

(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2008-125952
(P2008-125952A)

(43) 公開日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-316806 (P2006-316806)</p> <p>(22) 出願日 平成18年11月24日 (2006.11.24)</p> <p>(出願人による申告) 平成18年度文部科学省 ナノテクノロジーを活用した人工臓器の開発委託研究 産業再生法第30条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(71) 出願人 301023238 独立行政法人物質・材料研究機構 茨城県つくば市千現一丁目2番地1</p> <p>(72) 発明者 田口 哲志 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内</p> <p>(72) 発明者 伊藤 倫子 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内</p> <p>Fターム(参考) 4B065 AA90X BB25 CA44 4C081 AB01 AB11 BA12 CA181 CA191 CC05 CC07 CD111 CD34 CE05</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 複合架橋体

(57) 【要約】

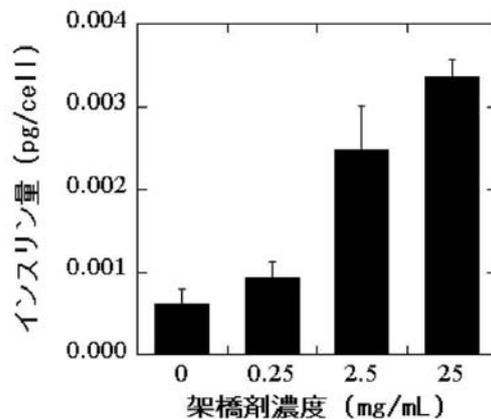
【課題】

動物細胞の一般的な培養法として広く用いられている単層培養法は、生体内で有していた細胞本来の機能を維持することが困難であり、急速に機能を消失するという問題点がある。

【解決手段】

一分子内に疎水性及び親水性部をもつ高分子架橋剤を合成し、脂質集合体である細胞、又は細胞とリポソームの混合体を物理的に架橋して、細胞機能の向上した細胞架橋体及び細胞とリポソームから構成される複合架橋体を得る。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞同士又は細胞とリポソームを高分子架橋剤にて架橋した複合架橋体であって、前記高分子架橋剤が、細胞表面に存在する脂質の疎水性部位に対してアンカリングする高分子架橋剤であって、下記〔化 1〕に示す構造を持つ高分子で、A が疎水性分子、B が親水性分子、C が非生分解性分子又は生分解性分子であり、培地にて培養してすることにより得られたことを特徴とする複合架橋体。

〔化 1〕

A - B - C - B - A

【請求項 2】

請求項 1 に記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記疎水性分子 A が、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合された脂質、アルキル基、コレステロール基であることを特徴とする複合架橋体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記親水性分子 B が、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたポリエチレングリコールであることを特徴とする複合架橋体。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記非生分解性分子又は生分解性分子 C が、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたアルキル鎖又はマトリックスメタロプロテアーゼ分解ペプチド、酵素分解性ペプチド、ポリ又はオリゴエステル、ポリ又はオリゴエーテルの 1 種又はそれ以上の組み合わせであることを特徴とする複合架橋体。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の複合架橋体において、前記細胞が、間葉系幹細胞、肝細胞、膵細胞、膵細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、赤血球、ES 細胞の 1 種又は 2 種以上の組み合わせであることを特徴とする複合架橋体。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の複合架橋体において、前記培地が血清添加培地であることを特徴とする複合架橋体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞同士又は細胞とリポソームを高分子架橋剤にて架橋した複合架橋体に関する。

【背景技術】

【0002】

動物細胞の一般的な培養法として広く用いられている単層培養法は、生体内で有していた細胞本来の機能を維持することが困難であり、急速に機能を消失することがよく知られている（例えば、非特許文献 1～2）。

【0003】

このため、細胞の生着、増殖を促進させ、細胞機能を維持、向上させ、細胞形態を生体内に近い形態に保持できるような方法として、コラーゲンを利用した 3 次元培養方法などの培養方法が種々開発されている（例えば、特許文献 1～2）。骨や軟骨は、細胞外マトリックスを含む組織であるため、生体高分子架橋体が組織再生には有効である。一方、肝臓や膵臓などの実質臓器は、細胞外マトリックスはほとんど含まれていないため、組織再生が行われていない。また、細胞を凝集化させるための技術として、擬似微小重力培養、疎水性と親水性のパターン化表面、U 字型マルチプレートなどが報告されている（例えば、非特許文献 3～5）。

10

20

30

40

50

【0004】

【特許文献1】特開2005-314号公報

【特許文献2】特開2004-283371号公報

【非特許文献1】Nature, 424, 870-872 (2003)

【非特許文献2】Science, 302, 46-47 (2003)

【非特許文献3】In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 39, 13-20 (2003)

【非特許文献4】ChemBioChem, 5, 850-855 (2004)

【非特許文献5】Journal of Reproduction and Development, 47, 165-171 (2001)

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、細胞の機能を高度に発現させることができる高分子架橋剤及びこの高分子架橋剤を用いて作製される細胞機能の向上した細胞架橋体及び細胞とリボソームから構成される複合架橋体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を達成するために、発明1の複合架橋体は、高分子架橋剤が、細胞表面に存在する脂質の疎水性部位に対してアンカリングする高分子架橋剤であって、下記[化1]に示す構造を持つ高分子で、Aが疎水性分子、Bが親水性分子、Cが非生分解性分子又は生分解性分子であり、かつ、かつ、前記架橋剤の生分解性分子を分解するまで培地にて培養することにより得られたことを特徴とする。

20

[化1]

A - B - C - B - A

【0007】

発明2の複合架橋体は、発明1に記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記疎水性分子Aが、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合された脂質、アルキル基、コレステロール基であることを特徴とする。

【0008】

発明3の複合架橋体は、発明1又は2に記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記親水性分子Bが、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたポリエチレングリコールであることを特徴とする。

30

【0009】

発明4の複合架橋体は、発明1から3のいずれかに記載の複合架橋体において、前記高分子架橋剤の前記非生分解性分子又は生分解性分子Cが、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたアルキル鎖又はマトリックスメタロプロテアーゼ分解ペプチド、酵素分解性ペプチド、ポリ又はオリゴエステル、ポリ又はオリゴエーテルの1種又はそれ以上の組み合わせであることを特徴とする。

【0010】

発明5の複合架橋体は、発明1から4のいずれかに記載の複合架橋体において、前記細胞が、間葉系幹細胞、肝細胞、膵細胞、膵細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、赤血球、ES細胞の1種又は2種以上の組み合わせであることを特徴とする。

40

【0011】

発明6の複合架橋体は、発明1から5のいずれかに記載の複合架橋体において、前記培地が血清添加培地であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0012】

細胞は、凝集化することによりE-カドヘリンなどの細胞-細胞間結合を介して細胞1個あたりの機能性が向上する。細胞を凝集化させることにより機能が向上し、架橋剤以外の

50

細胞 - 細胞間の結合が形成された後には、架橋剤が細胞機能あるいは増殖に影響を与えないように分解する必要がある。そのため、細胞の産生する酵素によって分解する部位を架橋剤に組み込むことが必要になる。

本発明の複合架橋体は、良好な凝集を行って細胞機能を向上させた後は、リボソーム又は細胞を物理的に架橋して、生分解性分子 (C) を分解することで架橋剤は消滅することになる。

【0013】

疎水性部 A は、架橋反応時に細胞膜表面の脂質膜と疎水的な相互作用を可能にするために、水に不溶な分子、例えば、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合された脂質、アルキル基、コレステロール基であることが好ましい。このように、細胞膜表面の脂質膜と疎水的な相互作用を可能にすることによって、細胞表面に存在するタンパク質の構造および活性を壊すことがなく、細胞へのダメージを減らすことができる。

10

【0014】

親水性部 B は、架橋体の細胞に対する生体親和性の観点から、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたポリエチレングリコールであることが好ましい。ここで親水性とは、架橋剤を水溶液として反応に用いるために必要な性質であり、水に溶解する平均分子量を持ち、かつポリエチレングリコール以外の親水性部、例えば、ポリプロピレングリコール鎖単独あるいはポリエチレングリコールとの共重合鎖などの組成を有することにより水に溶解する性質をいうものである。

20

【0015】

非生分解性部又は生分解性部 C は、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたアルキル鎖又はマトリックスメタロプロテアーゼ分解ペプチド、酵素分解性ペプチド、ポリ又はオリゴエステル、ポリ又はオリゴエーテルの1種又はそれ以上の組み合わせであることが好ましい。ここで生分解性とは、酵素的又は非酵素的加水分解のことである。

【0016】

なお、リボソームは、細胞の凝集塊に適度な空間を持たせることができることに利点がある。細胞凝集塊中では内部に酸素や栄養分が透過しにくいいため、内部の細胞はネクローシス(壊死)を起こすことが知られている。

30

この場合、リボソームの存在により、細胞凝集塊の奥にまで、酸素や栄養分を透過させることができ、ネクローシスが生じなくなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明は、下記[化1]に示す構造を持つ高分子で、Aが疎水性部、Bが親水性部、Cが非生分解性部又は生分解性部である細胞機能を向上させる高分子架橋剤である。

[化1]

A - B - C - B - A

【0018】

疎水性部 A は、架橋反応時に細胞膜表面の脂質膜と疎水的な相互作用を可能にするために、水に不溶な分子、例えば、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合された脂質、アルキル基、コレステロール基であることが好ましい。このように、細胞膜表面の脂質膜と疎水的な相互作用を可能にすることによって、細胞表面に存在するタンパク質の構造および活性を壊すことがなく、細胞へのダメージを減らすことができる。

40

【0019】

親水性部 B は、架橋体の細胞に対する生体親和性の観点から、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたポリエチレングリコールであることが好ましい。ここで親水性とは、架橋剤を水溶液として反応に用いるために必要な性質であり、水に溶解する平均分子量を持ち、かつポリエチレングリコール以外の親水性部、例えば

50

、ポリプロピレングリコール鎖単独あるいはポリエチレングリコールとの共重合鎖などの組成を有することにより水に溶解する性質をいうものである。

【0020】

非生分解性部又は生分解性部Cは、エステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかで結合されたアルキル鎖又はマトリックスメタロプロテアーゼ分解ペプチド、酵素分解性ペプチド、ポリ又はオリゴエステル、ポリ又はオリゴエーテルの1種又はそれ以上の組み合わせであることが好ましい。ここで生分解性とは、酵素的又は非酵素的加水分解のことである。

【0021】

細胞は、凝集化することによりE-カドヘリンなどの細胞-細胞間結合を介して細胞1個あたりの機能性が向上する。細胞を凝集化させることにより機能が向上し、架橋剤以外の細胞-細胞間の結合が形成された後には、架橋剤が細胞機能あるいは増殖に影響を与えないように分解する必要がある。そのため、細胞の産生する酵素によって分解する部位を架橋剤に組み込むことが必要になる。

10

【0022】

非生分解性部又は生分解性部は、架橋剤の分子鎖長を変化させる、あるいは分子間の相互作用を強める役割をする。非生分解性部又は生分解性部の長い分子で形成された架橋体は、細胞あるいはリボソーム間の距離が長くなるため架橋密度が低くなる。非生分解性部は、分子鎖の延長および分子間相互作用(例えば+と-のチャージを持つもの)のみを強めることが可能になる。一方、生分解性部を用いると、分子鎖の延長および分子間相互作用(例えば+と-のチャージを持つもの)に加え、酵素分解性ペプチドを持っているため、細胞を一時的に凝集させ(このときに細胞-細胞間相互作用により架橋剤以外の結合が形成する)、その後細胞の産生する酵素によって分解することが可能になる。

20

【0023】

前記酵素分解性ペプチドは、マトリックスメタロプロテアーゼ分解ペプチドであるLGP A又は、PQGIWGQの1種又は2種以上の組み合わせを含むペプチドであることが好ましい。

【0024】

前記ポリ又はオリゴエステルを構成する分子は、乳酸、グリコール酸、カプロラク톤の1種又は2種以上の組み合わせであることが好ましい。また、前記ポリ又はオリゴエーテルを構成する分子が、エチレングリコール、プロピレングリコールの1種又は2種以上の組み合わせであることが好ましい。

30

【0025】

高分子架橋剤は、活性化エステルで活性化する、又は縮合剤を用いて溶媒中反応させ、疎水性部A、親水性部B、非生分解性部又は生分解性部Cをエステル、アミド、ジスルフィド、シッフ塩基結合のいずれかの結合を形成させることで合成する。リボソーム又は細胞の懸濁溶液と高分子架橋剤の溶液とを混合することにより架橋が起こり、細胞架橋体、及び細胞とリボソームから構成される複合架橋体を得られる。

【0026】

本発明は、前記の細胞機能を向上させる高分子架橋剤と細胞又はリボソームの分散水溶液によって得られる細胞架橋体、又は細胞とリボソームから構成される複合架橋体である。ここで、架橋とは、前記の高分子架橋剤の疎水性部とリボソーム又は細胞の脂質膜との疎水的な相互作用による物理的な架橋である。すなわち、本明細書において、物理的な架橋は、細胞表面に存在する脂質の疎水性部位に対するアンカリングを意味している。図3の模式図に示すように、リボソーム又は細胞膜を構成する脂質の疎水性部分に対して、高分子架橋剤の疎水性部分が疎水的な相互作用によりアンカリングする。

40

【0027】

また、前記リボソームは脂質の1種又は2種以上の組み合わせであることが挙げられる。また、前記細胞は間葉系幹細胞、肝細胞、膵細胞、膵細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、赤血球、ES細胞の1種又は2種以上の組み合わせが挙げられる。

50

【実施例 1】

【0028】

以下、実施例及び試験例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0029】

細胞機能を向上させる高分子架橋体の一例として、末端に疎水性部としてオレイル基を持ち、親水性部としてポリエチレングリコール（分子量 8000）を持つ分子と非生分解性部のエチレンジアミンの両末端をジメチルホルムアミド溶媒中、室温で反応させ、アミド結合を形成させることにより、一分子内に疎水性部、親水性部及び非生分解性部をもつ高分子架橋剤を合成した。

10

【0030】

さらに、培養容器としてU底96ウェルプレート（住友ベークライト製）を用い、ラット膵島細胞（RIN）（ 1×10^5 cells/well、培地 0.1 mL、無血清）に高分子架橋剤（0-25 mg/mL水溶液、0.1 mL）を添加し、10%血清培地で培養（37℃, 5% CO₂）することにより細胞架橋体を調製した。

【0031】

膵細胞の機能の一つとして、インスリンの生産がある。図1には、得られた細胞架橋体のインスリン分泌量をELISA（酵素免疫測定）により測定した結果を示している。得られた細胞架橋体を2 mg/mLのグルコースを含む無血清培地中で1時間インキュベート（37℃, 5% CO₂）したときのインスリン量をレビス(R)インスリンキット（株式会社シバヤギ製）を用いて測定した。また、DNAの定量により求めた細胞数から、1細胞当たりのインスリン分泌量に換算してある。

20

【0032】

架橋剤の存在により、1細胞当たりのインスリン分泌能が向上したことを示している。

【0033】

さらに、細胞接着因子であるE-カドヘリンの遺伝子（mRNA）発現量についてリアルタイムPCR法により定量した。図2には、その結果を示してある。内在性コントロールとしてRat-18Sを使用し、これを100として換算してある。

【0034】

図2から明らかなように、高分子架橋剤存在下で作製された細胞架橋体はE-カドヘリンの遺伝子発現量に増加が認められた。E-カドヘリンなどの細胞接着因子を介した細胞凝集塊（スフェロイド）を形成することによりインスリン産生などの細胞機能が上昇していることが示唆される。

30

【実施例 2】

【0035】

合成実験

原料のポリエチレングリコール（PEG）誘導体：親水性部としてのポリエチレングリコール鎖の片末端に疎水性部としてオレイル基を持ち、もう片末端は反応基として活性エステル基（アミノ基と反応してアミド結合を形成する）を持つ分子（分子量 8500）

得られた架橋剤：分子量 18000

40

PEG誘導体をジアミンの両末端に1段階で導入して、架橋剤を合成した。

【0036】

操作

1. ジメチルホルムアミド（4 mL）中、エチレンジアミン（2 μL、1.0当量）とPEG誘導体（561 mg、2.2当量）を室温にて一晚攪拌
2. 透析（分画分子量 12000 - 14000）により精製
3. 凍結乾燥

【0037】

細胞培養実験

条件

50

使用細胞：ラット臍島 細胞 R I N

使用培地：R P M I - 1 6 4 0 (S i g m a)
2 % ペニシリン - ストレプトマイシン含有
1 0 % 牛胎児血清 (F B S) 有または無

使用容器：U 底 9 6 ウェルプレート

(スミロンセルタイト(R)スフェロイド , 住友ベークライト)

播種細胞数：1 × 1 0 5 c e l l s / w e l l (培地 0 . 1 m L / w e l l)

架橋剤添加濃度：0 , 0 . 2 5 , 2 . 5 , 2 5 (m g / m L) (添加量 0 . 1 m L / w e l l)

架橋剤を 1 5 分 U V 照射して滅菌後、P B S 溶液に溶解

培地交換：1 日目および 4 日目 (3 日毎に交換)

培養日数：7 日

【 0 0 3 8 】

操作

1 . 細胞播種 (細胞懸濁液 0 . 1 m L / w e l l 、無血清培地使用)

2 . 架橋剤添加 (P B S 溶液 0 . 1 m L / w e l l)

3 . インキュベーション (3 7 , 5 % C O 2)

培地交換 (培地 0 . 1 m L / w e l l を抜き取り、血清培地 0 . 1 m L / w e l l を添加)

無血清培地で架橋剤を添加し、血清培地で培養

【 0 0 3 9 】

インスリン測定

操作 (サンプルング)

1 . マイクロピペットで培地を抜き取る。

2 . グルコースの添加：培地 (グルコース濃度 2 g / L , F B S なし , 2 % ペニシリン - ストレプトマイシン含有) を 0 . 1 m L / w e l l ずつ添加する。

3 . インキュベーション (3 7 , 1 h)

4 . 上澄み回収：遠心 (1 2 0 0 r p m , 5 m i n) した後、マイクロピペットで培地を 6 0 μ L / w e l l ずつ回収し、測定するまでディープフリーザー (- 8 0 ° C) にて保存。

結果を表 1 に示す。

【 0 0 4 0 】

【表 1】

架橋剤添加濃度 (mg/mL)	培養日数 (days)	インスリン濃度 (pg/mL)	インスリン量 (pg/cell)
0	3	1193	7.5×10^{-4}
0.25	3	1413	8.3×10^{-4}
2.5	3	1181	10.1×10^{-4}
25	3	520	6.5×10^{-4}
0	7	780	6.2×10^{-4}
0.25	7	1617	9.2×10^{-4}
2.5	7	3391	24.8×10^{-4}
25	7	494	33.5×10^{-4}

1 細胞当たりのインスリン分泌量は、D N A の定量により求めた細胞数から換算した。

操作 (測定)

レビス(R)インスリンキット (株式会社シバヤギ製) (酵素免疫測定法 (E L I S A 法) を用いたモノクロナル抗体を使用するサンドイッチ手法によるインスリン測定用キット) を用いて、取扱説明書に従って測定 (下記) 。

10

20

30

40

50

1. 抗体固相化プレートを洗浄液で、4回洗浄する。
2. ビオチン結合抗インスリン抗体を100 μ Lずつ各ウェルに分注する。
3. 攪拌後、検体又は標準インスリン溶液を10 μ Lずつ分注する。
4. 攪拌後、静置し室温で2時間反応させる。
5. プレートを洗浄液にて、4回洗浄する。
6. ペルオキシダーゼ-アビジン結合物を100 μ Lずつ各ウェルに分注する。
7. 攪拌後、静置し室温で30分間反応させる。
8. プレートを洗浄液にて、4回洗浄する。
9. 発色液を100 μ Lずつ各ウェルに分注する。
10. 攪拌後、静置30分間反応させる。
11. 反応停止液を100 μ Lずつ各ウェルに分注する。
12. 攪拌後、プレートリーダーで492 nmの吸光度を測定する。

10

【0041】

DNAの定量

操作(サンプリング)

1. インスリン測定用サンプルを採取した後、遠心(1200 rpm, 5 min)し、マイクロピペットで培地を40 μ L/wellずつ抜き取る。
2. 凍結乾燥し、測定するまでデシケーターにて保存。

【0042】

操作(測定)

1. パパイン消化: パパイン溶液(125 μ g/mL)を0.15 mL/wellずつ添加後、プレートシールにて密封し、インキュベーション(60 $^{\circ}$ C, 24 h)。
2. 蛍光測定(Hoechst 33258染色): 遠心(1800 rpm, 10 min)した後、検体を平底96ウェルプレートに分注(0.1 mL/well)。Hoechst 33258(1 μ g/mL)を0.1 mL/wellずつ添加し、攪拌した後、プレートリーダーにて測定(ex. 360 nm, em. 465 nm)。

20

検量線は、細胞懸濁液とDNA溶液で作成し、換算した。
その結果を表2に示す。

30

【0043】

【表2】

架橋剤添加濃度 (mg/mL)	培養日数 (days)	細胞数 (cells/well)
0	3	1.7×10^5
0.25	3	1.9×10^5
2.5	3	1.3×10^5
25	3	8.8×10^4
0	7	1.5×10^5
0.25	7	1.9×10^5
2.5	7	1.5×10^5
25	7	1.6×10^4

40

1細胞当たりのインスリン分泌量は、DNAの定量により求めた細胞数から換算した。

【0044】

遺伝子解析(リアルタイムPCR)

操作(サンプリング)

1. 15 mL遠心管に細胞を集めて、遠心(1200 rpm, 5 min)した後、培地を抜き取る。

50

2. PBS 洗浄 (2 回) : 冷 PBS (2 mL) で懸濁後、遠心 (1200 rpm, 5 min) して、抜き取る。

もう一度繰り返す。

3. 測定するまでディープフリーザー (-80) にて保存。

【0045】

操作 (測定)

1. total RNA 抽出 (QIAGEN、RNeasy Kit 使用)

2. OD 測定する (この結果より、4ug 相当の RNA 量を計算)

3. cDNA 合成 (invitrogen、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR 使用)

10

4. リアルタイム PCR (日本ジーン、qPCR Mastermix for SYBR(R) Green I

その結果を表 3 に示す

【0046】

【表 3】

エーカドヘリンの発現量 (18s を 100 としたエーカドヘリンの分子数)

架橋剤添加濃度 (mg/mL)	培養日数 (days)	エーカドヘリン
0	7	0.248
0.25	7	0.314
2.5	7	0.406
25	7	0.382

20

【0047】

(使用)

リアルタイム PCR 条件

10 min 95

15 sec 95 40 cycles

1 min 60

内在性コントロールとして、Rat-18S 等を使用

30

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明によると、高分子架橋剤を用いて細胞の機能を高度に発現できる細胞架橋体及びリポソームと細胞から構成される複合架橋体を作製することが可能であり、医用生体材料として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0049】

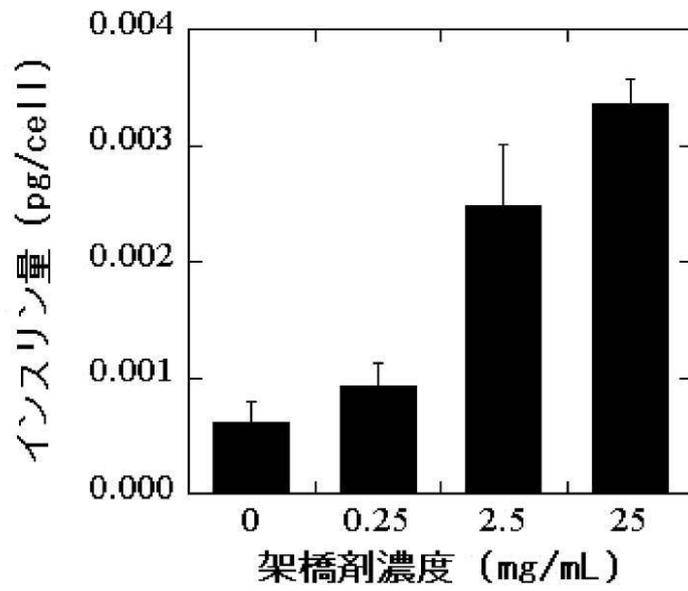
【図 1】実施例 1 において、高分子架橋剤濃度と 1 細胞当たりのインスリン分泌量との関係を示すグラフ。

【図 2】実施例 1 において、高分子架橋剤濃度と E-カドヘリンの遺伝子発現量との関係を示すグラフ。

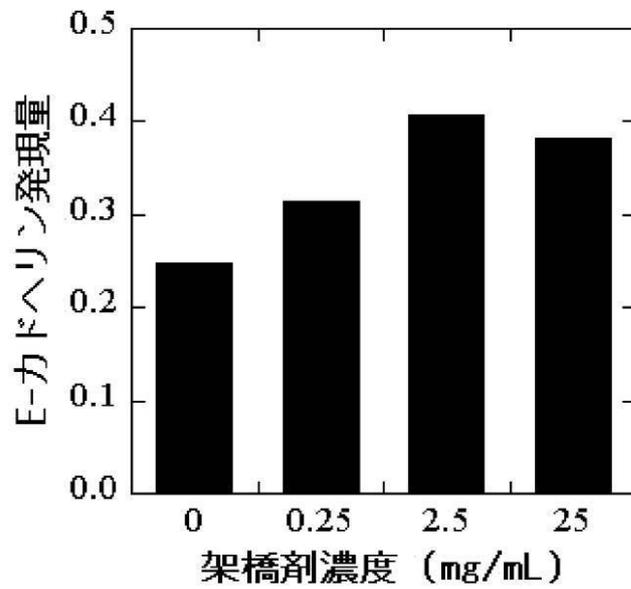
40

【図 3】高分子架橋剤の模式図 (A) および高分子架橋剤により調製したリポソーム架橋体又は細胞架橋体の模式図 (B)。

【図1】

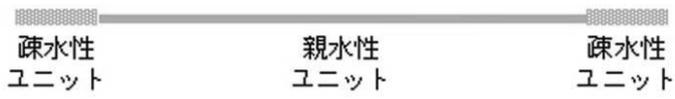


【図2】



【 図 3 】

A



B

