

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11)特許番号

第2987441号

(45)発行日 平成11年(1999)12月6日

(24)登録日 平成11年(1999)10月8日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 5/06  
11/08

C 1 2 N 5/00  
11/08

E  
B

請求項の数7(全4頁)

(21)出願番号 特願平10-280831  
(22)出願日 平成10年(1998)10月2日  
審査請求日 平成10年(1998)10月2日

(73)特許権者 391012361  
筑波大学長  
茨城県つくば市天王台1丁目1番地の1  
(72)発明者 大島 宣雄  
茨城県つくば市小野川8の20  
(72)発明者 三好 浩稔  
茨城県つくば市吾妻2丁目1-2 710  
-713  
(72)発明者 楊 宗樺  
茨城県つくば市春日4-12-4 あらい  
ハイツ105  
(74)代理人 弁理士 杉村 暁秀 (外8名)  
  
審査官 内田 俊生

(56)参考文献 特開 平5-76364 (J P, A)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 動物細胞の固定化方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体に動物細胞を固定化して動物細胞固定化物を得る動物細胞の固定化方法であって、前記粒子状の担体と前記動物細胞とが培地中に浮遊して存在している所定の容器を遠心処理することを特徴とする、動物細胞の固定化方法。

【請求項2】 前記遠心処理において、前記所定の容器に印加する遠心力が、100G～500Gであることを特徴とする、請求項1に記載の動物細胞の固定化方法。

【請求項3】 前記遠心処理において、前記所定の容器に印加する遠心力が、200G～400Gであることを特徴とする、請求項2に記載の動物細胞の固定化方法。

【請求項4】 前記遠心処理前の播種細胞数が、前記粒子状の担体1cm<sup>3</sup>あたり2×10<sup>7</sup>個以上であること

を特徴とする、請求項1～3のいずれか一に記載の動物細胞の固定化方法。

【請求項5】 前記遠心処理前の播種細胞数が、前記粒子状の担体1cm<sup>3</sup>あたり4×10<sup>7</sup>個以上であることを特徴とする、請求項4に記載の動物細胞の固定化方法。

【請求項6】 微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体に動物細胞を固定化してなる動物細胞固定化担体であって、前記粒子状の担体1cm<sup>3</sup>当たりの播種細胞数を2×10<sup>7</sup>個以上とし、前記動物細胞と前記粒子状の担体とが培地中に浮遊している所定の容器を100G以上で遠心処理して得たことを特徴とする、動物細胞固定化担体。

【請求項7】 請求項6に記載の動物固定化担体を、所定の培養器に充填した後、この培養器に培地を供給しな

がら、前記動物細胞を培養することを特徴とする、動物細胞固定化担体の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物細胞の固定化方法に関し、さらに詳しくは、有用生理活性物質の生産及び治療を目的とした擬似生体材料、並びにはハイブリッド型人工臓器などに好適に使用することのできる動物細胞の固定化方法に関する。

【0002】

【従来の技術】バイオリアクタやバイオ人工臓器などの開発においては、目的とする細胞を装置内で高密度に培養する必要がある。中でも、バイオ人工臓器の場合には、装置を小型化し、体外循環する血液（血漿）の量を低減するために遊離肝細胞を高密度に培養することが必要である。

【0003】臨床応用されるバイオ人工肝臓には、10<sup>10</sup>個オーダの肝細胞が必要になるため、これらの細胞を現実的な大きさの装置（数リットル）に組み込むためには、肝細胞を10<sup>7</sup>個/cm<sup>3</sup>程度の高密度に培養する技術が不可欠となる。しかしながら、肝細胞は生体内では活発な増殖能を示すにもかかわらず、生体外ではほとんど増殖しない。そのため、肝細胞を高密度で培養するためには、細胞播種時において予め高密度に培養しておく必要がある。

【0004】この目的を達成すべく、本発明者らは、多孔質のポリビニルホルマール（以下、略してPVFという場合がある）樹脂を肝細胞の培養用担体とし、このPVF樹脂に固定化した肝細胞を装置内に充填した充填層型リアクタを用いることで、肝細胞を高密度に培養できることを見出し、特開平576364号公報において、かかる技術を開示している。具体的には、肝細胞懸濁液をリアクタ上部から注入することにより、細胞を播種することにより、固定化された肝細胞密度は、細胞播種時に装置内に保持された肝細胞数に比例して増加し、最高で1×10<sup>7</sup>個/cm<sup>3</sup> PVF以上の高密度を達成した。また、このとき固定化された細胞の活性は、通常の肝細胞培養法である単層培養のものと同様であった。したがって、本方法は、バイオ人工肝臓の開発に有望であることが示唆された。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記方法においては、播種時にリアクタ内に保持された細胞数に対する固定化細胞の比率、すなわち、固定化効率（＝固定化細胞数/保持細胞数）は、約30%と低い値であった。これは、ゲルによる包埋やホローファイバを用いた培養など、強制的に細胞を装置内に封じ込めるアクティブな固定化方法と比較して、上記方法のような細胞自身の接着力を利用したパッシブな固定化方法は、固定化効率がさほど高くないという本質的な欠点があることを

意味している。また、材料となる遊離肝細胞は豚などの大動物からその都度摂取されるが、これらの遊離肝細胞を有効に利用し、犠牲にする動物の数を減らすためにも、固定化効率の向上が望まれる。

【0006】本発明は、高い固定化効率を有する動物細胞を得るための新たな固定化方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体に動物細胞を固定化して動物細胞固定化物を得る動物細胞の固定化方法であって、前記粒子状の担体と前記動物細胞とが培地中に浮遊して存在している所定の容器を遠心処理することを特徴とする、動物細胞の固定化方法である。

【0008】本発明者は、固定化効率を向上させるべく鋭意検討した結果、培養装置全体ではなく、微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体と動物細胞とを培地中に浮遊させた状態の所定の容器のみに遠心処理を施すと、前記容器自体が小型であるためにこの容器に高い遠心力を印加することができ、その結果、全く予期しないことに上記固定化効率を向上できることを見出し、本発明をするに至ったものである。

【0009】これにより、ゲルによる包埋やホローファイバを用いた培養などの、強制的に細胞を装置内に封じ込めるアクティブな固定化方法などと比較しても、同等の高い固定化効率を得ることができる。さらには、本発明者らによる上記充填層型リアクタなどを用いた場合においても、アクティブな固定化方法と同様の固定化効率を得ることができる。

【0010】このように、培養器自体に高い遠心力を印加して固定化効率が向上できる理由、高い遠心力によって細胞が微孔性の担体の内部にまで入り込み、担体の内部にまで有効に細胞が接着できるためだと考えられる。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を発明の実施の形態に即して詳細に説明する。本発明の動物細胞の固定化方法では、微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体と動物細胞とが培地中に浮遊した状態の、所定の容器のみに遠心処理を施す。これにより、前記容器に高い遠心力を印加することができ、これによって本発明の目的である固定化効率の向上を達成することができる。

【0012】前記所定の容器に印加する遠心力の下限は、100Gであることが好ましく、さらには200Gであることが好ましい。これによって、きわめて高い固定化効率を得ることができる。前記所定の容器に印加する遠心力の上限は特に限定されるものではないが、遠心力が高すぎると細胞が傷害される恐れがある。これらの点を考慮すれば、遠心力の上限は500Gである。また、播種した細胞数が比較的高い場合において、固定化効率をより向上させるためには、印加する遠心力の上限

は400Gであることが好ましい。また、本発明の方法において使用する遠心処理装置としては、特に限定されるものではなく、汎用の遠心処理機を用いることができる。さらに、前記所定の容器には、ポリカーボネートなどのプラスチック容器を使用することができる。

【0013】さらに、本発明の方法においては、前記培養器内に播種する細胞の数が、粒子状の担体1cm<sup>3</sup>あたり2×10<sup>7</sup>個以上であることが好ましく、さらには、4×10<sup>7</sup>個以上であることが好ましい。これにより、本発明の目的である固定化効率に加えて、固定化された細胞の密度をも向上させることができる。この播種細胞数の上限は特に限定されるものではないが、以下に示す担体及び動物細胞、さらには培地を使用した場合、一般には粒子状の担体1cm<sup>3</sup>あたり1.0×10<sup>8</sup>個である。

【0014】本発明の方法における微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体としては、単位体積当たりの表面積が広く、培養すべき細胞に対して毒性を示さず、さらに、この細胞が前記担体中に保持されて外部に流出せず、培地の流入及び流出がスムーズに行われるとともに、前記担体内において細胞の付着及び生育が容易なものであれば特に限定されるものではない。また、前記担体は、水および培地中で変質せず、高圧蒸気滅菌に耐え得るような性質を有し、さらに、弱酸やアルカリ及び他の多くの有機溶媒に対して耐薬品性を示し、化学的に安定な物が好ましい。これによって、高圧蒸気などにより担体の滅菌を前記培養器中で行い、さらに、培養終了後に担体を回収し、加熱処理及び弱酸またはアルカリなどで処理することにより細胞を溶解離脱させた後に洗浄して、前記担体を再使用することができる。

【0015】さらに、細胞を多量に培養するためには、担体を多量に充填する必要があるため、物理的強度が高く、比重が水よりもわずかに高いものが好ましい。具体的には、ろ過材として市販されている立体網状連続多孔質構造を有するポリビニルホルマール樹脂、高分子材料を発泡又は多孔質化させたもの、ステンレススチール製の焼結金属担体、多孔性のガラスやセラミックス、さらに、キトサン、セルロース、デキストランなどの天然高分子物質などを使用することができる。

【0016】さらに、細胞を固定化する際の効率、細胞の保持能、及び担体内の細胞の生育状態を考慮すると、本発明の方法において使用する担体の立体網状多孔質構造は、平均孔径が好ましくは1~1000μm、さらには好ましくは5~600μmであって、空孔率が好ましくは50~98%、さらには好ましくは75~95%である。

【0017】また、前記粒子状の担体の形状及び大きさは、使用する前記所定の容器の性状及び大きさに応じて種々のものを使用することができる。例えば、前記担体が球形であれば直径0.1~20mmの大きさの担体

を、前記担体がブロック形のものであれば一辺が0.1~20mmの大きさの担体を使用することが好ましい。

【0018】本発明の方法で使用される動物細胞は、本発明の方法において前記担体に固定化された後、培養して生育可能なものであれば特に限定されるものではなく、ヒト又は動物由来の肝細胞、臍ランゲルハンス島細胞、血管内皮細胞、腎臓細胞、神経細胞、下垂体細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、骨髄細胞、副腎皮質細胞、及びマクロファージなどの動物遊離細胞や神代細胞などを例示することができる。さらに、これらの細胞を株化したものや、遺伝子組換えや細胞融合などの操作により人為的に変性させた細胞を用いることもできる。

【0019】また、培地としては、細胞の培養に使用する汎用のものを使用することができ、目的に応じて血清を加えることもできる。なお、本発明の方法をハイブリッド型人工臓器に適用する場合には、上記培地の他に、血液から分離した血漿や血液そのものを使用することもできる。

【0020】本発明の動物細胞の固定化方法は、粒子状の担体と動物細胞とが培地中に浮遊している状態の所定の容器に遠心処理を施すことができれば、特に限定されるものではないが、好ましくは以下に示す手順によって行う。

【0021】最初に、上記材料からなる微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体を、前記所定の容器に供給した後、好ましくは121~150で20分間以上高圧蒸気滅菌する。次いで、前記培地に上記材料の動物細胞を懸濁させた後、この懸濁液を上記所定の容器に注入する。この懸濁液の温度は4~37であることが好ましい。前記懸濁液の注入後、前記所定の容器を遠心処理装置に設置し、遠心処理を実施する。遠心処理は好ましくは上記遠心力を印加して1~10分間行い、さらには好ましくは、この処理を1~10回行う。

【0022】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明する。

(1)細胞及び培地

動物細胞は、雄性Wistarラットからコラゲナーゼ灌流法により得た肝細胞を使用した。培地は、培地養純水にウイリアムスE培地を11g、炭酸水素ナトリウムを2.2g溶解したものに、デキサメサゾン0.1μ、インスリン0.1μ、アプロチニン5000KIU/L、ペニシリンG20000IU/L、ストレプトマイシン20mg/L、アンフォテシリンB50μg/L加えた基本培地に、牛胎児血清を10%添加したものをを使用した(以下、略して血清添加培地という)。

【0023】(2)固定化用担体

微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体として、ポリビニルホルマール樹脂シート(カネボウスポンジシート、品名ペルイータ、品番A3410:カネボウ化成

(株)製、)を使用し、 $2 \times 2 \times 2$  mmの粒子状に切断した。100～200個の前記粒子を、外径27mm、高さ80mmのポリカーボネート製のキャップ付き遠心用平底ボトルに入れた。ボトルは全体を121で20分間高圧蒸気滅菌した後、血清添加培地で洗浄した。

【0024】(3-1)肝細胞の担体への固定化(実施例1～4)

(2)のような操作によって粒子状の担体を含んだボトル内に、所定量の肝細胞を血清添加培地に懸濁して得た肝細胞懸濁液を注入し、直ちに、前記ボトルを冷却遠心機(Kokusan製H-500FR)に設置して遠心処理を行った。遠心処理は、前記ボトルに300Gの遠心力

を印加して1分間行う処理を1回として、計6回行った。遠心処理を行う前の播種細胞数、及び担体数(粒子数)に応じて、表1に示すような値の固定化効率及び固定化細胞密度が得られた。

【0025】(3-2)肝細胞の担体への固定化(比較例1～4)

前記(3-1)の実施例に対し、遠心処理を行わなかった以外は、前記同様にして肝細胞の担体への固定化を行った。結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

	播種細胞数 (個)	担体数 (個)	担体 $1\text{cm}^3$ あたりの播種 細胞数(個/ $\text{cm}^3$ -PVF)	固定化効率 (%)	固定化細胞密度 (個/ $\text{cm}^3$ -PVF)
実施例 1	$3.00 \times 10^7$	100	$3.75 \times 10^7$	45.0	$1.69 \times 10^7$
2	$7.91 \times 10^7$	200	$4.94 \times 10^7$	52.7	$2.60 \times 10^7$
3	$5.64 \times 10^7$	100	$7.05 \times 10^7$	40.4	$2.85 \times 10^7$
4	$6.71 \times 10^7$	100	$8.39 \times 10^7$	45.5	$3.82 \times 10^7$
比較例 1	$3.00 \times 10^7$	100	$3.75 \times 10^7$	10.3	$3.86 \times 10^6$
2	$7.91 \times 10^7$	200	$4.94 \times 10^7$	13.1	$6.48 \times 10^6$
3	$5.64 \times 10^7$	100	$7.05 \times 10^7$	8.6	$6.06 \times 10^6$
4	$6.71 \times 10^7$	100	$8.39 \times 10^7$	8.9	$7.05 \times 10^6$

【0027】表1から明かなように、本発明の方法にしたがって遠心処理を施して得た動物細胞の担体に対する固定化効率は極めて高いことがわかる。また、播種細胞数が上昇するにつれて、固定化細胞密度が上昇し、特に、播種細胞数が担体 $1\text{cm}^3$ あたり $4 \times 10^7$ 個以上の場合において、極めて高い固定化細胞密度を示すことがわかる。

【0028】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の方法によれば、高い固定化効率を有する固定化動物細胞を容易に得ることができ、材料となる動物細胞の使用効率を高めることができる。その結果、動物細胞の原料となる豚な

ど各種動物の犠牲を最小限に押さえることができる。また、本発明における遠心処理の前に、播種細胞数をある一定値よりも高く設定することにより、固定化細胞密度をも向上させることができる。

【要約】

【課題】 高い固定化効率を有する動物細胞を得るための新たな固定化方法を提供する。

【解決手段】 微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体と動物細胞が培地中に浮遊して存在している所定の容器を、好ましくは100～500G、さらに好ましくは200～400Gの遠心力を印加して遠心処理を行う。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>6</sup>, DB名)

C12N 1/00 - 5/28