

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-520328

(P2016-520328A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/16 (2006.01)	C 1 2 M 1/16	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-518046 (P2016-518046)	(71) 出願人	512047173 エヌエヌエス・ナノ・ファイバー・テクノロジー・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成26年6月6日 (2014.6.6)		
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月7日 (2016.1.7)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/041380		アメリカ合衆国・オハイオ・44236・
(87) 国際公開番号	W02014/197845		ハドソン・ハドソン・インダストリアル・
(87) 国際公開日	平成26年12月11日 (2014.12.11)		パークウェイ・5633
(31) 優先権主張番号	61/832,074	(74) 代理人	100130111 弁理士 新保 育
(32) 優先日	平成25年6月6日 (2013.6.6)	(72) 発明者	チュン イクス アメリカ合衆国、ニュージャージー州 O
(33) 優先権主張国	米国 (US)		8540、プリンストン、シェイディブルック レーン 269

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞または組織培養用の三次元構造

(57) 【要約】

三次元構造を備え、ビーズを有するフィブリルおよび/または粒子を含む細胞または組織培養用の装置と、細胞または組織培養用の装置を製造する新規な方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上のフィブリルおよび1つ以上のビーズを備える
ことを特徴とする三次元構造を備える細胞または組織培養用の装置。

【請求項 2】

前記三次元構造は、開けていて制御可能である
請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記三次元構造は、開口した孔を備えている
請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記フィブリルのサイズは、50 nm から 5,000 nm までの範囲である
請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の装置。

【請求項 5】

少なくとも1つのフィブリルは、オリゴマー、プレポリマー、モノマー、またはポリマ
ー材料からなる
請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6】

前記ポリマー材料は、脂肪族ポリエステル、ポリスチレン、ポリオレフィン、多糖、コ
ラーゲン、ゼラチン、ゼイン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロ
ース、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンイミンポリビニルアルコール、ポリアミド、
またはポリウレタンである
請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

前記脂肪族ポリエステルは、ポリカプロラクトン、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸
塩)、ポリ(ジオキサノン)、ポリヒドロキシアルカノエート、またはその共重合体であ
る
請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】

少なくとも1つのビーズは、細胞毒性のないものである
請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の装置。

【請求項 9】

少なくとも1つのビーズは、有機材料、無機材料、合成材料、または天然材料からなる
請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の装置。

【請求項 10】

少なくとも1つのビーズは、天然材料の粉末からなる
請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】

少なくとも1つのビーズは、キトサン粉末、コラーゲン粉末、ゼラチン粉末、ゼイン粉
末、またはこれらを組み合わせたものからなる
請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

少なくとも1つのビーズは、ガラスビーズ、生物活性分子、増殖因子、分化因子、細胞
接着分子またはタンパク質、医薬小分子、生体巨大分子、または吸収粒子からなるか、こ
れに組み込まれる
請求項 8 に記載の装置。

【請求項 13】

前記増殖因子は、VEGF、コラーゲン、骨形成因子 - 、EGF、PDGF、NGF
、FGF、IGF、またはTGFである
請求項 12 に記載の装置。

10

20

30

40

50

- 【請求項 14】
前記分化因子は、ニューロトロフィン、CSF、またはTGFである
請求項 12 に記載の装置。
- 【請求項 15】
前記細胞接着分子は、免疫グロブリンスーパーファミリーの一種である
請求項 12 に記載の装置。
- 【請求項 16】
前記免疫グロブリンスーパーファミリーのCAMは、インテグリン、カドヘリン、またはセレクチンからなる
請求項 15 に記載の装置。 10
- 【請求項 17】
前記吸収粒子は、ポリアクリルアミド共重合体、エチレン無水マレイン酸共重合体、架橋カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール共重合体、架橋ポリビニルピロリドン、架橋ポリエチレンオキシド、ポリアクリロニトリルの澱粉グラフト共重合体、ポリウレタン、プルロニック、ゼラチン、シリカゲル、架橋デキストラン（セファデックス）、アルギン酸塩、寒天、微生物セルロース、改質粘土、またはその混合物からなる
請求項 12 に記載の装置。
- 【請求項 18】
前記吸収粒子は、液体を吸収するとサイズが大きくなる
請求項 17 に記載の装置。 20
- 【請求項 19】
前記吸収粒子は、前記吸収粒子が液体を吸収すると前記三次元構造の開口した孔のサイズを大きくする能力がある
請求項 18 に記載の装置。
- 【請求項 20】
前記装置は、前記ビーズが飽和すると多孔性が高まる
請求項 12 および 17 ないし 19 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 21】
少なくとも1つのビーズは、細胞拡大、細胞付着、細胞成長、または細胞の分化を促進するために活性してよい
請求項 1 ないし 20 のいずれかに記載の装置。 30
- 【請求項 22】
少なくとも1つのビーズは、前記三次元構造の開口した孔のサイズを大きくする能力がある
請求項 1 ないし 21 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 23】
前記ビーズのサイズは、10 μm よりも大きい
請求項 1 ないし 22 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 24】
前記ビーズは、前記三次元構造を支持または保持する能力がある
請求項 1 ないし 23 のいずれかに記載の装置。 40
- 【請求項 25】
前記ビーズの充填範囲は、0.1% から 70% である
請求項 1 ないし 24 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 26】
前記ビーズの充填範囲は、0.5% から 50% である
請求項 25 に記載の装置。
- 【請求項 27】
前記フィブリルは、プラズマ処理または生体適合性材料で表面処理される
請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載の装置。 50

- 【請求項 28】
前記装置の厚み範囲は、0.5 mm から 20 mm である
請求項 1 ないし 27 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 29】
細胞または細胞の凝集体は、細胞播種後に前記ビーズに付着する
請求項 1 ないし 28 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 30】
前記装置は、神経再生装置用に使用される
請求項 1 ないし 29 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 31】 10
前記装置または前記フィブリルは、静電紡糸、ガスジェット式の紡糸、溶融、または強制的な紡糸工程で製造される
請求項 1 ないし 30 のいずれかに記載の装置。
- 【請求項 32】
請求項 1 ないし 31 のいずれかに記載の細胞または組織培養用の装置を製造する方法であって、
(1) ビーズを含むポリマー溶液を用意するステップ；
(2) 前記ポリマー溶液を紡糸して前記ビーズを有するフィブリルを形成するステップ；
および
(3) 前記ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の前記装置を形成するステップ 20
を含む
ことを特徴とする方法。
- 【請求項 33】
前記ポリマー溶液は、ポリスチレン溶液またはバイオプラスチック溶液である
請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 34】
前記バイオプラスチック溶液は、ポリヒドロキシアルカノエート溶液またはポリ(乳酸)溶液である
請求項 33 に記載の方法。 30
- 【請求項 35】
前記ポリマー溶液は、ポリカプロラクトン溶液である
請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 36】
前記ビーズは、キトサンからなる
請求項 35 に記載の方法。
- 【請求項 37】
請求項 1 ないし 31 のいずれかに記載の細胞または組織培養用の装置を製造する方法であって、
(1) 第1のポリマーの溶液を用意するステップ； 40
(2) 第2のポリマーの溶液を用意するステップ；
(3) 前記第1のポリマーの溶液および前記第2のポリマーの溶液を合わせて紡糸してビーズを有するフィブリルを形成するステップ；および
(4) 前記ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の前記装置を形成するステップ
を含み、
少なくとも前記第1のポリマーの溶液または前記第2のポリマーの溶液は前記ビーズを含む
ことを特徴とする方法。
- 【請求項 38】 50

前記第 1 のポリマーはポリスチレンであり、前記第 2 のポリマー溶液はポリウレタンである

請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

請求項 1 ないし 31 のいずれかに記載の細胞または組織培養用の装置を製造する方法であって、

- (1) ポリマー溶液を用意するステップ；
- (2) 前記ポリマー溶液を紡糸してフィブリルを形成するステップ；
- (3) 前記ポリマー溶液の紡糸過程でビーズを組み込んで、前記ビーズを有するフィブリルを形成するステップ、
- (4) 前記ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の前記装置を形成するステップ

を含む

ことを特徴とする方法。

【請求項 40】

前記ポリマー溶液は、ポリスチレン溶液またはポリカプロラクトン溶液である

請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記ビーズは吸収材からなる

請求項 39 または 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年6月6日に本願された特許文献1に基づく優先権を主張し、その内容を参照することによりその全容を本願に援用する。

【背景技術】

【0002】

細胞または組織培養用の標準装置として二次元のプラスチック皿が数十年にわたって使用されている。しかしながら、このような二次元のプラスチック皿では自然な細胞外マトリクス環境を再現できない。二次元の細胞培養系と比較すると、三次元の細胞培養系で見られる細胞活動および細胞形状の方が *in vivo* の結果に類似している。したがって、特に再生医療および医薬品の研究などの生命科学における最近の発展により、三次元構造の細胞培養装置に対する需要が高まっている。

【0003】

三次元構造を必要とするとされる最新の細胞または組織培養装置は、ほとんどが静電紡糸法によって製造されている。静電紡糸法は、不織布として収集できる繊維を生産できるものである。しかしながら、これらの従来の静電紡糸した繊維質の装置には、細胞または組織培養用に使用するには多くの欠点がある。例えば、静電紡糸した不織布には通常ミクロンサイズの範囲で小孔があり、この小孔は小さすぎるため、細胞が細胞培養装置の中に完全に浸透できない。その上、静電紡糸した不織布は非常に薄いため、そのような細胞培養装置では現実的な三次元環境を提供できない。さらに、静電紡糸した薄い不織布を扱うことは極めて困難である。なぜなら、不織布は、*in vitro* の実験および *in vivo* の実験過程で簡単に折り畳まれてしまうからである。近年、複数の層を重ね合わせて静電紡糸した不織布を薄くするためのいくつかの試行が行われている。しかしながら、その場合は層間剥離が問題となり、この問題を研究者らはこれまで解決していない。これらの欠点を本発明によって克服できる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

20

30

40

50

【特許文献1】米国特許出願第61/832,074号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は全体的に、三次元構造を含み、さらにビーズを有するフィブリルを備える細胞または組織培養装置を提供する。ビーズは、フィブリルの中に全体的または部分的に組み込まれてもよいし、ビーズは、フィブリルの表面上に/表面に化学的または物理的に付着してもよいし、あるいはビーズは、フィブリルどうしの間の空間に分散していてもよい。本発明によって提供される装置は、吸収性または非吸収性のいずれかであってよい。

【0006】

本明細書で使用したように、「ビーズ」という用語は、「粒子」という用語と入れ替え可能であってよい。

【0007】

いくつかの実施形態では、本発明の装置に含まれる三次元構造は、制御可能で開けた（密閉されていない）細胞培養系を提供する。例えば、三次元構造は、毛羽立っていてよく、開口した大きな孔を含んでいてよい。

【0008】

いくつかの実施形態では、本発明の装置に含まれるフィブリルは、その化学組成または物理的特性のいずれかの点で、互いに同じであっても異なってもよい。同じく、本発明の装置に含まれるビーズは、その化学組成または物理的特性（例えば水親和性、機械的強度、生物分解性、分子重量、またはサイズ）のいずれかの点で、同じであっても異なってもよい。

【0009】

いくつかの実施形態では、本発明の装置に含まれるフィブリルは、生体適合性材料または生分解性材料からなる。いくつかの他の実施形態では、フィブリルは、生体ポリマーである。いくつかの実施形態では、フィブリルは、合成ポリマー、またはコラーゲン、ゼラチン、キトサン、およびゼインなどの天然ポリマーであってよい。

【0010】

いくつかの他の実施形態では、フィブリルは、オリゴマー、プレポリマー、またはモノマーである。いくつかの実施形態では、フィブリルは、ポリスチレン、ポリオレフィン、多糖類、コラーゲン、ゼラチン、ゼイン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンイミンポリビニルアルコール、ポリアミド、またはポリウレタンなどのポリマー材料である。いくつかの実施形態では、フィブリルは、脂肪族ポリエステルであってよい。適切な脂肪族ポリエステルの例には、ポリカプロラクトン（例えばポリ（ ϵ -カプロラクトン））、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸塩）、ポリ（ジオキサノン）、ポリヒドロキシアルカノエートおよびその共重合体などがある。これらの脂肪族ポリエステルは、米国食品医薬品局（FDA）が承認しているいくつかの合成ポリマーに含まれ、術用縫合糸やいくつかの移植装置など、ヒトに対する特定の臨床用途向けのものである。1つの実施形態では、本発明の装置に含まれるフィブリルは、*in vivo*でのヒトへの応用に適した脂肪族ポリエステルから製作または製造される。

【0011】

いくつかの実施形態では、フィブリルはナノ繊維である。いくつかの他の実施形態では、フィブリルは、物理的処理、化学的処理、プラズマ処理などの生物学的処理で表面処理されたもの、あるいは生体適合性材料を有するものである。

【0012】

いくつかの実施形態では、本発明の装置内のビーズは、（1）細胞の基盤；（2）増殖因子、分化因子、医薬小分子、生体巨大分子、または細胞接着分子などの生物活性成分に対する貯蔵領域または貯蔵空間；（3）装置が飽和した際に装置の三次元構造を保持する支持体；および/または（4）ビーズが膨張した際に孔を開けるものであってよい。例え

10

20

30

40

50

ば、ビーズは、細胞拡大、細胞付着、細胞成長、細胞の分化を促進するために活性してい
てよい。

【0013】

本発明の装置に含まれるビーズは、細胞毒性のないものであってよい。いくつかの実施
形態では、ビーズは、有機材料、無機材料、合成材料、または天然材料からなる。例えば
、ビーズは、全体的または部分的に、ガラス、生物活性分子、増殖因子、分化因子、（1
つまたは複数の）細胞接着分子、（1つまたは複数の）医薬小分子、（1つまたは複数の
）生体巨大分子、または（1つまたは複数の）吸収粒子などの材料から作製されてよい。
このようにする代わりに、ビーズは、生物活性分子、増殖因子、分化因子、細胞接着分子
またはタンパク質、医薬小分子または吸収粒子に組み込まれていてよい/で構成されてよ
い。例えば、ビーズ形状にした生物活性分子、増殖因子、分化因子、細胞接着分子/タン
パク質、医薬小分子、または吸収粒子を、紡糸工程で組み込むことができる。

10

【0014】

いくつかの他の実施形態では、ビーズは、コラーゲン、ゼラチン、キトサン、またはゼ
インなどの天然材料の粉末または球体からなる。このような天然材料の源は、ヒト、動物
、または植物であってよい。

【0015】

ビーズに含めるのに適している生物活性分子の例には、増殖因子、分化因子、繊維性タ
ンパク質、および接着タンパク質などがあるが、これに限定されない。増殖因子の例には
、血管内皮増殖因子（VEGF）、コラーゲン、骨形成因子、上皮細胞増殖因子（E
GF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、神経成長因子（NGF）、線維芽細胞増殖因
子（FGF）、インスリン様成長因子（IGF）、およびトランスフォーミング増殖因子
（TGF）などがある。分化因子の例には、ニューロトロフィン、コロニー刺激因子（C
SF）、およびトランスフォーミング増殖因子（TGF）などがある。細胞接着分子の例
には、IgSF CAMなどの免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリの一種であるイン
テグリン、カドヘリン、およびセレクチンなどがある。

20

【0016】

（1つまたは複数の）吸収粒子（AP）は、液体（例えば水）を吸収して保持できる。
APは水を吸収すると膨張してそのサイズが大きくなる。膨張したAPは、液体で飽和す
ると、本発明の装置内の孔を広げ、装置の全体的な多孔性は高まる。孔のサイズおよび装
置の全体的な多孔性は、装置に含まれるAPの量またはAPのサイズによっても制御でき
る。

30

【0017】

APは、ポリアクリルアミド共重合体、エチレン無水マレイン酸共重合体、架橋カルボ
キシメチルセルロース、ポリビニルアルコール共重合体、架橋ポリビニルピロリドン、架
橋ポリエチレンオキシド、ポリアクリロニトリルの澱粉グラフト共重合体、ポリウレタン
、プルロニック、ゼラチン、シリカゲル、架橋デキストラン（セファデックス）、アルギ
ン酸塩、寒天、微生物セルロース、改質粘土、またはその混合物などの材料で全体的また
は部分的に作製されるか、これらで構成されてよい。

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明の装置は、毛羽立った厚い不織布であり、制御可能な
ビーズ構造を備えている。このような装置は、大きく開口した孔を含んでいてよい。いく
つかの他の実施形態では、このような装置は、厚みの範囲が約0.5mmから約20mm
であってよく、よってビーズのサイズは、10μmより大きくてよい。

40

【0019】

いくつかの他の実施形態では、本発明の装置の三次元構造は、少なくとも1つの表面を
有する基板をさらに備え、ビーズを有する1つ以上のフィブリルをこの基板の表面上に載
置できる。表面は、載置したフィブリルおよび/またはビーズに対する構造支持体であっ
てよい。例えば、基板は、フィルムまたは培養容器であってよい。いくつかの実施形態で
は、基板は、ガラス、金属、またはプラスチック（例えば細胞毒性のないプラスチック）

50

からなる。

【0020】

本発明の装置は、*in vitro*の細胞または組織培養、特に多くの細胞拡大を必要とする細胞培養に使用できるものである。細胞懸濁液が装置に投与されると、細胞の凝集体はビーズに容易に付着できる。細胞は、装置の中に浸透して難なく増殖できる。細胞は、装置の種類に応じてランダムにまたは規則的に拡大できる。いくつかの実施形態では、本発明の装置は、一列に並んだ繊維を含み、これによって細胞はその一列に並んだ繊維に沿って浸透できる。

【0021】

具体的な例として、本発明の装置を神経再生装置として、または神経再生装置用に使用できる。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、本発明の装置または同装置に含まれるフィブリルは、溶融紡糸、電界紡糸、ガスジェット式の紡糸（NGJ）、溶融、または適切なポリマーの強制的な紡糸を含む紡糸工程などの先行技術で公知の多様な方法に従って製作されてよい。好ましくは本発明の装置は、静電紡糸工程で生産される。

【0023】

静電紡糸およびNGJ技術により、有機溶媒と水性溶媒との両方からポリマーを処理することが可能になる。さらに、本発明に基づき、これらの技術により、分散粒子および/または繊維を形成しない可溶性の添加剤を、紡糸/ガスジェット流を介して得られた繊維の中に組み込み、分散（均一分散と不均一分散との両方）させ、かつ/または局所分散させることが可能になる。したがって、1つ以上のビーズを、本発明の細胞培養装置を形成するために使用するフィブリルの中および/または上に組み込むことができる。

20

【0024】

もう1つの態様では、本発明は、紡糸（例えば静電紡糸）法によって前述した本発明の装置を製造する方法を提供する。例えば、本発明の装置は、ビーズを含むポリマー溶液を紡糸して生産されてよい。このようにする代わりに、装置は、紡糸工程で既に形成された（紡糸された）繊維の中にビーズを組み込んで生産されてもよい。

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明の装置を製造する方法は、（1）ビーズを含むポリマー溶液を用意するステップ；（2）ポリマー溶液を紡糸してビーズを有するフィブリルを形成するステップ；（3）ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の装置を形成するステップを含んでいてよい。例えば、ポリマー溶液は、ポリスチレン溶液、ポリヒドロキシアルカノエート溶液（PHA）などのバイオプラスチック溶液、ポリ（乳酸）（PLA）溶液である。もう1つの例として、ポリマー溶液はポリカプロラクトン溶液であり、ビーズはキトサン粒子で構成されてよい。

30

【0026】

いくつかの他の実施形態では、本発明の装置を製造する方法は、（1）第1のポリマー溶液を用意するステップ；（2）第2のポリマー溶液を用意するステップ；（3）第1のポリマーの溶液および第2のポリマーの溶液を合わせて紡糸してビーズを有するフィブリルを形成するステップ；（4）ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の装置を形成するステップを含んでいてよく、少なくとも第1のポリマー溶液または第2のポリマー溶液は、ビーズを含む。例えば、第1のポリマー溶液はポリスチレン溶液であり、第2のポリマー溶液はポリウレタン溶液である。

40

【0027】

いくつかの他の実施形態では、本発明の装置を製造する方法は、（1）ポリマー溶液を用意するステップ；（2）ポリマー溶液を紡糸するステップ；（3）ポリマー溶液の紡糸過程でビーズを組み込んで、ビーズを有するフィブリルを形成するステップ；（4）ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の装置を形成するステップを含んでいてよい。例えば、ポリマー溶液はポリスチレン溶液であり、ビーズは吸収粒子である。

50

【0028】

引き続きいくつかの他の実施形態では、本発明の装置を製造する方法は、(1)ポリマー溶液を用意するステップ；(2)ポリマー溶液を紡糸するステップ；(3)ポリマー溶液の紡糸過程でビーズを組み込んで、ビーズを有するフィブリルを形成するステップ；(4)ビーズを有するフィブリルを用いて細胞または組織培養用の装置を形成するステップを含んでよい。例えば、ポリマー溶液はポリカプロラクトン溶液であり、ビーズは吸収粒子である。

【0029】

さらに、本発明は、本明細書に記載した装置を用いて細胞を培養する方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法は、フィブリルおよびビーズをさらに備える三次元構造を含む装置と細胞を(例えば細胞懸濁液の形態で)接触させるステップを含む。いくつかの他の実施形態では、本方法は、本発明の装置を生物細胞の近傍に配置してその細胞を装置の中または上で増殖させるステップを含む。

10

【0030】

本明細書で使用したように、「ビーズ(beadまたはbeads)」という用語は、「粒子(particleまたはparticles)」という用語と入れ替え可能であってよい。ビーズは一般に、球状または楕円形であってよいが、あるいは不規則な形状であってよい粒子またはマイクロ粒子を指す。ビーズは、サイズ範囲が広くてよい(例えば10 μ mよりも大きいサイズ)。ビーズは、有機材料、無機材料、合成材料、または天然材料であってよい。例えば、ビーズは、天然材料の粉末(例えばコラーゲン粉末、ゼラチン粉末、キトサン粉末、ゼイン粉末)からなるものであってよい。ビーズは、1つ以上の材料からなるものであってよく、それには、ガラスビーズ、生物活性分子、増殖因子、分化因子、細胞接着分子またはタンパク質、医薬小分子および吸収粒子などがあるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ビーズは、表面処理されているか、その表面に官能基を有する。いくつかの実施形態では、装置へのビーズの充填は、0.1%~70%の範囲内である。好ましくは、充填は、0.5%から50%の範囲内である。

20

【0031】

本明細書で使用したように、「生体適合性材料」という用語は、生物機能への毒性または有害作用が一切ない任意の物質である。

【0032】

本明細書で使用したように、本明細書の「生体ポリマー」という用語は、ペプチド、タンパク質、核酸またはウイルス粒子-未加工のものも生物学的または合成して修正されたものも-を意味し、断片、多量体、凝集体、複合体、融合産物などもこれに含まれる。

30

【0033】

本明細書で使用したように、「合成ポリマー」という用語は、ポリマーが自然に生じる生体材料で作製されているとしても自然界では発見されないポリマーを指す。「天然ポリマー」という用語は、自然に生じるポリマーを指す。

【0034】

本明細書で使用したように、「ガラスビーズ」という用語は、球状または不規則な形状をしたガラスを作製するための先行技術で公知の方法で生産された粒子を指す。ガラスビーズは、先行技術で公知の任意数の酸化物の化合物で作製されてよい。通常ガラスは、シリコン酸化物を少なくとも約50%必要とする。

40

【0035】

本明細書で使用したように、「生物活性分子」という用語は、細胞または組織へ作用する分子を意味する。本発明に有益な生物活性分子には、増殖因子、分化因子、繊維性タンパク質、および/または接着タンパク質などがあるが、これに限定されない。

【0036】

本明細書で使用したように、「増殖因子」という用語は、細胞または組織の増殖を促進する分子を意味する。好ましくは、増殖因子は、VEGF、コラーゲン、骨形成因子-EGF、PDGF、NGF、FGF、IGF、またはTGFである。

50

【0037】

本明細書で使用したように、「分化因子」という用語は、細胞の分化を促進する分子を意味する。好ましくは、分化因子は、ニューロトロフィン、CSF、またはTGFである。

【0038】

本明細書で使用したように、「接着分子またはタンパク質」あるいは「細胞接着分子またはタンパク質」という用語は、細胞のビーズおよび/またはフィブリルへの付着を促進する分子またはタンパク質を意味する。好ましくは、細胞接着分子は、Ig（免疫グロブリン）スーパーファミリの一種である。例えばIgSFCAMには、インテグリン、カドヘリン、およびセレクチンなどがある。

10

【0039】

本明細書で使用したように、「吸収粒子」という用語は、吸収材から作製される材料を意味し、吸収材は、水を吸収する能力があり水膨潤性で水不溶性の有機材料または無機材料である。例えば、吸収ポリマーには、ポリアクリルアミド共重合体、エチレン無水マレイン酸共重合体、架橋カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール共重合体、架橋ポリビニルピロリドン、架橋ポリエチレンオキシド、ポリアクリロニトリルの澱粉グラフト共重合体、ポリウレタン、プルロニック、ゼラチン、シリカゲル、架橋デキストラン（セファデックス）、アルギン酸塩、寒天、微生物セルロース、改質粘土などがあるが、これに限定されない。

【0040】

本明細書で使用したように、「フィブリル」という用語は、断面または直径が小さく（例えば50nmから20,000nmまたは50nmから5,000nm）細長い構造体を指す。フィブリルは、相溶性および/または生物分解性であってよい。さらに、フィブリルは、表面処理されてよい。

20

【0041】

1つの実施形態では、本発明で使用され、かつ/または本発明に含まれる繊維および/またはナノ繊維の直径の範囲は、約50ナノメートルから約5,000ナノメートルである。もう1つの実施形態では、本発明で用いる繊維は、直径が約3ナノメートルから約5,000ナノメートル、または約10ナノメートルから約5,000ナノメートル、またはさらに約50ナノメートルから約5,000ナノメートルの範囲内である静電紡糸繊維である。ここでもまた、明細書および請求項のいずれかの箇所に記載したように、個別に記載した様々な範囲の制限を組み合わせることで新たな範囲を形成してよい。

30

【0042】

本明細書で使用したように、「または（or）」という用語は、「および（and）」も「または（or）」も両方含むという意味である。

【0043】

本明細書で使用したように、「1つの（aまたはan）」という用語は、複数という意味および「任意の」という意味を含むことを意味してよい。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】フィブリルおよびビーズを含む本発明の装置の画像

【図2】ビーズを含むポリマー溶液を紡糸して生産した本発明の装置の概略上面図

【図3】ポリマー溶液の紡糸過程でビーズを散在させて生産した本発明の装置の概略上面図

【図4】細胞播種後の本発明の装置の概略上面図。装置は、ビーズを含むポリマー溶液を紡糸して生産される。

【図5】細胞播種後の本発明の装置の概略断面図。装置は、ビーズを含むポリマー溶液を紡糸して生産される。

【図6】本発明の装置の画像。装置は、1%のキトサン粒子を含むポリカプロラクトン溶液を紡糸して生産される。

40

50

【図 7】図 6 の装置の断面図

【図 8】本発明の装置の画像。装置は、3%のキトサン粒子を含むポリカプロラクトン溶液を紡糸して生産される。

【図 9】図 8 の装置の断面図

【図 10】キトサン粒子のないポリカプロラクトン溶液を紡糸して生産した対照装置の画像

【図 11】図 10 の装置の断面図

【図 12】(a) 図 6 の装置で細胞が拡大する画像。(b) 図 8 の装置で細胞が拡大する画像。(c) 図 10 の装置で細胞が拡大する画像

【図 13】図 6、図 8、および図 10 の装置で細胞が拡大するアスペクト比を示すグラフ

10

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明の1つの態様は、*in vitro*で細胞または組織を培養するための装置に関する。各装置は、三次元構造を備え、ビーズおよび/または粒子を含むフィブリルをさらに備える。

【0046】

装置の主要構成要素として、三次元構造が開けていて制御可能になるようにビーズは装置の構造を支持する能力があり、装置は毛羽立っていて薄い。細胞または細胞の凝集体は、ビーズのサイズが原因で細胞播種後にビーズに付着でき、その後、装置が厚くても(例えば毛羽立った構造内部にある開口した大きな孔を通して)装置の中に浸透して難なく増殖できる。細胞は、装置の種類に応じてランダムにまたは規則的に拡大できる。

20

【0047】

いくつかの実施形態では、ビーズは、細胞拡大、細胞接着、細胞成長、および/または細胞の分化を促進するために活性であってよい。例えばビーズは、生物活性分子、増殖因子、分化因子、細胞接着分子、医薬小分子、または生体巨大分子からなるものでもよいし、これらに組み込まれていてもよい。

【0048】

いくつかの他の実施形態では、ビーズを使用して、装置が飽和した際に装置の三次元構造を支持または保持し、かつ/またはビーズが膨張した際に孔を開くことができる。例えば、ビーズは吸収性粒子であってよく、この吸収性粒子は、液体を吸収して保持すると同時にビーズのサイズを大きくする能力がある。その結果、膨張したビーズによって装置の孔が広がり、装置の全体的な多孔性はビーズが飽和すると高まる。孔のサイズおよび装置の全体的な多孔性は、吸収性粒子の量またはサイズによって制御できる。

30

【0049】

本発明のもう1つの態様は、細胞または組織培養用の装置を製造する新規な方法を提供する。以下の図面および例に示したように、本発明の装置は、ビーズを含むポリマー溶液を紡糸するか、紡糸工程でビーズをフィブリルに組み込んで製造できるものである。

【0050】

図 1 は、フィブリルおよびビーズを含む装置 10 の例示的画像を示している。ビーズがあることにより、装置 10 (例えば不織布) は、毛羽立っていて厚く、その三次元構造内に大きく開口した孔を含んでいる。図 1 の実施形態は、球状構造を示しているが、装置はこれ以外の任意の種類 of 三次元構造であってよい。

40

【0051】

図 2 は、本発明の装置の上面図である。装置は、フィブリル 20 およびビーズ 30 を含み、ビーズ 30 を含むポリマー溶液を紡糸して製造される。本明細書で示したように、ビーズ 30 は毛羽立った三次元構造を支持する能力があるため、装置は大きく開口した孔を有する。前述したように、ビーズは活性していもよいし、あるいは吸収材(またはビーズの粒子)を含んでいてもよい。

【0052】

図 3 は、本発明のもう1つの装置の上面図である。この装置は、フィブリル 20 および

50

ビーズ40を含み、ビーズ40はポリマー溶液の紡糸工程で組み込まれる。

【0053】

図4は、本発明の装置の上面図であり、フィブリル20およびビーズ50を含んでいる。装置は、ビーズ50を含むポリマー溶液を紡糸して生産される。本明細書で示したように、細胞播種後（例えば細胞懸濁液を装置に投与した後）、細胞の凝集体は、ビーズおよび/または粒子に付着する。

【0054】

図5は、播種後の本発明の装置の断面図である。フィブリル20およびビーズ60を備える装置は、ビーズ60を含むポリマー溶液を紡糸して製造される。播種後、細胞はビーズ60に付着でき、その後、（例えば装置内の開口した空間または孔を通して）装置の中に浸透して難なく増殖できる。細胞は、装置の種類に応じてランダムにまたは規則的に拡大できる。

10

【0055】

以下の実施例を参照して本発明を例示的にさらに説明できる。

【0056】

実施例

本発明の吸収性ポリマー装置を、ビーズを有するポリカプロラクトン（PCL）溶液を紡糸して生産する。具体的には、25重量%のPCL溶液を用意し、アセトンを添加して懸濁液を形成した。米国標準篩を用いてサイズが75から150ミクロンのキトサン粒子を用意した。その後、懸濁液にキトサン粒子を添加した。様々な量のキトサン粒子を使用している。添加するキトサン粒子の割合を以下の表1に詳細に示している。得られた溶液をその後、本発明の装置の達成に応じて紡糸（例えば静電紡糸）できる。

20

【0057】

【表1】

装置	PCL懸濁液に対するキトサン粒子の割合
試料A	1%
試料B	3%
試料C（対照）	（0%）

30

【0058】

図6から図11は、装置の試料A、試料B、および試料Cを走査型電子顕微鏡（SEM）で見た画像を示している。図6に示したように、試料Aは、フィブリル（すなわちPCL）および1%のビーズ（すなわちキトサン粒子）を含む。図7は、フィブリル（すなわちPCL）および1%のビーズ（すなわちキトサン粒子）の断面図である。図8は、試料Bがフィブリル（すなわちPCL）および3%のビーズ（すなわちキトサン粒子）を含んでいることを示している。図9は、フィブリル（すなわちPCL）および3%のビーズ（すなわちキトサン粒子）の断面図である。対照として、図10の試料Cはフィブリル（すなわちPCL）のみを含み、ビーズは一切ない。図11は、対照の断面図である。

40

【0059】

細胞培養

試料A、試料B、および試料Cを細胞培養用に使用した。A10平滑筋細胞（SMC）を使用し、細胞培養培地はダルベッコ改変イーグル培地（DMEMであり、10%のウシ胎児血清（FBS）、1%のペニシリン/ストレプトマイシン（10,000u/mlのペニシリン、10,000μg/mlのストレプトマイシン）、および1mMのピルビン酸ナトリウムを添加した高グルコース（4.5g/L）であった。細胞は、標準の細胞培

50

養条件（37°C、CO₂が5%、湿度95%）で培養し、日毎に新鮮な培地を用意した。細胞は、全試料に播種するのに十分な細胞を得るために培養で増殖させた。試料A、試料B、および試料Cを小サイズ（1cm²）に切断し、24ウェルのプレートの中に配置し、エチレンオキシド滅菌を用いて滅菌した。次に、このような試料を1mlの培地に浸漬させ、細胞播種の1日前に血清蛋白質を材料に付着させるために標準の細胞培養条件で培養した。培地は、播種直前に吸引した。細胞播種するために、細胞をトリプシン処理し、遠心分離機にかけてペレットを得て、培地で再度懸濁した。24ウェルのプレートのウェル全体にわたっておよそ28,500の細胞に播種した（15,000細胞/cm²）。

【0060】

3日目に、細胞のアスペクト比を用いて細胞拡大を計算した。大きいアスペクト比は試料全体にわたって大きく細胞が拡大したことを指し、小さいアスペクト比は細胞が同一方向に拡大していることを指す。拡大画像を得るため、DAPI（345/455nmの励起/発光、細胞核）、FITC（接着斑）、およびTRITC（細胞骨格）のチャンネルを用いて40倍の倍率で試料を画像化した。図12（a）、図12（b）、および図12（c）は、試料A、試料B、および試料Cのそれぞれに対する例示的な細胞拡大画像を提供している（スケールバーは20ミクロン）。各標本に対して30枚の画像を取得し、細胞を伸ばした最長の長さを測定し、それを核全体にわたる細胞の端から端までの最短距離で除算して計算して、アスペクト比に対してImage Jを用いて分析した。30枚の画像に対する各標本の平均アスペクト比を用いて、別の標本の端から端までを試料の平均に対して平均化した。図13は、試料A、試料B、および試料Cのアスペクト比を示している。これらの試料のうち、PCLフィブリルおよび1%のキトサン粒子を含む試料Aはアスペクト比が最大である（ほぼ6.0）。PCLフィブリルおよび3%のキトサン粒子を含む試料Bはアスペクト比が約5.5である。対照（試料C）はキトサン粒子を含まず、アスペクト比が最小である（約4.5）。

【0061】

このように、異なるフィブリルおよび/またはビーズ（例えば試料Aと試料B）を含む本発明の装置は、細胞培養に対して細胞の挙動（例えば細胞拡大）が異なる結果になることがあることもわかる。そのため、本発明の特定の利点は、さらに多くの細胞拡大を必要とする細胞培養に使用すべきものである。例えば、本発明の装置を神経再生装置として、または神経再生装置用に使用できる。

【0062】

本明細書では本発明の特定の実施形態を説明してきたが、本発明の精神を逸脱しない限り、何らかの修正および変更を加えてよいことは当業者に理解される。上記の実施例および説明は、本発明の範囲を限定しない。さらに、本発明は、その同じ目的を達成することを計算された何らかの編成、および添付の特許請求の範囲に収まるあらゆるそのような変形例および修正を含む。

【0063】

上記で言及した全文献は、参照することによりその全容を本願に援用する。本明細書で開示した特徴はすべて（任意の添付の請求項、要約書および図面を含む）、特に別途明記しない限り、同一、同等、または同様の目的を果たす別の特徴に入れ替えられてよい。そのため、特に別途明記しない限り、開示したそれぞれの特徴は、包括的な一連の同等または同様の特徴のうちの一例である。

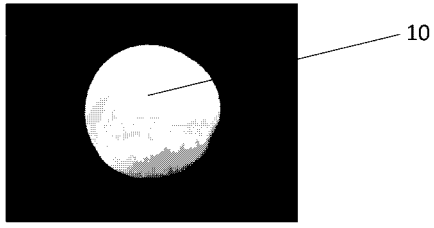
10

20

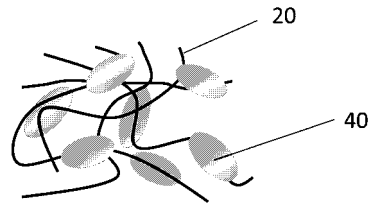
30

40

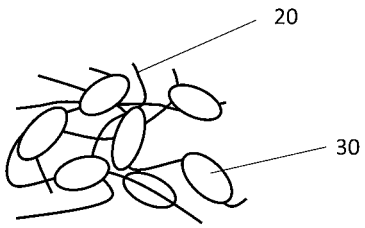
【 図 1 】



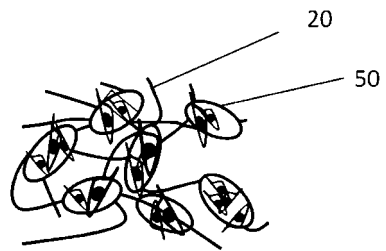
【 図 3 】



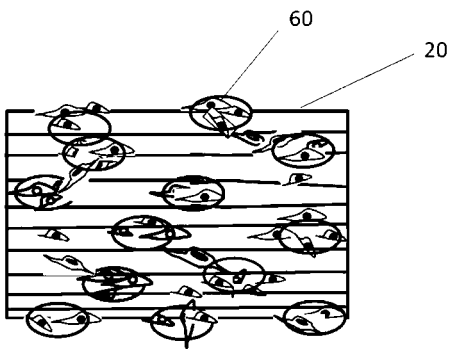
【 図 2 】



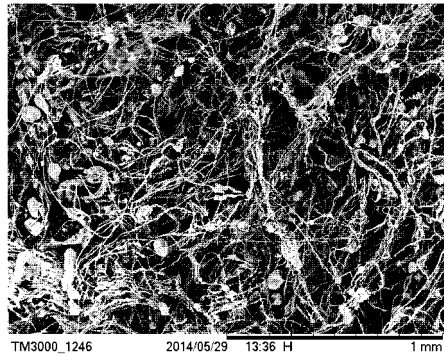
【 図 4 】



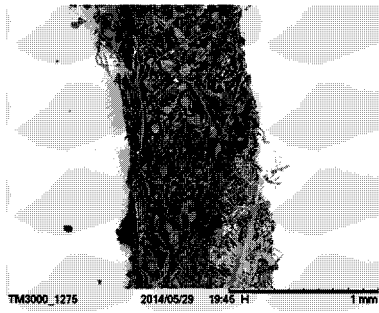
【 図 5 】



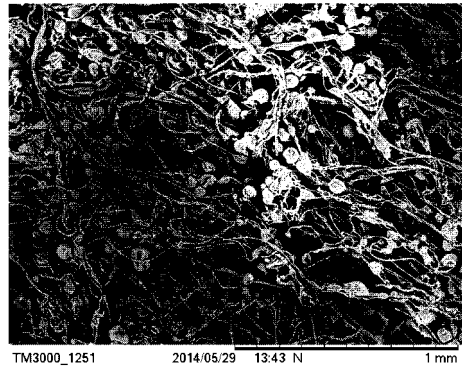
【 図 6 】



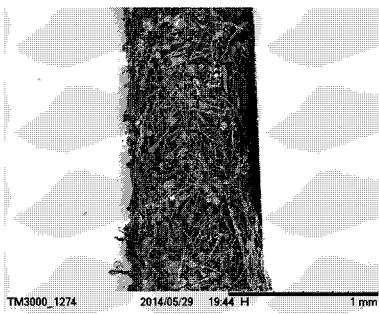
【 図 7 】



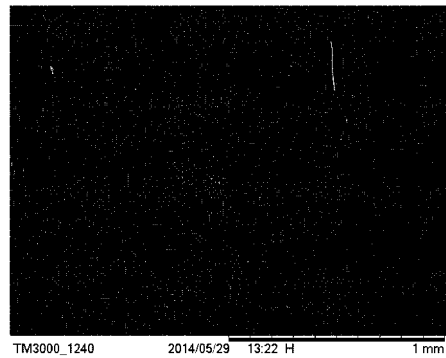
【 図 8 】



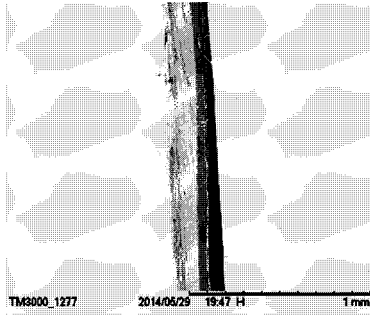
【 図 9 】



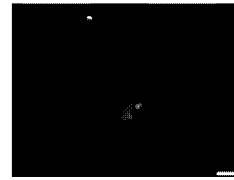
【 図 10 】



【 図 1 1 】



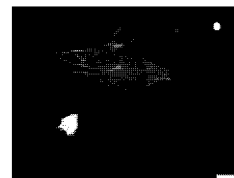
【 図 1 2 】



(a)

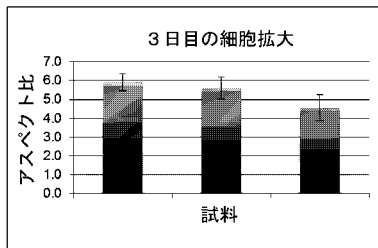


(b)



(c)

【 図 1 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/41380
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12M 3/00, C12N 11/00, C12N 11/04 (2014.01) CPC - C12M 3/00, C12M 25/16, C12N 11/04 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) IPC(8) - C12M 3/00, C12N 11/00, C12N 11/04 (2014.01) CPC - C12M 3/00, C12M 25/16, C12N 11/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C12M 1/16 (2014.01) CPC - C12N 11/00, C12M 1/16, C12M 23/24 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, Google Patents Search terms: fibril, bead, microbead, nanobead, three dimensional, 3 dimensional, 3D, 3-D, cell, tissue, culture, pore, porous		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,306,491 B1 (KRAM et al.) 23 October 2001 (23.10.2001) col 6, ln 36-38; col 8, ln 10-17; col 14, ln 43-48; col 22, ln 54-57; col 24, ln 10-18; col 27, ln 55-65; col 86, ln 34-48; Fig. 17	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 15 September 2014 (15.09.2014)		Date of mailing of the international search report 23 OCT 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/41380

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-41
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, LT, 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

(72)発明者 フレーザー、ローラ、エム .

アメリカ合衆国、オハイオ州 4 4 2 2 4、ストー、ブルックシャー コート 2 7 4 4

(72)発明者 カタフィナン、ワラフォン

アメリカ合衆国、オハイオ州 4 4 3 1 3、アクロン、ロス ドライブ 3 0

Fターム(参考) 4B029 AA03 AA08 BB11 CC02 CC10 CC13 EA20 FA15 GB09

4B065 AA90X AC12 BB34 BC42 BC46 CA46