

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5124125号  
(P5124125)

(45) 発行日 平成25年1月23日(2013.1.23)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl. F 1  
C 1 2 M 3/00 (2006.01) C 1 2 M 3/00 A

請求項の数 7 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2006-298230 (P2006-298230)	(73) 特許権者	390021393
(22) 出願日	平成18年11月1日(2006.11.1)		北海道曹達株式会社
(65) 公開番号	特開2008-113580 (P2008-113580A)		北海道苫小牧市字沼ノ端134番地122号
(43) 公開日	平成20年5月22日(2008.5.22)	(73) 特許権者	591063394
審査請求日	平成21年9月7日(2009.9.7)		公益財団法人東京都医学総合研究所 東京都世田谷区上北沢2-1-6
		(73) 特許権者	504179255
			国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-45
		(74) 代理人	100101236
			弁理士 栗原 浩之
		(74) 代理人	100128532
			弁理士 村中 克年

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養基材、及び細胞培養基材の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エレクトロスピニングにより形成されたキトサン繊維を溶媒に分散させ、これをホモジナイズしたスラリー液を乾燥させることにより得た、繊維が絡み合った繊維体からなることを特徴とする細胞培養繊維体。

【請求項2】

基板と、基板上に設けられた細胞培養繊維体とからなる細胞培養基材であって、前記細胞培養繊維体が、エレクトロスピニングにより形成されたキトサン繊維を溶媒に分散させ、これをホモジナイズしたスラリー液を前記基板に塗布して乾燥させることにより得られ、前記基板と一体となった、繊維が絡み合った繊維体からなることを特徴とする細胞培養基材。

【請求項3】

請求項2に記載の細胞培養基材において、前記細胞培養繊維体がメッシュ状であることを特徴とする細胞培養基材。

【請求項4】

請求項2又は3に記載の細胞培養基材において、前記細胞培養繊維体が、繊維径が5 μm以下の繊維からなることを特徴とする細胞培養基材。

【請求項5】

基板と、基板上に設けられた細胞培養繊維体とからなる細胞培養基材の製造方法であって、キトサン類を含むキトサン溶液をエレクトロスピニングにより繊維化してキトサン繊維

10

20

を形成する工程と、前記キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズすることによりスラリー液を形成する工程と、前記スラリー液を前記基板に塗布して乾燥させることにより当該基板と一体となった、繊維が絡み合った繊維体を形成する工程とを具備することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の細胞培養基材の製造方法において、前記乾燥が加熱乾燥であることを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の細胞培養基材の製造方法において、前記乾燥が凍結乾燥であることを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を培養するための細胞培養繊維体、細胞培養基材、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞培養法は、医学、生物学の研究において最も汎用される方法の一つである。細胞培養法において用いられる細胞培養基材は、細胞を培養するのに好適なものであること、例えば、細胞が付着しやすい、細胞が増殖しやすいことが求められる。

20

【0003】

そこで、例えば、少なくとも、微粒子と、親水性成分と、を含む微粒子含有親水性高分子ゲルからなることを特徴とする細胞培養基材が提案されている（特許文献 1 参照）。このような培養基材は、細胞の接着性がよく、簡便に回収できるものであるが、ゲル状であるため取り扱いにくく、また保存しにくいという問題がある。

【0004】

また、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる軟骨細胞培養用の担体が提案されている（特許文献 2 参照）。しかしながら、特許文献 2 のような担体は、例えば、24 穴プレート等の非常に小さな基板上に置いて使用する場合、シートが非常に小さくなるために取り扱いにくいという問題があった。

30

【0005】

また、細胞培養基材の製造方法としては、例えば、重量平均分子量 10 万以上のポリ乳酸を、任意の割合で水に溶解しうる有機化合物を含有する溶媒に溶解する段階と、前記段階で製造された溶液を静電紡糸法にて紡糸する段階、および捕集基板に累積される繊維構造体を得る段階を含む細胞培養基材の製造方法が提案されている（特許文献 3 参照）。特許文献 3 の細胞培養基材の製造方法は、いわゆる静電紡糸法によるものであるが、均一な大きさ、及び厚さの繊維構造体を得にくいという問題があった。また、繊維体の大きさを自由に設定することができないという問題があった。

【0006】

【特許文献 1】特開 2005 - 027532 号公報（特許請求の範囲等）

40

【特許文献 2】特開 2002 - 291461 号公報（特許請求の範囲等）

【特許文献 3】特開 2004 - 290133 号公報（特許請求の範囲等）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明はこのような事情に鑑み、細胞が接着及び増殖しやすく、取り扱いが容易な細胞培養繊維体、細胞培養基材、及び細胞培養基材の製造方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決する本発明の第 1 の態様は、エレクトロスピンニングにより形成されたキ

50

トサン繊維を溶媒に分散させ、これをホモジナイズしたスラリー液を乾燥させることにより得た、繊維が絡み合った繊維体からなることを特徴とする細胞培養繊維体にある。

【0009】

かかる第1の態様では、キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズしたスラリー液を乾燥させることにより得た、繊維が絡み合った繊維体からなることで、小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な細胞培養繊維体となり、細胞の接着性に優れ、且つ細胞が増殖しやすい細胞培養繊維体となる。また、取り扱いが容易であり、室温で保存することができる細胞培養繊維体となる。

【0010】

本発明の第2の態様は、基板と、基板上に設けられた細胞培養繊維体とからなる細胞培養基材であって、前記細胞培養繊維体が、エレクトロスピニングにより形成されたキトサン繊維を溶媒に分散させ、これをホモジナイズしたスラリー液を前記基板に塗布して乾燥させることにより得られ、前記基板と一体となった、繊維が絡み合った繊維体からなることを特徴とする細胞培養基材にある。

10

【0011】

かかる第2の態様では、スラリー液を基板に塗布して乾燥させることで、基板と一体で取り扱いが容易な細胞培養基材となる。小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な細胞培養繊維体を具備することで、細胞の接着性に優れ、且つ細胞が増殖しやすい細胞培養基材となる。また、室温で保存することができる細胞培養基材となる。

【0012】

本発明の第3の態様は、第2の態様に記載の細胞培養基材において、前記細胞培養繊維体がメッシュ状であることを特徴とする細胞培養基材にある。

20

【0013】

かかる第3の態様では、細胞培養繊維体がメッシュ状であることで、より細胞の接着性に優れ、且つ接着した細胞を安定して保持することができる細胞培養基材となる。

【0014】

本発明の第4の態様は、第2又は3の態様に記載の細胞培養基材において、前記細胞培養繊維体が、繊維径が5 μm以下の繊維からなることを特徴とする細胞培養基材にある。

【0015】

かかる第4の態様では、繊維径が5 μm以下の繊維からなることで、より細胞の接着性に優れ、且つ接着した細胞を安定して保持することができる細胞培養基材となる。

30

【0016】

本発明の第5の態様は、基板と、基板上に設けられた細胞培養繊維体とからなる細胞培養基材の製造方法であって、キトサン類を含むキトサン溶液をエレクトロスピニングにより繊維化してキトサン繊維を形成する工程と、前記キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズすることによりスラリー液を形成する工程と、前記スラリー液を前記基板に塗布して乾燥させることにより当該基板と一体となった、繊維が絡み合った繊維体を形成する工程とを具備することを特徴とする細胞培養基材の製造方法にある。

【0017】

かかる第5の態様では、小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。これにより細胞の接着性に優れ、且つ細胞が増殖しやすい細胞培養基材を製造することができる。また、所望の大きさ、及び形状の細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。さらに、例えば、均一な厚さの細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を同時に製造することができる、又は異なる大きさや形状の細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を同時に製造することができる。

40

【0018】

本発明の第6の態様は、第5の態様に記載の細胞培養基材の製造方法において、前記乾燥が加熱乾燥であることを特徴とする細胞培養基材の製造方法にある。

【0019】

かかる第6の態様では、加熱乾燥することにより、平板状の比較的厚さの薄い細胞培養

50

繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。

【0020】

本発明の第7の態様は、第5の態様に記載の細胞培養基材の製造方法において、前記乾燥が凍結乾燥であることを特徴とする細胞培養基材の製造方法にある。

【0021】

かかる第7の態様では、凍結乾燥することにより、3次元構造の比較的厚みのある細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な細胞培養繊維体となる。また、細胞の接着性に優れ、且つ細胞が増殖しやすい細胞培養繊維体及び細胞培養基材となる。さらに、取り扱いが容易であり、室温で保存することができる細胞培養繊維体、及び細胞培養基材となる。

【0023】

小さく均一な繊維径の繊維からなる均質な細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができ、また、所望の大きさ、及び形状の細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。さらに、均一な厚さの細胞培養基材を同時に製造することができる、又は異なる大きさや形状の細胞培養基材を同時に製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明にかかる細胞培養繊維体は、エレクトロスピニングにより形成されたキトサン繊維と溶媒とをホモジナイズしたスラリー液を乾燥させることにより得た繊維体からなる。かかる細胞培養繊維体は、小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な繊維体である。ここでいう均質とは、厚さ方向及び平面方向に繊維が均一に存在している状態、すなわち繊維の密度が均一な状態のことを指す。このとき、繊維と繊維との隙間（開口）もほぼ均一な大きさで存在している。これは、キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズしたスラリー液、すなわち均質化したスラリー液を乾燥させることにより実現されるものである。

【0025】

本発明における細胞培養繊維体は、エレクトロスピニング（静電紡糸）により形成されたキトサン繊維を用いることで、非常に小さく均一な繊維径の繊維からなるものとする。すなわち、本発明にかかる細胞培養繊維体は、エレクトロスピニング（静電紡糸）により得られる小さく均一な繊維径を保持した繊維からなる繊維体である。なお、繊維体は、繊維の繊維径が好ましくは5  $\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは0.01~3.0  $\mu\text{m}$ 、特に好ましくは0.1~1.0  $\mu\text{m}$ である。細胞がひっかかる部分（繊維）や、繊維と繊維の間にできる細胞が入り込む開口が小さくなるため、細胞が付着しやすく、接着した細胞を安定して保持することができるものとなる。

【0026】

また、本発明における細胞培養繊維体は、キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズしたスラリー液を乾燥させることにより得たものである。ここで、ホモジナイズとは、凝集した状態のキトサン繊維をほぐしながら破碎して、キトサン繊維を均一化させながら溶媒中に分散させることをいう。これにより、エレクトロスピニングにより得られた繊維径を保持しつつ、ほぼ均一な長さからなるキトサン繊維が溶媒中に分散したスラリー液が得られる。このスラリー液を乾燥させることで、本発明の細胞培養基材は、ほぼ均一な長さの繊維が絡み合い、厚さ方向及び平面方向の繊維の密度がほぼ均一な状態、すなわち、均質なものとなる。このとき、繊維と繊維との間の開口はほぼ均一な大きさで存在するようになる。

【0027】

本発明における細胞培養繊維体は、従来のエレクトロスピニングにより形成された細胞培養基材のように厚さ方向又は平面方向の繊維の密度が異なったり、繊維と繊維との間にできる開口の大きさが著しく異なったりする虞がない。このため、本発明の細胞培養繊維

10

20

30

40

50

体、及び細胞培養基材は、付着した細胞を安定して保持しやすく、また付着した細胞が増殖しやすくなる。

【0028】

また、本発明における細胞培養繊維体は、好ましくはメッシュ状である。メッシュ状とは、所望の開口を有する網目状のことである。本発明における繊維体は、ほぼ均一な長さの繊維が絡み合いながらメッシュ状となることで、繊維と繊維の間の開口から細胞が侵入しやすく、また繊維が絡んで網目状となっている部分に細胞がひっかかりやすいため、より細胞が付着しやすく、接着した細胞を安定して保持することができる。

【0029】

本発明における細胞培養繊維体は、キトサン繊維を含むスラリー液から得るものである。ここでいうキトサン繊維は、キトサン類を主成分とする繊維である。すなわち、本発明における繊維体はキトサン類繊維からなるものである。このため、本発明の細胞培養繊維体は、細胞の接着性に優れ且つ細胞の増殖がしやすいものとなる。また、キトサン類繊維は蛍光化で細胞と区別できるため、本発明にかかる細胞培養繊維体は細胞の観察が容易である。

【0030】

なお、キトサン類とは、キチン( -ポリ-N-アセチル-D-グルコサミン)を脱アセチル化した生成物又はこの誘導体をいい、キトサン( -ポリ-D-グルコサミン)及びその誘導体の他、未反応のキチン及びその誘導体を含有するものをいう。本発明で用いることができるキトサン類は、キチンの脱アセチル化度合、すなわち、キトサンの割合は特に限定されないが、50%以上であることが好ましい。

【0031】

本発明で用いるキトサン類の主成分は特に限定されず、例えば、キトサン、N-アリルキトサン、N-アルキルキトサン、o-アリルキトサン、o-アルキルキトサン、硫酸化キトサン、ニトロ化キトサン、カルボキシメチル化キトサン等が挙げられるが、キトサン、カルボキシメチル化キトサンが好ましい。

【0032】

なお、繊維体は、キトサン類を含有するものであればよく、細胞の培養に好適な他の成分を含んでいてもよい。例えば、性能を最大限に発揮させるために必要に応じて、合成高分子や繊維の改質剤、生理活性物質(細胞接着活性因子、細胞増殖因子、繊維芽細胞成長因子、免疫活性因子、神経作用因子等)、血清成分、生物組織成分、界面活性剤等を加える。具体的には、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ乳酸、絹フィブリン、プリテオグリカン、フィブロネクチン、ヴィトロネクチン、エンタネクチン、エラスチン、ラミニン、セレクチン、ガレクチン、レクチン(WGA、コンカナバリンA等)、コラーゲン、ゼラチン、酵素(コラゲナーゼ、トリプシン、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、ウロキナーゼ、SOD等)、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリ-L-リジン、ポリ-L-グルタミン酸、細胞外マトリクスタンパク質、インテグリン、アミノ酸(グリシン、プロリン、ヒドロキシプロリン、アラニン、セリン、アスパラギン、グルタミン酸、スレオニン、システイン、ロイシン、メチオニン等)、ジペプチド、トリペプチド、ペプチドタンパク質(チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン配列、アルギニン-グルタミン酸-アスパラギン酸-バリン配列、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列を含む)、グリコサミノグリカン、ムチン型結合糖鎖、アスパラギン型結合糖鎖、オリゴ糖(トレハロース、キチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、シクロデキストリン等)、単糖(マンノース、N-アセチル-D-グルコサミン、グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、シアル酸、ムラミン酸、グルコース、ガラクトース、ラクトース、フコース、アラビノース等)、ガングリオシド、スフィンゴ脂質、糖脂質(アルキルグリコシド、ガラクトシルセラミド等)、ショ糖脂肪酸エステル、脂肪酸エステル(DHA、EPA等)、長鎖脂肪酸(アラキドン酸、リノール酸、レチノイン酸等)、グリセロール、多価アルコール、コレステロール、スクアレン、プロスタグランジ

10

20

30

40

50

ン、トロンボキサン、ロイコトリエン、ステロイド、インシュリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、チロキシン、トリヨードチロシン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、アセチルコリン、酸類（乳酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、グルコン酸、グルコロン酸、パントテン酸、ピルビン酸等）、グリチルリチン、ルチン、ステビオシド、サポニン、アルブチン、ポリフェノール（カテキン）、SOD様活性物質、インターフェロン、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、TNF- $\alpha$ 、モノクローナル抗体、補体因子、遺伝子、DNA、RNA、アデニン、牛胎仔血清、ビタミン類、無機塩類、シリコン、セラミック、アパタイト、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、エチレンジアミンテトラ酢酸等が挙げられる。

【0033】

本発明にかかる細胞培養繊維体及び細胞培養基材は、室温で保存することができ、使用する際には、細胞の培養に適した水等の溶媒を滴下又は含浸させることにより直ちに使用することができる。

【0034】

本発明にかかる細胞培養基材は、細胞培養繊維体と基板とが一体となっている。ここでいう「基板と一体」とは、基板と接着している状態を指すが、基板から取り外すこともできる状態である。かかる細胞培養繊維体は、水やバッファー等に通しても基板から剥がれてしまうことがない。なお、細胞培養繊維体は、所望の基板と一体となることができる。基板としては、例えば、非常に小さなカバースリップ、ウェル、滅菌シャーレ、培養フラスコ等を挙げることができる。このとき、細胞培養繊維体は基板の形状や大きさ等に左右されることなく均質なものとなる。かかる細胞培養基材は、細胞培養繊維体と基板とが一体となっていることにより、細胞培養繊維体を取り扱いの際に変形してしまったり、基板に載せるのが困難であったりすることがない。また、細胞培養基材は、細胞培養繊維体と基板とが一体となった状態で、室温で保存することができ、非常に取り扱いが容易である。

【0035】

本発明にかかる細胞培養基材は、上述したような構成により、従来、培養が困難とされていた肝臓細胞、脂肪細胞、血球系細胞の培養や、神経節移植片の培養をすることができるものである。勿論、線維芽細胞等の他の細胞も好適に培養することができる。また、増殖アッセイも容易にできるものである。

【0036】

本発明にかかる細胞培養基材の製造方法は、キトサン類を含むキトサン溶液をエレクトロスピンニングにより繊維化してキトサン繊維を形成する工程と、キトサン繊維と溶媒とをホモジナイズすることによりスラリー液を形成する工程と、スラリー液を基板に塗布して乾燥させることにより当該基板と一体となった繊維体を形成する工程とを具備するものである。この製造方法によれば、小さく均一な繊維径の繊維が絡み合った均質な細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。また、所望の大きさ、及び形状の細胞培養繊維体を基板上に有する細胞培養基材を製造することができる。従来のように細胞培養繊維体を基板の形状に合わせて切ったりする必要がなく、例えば、基板の形状に合わせて形成することができる。すなわち、非常に小さなカバースリップやウェル等の上にも細胞培養繊維体を形成することができ、また、大きな基板上に継ぎ目等をつくることなく形成することもできる。さらに、均一な厚さの細胞培養繊維体を基板上に同時に複数個形成したり、異なる大きさや形状の複数の細胞培養繊維体を基板上に同時に形成したりすることができる。

【0037】

ここで、細胞培養基材の製造方法を詳細に説明する。

【0038】

まず、キトサン類をトリフルオロ酢酸等の溶媒に溶解させて、適宜ろ過等を行うことでキトサン溶液を調製する。このとき、キトサン溶液には細胞の培養に好適な他の成分を溶解させてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0039】

次に、キトサン溶液をエレクトロスピニング法（静電紡糸法）により繊維化することで例えば、繊維径が5 μm以下のキトサン繊維を得る。

## 【0040】

次に、得られたキトサン繊維と水等の溶媒とをホモジナイズすることによりスラリー液を形成する。なお、ここでいうホモジナイズとは、凝集した状態のキトサン繊維をほぐしながら破碎して、キトサン繊維を均一化させながら溶媒中に分散させることをいう。この工程において、キトサン繊維は、エレクトロスピニングにより得られた繊維径を保持しつつ、微砕化及び均一化され、溶媒中に分散する。

## 【0041】

そして、得られたスラリー液を基板上に塗布する。なお、ここでいう塗布とは、スプレーや刷け塗りによる塗布だけでなく、滴下による塗布等を含むものである。また、基板に塗布するスラリー液の量は、濃度等により適宜調整する。

## 【0042】

最後に、スラリー液を加熱乾燥させることで、基板上に平板状の細胞培養繊維体が一体となって設けられた細胞培養基材が得られる。

## 【0043】

上述した方法により得られる細胞培養繊維体は、基板との接着性が高いものであり、取り扱いが容易である。

## 【0044】

本実施形態では、スラリー液を1つの基板上に塗布して細胞培養繊維体を形成したが、例えば、24穴ウェルなどの底部にそれぞれ等量ずつスラリー液を滴下（塗布）することで、均一な厚さの細胞培養繊維体を同時に複数個形成することもできる。また、それぞれ異なる大きさや形状の基板に塗布して、異なる大きさや形状の細胞培養繊維体を同時に形成することもできる。なお、スラリー液の塗布方法は特に限定されないが、例えば24穴ウェル等のように筒状の底部にスラリー液を塗布する場合は、滴下による塗布が好ましい。壁面にスラリー液が付着する虞がなく、それぞれの穴に等量ずつ塗布することができるからである。

## 【0045】

本発明にかかる細胞培養基材の製造方法では、乾燥方法を選択することにより所望の形状の細胞培養繊維体とすることができる。具体的には、加熱乾燥することにより、平板状の比較的厚さの薄い細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造でき、凍結乾燥することにより、3次元構造の比較的厚さの厚い細胞培養繊維体を有する細胞培養基材を製造することができる。

## 【0046】

本発明の細胞培養基材の製造方法によれば、キトサン溶液をエレクトロスピニングすることで小さく均一な繊維径からなるキトサン繊維を得られ、得られたキトサン繊維と溶媒とをホモジナイズしたスラリー液を塗布して乾燥することにより均質な細胞培養繊維体を得ることができるため、細胞の接着性に優れ、且つ接着した細胞を安定して保持することができる細胞培養基材を製造することができる。

## 【0047】

以下、本発明を実施例に基づいて説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものではない。

## 【0048】

（実施例1）

<キトサン溶液の調製>

脱アセチル化度93%のキトサン（北海道曹達株式会社製）1.6gをトリフルオロ酢酸（和光純薬工業株式会社製）20mlに50で12時間かけて溶解し、塩化メチレン5mlを加え、ガラスフィルター（3G型-2、フィルター径30mm、ポアサイズ40~100 μm；日本理化学器械株式会社製）でろ過してキトサントリフルオロ酢酸液を得

10

20

30

40

50

た。

【0049】

<キトサン繊維の製造>

キトサントリフルオロ酢酸液を注射器(テルモシリンジSS-30ESZ;テルモ株式会社製)に入れて針(シェアフィールドSVセット22G;テルモ株式会社製)につなぎ、インフュージョンポンプ(11Plus;HARVARD APPRATUS製)にセットした。インフュージョンポンプの送液速度を2ml/時間とし、アルミニウムからなる電極板(5.5cm×5.5cm)と針との間に高圧直流電圧電源(HSP-30k-2;日本スタビライザー株式会社製)により27kVの電圧をかけて、1時間かけて針から電極板へキトサントリフルオロ酢酸液を噴出することで、電極板にキトサン繊維を得た。

10

【0050】

電極板からはがしたキトサン繊維を28重量%のアンモニア水(和光純薬工業株式会社製)に室温で1時間浸漬させた後、蒸留水を室温で2時間連続的に供給して洗浄することで、キトサン繊維を得た。

【0051】

<細胞培養基材の製造>

キトサン繊維92mgに蒸留水を300ml加え、ホモジナイザー(T.K.HOMOMIXER;TOKUSYU KIKAKO GYO社製)により8000rpmで10分間ホモジナイズし、スラリー液を得た。なお、スラリー液は、乾燥減量(第14改正日本薬局方 乾燥減量試験法)の値から求めたキトサン濃度は約0.3mg/mlであった。得られたスラリー液をポリスチレン製24ウェル透明培養プレート(COSTAR3524;CORNING社製)の全24ウェルに1mlずつ分注し、50で1時間乾燥させることで、24ウェル透明培養プレートの底部上に白色でシート状の繊維体が一体となって設けられた実施例1の細胞培養基材を得た。写真を図1に示す。

20

【0052】

(実施例2)

実施例1と同様の方法により得たキトサン繊維239mgに蒸留水を200ml加え、ホモジナイザー(T.K.HOMOMIXER;TOKUSYU KIKAKO GYO社製)により8000rpmで25分間ホモジナイズし、スラリー液を得た。なお、スラリー液は、乾燥減量(第14改正日本薬局方 乾燥減量試験法)の値から求めたキトサン濃度は約1.2mg/mlであった。得られたスラリー液をポリスチレン製24ウェル透明培養プレート(COSTAR3524;CORNING社製)の全24ウェルに1mlずつ分注し、-25の冷凍庫に1晩入れて凍結させた。これを凍結乾燥機FDU-1100(東京理化学器械株式会社製)にて-10で48時間かけて凍結乾燥することで、24ウェル透明培養プレートの底部上に白色で厚さ0.3cmの繊維体が一体となって設けられた実施例2の細胞培養基材を得た。写真を図2に示す。

30

【0053】

(実施例3)

実施例2と同様の方法により得たスラリー液を直径13mmの円形マイクロカバーグラス(MATSUNAMI製)の片側表面上に1枚当たり0.13mlずつ滴下し、50で1時間乾燥させることで、マイクロカバーグラスの片側表面上に白色でシート状の繊維体が一体となって設けられた実施例3の細胞培養基材を得た。写真を図3に示す。

40

【0054】

(比較例1)

poly-L-lysine(Sigma社製;10μg/ml水溶液)をカバースリップに塗布させて比較例1の細胞培養基材を得た。

【0055】

(比較例2)

collagen type I(BD社製;10%水溶液)をカバースリップに塗布

50



させて比較例 2 の細胞培養基材を得た。

【0056】

(試験例 1)

実施例 1 ~ 3 の細胞培養基材の繊維体を顕微鏡により観察した。写真をそれぞれ図 4 ~ 6 に示す。

【0057】

繊維の繊維径はいずれも 1  $\mu$ m 程度であり、加熱乾燥により得られた実施例 1 の繊維体 (図 4) 及び実施例 3 の繊維体 (図 6) は曲線状の繊維がややランダムに固定化されており、凍結乾燥により得られた実施例 2 の繊維体 (図 5) は曲線状の繊維が比較的均一に固定化されていた。

10

【0058】

(試験例 2)

実施例 3 及び比較例 1 ~ 2 の細胞培養基材に成体マウスから得られた後根神経節を移植片培養し、5%牛胎仔血清加 DMEM 培養液、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 7 日間培養した。これらを 4% paraformaldehyde, methanol で固定したのち、ニューロンのマーカーである neurofilament 160K に対するマウスモノクロナル抗体 (Sigma 社製) とシュワン細胞のマーカーである S100 に対するウサギ・ポリクロナル抗体 (DAKO 社製) を用いて蛍光二重免疫染色を施行した。2 次抗体として、Rhodamine 標識ヤギ抗マウス IgG、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG をそれぞれ用い、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) で観察した。実施例 3 の細胞培養基材の結果を

20

図 7 (a) ~ (f) に示す。抗 neurofilament 160K 抗体を用いた蛍光染色の結果を図 7 (a) 及び (d)、抗 S100 抗体を用いた蛍光染色の結果を図 7 (b) 及び (e)、UV 励起による結果を図 7 (c) 及び (f) に示す。なお、図 7 (d) ~ (f) は図 7 (a) ~ (c) をさらに拡大した写真である。

【0059】

poly-L-lysine を塗布した比較例 1 の細胞培養基材、及び collagen type I を塗布した比較例 2 の細胞培養基材には、基本的に後根神経節が接着せず、ごく少数接着したのもその接着性が極めて弱く、神経節からの神経突起伸張も非常に軽微であった。

【0060】

一方、実施例 3 の細胞培養基材では、移植片の接着性が極めて強固であった。図 7 (a)、(b)、(d)、(e) に示すように、移植片に含まれるシュワン細胞の遊走、及び後根神経節ニューロンの突起伸長が非常に良好であり、比較例 1 及び 2 に比べて 10 倍以上長い突起伸張を認めた。なお、図 7 (c) 及び (f) に示すように、キトサンは UV 波長で自家蛍光を発し、Rhodamine、FITC の蛍光 2 重免疫染色と組み合わせて 3 重蛍光による同一視野の観察が可能であった。

30

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図 1】実施例 1 の細胞培養基材の写真である。

【図 2】実施例 2 の細胞培養基材の写真である。

40

【図 3】実施例 3 の細胞培養基材の写真である。

【図 4】実施例 1 の繊維体の拡大写真である。

【図 5】実施例 2 の繊維体の拡大写真である。

【図 6】実施例 3 の繊維体の拡大写真である。

【図 7】試験例 2 における実施例 3 の細胞培養基材の蛍光顕微鏡写真である。

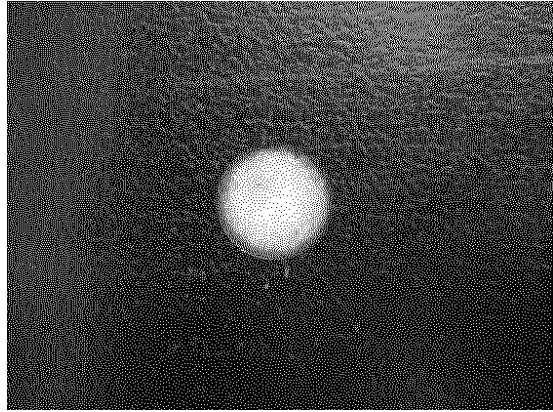
【図 1】



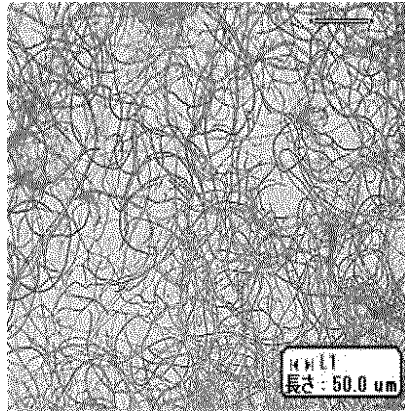
【図 2】



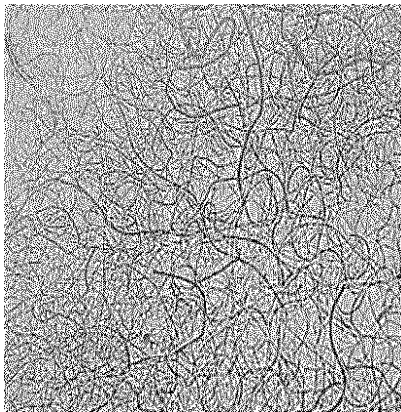
【図 3】



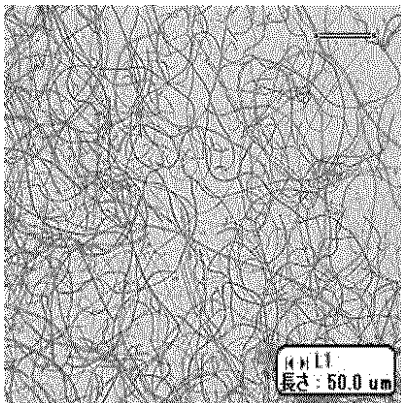
【図 4】



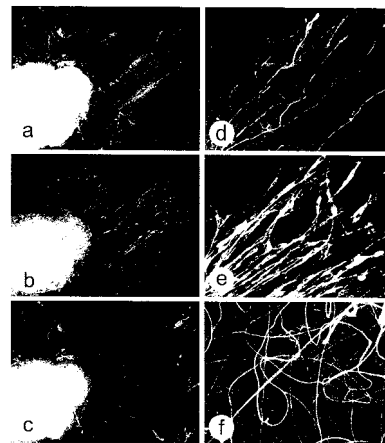
【図 5】



【図 6】



【図 7】



## フロントページの続き

- (72)発明者 大熊 恒雄  
北海道登別市千歳町2丁目12番地 北海道曹達株式会社 研究開発部内
- (72)発明者 石川 和裕  
北海道登別市千歳町2丁目12番地 北海道曹達株式会社 研究開発部内
- (72)発明者 境 勝義  
北海道登別市千歳町2丁目12番地 北海道曹達株式会社 研究開発部内
- (72)発明者 渡部 和彦  
東京都府中市武蔵台2-6 財団法人東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所内
- (72)発明者 伊藤 聡一郎  
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 国際公開第2006/028244(WO, A1)  
J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2005年, Vol.16, No.7, p.861-873  
J. Mater. Sci., 2006年10月, Vol.41, p.6453-6459  
J. Biomed. Mater. Res. Pt. A., 2006年10月, Vol.79, No.1, p.36-46  
Biomaterials, 2004年, Vol.25, p.4273-4278  
キチン・キトサン研究, 2006年 7月, Vol.12, No.2, p.192-193

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10

C12N 5/00 - 5/28

A61L 15/00 - 33/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)