

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-73107

(P2014-73107A)

(43) 公開日 平成26年4月24日(2014.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/04 (2006.01)	C 1 2 M 3/04 Z	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2012-222744 (P2012-222744)	(71) 出願人	000231361 日本写真印刷株式会社 京都府京都市中京区壬生花井町3番地
(22) 出願日	平成24年10月5日 (2012.10.5)	(74) 代理人	100116816 弁理士 藤原 道彦
		(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
		(72) 発明者	小尾 奈緒子 京都府京都市中京区壬生花井町3番地 日本写真印刷株式会社内
		(72) 発明者	住吉 千夏子 京都府京都市中京区壬生花井町3番地 日本写真印刷株式会社内

最終頁に続く

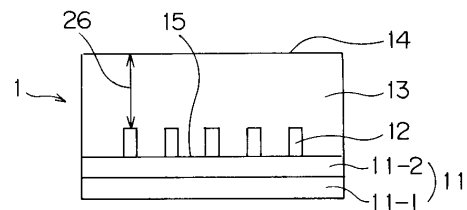
(54) 【発明の名称】 細胞培養部材と細胞培養方法

(57) 【要約】

【課題】 培養細胞集合体の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養部材を得ることを課題とする。

【解決手段】 基板11の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位12を形成し、ハイドロゲル部位12を覆って層状の培養部位13を形成した細胞培養部材1である。培養部位の表面が第一の細胞種播種面14である。ハイドロゲル部位12は細胞成長因子を浸潤している、ハイドロゲル部位の厚さは、ハイドロゲル部位12から培養部位13に細胞成長因子を培養期間に渡り徐放可能な厚さである。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

基板の上に、  
 パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成し、  
 前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成した細胞培養部材において、  
 前記培養部位の表面が第一の細胞種播種面であり、  
 前記ハイドロゲル部位は細胞成長因子を浸潤していて、  
 前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放することを特徴とする細胞培養部材。

## 【請求項 2】

前記ハイドロゲル部位の厚さは、前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を 2 日以上 21 日以下徐放する厚さであることを特徴とする請求項 1 に記載した細胞培養部材。

## 【請求項 3】

前記ハイドロゲル部位の厚さは、1  $\mu$ m 以上 30 mm 以下であることを特徴とする請求項 1 に記載した細胞培養部材。

## 【請求項 4】

前記ハイドロゲル部位は熱架橋ゼラチンからなるものである請求項 1 乃至 3 いずれかに記載した細胞培養部材。

## 【請求項 5】

前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率が 70 % 以上 99 % 以下であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれかに記載した細胞培養部材。

## 【請求項 6】

以下の工程からなる細胞培養方法。

イ．基板の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成する工程

ロ．前記ハイドロゲル部位に細胞成長因子を浸潤する工程

ハ．前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成し、細胞培養部材を完成する工程

ニ．前記培養部位の表面に第一の細胞種を播種する第一細胞種播種工程

ホ．第一細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第一細胞種培養工程

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載した細胞培養方法において、ニの工程である第一細胞種播種工程に使用する第一の細胞種は、播種前に飢餓処理を行った細胞であることを特徴とする請求項 6 に記載した細胞培養方法。

## 【請求項 8】

前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率を 70 % 以上 99 % 以下の範囲とし、ハイドロゲルの含水率を前記範囲内で変更することにより前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放する期間を調整することを特徴とする請求項 6 又は 7 いずれかに記載した細胞培養方法。

## 【請求項 9】

請求項 6 に記載した細胞培養方法において、

ホの工程である第一細胞種培養工程に続いて、以下の工程を行うことを特徴とする細胞培養方法。

ヘ．前記培養部位に第二の細胞種を播種する第二細胞種播種工程

ト．第二細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第二細胞種培養工程

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は人や動物等の細胞の培養を生体外で行うための細胞培養部材に関する。また、本発明は細胞の培養を生体外で行う細胞培養方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

生体内で細胞はある規則をもって三次元的に配列及び配置されている。しかしながら現状の細胞培養では、この細胞の配列・配置に関する技術はきわめて限られている。

## 【0003】

これまで、二次元の細胞配列に関しては報告がある。例えば、細胞接着性表面と非接着性表面というパターンを形成し、それにより細胞の二次元接着、それに続く増殖パターンを制御することが行われている。一例を挙げれば、従来、基材上に温度応答性高分子を微細な線幅でパターンングした細胞培養支持体と、当該細胞培養支持体で細胞を培養する細胞培養方法が知られている（例えば特許文献1参照）。上述の細胞培養支持体は、細胞培養部位を毛細血管の線幅でパターンングできるので、培養細胞の構造を二次元的（膜面方向）に制御することができる。

10

## 【0004】

これに対して、三次元での細胞配列に対する技術方法論はほとんどない。細胞シートを重ねて細胞の三次元配列を実現する技術が報告されている（例えば特許文献2参照）。しかし、細胞が重層化された内部の構造は必ずしも人為的に制御されているとは言えない。また、従来、細胞を三次元的・立体的に増殖させ塊形状の細胞塊を作る細胞培養法が提案されている。しかしながら、この方法論においても、三次元的での細胞配列は人為的に制御することはできない。

20

## 【0005】

細胞の三次元・立体培養（塊形状培養）では、しばしば、立体形状内部に位置する細胞への酸素や栄養の供給が悪く、内部細胞の機能低下、あるいは細胞の死滅が生じる。これに対して、生体は細胞の三次元的集合体からできているにもかかわらず、このような問題は生じない。その理由は、三次元細胞集合体中に血管が存在し、立体形状内部の細胞に酸素と栄養をうまく供給しているからである。

30

## 【0006】

このように三次元で細胞を生存、機能させるためには血管網の形成がKey（必須事項）である。この血管網の形成はまさに三次元の血管細胞の配列である。このような体内の組織構造に近い細胞配列の制御技術の開発が、今後の細胞生物学の発展に必要な課題となっている。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】特開2010-98973号公報

【特許文献2】特開2005-342112号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

そこで、本発明は、培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養部材を得ることを課題とする。

40

## 【0009】

本発明の他の課題は、培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能な細胞培養方法を提供することにある。また、本発明は第一細胞種の培養細胞（集合体）の構造を三次元方向に制御可能とし、さらに第二細胞種を共培養する細胞培養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】

## 【0010】

本発明では、細胞が細胞成長因子の濃度勾配に応答する性質を利用して、細胞の三次元配列を制御する。まず、基材上に、細胞成長因子を徐放（徐々に放出）するハイドロゲル層を、二次元パターンに形成する。次に、当該パターンを形成した基材上に細胞移動を可

50

能とする培養部位（例えばマトリゲル層）を置き、その培養部位上に細胞を播種する。

【0011】

細胞成長因子の放出にともない、培養部位内に細胞成長因子の三次元濃度勾配パターンが形成される。この三次元パターンに沿って細胞が移動する。その結果培養部位内に細胞成長因子の三次元濃度勾配パターンに従った、細胞配列が形成される。

【0012】

本発明は、ハイドロゲルからの細胞成長因子の徐放性と、ハイドロゲルの二次元パターンを組み合わせて、培養部位内で三次元での細胞配列を可能とした。

【0013】

本発明の一の態様にかかる細胞培養部材は、

基板の上に、

パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成し、

前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成した細胞培養部材において、

前記培養部位の表面が第一の細胞種播種面であり、

前記ハイドロゲル部位は細胞成長因子を浸潤して、

前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放することを特徴とする。

【0014】

本発明にかかる細胞培養部材の好ましい実施態様にあつて、前記ハイドロゲル部位の厚さが、前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を2日以上21日以下徐放する厚さであってもよく、また、前記ハイドロゲル部位の厚さが、1 $\mu$ m以上30mm以下であってもよい。

【0015】

本発明のさらに他の好ましい実施態様にかかる細胞培養部材は、

前記ハイドロゲル部位が熱架橋ゼラチンからなるものであつてもよく、また、前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率が70%以上99%以下であってもよい。

【0016】

本発明にかかる細胞培養方法は以下の工程からなる。

イ．基板の上に、パターン状、かつ層状のハイドロゲル部位を形成する工程

ロ．前記ハイドロゲル部位に細胞成長因子を浸潤する工程

ハ．前記ハイドロゲル部位を覆って層状の培養部位を形成し、細胞培養部材を完成する工程

ニ．前記培養部位の表面に第一の細胞種を播種する第一細胞種播種工程

ホ．第一細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第一細胞種培養工程

【0017】

本発明にかかる細胞培養方法の好ましい実施態様にあつては、

ニの工程である第一細胞種播種工程に使用する第一の細胞種は、播種前に飢餓処理を行った細胞であってもよく、また、前記ハイドロゲル部位を形成するハイドロゲルの含水率を70%以上99%以下の範囲とし、ハイドロゲルの含水率を前記範囲内で変更することにより前記ハイドロゲル部位から前記培養部位に細胞成長因子を徐放する期間を調整するものであつてもよい。

【0018】

本発明にかかる細胞培養方法のその他の好ましい実施態様にあつては、

ホの工程である第一細胞種培養工程に続いて、以下の工程を行うものであつてもよい。

ヘ．前記培養部位に第二の細胞種を播種する第二細胞種播種工程

ト．第二細胞種播種工程を終えた細胞培養部材を培養条件下に置く第二細胞種培養工程

【0019】

以上説明した本発明、本発明の好ましい実施態様、これらに含まれる構成要素は可能な限り組み合わせて実施することができる。

【発明の効果】

【0020】

10

20

30

40

50

本発明に係る細胞培養部材は、細胞成長因子を浸潤した一定の厚さを有するハイドロゲル部位を具備し、ハイドロゲル部位から細胞成長因子が徐放されるので、その他の発明特定事項とあわせて、培養中の第一の細胞種が培養部位の表面からハイドロゲル部位へ向かって移動と増殖を行う。この結果、ハイドロゲル部位のパターン形成に起因する第一の細胞種にかかる培養細胞（集合体）の二次元構造（基材の表面方向）を制御できるのみならず、培養部位の層厚さ方向への構造を制御できる。すなわち、培養細胞（集合体）の三次元構造を制御することができる。

【0021】

本発明にかかる細胞培養方法にあっても、上記細胞培養部材と同様に培養細胞（集合体）の三次元構造を制御できる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は細胞培養部材の断面説明図である。

【図2】図2は培養部位を取り除いた細胞培養部材の説明図であり、図2(a)は断面説明図、図2(b)は平面説明図である。

【図3】図3は第一の細胞種にかかる細胞培養方法の概念説明図であり、図3(a)は第一の細胞種播種直後、図3(b)は第一の細胞種培養初期、図3(c)は第一の細胞種培養後期のそれぞれの概念説明図である。

【図4】図4は実施例の評価結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、図面を参照して本発明の実施例にかかる細胞培養部材と細胞培養方法をさらに説明する。本明細書において参照する各図は、本発明の理解を容易にするため、一部の構成要素を誇張して表すなど模式的に表しているものがある。このため、構成要素間の寸法や比率などは実物と異なっている場合がある。また、本発明の実施例に記載した部材や部分の寸法、材質、形状、その相対位置などは、とくに特定の記載のない限りは、この発明の範囲をそれらのみに限定する趣旨のものではなく、単なる説明例にすぎない。

【0024】

<細胞培養部材>

図1は細胞培養部材1の断面説明図であり、図2は培養部位13を取り除いた細胞培養部材1の説明図であり、図2(a)は断面説明図、図2(b)は平面説明図である。

【0025】

細胞培養部材1は基板11の上にハイドロゲル部位12を形成し、ハイドロゲル部位12を覆って培養部位13を形成したものである。ハイドロゲル部位12は細胞成長因子の徐放用担体である。また、ハイドロゲル部位12は第一の細胞種にかかる増殖細胞の接着部位でもある。

【0026】

基板11の形状は通常、平板、薄い平板、またはフィルム状である。基板11の上にパターン状にハイドロゲル部位12が形成されていて、ハイドロゲル部位12の無い部分は細胞非接着部分15が露出している。基板11を構成する基材11-1が細胞非接着材料（例えばポリジメチルシロキサン（以下PDMSと称する））からなるものであれば、基板11は基材11-1のみから構成される。

【0027】

基材11-1が細胞接着材料（例えば、ポリエチレンテレフタレート（以下PETと称する））からなるものであれば、基材11-1の上面の全面に細胞非接着材料を層状に塗布することにより細胞非接着層11-2を形成する。本発明において細胞非接着層11-2は基材11-1の材料、表面性質等に応じて、存在が必要であったり、不必要であったりする。

【0028】

基材11-1の材料は、PDMS、PET、ガラス、シリコン、金属（アルミニウム、

10

20

30

40

50

SUS304等のステンレススチール、金、銀など)、金属酸化物(アルミナ、酸化チタン、ITO、酸化錫)などである。細胞非接着層11-2の材料は、アガロース、ポリエチレングリコール、PDMSなどである。

【0029】

ハイドロゲル部位12は、パターン状、かつ層状に形成される。パターン状に形成する理由は、第一の細胞種にかかる培養細胞集合体の二次元(基板11の平面方向)形状を制御するためである。図2(b)を参照して、本実施例ではハイドロゲル部位12は直線状であり、5本の直線が平行に並んだパターンとなっている。パターン状に形成するハイドロゲル部位の線幅(矢印22)は特に制限は無いが、10 $\mu$ m~500 $\mu$ mにすることが好ましい。パターン状に形成するハイドロゲル部位相互間の間隔(矢印23)は特に制限は無いが、50 $\mu$ m~1000 $\mu$ mにすることが好ましい。

10

【0030】

ハイドロゲル部位12は層状に形成することにより高さを与えた。高さを与えることによりハイドロゲル部位12に体積が付与されるので、ハイドロゲル部位12に細胞成長因子溶液を浸潤することにより、細胞成長因子徐放のための貯留が可能となる。

【0031】

細胞成長因子を貯留しかつ徐放するために、ハイドロゲル部位12はハイドロゲルで形成される。

【0032】

また、層状に形成されるハイドロゲル部位12の厚さ(矢印21)は、特に限定されるものではない。播種した細胞がハイドロゲル部位12に向かう方向に移動、増殖するのに十分な時間と量の細胞成長因子を徐放できる貯留量があればよい。

20

【0033】

ハイドロゲルの架橋度を調整すれば、細胞成長因子の徐放期間は調整可能である。ハイドロゲルの架橋度に対応する指標として含水率がある。ハイドロゲルの架橋度は通常70%以上99%以下であり、好ましくは90%以上99%以下である。含水率をこの範囲にすれば、第一の細胞種にかかる細胞培養期間中の全ての期間に渡り、第一の細胞種にかかる増殖細胞の増殖方向を方向付けるに十分な細胞成長因子が徐放され続けるからである。

【0034】

ハイドロゲル部位12に要求される細胞成長因子の徐放期間は、好ましくは2日以上21日以下である。また、ハイドロゲル部位12の好ましい厚さは1 $\mu$ m以上3000 $\mu$ m以下であり、より好ましくは20 $\mu$ m以上70 $\mu$ m以下である。第一の細胞種にかかる細胞培養期間中の全ての期間に渡り、第一の細胞種にかかる増殖細胞の増殖方向を方向付けるに十分な細胞成長因子が徐放され続けるからである。

30

【0035】

ハイドロゲル部位12の材料は、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸、ファイブロンネクチン、ラミニン、フィブリンなどであり、ゼラチンが特に好ましい。ゼラチンは比較的低温での加熱により熱架橋できるからである。

【0036】

ハイドロゲル部位12の形成方法は、(1)ガラス板等の上に所定厚さの薄層物を作成し、これを切り出して基板11上に戴置する方法、(2)ディスペンサーを用いてゲル状材料を戴置する方法、(3)スクリーン印刷で重ね刷りをする方法等任意の方法で行うことができる。

40

【0037】

培養部位13は、ハイドロゲル部位12を覆って層状に形成する。基板の平面方向を考えれば、培養部位13は当該平面方向に面状に形成する。ハイドロゲル部位12は、基板11上の細胞非接着部分15に取り囲まれていて、培養部位13は面状に形成されているから、培養部位13はハイドロゲル部位12と細胞非接着部分15を覆っている。

【0038】

培養部位13の上面は第一の細胞種播種面14である。細胞培養部材1にあって、培養

50

対象となる第一の細胞種は第一の細胞種播種面 1 4 に置かれる。培養部位 1 3 の上面は、層状に形成された培養部位 1 3 の 2 つの面のうち、基板 1 1 から遠い方の面である。

【 0 0 3 9 】

培養部位 1 3 は第一の細胞種が増殖する部位である。また培養部位 1 3 はハイドロゲル部位 1 2 から細胞成長因子が徐放される部位である。さらに、培養部位 1 3 は第二の細胞種が増殖する部位でもある。

【 0 0 4 0 】

培養部位 1 3 の層厚さすなわちハイドロゲル部位 1 2 の表面から第一の細胞種播種面 1 4 までの距離（矢印 2 6 で示す）は  $10\ \mu\text{m} \sim 30\ \text{mm}$ 、好ましくは  $100\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$  である。層厚さがこの範囲であれば、第一の細胞種にかかる増殖細胞が細胞成長因子放出方向に方向付けられる効果が得られ、かつ、三次元方向（層厚さ方向）への構造が確認され得るからである。

10

【 0 0 4 1 】

培養部位 1 3 の材料はマトリゲル、コラーゲンなどである。コラーゲンはコラーゲンゲルであってもよく、コラーゲンスポンジでもよい。

【 0 0 4 2 】

< 細胞培養方法 >

続いて第一の細胞種にかかる細胞培養方法を説明する。細胞の培養に先立ち、細胞培養部材を準備する。

【 0 0 4 3 】

細胞培養部材は、まず(1)基板 1 1 の上に、パターン状かつ層状のハイドロゲル部位 1 2 を形成する工程、次に(2)ハイドロゲル部位 1 2 に細胞成長因子を浸潤する工程、続いて(3)ハイドロゲル部位 1 2 を覆って層状の培養部位 1 3 を形成する工程により完成する。

20

【 0 0 4 4 】

図 3 は第一の細胞種にかかる細胞培養方法の概念説明図であり、図 3 ( a ) は第一の細胞種播種直後の状態を示し、図 3 ( b ) は第一の細胞種培養初期の状態を示し、図 3 ( c ) は第一の細胞種培養後期の状態を示している。

【 0 0 4 5 】

図 3 ( a ) を参照し、培養部位の表面である第一の細胞種播種面 1 4 に培養細胞を播種する。播種した第一の細胞種にかかる細胞のイメージを符号 3 1 で示している。本発明の細胞培養方法を好適に実施できる第一の細胞種の例として、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（以下 H U V E C と称する）、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞、胆管上皮細胞、表皮細胞等を挙げることができる。

30

【 0 0 4 6 】

本発明の細胞培養方法と細胞培養部材に使用する細胞成長因子は、第一の細胞種にかかる細胞の増殖と移動を促す属性を持つ細胞成長因子であれば、特に限定されるものではない。例えば、H U V E C 細胞を培養する場合は細胞成長因子 V E G F を選択し、リンパ管上皮細胞を培養する場合には細胞成長因子 V E G F を選択し、表皮細胞を培養する場合にはケラチノサイト細胞因子 ( K G F ) を選択して使用する。

40

【 0 0 4 7 】

第一の細胞種にかかる播種細胞 3 1 は播種前に飢餓処理 ( Starvation 処理 ) を行うことが好ましい。細胞成長因子方向への移動と当該方向への増殖がより一層行われるからである。

【 0 0 4 8 】

図 3 ( b ) を参照して、ハイドロゲル部位 1 2 から培養部位 1 3 に向かって細胞成長因子が徐放されている。放出された細胞成長因子のイメージを矢印 3 4 で示している。播種した細胞 3 1 は細胞成長因子 3 4 の方向に移動し、当該方向に増殖する。図 3 ( b ) 中に培養初期の培養細胞集合体のイメージを符号 3 2 で示している。

【 0 0 4 9 】

50

培養期間中に第一の細胞種は放出される細胞成長因子方向への移動と当該方向への増殖を繰り返す。培養終期に至ると第一の細胞種にかかる培養細胞集合体は、細胞播種面14とハイドロゲル部位12を連絡する状態となる。図3(c)中に培養終期の培養細胞集合体のイメージを符号33で示している。このようにして培養細胞集合体の三次元(培養部分13の層厚さ方向)構造の制御が行われる。

【0050】

基板11上でハイドロゲル部位12を取り巻く部分は細胞非接着部分15であり、培養細胞は細胞非接着部分15に至ることはない。このようにして培養細胞集合体の二次元(培養部位13の面方向)構造の制御が行われる。

【0051】

HUVEC細胞を培養すると、培養細胞集合体33は管状構造となる。

【0052】

続いて本発明にかかる細胞培養方法の好ましい実施態様を説明する。上述のようにして得た培養細胞集合体を含む細胞培養部材に、第二の細胞種を播種する。第二の細胞種は培養部位に播種する。その後、細胞培養部材を培養条件下において、第二の細胞種を増殖させる。培養条件については、用いる細胞によっても異なるが、公知の培養方法を用いる。

【0053】

このようにして、生体内の環境と類似する環境での2種類の細胞の共培養ができる。

【0054】

第二の細胞種の例は、肝実質細胞、伊東細胞、膵実質細胞、心筋細胞、神経細胞、間葉系細胞、腫瘍細胞などである。第一の細胞種と第二の細胞種の組み合わせについては特に制限はない。

【実施例1】

【0055】

<細胞培養部材(培養部位形成前)の作成>

ホットプレート(50)上で易接着処理のしてあるPETフィルム(テイジンテトロンフィルムG274)上にアガロース水溶液(80、5%)をバーコーティングした。オープン中で40、30分間加熱乾燥した。

【0056】

ガラス板をホットプレート(50)上で加温しながら30%ゼラチン水溶液をコーティングした。冷却後にゼラチンを切り出して、上記アガロースコーティング済みフィルム上に載せた。その後当該フィルムを切り分けて、ゼラチンパターン基材を得た。

【0057】

作成したゼラチンパターン基材を140、48時間真空加熱乾燥することによりゼラチンの架橋及び滅菌を行った。ハイドロゲル部位であるゼラチンの層厚さは50 $\mu$ m、ゼラチンのパターンは1本の直線、線幅は70 $\mu$ mであった。作成したゼラチンパターン基材を140、48時間、真空加熱乾燥にかけることにより、ゼラチンの架橋及び基材の滅菌を行った。

【0058】

細胞成長因子は、HumanVEGF165を使用した。HumanVEGF165 40ng/ml水溶液に架橋済ゼラチン基材を浸し、基材上のゼラチンにVEGF水溶液を浸み込ませた。また、コントロールとして、純水に架橋済ゼラチン基材を浸し、基材上のゼラチンに純水を浸み込ませた。

【0059】

<第一の細胞種の準備>

播種(培養)細胞はHUVECを使用した。HUVECを所定の培養液で培養後、1日前にmediumをmedium199+0.5%FCS(仔牛血清)+1%P/S(ペニシリンストレプトマイシン)に交換して培養した。当該培養は飢餓処理(starvation処理)である。細胞培養実験直前に、コラゲナーゼ処理によりHUVECをはがした。得られたHUVECをPKH26により蛍光標識した。

【0060】

<播種と培養>

10

20

30

40

50



24well plate下部にVEGF含浸ゼラチンパターンニング基材を静置し、24well cell culture insert上部に培養部位であるマトリゲル (matrigel) 層を作製した。マトリゲルの濃度は10mg/mlであった。当該マトリゲル溶液を20 $\mu$ l用いたものと、50 $\mu$ l用いたものの2種類の細胞培養部材を使用した。マトリゲル溶液20 $\mu$ lの場合にマトリゲル層の厚さは約0.7mmであり、マトリゲル溶液50 $\mu$ lの場合にマトリゲル層の厚さは約1.7mmであった。コントロールは、24well plate下部に純水含浸ゼラチンパターンニング基材を静置し、24well cell culture insert上部に培養部位であるマトリゲル (matrigel) 層を同様に作製した。

【0061】

細胞播種面であるマトリゲル (matrigel) 層表面に飢餓処理済みのPKH26蛍光標識HUVECを播種した。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で21時間培養した。

10

【0062】

< 培養細胞の評価 >

培養終了後、プレートリーダーでcell culture insert下部の蛍光強度を測定することで、培養部位 (マトリゲル層) 下部へ移動したHUVEC細胞数を評価した。

【0063】

評価結果を図4に示した。VEGF未添加群 (コントロール群) と比較して、VEGF含浸ゼラチン基材群では、cell culture insert下部の蛍光強度が増加した。これにより、VEGF含浸ゼラチンパターンニング基材から放出されたVEGFにより、HUVECが培養部位 (マトリゲル層) 中をVEGFの方向 (下部) へ移動した。

20

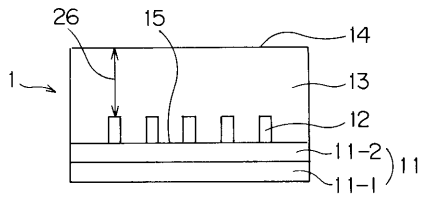
【符号の説明】

【0064】

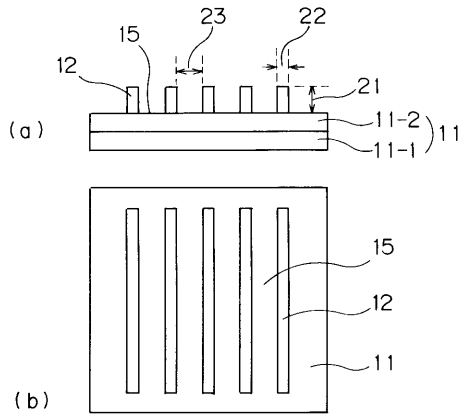
- 1 細胞培養部材
- 1 1 基板
- 1 1 - 1 基材
- 1 1 - 2 細胞非接着層
- 1 2 ハイドロゲル部位
- 1 3 培養部位
- 1 4 第一の細胞種播種面
- 1 5 細胞非接着部分
- 3 1 第一の細胞種にかかる播種した細胞 (イメージ)
- 3 2 第一の細胞種にかかる培養細胞集合体 培養初期 (イメージ)
- 3 3 第一の細胞種にかかる養細胞集合体 培養後期 (イメージ)
- 3 4 放出された細胞成長因子 (イメージ)

30

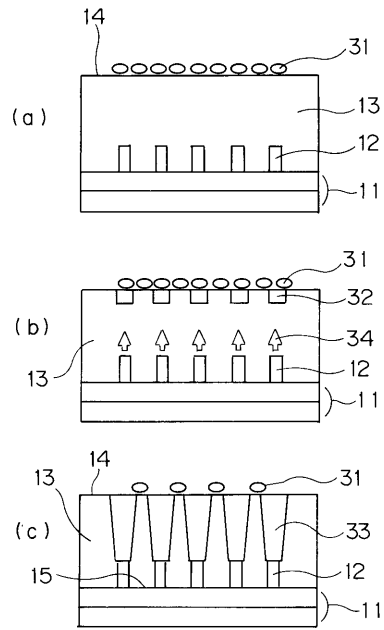
【図1】



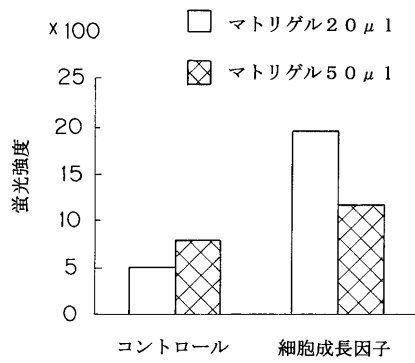
【図2】



【図3】



【図4】



---

フロントページの続き

(72)発明者 村上 英樹

京都府京都市中京区壬生花井町3番地 日本写真印刷株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA21 BB11 CC02 CC10 DF03 GA08

4B065 AA93X BB19 BB34 BC46 CA44