

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4876275号
(P4876275)

(45) 発行日 平成24年2月15日(2012.2.15)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	11/16	(2006.01)	C 1 2 N 11/16
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
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00 V

請求項の数 21 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2001-101961 (P2001-101961)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成13年3月30日(2001.3.30)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2001-340076 (P2001-340076A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成13年12月11日(2001.12.11)	(73) 特許権者	500142028
審査請求日	平成20年3月19日(2008.3.19)		竹澤 俊明
(31) 優先権主張番号	特願2000-98401 (P2000-98401)		東京都町田市相原町1806番地58
(32) 優先日	平成12年3月31日(2000.3.31)	(74) 代理人	100081961
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 木内 光春
		(72) 発明者	竹澤 俊明
			東京都町田市相原町1806番地58
		(72) 発明者	今井 敬
			茨城県つくば市並木2-10-1-205-104

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体と、この担体を用いる動物細胞の培養方法および移植方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物細胞を培養する担体が、生物の組織を薄切した切片からなり、ポリリジン又はAPSコートされた支持体に付着または付着伸展していることを特徴とする細胞培養担体。

【請求項2】

支持体が、ガラス、プラスチック、ゴム、金属、天然または合成の糸および/またはその織成体、および生体吸収性材料から選ばれる1種以上である請求項1記載の細胞培養担体。

【請求項3】

生物の組織が、新鮮な組織または予め固定液で固定した組織である請求項1記載の細胞培養担体。

【請求項4】

薄切する前の生物の組織、または生物の組織を薄切した切片に無細胞化する処理が施されている請求項1記載の細胞培養担体。

【請求項5】

生物の組織を薄切した切片に、生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することを特徴とする請求項1記載の細胞培養担体。

【請求項6】

生物の組織を薄切した切片に、酵素の処理など生物学的処理または酸やアルカリや界面

10

20

活性剤の処理など化学的処理を施して、切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変もしくは修飾することを特徴とする請求項 1 記載の細胞培養担体。

【請求項 7】

生物の組織を薄切するために、予め生物の組織が凍結または凍結包埋、パラフィン包埋、または樹脂包埋されている請求項 1 記載の細胞培養担体。

【請求項 8】

生物が動物または植物である請求項 1 記載の細胞培養担体。

【請求項 9】

動物が哺乳動物である請求項 8 記載の細胞培養担体。

【請求項 10】

生物の組織が、生前の発生段階にあるヒトを除く動物の全身又は一部である請求項 1 記載の細胞培養担体。

10

【請求項 11】

生物の組織が、生後のヒトを除く動物の全身、または動物の一部である請求項 1 記載の細胞培養担体。

【請求項 12】

請求項 1 ないし 11 記載のいずれかの細胞培養担体を培養容器に装入して動物細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。

【請求項 13】

動物細胞の培養を開始する手段が、細胞懸濁液、細切組織片、ヒトを除く受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊の播種によることを特徴とする請求項 12 記載の細胞培養方法。

20

【請求項 14】

播種した動物細胞が付着増殖して、切片または切片に由来する組織を、請求項 1 又は 2 記載のいずれかの支持体から剥離することを特徴とする請求項 12 又は 13 記載の細胞培養方法。

【請求項 15】

支持体から剥離した後に培養を続けることで、切片または切片に由来する組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝集塊を形成することを特徴とする請求項 14 記載の細胞培養方法。

30

【請求項 16】

培養する動物細胞が、初代培養細胞、株化細胞、ヒトを除く受精卵、および/またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞から選ばれる 1 種または 2 種以上である請求項 12 記載の細胞培養方法。

【請求項 17】

培養する動物細胞が、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および/または脱分化した細胞に由来することを特徴とする請求項 12 記載の細胞培養方法。

【請求項 18】

未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 17 記載の細胞培養方法。

40

【請求項 19】

動物細胞を培養する培養液が、血清含有の培養液または血清非含有の無血清培養液であることを特徴とする請求項 12 ないし 18 記載のいずれかの細胞培養方法。

【請求項 20】

請求項 12 ないし 19 記載のいずれかの細胞培養方法により培養した動物細胞を、ヒトを除く動物に移植することを特徴とする細胞移植方法。

【請求項 21】

移植する動物がヒトを除く哺乳動物である請求項 20 記載の細胞移植方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体と、この担体を用いる動物細胞の培養方法および移植方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、培養系に於いて動物細胞に生体組織の場所的かつ時間的環境情報を提供するための培養担体と、その培養担体上での動物細胞の培養方法、およびその培養担体上で培養した細胞の移植方法に関するものであり、様々な生体組織由来の担体上で様々な細胞を培養できるので、当該担体を利用した機能細胞の培養維持、細胞の挙動や機能の評価、および生体に近い組織の再構築を可能とし、遺伝子機能の評価、培養臓器の開発、もしくは細胞移植等に有用である。

【0002】

10

【従来の技術】

培養下における動物細胞は、その培養環境を工夫することで、医薬品等の生理活性物質の開発研究やその製造手段、あるいは培養臓器の作製やその移植へと活用領域が拡大し、現代社会に貢献している。そして従来より、動物由来の機能細胞に目的とする能力を発揮させるために、動物細胞用の様々な培養担体が開発されてきている。なぜなら、培養担体の素材と形状を創意工夫することで、細胞の接着、伸展、移動、浸潤、増殖、分化、極性、自己組織化等の細胞挙動、さらには細胞と培養液の相互作用機構を制御することができるからである。

【0003】

これまでの培養担体の素材は、天然物由来素材、人工素材、および天然物由来素材と人工素材のハイブリッドに分類でき、それらの形状は、支持体への吸着体、支持体の被膜、フィルム、膜、プレート、シャーレ、フラスコ、中空系、糸および/またはその織成体、ゲル、ビーズ、等さまざまである。天然物由来素材としては、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、あるいはマトリゲル (EHS 腫瘍から抽出して再構成された基底膜; Kleinman, H. K., et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochem.* 25, 312, 1986.) などの動物組織から抽出した細胞外マトリックス構成成分、動物組織から調製した無細胞真皮マトリックス (Live sey, S. A., et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplant*, 60, 1, 1995.)、イガイ由来の接着蛋白質、絹、あるいは綿等が培養担体として開発されている。また、人工素材としては、ナイロン等の生体非吸収性の合成高分子、ポリグリコール酸等の生体吸収性の合成高分子、あるいはセラミックス等が培養担体として開発されている。

20

30

【0004】

一般に、動物の初代培養細胞は、培養担体としてプラスチックシャーレを用いて培養すると、生体内で発現していた組織特異的機能を失ってしまうが、細胞外マトリックス構成成分を含有する培養担体を用いて培養すると、比較的機能が維持されること、特に培養担体としてマトリゲルを用いて上皮系細胞を培養すると、細胞は分化して組織特異的機能が向上することが知られている。また、培養担体として無細胞真皮マトリックスを用いて表皮角化細胞を培養すると、角化細胞は分化して再構築表皮を無細胞真皮マトリックス上に形成することが知られている。これらの知見は、培養細胞に組織特異的機能もしくは三次元微細構造形態を誘導するためには、元来その細胞が生体内で存在していた場所的情報を培養担体に極力正確に反映することが重要であることを示唆している。動物の生体内組織に於いては、細胞は時間経過とともに未分化な状態から終末分化した状態へと変遷し、細胞の分化状態に対応して細胞外マトリックスも刻々と変化しているので、各々の細胞が局在している細胞外マトリックス環境も時間的支配下にある。つまり、生体内組織に於ける細胞の周囲環境は、場所的情報に加えて時間的情報も有している。

40

【0005】

しかしながら、様々な分化状態にある細胞で構成されている生体組織の環境を反映した培養担体、つまり、生体組織の場所的かつ時間的情報を正確に反映できるような培養担体は、これまで未開発であった。

50

【 0 0 0 6 】

それ故、任意の動物細胞に対して生体内に酷似した細胞外環境を付与する培養システムを実現することは、不可能であった。

【 0 0 0 7 】

【 発明が解決しようとする課題 】

この出願の発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、動物細胞の培養担体として、より生体組織に近い培養環境、即ち、目的とする生体組織の場所的かつ時間的情報が組込まれた環境を、提供することを課題としている。さらに、この出願の発明は、当該培養担体上で細胞を培養することにより、目的とする細胞と、生体組織の場所的かつ時間的情報との相互作用を利用した細胞の諸性質や特性の解明、およびその相互作用を利用した遺伝子の機能解析、さらには生体組織の鋳型を利用した組織の再構築、およびその再構築組織の移植を可能とすることを課題としている。

10

【 0 0 0 8 】

【 課題を解決するための手段 】

この出願の発明は、培養系に於いて動物細胞に生体組織の場所的かつ時間的環境情報を提供するために、通常は組織学や病理学の分野で顕微鏡観察の目的で調製される生体組織の薄切切片を、直接もしくは無細胞化するなどの処理を施した後に、培養担体として用いる方法を見出した。そこで、この出願の発明は、第 1 には生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体を提供し、さらに、第 2 には、生物の組織を薄切した切片が、支持体に付着または付着伸展している細胞培養担体を、第 3 には、支持体が、ガラス、プラスチック、ゴム、金属、天然または合成の糸および/またはその織成体、および生体吸収性材料から選ばれる 1 種以上である細胞培養担体を、第 4 には支持体には予め切片の付着または付着伸展を促進する処理が施されている細胞培養担体を提供する。

20

【 0 0 0 9 】

また、この出願の発明は、第 5 には、生物の組織が、新鮮な組織または予め固定液で固定した組織から調製される細胞培養担体を、第 6 には、薄切する前の生物の組織、または生物の組織を薄切した切片に無細胞化する処理が施されている組織から調製される細胞培養担体を、第 7 には、生物の組織を薄切した切片に、生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することを特徴とする細胞培養担体を、第 8 には、生物の組織を薄切した切片に、酵素の処理など生物学的処理または酸やアルカリや界面活性剤の処理など化学的処理を施して、切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変もしくは修飾することを特徴とする細胞培養担体を、第 9 には、生物の組織を薄切するために、予め生物の組織が凍結または凍結包埋、パラフィン包埋、または樹脂包埋されている組織から調製される細胞培養担体を、第 10 には、生物が動物または植物である細胞培養担体を、第 11 には、動物が哺乳動物である組織から調製される細胞培養担体を、第 12 には、生物の組織が、生前の発生段階にある動物の全身または一部である組織から調製される細胞培養担体を、第 13 には、生物の組織が、生後の動物の全身または一部である細胞培養担体を提供する。

30

【 0 0 1 0 】

そしてこの出願の発明は、第 14 には第 1 ないし第 13 の発明のいずれかの細胞培養担体を培養容器に装入して動物細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法を、第 15 には、動物細胞の培養を開始する手段が、細胞懸濁液、細切組織片、受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊の播種によることを特徴とする細胞培養方法を、第 16 には、播種した動物細胞が付着増殖して、切片または切片に由来する組織を、第 2 ないし第 4 の発明の支持体から剥離することを特徴とする細胞培養方法を、第 17 には、支持体から剥離した後に培養を続けることで、切片または切片に由来する組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝集塊を形成することを特徴とする細胞培養方法を、第 18 には、培養する動物細胞が、初代培養細胞、株化細胞、受精卵および/またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞から選ばれる 1 種または 2 種以上である細胞培養方法を、第 19 には、培養する動物細胞が、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および/または脱分化

40

50

した細胞に由来することを特徴とする細胞培養方法を、第20には、未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であることを特徴とする細胞培養方法を、第21には、動物細胞を培養する培養液が、血清含有の培養液または血清非含有の無血清培養液であることを特徴とする第14ないし第20の発明の細胞培養方法を、第22には、これらの細胞培養方法により培養した動物細胞を、動物に移植することを特徴とする細胞移植方法を、第23には、移植する動物が哺乳動物である細胞移植方法を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

この出願の発明は、上記のとおりの特徴を有するものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

10

【0012】

この出願の発明で用いられる生物の組織は、動物の生前または生後の全身または一部の組織であっても、植物の全体または一部の組織であっても、さらには、それらの組織が予め固定液で固定した組織であっても新鮮な組織であってもよい。固定液としては、メタノール、エタノール、アセトン、ホルマリン、グルタルアルデヒド等が挙げられる。哺乳動物としては、ヒト、サル、ウシ、羊、ヤギ、ヒヒ、ブタ、イヌ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等が挙げられる。動物の組織は、全身または一部組織であれば特に限定されないが、例えば、脳、脊髄、筋肉、皮膚、血管、食道、胃、小腸、大腸、心臓、肺臓、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、骨、軟骨、骨髄、子宮、卵巣、卵管、精巣、胎盤、臍帯等が挙げられ、さらにそれらの正常組織であっても、腫瘍をはじめ各種病巣組織であってもよい。

20

【0013】

この発明で用いられる生物の組織を薄切した切片は、凍結切片であっても、パラフィン切片であっても、または樹脂切片であってもよい。組織学や病理学の分野では、動物や植物の全体または一部組織の薄切切片を作製して、スライドガラス上に薄切切片を伸展し、種々の染色を施した後に顕微鏡で観察するといった一連の実験手法は、極めて日常的である。生体組織の薄切切片には、言うまでもなく生体組織の場所的かつ時間的情報が全て含まれており、各々の情報は一般染色のみならず免疫組織化学的手法やin situハイブリダイゼーション技術により解析が可能である。

30

【0014】

このような技術を利用して、薄切切片に生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することも可能である。生理活性物質としては、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、核酸、低分子化合物、等が挙げられる。これら生理活性物質の作用としては、抗体活性、酵素活性、ホルモン、サイトカイン、細胞接着、増殖、分化、再生、形態形成、等が挙げられる。

【0015】

さらに、薄切切片に酵素の処理など生物学的処理を施したり、もしくは酸やアルカリや界面活性剤の処理など化学的処理を施したりして、薄切切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変したり修飾したりすることも可能である。この出願の発明においても、凍結切片は、未固定もしくはホルマリン等で固定した生物の組織を直接、もしくはOCTコンパウンドに包埋した後に液体窒素等で急速冷凍した後、凍結ミクロトームで1~50 μ m、好ましくは4~20 μ mの厚さに薄切して調製すること等ができる。未固定の凍結切片は、薄切後にホルマリン等で固定することもできる。パラフィン切片は、通常、生物の組織をホルマリン等で固定した後、エタノールで脱水し、キシレン、パラフィンと置換して、パラフィンに包埋した後に、ミクロトームで0.5~50 μ m、好ましくは2~20 μ mの厚さに薄切して調製する。また、樹脂切片は、通常、生物の組織をホルマリン等で固定した後、エタノールで脱水し、ヒストレジン等の樹脂に包埋した後に、ミクロトームで0.1~50 μ m、好ましくは0.5~10 μ mの厚さに薄切して調製する。

40

【0016】

50

また、この発明で用いられる無細胞化の処理は、薄切する前の生物の組織に施されても、もしくは生物の組織を薄切した切片に施されてもよい。無細胞化の処理には、塩類、アルカリ、界面活性剤、キレート剤、または酵素等を含む溶液が単独もしくは組み合わせて用いられる。塩類としては、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸カリウム等が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、アンモニア等が挙げられる。また、界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、Triton X-100、Tween 20 および 80 等が挙げられ、キレート剤としては、EDTA、EGTA 等が挙げられる。さらに、酵素としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、エラスターゼ、パイン、マトリックスメタロプロテアーゼ等の蛋白分解酵素、ヒアルロニダーゼ等の糖分解酵素、デオキシリボヌクレアーゼ等の核酸分解酵素等が挙げられる。

10

【0017】

この発明で用いられる生物組織の薄切切片からなる培養担体は、薄切切片のみから構成されていても、薄切切片がガラス、プラスチック、ゴム、金属、天然または合成の糸および/またはその織成体、および生体吸収性材料等の支持体に付着または付着伸展した複合体から構成されていてもよい。また、支持体に予め切片の付着または付着伸展を促進する処理が施されていてもよい。切片の付着または付着伸展を促進する処理としては、支持体へのポリリジン、APS 等のコートが挙げられる。また、培養担体とする薄切切片に OCT コンパウンド、パラフィン、樹脂等が混入している場合は、水洗、脱パラフィン処理、もしくは脱樹脂処理を施すこともできる。さらに、培養担体とする薄切切片には、エタノール処理、エチレンオキシドガス処理、および線や紫外線処理等の滅菌処理を施すこともできる。

20

【0018】

そして、この発明で用いられる動物細胞は、初代培養細胞であっても、株化細胞であっても、受精卵であっても、またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞であってもよく、さらに細胞は 1 種類であっても 2 種類以上であってもよい。

【0019】

さらに、動物細胞は、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および/または脱分化した細胞のいずれに由来してもよい。未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であってもよい。このような動物細胞の培養は、細胞懸濁液、細切組織片、受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊を播種することで開始できる。動物細胞の培養に用い

30

【0020】

また、この発明の培養担体を用いる動物細胞の培養は、例えば、動物の組織を厚さ 6 μm に薄切した凍結切片の 1 または 2 以上の 1 枚または 2 枚以上を付着伸展したスライドグラスに、固定、無細胞化、滅菌、培養液を用いた平衡化等の必要な処理を施した後に、そのスライドグラスを培養シャーレに装入して、動物細胞の懸濁液を播種することで、容易に達成できる。さらに、この発明の培養担体を用いる動物細胞の移植は、例えば、動物の組織を厚さ 6 μm に薄切した凍結切片を付着した生体吸収性メッシュに、固定、無細胞化、滅菌、培養液を用いた平衡化等の必要な処理を施した後に、その生体吸収性メッシュを培養シャーレに装入して、動物細胞の懸濁液を播種して培養した後の培養担体を移植することで、容易に達成できる。

40

【0021】

【実施例】

(実施例 1：動物組織を薄切した切片からなる細胞培養担体の作製)

50

屠殺により採取した妊娠241日齢のウシ胎盤をOCTコンパウンドに包埋した後に、液体窒素で急速凍結した。凍結マイクロトームで、5, 10, 20 μmに薄切した切片を、スライドガラス(松浪硝子工業(株)製S-0317)上に調製した。これ以降の操作は、クリーンベンチ内で行った。この凍結切片を付着伸展したスライドガラス4枚を、菌液トレイ(住友ベークライト(株)製MS-3300N)に装入した(図1参照)。この菌液トレイに20mlのHBSS(Hanks' Balanced Salt Solution; GIBCO BRL#14025-092)を注入して、室温で5分間静置した後に除去した。この操作で、切片よりOCTコンパウンドを除去した。次に、菌液トレイに20mlの70%エタノールを注入して、室温で10分間静置した後に除去した。この操作で、切片組織の固定および滅菌を行った。その後、菌液トレイ内の切片付着スライドガラスを20mlのHBSSで2回、20mlの培養液で1回、リンスした。このようにして、ウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体を、スライドガラスを支持体として、以後培養容器として使用する菌液トレイ内に作製した。この細胞培養担体を、定法に従いヘマトキシリン・エオシン染色で観察した。その結果、この細胞培養担体はウシ胎盤の組織であることが確認できた(図2参照)。

10

【0022】

一方、屠殺により採取した発情後13日目の未経産ウシの子宮を、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、病理組織学の定法に従いパラフィンに包埋した。マイクロトームで5 μmに薄切した切片を、スライドガラス(松浪硝子工業(株)製S-0317)上に付着伸展した。このスライドガラスを、キシレンで脱パラフィン処理した後、100%から50%までのエタノールで順次処理した。これ以降の操作は、クリーンベンチ内で行った。切片を付着伸展したスライドガラス1枚を、直径100mmの培養皿(Falcon #351001)に挿入した。この培養皿に、10mlのHBSSを注入して、室温で5分間穏やかに攪拌することで、切片をスライドガラスより剥離した。剥離した切片を、ピペットで少量でのHBSSと共に、予め2mlの滅菌水を注いである直径35mmのポリスチレン製の親水性培養皿(Falcon #353001)あるいは疎水性培養皿(Falcon #351008)に、1枚の培養皿に1切片ずつ移し入れた。各々の培養皿内で、切片を2mlの滅菌水で2回リンスした。親水性培養皿については、切片を伸展した状態で、できるだけ滅菌水を除去してから風乾した。このようにして、ウシ子宮のパラフィン切片由来の細胞培養担体を、直径35mmのポリスチレン製の親水性培養皿を支持体として作製した(図3参照)。疎水性培養皿については、滅菌水で2回リンスした後、2mlの70%エタノールで1回リンスした。そして、切片を伸展した状態で、できるだけ70%エタノールを除去してから風乾した。このようにして、ウシ子宮のパラフィン切片由来の細胞培養担体を、直径35mmのポリスチレン製の疎水性培養皿を支持体として作製した(図4参照)。

20

30

(実施例2:無細胞化処理した切片からなる細胞培養担体の作製)

実施例1と同様に、クリーンベンチ内の菌液トレイへウシ胎盤の凍結切片を付着伸展したスライドガラスを装入して、20mlのHBSSを注入し室温で5分間静置して、切片よりOCTコンパウンドを除去した。次に、菌液トレイ内の切片付着スライドガラスを1枚ずつ、直径100mmの培養皿(Falcon #351001)に移し入れた。各々10mlの0.01, 0.1, 0.5, および1.0%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を注入して、室温で10分間静置した後に除去した。この操作で、切片組織を無細胞化することを検討した。その後、培養皿内の切片付着スライドガラスを20mlのHBSSで2回、10mlの培養液で1回、リンスした。各々の切片を、定法に従いヘマトキシリン・エオシン染色で観察した。その結果、0.1%SDSで処理することで、ウシ胎盤の凍結切片は無細胞化できることが確認できた(図5-8参照)。このようにして、ウシ胎盤の凍結切片を無細胞化した細胞培養担体を、スライドガラスを支持体として作製した。

40

(実施例3:ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのBeWo細胞の培養)

ヒトの絨毛癌細胞株であるBeWo細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体の毒性、および細胞の接着伸展や増殖性に対する影響、さらに切片の厚さの違いによる細胞形態への影響を検討した。BeWo細胞(ヒューマンサイエンス振興財団より分譲JCRB9111)は、培養液(15%非動化牛胎仔血清(SIGMA #F-2442)、100units/mlペニシ

50

リン、および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (GIBCO BRL#15140-148) を含有する Ham's F12 (GIBCO BRL #11765-054) で継代培養した。

【0023】

実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5 \mu\text{m}$ の凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5 \mu\text{m}$ の凍結切片を 0.1% SDS 処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に各々スライドグラス2枚ずつ計4枚を挿入した。この菌液トレイに、 20ml の培養液に懸濁した BeWo 細胞を、終濃度が $2.1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、 $5\% \text{CO}_2$ 、 95% 空気、 37 の保湿インキュベータ内で培養した。培養1日目に、菌液トレイ内のスライドグラスを、 10ml の培養液を入れた直径 100mm の培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、毎日培養液の交換を行い、4日目まで培養した。培養1日目と4日目に、培養細胞の位相差顕微鏡による形態観察、および生存細胞の calcein AM (Molecular Probes #L-3224) 代謝能を利用した calcein 蛍光発色の蛍光顕微鏡による観察を行った。培養細胞の calcein AM 代謝能は、培養皿内の培養液を除去し、 10ml の PBS で細胞を2回リンスした後、 10ml の $2 \mu\text{M}$ calcein AM を含む HBS で15分間、 $5\% \text{CO}_2$ 、 95% 空気、 37 の保湿インキュベータ内で培養した後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、切片上、および無細胞化処理した切片上でも、切片の付着していないスライドグラス上と同様に、細胞は培養1日目で接着伸展し、培養4日目には増殖していること、さらに、接着伸展し増殖した細胞は、いずれの担体上でも生存していることが分かった (図9-20参照)。この結果は、切片、および無細胞化処理した切片からなる細胞培養担体には、細胞毒性が無いことを示唆する。

10

20

【0024】

次に、実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5, 10, 20 \mu\text{m}$ 凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5, 10, 20 \mu\text{m}$ 凍結切片を 0.1% SDS 処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、 20ml の培養液に懸濁した BeWo 細胞を、終濃度が $4.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、 $5\% \text{CO}_2$ 、 95% 空気、 37 の保湿インキュベータ内で1日間培養した。位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察を行った結果、切片の付着していないスライドグラス上では、接着したコロニー内で個々の細胞は敷石状によく伸展していたが、切片上および無細胞化処理した切片上では切片の厚みが増すにつれて、接着したコロニー内で個々の細胞は丸く凝集する傾向を示すことが分かった (図21-27参照)。

30

(実施例4：ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上での NHDF 細胞の培養)

正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞である NHDF 細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体を取り込んだ多細胞性三次元凝集塊の形成を検討した。NHDF 細胞 (倉敷紡績 (株) KF-4109) は、培養液 (10% 非動化牛胎仔血清、 20mM HEPES (GIBCO BRL #15630-080)、 $100 \text{units}/\text{ml}$ ペニシリン、および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含有する DME M (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO BRL #11885-084)) で継代培養した。

【0025】

実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5, 10, 20 \mu\text{m}$ 凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の $5, 10, 20 \mu\text{m}$ 凍結切片を 0.1% SDS 処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、 20ml の培養液に懸濁した NHDF 細胞を、終濃度が $3.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、 $5\% \text{CO}_2$ 、 95% 空気、 37 の保湿インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドグラスを、 10ml の培養液を入れた直径 100mm の培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに培養液の交換を行い、9日目まで培養した。位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察を行った結果、培養7日目に、無細胞化処理した $20 \mu\text{m}$ 切片上で多層化増殖した細胞は、切片由来組織を取り込んでシート状にスライドグラスから剥離し始め (図28、29参照)、軽く

40

50

ピペッティングすることで完全に剥離し培養液中に浮遊した(図30参照)。この剥離した細胞シートを、細胞が接着し辛いとされている直径35mmのポリスチレン製の疎水性培養皿へ、2mlの培養液と共に移し入れて培養を続けた。切片由来組織を取り込んだ細胞シートは、疎水性培養皿内で培養して7時間目にはかなり凝集し(図31参照)、2日目(培養開始後9日目)には周囲が滑らかな三次元の高細胞性凝集塊を形成した(図32参照)。なお、培養開始後8日目には、無細胞化処理した10 μ m切片上で多層化増殖した細胞もスライドガラスから剥離し始めることが、さらに、培養開始後9日目には、残りの5, 10, 20 μ m切片上および無細胞化処理した5 μ m切片上で多層化増殖した細胞も、スライドガラスから剥離し始めることが分かった。

(実施例5:ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのCPAE細胞の培養)

ウシの肺動脈血管内皮細胞株であるCPAE細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体による形態形成を検討した。CPAE細胞(ヒューマンサイエンス振興財団より分譲JCRB9022)は、培養液(10%非動化牛胎仔血清、20mM HEPES、100units/mlペニシリン、および100 μ g/mlストレプトマイシンを含有するDMEM)で継代培養した。

【0026】

実施例1でスライドガラス上に作製したウシ胎盤の5 μ m凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドガラス上に作製したウシ胎盤の5 μ m凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの培養液に懸濁したCPAE細胞を、終濃度が3.4 $\times 10^4$ /cm²となるように播種して、5%CO₂、95%空気、37 $^{\circ}$ Cの保湿インキュベータ内で培養した。培養1日後に、菌液トレイ内のスライドガラスを、10mlの培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに培養液の交換を行い、3日目まで培養した。その結果、培養1日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察では、切片の付着していないスライドガラス上で培養した細胞は敷石状形態を示す細胞が多いのに対して、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は比較的細長く伸展した形態を示す細胞が多いことが分かった(図33-35参照)。さらに、培養3日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察、およびヘマトキシリン・エオシン染色したスライドガラスの光学顕微鏡による観察では、切片の付着していないスライドガラス上で培養した殆どの細胞は敷石状形態を示すのに対して、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、切片由来組織を取り込んで血管網様構造を形成することが分かった(図36-40参照)。

(実施例6-ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのPC-12細胞の培養)

ラット褐色細胞腫であるPC-12細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体による形態形成を、通常の継代培養に用いる培養液による培養と無血清培養液による培養の両方で検討した。PC-12細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行より分譲RCB0009)は、培養液(10%非動化牛胎仔血清、20mM HEPES、100units/mlペニシリン、および100 μ g/mlストレプトマイシンを含有するDMEM)で継代培養した。

【0027】

実施例1でスライドガラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20 μ m凍結切片からなる細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの培養液に懸濁したPC-12細胞を、終濃度が14.5 $\times 10^4$ /cm²となるように播種して、5%CO₂、95%空気、37 $^{\circ}$ Cの保温インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドガラスを、10mlの培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、毎日培養液の交換を行い、2日目まで培養した。2日間培養した後に、スライドガラスをヘマトキシリン・エオシン染色して光学顕微鏡による観察を行った結果、5, 10, 20 μ mのいずれの厚みの切片においてもウシ胎盤由来の細胞が観察できないこと(図41-43参照)、および切片上で培養した細胞は、切片の付着していないスライドガラス上で培養した細胞に比べて大きく接着伸展していること(図44参照

10

20

30

40

50

)が分かった。さらに、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域では、胎盤中隔上で敷石状細胞が主に接着伸展して、胎盤中隔の縁に沿って扁平化細胞が接着伸展していること(図42参照)、ウシ胎盤切片上で、絨毛叢に接する子宮小丘の結合織が豊富な領域では、敷石状細胞が接着伸展していること(図45参照)、および、ウシ胎盤切片上で、子宮小丘の粘膜固有層側の領域では、子宮腺や血管の内腔側に沿って扁平化細胞が接着伸展していること(図46参照)が分かった。この結果は、培養細胞が、切片上の微細構造を認識して細胞形態を変化させていることを示唆する。

【0028】

次に、実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5 μ m凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5 μ m凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの無血清培養液に懸濁したPC-12細胞を、終濃度が $4.6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して5%CO₂、95%空気、37 $^{\circ}$ Cの保温インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドグラスを、10mlの無血清培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに無血清培養液の交換を行い、5日目まで培養した。その結果、培養5日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察では、切片の付着していないスライドグラス上で培養した細胞は、殆んど全てが死んでいる(図47参照)のに対して、無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、敷石状に接着伸展して生きている細胞もいること(図48参照)、さらに、切片上で培養した細胞は、殆んど全てが敷石状に接着伸展して生きていること(図49参照)が分かった。さらに、培養5日目のスライドグラスをヘマトキシリン・エオシン染色した後の光学顕微鏡による観察では、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、敷石状に接着伸展して生きていること、さらに、切片上で培養した場合にもウシ胎盤由来の細胞が明瞭に観察できること、および無細胞化処理した切片上で培養した場合は、ウシ胎盤由来の細胞が除去された無細胞組織が明瞭に観察できることが分かった(図50、51参照)。この結果は、切片からなる細胞培養担体は、無血清培養した際に、細胞の長期間生存維持を可能にすること、および、細胞を無血清培養することで、長期間培養後でも切片由来の細胞や組織を維持できることを示唆する。

【0029】

もちろん、この発明は、以上の例によって何ら限定されるものではない。スライドグラスの上には、複数個(枚)の切片が載置されていてもよいことは言うまでもない。そして切片を作製する動物組織はもとより、培養対象となる動物細胞、切片の状態、支持体、培養液組成、培養条件などについても様々な態様が可能であることは多言を要しない。この出願の発明は、これら各種の形態、態様を包括するものである。

【0030】

【発明の効果】

この出願の発明により、動物細胞の培養担体として、より生体組織に近い培養環境、即ち、目的とする生体組織の場所的かつ時間的情報が組み込まれた環境が提供される。この出願の発明の培養担体上で細胞を培養することにより、目的とする細胞と、生体組織の場所的かつ時間的情報との相互作用を利用した細胞の諸性質や特性の解明、およびその相互作用を利用した遺伝子の機能解析、さらには生体組織の鋳型を利用した組織の再構築、およびその再構築組織の移植が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を付着伸展したスライドグラス4枚を、菌液トレイに装入した実体写真。

【図2】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図3】5 μ mに薄切した発情後13日目の未経産ウシ子宮のパラフィン切片を、付着伸展した直径35mmのポリスチレン製の親水性培養皿の実体写真。

【図4】5 μ mに薄切した発情後13日目の未経産ウシ子宮のパラフィン切片を、付着伸

10

20

30

40

50

展した直径35mmのポリスチレン製の疎水性培養皿の実体写真。

【図5】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.01%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図6】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図7】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.5%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図8】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を1.0%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図9】切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図10】切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図11】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図12】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養したcalcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図13】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図14】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図15】切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図16】切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図17】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図18】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図19】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図20】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図21】切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図22】5 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μ mに相当)

【図23】10 μ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo

10

20

30

40

50

細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図24】20 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図25】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図26】10 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図27】20 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

10

【図28】20 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、NHDF細胞を培養した。切片上で多層化増殖した細胞は、培養7日目に、切片由来組織を取り込んでシート上にスライドガラスから剥離し始めた。その位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図29】20 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、NHDF細胞を培養した。切片上で多層化増殖した細胞は、培養7日目に、切片由来組織を取り込んでシート上にスライドガラスから剥離し始めた。図28と異なる部分の位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

20

【図30】20 μmの切片上で多層化増殖したNHDF細胞が、完全に培養液中に剥離したときの位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図31】切片由来組織を取り込んだ細胞シートを、疎水性培養皿内で培養して7時間後の位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図32】疎水性培養皿内で培養して2日後に形成された、切片由来組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝縮塊の位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図33】切片の付着していないスライドガラス上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図34】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

30

【図35】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図36】切片の付着していないスライドガラス上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図37】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図38】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

40

【図39】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図40】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μmに相当)

【図41】5 μmに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200 μmに相当)

50

【図42】10 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200 μm に相当)

【図43】20 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200 μm に相当)

【図44】切片の付着していないスライドグラス上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

10

【図45】10 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。特に、ウシ胎盤切片上で、絨毛叢に接する子宮小丘の結合織が豊富な領域。(写真上のバーは、200 μm に相当)

【図46】10 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。特に、ウシ胎盤切片上で、子宮小丘の粘膜固有層側の領域。(写真上のバーは、200 μm に相当)

【図47】切片の付着していないスライドグラス上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

20

【図48】5 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

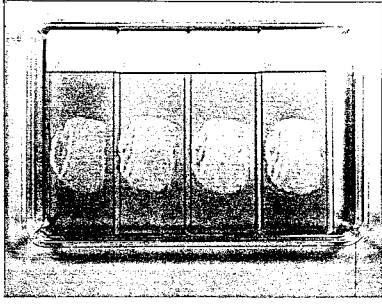
【図49】5 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

【図50】5 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

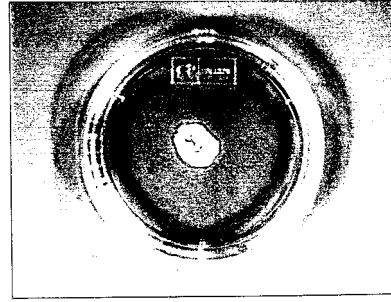
【図51】5 μm に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真。(写真上のバーは、200 μm に相当)

30

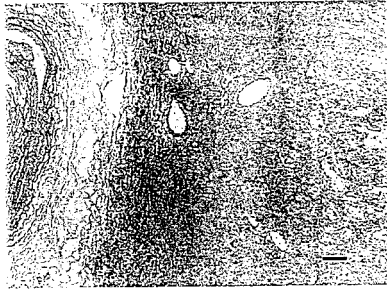
【図 1】



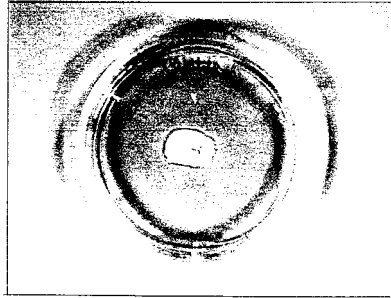
【図 3】



【図 2】



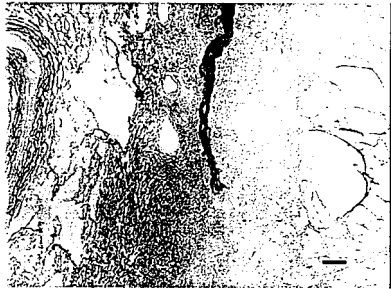
【図 4】



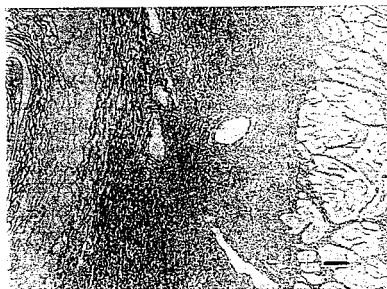
【図 5】



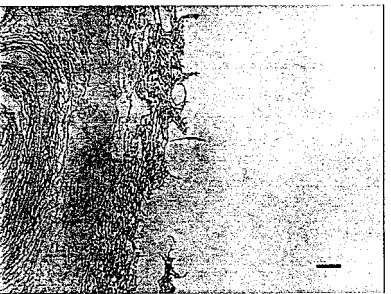
【図 7】



【図 6】



【図 8】



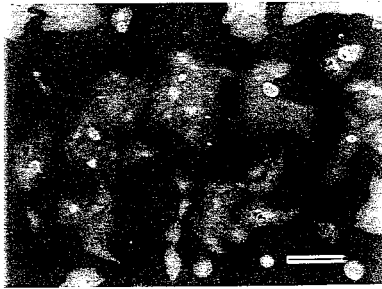
【図 9】



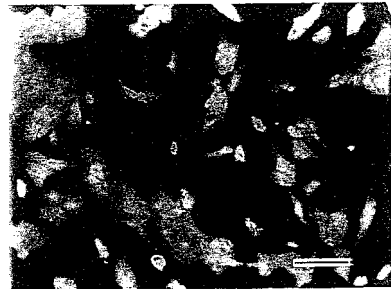
【図 11】



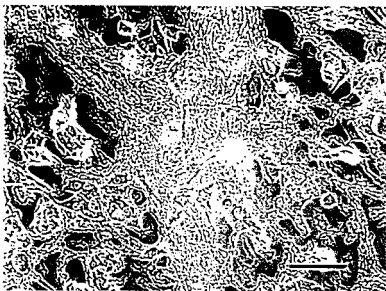
【図 10】



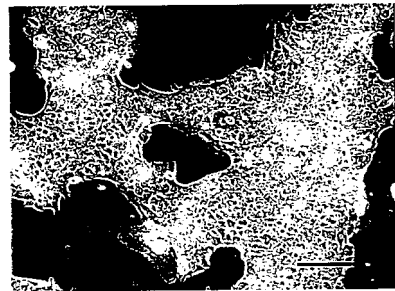
【図 12】



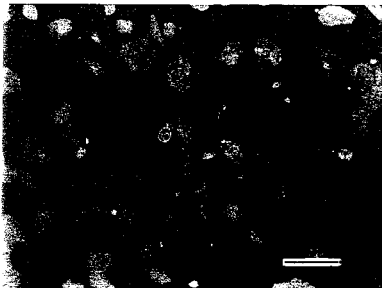
【図 13】



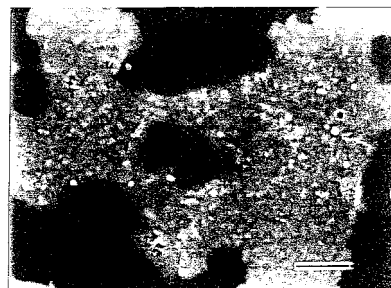
【図 15】




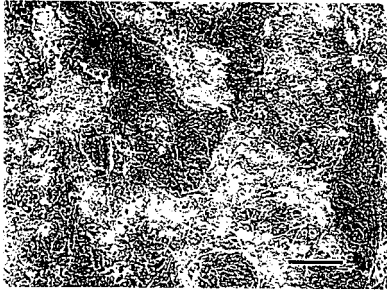
【図 14】




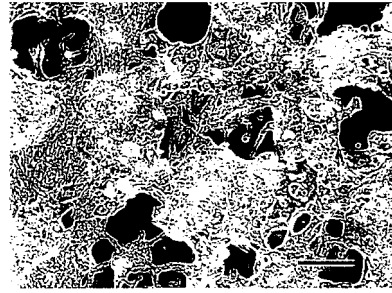
【図 16】




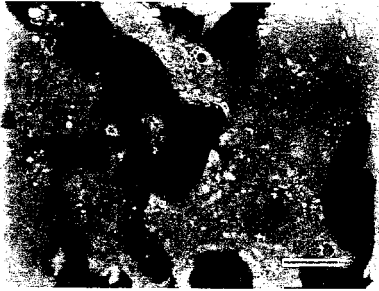
【 17】




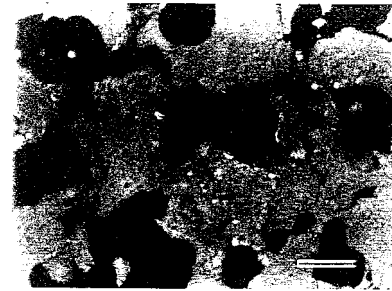
【 19】




【 18】




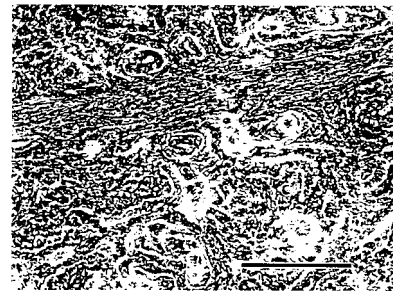
【 20】




【 21】




【 23】




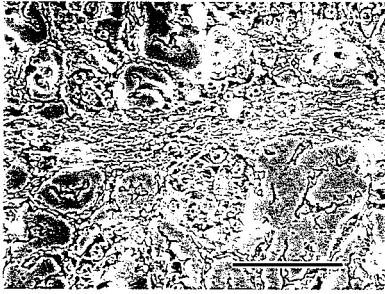
【 22】




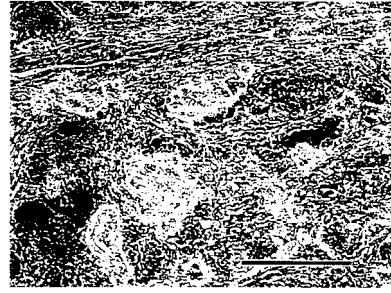
【 24】




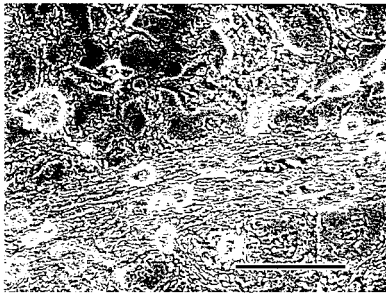
【 2 5】




【 2 7】




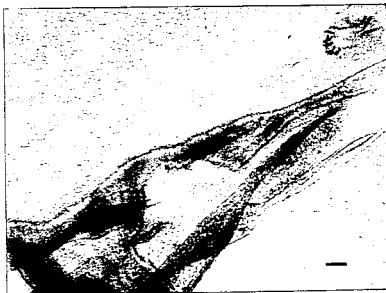
【 2 6】




【 2 8】




【 2 9】




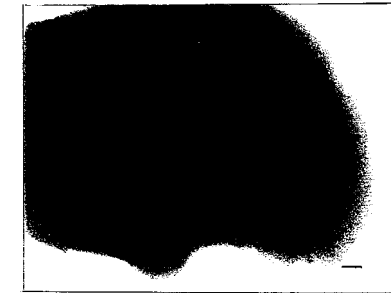
【 3 1】




【 3 0】




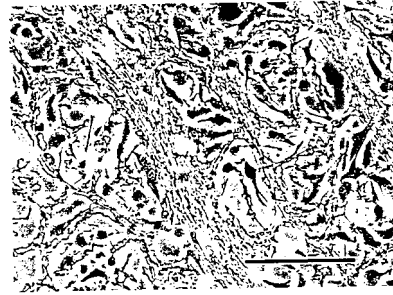
【 3 2】




【 3 3】




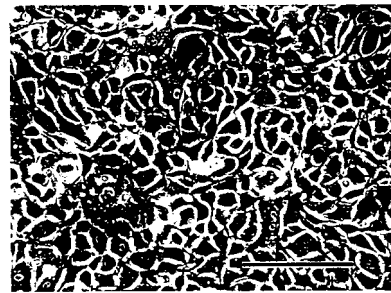
【 3 5】




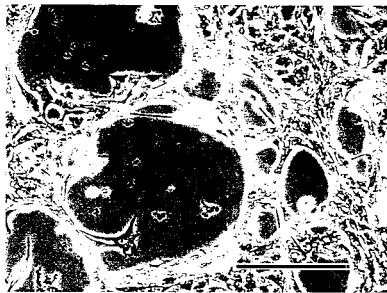
【 3 4】




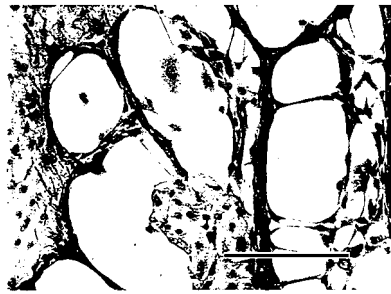
【 3 6】




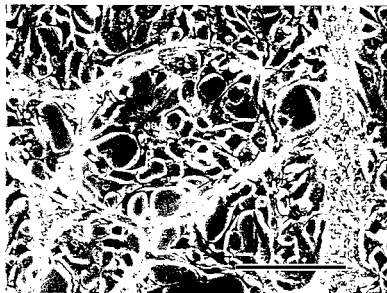
【 3 7】




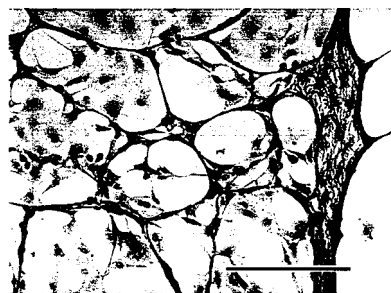
【 3 9】



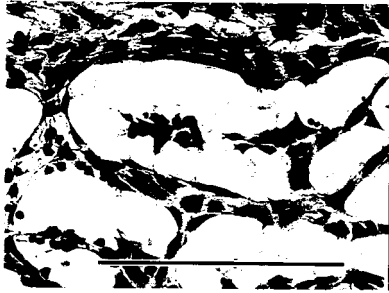
【 3 8】



【 4 0】



【 図 4 1 】



【 図 4 3 】



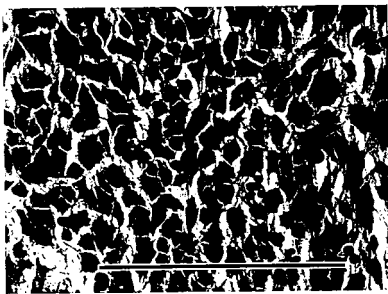
【 図 4 2 】



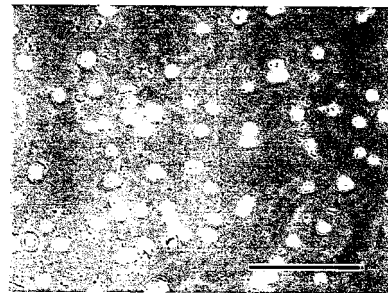
【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



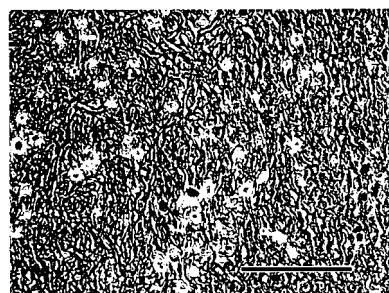
【 図 4 7 】




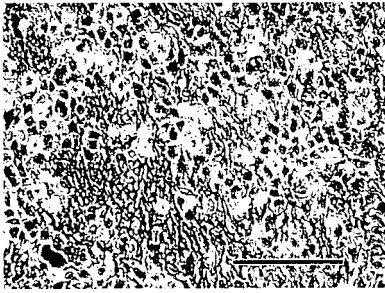
【 図 4 6 】




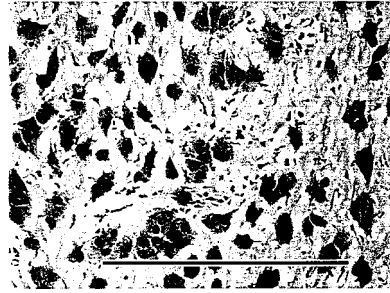
【 図 4 8 】




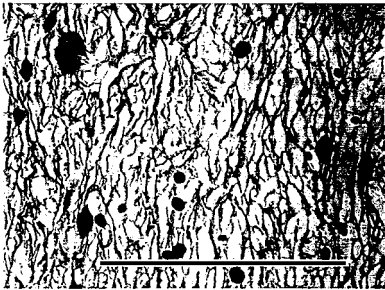
【 49】



【 51】



【 50】



フロントページの続き

- (72)発明者 高橋 透
茨城県つくば市松代5 - 1 5 - 5 0 3 - 4 0 2
- (72)発明者 橋爪 一善
東京都葛飾区堀切1 - 4 1 - 9 - 4 0 3

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 Eur. J. Cardiothorac. Surg., (1998), 14, [3], p.279-284
Anat. Embryol., (1999), 199, [4], p.319-327

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C12N 11/00-13/00
 - C12N 1/00-7/08
 - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 - PubMed