

明 細 書

発明の名称：膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物

技術分野

[0001] 本発明は、膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物等に関する。

背景技術

[0002] 近年、損傷した組織等の修復のために、種々の細胞を移植する試みが行われている。例えば、狭心症、心筋梗塞等の虚血性心疾患により損傷した心筋組織の修復のために、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、ES細胞、iPS細胞等の利用が試みられている（非特許文献1）。

[0003] このような試みの一環として、スキャフォールドを利用して形成した細胞構造物や、細胞をシート状に形成したシート状細胞培養物が開発されてきた（特許文献1、非特許文献2）。

シート状細胞培養物の治療への応用については、火傷等による皮膚損傷に対する培養表皮シートの利用、角膜損傷に対する角膜上皮シート状細胞培養物の利用、食道がん内視鏡的切除に対する口腔粘膜シート状細胞培養物の利用等の検討が進められており、その一部は臨床応用の段階に入っている。

[0004] そのような応用の一つとして、消化管等の臓器の損傷の治癒にシート状細胞培養物を利用することが提案されている。例えば特許文献2には、縫合不全等により生じた消化管の損傷部からの漏出を治癒または予防するために、間葉系幹細胞を含むシート状細胞培養物を利用することが記載されている。また非特許文献3や4には、膵液瘻や胃穿孔のモデル動物において、それらの治癒に骨格筋芽細胞シートを用い得ることが記載されている。

[0005] 膵液瘻とは、膵臓から膵液が漏出することを指し、例えば、膵炎や外傷によって生じ得、また、膵臓の外科的処置後に縫合部位に貫通孔が生じることによっても生じ得る。漏出した膵液は、消化液や胆汁と混合して活性化され得、漏出部位周辺の組織を溶解することによって炎症を引き起こし得る。また、膵液瘻は、漏出部位周辺の血管を溶解し、出血を引き起こすことによ

て、重篤な予後をもたらす場合もある。

[0006] 特許文献3には、マンノースで処理した脂肪組織由来間葉系幹細胞シートがラット膵液瘻モデルにおいて優れた治療効果を発揮したことが記載されている。具体的には、切り込みを入れたラットの膵臓の膵断端に前記間葉系幹細胞シートを貼付したところ、膵液瘻の指標である腹水のアミラーゼ値が低下したこと、また、腹水のリパーゼ値についても同様の傾向を示したことが記載されている。

[0007] 他方、近年、生体組織の癒合を促進するシート状の本体部を、膵実質の切断面周辺と空腸の腸壁との間に挟み込み、膵実質の切断面周辺と空腸の腸壁を接合する試みもなされている（特許文献4）。また、生分解性シートを空腸と膵実質との間に配置し、空腸と膵実質を縫合することにより、空腸、膵実質、膵管の間の癒合を促進する試みもなされている（特許文献5）。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特表2007-528755号公報
特許文献2：国際公開第2017/130802号
特許文献3：特許第6332800号公報
特許文献4：特開2019-162405号公報
特許文献5：国際公開第2019/156230号

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Haraguchi Y. et al., Stem Cells Transl. Med., 1(2), 136-141 (2012)
非特許文献2：Sawa Y. et al., Surg. Today, 42(2), 181-184 (2012)
非特許文献3：Tanaka T. et al., J. Gastroenterol., 48(9), 1081-1089 (2013)
非特許文献4：Tanaka S. et al., Surg. Today., 47(1), 114-121 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、膵液瘻を予防または処置するための手段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

[0011] 本発明者は、膵液瘻を予防または処置するための方法を研究する中で、膵臓の外科的処置後に縫合部位に貫通孔が生じるなどして縫合部位の液密性が悪化することにより、縫合部位から膵液が漏出し得ると考えた。そして、かかる縫合部位の液密性を維持すべく鋭意研究を進めたところ、膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆い、膵臓の切断面をシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合させることにより、膵臓の外科的処置後に縫合部位の液密性を維持できることを見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を続けた結果、本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち本発明は、以下に関する。

[1] 膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物であって、膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含み、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合される、前記シート状細胞培養物。

[2] 膵管が、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合される、[1]のシート状細胞培養物。

[3] 膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔が、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通する、[2]のシート状細胞培養物。

[4] 膵管が、主膵管および／または副膵管である、[1]～[3]のシート状細胞培養物。

[5] 小腸が、十二指腸または空腸である、[1]～[4]のシート状細胞培養物。

[0013] [6] 膵臓の切断面、小腸腸壁の貫通孔、および／またはシート状細胞培養物の貫通孔が、外科的処置によって形成される、[1]～[5]のシート状細胞培養物。

〔 7 〕 外科的処置が、膵頭十二指腸切除手術である、〔 6 〕 のシート状細胞培養物。

〔 8 〕 膵液瘻を予防または処置するための、〔 1 〕 ～〔 7 〕 のシート状細胞培養物。

〔 9 〕 骨格筋芽細胞を含む、〔 1 〕 ～〔 8 〕 のシート状細胞培養物。

〔 1 0 〕 ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を含む、〔 1 〕 ～〔 9 〕 のシート状細胞培養物。

[0014] 〔 1 1 〕 膵液瘻を予防または処置するための方法であって、膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップ、および膵臓の切断面をシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合させるステップを含む、前記方法。

〔 1 2 〕 膵管を、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合させるステップをさらに含む、〔 1 1 〕 の方法。

〔 1 3 〕 膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔を、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通させるステップをさらに含む、〔 1 2 〕 の方法。

〔 1 4 〕 膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップが、移植デバイスによってなされる、〔 1 1 〕 ～〔 1 3 〕 の方法。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、膵臓の外科的処置後に縫合部位の液密性を維持することができ、膵液瘻を予防または処置することができる。特に、本発明によれば、膵頭十二指腸切除手術の処置後に縫合部位の液密性を維持することができ、膵液瘻を予防または処置することができる。さらに、本発明によれば、膵液瘻を予防または処置だけでなく、腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着は生じず、炎症も生じないため、膵臓の外科的処置の予後を改善することができる。そして、本発明によれば、シート状細胞培養物を利用することによって、膵臓の外科的処置後に縫合部位の生体組織の癒合を促進することも

できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図 1 は、調製したシート状細胞培養物を示す。

[図2]図 2 は、対照群の膵頭十二指腸切除手術の施術部位を示す。

[図3]図 3 は、シート処置群の膵頭十二指腸切除手術の施術部位を示す。膵頭部と十二指腸乳頭部肛門側を合併切除し、十二指腸断端を端々吻合し、膵頭切離面にシート状細胞培養物を移植した後（図 3 A の点線で囲まれた領域）、遠位の十二指腸と膵実質を吻合した（図 3 B）。

[0017] [図4]図 4 A は、対照群の、膵頭十二指腸切除手術から 3 日後に摘出した十二指腸と膵実質の吻合部位の H E 染色像（ $\times 200$ ）を示す。矢印は、出血および濃縮したタンパク質を示す。図 4 B および C は、シート処置群の、シート状細胞培養物の移植から 3 日後に摘出したシート状細胞培養物の移植部位の H E 染色像（ $\times 200$ ）を示す。点線で挟まれた領域は、シート状細胞培養物を示す。図 4 D は、シート処置群の、シート状細胞培養物の移植から 3 日後に摘出したシート状細胞培養物の移植部位の抗 D E S M I N 抗体免疫染色像（ $\times 200$ ）を示す。点線で挟まれた領域は、シート状細胞培養物を示す。

[図5]図 5 は、膵頭十二指腸切除手術から 3 日後の（腹水のアミラーゼ値）／（血清のアミラーゼ値）（図 5 A）および（腹水のリパーゼ値）／（血清のリパーゼ値）（図 5 B）を示す。それぞれの図は、対照群（ $n = 9$ ）およびシート処置群（ $n = 5$ ）の箱ひげ図を示し、上端のバーは最大値を、箱の上端、内部および下端の線はそれぞれ第三四分位数、第二四分位数（中央値）および第一四分位数を、下端のバーは最小値を示し、図中の値は 2 群間の p 値を示す（Mann-Whitney の U 検定）。

[0018] 本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願および他の出版物や情報は、その全体を参照により本明細書に援用する。

発明を実施するための形態

[0019] [膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物]

本発明の一側面は、膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物であって、膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含み、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合される、前記シート状細胞培養物（「本発明のシート状細胞培養物」と記す場合がある）に関する。

[0020] 一態様において、膵管は、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合される。

一態様において、膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔は、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通する。

一態様において、膵管は、主膵管および／または副膵管である。一態様において、小腸は、十二指腸または空腸である。

[0021] 一態様において、膵臓の切断面、小腸腸壁の貫通孔、および／またはシート状細胞培養物の貫通孔は、外科的処置によって形成される。

一態様において、外科的処置は、膵頭十二指腸切除手術である。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、膵液瘻を予防または処置するためのものである。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞を含む。

一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を含む。

[0022] 膵臓は、膵液を分泌し、膵液を十二指腸に送り込む外分泌腺である。膵臓の十二指腸側の部位は膵頭部、脾臓側の部位は膵尾部、膵頭部と膵尾部との間の部位は膵体部と呼ばれる。膵臓はその内部に膵液を十二指腸まで運ぶ膵管を有する。多数の分枝状の細い膵管が膵尾部から膵頭部にかけて合流して主膵管（および副膵管）となり、十二指腸に繋がる。ヒトの場合、主膵管は、十二指腸に繋がる前に、胆嚢から胆汁を運ぶ総胆管と合流する。膵管は、十二指腸腸壁に繋がり、十二指腸の内腔に膵液を出す。膵管の開口部は、十

十二指腸の内腔に向かって盛り上がっており、十二指腸乳頭と呼ばれる。

本発明において、膵臓は、任意の生物の膵臓であってよく、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の哺乳動物の膵臓である。

[0023] また、膵臓は、その内部に膵管、主膵管、副膵管等の管腔を有する臓器であるともいえる。かかる管腔内には消化液等の生体液が流通する。本発明によれば、膵臓の切断面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合し、また膵管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合することにより、膵臓の外科的処置後にかかる管腔の縫合部位の液密性を維持することができる。これにより、かかる管腔内に流通する消化液等の生体液が縫合部位から膵臓や小腸の外部へ漏出することを予防または処置することができる。特に、本発明によれば、膵頭十二指腸切除手術の処置後にかかる管腔の縫合部位の液密性を維持することができる。これにより、かかる管腔内に流通する消化液等の生体液が縫合部位から膵臓や小腸の外部へ漏出することを予防または処置することができる。

[0024] 本発明において、「膵臓の切断面」とは、任意の部位で膵臓に切り込みを入れ、および／または任意の部位で膵臓を切り離し、その結果生じる断面および／または断片の断面を指す。膵臓の切断面は、例えば、膵頭部と膵体部との間で膵臓を切り離し、その結果生じる断片の断面である。一態様において、膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含み、ここで、膵管の切断面は、例えば、主膵管および／または副膵管の切断面である。

[0025] 本発明において、「膵臓の切断面を覆う」とは、シート状細胞培養物によって膵臓の切断面のすべてを覆うことを指す。シート状細胞培養物の大きさは、膵臓の切断面と同じか、またはそれ以上の大きさであり、ちょうど膵臓の切断面のすべてを覆うか、または膵臓の切断面のすべてを覆い、かつ余分の辺縁部を有するものであってよい。かかる辺縁部は、膵臓の切断面の周辺をさらに覆うこともあり得る。

本発明において、シート状細胞培養物は貫通孔を有してもよく、「腓臓の切断面を覆う」とは、任意の位置で貫通孔を有するシート状細胞培養物によって腓臓の切断面のすべてを覆うことを包含する。このとき、シート状細胞培養物は、その貫通孔が腓管の切断面の内腔部分の位置に合わさるように配置される。

[0026] 本発明において、「シート状細胞培養物」とは、細胞が互いに連結してシート状になったものを指す。細胞同士は、直接（接着分子等の細胞要素を介するものを含む）および／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物理的（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等が挙げられる。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。細胞は少なくとも物理的（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。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層（多層）体、例えば、2層、3層、4層、5層、6層等）であってもよい。また、シート状細胞培養物は、細胞が明確な層構造を示すことなく、細胞1個分の厚みを超える厚みを有する3次元構造を有してもよい。例えば、シート状細胞培養物の垂直断面において、細胞が水平方向に均一に整列することなく、不均一に（例えば、モザイク状に）配置された状態で存在していてもよい。

[0027] シート状細胞培養物は、好ましくはスキャフォールド（支持体）を含まない。スキャフォールドは、その表面上および／またはその内部に細胞を付着させ、シート状細胞培養物の物理的一体性を維持するために当該技術分野において用いられることがあり、例えば、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）製の膜等が知られているが、本発明のシート状細胞培養物は、かかるスキャフォールドがなくともその物理的一体性を維持することができる。また、本発明のシート状細胞培養物は、好ましくは、シート状細胞培養物を構成する細胞由来の物質のみからなり、それら以外の物質を含まない。

[0028] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞等）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞等の組織幹細胞、胚性幹細胞、i P S (induced pluripotent stem) 細胞等の多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）等を含む。体細胞は、幹細胞、特に i P S 細胞から分化させたもの（i P S 細胞由来接着細胞）であってもよい。シート状細胞培養物を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞等）、間葉系幹細胞（例えば、骨髓、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のもの等）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、i P S 細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞等）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞等）、肝細胞（例えば、肝実質細胞等）、膵細胞（例えば、膵島細胞等）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。i P S 細胞由来接着細胞の非限定例としては、i P S 細胞由来の心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞等が挙げられる。

[0029] 本発明において、「骨格筋芽細胞」とは、骨格筋に存在する筋芽細胞を指す。骨格筋芽細胞は当該技術分野でよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開 2007-89442 号公報に記載の方法等）により調製することもできるし、商業的に入手することもできる（例えば、Lonza、Cat# CC-2580）。骨格筋芽細胞は、限定されずに、例えば、CD56、 α 7 インテグリン、ミオシン重鎖 I I a、ミオシン重鎖 I I b、ミオシン重鎖 I I d (I I x)、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3 等のマーカーにより同定することができる。特定の態様において

、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。さらに特定の態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。骨格筋芽細胞は、骨格筋を有する任意の生物、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の哺乳動物に由来してもよい。一態様において、骨格筋芽細胞は哺乳動物の骨格筋芽細胞である。特定の態様において、骨格筋芽細胞はヒト骨格筋芽細胞である。また、骨格筋芽細胞は、任意の骨格筋から採取できる。一態様において、本発明の骨格筋芽細胞は、大腿部、頸部、腹部由来の骨格筋芽細胞である。

[0030] シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物による治療が可能な任意の生物に由来し得る。かかる生物には、限定されずに、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯目動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ等が含まれる。また、シート状細胞培養物を構成する細胞の種類数は特に限定されず、1種類のみ細胞で構成されていてもよいが、2種類以上の細胞を用いたものであってもよい。シート状細胞培養物を形成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、シート状細胞培養物の形成終了時において、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%以上である。

[0031] 細胞は異種由来細胞であっても同種由来細胞であってもよい。ここで「異種由来細胞」とは、シート状細胞培養物が移植に用いられる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する細胞を指す。例えば、レシピエントがヒトである場合、サルやブタに由来する細胞等が異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」とは、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を指す。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト細胞が同種由来細胞に該当する。同種由来細胞は、自己由来細胞（自己細胞または自家細胞ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する細胞と、同種非自己由来細胞（他家細胞ともいう）を含む。自己由来細胞は、移植しても拒絶反応が生

じないため、本発明において好ましい。しかしながら、異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用することも可能である。異種由来細胞や同種非自己由来細胞を利用する場合は、拒絶反応を抑制するため、免疫抑制処置が必要となることがある。なお、本明細書中で、自己由来細胞以外の細胞、すなわち、異種由来細胞と同種非自己由来細胞を非自己由来細胞と記す場合もある。本発明の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本発明の一態様において、細胞は自家細胞である。本発明の別の態様において、細胞は他家細胞である。

[0032] シート状細胞培養物は、既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-081829号公報、特開2011-110368号公報等参照）で製造することができる。シート状細胞培養物の製造方法は、典型的には、細胞を培養基材上に播種するステップ、播種した細胞をシート化するステップ、形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含むが、これに限定されない。細胞を培養基材上に播種するステップの前に、細胞を凍結するステップおよび細胞を解凍するステップを行ってもよい。さらに、細胞を解凍するステップの後に細胞を洗浄するステップを行ってもよい。これら各ステップは、シート状細胞培養物の製造に適した既知の任意の手法で行うことができる。シート状細胞培養物の製造方法は、シート状細胞培養物を製造するステップを含んでもよく、その場合、シート状細胞培養物を製造するステップは、サブステップとして上記シート状細胞培養物の製造方法に係るステップの1または2以上を含んでもよい。ある一態様において、細胞を解凍するステップの後、細胞を培養基材上に播種するステップの前に細胞を増殖させるステップを含まない。

[0033] 培養基材は、細胞がその上で細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、種々の材質の容器、容器中の固形もしくは半固形の表面等を含む。容器は、培養液等の液体を透過させない構造および材料が好ましい。かかる材料としては、限定することなく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ポリエチレンテレフタレート、ポリメ

チルメタクリレート、ナイロン6, 6、ポリビニルアルコール、セルロース、シリコン、ポリスチレン、ガラス、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、金属（例えば、鉄、ステンレス、アルミニウム、銅、真鍮）等が挙げられる。また、容器は、少なくとも1つの平坦な面を有することが好ましい。かかる容器の例としては、限定することなく、例えば、細胞培養物の形成が可能な培養基材で構成された底面と、液体不透過性の側面とを備えた培養容器が挙げられる。かかる培養容器の特定の例としては、限定されずに、細胞培養皿、細胞培養ボトル等が挙げられる。容器の底面は透明であっても不透明であってもよい。容器の底面が透明であると、容器の裏側から細胞の観察、計数等が可能となる。また、容器は、その内部に固形もしくは半固形の表面を有してもよい。固形の表面としては、上記のような種々の材料のプレートや容器等が、半固形の表面としては、ゲル、軟質のポリマーマトリックス等が挙げられる。培養基材は、上記材料を用いて作製してもよいし、市販のものを利用してもよい。好ましい培養基材としては、限定することなく、例えば、シート状細胞培養物の形成に適した、接着性の表面を有する基材が挙げられる。具体的には、親水性の表面を有する基材、例えば、コロナ放電処理したポリスチレン、コラーゲンゲルや親水性ポリマー等の親水性化合物を該表面にコーティングした基材、さらには、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン等の細胞外マトリックスや、カドヘリンファミリー、セレクトインファミリー、インテグリンファミリー等の細胞接着因子等を表面にコーティングした基材等が挙げられる。また、かかる基材は市販されている（例えば、Corning（登録商標）TC-Treated Culture Dish、Corning等）。培養基材は全体または部分が透明であっても不透明であってもよい。

[0034] 培養基材は、刺激、例えば、温度や光に応答して物性が変化する材料で表面が被覆されていてもよい。かかる材料としては、限定されずに、例えば、（メタ）アクリルアミド化合物、N-アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体（例えば、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルア

ミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフルルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフルルメタクリルアミド等)、N、N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体(例えば、N、N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N、N-エチルメチルアクリルアミド、N、N-ジエチルアクリルアミド等)、環状基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体(例えば、1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等)、またはビニルエーテル誘導体(例えば、メチルビニルエーテル)のホモポリマーまたはコポリマーからなる温度応答性材料、アゾベンゼン基を有する光吸収性高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体、および、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲル等の光応答性材料等の公知のものを用いることができる(例えば、特開平2-211865号公報、特開2003-33177号公報参照)。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。温度応答性材料で被覆された培養皿は市販されており(例えば、CellSeed Inc.のUpCell(登録商標))、これをシート状細胞培養物の製造方法に使用することができる。

- [0035] 培養基材は、種々の形状であってもよいが、平坦であることが好ましい。また、その面積は特に限定されないが、例えば、約 1 cm^2 ~約 200 cm^2 、約 2 cm^2 ~約 100 cm^2 、約 3 cm^2 ~約 50 cm^2 等であってよい。例えば、培養基材として直径 10 cm の円形の培養皿が挙げられる。この場合

、面積は56.7 cm²となる。

培養基材は、血清でコート（被覆またはコーティング）されていてもよい。血清でコートされた培養基材を用いることにより、より高密度のシート状細胞培養物を形成することができる。「血清でコートされている」とは、培養基材の表面に血清成分が付着している状態を指す。かかる状態は、限定されずに、例えば、培養基材を血清で処理することにより得ることができる。血清による処理は、血清を培養基材に接触させること、および、必要に応じて所定期間インキュベートすることを含む。

[0036] 血清としては、異種血清および／または同種血清を用いることができる。異種血清は、シート状細胞培養物を移植に用いる場合、そのレシピエントとは異なる種の生物に由来する血清を意味する。例えば、レシピエントがヒトである場合、ウシやウマに由来する血清、例えば、ウシ胎仔血清（FBS、FCS）、仔ウシ血清（CS）、ウマ血清（HS）等が異種血清に該当する。また、「同種血清」とは、レシピエントと同一の種の生物に由来する血清を指す。例えば、レシピエントがヒトである場合、ヒト血清が同種血清に該当する。同種血清は、自己血清（自家血清ともいう）、すなわち、レシピエントに由来する血清、およびレシピエント以外の同種個体に由来する同種他家血清を含む。なお、本明細書中で、自己血清以外の血清、すなわち、異種血清と同種他家血清を非自己血清と記す場合もある。

培養基材をコートするための血清は、市販されているか、または、所望の生物から採取した血液から常法により調製することができる。具体的には、例えば、採取した血液を室温で約20分～約60分程度放置して凝固させ、これを約1000×g～約1200×g程度で遠心分離し、上清を採取する方法等が挙げられる。

[0037] 培養基材上でインキュベートする場合、血清は原液で用いても、希釈して用いてもよい。希釈は、任意の媒体、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI

1640、MCDB (MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0.5%~約100%(v/v)、好ましくは約1%~約60%(v/v)、より好ましくは約5%~約40%(v/v)である。

[0038] インキュベート時間も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約1時間~約72時間、好ましくは約2時間~約48時間、より好ましくは約2時間~約24時間、さらに好ましくは約2時間~約12時間である。インキュベート温度も、血清成分が培養基材上に付着することができれば特に限定されず、例えば、約0℃~約60℃、好ましくは約4℃~約45℃、より好ましくは室温~約40℃である。

[0039] インキュベート後に血清を廃棄してもよい。血清の廃棄手法としては、ピペット等による吸引や、デカンテーション等の慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本発明の好ましい態様においては、血清廃棄後に、培養基材を無血清洗浄液で洗浄してもよい。無血清洗浄液としては、血清を含まず、培養基材に付着した血清成分に悪影響を与えない液体媒体であれば特に限定されず、例えば、限定することなく、水、生理食塩水、種々の緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）、種々の液体培地（例えば、DMEM、MEM、F12、DMEM/F12、DME、RPMI1640、MCDB (MCDB102、104、107、120、131、153、199等)、L15、SkBM、RITC80-7等)等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の培養基材洗浄手法、例えば、限定することなく、培養基材上に無血清洗浄液を加えて所定時間（例えば、約5秒~約60秒間）攪拌後、廃棄する手法等を用いることができる。

[0040] 本発明において、培養基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」とは、細胞の増殖を、それが無い場合に比べて促進する任意の物質を指し、例えば、上皮細胞成長因子(EGF)、血管内皮成長因子(VE

G F)、線維芽細胞成長因子(F G F)等を含む。成長因子による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、例えば、約 $0.0001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約 $0.0005\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約 $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0041] 本発明において、培養基材を、ステロイド剤でコートしてもよい。ここで「ステロイド剤」とは、ステロイド核を有する化合物のうち、生体に、副腎皮質機能不全、クッシング症候群等の悪影響を及ぼし得るものを指す。かかる化合物としては、限定されずに、例えば、コルチゾール、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン等が含まれる。ステロイド剤による培養基材のコート手法、廃棄手法および洗浄手法は、インキュベーション時の希釈濃度が、デキサメタゾンとして、例えば、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約 $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0042] 培養基材は、血清、成長因子およびステロイド剤のいずれか1つでコートしても、これらの任意の組み合わせ、すなわち、血清と成長因子、血清とステロイド剤、血清と成長因子とステロイド剤、または、成長因子とステロイド剤の組み合わせでコートしてもよい。複数の成分でコートする場合、これらの成分を混合して同時にコートしてもよいし、別々のステップでコートしてもよい。

[0043] 培養基材は、血清等でコートした後直ちに細胞を播種してもよいし、コートした後に保存しておき、その後細胞を播種することもできる。コートした基材は、例えば約 4°C 以下、好ましくは約 -20°C 以下、より好ましくは約 -80°C 以下に保つことにより長期間保存することができる。

培養基材への細胞の播種は、既知の任意の手法および条件で行うことができる。培養基材への細胞の播種は、例えば、細胞を培養液に懸濁した細胞懸

濁液を培養基材（培養容器）に注入することにより行ってもよい。細胞懸濁液の注入には、スポイトやピペット等、細胞懸濁液の注入操作に適した器具を用いることができる。

[0044] 播種は、約 7.1×10^5 個/cm² ~ 約 3.0×10^6 個/cm²、約 7.3×10^5 個/cm² ~ 約 2.8×10^6 個/cm²、約 7.5×10^5 個/cm² ~ 約 2.5×10^6 個/cm²、約 7.8×10^5 個/cm² ~ 約 2.3×10^6 個/cm²、約 8.0×10^5 個/cm² ~ 約 2.0×10^6 個/cm²、約 8.5×10^5 個/cm² ~ 約 1.8×10^6 個/cm²、約 9.0×10^5 個/cm² ~ 約 1.6×10^6 個/cm² 等の密度で行うことができる。

[0045] 本発明のシート状細胞培養物を構成する細胞（「シート形成細胞」と記す場合がある）は、上記で詳述したとおりである。本発明のシート状細胞培養物は、適用組織の細胞を含んでいる必要はなく、むしろ当該組織に存在しない細胞を含んでいてもよい。したがって一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、異所性の細胞、すなわち適用組織に本来存在しない細胞を含んでいる。好ましい一態様において、上述のとおり本発明のシート状細胞培養物が適用されるのは脾臓および小腸の組織の損傷であり、この場合の異所性の細胞としては、例えば骨格筋芽細胞等の横紋筋に由来する細胞や間葉系幹細胞等が挙げられる。より好ましい一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、骨格筋芽細胞を含んでいる。骨格筋芽細胞は、大腿、頸部、腹部等の横紋筋に由来するものであってよい。

[0046] 横紋筋組織から骨格筋芽細胞を調製する場合、調製した細胞集団には線維芽細胞が含まれる。本発明のシート状細胞培養物を製造する際に横紋筋組織から調製した骨格筋芽細胞を含む細胞集団を用いる場合、当該細胞集団には一定量の線維芽細胞が含まれることになる。線維芽細胞は当該技術分野でよく知られており、TE-7（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci. 1994; 107 (Pt 1):29-37、Goodpaster et al., J Histochem Cytochem. 2008;56(4):347-58等参照）等のマーカーにより同定することができる。

- [0047] 一態様において、本発明のシート状細胞培養物を形成する細胞は、横紋筋組織から調製された骨格筋芽細胞を含む。したがって本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団には、骨格筋芽細胞および線維芽細胞が含まれ得る。一態様において、本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、CD56陽性率が50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上であり得、好ましくは60%以上である。
- [0048] 本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、線維芽細胞を含み得るが、線維芽細胞の含有率が高すぎる場合、骨格筋芽細胞の含有率が低下してしまい好ましくない。したがって一態様において、本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、TE7陽性率が50%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下であり得、好ましくは40%以下である。
- [0049] 本発明のシート状細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、骨格筋芽細胞および線維芽細胞以外の細胞も含み得るが、かかる細胞はなるべく少ない方が好ましい。したがってCD56陽性率およびTE7陽性率の合計値は、高い方が好ましく、例えば80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上等であり得、好ましくは90%以上である。
- [0050] 本発明のシート状細胞培養物の厚みは特に限定されない。シート状細胞培養物として単層のシートを用いる場合、その厚みは、通常は細胞1個分以上の厚みを有し、シート形成細胞の種類によっても厚みは異なるが、一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、30 μm 以上の厚みを有し、好ましい一態様において、50 μm 以上の厚みを有する。本発明のシート状細胞培養物の厚みの範囲としては、例えば30 μm ～200 μm 、好ましくは50 μm ～150 μm 、より好ましくは60 μm ～100 μm 等が挙げられる。シート状細胞培養物として積層したシートを用いる場合、前記単層シートの厚み×積層枚数を超えない厚みとなる。したがって、一態様として例えば

単層シートを5枚積層したシートを用いる場合、その厚みは150 μm 以上、好ましくは250 μm 以上となり、また厚みの範囲としては、例えば150 μm ～1000 μm 、好ましくは250 μm ～750 μm 、より好ましくは300 μm ～500 μm 等が挙げられる。

したがって本発明のシート状細胞培養物の厚みは、例えば30 μm ～1000 μm 、好ましくは50 μm ～750 μm 、50 μm ～500 μm 、60 μm ～500 μm 等が挙げられる。

[0051] ある態様においては、本発明のシート状細胞培養物は、非常に脆弱であり、取り扱いが困難である場合がある。したがって本発明のシート状細胞培養物は、取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減する目的で、さらに補強層を有してよい。補強層としては、本発明のシート状細胞培養物の機能を損なわず、構造を補強できるものであればいかなるものであってもよく、例えばゲルおよび／またはポリマーを含む補強層であってよいが、生体内に移植するものであるため、好ましくは、例えば生体適合性ゲルやポリマー等を含む、生体適合性の補強層である。

[0052] 本発明の補強層に用い得るゲル、好ましくは生体適合性ゲルとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないゲルであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばフィブリンゲル、フィブリノーゲンゲル、ゼラチンゲル、コラーゲンゲル等が挙げられる。

本発明の補強層に用い得るポリマー、好ましくは生体適合性ポリマーとしては、生体内に導入した際に生体に悪影響を及ぼさないポリマーであればいかなるものであってもよく、これに限定するものではないが、例えばポリ乳酸、ポリジオキサノ、ポリグリカプロ、コラーゲン等が挙げられる。

[0053] 生体適合性ゲルを含む補強層の形成方法は、当該技術分野において公知の方法を用いることができる。かかる方法としては、これに限定するものではないが、例えばシート状細胞培養物上に生体適合性ゲルやポリマーまたはその材料となる成分を噴霧する方法、シート状細胞培養物上にゾル状の生体適合性物質を積層してゲル化する方法、液状のゲルに浸漬したのちゲルを固形

化させる方法等のほか、特開 2016-52271 号公報等に記載の方法等が挙げられる。

[0054] 補強層は、本発明のシート状細胞培養物の取り扱いを簡便にし、破損のリスクを低減するためのものであるため、一定以上の強度を有していることが好ましく、さらに弾力性を有していることが好ましい。ゲルやポリマーを含む構造物の強度の公知の評価単位としては、例えばゼリー強度等が挙げられ、シート状構造物の強度の公知の評価単位としては、例えば引張破断荷重等が挙げられる。ゼリー強度の測定方法については、例えば J I S K 6503 等に記載されている。引張破断荷重は、シート状細胞培養物等の両端を水平方向に引っ張り、破断するまでの最大荷重を意味し、その測定方法は、例えば特開 2016-52272 号公報等に記載されている。

[0055] 本発明のシート状細胞培養物の補強層としては、これに限定するものではないが、例えば引張破断荷重として約 0.010 N 以上、約 0.015 N 以上、約 0.020 N 以上、約 0.025 N 以上、約 0.030 N 以上、約 0.035 N 以上、約 0.040 N 以上、約 0.045 N 以上等であってよく、また、約 0.010 N～約 0.200 N、約 0.015 N～約 0.100 N、約 0.020 N～約 0.50 N 等の範囲であってよい。補強層を有するシート状細胞培養物は、補強層を有しないシート状細胞培養物と比較して、強度が約 1.5 倍以上、約 2 倍以上、約 3 倍以上、約 4 倍以上、約 5 倍以上、約 6 倍以上、約 7 倍以上、約 8 倍以上、約 9 倍以上、約 10 倍以上となり得、また、約 1.5 倍～約 20 倍、約 2 倍～約 15 倍、約 2.5 倍～約 10 倍等の範囲となり得る。

[0056] 補強層を有するシート状細胞培養物を適用する場合、補強層が適用部位に直接接触しないように適用するのが好ましい。すなわち、適用部位と補強層との間にシート状細胞培養物が位置するように適用するのが好ましい。

適用部位へのシート状細胞培養物の適用は、当該技術分野において公知の任意のデバイスおよび／または手法を用いて実施することができる。

[0057] 一態様において、本発明のシート状細胞培養物を組織に適用する際、治癒

や癒合を促進する他の組成物および／または移植片等と併せて適用してもよい。治癒や癒合を促進する他の組成物および／または移植片としては、これに限定するものではないが、例えば、有茎大網片等の有茎血管を含む移植片、フィブリンゲル、アドスプレー（登録商標）等が挙げられる。好ましい一態様において、本発明のシート状細胞培養物は、有茎血管を含む移植片とともに適用される。有茎血管を含む移植片の典型例としては、例えば有茎大網片等が挙げられる。

かかる治癒や癒合を促進する他の組成物および／または移植片は、本発明のシート状細胞培養物とは独立した別の組成物または移植片であってもよいし、例えばシート状細胞培養物または補強層等に組み込まれたものであってもよい。

[0058] 本発明のシート状細胞培養物が、独立した治癒や癒合を促進する他の組成物および／または移植片とともに適用される場合、かかる組成物および／または移植片は、シート状細胞培養物の適用の前に適用されても、適用後に適用されてもよい。シート状細胞培養物の適用の前に他の組成物および／または移植片を適用する場合、適用部位とシート状細胞培養物との間に位置するように適用される。すなわち、まず適用部位に他の組成物および／または移植片を適用した後、その上からシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）を適用する。シート状細胞培養物の適用の後に適用される場合、適用部位に対してシート状細胞培養物（任意に補強層を含む）の上から適用される。すなわち、まず適用部位にシート状細胞培養物を適用し、その上から他の組成物および／または移植片を適用する。

[0059] 組織再生のメカニズムとしては、例えば障害部位で血管新生や細胞の保護、修復等を担うVEGF、HGF等のサイトカインやコラーゲン等を、シート状細胞培養物が持続的に放出するパラクライン効果によるものおよび／または、適用された周囲組織の前駆細胞や幹細胞が活性化して、コラーゲン産生等を促すオートクライン効果が得られること等が考えられる。

本発明のシート状細胞培養物の大きさは、生体組織の所定の部位を覆うこ

とができるものであれば特に限定されないが、例えば、シート状細胞培養物の形状が円形である場合、その直径は、10～55mm、15～50mm、20～45mm、25～40mm、または30～35mmであり、脾臓の切断面を覆う観点から、30～35mmであることが好ましい。

[0060] 小腸は、胃に続き、大腸へと繋がる消化管である。胃側の部位は十二指腸と、大腸側の部位は回腸と、十二指腸と回腸との間の部位は空腸と呼ばれる。十二指腸は、C字状に湾曲しながら脾臓の脾頭部を取り囲んでいる。脾臓の脾管の開口部は、十二指腸の内腔に向かって盛り上がっており、十二指腸乳頭と呼ばれる。脾液および胆汁は、かかる開口部から供給される。

本発明において、「小腸腸壁」とは、小腸の腸管の内側と外側とを仕切る、小腸の任意の部位の壁を指す。小腸腸壁は、漿膜、外縦走筋層、内輪走筋層、粘膜下組織、粘膜筋板、粘膜固有層、粘膜上皮等で構成されている。一態様において、小腸腸壁は、十二指腸腸壁、空腸腸壁、または回腸腸壁である。

[0061] 本発明において、「液密に結合する」とは、生体組織の異なる部位同士が、生体組織内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合することを指す。本発明において、「液密性」とは、生体組織の異なる部位同士が液密に結合する性質を指す。かかる結合は、縫合糸、医療用ステープラー、縫合接着剤等の任意の医療器具または医療機器を用いてなされ得、液密性の観点から、縫合糸を用いてなされることが好ましい。例えば、生体組織の異なる部位同士は、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、生体組織内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合する。

[0062] 本発明において、「シート状細胞培養物を介して液密に結合する」とは、生体組織の異なる部位同士が、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、生体組織内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合することを指す。すなわち、かかる結合により、「生体組織の部位－シート状細胞培養物－生体組織の部位」という互いに密着して結合した構造がもたらされる。

このとき、一方の生体組織の部位について、それが他の部位と結合する部分または面のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。また、かかる結合は、縫合糸、医療用ステープラー、縫合接着剤等の任意の医療器具または医療機器を用いてなされ得、液密性の観点から、縫合糸を用いてなされることが好ましい。例えば、生体組織の異なる部位同士は、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、生体組織内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合する。

[0063] 本発明において、「膵臓の切断面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合する」とは、膵臓の切断面および小腸腸壁が、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合することを指す。すなわち、かかる結合により、「膵臓の切断面－シート状細胞培養物－小腸腸壁」という互いに密着して結合した構造がもたらされる。このとき、膵臓の切断面のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。また、かかる結合は、縫合糸、医療用ステープラー、縫合接着剤等の任意の医療器具または医療機器を用いてなされ得、液密性の観点から、縫合糸を用いてなされることが好ましい。例えば、膵臓の切断面および小腸腸壁は、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合する。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0064] 本発明において、「膵管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合する」とは、膵管および小腸腸壁の貫通孔が、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合することを指す。すなわち、かかる結合により、「膵管－シート状細胞培養物－小腸腸壁の貫通孔」という互いに密着して結合した構造がもたらされる。このとき、膵管は、膵臓の切断面において膵管の断面として露出し、かかる断面は膵管壁および内腔部分で構成されるところ

、膵管壁および内腔部分のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。また、かかる結合は、縫合糸、医療用ステープラー、縫合接着剤等の任意の医療器具または医療機器を用いてなされ得、液密性の観点から、縫合糸を用いてなされることが好ましい。例えば、膵管および小腸腸壁の貫通孔は、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合する。このとき、膵管の切断面および小腸腸壁の貫通孔のそれぞれの大きさが等しくなるように、膵管および小腸腸壁の貫通孔が互いに密着して結合する。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

一態様において、「膵臓の切断面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合する」ことは、「膵管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合する」ことと一緒になされる。

[0065] 一態様において、膵臓の切断面のすべてが本発明のシート状細胞培養物で覆われた状態で、膵臓の切断面と小腸腸壁とが、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合される。換言すれば、膵臓の切断面、本発明のシート状細胞培養物および小腸腸壁は、この順で配置され、互いに密着して結合されたまま固定される。このとき、膵臓の切断面と小腸腸壁とは、膵臓の切断面と小腸腸壁との間に存在する本発明のシート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合される。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0066] 一態様において、膵管の切断面の内腔部分の位置は、小腸腸壁の貫通孔に合わせて配置される。このとき、膵管は、膵臓の切断面において膵管の断面として露出し、かかる断面は膵管壁および内腔部分で構成されるところ、膵

管壁および内腔部分のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。膵管および小腸腸壁の貫通孔は、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合する。このとき、膵管の切断面および小腸腸壁の貫通孔のそれぞれの大きさが等しくなるように、膵管および小腸腸壁の貫通孔が互いに密着して結合する。このとき、物理的な作用、生化学的な反応等の任意の効果により、膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成すると、膵管および小腸の各内腔がシート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通する。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0067] 本発明において、「貫通孔」とは、生体組織の表面のある部位から生体組織の表面の別の部位まで貫通している穿孔を指す。貫通孔は、例えば、小腸腸壁の外側の表面の任意の部位から小腸腸壁の内側の表面の任意の部位まで貫通している穿孔である。一態様において、貫通孔は、小腸腸壁の外側の表面の任意の部位から、小腸腸壁に対して垂直に小腸腸壁を貫通している穿孔である。一態様において、貫通孔は、十二指腸腸壁の外側の表面の任意の部位から、十二指腸腸壁に対して垂直に十二指腸腸壁を貫通している穿孔である。一態様において、貫通孔は、空腸腸壁の外側の表面の任意の部位から、空腸腸壁に対して垂直に空腸腸壁を貫通している穿孔である。貫通孔は、生体組織において複数存在してもよい。貫通孔は、シート状細胞培養物の表面のある部位からシート状細胞培養物の表面の別の部位まで貫通している穿孔であってもよい。

[0068] 貫通孔の大きさは、貫通孔が生体組織の所定の部位に結合するものであれば特に限定されないが、例えば、貫通孔の直径は、0.5～7 mm、0.6～6 mm、0.7～5 mm、0.8～4 mm、0.9～3 mm、または1～2 mmである。貫通孔の直径は、膵管を小腸腸壁の貫通孔に液密に結合する観点から、1～2 mmが好ましい。

[0069] 本発明において、「膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成する」とは、物理的な作用、生化学的な反応等の任意の効果により、膵管および小腸の各内腔がシート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通するように、膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することを指す。物理的な作用とは、鉗子等の任意の医療器具または医療機器による、膵管の切断面の内腔部分でのシート状細胞培養物の刺突、穿孔、貫通等を指す。生化学的な反応とは、膵液等の生体液による、膵管の切断面の内腔部分でのシート状細胞培養物の溶解、分解、消化等を指す。このとき、シート状細胞培養物は膵管の切断面の内腔部分以外では膵液等の生体液に触れないため、膵管の切断面の内腔部分以外ではシート状細胞培養物の溶解、分解、消化等は生じず、シート状細胞培養物は残存する。かかるシート状細胞培養物の溶解、分解、消化等は、シート状細胞培養物の移植から数時間～数日程度でなされ得る。例えば、本発明のシート状細胞培養物が補強層を含まない場合、かかるシート状細胞培養物の溶解、分解、消化等は、シート状細胞培養物の移植から数時間程度でなされ得る。例えば、本発明のシート状細胞培養物がゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を含む場合、かかるシート状細胞培養物の溶解、分解、消化等は、シート状細胞培養物の移植から数時間～数日程度でなされ得る。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0070] 一態様において、膵管および小腸腸壁の貫通孔は、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合している。すなわち、かかる結合により、「膵管－シート状細胞培養物－小腸腸壁の貫通孔」という互いに密着して結合した構造がもたらされる。このとき、膵管は、膵臓の切断面において膵管の断面として露出し、かかる断面は膵管壁および内腔部分で構成されるところ、膵管壁および内腔部分のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。このとき、膵管の切断面および小腸腸壁の貫通孔のそれぞれの大きさが等しくなるように、膵管および小腸腸壁の貫通孔が互いに密着して結合する。このとき、物理的

な作用、生化学的な反応等の任意の効果により、膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成すると、膵管および小腸の各内腔がシート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通する。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0071] 他方、本発明のシート状細胞培養物は、膵臓の切断面を覆う前に、任意の位置で貫通孔を有するものであってもよい。このとき、シート状細胞培養物は、その貫通孔が膵管の切断面の内腔部分の位置に合わさるように配置されることによって、膵管および小腸の各内腔を、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通させることができる。このとき、膵管の切断面および小腸腸壁の貫通孔のそれぞれの大きさが等しくなるように、膵管および小腸腸壁の貫通孔が互いに密着して結合する。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0072] 一態様において、膵管および小腸腸壁の貫通孔は、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合している。すなわち、かかる結合により、「膵管－シート状細胞培養物－小腸腸壁の貫通孔」という互いに密着して結合した構造がもたらされる。このとき、膵管は、膵臓の切断面において膵管の断面として露出し、かかる断面は膵管壁および内腔部分で構成されるところ、膵管壁および内腔部分のすべてがシート状細胞培養物で覆われている。このとき、シート状細胞培養物は、膵臓の切断面を覆う前に、任意の位置で貫通孔を有するものである。このとき、シート状細胞培養物は、その貫通孔が膵管の切断面の内腔部分の位置に合わさるように配置されることによって、膵管および小腸の各内腔を、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通させることができる。このとき、膵管の切断面および小腸腸壁の貫通孔のそれぞれの大きさが等しくなるように、膵管および小腸腸壁の貫通孔が互いに密着して結合する。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0073] 本発明において、「膵管および小腸の各内腔が連通する」とは、膵管およ

び小腸の各内腔が物理的に繋がり、膵管の内腔内の膵液等の生体液が小腸の内腔へ流入し得る状態を指す。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

本発明において、「外科的処置」とは、外科的機器やメス等を用いて生体組織の所定の部位を切開し、治療的処置を施すことを指す。外科的処置は、これに限定するものではないが、例えば、開腹手術、内視鏡手術、膵頭十二指腸切除手術等が挙げられる。

本発明において、「膵頭十二指腸切除手術」とは、胆管、膵頭部、十二指腸等に発生した腫瘍等の切除を行う術式を指す。同手術では、胃、十二指腸、胆管、胆嚢、膵頭部等の切除を行い、切除後の十二指腸や空腸に対して、切除後の胃、胆管、膵臓等の吻合を行う。同手術は、日本国内で年間1万例程度実施されるが、極めて複雑かつ高度な術式であるのと同時に施術は長時間に及ぶことから、合併症が起こることは少なくない。例えば、手術後の吻合部に貫通孔が生じることによって膵液瘻が生じ得ることが知られている。

[0074] 本発明において、「膵液瘻」とは、膵臓から膵液が漏出することを指し、例えば、膵炎や外傷によって生じ得、また、膵臓の外科的処置後に縫合部位に貫通孔が生じることによって生じ得る。漏出した膵液は、消化液や胆汁と混合して活性化され得、漏出部位周辺の組織を溶解することによって炎症を引き起こし得る。また、膵液瘻は、漏出部位周辺の血管を溶解し、出血を引き起こすことによって、重篤な予後をもたらす場合もある。

[0075] 本発明において、「癒合」とは、損傷を受けた臓器や組織同士が、縫合等によって互いに結合して治癒することを指す。癒合は、膵臓の外科的処置後の縫合部位の生体組織の癒合であり得る。特に、癒合は、膵臓の外科的処置後の縫合部位の膵臓および小腸の癒合であり得る。

例えば、膵臓の切断面および小腸腸壁が、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合している場合、癒合は、膵臓の外

科的処置後の縫合部位の膵臓の切断面および小腸腸壁の癒合であり得る。例えば、膵管および小腸腸壁の貫通孔が、シート状細胞培養物とともに、それらが結合する部分または面の辺縁部等において縫合糸によって縫合され、シート状細胞培養物を挟んだ状態で、膵臓および小腸内の消化液等の生体液が漏出しないように互いに密着して結合している場合、癒合は、膵臓の外科的処置後の縫合部位の膵管および小腸腸壁の貫通孔の癒合であり得る。膵管は、主膵管または副膵管であり得る。小腸は、十二指腸または空腸であり得る。

[0076] 本発明によれば、膵臓の切断面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合し、癒合すること、また、膵管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合し、癒合することにより、膵臓の外科的処置後にかかる管腔の縫合部位の液密性を維持することができる。これにより、縫合部位において貫通孔の発生を防ぐことができるため、かかる管腔内に流通する消化液等の生体液が縫合部位から膵臓や小腸の外部へ漏出することを予防または処置することができる。特に、本発明によれば、膵頭十二指腸切除手術の処置後にかかる管腔の縫合部位の液密性を維持することができる。これにより、縫合部位において貫通孔の発生を防ぐことができるため、かかる管腔内に流通する消化液等の生体液が縫合部位から膵臓や小腸の外部へ漏出することを予防または処置することができる。

また、本発明によれば、シート状細胞培養物を利用することによって、膵臓の外科的処置後に縫合部位の生体組織の癒合を促進することができる。

[0077] 本発明において、「癒着」とは、本来は離れている臓器や組織同士が、外傷や炎症等によって互いに結合することを指す。例えば、開腹手術や虫垂炎、子宮内膜症等の炎症等によって癒着が生じると、腸閉塞、不妊症、慢性骨盤痛等の合併症が生じ得ることが知られている。

本発明において、「腹腔内の縫合部位以外の部位」とは、膵臓と小腸との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位であって、本来は離れている臓器や組織の任意の部位を指す。例えば、腹腔内の縫合部位以外の部位は、膵臓の切断

面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合し、癒合する場合、脾臓の切断面と小腸腸壁との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位（例えば、腹腔壁、小腸、大腸等の任意の部位）である。例えば、腹腔内の縫合部位以外の部位は、脾管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合し、癒合する場合、脾管と小腸腸壁の貫通孔との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位（例えば、腹腔壁、小腸、大腸等の任意の部位）である。

[0078] 本発明において、「腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着」とは、脾臓と小腸との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位であって、本来は離れている臓器や組織の任意の部位に対する、脾臓と小腸との縫合部位の結合を指す。例えば、腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着は、脾臓の切断面がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合し、癒合する場合、脾臓の切断面と小腸腸壁との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位（例えば、腹腔壁、小腸、大腸等の任意の部位）に対する、脾臓の切断面と小腸腸壁との縫合部位の結合である。例えば、腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着は、脾管がシート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合し、癒合する場合、脾管と小腸腸壁の貫通孔との縫合部位以外の腹腔内の任意の部位（例えば、腹腔壁、小腸、大腸等の任意の部位）に対する、脾管と小腸腸壁の貫通孔との縫合部位の結合である。

本発明によれば、脾液瘻を予防または処置するだけでなく、腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着は生じず、炎症も生じないため、脾臓の外科的処置の予後を改善することができる。

[0079] [脾液瘻を予防または処置するための方法]

本発明の別の側面は、脾液瘻を予防または処置するための方法であって、脾実質および脾管の各切断面を含む脾臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップ、および脾臓の切断面をシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合させるステップを含む、前記方法（「本発明の処置方法」と記す場合がある）に関する。

[0080] 一態様において、本発明の処置方法は、脾管を、シート状細胞培養物を介

して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合させるステップをさらに含む。

一態様において、本発明の処置方法は、膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔を、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通させるステップをさらに含む。

一態様において、膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップは、移植デバイスによってなされる。

[0081] 本発明において、「移植デバイス」とは、膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うことができる、任意の医療機器を指す。移植デバイスは、例えば、シート状細胞培養物を支持し得、シート状細胞培養物を剥離し得る、平面構造を備える医療機器であり、腹腔内で操作する観点から、内視鏡手術において体腔内に経腹腔的に挿入された筒状体に挿通し得る形態のものが好ましい。

[0082] [本発明のシート状細胞培養物を製造するための方法]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物を製造するための方法であって、(i) シート形成細胞を含む細胞集団を培養基材上に播種するステップ、(ii) ステップ(i)で播種された細胞集団をシート化し、シート状細胞培養物を形成するステップ、および(iii) ステップ(ii)で形成されたシート状細胞培養物を培養基材から剥離するステップを含む、前記製造方法（「本発明の製造方法」と記す場合がある）に関する。

[0083] [本発明のシート状細胞培養物を含む組成物等]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物を含む、組成物（例えば、医薬組成物等）、移植片および医療製品等（「本発明の組成物等」と記す場合がある）に関する。

本発明の組成物等は、本発明のシート状細胞培養物に加えて、種々の追加成分を含むことができる。かかる追加成分は、例えば、薬学的に許容し得る担体、シート状細胞培養物の生存性、生着性および／または機能性等を高める成分、生体組織の再生、治癒、および／または癒合またはその促進等に有

用な成分、および／または移植片等である。当業者は、かかる追加成分について精通し、既知の任意の追加成分を適宜選択し、使用することができる。また、本発明の組成物等は、本発明のシート状細胞培養物に加えて、前記の追加成分を併用することもできる。

一態様において、本発明の組成物等は、膵臓の切断面を覆うためのものである。

一態様において、本発明の組成物等は、膵液瘻を予防または処置するためのものである。

[0084] [膵液瘻を予防または処置するための医薬の製造における使用]

本発明の別の側面は、膵液瘻を予防または処置するための医薬の製造における、本発明のシート状細胞培養物、または本発明の組成物等の使用（「本発明の医薬の製造における使用」と記す場合がある）に関する。

[膵液瘻を予防または処置するための使用]

本発明の別の側面は、本発明のシート状細胞培養物、または本発明の組成物等の、膵液瘻を予防または処置するための使用（「本発明の使用」と記す場合がある）に関する。

本発明を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これは本発明の特定の具体例を示すものであり、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0085] 例 1. シート状細胞培養物の調製

(1) 細胞の準備

ブタ下肢の横紋筋を全身麻酔下で採取し、採取した組織をコラゲナーゼとトリプシンを含む酵素消化液で処理して単一の細胞に分散させた。かかる細胞を、37℃、5%CO₂の条件下で、20%FBS含有MCDB131培地でコンフルエントになるまで培養した。

(2) シート状ブタ骨格筋芽細胞培養物の調製

例 2 に示す膵頭十二指腸切除手術の当日に、(1) で培養した細胞を回収し、60mmの温度応答性培養皿（UpCell（登録商標）、セルシード製）に

2. 2×10^7 個播種し、20% FBS含有DMEM/F12培地中で12時間培養した。その後20℃まで温度を下げることで自家のシート状細胞培養物（シート状ブタ骨格筋芽細胞培養物）を温度応答性培養皿から剥離して回収した（図1）。回収したシート状細胞培養物にフィブリンゲルを添加し、フィブリンゲルの補強層を形成した。

[0086] 例2. シート状細胞培養物による膵液瘻の予防

(1) 対照群の膵頭十二指腸切除手術

例1で横紋筋を採取したブタに対し、全身麻酔下で膵頭十二指腸切除手術を行い、対照群（ $n=9$ ）とした。対照群の膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含んでいた。対照群の膵臓の切断面を、シート状細胞培養物を介することなく、十二指腸腸壁に直接縫合した。

具体的には、膵頭部と十二指腸乳頭部肛門側を合併切除し、十二指腸断端を端々吻合し、遠位の十二指腸と膵実質を吻合した（図2）。より詳細には、十二指腸の乳頭部より2cm口側～2cm肛門側と膵頭部を合併切除し、切断した十二指腸の断端を4-0合成吸収性モノフィラメント針付縫合糸でGambee法により端々吻合した。そして、膵臓と十二指腸について、4-0合成吸収性モノフィラメント両端針付縫合糸でBlumgart変法による（膵管吻合を除いた）圧着吻合を行った。なお、臨床化学検査のために、ブタ体内にCVカテーテルおよび腹水ドレーンを留置した。

[0087] (2) シート処置群の膵頭十二指腸切除手術

例1で横紋筋を採取したブタに対し、例1で調製したシート状細胞培養物を用いて、全身麻酔下で膵頭十二指腸切除手術を行い、シート処置群（ $n=5$ ）とした。シート処置群の膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含んでいた。シート処置群の膵臓の切断面をすべて覆うように、例1で調製したシート状細胞培養物を移植した。かかる移植から数分後、膵臓の切断面をシート状細胞培養物を介して十二指腸腸壁に縫合した。

具体的には、膵頭部と十二指腸乳頭部肛門側を合併切除し、十二指腸断端を端々吻合し、膵頭切離面にシート状細胞培養物を移植した後（図3Aの点

線で囲まれた領域)、遠位の十二指腸と膵実質を吻合した(図3B)。より詳細には、十二指腸の乳頭部より2cm口側～2cm肛門側と膵頭部を合併切除し、切断した十二指腸の断端を4-0合成吸収性モノフィラメント針付縫合糸でGambee法により端々吻合した。そして、膵臓切離面(膵管は切り放しで露出している)にシート状細胞培養物を移植した。さらに、膵臓と十二指腸について、4-0合成吸収性モノフィラメント両端針付縫合糸でBlumgart変法による(膵管吻合を除いた)圧着吻合を行った。なお、臨床化学検査のために、ブタ体内にCVカテーテルおよび腹水ドレーンを留置した。

[0088] (3) 膵頭十二指腸切除手術後の病理組織学検査

シート状細胞培養物の移植から3日後に、対照群およびシート処置群を再度全身麻酔下で開腹し、対照群においては十二指腸と膵実質の吻合部位を、シート処置群においてはシート状細胞培養物の移植部位(膵臓の切断面と十二指腸腸壁との間の縫合部位)を摘出し、病理組織学検査に供した。図4Aは、対照群の、膵頭十二指腸切除手術から3日後に摘出した十二指腸と膵実質の吻合部位のHE染色像(×200)を示す。矢印は、出血および濃縮したタンパク質を示す。図4BおよびCは、シート処置群の、シート状細胞培養物の移植から3日後に摘出したシート状細胞培養物の移植部位のHE染色像(×200)を示す。点線で挟まれた領域は、シート状細胞培養物を示す。図4Dは、シート処置群の、シート状細胞培養物の移植から3日後に摘出したシート状細胞培養物の移植部位の抗DESMIN抗体免疫染色像(×200)を示す。点線で挟まれた領域は、シート状細胞培養物を示す。

その結果、摘出したシート状細胞培養物の移植部位において、シート状細胞培養物が膵実質(膵臓の切断面の一部)および十二指腸(十二指腸腸壁の一部)に密着した状態で残存していることがわかった(図4B～Dの点線で挟まれた領域)。また、シート状細胞培養物の移植部位以外の部位での癒着は生じず、炎症も生じていなかった(図示せず)。なお、図4B～Dにおいて、シート状細胞培養物に隣接する均一な層はフィブリンゲルの補強層である。

[0089] (4) 膵頭十二指腸切除手術後の臨床化学検査

対照群およびシート処置群において、ブタ体内に留置されたC Vカテーテルを介して、膵頭十二指腸切除手術から0、1および3日後に静脈血を採取し、常法により血清を調製した。また、対照群およびシート処置群において、ブタ体内に留置された腹水ドレーンを介して、膵頭十二指腸切除手術から1および3日後に腹水を採取した。かかる血清および腹水を臨床化学検査に供し、それぞれのアミラーゼ値およびリパーゼ値を測定した。

その結果、膵頭十二指腸切除手術から3日後において、対照群(n=9)に対し、シート処置群(n=5)では、腹水のアミラーゼ値および腹水のリパーゼ値は低くなる傾向を示した(図示せず)。なお、図5は、ヒト膵液瘻の臨床評価方法に準拠し、膵頭十二指腸切除手術から3日後の(腹水のアミラーゼ値)/(血清のアミラーゼ値)(図5A)および(腹水のリパーゼ値)/(血清のリパーゼ値)(図5B)を示す。また、膵頭十二指腸切除手術から1日後においても、対照群(n=9)に対し、シート処置群(n=5)では、腹水のアミラーゼ値および腹水のリパーゼ値は低くなる傾向を示した(図示せず)。

[0090] 以上の結果から、本発明によれば、膵臓の外科的処置後に縫合部位の液密性を維持することができ、膵液瘻を予防または処置することができる。特に、本発明によれば、膵頭十二指腸切除手術の処置後に縫合部位の液密性を維持することができ、膵液瘻を予防または処置することができる。さらに、本発明によれば、膵液瘻を予防または処置するだけでなく、腹腔内の縫合部位以外の部位での癒着は生じず、炎症も生じないため、膵臓の外科的処置の予後を改善することができる。そして、本発明によれば、シート状細胞培養物を利用することによって、膵臓の外科的処置後に縫合部位の生体組織の癒合を促進することもできる。

請求の範囲

- [請求項1] 膵臓の切断面を覆うためのシート状細胞培養物であって、膵臓の切断面は、膵実質および膵管の各切断面を含み、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液密に結合される、前記シート状細胞培養物。
- [請求項2] 膵管が、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合される、請求項1に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項3] 膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔が、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通する、請求項2に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項4] 膵管が、主膵管および／または副膵管である、請求項1～3のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項5] 小腸が、十二指腸または空腸である、請求項1～4のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項6] 膵臓の切断面、小腸腸壁の貫通孔、および／またはシート状細胞培養物の貫通孔が、外科的処置によって形成される、請求項1～5のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項7] 外科的処置が、膵頭十二指腸切除手術である、請求項6に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項8] 膵液瘻を予防または処置するための、請求項1～7のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項9] 骨格筋芽細胞を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項10] ゲルおよび／またはポリマーを含む補強層を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のシート状細胞培養物。
- [請求項11] 膵液瘻を予防または処置するための方法であって、膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップ、および膵臓の切断面をシート状細胞培養物を介して小腸腸壁に液

密に結合させるステップを含む、前記方法。

- [請求項12] 膵管を、シート状細胞培養物を介して小腸腸壁の貫通孔に液密に結合させるステップをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。
- [請求項13] 膵管の切断面の内腔部分でシート状細胞培養物に貫通孔を形成することにより、膵管および小腸の各内腔を、シート状細胞培養物および小腸腸壁の各貫通孔を介して連通させるステップをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。
- [請求項14] 膵実質および膵管の各切断面を含む膵臓の切断面をシート状細胞培養物で覆うステップが、移植デバイスによってなされる、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。