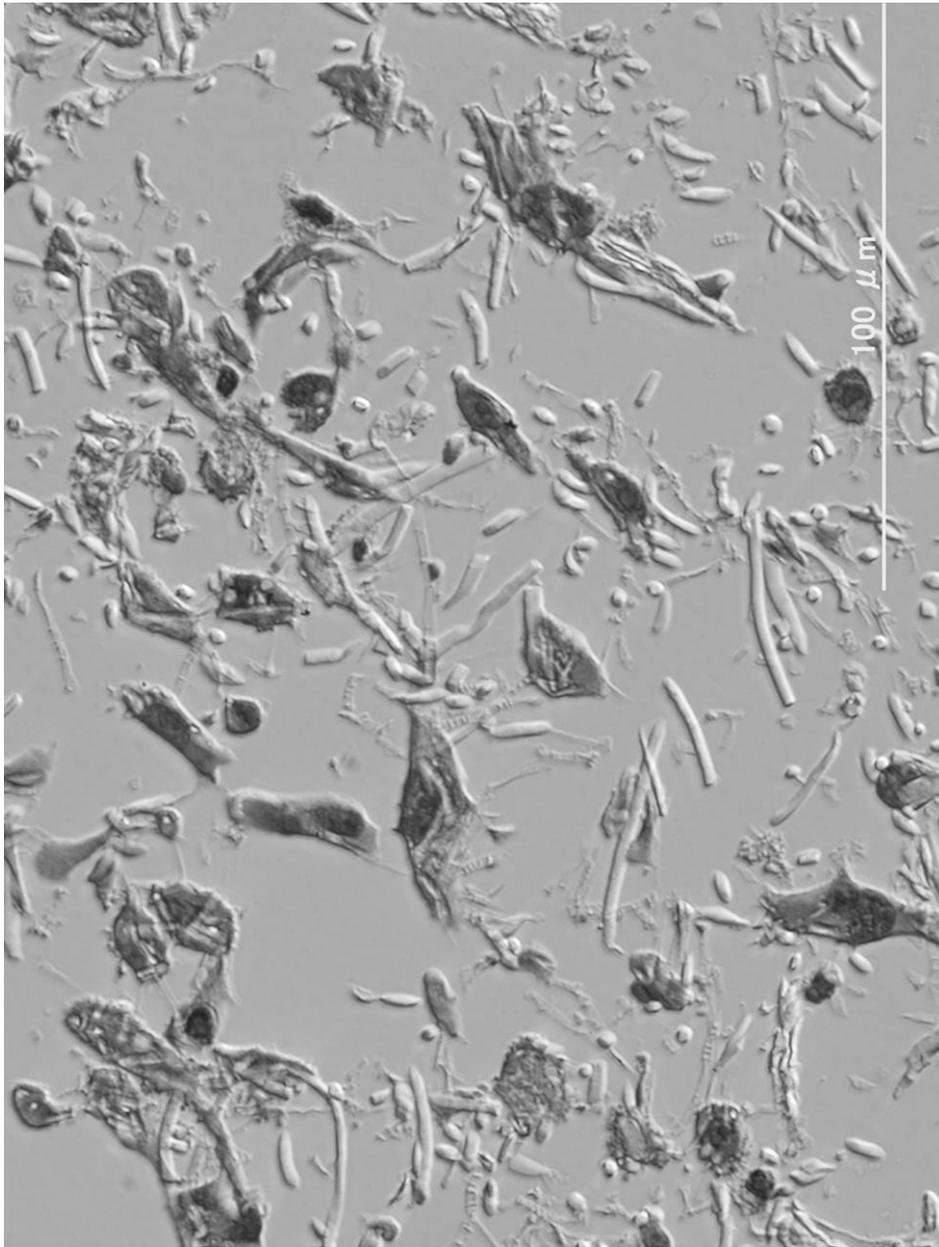
【 図 4 】



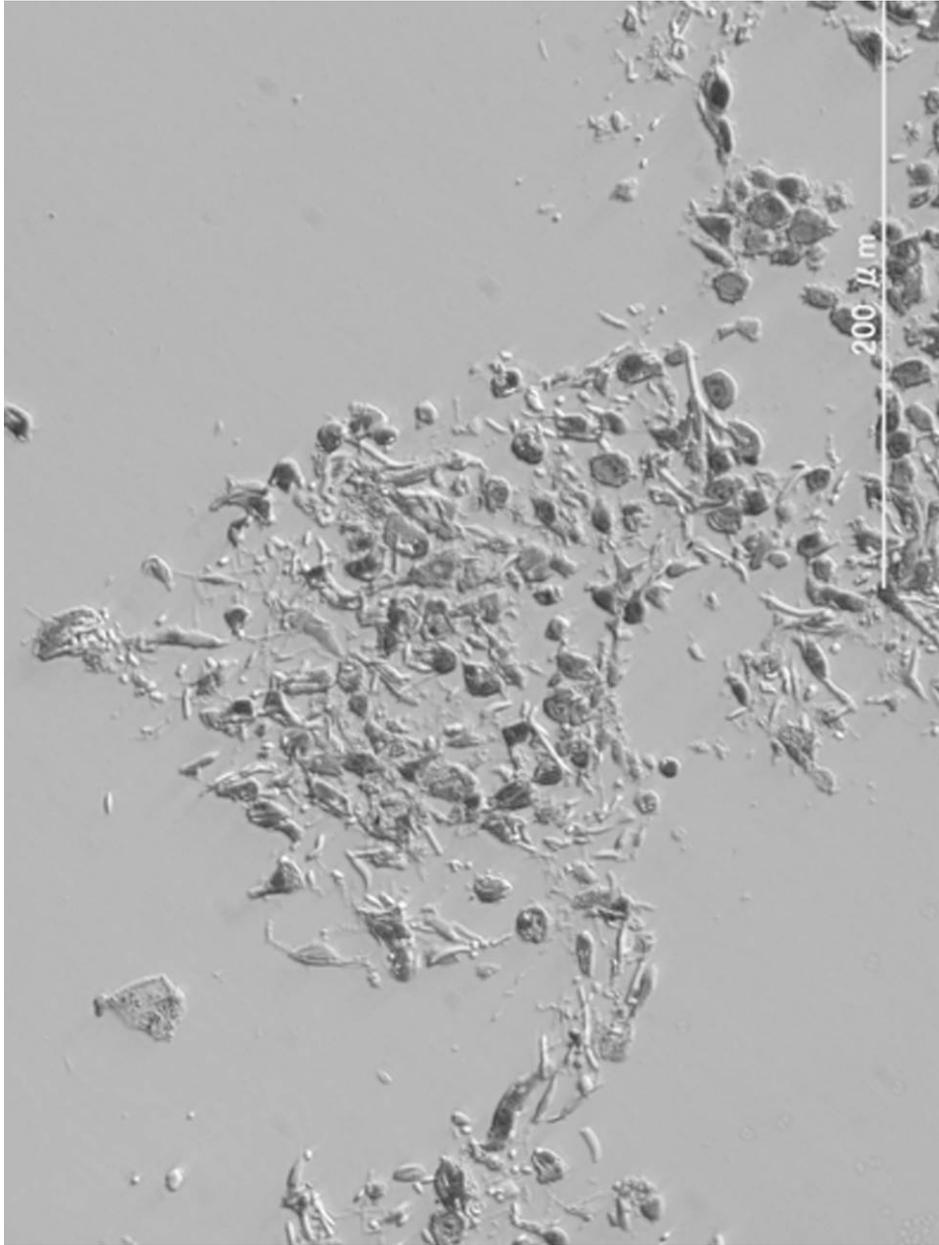
【 図 5 】



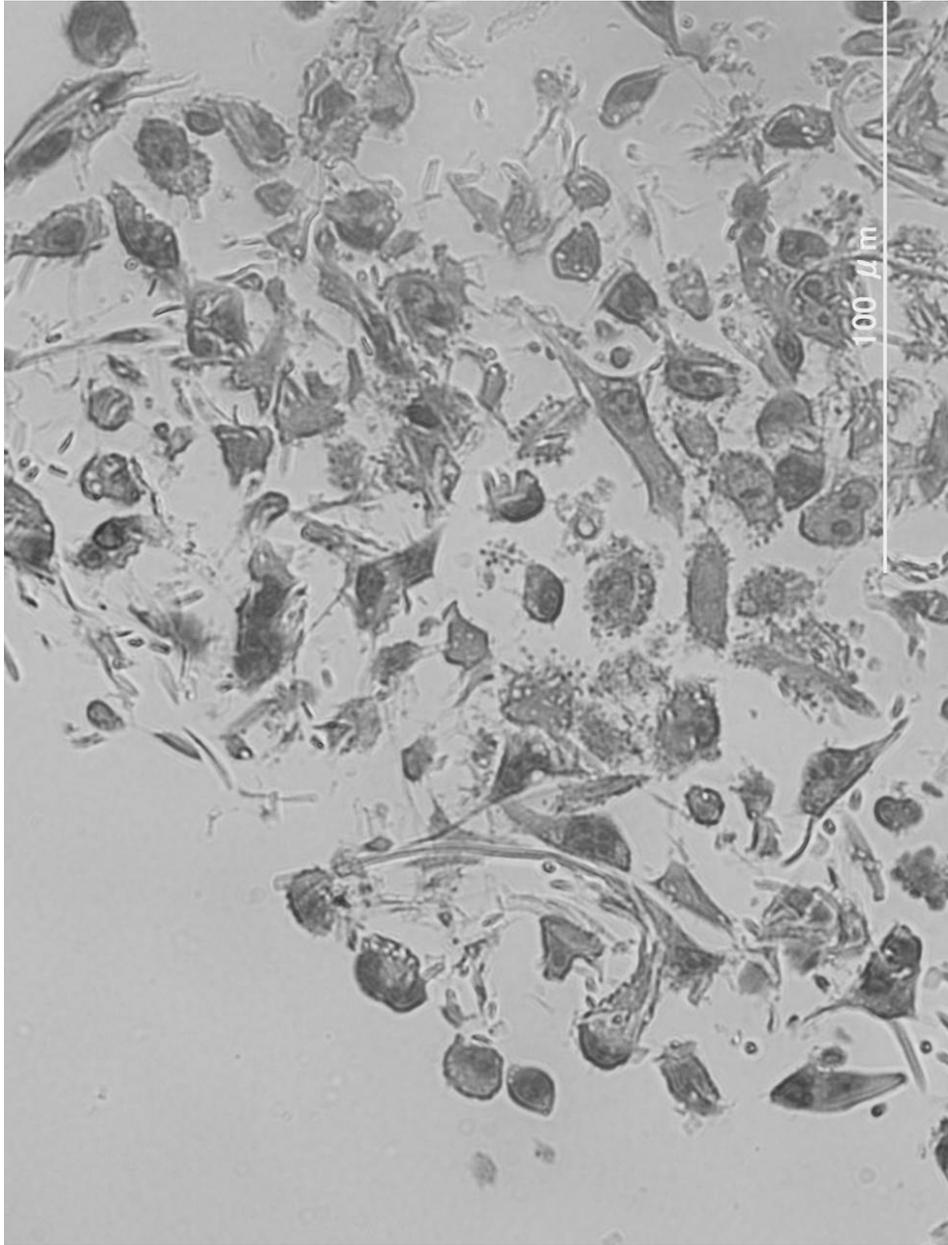
【図 6】



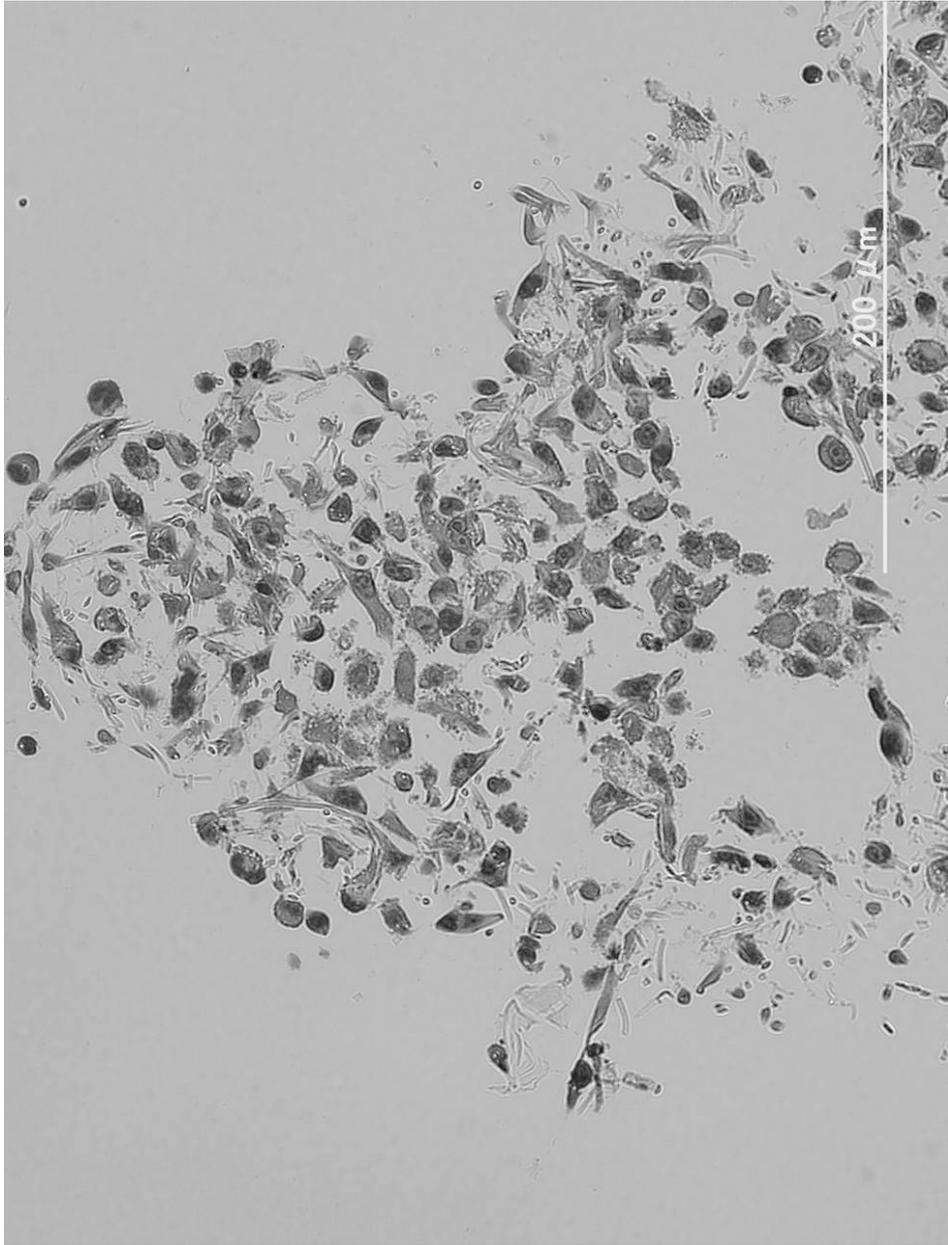
【図7】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特表昭62-500001(JP,A)
特開2007-325543(JP,A)
国際公開第2007/018165(WO,A1)
国際公開第2004/072336(WO,A1)
国際公開第2007/102606(WO,A1)
米国特許出願公開第2010/0179659(US,A1)
特表2007-515210(JP,A)
米国特許出願公開第2010/0028999(US,A1)
特開2011-084739(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 3/00-3/10
C12N 5/00-5/28
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)