

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年4月27日(27.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/069116 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/78 (2006.01) C09H 3/00 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01) C12M 3/04 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C08H 1/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/080829
- (22) 国際出願日: 2016年10月18日(18.10.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-207399 2015年10月21日(21.10.2015) JP
- (71) 出願人: 地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター(TOKYO METROPOLITAN INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海二丁目4番10号 Tokyo (JP). 新田ゼラチン株式会社(NITTA GELATIN INC.) [JP/JP]; 〒5560022 大阪府大阪市浪速区桜川4丁目4番26号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 大藪 淑美(OHYABU, Yoshimi); 〒1350064 東京都江東区青海二丁目4番10号 地方独立

行政法人東京都立産業技術研究センター内 Tokyo (JP). 柚木 俊二(YUNOKI, Shunji); 〒1350064 東京都江東区青海二丁目4番10号 地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター内 Tokyo (JP). 畑山 博哉(HATAKEYAMA, Hirotsuke); 〒1350064 東京都江東区青海二丁目4番10号 地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター内 Tokyo (JP). 井田 昌孝(IDA, Masataka); 〒5810024 大阪府八尾市二俣2丁目2番地 新田ゼラチン株式会社大阪工場内 Osaka (JP). 平岡陽介(HIRAOKA, Yosuke); 〒5810024 大阪府八尾市二俣2丁目2番地 新田ゼラチン株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

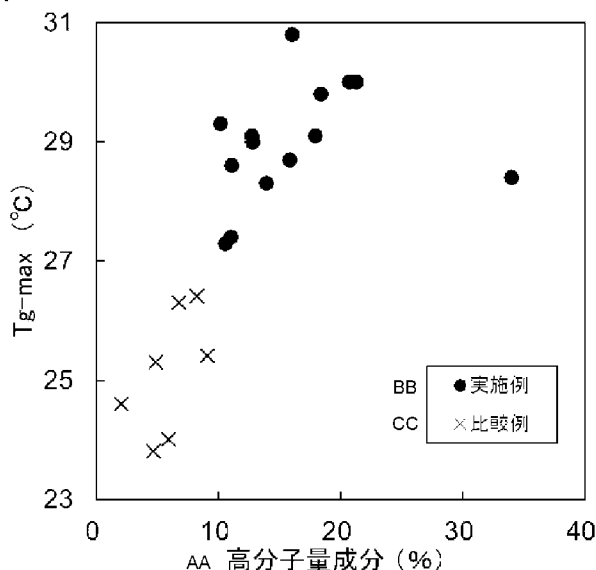
- (74) 代理人: 特許業務法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島二丁目2番7号 中之島セントラルタワー Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

[続葉有]

(54) Title: GELATIN, CHEMICALLY MODIFIED PRODUCT THEREOF, AQUEOUS COMPOSITION AND MEDICAL LAMINATE CONTAINING SAME, PRODUCTION METHOD FOR MEDICAL LAMINATE, AND CELL SHEET ISOLATION METHOD

(54) 発明の名称: ゼラチンまたはその化学修飾体、それを含有する水性組成物および医療用積層体、ならびに医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法

FIG.1



(57) Abstract: A gelatin or chemically modified product thereof having a high-molecular weight component content of 10%-50% by mass and having a value, being the low-molecular weight component content deducted from the high-molecular weight component content, of at least 0% by mass.

(57) 要約: ゼラチンまたはその化学修飾体は、高分子量成分の含有量が10~50質量%であり、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上である。

AA High-molecular weight component (%)
 BB Embodiment
 CC Comparative example

WO 2017/069116 A1

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

ゼラチンまたはその化学修飾体、それを含有する水性組成物および医療用積層体、ならびに医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法

技術分野

[0001] この発明は、ゼラチンまたはその化学修飾体、それを含有する水性組成物および医療用積層体、ならびに医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法に関する。さらに詳しくは、27℃以上の温度で急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解するゼラチン水性組成物に用いられるゼラチンまたはその化学修飾体、それを含有する水性組成物および医療用積層体、ならびに医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞シート工学の技術を用いた再生医療が注目され、各種の細胞シートの移植が試みられている。細胞シートとしては、単層のシート、同一細胞のシートを積層化したもの、数種の細胞のシートを積層化したもの等が利用されている。例えば、細胞シートを用いて、皮膚、角膜、網膜、心臓病、耳、軟骨、すい臓、肝臓、肺、歯、食道、膀胱等の臨床応用が進められている。

[0003] 細胞シートは非常に脆弱であり、単離後にシワ、破れなどが生じやすい。培養状態のまま保存および移送すれば、鮮度が保たれるが、培養液の振動を抑えて保存および移送することは容易ではない。そこで、より優れた細胞シートの保存および移送の方法が求められていた。

[0004] ゼラチンは皮膚、骨等の熱抽出物であり、変性コラーゲンを主成分としている。化学的にはコラーゲンとほぼ等価であるため、生体適合性に優れ、生体内で分解および吸収される。微粒子、フィルム、カプセル、スポンジ等の成型体がゼラチン水溶液から作製することができ、これらの成型体は再生医療の分野で広く用いられている。ゼラチン水溶液は低温でゲル化し、加温す

ると融解する性質を有し、食品分野では古くからゼリーとして活用されているが、この温度可逆性のゾルーゲル転移を医療技術に応用した事例はほとんど無い。

[0005] 特開2011-172925号公報（特許文献1）には、シート状細胞培養物と、該シート状細胞培養物を支持し、常温で高分子ゲル化可能な生体適合性化合物を含有する支持体層とから本質的になる医療用積層体が記載されている。実施例1には、常温で高分子ゲル化可能な生体適合性化合物としてゼラチンを用いて、4℃でゼラチンを凝固させて積層体を製造し、その後、37℃に加温してゼラチンを融解させてシート状細胞培養物を得ている。しかし、実施例1で用いているゼラチンは通常の低い融点のゼラチンであり、25℃等の室温ではゲル化しない。従って、実施例1の方法を用いた場合、細胞や組織を包埋した積層体の保管または移送は、室温よりも低い温度、例えば実施例1に記載された4℃に管理して行うことが必要になる。しかし、このような低温では、細胞や組織の機能は著しく低下するため、積層体から得られる細胞シートは、再生医療に用いるには適していない。

[0006] Journal of Bioscience and Bioengineering, 118(1), 112-115 (2014)（非特許文献1）および特開2014-100110号公報（特許文献2）には、60℃の穏やかな温度でブタ皮膚コラーゲン由来のアテロコラーゲンを熱変性させることで、加水分解された短いペプチドの含有量を減少させた非分解ゼラチン（UCG）が開示されている。このUCGの5質量%水溶液は、通常のゼラチンの5質量%水溶液よりも高い31℃の融点を有し、25℃で急速にゲル化する（非特許文献1の図2B）。非特許文献1の図1Bには、5質量%UCG水溶液が37℃では溶解しており、23℃に冷却するとゲル化して、37℃に昇温すると急激に溶解したことが示されている。従って、このUCGを用いれば、培養温度の37℃で細胞シートにゼラチンを加えて、23℃でゲル化させ、生成した細胞シートを移送し、目的地で再び37℃加温することで、ゼラチンを溶解させて細胞シートを単離することができる。

[0007] 現在、細胞シート工学で汎用されているUpCell（登録商標：セルシート社）等の細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材は、一定の温度を境に器材表面の性質が疎水性から親水性に可逆的に変化する。細胞の種類によって接着特性が異なるために温度が変わるが、例えば27℃程度より低い温度にすることで、細胞シートを器材表面から分離して回収することができる。なお、この細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材にはポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）が用いられているが、Material Matters(商標), Vol.5, No.3, Aldrich刊, p.4-9 (2011.2) (非特許文献2) に記載の通り、多種類のPNIPAMがあり、そのPNIPAMごとに細胞が接着する温度は変わり得る。この細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材を利用して細胞シートを調製して移送する場合、37℃等（第1の温度）で同器材上の細胞シートにゾル状態の細胞シート保護材料を加え、27℃より高い温度（第2の温度）で細胞シートが同器材に接着した状態を保ちながら細胞シート保護材料をゲル化させ、その後、27℃より低い温度（第3の温度）に冷却して細胞シート保護材料で保護された細胞シートを同器材から分離して、移送し、目的地で再び37℃（第1の温度）に加熱して細胞シートを単離する工程が実用的である。この工程を実現できるような温度可逆性のゾル-ゲル転移をする細胞シート保護材料が望まれているが、いまだに開発されていない。非特許文献1等のUCGは、27℃以上の温度（第2の温度）では急速にゲル化しないため、上記の細胞シート保護材料として用いることができない。

[0008] そこで、27℃以上の温度で急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解する温度可逆性のゾル-ゲル転移をする細胞シート保護材料が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2011-172925号公報

特許文献2：特開2014-100110号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1: Journal of Bioscience and Bioengineering, 118(1), 112-115 (2014)

非特許文献2: Material Matters(商標), Vol.5, No.3, Aldrich刊, p.4-9 (2011.2)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明が解決しようとする課題は、27℃以上の温度で急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解するゼラチン水性組成物、およびそれに用いられるゼラチン等を提供することにある。また、前記ゼラチン水性組成物を用いる医療用積層体、ならびに医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、前記課題を解決すべく、様々な原料を用いて種々の処理操作を行って調製したゼラチンを種々検討した結果、意外にもγ鎖よりも高分子量の成分の含有量が10～50質量%であり、前記高分子量成分の含有量からα鎖よりも低分子量の成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上であるゼラチンを5質量%含む水性組成物が、27℃以上の温度で30分以内に急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解することを見出して、本発明を完成した。本発明は、以下の通りである。

[1] 高分子量成分の含有量が10～50質量%であり、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上であるゼラチンまたはその化学修飾体。

[2] 腱由来コラーゲンに由来する、[1]に記載のゼラチンまたはその化学修飾体。

[3] コラーゲンを、0.1～10質量%の濃度になるように水を加え、pHを2～9に調整して、40～80℃の温度範囲で熱変性させることを含

む、〔1〕に記載のゼラチンまたはその化学修飾体の製造方法。

〔4〕 コラーゲンが腱由来である、〔3〕に記載の製造方法。

〔5〕 〔1〕または〔2〕に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を0.5～10質量%で含有する、水性組成物。

〔6〕 細胞シートと、該細胞シートの片面または両面に接着する〔1〕または〔2〕に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する1つまたは2つの支持体層とからなる、医療用積層体。

〔7〕 培養基材上に形成された細胞シートに、〔1〕または〔2〕に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する液状またはゾル状の水性組成物を被覆し、該液状またはゾル状の水性組成物をゲル化させて支持体層を形成することを含む、医療用積層体の製造方法。

〔8〕 〔7〕の方法によって〔6〕に記載の医療用積層体を製造し、ついで前記支持体層を除去することを含む、細胞シートの単離方法。

発明の効果

[0013] 本発明のゼラチン等と水とを混合して調製されたゼラチン水性組成物は、27℃以上の温度で30分以内に急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解する。このゼラチン水性組成物を用いれば、37℃等（第1の温度）で細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材上の細胞シートにゾル状態のゼラチン水性組成物を加え、27℃より高い温度（第2の温度）で細胞シートが同器材に接着した状態を保ちながらゼラチン水性組成物をゲル化させ、その後、27℃より低い温度（第3の温度）に冷却してゼラチン水性組成物で保護された細胞シートを同器材から分離して、移送し、目的地で再び37℃（第1の温度）に加熱して細胞シートを単離することに用いることができる。なお、第3の温度は、25℃程度の室温でもよく、その温度では細胞シートにダメージを与えることがなく、細胞シートを安定して保管および移送することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1～14および比較例1～7のゼラチンにおける、高分子量成分

の含有量と $Tg - max$ との関係を示す図である。

[図2]実施例1～14および比較例1～7のゼラチンにおける、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値と $Tg - max$ との関係を示す図である。

[図3]実施例16における本発明の水性組成物のゼラチン濃度と $Tg - max$ との関係を示す図である。

[図4]実施例17におけるゼラチンに対するコハク酸無水物との質量比と、サクシニル化された塩基性アミノ酸の置換率との関係を示す図である。

[図5]実施例18におけるゼラチンの水性組成物のゲル化挙動を示す図である。

[図6]実施例20における高濃度ゼラチン水性組成物のゲルの様子を示す図である。

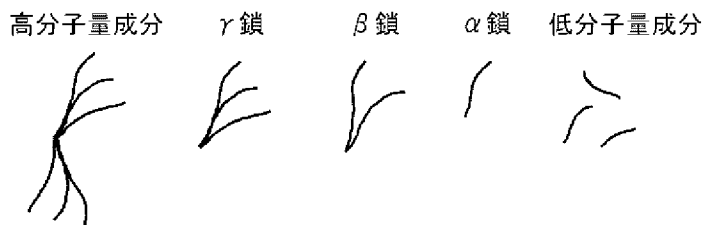
発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. ゼラチンまたはその化学修飾体

コラーゲンは α 鎖と呼ばれるペプチド鎖が3本集まってらせん構造を取っている。コラーゲンに熱分解等の処理を施して得られる通常のゼラチンは、一般に下記の成分が混合した組成物である。

[0016] [化1]



[0017] 「 α 鎖」は1本のペプチド鎖であり、「 β 鎖」は2本の α 鎖が結合しており、「 γ 鎖」は3本の α 鎖が結合している。また、 α 鎖が加水分解して生成される短いペプチドである α 鎖より低分子量の成分「低分子量成分」と、4本以上の α 鎖が結合している γ 鎖よりも高分子量の成分「高分子量成分」が存在する。市販のゼラチンには、その調製過程で加水分解が進行して生成され

る低分子量成分が多量に含まれる。

[0018] 本発明のゼラチンは、高分子量成分の含有量が10～50質量%であり、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上であるゼラチンである。本発明のゼラチンにおいて、高分子量成分の含有量は10～50質量%であるが、好ましくは11～40質量%が挙げられ、より好ましくは12～35質量%が挙げられ、さらに好ましくは13～30質量%が挙げられ、特に好ましくは15～25質量%が挙げられる。高分子量成分の含有量が50質量%を超えると、1～10質量%ゼラチン水性組成物においてゾルが極めて粘ちょうとなってゲル化もしなくなる。高分子量成分の含有量が10質量%より少なければ、1～10質量%ゼラチン水性組成物が27℃以上の温度で急速にゲル化しなくなる。

[0019] 本発明のゼラチンにおいて、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値は0質量%以上であるが、好ましくは2質量%以上が挙げられ、より好ましくは3質量%以上が挙げられ、さらに好ましくは5質量%以上が挙げられ、特に好ましくは8質量%以上が挙げられる。前記の値が、0質量%より低ければ、1～10質量%ゼラチン水性組成物が27℃以上の温度で急速にゲル化しなくなる。

[0020] α 鎖、 β 鎖および γ 鎖の含量としては、特に制限はない。 α 鎖の含有量としては、例えば10～50質量%が挙げられ、好ましくは15～40質量%が挙げられ、より好ましくは20～35質量%が挙げられる。 β 鎖の含有量としては、例えば10～50質量%が挙げられ、好ましくは15～40質量%が挙げられ、より好ましくは20～35質量%が挙げられる。 γ 鎖の含有量としては、例えば10～50質量%が挙げられ、好ましくは15～40質量%が挙げられ、より好ましくは20～35質量%が挙げられる。

[0021] また、本発明のゼラチンに含まれるアミノ酸におけるヒドロキシプロリンの含有率としては、好ましくは10%以上が挙げられる。ヒドロキシプロリンの含有量が低くなると、ゼラチン水性組成物の急速にゲル化する温度も低下する。

[0022] 本発明のゼラチンの化学修飾体としては、例えば本発明のゼラチンのカルボキシル基またはアミノ基が化学修飾されたもの、および本発明のゼラチンのプロリンを水酸化したもの等が挙げられる。カルボキシル基の化学修飾としては、例えばアンモニア、アミン、グリシンメチルエステル等によるアミド化等が挙げられる。アミノ基の化学修飾としては、例えばサクシニル化、フタル化、フマリル化、アセチル化等が挙げられる。ゼラチンのプロリンの水酸化は、例えばゼラチンにプロリル4-ヒドロキシラーゼを作用させることで実施できる。これらの化学修飾に用いられる官能基のうち、アミノ基とカルボキシル基はコラーゲンらせんの外側に向いているため、コラーゲンらせんの部分回復現象であるゼラチンのゲル化現象がこれらの官能基修飾によって阻害されにくい。その結果、高いゲル化温度という本発明の効果を損なわずに、その他種々のゼラチン物性を変えることが可能である。一方、プロリンの水酸化については、コラーゲンらせん内の水素結合に寄与し、ゼラチンゲル化を安定化させる。好ましい化学修飾体としては、導入される側鎖が生体内代謝物質であり、中性での水溶性を高める効果を持つサクシニル化が挙げられる。化学修飾の度合いは、ゼラチンの化学修飾体の物性が所望のものとなるように、適宜、調整することが好ましい。サクシニル化では、ゼラチンに存在するアミノ基のうちの80%までの修飾では、ゼラチン水性組成物の急速にゲル化する温度はほとんど変化させず、溶解性を上げることができる。より好ましいサクシニル化の割合としては、アミノ基のうち40~70%が挙げられる。前記の化学修飾は、常法に従って、実施することができる。

2. ゼラチンの製造方法

本発明のゼラチンの原料としては、例えば牛、豚、鶏、ダチョウ、魚等の動物に由来するコラーゲン等が挙げられ、好ましくは牛、豚、鶏、ダチョウ等が挙げられ、より好ましくは豚が挙げられる。これらの動物からコラーゲンを採取する部分としては、皮膚、骨、軟骨、腱、鱗等が挙げられる。これらのうちで腱は高分子量成分が多量に含まれているため好ましい。

[0023] 本発明のゼラチンは、抽出されたコラーゲンを熱分解により調製することで、高分子量の会合体を多く含み、急速にゲル化する温度が高くなるゼラチンが得られる。原料として用いる抽出されたコラーゲンとしては、アテロコラーゲン、酸抽出コラーゲン、アルカリ処理コラーゲン等を用いることができる。好ましくはアテロコラーゲンが挙げられる。アテロコラーゲンは、例えばペプシン、キモシン、カテプシンD、レニン等のタンパク質分解酵素を加えて、N末端またはC末端に存在するテロペプチドを消化することにより調製されたものであり、テロペプチドが除去されているために粘性が低く、取扱いが容易になる。さらに好ましくは臍由来のアテロコラーゲンが挙げられる。

[0024] 抽出されたコラーゲンを、0.1～10質量%の濃度になるように水を加え、特定のpHに調整する。コラーゲンの濃度としては、好ましくは0.15～5質量%が挙げられ、より好ましくは0.2～3質量%が挙げられる。pHとしては、例えば2～9が挙げられ、好ましくは3～8が挙げられ、より好ましくは4～7が挙げられる。続いて、この水溶液を例えば40～80℃の温度範囲で5分間～24時間保持することで熱変性させる。熱変性温度は、好ましくは45～70℃が挙げられ、より好ましくは50～60℃が挙げられる。熱変性時間は、熱変性温度が低ければ長時間に、高ければ短時間に調整することが好ましい。熱変性時間としては、例えば15分間～15時間が挙げられる。この熱変性によって、コラーゲンのらせん構造が壊れて、高分子量成分、 γ 鎖、 β 鎖、 α 鎖および低分子量成分の混合物が得られる。

[0025] 熱変性したゼラチン水溶液を乾燥することで、本発明のゼラチンが得られる。乾燥の方法としては、常法に従って行うことができるが、例えば通風乾燥、噴霧乾燥、凍結乾燥等が挙げられる。また、得られたゼラチンを常法に従って化学修飾して、化学修飾体とすることができる。

[0026] 複数のゼラチンまたは高分子量成分、 γ 鎖、 β 鎖、 α 鎖もしくは低分子量成分を適宜混合して、本発明の条件に合致するゼラチン混合物とすることもできる。

3. 水性組成物

本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を0.5～10質量%となるように水と混合することで、温度可逆性ゾル-ゲル転移を示す水性組成物を得ることができる。本水性組成物は、その使用目的に応じて、濃度を変更することができる。例えば医療用積層体に使用するのであれば、好ましい濃度としては、1～8質量%が挙げられ、より好ましくは2～7質量%が挙げられ、さらに好ましくは3～6質量%が挙げられる。

[0027] 用いられる水は、その使用目的に応じて任意に選択することができる。例えば医療用積層体に使用するのであれば、水は無菌のものが好ましく、例えば生理食塩水を用いることができる。必要に応じて、トリス緩衝剤、HEPES緩衝剤、リン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤等の緩衝剤、防腐剤、殺菌剤等の添加物を加えることもできる。

[0028] 本発明の水性組成物は、27℃以上の温度で急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解する。急速にゲル化する温度として、本発明者らは「実用的な最高ゲル化温度 (T_{g-max})」を定義して、本明細書にて用いる。UpCell (登録商標：セルシード社) 等の細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材を27℃にすると、30分前後で細胞シートが剥離する場合がある。そこで、 T_{g-max} とは、30分以内に実用的な硬さ ($G' = 50 Pa$) 以上になる温度で最高の温度を表す。 T_{g-max} の測定法方法は、後述する。また、ゲルが溶解する温度としては「最低融解温度」を用いる。従って、本発明の水性組成物は、 T_{g-max} が27℃以上であり、最低融解温度が32℃以上のものということになる。

[0029] 本水性組成物の使用目的に応じて、実施例15に示すように、本発明のゼラチン等に含まれる高分子量成分および低分子量成分等の含有量を調整することで、あるいは実施例16に示すように、本発明のゼラチン等の濃度を調整することで、本発明の水性組成物の T_{g-max} および最低融解温度を所望の値に調整することができる。

4. 医療用積層体

本発明の医療用積層体は、細胞シートと、該細胞シートの片面または両面に接着する本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する1つまたは2つの支持体層とからなる。

[0030] 該細胞シートの片面または両面に接着する本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する1つまたは2つの支持体層として、前記3.に記載の水性組成物が用いられる。

[0031] 細胞シートとしては、細胞が互いに連結してシート状になったものをいい、典型的には1つの細胞層からなるものであるが、2以上の細胞層から構成されるものも含む。細胞同士は、直接または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも機械的に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなどが挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも機械的に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。細胞シートの細胞としては、任意の細胞が含まれるが、例えば、筋芽細胞、心筋細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、角膜上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、歯根膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。細胞の動物種としては、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット等が挙げられる。

[0032] 支持体層として用いられる前記3.の水性組成物中の本発明のゼラチンまたはその化学修飾体の含有量としては、例えば1～10質量%が挙げられ、好ましくは2～8質量%が挙げられ、より好ましくは3～7質量%が挙げられ、さらに好ましくは4～6質量%が挙げられる。

[0033] 支持体層は、細胞シートの全体に接着することが好ましいが、細胞シートの一部だけに接着していてもよい。支持体層の厚みとしては、細胞シートを支持できる厚みであれば特に限定されないが、剥離の過程で細胞シートの破損を避ける強度の点から、例えば1～10mmが挙げられ、好ましくは2～7mmが挙げられ、より好ましくは3～5mmが挙げられる。

[0034] 本発明において、支持体層は細胞シートの片面または両面に接着しており、強度を有しているため、脆弱な細胞シートを確実に支持することができる。従って、細胞シートを安定して保管および移送できるだけでなく、培養基材からの剥離も容易に行うことができる。

[0035] 本発明の医療用積層体を室温で7日間程度保管しても、実施例19に示すように、細胞シート中の細胞の死滅は非常に少ない。このように、死滅が少ないことから、細胞や組織の機能は著しく低下する低温での保管および移送ではなく、室温での保管および移送が可能となる。

5. 医療用積層体の製造方法および細胞シートの単離方法

本発明の医療用積層体は、例えば培養基材上に形成された細胞シートに、本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する液状またはゾル状の水性組成物を被覆し、該液状またはゾル状の水性組成物をゲル化させて支持体層を形成することを含む方法で製造することができる。また、細胞シートの両面に支持層を有する医療用積層体は、例えば培養基材上に形成された細胞シートに、本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する液状またはゾル状の水性組成物を被覆し、該液状またはゾル状の水性組成物をゲル化させて第1の支持体層を形成し、続いて前記細胞シートをゲル化した支持体層とともに前記培養基材から分離し、該細胞シートの前記培養基材と接していた面に本発明のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する液状またはゾル状の水性組成物を被覆し、該液状またはゾル状の水性組成物をゲル化して第2の支持体層を形成することを含む方法で製造することができる。

[0036] 細胞シートは通常、培養基材上で形成される。培養基材としては、その上で細胞シートを形成し得るものであれば特に限定されない。刺激、例えば温度や光に応答して物性が変化する材料で培養基材の表面が被覆されていてもよい。これらの材料に所定の刺激を与えることによりその物性、例えば、親水性や疎水性を変化させ、同材料上に付着した細胞培養物の剥離を促進することができる。培養基材として、例えばUpCell（登録商標：セルシート製）の細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材を用いることができる。

- [0037] 細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材を用いれば、37℃等（第1の温度）で細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材上の細胞シートにゾル状態の本発明の水性組成物を加え、27℃以上の温度（第2の温度）で細胞シートが同器材に接着した状態を保ちながら本発明の水性組成物をゲル化させ、その後、27℃より低い温度（第3の温度）に冷却して本発明の水性組成物で保護された細胞シートを同器材から分離して、移送し、目的地で再び37℃等（第1の温度）に加温して細胞シートを単離することに用いることができる。
- [0038] 細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材を用いる場合について、さらに具体的に説明する。
- [0039] まず、第1の温度で細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材上の細胞シートにゾル状態の本発明の水性組成物を加える。本発明の水性組成物に含まれる本発明のゼラチンまたはその化学修飾体の含有量としては、例えば1～10質量%が挙げられ、好ましくは2～8質量%が挙げられ、より好ましくは3～7質量%が挙げられ、さらに好ましくは4～6質量%が挙げられる。前記3.の液状またはゾル状の水性組成物の量としては、細胞シートを支持できる厚みとなる量が挙げられ、例えば1～10mmとなる量が挙げられ、好ましくは2～7mmとなる量が挙げられ、より好ましくは3～5mmとなる量が挙げられる。第1の温度としては、例えば、34～38℃が挙げられ、好ましくは37℃が挙げられる。
- [0040] 続いて、27℃以上の温度（第2の温度）で細胞シートが同器材に接着した状態を保ちながら本発明の水性組成物をゲル化させる。第2の温度としては、例えば27～32℃が挙げられ、好ましくは28～31℃が挙げられ、より好ましくは28～30℃が挙げられる。固化またはゲル化の時間としては、例えば10分間～1時間が挙げられ、好ましくは15～30分間が挙げられる。
- [0041] その後、27℃より低い温度（第3の温度）に冷却して本発明の水性組成物で保護された細胞シートを同器材から分離する。第3の温度としては、例

例えば20～25℃が挙げられる。

[0042] 得られた片面に本発明の水性組成物を有する医療用積層体は、ピンセット等を用いて表面と裏面をひっくり返して、前記と同様にして、細胞シートの培養基材と接していた面に第2の本発明の水性組成物を形成させて、両面に本発明の水性組成物を有する医療用積層体を製造することもできる。

[0043] 得られた本発明の水性組成物で保護された細胞シートを、目的地で再び37℃等（第1の温度）に加温して細胞シートを単離する。第1の温度は、前記の通りである。

[0044] 本発明の水性組成物を除去した後、必要に応じて水で細胞シートを洗浄することができるが、ゼラチンは生体適合性があるため、細胞シートにゼラチンが多少残存し付着していても、医療に用いる上で支障はない。また、本発明の水性組成物を除去せずに、医療用積層体を生体に直接適用することもできる。直接適用した場合、本発明の水性組成物は生体の体温に伴って溶解され、あるいは生体内の酵素によって分解されるため、そのまま生体中に留めておくか、あるいは医療行為の際に除去することもできる。医療用積層体を生体に直接適用することで、細胞シートを適用するための移植用の治具等を用いる必要がなくなる。

6. ゼラチンのその他の使用

本発明のゼラチンは、前記の細胞シートへの適用の他、その特性に基づいて様々な用途（例えば、培地、食品、化粧品、医薬等）に応用することもできる。

[0045] 本発明の水性組成物において本発明のゼラチン等の濃度を高めることで、最低融解温度を37℃以上にすることもできる。その場合、37℃で融解しないため、細胞をゲル状態の本発明の水性組成物の中に分散させて、そのまま37℃で培養することができる。また、37℃でゲル状態を保つことから、細胞を含むゲル状態の本発明の水性組成物を、生体にそのまま移植することもできる。その場合、本発明のゼラチン等は、生体内の酵素によりゆっくりと分解される。

[0046] 食品としては、例えば即席食品、野菜、果実、消化を活性化する繊維性食品、機能性食品等が挙げられる。化粧品および医薬としては、例えば経皮製剤、内服剤、坐剤、経腔剤等が挙げられる。

実施例

[0047] 以下、本発明を実施例、比較例、評価試験によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

[0048] 実施例および比較例で調製したゼラチンの水性組成物の評価試験は、下記方法にて実施した。

(a) ゼラチン成分の含有量の分析

ゼラチンに含まれる高分子量成分、 γ 鎖、 β 鎖、 α 鎖および低分子量成分の含有量は、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)、およびそのデンストグラムによって解析した。

[0049] 電気泳動のゲルは、ミニプロティアンTGXプレキャストゲル (登録商標: バイオ・ラッド製) を用いた。実施例および比較例のゼラチンを、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS: 和光純薬製)、ブロムフェノールブルー (BPB: 和光純薬製)、グリセリン (関東化学製)、トリス緩衝液 (和光純薬製) と混合し、試料濃度が1レーンあたり10 μ gになるよう調製し、100 $^{\circ}$ Cで3分間加熱した。試料溶液を各ウェルに10 μ Lずつアプライし、プロトコールに記載のある所定の方法によって電気泳動を行った。分子量マーカーとして、プレシジョンPlusプロテインブルースタンダード (商標: バイオ・ラッド製) を使用した。また、豚臍由来アテロコラーゲンはSDS-PAGEを行うと、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1 1$ 、 $\beta 1 2$ 、 γ 、高分子量成分からなるため、各成分のピークのコントロールとして用いた。電気泳動後、クーマシーブリリアントブルー (CBB: 和光純薬製) を用いて染色を行った。さらに、メタノール (和光純薬製)、酢酸 (和光純薬製)、超純水によって調製された脱色液を用いて脱色を行った。

[0050] ゼラチンに含まれる高分子量成分、 γ 鎖、 β 鎖、 α 鎖および低分子量成分の含有量の解析に用いたデンストグラムの取得には、画像解析ソフトIma

g e J (N I H) を用いた。その手法は以下の通りである。脱色後のゲルをゲルドライヤー（バイオ・ラッド製）で乾燥させ、得られた乾燥体をスキャナーで電子化した。I m a g e J を用いた画像処理により、バックグラウンドを差し引き、泳動バンドの幅に応じてレーンごとに、各バンドの位置と、画素数から算出した輝度をグラフ化したデンシトグラムを作成した。ゲル画像に基づいてデンシトグラム上にベースラインを引き、ピークごとの面積を算出することで各ピーク濃度を定量した。レーン全体の合計面積に対する各バンドの面積比から、ゼラチンに含まれる高分子量成分、 γ 鎖、 β 鎖、 α 鎖および低分子量成分の組成比を算出した。

[0051] なお、低分子量成分のバンドとしては、分子量マーカの100kDaより低分子量のすべての成分を選択した。 α 鎖のバンドとしては分子量マーカの100kDaから150kDaにあるデンシトグラムにおけるピークを選択した。 β 鎖のバンドとしてはデンシトグラムにおける $\beta 11$ 、 $\beta 12$ に相当するピークを選択した。 γ 鎖のバンドとしてはデンシトグラムにおいて γ 鎖に相当するピークを中心に、 γ 鎖と高分子成分との間の最も深い谷より低分子の成分を含めて選択した。高分子量成分のバンドとしてはデンシトグラムにおいて γ 鎖と高分子成分との間の最も深い谷より高分子の成分を選択した。

(参考文献)

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". Nature Methods 9, 671-675, 2012.

(b) T g - m a x の測定

動的粘弾性測定装置 (Thermo Fisher Scientific製、型式:MARSIII) を使用して測定した。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S : シグマアルドリッチ製) を溶媒とし、実施例および比較例のゼラチンから5.0質量%のゼラチン

水性組成物を調製して検体とした。50℃に加熱した状態のゼラチン水性組成物を37℃に加熱したダブルコーン型センサー（内径60mm、コーン角度1°）に3.0ml充填し、-1.2℃/分でターゲット温度まで冷却して貯蔵弾性率 G' の変化を追跡した。 G' が50Paに達するまでの時間を、ターゲット温度を少なくとも3点変えて計測した。縦軸に貯蔵弾性率 G' （Pa）を、横軸に時間（分）として両者の関係をプロットして最小二乗法で一次の近似式を求め、その近似式から30分間で50Paに達する温度を T_{g-max} として算出した。なお、 G' を測定する際の前記動的粘弾性測定は、剪断ひずみ0.01でのひずみ制御下、周波数1Hzで行った。

（c）最低融解温度の測定

前記（b）と同じ動的粘弾性測定装置を使用して測定した。（b）と同様に調製したゼラチン水性組成物を50℃に加熱した状態で、37℃に加熱したダブルコーン型センサーに3.0ml充填した。その後、以下に示す測定プロファイルによりゼラチンのゲル化と融解を、ひずみ制御の動的粘弾性測定で追跡した。

（i）温度、37℃→4℃（-3℃/分）；剪断ひずみ、0.005；周波数、1Hz。（ii）温度、4℃（120分）；剪断ひずみ、0.001；周波数、1Hz。

（iii）温度、4℃→x℃（+1.2℃/分）；剪断ひずみ、0.01；周波数、1Hz。

（iv）温度、x℃（30分）；剪断ひずみ、0.005；周波数、1Hz

（v）温度、x℃→x+1℃（+1.2℃/分）；剪断ひずみ、0.005；周波数、1Hz。

（vi）プロファイル（iv）と（v）を、+1℃ずつ段階的に温度上昇するように繰り返す。

このような段階的溫度上昇を、溫度保持中の G' が1Pa未満になるまで行い、その温度を最低融解温度とした。

(d) 医療用積層体から単離された細胞の血球計算盤による細胞生存率の評価

細胞の生存率を定量的に評価するために、血球計算盤により生細胞と死細胞を計測した。実施例のゼラチン水性組成物を、緩衝液 (Hanks' Balanced Salt Solution: ライフテクノロジーズ製) と混合して、基材濃度が5質量%になるように調製し、温度を37°Cに保温して基材ゾルを調製した。一方、温度応答性培養皿 (UpCell (登録商標): セルシード製) に、ヒト新生児皮膚線維芽細胞NB1RGB (理化学研究所バイオリソースセンター提供、リソースNo. RBRC-RCB0222) を播種して、オーバーコンフルエントにして、細胞シートを作製した。細胞シートは、37°Cに保温したサーモプレートに静置し、37°Cに保温された緩衝液で洗浄した。ゾル状態のゼラチン水性組成物を、細胞シート表面を覆ったのち、サーモプレートを27°Cに30分間冷却して、基材ゾルをゲル化させた。細胞シートと一緒に、ゲル状態のゼラチン水性組成物を培養皿から剥がして、細胞シート面を上にして浮遊細胞用培養皿に移した。温度を37°Cに保温したゾル状態のゼラチン水性組成物で、細胞シート面を覆い、医療用積層体を得た。国内における他所への搬送と手術までの保存を想定して、この医療用積層体を室温に1週間静置した。

[0052] 医療用積層体を室温に1週間静置した後、医療用積層体と等量の1%コラゲナーゼ (和光純薬製) / 0.2%トリプシンインヒビター (和光純薬製) 緩衝液を加え、CO₂インキュベーター (5%CO₂, 37°C) に移して、30分間振とうしてゼラチン水性組成物を溶解させた。細胞を分離するために、遠心分離機 (himacCR-GIII: 日立工機製) により1000rpmで3分間遠心して上清を除去し、緩衝液を加えて遠心して上清を除去することを2回行った後、試料の細胞を回収した。緩衝液に細胞塊を分散させて細胞懸濁液を調製し、懸濁液から100μl採取して、0.4%トリパンブルー染色を行った。染色後の細胞は、カバーガラスをセットした血球計算盤 (改良ノイバウエル: サンリード硝子製) に10μl滴下して、トリパンブルーで染色

された死細胞と染色されなかった生細胞の数を計測した。細胞の生存率は、値が高いほど好ましく、90%以上が好ましい。

$$\{\text{細胞生存率 (\%)}\} = \{1 - (\text{死細胞数}) / (\text{生細胞数} + \text{死細胞数})\} \times 100$$

実施例 1

ゼラチンの調製

豚腱由来アテロコラーゲンを0.3質量%のpH3.0の水溶液にして、60℃で0.25時間、加熱処理した。その後、1N水酸化ナトリウム水溶液でpH7.0に調整し、凍結乾燥して、実施例1のゼラチンを得た。

実施例2～14および比較例1～7

ゼラチンの調製

実施例1の調製と同様にして、表1に記載の通り、原料、処理時間または処理温度を変更して、実施例2～14および比較例1～5のゼラチンを調製した。

[0053] 比較例4および5の原料は、販売されているコラーゲンであり、コラーゲンBM（豚皮由来：新田ゼラチン社製）である。比較例6および7は、販売されているゼラチンであり、それぞれbeMatrix gelatin LS-H（豚皮由来：新田ゼラチン社製）およびゼラチン（豚皮由来：新田ゼラチン社製）である。

[0054]

[表1]

No	原料	処理pH	処理温度 (°C)	処理時間 (時間)
実施例1	豚臍コラーゲン	3.0	60	0.25
実施例2	豚臍コラーゲン	3.0	60	1.0
実施例3	豚臍コラーゲン	3.0	60	2.0
比較例1	豚臍コラーゲン	3.0	60	5.0
実施例4	豚臍コラーゲン	7.0	60	1.0
実施例5	豚臍コラーゲン	7.0	60	5.0
実施例6	豚臍コラーゲン	7.0	60	15.0
実施例7	豚臍コラーゲン	3.0	70	0.25
比較例2	豚臍コラーゲン	3.0	70	2.0
実施例8	豚臍コラーゲン	7.0	70	1.0
実施例9	豚臍コラーゲン	7.0	70	5.0
比較例3	豚臍コラーゲン	7.0	70	15.0
実施例10	豚臍コラーゲン	3.0	50	0.25
実施例11	豚臍コラーゲン	3.0	50	1.0
実施例12	豚臍コラーゲン	3.0	50	2.0
実施例13	豚臍コラーゲン	3.0	50	5.0
比較例4	コラーゲンBM(豚皮コラーゲン)	3.0	60	1.0
比較例5	コラーゲンBM(豚皮コラーゲン)	7.0	60	1.0
実施例14	ダチョウ皮膚コラーゲン	3.0	60	1.0
比較例6	beMatrix gelatin LS-H (豚皮)	—	—	—
比較例7	汎用ゼラチン(豚皮)	—	—	—

[0055] 評価試験 1

実施例1～14および比較例1～7のゼラチンの組成、 $T_g - max$ および最低融解温度

実施例1～14および比較例1～7のゼラチンの組成を分析した。その分析結果を、表2に記す。また、これらのゼラチンを5質量%となるようにリン酸緩衝生理食塩水で溶解した水性組成物の $T_g - max$ および最低融解温度を測定した結果を、表2に記す。

[0056]

[表2]

No	高分子量成分	γ	β	α	低分子量成分	T _g -max	最低融解温度	最低融解温度(推定)
実施例1	18.4	25.5	27.8	23.8	4.4	29.8	—	34.8
実施例2	13.9	30.7	28.6	24.6	2.1	28.3	33.8	—
実施例3	11.1	33.4	30.9	20.9	3.7	28.6	—	33.3
比較例1	6.8	27.5	25.3	26.9	13.5	26.3	—	31.3
実施例4	16.0	25.7	24.4	30.3	3.6	30.8	35.4	—
実施例5	12.8	27.5	26.5	26.6	6.5	29.0	—	34.0
実施例6	10.5	32.7	24.4	24.3	8.1	27.3	—	32.3
実施例7	10.2	34.6	27.3	26.4	1.6	29.3	—	34.3
比較例2	9.1	36.1	21.7	20.8	12.2	25.4	—	30.4
実施例8	12.7	30.4	24.2	29.0	3.8	29.1	—	34.1
実施例9	11.0	31.8	26.6	23.2	7.4	27.4	—	32.4
比較例3	2.1	30.1	31.1	27.6	9.2	24.6	—	29.6
実施例10	20.7	24.7	25.3	26.1	3.2	30.0	—	35.0
実施例11	21.3	23.3	28.0	23.9	3.5	30.0	—	35.0
実施例12	18.0	21.5	27.3	24.2	9.1	29.1	—	34.1
実施例13	15.8	25.8	23.1	25.6	9.6	28.7	—	33.7
比較例4	8.3	27.8	21.5	35.8	6.7	26.4	—	31.4
比較例5	4.9	12.0	21.8	48.7	12.6	25.3	—	30.3
実施例14	34.0	21.7	16.4	23.0	5.0	28.4	33.8	—
比較例6	4.7	29.2	22.0	37.5	6.6	23.8	—	28.8
比較例7	6.0	26.6	53.4	0.1	14.0	24.0	—	29.0

[0057] 図1に、実施例1～14および比較例1～7のゼラチンにおける、高分子量成分の含有量とT_g-maxとの関係を示す。また、図2に、実施例1～14および比較例1～7のゼラチンにおける、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値とT_g-maxとの関係を示す。図1から、高分子量成分の含有量が10～50質量%であるゼラチンは、その5質量%水性組成物のT_g-maxが27℃以上であり、急速にゲル化することが分かる。また、図2から、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上であるゼラチンは、その5質量%水性組成物のT_g-maxが27℃以上であり、急速にゲル化することが分かる。

[0058] 表2に記載の通り、実施例2、4および14のゼラチンの5質量%水性組成物のT_g-maxと最低融解温度は、ほぼ5℃相違している。そこで、これら以外のゼラチンについては最低融解温度の測定はしていないが、T_g-maxに5℃を加えたものを最低融解温度の推定値として、表2に記載する。

実施例15

ゼラチンの混合実験

実施例4のゼラチンと比較例7のゼラチンを1対1（重量比）で混合したゼラチンを用いて、その5質量%ゼラチン水性組成物のT_g-maxを求めた。その結果、T_g-maxは、27.3℃となった。実施例4のゼラチンと比較例7のゼラチンの5質量%水溶液のT_g-maxは、それぞれ30.8℃および24.0℃であるため、ほぼその平均値となった。

[0059] 以上の通り、種類の異なる複数のゼラチンまたは複数のゼラチンの成分を混合することなどによって、高分子量成分の含有量、および高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値を調整すれば、それらの数値に応じたT_g-maxを有するゼラチンを調製することができることが分かる。

実施例16

濃度の変化によるT_g-maxの変化

実施例4のゼラチンをリン酸緩衝生理食塩水に溶解させて、3、5および7質量%溶液を調製した。この水溶液のT_g-maxを求めた。濃度とT_g-maxの関係をプロットした図を、図3に示す。実施例4のゼラチンでは、濃度上昇に伴って、T_g-maxが上昇した。

実施例17

ゼラチンのサクシニル化

高分子量成分の含有量が高くなると、ゼラチンの5質量%水性組成物は溶解性が低下することがある。ゼラチンをサクシニル化して、塩基性アミノ酸（リジン）にかさ高いコハク酸を導入すれば、溶解性が高まることが一般的に知られている。そこで、実施例2のゼラチンをサクシニル化した。

[0060] 氷浴中で10℃未満に保ったゼラチン原料の0.1%コラーゲン水溶液に、1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpHを9~10にした。コラーゲン水溶液を攪拌しながら、ペレット状のコハク酸無水物（東京化成製）を少量ずつ投入し、1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下してpHが9~10の範囲になるように調節した。所定量のコハク酸無水物をすべて投入し、pHが変化しなくなったところで反応終了とした（反応時間は4時間を超えなかった

）。得られた反応液に1 N塩酸を滴下することでpH4近傍にして、サクシニル化コラーゲンを析出させ、遠心分離機（日立工機社製、型式：himacCR-G III）により4000rpmで20分間遠心して沈殿物を回収した。pH4の希塩酸に沈殿物を分散させ、再度遠心分離する洗浄操作を2回行った後、濃度が約0.1%になるように沈殿物を純水に分散させ、1 N水酸化ナトリウム水溶液を滴下してpHを中性にして沈殿物を溶解させた。得られた水溶液を冷蔵庫内で純水に対して透析し、ゼラチンを原料として用いるサクシニル化コラーゲンを得た。

[0061] サクシニル化度を制御するために、以上に述べたコラーゲンのサクシニル化操作を、コハク酸無水物／コラーゲン（w/w）=0.05、0.1、0.2、0.5、1、および3と変化させて実施し、実施例1と同様にゼラチンを調製した。反応に用いたゼラチンに対するコハク酸無水物との質量比と、サクシニル化された塩基性アミノ酸の置換率との関係を、図4に示す。この結果から、置換率が90%で頭打ちになり、それ以上のサクシニル化は容易ではないことが分かる。

[0062] 前記反応で得られた種々の置換率を有するゼラチンのサクシニル体について、その5質量%水性組成物のT_{g-max}を測定する。置換率が40~70%のゼラチンの水性組成物のT_{g-max}は、無置換の実施例2のゼラチンの水性組成物と同等である。しかし、置換率が80%以上のゼラチンの水性組成物のT_{g-max}は、無置換の実施例2のゼラチンの水性組成物とT_{g-max}よりも低く、置換率がさらに上昇することで、さらにT_{g-max}が低下する。

実施例18

ゼラチンの水性組成物のゲル化挙動

実施例4のゼラチンの5質量%水性組成物を、図5に示す通り、37℃、30℃、24℃および37℃と温度を変化させて保温した。その時々貯蔵弾性率G'（Pa）を、動的粘弾性測定装置を用いて測定した。保温温度と貯蔵弾性率G'（Pa）の挙動を図5に示す。

[0063] 30℃で貯蔵弾性率 G' (Pa)が急激に上昇してゲル化し、24℃まで温度を下げることでゲルの硬さを更に高めることができた。このように形成されたゲルは37℃で速やかに溶解した。

実施例19

医療用積層体の調製

温度応答性培養皿でヒト新生児皮膚線維芽細胞NB1RGB（理化学研究所バイオリソースセンター提供、リソースNo. RBRC-RCB0222）をオーバーコンフルエントになるまで培養して細胞シートを調製した。実施例2のゼラチンの5質量%水性組成物を37℃に加温して、30℃に保温した細胞シートの上に加えてゲル化させて第1の支持体層を形成させた。続いて細胞シートと第1の支持体層を室温に30分間静置した後、培養皿から剥がして、表面と裏面を裏返して、裏面にも、同様にして第2の支持体層を形成させた。

[0064] 一方、比較例6のゼラチンの5質量%水性組成物を37℃に加温して、30℃に保温した細胞シートの上に加えたが、30℃ではゲル化しなかった。そこで、27℃より低い温度に冷却したところ、ゲル化が生じる前に細胞シートが剥離したため、細胞シートを回収することができなかった。

室温で保存された医療用積層体から単離された細胞の血球計算盤による細胞生存率の評価

実施例19で調製した医療用積層体を室温に静置して、医療用積層体から細胞を回収し、細胞生存率を測定した結果を表3に記す。3日までは95%以上の生存率を示し、7日後の90%以上の生存率を示した。

[0065] [表3]

静置期間(日)	0	1	2	3	7
細胞生存率(%)	99.3±0.5	96.4±3.7	96.3±0.4	98.2±1.8	92.0±10.2

[0066] 実施例20

高濃度ゼラチン水性組成物

実施例4のゼラチンを8質量%によるようにリン酸緩衝生理食塩水で溶解

し、2 mLを35 mmディッシュに添加した。20℃で一晩静置してゲル化させた。その後、37℃にインキュベートし、1日目および4日目に観察をした。また、比較例6のゼラチンを用いて、同様にして20℃一晩で静置しゲル化させた。その後、37℃にインキュベートし、1日目に観察をした。両方のゲルの様子を図7に記す。

[0067] 8質量%の比較例6のゼラチンのゲルは、37℃で1日目にはゲルが溶解したのに対して、8質量%の実施例4のゼラチンのゲルは、37℃で4日目でも十分にゲルを維持していることが分かる。この37℃で融解しない特性を利用すれば、細胞シートへの応用の他に様々な用途（例えば、培地、食品、化粧品、医薬等）に応用することができる。

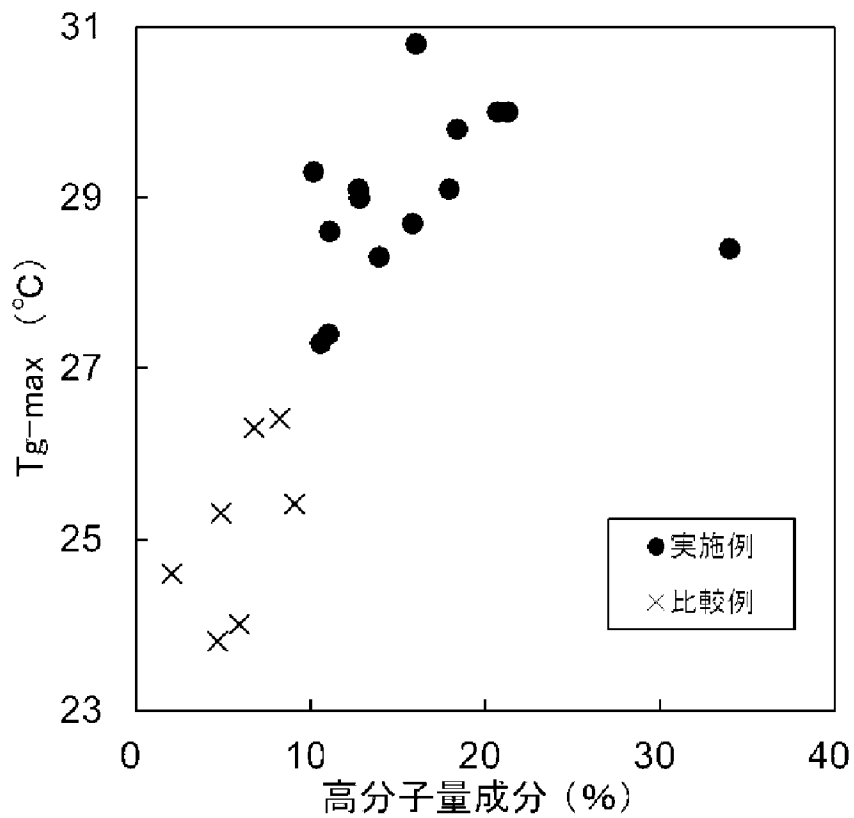
[0068] 本発明のゼラチンと水とを混合して調製された水性組成物は、27℃以上の温度で急速にゲル化し、約32℃以上でゲルが溶解する。前記の効果を利用することで、本発明は細胞シートの保存および移送等に用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 高分子量成分の含有量が10～50質量%であり、高分子量成分の含有量から低分子量成分の含有量を差し引いた値が0質量%以上であるゼラチンまたはその化学修飾体。
- [請求項2] 腱由来コラーゲンに由来する、請求項1に記載のゼラチンまたはその化学修飾体。
- [請求項3] コラーゲンを、0.1～10質量%の濃度になるように水に加え、pHを2～9に調整して、40～80℃の温度範囲で熱変性させることを含む、請求項1に記載のゼラチンまたはその化学修飾体の製造方法。
- [請求項4] コラーゲンが腱由来である、請求項3に記載の製造方法。
- [請求項5] 請求項1または2に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を0.5～10質量%で含有する、水性組成物。
- [請求項6] 細胞シートと、該細胞シートの片面または両面に接着する請求項1または2に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する1つまたは2つの支持体層とからなる、医療用積層体。
- [請求項7] 培養基材上に形成された細胞シートに、請求項1または2に記載のゼラチンまたはその化学修飾体を含有する液状またはゾル状の水性組成物を被覆し、該液状またはゾル状の水性組成物をゲル化させて支持体層を形成することを含む、医療用積層体の製造方法。
- [請求項8] 請求項7の方法によって請求項6に記載の医療用積層体を製造し、つづいて前記支持体層を除去することを含む、細胞シートの単離方法。

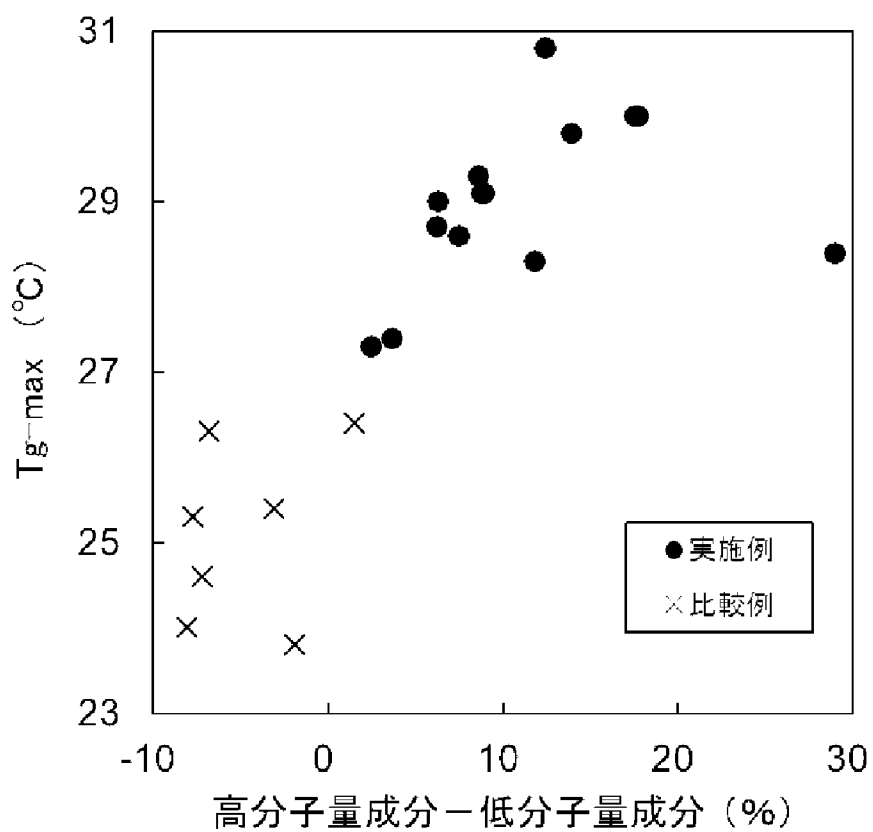
[図1]

FIG.1



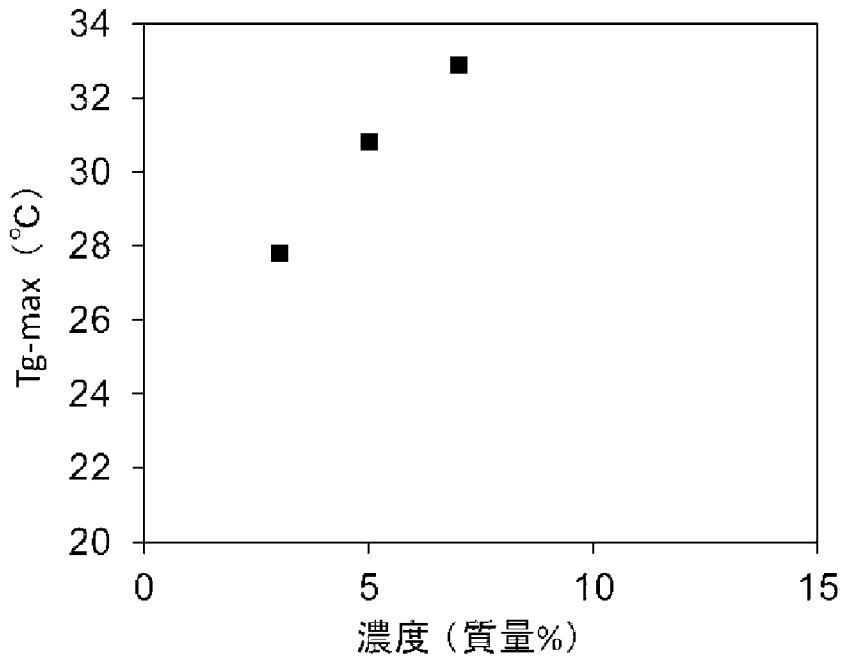
[図2]

FIG.2



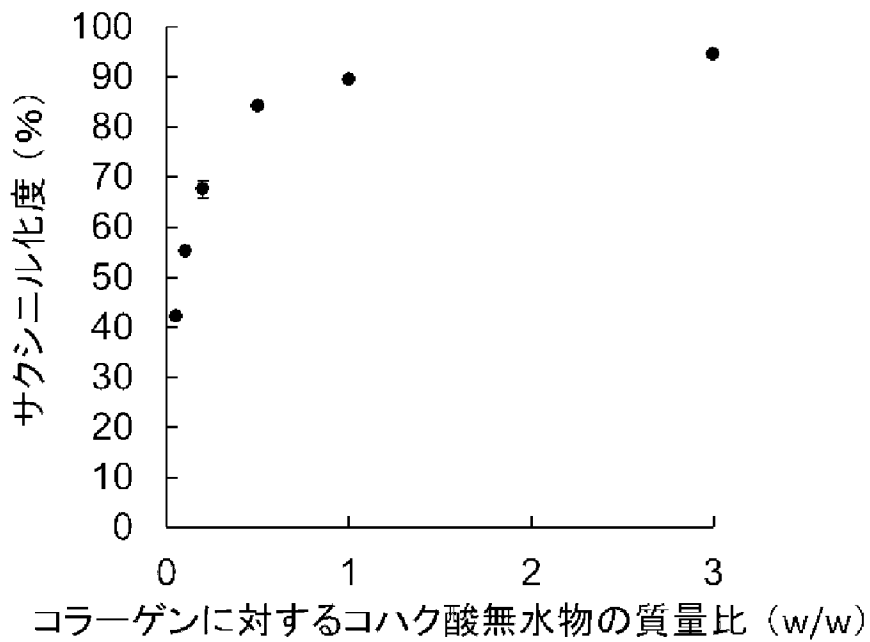
[図3]

FIG.3



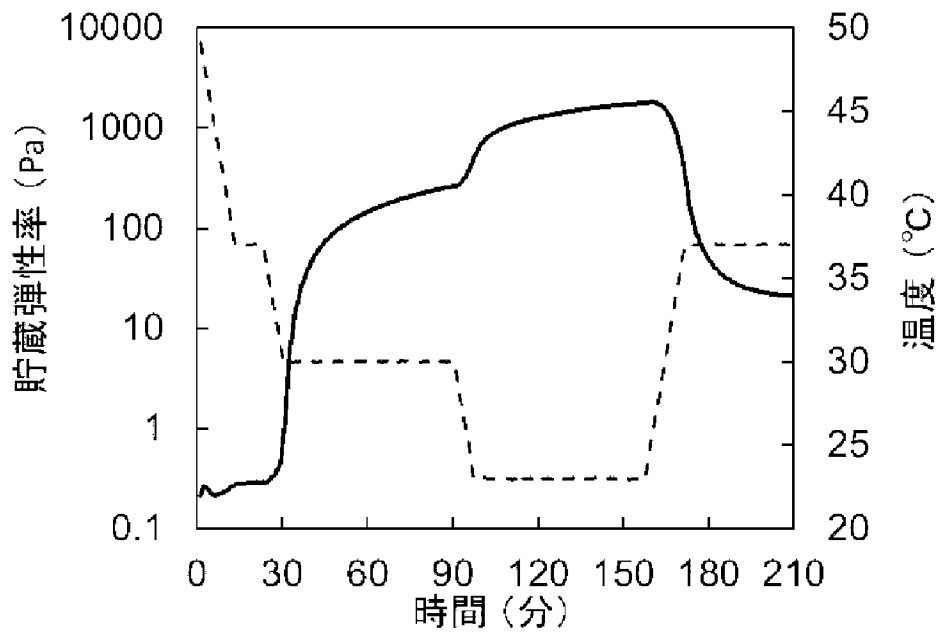
[図4]

FIG.4



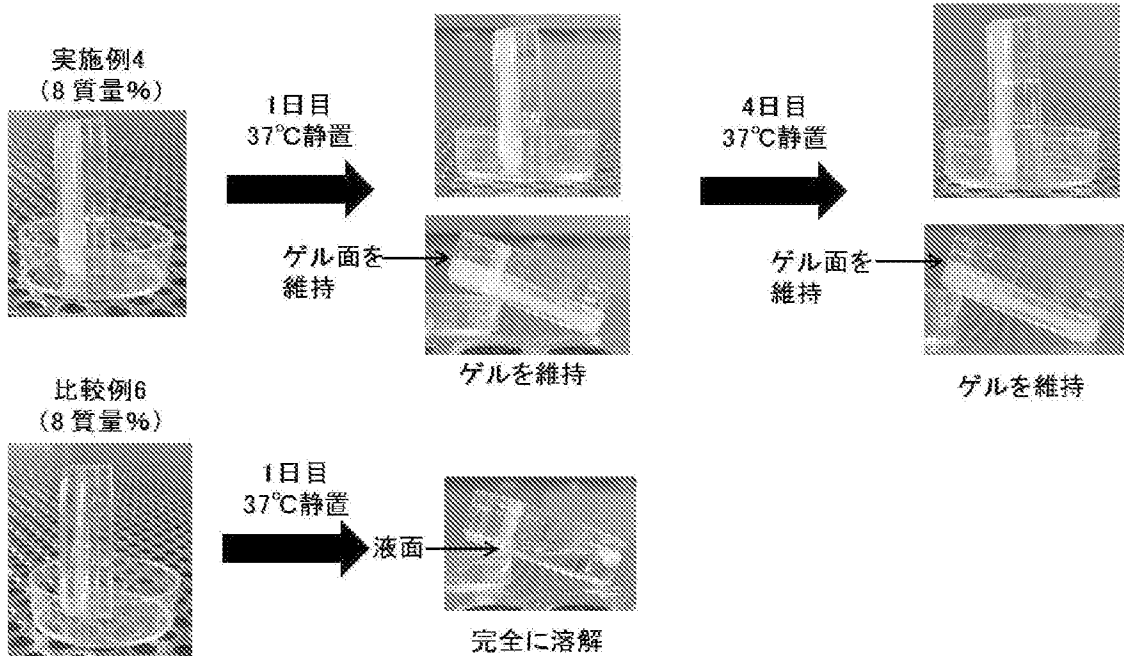
[図5]

FIG.5



[図6]

FIG.6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/78(2006.01)i, A61L15/32(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C08H1/06(2006.01)i, C09H3/00(2006.01)i, C12M3/04(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/78, A61L15/32, A61L27/00, C08H1/06, C09H3/00, C12M3/04, C12N5/071 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-144059 A (Eastman Kodak Co.), 26 May 2000 (26.05.2000), claims; paragraph [0007]; examples & US 5919906 A claims; column 2, lines 22 to 39; examples & EP 999470 A1	1, 5
X	JP 2006-63100 A (Shozo ENDO), 09 March 2006 (09.03.2006), claims; paragraph [0011]; examples 1 to 5 (Family: none)	5
X Y	OHYABU Yoshimi et al., "Evaluation of gelatin hydrogel as a potential carrier for cell transportation", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, Vol.118, No.1, p.112-115	1, 3, 5 2, 4, 6-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2017 (12.01.17)		Date of mailing of the international search report 24 January 2017 (24.01.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080829

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 1-6300 A (Istituto Gentili S.p.A.), 10 January 1989 (10.01.1989), claims & US 4894441 A claims & EP 284789 A1 & CA 1322166 A	2, 4
Y	JP 2011-172925 A (Terumo Corp.), 08 September 2011 (08.09.2011), claims; examples (Family: none)	6-8
A	JP 2015-122985 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 06 July 2015 (06.07.2015), entire text (Family: none)	1-8
A	WO 2014/104366 A1 (Nitta Gelatin Inc.), 03 July 2014 (03.07.2014), entire text & US 2015/0374881 A1 whole document & EP 2940126 A1 & JP 5946046 B	1-8
A	JP 2006-511219 A (Fuji Photo Film B.V.), 06 April 2006 (06.04.2006), entire text & US 2007/0004034 A1 whole document & EP 1576148 A2 & WO 2004/056976 A2	1-8

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K14/78(2006.01)i, A61L15/32(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C08H1/06(2006.01)i, C09H3/00(2006.01)i, C12M3/04(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K14/78, A61L15/32, A61L27/00, C08H1/06, C09H3/00, C12M3/04, C12N5/071</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2017年											
日本国実用新案登録公報	1996-2017年											
日本国登録実用新案公報	1994-2017年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2000-144059 A (イーストマン コダック カンパニー) 2000.05.26, 請求の範囲, 【0007】, 実施例, & US 5919906 A, claims, column2 1.22-1.39, examples, & EP 999470 A1</td> <td>1, 5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2006-63100 A (遠藤昭三) 2006.03.09, 請求の範囲, 【0011】, 実施例1~5, (ファミリーなし)</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 2000-144059 A (イーストマン コダック カンパニー) 2000.05.26, 請求の範囲, 【0007】, 実施例, & US 5919906 A, claims, column2 1.22-1.39, examples, & EP 999470 A1	1, 5	X	JP 2006-63100 A (遠藤昭三) 2006.03.09, 請求の範囲, 【0011】, 実施例1~5, (ファミリーなし)	5	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X	JP 2000-144059 A (イーストマン コダック カンパニー) 2000.05.26, 請求の範囲, 【0007】, 実施例, & US 5919906 A, claims, column2 1.22-1.39, examples, & EP 999470 A1	1, 5										
X	JP 2006-63100 A (遠藤昭三) 2006.03.09, 請求の範囲, 【0011】, 実施例1~5, (ファミリーなし)	5										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>12.01.2017</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>24.01.2017</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>坂崎 恵美子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>9451</td> </tr> </table>	4B	9451								
4B	9451											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	OHYABU Yoshimi et al., "Evaluation of gelatin hydrogel as a potential carrier for cell transportation", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, Vol.118, No.1, p.112-115	1, 3, 5 2, 4, 6-8
Y	JP 1-6300 A (インステイトウト ジエンテイーリ エス. ピー. エ イ.) 1989.01.10, 請求の範囲, & US 4894441 A, claims, & EP 284789 A1 & CA 1322166 A	2, 4
Y	JP 2011-172925 A (テルモ株式会社) 2011.09.08, 請求の範囲, 実施例, (ファミリーなし)	6-8
A	JP 2015-122985 A (大日本印刷株式会社) 2015.07.06, 文献全体, (ファミリーなし)	1-8
A	WO 2014/104366 A1 (新田ゼラチン株式会社) 2014.07.03, 文献全体, & US 2015/0374881 A1, whole document, & EP 2940126 A1 & JP 5946046 B	1-8
A	JP 2006-511219 A (フジ フォト フィルム ビー. ブイ.) 2006.04.06, 文献全体, & US 2007/0004034 A1, whole document, & EP 1576148 A2 & WO 2004/056976 A2	1-8