

明 細 書

発明の名称： フィブリンシートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、フィブリンシート、より詳しくは、フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 再生医療分野においては、失われた臓器機能を補完する観点から、細胞を3次元的な組織や臓器に構築して移植する治療方法に期待が高まっている（例えば、Kawamura M. et al.、Circulation、2012；126：S29－37（非特許文献1）、Miyagawa S. et al.、Current Gene Therapy、2016、Vol. 16、No. 1、p. 5－13（非特許文献2））。3次元的な組織や臓器の構築においては、よりよい治療効果を得るためにも、数層に及ぶ十分な量の細胞を含む組織を作製する必要がある。そのため近年では、3Dプリンターを用いて細胞を積層化するLayer by Layer法（LbL法）（例えば、Takagi D. et al.、Ricoh Technical Report、2016、No. 41、p. 118－127（非特許文献3））、ナノファイバーを作製してその上に細胞を播種する方法（例えば、Li J. et al.、Stem Cell Reports、2017、Vol. 9、1－14、p. 1546－1559（非特許文献4））、特殊な型を作製し、これに前記生体親和性材料及び細胞を播種する方法（Nakane T. et al.、Scientific Report、2017、7：45641（非特許文献5）、Gao L. et al.、Circulation、2018；137：1712－1730（非特許文献6）、Shadrin IY. et al.、Nature Communications、2017；8：1825（非特許文献7））

）などが研究されている。

[0003] しかしながら、前記ＬｂＬ法では、細胞を播種できる特殊な３Ｄプリンターが必要であったり、前記ナノファイバーを用いる方法では、当該ナノファイバーを作製する装置や播種後に細胞が十分に生着するまでの期間が必要となったり、前記特殊な型を用いる方法では、該特殊な型の作製と細胞を型の中で培養する期間とが必要となったり、これらの既存の方法では、特殊で高価な装置や時間が必要となるという問題点を有していた。

[0004] また、再生医療分野においては、組織を再生するために病巣部や欠損部に細胞を含有する細胞シートを用いる細胞補充療法が知られており、さらに、当該細胞シートを三次元的に積層して上記の３次元的な組織や臓器を構築し、移植や創薬研究等に用いることも研究されている。関連して、外科手術においては、切開部や病変除去後の組織欠損部の補綴・補強のために生体親和性材料からなるシートを用いることが知られており、当該シートには、治療のための薬剤をさらに含有させて薬剤シートとすることも知られている。これらの細胞シートや薬剤シートの基材（足場）や前記生体親和性材料としては、フィブリン、コラーゲン、及びポリ乳酸等が広く用いられている。中でも、フィブリンからなるフィブリンゲルは、組織膠着性によって生体接着剤としても機能するという利点を有するが、一方、糊状であるために、取り扱いを比較的容易とするためにフィブリンの濃度を濃くすると、含有させる細胞を生存させることが困難となる。逆に、細胞が生存できる濃度までフィブリンを希釈すると、ゲルの形状を維持しにくくなるために取り扱いが困難となる。さらに、接着性が強いために細胞シートの回収の際に細胞にダメージを与えてしまったり、均一で任意の形状の細胞シートを製造・維持することが困難であるといった問題点を有していた。また、今後の細胞シートや薬剤シート等の製造は、装置による自動化が主流になると想定され、装置のメンテナンス性の向上や小型化などの観点から、より簡便な製造方法が求められると予想される。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Kawamura M. et al., Circulation, 2012; 126: S29-37
- 非特許文献2: Miyagawa S. et al., Current Gene Therapy, 2016, Vol. 16, No. 1, p. 5-13
- 非特許文献3: Takagi D. et al., Ricoh Technical Report, 2016, No. 41, p. 118-127
- 非特許文献4: Li J. et al., Stem Cell Reports, 2017, Vol. 9, 1-14, p. 1546-1559
- 非特許文献5: Nakane T. et al., Scientific Report, 2017, 7: 45641
- 非特許文献6: Gao L. et al., Circulation, 2018; 137: 1712-1730
- 非特許文献7: Shadrin IY. et al., Nature Communications, 2017; 8: 1825

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを、フィブリン濃度が細胞が生存可能な程度に低濃度であっても、細胞及び薬剤に与えるダメージを抑制しつつ、均一かつ任意の形状で簡便に製造可能な、フィブリンシートの製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートの製造方法について、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ゼラチンハイドロゲルからなる基材

表面上に、前記細胞及び／又は薬剤とフィブリノゲンとを含有するフィブリノゲン溶液を滴下し、次いで、前記基材表面上で前記フィブリノゲン溶液にトロンピンを添加してフィブリン前駆液とし、その上面に支持膜を接触させて乗せることにより、塗り広げるといった細胞に機械的なダメージを与え得る操作を用いることなく、前記フィブリン前駆液を前記基材及び前記支持膜の均一な面間に表面張力によって広げることができること、並びに、フィブリノゲンとトロンピンとの反応によって、前記フィブリンシートを均一に形成できることを見出した。さらに、前記フィブリンシートを形成せしめた後、前記ゼラチンハイドロゲルの溶解温度以上の温度で前記基材を溶解させることにより、前記フィブリンシートにおけるフィブリン濃度にかかわらず、当該濃度が細胞が生存可能な程度に低濃度であっても、前記フィブリンシートと前記基材とを容易に分離することができることを見出した。さらに、前記支持膜の形状を調整することによって任意の形状のフィブリンシートを容易に得られることも見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、以下の態様を包含する。

[1]

フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートの製造方法であり、

ゼラチンハイドロゲルからなる基材表面上に、細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種とフィブリノゲンとを含有するフィブリノゲン溶液を滴下する工程1と、

前記基材表面上の前記フィブリノゲン溶液にトロンピンを添加する工程2と、

前記トロンピンを添加したフィブリノゲン溶液の上面に支持膜を接触させて乗せる工程3と、

前記基材と前記支持膜との間に、フィブリノゲンとトロンピンとの反応によって、フィブリンゲル中に前記細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを形成する工程4と、

前記ゼラチンハイドロゲルの溶解温度以上の温度で前記基材を溶解させ、前記支持膜に支持された前記フィブリンシートを前記基材から分離する工程5と、
を含む、フィブリンシートの製造方法。

[2]

前記フィブリンシートが前記フィブリンゲル中に少なくとも細胞を含有する細胞シートであり、前記基材が細胞培養用基材である、[1]に記載のフィブリンシートの製造方法。

[3]

前記工程1の前に、ゼラチン及び水を含有するゼラチン水溶液を加熱した後、冷却して前記ゼラチンハイドロゲルを得る工程をさらに含む、[1]又は[2]に記載のフィブリンシートの製造方法。

[4]

前記支持膜がポリプロピレンシートである、[1]～[3]のうちのいずれかに記載のフィブリンシートの製造方法。

[5]

前記工程5において、30～40℃で前記基材を溶解させる、[1]～[4]のうちのいずれかに記載のフィブリンシートの製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを、フィブリン濃度が細胞が生存可能な程度に低濃度であっても、細胞及び薬剤に与えるダメージを抑制しつつ、均一かつ任意の形状で簡便に製造可能な、フィブリンシートの製造方法を提供することが可能となる。

[0010] また、本発明によって得られたフィブリンシート（細胞シート及び／又は薬剤シート）を用いてこれを積層等することにより、3次元的な組織や臓器等の3次元生体材料を簡便に短時間で構築することが可能となる。前記フィブリンシートや前記3次元生体材料は、慢性期疾患や急性期疾患に対する細

胞補充療法や治療に用いることができ、また、生化学的な現象の理解や有用物質の産生のための細胞培養にも用いることが可能である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例1の工程4における基材、フィブリンシート、及び支持膜の形態を示す写真である。

[図2]実施例1の工程5における溶解基材、フィブリンシート、及び支持膜の形態を示す写真である。

[図3]実施例1で得られたフィブリンシートの形態を示す写真である。

[図4]面積を大きくして得られたフィブリンシートの形態を示す写真である。

[図5]実施例1で得られたフィブリンシートの評価における心機能の評価結果を示すグラフである。

[図6]実施例1で得られたフィブリンシートの評価におけるVEGF遺伝子の発現量の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明をその好適な実施形態に即して詳細に説明するが、以下の実施形態は本発明を説明するための例示であり、本発明を以下の内容に限定する趣旨ではない。本発明は、その趣旨の範囲内で適宜に変形して実施できる。

[0013] 本発明のフィブリンシートの製造方法は、

フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートの製造方法であり、

ゼラチンハイドロゲルからなる基材表面上に、細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種とフィブリノゲンとを含有するフィブリノゲン溶液を滴下する工程1と、

前記基材表面上の前記フィブリノゲン溶液にトロンピンを添加する工程2と、

前記トロンピンを添加したフィブリノゲン溶液の上面に支持膜を接触させて乗せる工程3と、

前記基材と前記支持膜との間に、フィブリノゲンとトロンビンとの反応によって、フィブリンゲル中に前記細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを形成する工程4と、

前記ゼラチンハイドロゲルの溶解温度以上の温度で前記基材を溶解させ、前記支持膜に支持された前記フィブリンシートを前記基材から分離する工程5と、

を含むことを特徴とする。

[0014] (フィブリンシート)

本発明において、「フィブリンシート」とは、フィブリンゲルと、前記フィブリンゲル中に含有される細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種と、を含むシートである。本発明において、「フィブリンゲル」とは、フィブリノゲンとトロンビンとの反応により形成されるポリマーである。フィブリンゲルは、主に細胞同士を接着させる機能を有する。

[0015] 前記フィブリノゲンは血液中のタンパク質であり、通常、ヒト又はヒト以外の動物の血漿から得られたものを用いることができる。生体適合性の点から、ヒトをフィブリンシートを用いる対象とする場合はヒトの血漿から得られたフィブリノゲンを、また、ヒト以外の動物を対象とする場合はその動物の血漿から得られたフィブリノゲンを、それぞれ原料として使用することが望ましい。このようなフィブリノゲンとしては、例えば、厚生労働省による生物学的製剤基準（令和元年（2019年）6月）に従って製造された乾燥人フィブリノゲンが挙げられ、また、市販のものを適宜用いてもよい。

[0016] 前記トロンビンは、前記フィブリノゲンをフィブリンにする反応を触媒する酵素であり、通常、ヒト又はヒト以外の動物の血漿から得られたものを用いることができる。このようなトロンビンとしては、例えば、ヒト又はウシの血漿から精製したプロトロンビンに Ca^{2+} の存在下でトロンボプラスチン、ヘビ毒等を作用させて調製したものが挙げられ、市販のものを適宜用いてもよい。

[0017] 本発明に係るフィブリンシートとしては、前記フィブリンゲル中に細胞を

含有する細胞シート、前記フィブリンゲル中に薬剤を含有する薬剤シート、前記フィブリンゲル中に細胞及び薬剤を含有する細胞・薬剤シートが挙げられる（本明細書中、場合によりこれらを総称して「細胞シート及び／又は薬剤シート」という）。

[0018] 本発明において、前記フィブリンゲル中に含有される細胞としては、細胞移植を行えるものであれば特に制限されず、目的に応じて適宜選択することができ、万能細胞、体性幹細胞、前駆細胞、及び成熟細胞のうちの何れであってもよく、これらのうちの1種のみであっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0019] 前記万能細胞としては、例えば、ES細胞、GS細胞、及びiPS細胞が挙げられる。前記体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（MSC）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、及び神経幹細胞が挙げられる。前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、滑膜由来細胞、脂肪由来細胞、心筋細胞、血管内皮細胞が挙げられ、また、前記万能細胞、体性幹細胞、又は前駆細胞から誘導された細胞（例えば、iPS細胞由来細胞（心筋細胞、血管内皮細胞）等）であってもよい。前記細胞の由来としては、ヒト、及びヒト以外の哺乳類（チンパンジーやサルなどの霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等の家畜や愛玩動物）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類が挙げられ、フィブリンシートを移植する対象に由来する自家細胞であっても移植する対象以外に由来する他家細胞であってもよい。

[0020] 前記フィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合、前記フィブリンゲル中に含有される細胞の含有量（2種以上である場合にはそれらの合計含有量）としては、前記フィブリンシートの体積100 μL に対して、細胞数で $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個であることが好ましい。なお、前記フィブリンゲル中には、前記細胞（目的の細胞）以外に、分離に際して混入した細胞等が含まれ得る。

[0021] 本発明において、前記フィブリンゲル中に含有される薬剤としては、例え

ば、抗腫瘍剤（アルキル化薬、白金化合物、代謝拮抗薬、ポイソメラーゼ阻害薬、抗癌抗生物質、微小管作用抗癌剤等）、抗菌剤（ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、アミノグリコシド系、キノロン系、マクロライド系、テトラサイクリン系、グリコペプチド系等）、抗炎症剤（ステロイド、NSAIDs等）、抗ウイルス剤、ホルモンなどの低分子薬物；骨形成因子、骨成長因子などの生理活性ペプチド；蛋白質；糖蛋白質；多糖類；核酸；栄養（クエン酸等）；ビタミン剤：オピオイドが挙げられ、これらのうちの1種のみであっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0022] 前記フィブリンシートが前記薬剤シート又は前記細胞・薬剤シートである場合、前記フィブリンゲル中に含有される薬剤の含有量（2種以上である場合にはそれらの合計含有量）としては、その使用の目的等に応じて適宜調整されるものであるため一概にはいえないが、例えば、前記フィブリンシート全量に対して、1～40質量%であることが好ましく、1～30質量%であることがより好ましく、1～20質量%であることがさらに好ましい。

[0023] 本発明に係るフィブリンシートとしては、前記フィブリンゲル、前記細胞、及び前記薬剤に加えて、他の成分をさらに含有していてもよい。かかる他の成分としては、下記のフィブリノゲン溶液やトロンビン溶液の溶媒に由来する成分、具体的には、注射用生理食塩水、緩衝液（PBS等のリン酸系緩衝液、クエン酸系緩衝液など）、細胞培養培地（DMEMなど）等の溶媒に由来する成分；下記のフィブリノゲン溶液やトロンビン溶液の添加成分、具体的には、界面活性剤等の溶解補助剤、血清アルブミン（ヒト血清アルブミン等）、糖、糖アルコール、アミノ酸（アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸等）又はその塩、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。また、前記フィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合、前記他の成分としては、細胞外マトリクスを構成する蛋白質や糖蛋白質（ラミニン（例えば、ラミニン-221）等）、細胞増殖因子も挙げられる。前記他の成分としては、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの他の成分の組成及び含有量

は、フィブリンシートに含有させる細胞や薬剤及び当該他の成分の種類、該フィブリンシートの使用目的等に応じて、適宜調整することができる。

[0024] 本発明に係るフィブリンシートとしては、特に制限されないが、例えば、 $100 \sim 300 \mu\text{L} / 1 \text{ cm}^2$ 程度となる厚さであることが好ましく、厚さが $1 \sim 3 \text{ mm}$ の範囲内にあることがより好ましい。ただし、本発明に係るフィブリンシートは、これを積層することにより、所望の厚さの3次元生体材料を形成することができる。また、本発明において、前記フィブリンシートの面積としても、特に制限されず、使用目的等に応じて適宜調整することができる。

[0025] (工程1)

本発明のフィブリンシートの製造方法においては、先ず、ゼラチンハイドロゲルからなる基材表面上に、細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種とフィブリノゲンとを含有するフィブリノゲン溶液を滴下する(工程1)。

[0026] 本発明に係る基材は、ゼラチンハイドロゲルからなる。本発明において、「ゼラチンハイドロゲル」とは、少なくともゼラチン及び水を含むゲルであり、前記ゼラチン分子間に架橋が形成されたものである。

[0027] 本発明に係る「ゼラチン」としては、架橋性を有するものであれば特に制限されず、ウシ、ブタ、クジラ、魚類等の動物種の、皮、骨、靱帯、腱等から製造される天然ゼラチンであっても、遺伝子組み換え技術によって作られたゼラチン類似のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくは蛋白様物質(リコンビナントゼラチン)であってもよい。また、前記天然ゼラチンとしては、いわゆる酸硬化組織由来のA型ゼラチン(等電点： $8 \sim 9$)であっても、いわゆる石灰硬化組織由来のB型ゼラチン(等電点： $4.8 \sim 5.0$)であってもよい。このようなゼラチンとしては、市販のものを適宜用いることができる。

[0028] 前記ゼラチンハイドロゲルにおいて、前記ゼラチン分子間の架橋は、架橋剤等を用いた化学的手法や紫外線等を用いた物理的手法によっても行うこと

ができるが、本発明に係るゼラチンハイドロゲルとしては、加熱による再溶解性の観点や、基材表面の均一性の観点から、ゼラチン及び水を含有するゼラチン水溶液を加熱した後に冷却する方法（熱処理法）により、前記ゼラチン分子間に架橋を形成させて得られたものであることが好ましい。

[0029] 前記ゼラチン水溶液としては、例えば、ゼラチンを水性溶媒に添加したものが挙げられ、前記水性溶媒としては、少なくとも水を含有する溶媒が使用でき、例えば、注射用蒸留水、注射用生理食塩水、緩衝液（PBS等のリン酸系緩衝液、クエン酸系緩衝液など）、細胞培養培地（DMEMなど）が挙げられ、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの中でも、本発明に係るフィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合、前記水性溶媒としては、含有される細胞に適した細胞培養培地を含有することが好ましく、前記基材がゼラチン及び前記細胞培養培地を少なくとも含有する基材、すなわち、細胞培養用基材であることがより好ましい。

[0030] 前記ゼラチン水溶液中におけるゼラチンの濃度としては、1～12質量%であることが好ましく、2～10質量%であることがより好ましく、3～8質量%であることがさらに好ましい。

[0031] 前記ゼラチンハイドロゲルを前記熱処理法で調製する際の条件としては、例えば、前記ゼラチン水溶液を30～40℃、好ましくは35～40℃において、5～40分間、好ましくは10～30分間加熱した後、0～20℃、好ましくは4～10℃において、5～120分間、好ましくは10～60分間冷却することが好ましい。前記加熱方法としては、例えば、ウォーターバス、インキュベータによる方法が挙げられ、前記冷却方法としては、室温（25℃程度）環境又は冷所に静置する方法が挙げられる。

[0032] 前記ゼラチンハイドロゲルは、例えば、シャーレ、マルチウェルプレート、フラスコ、マイクロキャリア等の器材に加熱後の前記ゼラチン水溶液を入れた後に冷却することによって、前記器材上に得ることができる。本発明に係る基材としては、操作容易性の観点から、このような器材上のゼラチンハ

イドロゲルをそのまま用いることが好ましいが、前記ゼラチンハイドロゲルを前記器材から剥離して用いても、適宜所望の大きさに切断してから用いてもよい。

[0033] 本発明に係るフィブリノゲン溶液は、細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種とフィブリノゲンとを含有する。前記細胞、薬剤、及びフィブリノゲンとしては、その好ましい態様も含めて、上述のとおりである。

[0034] 前記フィブリノゲン溶液中における細胞及び薬剤の含有量としては、それぞれ、得られるフィブリンシートにおけるこれらの含有量が上記の好ましい各含有量範囲内となるように、適宜調整することが好ましい。

[0035] 前記フィブリノゲン溶液中におけるフィブリノゲンの含有量としては、タンパク質量換算で、0.4～2質量%であることが好ましく、0.4～1質量%であることがより好ましい。前記フィブリノゲンの含有量が前記下限未満であると、フィブリンゲルの形成が困難となる傾向にあり、他方、前記上限を超えると、フィブリンゲルのフィブリン濃度が高くなって、細胞を含有させた場合に生存させることが困難となる傾向にある。

[0036] 前記フィブリノゲン溶液の溶媒としては、通常フィブリノゲンを溶解させる溶媒として使用される溶媒が使用でき、例えば、注射用蒸留水、注射用生理食塩水、pH 5～8の緩衝液（PBS等のリン酸系緩衝液、クエン酸系緩衝液など）、細胞培養培地（DMEMなど）等の水性溶媒が挙げられ、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの中でも、前記フィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合、前記溶媒としては、含有される細胞に適した細胞培養培地を含有することが好ましい。

[0037] 前記フィブリノゲン溶液としては、前記細胞、薬剤、及びフィブリノゲンに加えて、本発明の効果を阻害しない範囲内において、さらに、界面活性剤等の溶解補助剤、血清アルブミン（ヒト血清アルブミン等）、糖、糖アルコール、アミノ酸（アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸等）又はその塩

、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、細胞外マトリクスを構成する蛋白質や糖蛋白質（ラミニン等）、細胞増殖因子等の添加成分を含有していてもよい。

[0038] 前記基材表面上に前記フィブリノゲン溶液を滴下する方法としては特に制限されず、例えば、ピペットにより滴下する方法や注射器で滴下する方法が挙げられる。このときの滴下量としては、得られるフィブリンシートの均一性の観点から、 $60 \sim 180 \mu\text{L}$ であることが好ましく、 $80 \sim 160 \mu\text{L}$ であることがより好ましく、 $100 \sim 140 \mu\text{L}$ であることがさらに好ましい。

[0039] (工程2)

本発明のフィブリンシートの製造方法においては、工程1の後に、前記基材表面上の前記フィブリノゲン溶液にトロンビンを追加する(工程2)。前記トロンビンとしては、その好ましい態様も含めて、上述のとおりである。

[0040] 前記フィブリノゲン溶液に対するトロンビンの添加量としては、フィブリノゲン 100 mg (タンパク質量換算) に対して、 $0.75 \sim 375$ 単位 (U) であることが好ましい。前記トロンビンの添加量が前記下限未満であると、フィブリンゲルの形成が困難となる傾向にあり、他方、前記上限を超えると、フィブリンゲルのフィブリン濃度が高くなって、細胞を含有させた場合に生存させることが困難となる傾向にある。なお、本発明において、トロンビンの定量法は、日本薬局方「トロンビンの定量法」を準用することができる。

[0041] 本発明において、トロンビンとしては、トロンビンを含むトロンビン溶液として添加してもよい。前記トロンビン溶液の溶媒としては、通常使用される溶媒が使用でき、例えば、注射用蒸留水、注射用生理食塩水、 $\text{pH } 5 \sim 8$ の緩衝液 (PBS等のリン酸系緩衝液、クエン酸系緩衝液など)、細胞培養培地 (DMEMなど) 等の水性溶媒が挙げられ、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの中でも、前記フィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合

、前記溶媒としては、含有される細胞に適した細胞培養培地を含有することが好ましい。

[0042] また、前記トロンビン溶液としては、トロンビンに加えて、本発明の効果を阻害しない範囲内において、さらに、界面活性剤等の溶解補助剤、血清アルブミン（ヒト血清アルブミン等）、糖、糖アルコール、アミノ酸（アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸等）又はその塩、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、細胞外マトリクスを構成する蛋白質や糖蛋白質（ラミニン等）、細胞増殖因子等の添加成分を含有していてもよい。

[0043] 前記フィブリノゲン溶液にトロンビンを添加する方法としては特に制限されず、例えば、ピペッタにより前記トロンビン溶液を前記フィブリノゲン溶液（好ましくは前記フィブリノゲン溶液の滴）に添加する方法、下記の支持膜下面に前記トロンビン溶液を付着させてから前記フィブリノゲン溶液の上面に乗せる方法、及びこれらを組み合わせた方法が挙げられる。このときの前記トロンビン溶液の添加液量としては、得られるフィブリンシートの均一性の観点から、 $1 \sim 25 \mu\text{L}$ であることが好ましく、 $2 \sim 20 \mu\text{L}$ であることがより好ましく、 $2 \sim 15 \mu\text{L}$ であることがさらに好ましい。

[0044] 工程2において、前記フィブリノゲン溶液と前記トロンビンとは、ピペッティング等により攪拌してもよいが、前記トロンビンを添加したフィブリノゲン溶液（本明細書において、場合により「フィブリン前駆液」という）としては、前記基材上で滴を形成したままであることが好ましい。本発明において、「滴」としては、基材表面全てを覆っておらず、かつ、滴の体積（ μL ）と基材との接触面積（ mm^2 ）との比が $0.5 \mu\text{L}/\text{mm}^2$ 以上であることが好ましく、 $1 \mu\text{L}/\text{mm}^2$ 以上であることがより好ましい。

[0045] （工程3）

本発明のフィブリンシートの製造方法においては、前記トロンビンを添加したフィブリノゲン溶液の上面に支持膜を接触させて乗せる（工程3）。工程3においては、前記フィブリン前駆液（好ましくは前記フィブリン前駆液の滴）の上面に前記支持膜を接触するように乗せるだけで、前記支持膜の自

重、及び、前記フィブリン前駆液の滴と支持膜との間の表面張力により、前記フィブリン前駆液を均一に広げることができ、また、得られるフィブリンシートと前記支持膜との間を密着させることができる。工程3を工程2の後に行う場合、工程2の後には、下記の工程4のフィブリンシートの形成が同時に進行するため、当該工程3においては、前記フィブリノゲン溶液にトロンبینを添加して直ぐ、好ましくは5分以内、より好ましくは2分以内に、前記フィブリン前駆液の上面に支持膜を乗せることが好ましい。また、工程2（フィブリノゲン溶液へのトロンبینの添加）と工程3とは同時であってもよく、例えば、前記支持膜下面に前記トロンبین溶液を付着させてから（好ましくは前記トロンبین溶液を滴下して広げてから）前記フィブリノゲン溶液（好ましくは前記フィブリン溶液の滴）の上面に乗せること等により、工程2と工程3とを同時に行うことができる。

[0046] 本発明において、「支持膜」としては、得られるフィブリンシートを支持し、その形状を維持できるものであれば特に制限されないが、フィブリンシートの使用時に当該フィブリンシートから剥離が容易であるものが好ましく、また、前記フィブリン前駆液と接する面が凹凸の少ない均一な面であることが好ましい。このような支持膜としては、例えば、ポリプロピレンシート、ポリエチレン、紙、チタン、アルミニウムなどの金属、ガラス、及びこれらのうちの2種以上の組み合わせが挙げられる。これらの中でも、前記支持膜としては、表面の均一性、取り扱いの容易性、及びフィブリンシートとの剥離容易性の観点から、ポリプロピレンシートが好ましい。

[0047] また、前記支持膜としては、その自重によって好適な厚さのフィブリンシートを得る観点から、その単位面積当たりの重さが、 $0.01 \sim 0.2 \text{ g/cm}^2$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 0.1 \text{ g/cm}^2$ であることがより好ましく、 $0.01 \sim 0.05 \text{ g/cm}^2$ であることがさらに好ましい。

[0048] 前記支持膜の面積としては、前記フィブリン前駆液の液量 $100 \mu\text{L}$ に対して、かかる溶液に接する面の面積が $50 \sim 200 \text{ mm}^2$ であることが好ましく、 $50 \sim 150 \text{ mm}^2$ であることがより好ましく、 $75 \sim 100 \text{ mm}^2$ であ

ることがさらに好ましい。前記支持膜の形状としては特に制限されず、円や楕円、正方形や長方形等の多角形、穴の開いた形状や、折れ曲がるようにフィブリンシートと接する面と反対側の面に切れ込みを入れた形状等、任意の形状を選択することができる。フィブリンシートと接する面と反対側の面に切れ込みを入れた形状の支持膜を用いることにより、フィブリンシートを折りたたむことができ、例えば、小切開でより大きい面積のフィブリンシートを移植することが可能となる。さらに、前記支持膜の厚さとしては、特に制限されないが、取り扱い容易性の観点からは、 $0.05 \sim 0.4 \mu\text{m}$ であることが好ましい。

[0049] (工程4)

本発明のフィブリンシートの製造方法においては、前記基材と前記支持膜との間に、フィブリノゲンとトロンビンとの反応によって、フィブリンゲル中に前記細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを形成する(工程4)。前記フィブリンシート、及びそれに含有される細胞、薬剤、フィブリンゲル、必要に応じて他の成分としては、その好ましい態様も含めて、それぞれ、上述のとおりである。本発明においては、工程2によってフィブリンシートの形成が開始されるため、工程4の一部は、工程2及び／又は工程3と同時進行であってよい。

[0050] 工程4において、フィブリノゲンとトロンビンとの反応条件としては、例えば、 $4 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $4 \sim 20^{\circ}\text{C}$ において、 $5 \sim 20$ 分間、好ましくは $5 \sim 15$ 分間、静置することが好ましい。フィブリノゲンとトロンビンとを反応させることによってフィブリンゲルが形成され、かかる工程4により、前記基材と前記支持膜との間に、前記フィブリンシートを得ることができる。

[0051] (工程5)

本発明のフィブリンシートの製造方法においては、工程4の後、前記ゼラチンハイドロゲルの溶解温度以上の温度で前記基材を溶解させ、前記支持膜に支持された前記フィブリンシートを前記基材から分離する(工程5)。

- [0052] 工程5において、前記基材を溶解させる温度としては、前記ゼラチンハイドロゲルの溶解温度以上の温度、すなわち、該ゼラチンハイドロゲルを構成するゼラチンの凝固後溶解温度以上の温度であればよい。前記基材を溶解させる温度として、具体的には、細胞の死滅や薬剤の失活を抑制する観点及びフィブリンシートと基材との分離をより容易にする観点から、30～40℃であることが好ましく、35～40℃であることがより好ましい。また、前記温度において前記基材を溶解させる時間としては、特に限定されないが、例えば、10～60分間であることが好ましく、10～30分間であることがより好ましい。
- [0053] 工程5において、前記基材を溶解させる方法としては、特に制限されず、例えば、ウォーターバス上や、インキュベータ内に、前記工程4の後の基材、フィブリンシート、及び支持膜を上記条件で静置する方法が挙げられる。かかる工程5により、前記基材を構成するゼラチンハイドロゲルが溶解するため、前記フィブリンシートと前記基材表面との接着が解消され、前記支持膜を回収することで、前記支持膜に積層され担持された前記フィブリンシートを回収することができる。
- [0054] 本発明によれば、フィブリン濃度が細胞が生存可能な程度に低濃度であってもフィブリンシートを簡便に製造可能であるため、前記フィブリンシートが前記細胞シート又は前記細胞・薬剤シートである場合には、フィブリンシート内に細胞を生存させたまま含有させることができる。また、フィブリン濃度が低濃度のフィブリンシート内においては、細胞の移動が可能であるため、本発明によれば、細胞が3次元に分散されたフィブリンシートとすることや、シート表層に細胞を集積させたフィブリンシートとすることが可能である。
- [0055] 本発明により得られたフィブリンシートは、そのまま細胞シート及び／又は薬剤シートとして用いることができ、細胞移植による疾患の治療（細胞補充療法）や、外科手術における切開部や病変除去後の組織欠損部の補綴・補強に好適に用いることができる。また、本発明により得られたフィブリンシ

ートは、これを積層して3次元生体材料とすることもでき、移植や創薬研究等に用いることもできる。

[0056] 本発明により得られたフィブリンシートを用いた治療方法の一例として、本発明の製造方法により得られた細胞シートを用いた、細胞移植による心疾患の治療方法を例に挙げて以下に説明する。また、本発明により得られたフィブリンシートを用いた治療方法としては、他に、例えば、欠損組織・機能低下臓器への細胞補充や補強という観点から、肝硬変、ウイルス性肝炎などの肝機能低下、消化管潰瘍、消化管穿孔、上皮潰瘍、上皮欠損、角膜損傷、血管・臓器損傷に伴う出血部位の止血も、治療対象となりうる。

[0057] 前記治療方法を行う対象となる「心疾患」としては、例えば、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、及び拡張型心筋症からなる群から選択される疾患が挙げられる。

[0058] 前記心疾患の治療方法は、ヒト及びヒト以外の対象に対して適用することができる。適用対象となる生物は、治療標的としての心臓を有する限り、特に制限はなく、例えば、ヒト、ヒト以外の哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類が挙げられる。ヒト以外の哺乳類としては、チンパンジーやサルなどの霊長類の他、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等の家畜や愛玩動物が挙げられるが、これらに制限されない。前記細胞シートに含有される細胞としては、これら治療の対象となる生物に適合した由来の細胞を用いればよいが、拒絶反応の抑制などの観点から、好ましくは同種由来、特に好ましくは自己由来の細胞である。

[0059] 前記心疾患の治療方法においては、前記細胞シートで、心疾患を罹患している対象の心表面（好ましくは病巣（例えば、心筋梗塞巣））を被覆することが好ましい。前記細胞シートの心表面への移植においては、当該細胞シートがフィブリンシートであるため、該細胞シートを心表面に貼付することで容易に固定することができる。

[0060] 前記心疾患の治療方法は、他の治療と適宜併用してもよい。かかる他の治療としては、例えば、慢性心筋梗塞においては、冠動脈バイパス手術、経皮

的冠動脈形成術、左室形成術等が挙げられ、急性心筋梗塞においては、冠動脈バイパス手術、経皮的冠動脈形成術等が挙げられる。その他、弁置換術や小児心臓手術と併用することもできる。

実施例

[0061] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例により何ら制限されるものではない。

[0062] (実施例1)

<材料>

iPS-CMs: ヒトiPS細胞由来心筋細胞

DMEM: DMEM High Glucose (nacalaitesque, Code 08458-16)、

PBS: D-PBS (-) (nacalaitesque, Code 14249-24)、

ゼラチン: Gelatin from porcine skin (Sigma, G1890-100G)、

フィブリノゲン: Beriplast P Combiset Solution A (CSL Behring, 87799)、

トロンビン: Beriplast P Combiset Solution B (CSL Behring, 87799)、

ポリプロピレンシート (PPシート): 面積: 10mm×10mm、厚さ: 0.3μm。

[0063] <フィブリンシートの製造>

まず、ゼラチン1.6gを40mLのDMEMに添加し、10~20分間、37℃のウォータバスで溶解させ、4w/v% (g/mL%, 以下同様)ゼラチン溶液を作製した。次いで、6wellプレートの各ウェルに前記ゼラチン溶液を3mLずつ入れ、4℃において20分間冷却してゼラチンハイドロゲルを形成させ、ゼラチンハイドロゲルからなる基材を作製した。また、70μmのフィルターで異物を除去し、遠心にて濃度を調整したiPS-

CMs $100\mu\text{L}$ (5×10^6 細胞)と、Beriplast P Solution AをDMEMで2倍希釈したフィブリノゲン $10\mu\text{L}$ と、PBS $10\mu\text{L}$ と、を混合したフィブリノゲン溶液 $120\mu\text{L}$ を、混合して直ぐ速やかに、上記基材表面(約 4°C)上に滴下した(工程1)。次いで、Beriplast P Solution B ($0.03\text{U}/\mu\text{L}$)をDMEMで10倍希釈したトロンビン溶液を $2\mu\text{L}$ 、前記基材表面上のフィブリノゲン溶液に添加し(工程2)、前記トロンビン溶液を添加したフィブリノゲン溶液の上面に接触するように、速やかにポリプロピレンシート(支持膜)を乗せた(工程3)。これを 4°C において10分間静置し、前記フィブリノゲン溶液が固まってフィブリンゲル(フィブリンシート)を形成していることを確認(工程4)した後、20分間、 37°C インキュベータ内で前記ゼラチンハイドロゲルからなる基材を溶解させ(工程5)、ポリプロピレンシートと共に前記フィブリンゲル(フィブリンゲル中に細胞数が 5×10^6 のiPS-CMsを含有するフィブリンシート)を回収した(工程6)。得られたフィブリンシートは、面積が 1cm^2 であり、厚さが約 1.2mm であった。工程4における基材、フィブリンシート、及び支持膜の形態を図1に示し、工程5における溶解基材、フィブリンシート、及び支持膜の形態を図2に示す。さらに、工程6で得られたフィブリンシートの形態を図3に示す。図3に示すように、得られたフィブリンシートは凹凸のない均一なものであった。また、得られたフィブリンシートにおいては、細胞が表層に集積して、 $100 \sim 150\mu\text{m}$ の厚さの組織を形成していた。

[0064] さらに、前記フィブリノゲン溶液及びトロンビン溶液を増量すると共にポリプロピレンシートの面積を大きくして、面積の大きなフィブリンシートも同様にして均一に得られることを確認した。面積を大きくして得られたフィブリンシートの形態を図4に示す。

[0065] <フィブリンシートの評価>

ヌードラット心筋梗塞モデルに、心筋梗塞を起こしてから2週間後、前記フィブリンシートを心筋の傍梗塞部位の表面に貼付して移植した。移植後

1週間おきに4週目まで心機能（収縮能、収縮期末期径、拡張期末期径）の評価を心エコー検査にて行った。また、移植後4週目の傍梗塞部位におけるVEGF（サイトカイン）遺伝子の発現量をqPCRにより測定した。

[0066] 図5に、前記フィブリンシートを移植したヌードラット心筋梗塞モデル（移植群 n：8）及び移植しなかったヌードラット心筋梗塞モデル（Control n：5）における心機能の評価結果を示す。図5の縦軸（EF（%））は、左室駆出率（Ejection Fraction）である。図5に示すように、前記フィブリンシートを移植したラット（移植群）では移植後4週間の間に心機能の有意な改善が認められた。

[0067] また、図6に、前記フィブリンシートを移植したヌードラット心筋梗塞モデル（移植群 n：8）及び移植しなかったヌードラット心筋梗塞モデル（Control n：5）におけるVEGF遺伝子の発現量の測定結果を示す。図6の縦軸は、Control群に対するVEGF遺伝子の発現量を示す。図6に示すように、前記フィブリンシートを移植したラット（移植群）では、傍梗塞部位において、血管新生に関連するサイトカインであるVEGF遺伝子の発現の増強が認められた。また、前記移植群においては、傍梗塞部位における心筋の大きさが有意に小さく、心筋の肥大が抑制されたことが確認され、さらに、血管新生が向上したことも確認された。

産業上の利用可能性

[0068] 以上説明したように、本発明によれば、フィブリンゲル中に細胞及び薬剤からなる群から選択される少なくとも1種を含有するフィブリンシートを、フィブリン濃度が細胞が生存可能な程度に低濃度であっても、細胞及び薬剤に与えるダメージを抑制しつつ、均一かつ任意の形状で簡便に製造可能な、フィブリンシートの製造方法を提供することが可能となる。