

明 細 書

発明の名称：

筋肉由来の細胞の培養方法および筋肉由来の細胞を含む培養装置

技術分野

[0001] 本発明は、筋肉由来の細胞の培養方法および筋肉由来の細胞を含む培養装置に関する。

背景技術

[0002] 従来、筋肉細胞を培養する標準培地は、10%～20%血清を含有するDMEMやRPMI-1640であった（例えば、Scientific Reports volume 12, Article number: 827 (2022)）。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、筋肉由来の細胞の培養方法および筋肉由来の細胞を含む培養装置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

[0004] 本発明の一実施態様は、筋肉由来の細胞と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞とを、共培養する工程を含むことを特徴とする細胞培養方法である。

[0005] 本発明の他の実施態様は、筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器とが接続された培養装置において、第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地を環流させる工程を含む、細胞培養方法である。第2の培養槽が、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来

の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種の細胞を含んでもよい。筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器と、が接続された培養装置において、第1～第3の培養容器の間で培地を環流させる工程を含む細胞培養方法であってもよい。また、筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器と、が接続された培養装置において、第1の培養容器と第2の培養容器の間で培地を連通させる工程と、第1の培養容器と第3の培養容器の間で培地を連通させる工程と、を含む細胞培養方法であってもよい。

[0006] 本発明のさらなる実施態様は、筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器とを含み、第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地が環流するように接続されている、細胞培養装置である。皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器とをさらに含み、第1～第3の培養容器の間で培地が

環流するように接続されていてもよい。皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器をさらに含み、第1の培養容器と第2の培養容器の間で培地が連通し、第1の培養容器と第3の培養容器の間で培地が連通するように接続されていてもよい。

[0007] 本発明のさらなる実施態様は、筋肉由来の細胞と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞とを共培養する、培養系である。

[0008] 本発明のさらなる実施態様は、筋肉由来の細胞を、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を培養して得られた培養上清の存在下で培養する工程を含む、細胞培養方法である。前記培養上清は、さらに、筋肉由来の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清を得るための培養は共培養であってもよい。

[0009] 本発明のさらなる実施態様は、筋肉由来の細胞を、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を培養して得られた培養上清の存在下で培養する、培養系である。前記培養上清は、さらに、筋肉由来の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清を得るための培養は共培養であってもよい。

[0010] 本発明のさらなる実施態様は、細胞を培養するために用いるシステムであって、前記細胞を増殖させるための細胞培養容器と、前記細胞を培養するための培地に含まれる培養上清を得るための装置を含み、前記装置は、複数の細胞種を共培養するための装置である、システムである。前記装置は、複数

の細胞培養容器を含み、前記複数の細胞培養容器の一部または全部は、容器内の培養上清が循環するように連結されていてもよい。

[0011] ==関連文献とのクロスリファレンス==

本出願は、2023年1月6日付で出願した日本国特許出願2023-001378に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、筋肉細胞を培養するための培養上清を得るための培養系の一実施形態を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の目的、特徴、利点、およびそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態および具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示または説明のために示すものであって、本発明をそれらに限定しない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0014] [1] 筋肉由来の細胞の培養方法

本発明の一実施形態の筋肉由来の細胞の培養方法は、筋肉由来の細胞と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞とを、共培養する工程を含む、培養方法である。

[0015] また、筋肉由来の細胞と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を共培養してもよい。

[0016] 本発明の他の実施態様は、筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚

由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器とが接続された培養装置において、第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地を環流させる工程を含む、細胞培養方法である。

[0017] 本発明の他の実施態様は、筋肉由来の細胞を、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を培養して得られた培養上清の存在下で培養する工程を含む、細胞培養方法である。培養上清は、さらに、筋肉由来の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。また、培養上清を得るための培養は共培養であってもよい。

[0018] [2] 培養装置

＜筋肉由来の細胞の培養装置＞

[0019] 本発明の一実施形態の筋肉由来の細胞の培養装置は、筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器とを含み、第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地が環流するように接続されている、細胞培養装置である。培養装置には、新鮮な細胞培養用培地を供給するための培地供給容器、培養済みの細胞培養用培地を回収するための培地回収容器などを設けてもよい。培養容器は特に限定されず、例えば、培養槽であっても、ガラスのシャーレであっても、プラスチックのディッシュであってもよい。

[0020] 第1の培養容器の数は単数でも複数でもよい。第1の培養容器の数が複数である場合、少なくともそのうちの一つの第1の培養容器が所定の第2の培養容器との間で還流するように接続されていればよいが、すべての第1の培養容器が所定の第2の培養容器との間で還流するように接続されていること

が好ましい。また、第2の培養容器の数は単数でも複数でもよい。第2の培養容器の数が複数である場合、少なくともそのうちの一つの第2の培養容器が所定の第1の培養容器との間で還流するように接続されていればよいが、すべての第2の培養容器が所定の第1の培養容器との間で還流するように接続されていることが好ましい。特に、複数のすべての第2の培養容器がそれぞれ独立に、所定の第1の培養容器に対し、連通するように接続されているのが好ましい。第1の培養容器の数が複数で、第2の培養容器の数が複数である場合、少なくともそのうちの一つの第1の培養容器が少なくともそのうちの一つの第2の培養容器との間で還流するように接続されていればよいが、すべての第1の培養容器がすべての第2の培養容器との間で還流するように接続されていることが好ましい。

[0021] この培養装置は、さらに、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器を含んでもよい。第3の培養容器の構成は、上述の第2の培養容器の構成に準ずる。たとえば、第1～第3の培養容器が還流するように接続されていてもよく、第1の培養容器と第2の培養容器の間で培地を連通させながら、独立に第1の培養容器と第3の培養容器の間で培地を連通させるように接続されていてもよい。以下同様に、この培養装置が有する培養容器の種類も個数も、特に限定されない。

[0022] 培養容器同士が還流するように接続されているとき、直接培養容器同士が接続されていてもよいが、第1の培養容器および第2の培養容器以外の1以上の培養容器を介してそれらが接続されていてもよい。その容器には、新鮮な培地が入っていてもよい。

[0023] 培養容器同士の結合の仕方は、第1の培養容器および第2の培養容器の間で培地が連通する、すなわち第1の培養容器および第2の培養容器の間で培地が共有されるように接続されていれば、目的に合わせて適宜決めることができる。例えば、培養容器が2つの場合、1本の連通管で結合してもよく、

2本またはそれ以上の連通管で結合してもよい。複数の連通管で培養容器を結合することで、培地を容易に還流することができる。培養容器が3つ以上の場合、直列に結合しても並列に結合してもよく、目的に合わせて、適宜培養容器を結合し、適切な培養装置を構成することができる。

[0024] また、培養容器同士を連通管で結合させ、培養容器間の連通管に、開閉弁などの開閉制御装置を設け、開閉を制御することで培地の連通を制御してもよい。また、培養容器間の連通管に、ポンプを設けて、培地の流れをいずれかの方向に促進してもよい。

[0025] <培養系>

培養系とは、培養装置、細胞培養用培地、および培養している細胞を含み、培養状態にある系をいう。細胞培養用培地は、血清含有培地でもよいが、含有物質を制御しやすいという点で、無血清培地であることが好ましい。細胞培養用培地は、当業者は、培養する細胞に適したものを選択することができる。

[0026] 共培養する場合は、複数の種類の細胞を1つの培養容器で培養してもよく、その場合、複数の種類の細胞を混合して培養してもよく、複数の区画に分けて、各区画には単一種の細胞を培養してもよい。各細胞用に独立した培養容器を設け、各培養容器の間で培地が連通し、全体に一樣な培地になるように、培養容器同士を結合させ、培地を共有して培養することにより、細胞を別々の培養容器で増殖させてもよい。

[0027] 増殖対象の細胞に培養上清を添加して培養する場合、増殖対象の細胞の培養容器は、培養上清を得るための細胞の細胞容器とは独立していてもよい。培養上清を得るための細胞の細胞容器の数は、用いる細胞種の数に関わらず、1つであっても、複数であってもよいが、各細胞種に対して1つまたは複数個であることが好ましい。それらは、独立していてもよく、目的に応じて連通していてもよい。なお、培養上清を得るための細胞として、増殖対象の細胞と同種の細胞を含めることが好ましい。

[0028] 各細胞用の培養容器は1つであっても2つ以上であってもよい。いずれの

場合も、目的に合わせて、適宜培養容器を結合し、適切な培養系を形成することができる。

[0029] [3] 具体的な細胞の調製方法と培養方法

＜細胞の由来＞

[0030] 筋肉を得るための動物は特に限定されないが、哺乳類などの脊椎動物であることが好ましく、卵殻を有する卵を産卵する動物、例えば鳥類や爬虫類であることがより好ましい。特に、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞が由来する生物種は特に限定されないが、脊椎動物であることが好ましく、哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類のいずれであってもよく、例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、ニワトリなどであってもよい。また、胚膜由来の細胞が由来する生物種は卵生であれば特に限定されず、鳥類や爬虫類であってもよく、ニワトリであってもよい。ニワトリの場合、0日胚～21日胚であればよいが、2日胚～19日胚でもよく、4日胚～17日胚でもよく、6日胚～15日胚でもよい。なお、各組織の細胞は、同じ動物に由来しても、異なる動物に由来してもかまわない。

[0031] ＜細胞の種類と調製方法＞

筋肉由来の細胞、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞は、それぞれ動物胚から、筋肉、皮膚、腸、心臓、脳、胃、胚膜、肝臓、腎臓、および肺を取り出して用いるか、または胚全体を用い、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、トリプシンなどの酵素などによる化学的処理、またはメスやカミソリによる切断・破砕や、マイクロチップを用いたピペッティングなどによる物理的処理によって細胞を分離することで得ることができる。具体的な方法は、既に技術常識として確立されており、細胞を生きたままで回収できる方法であれば、特に限定されない。

[0032] 筋肉由来の細胞には、筋細胞、神経細胞、結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、血液細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞

胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。筋肉は、骨格筋、平滑筋、または心筋のいずれであってもよく、またいずれか2つ以上の混合でもかまわない。

[0033] 皮膚由来の細胞には、上皮細胞、および真皮細胞が含まれる。

[0034] 腸由来の細胞には、腸管上皮細胞、C B C細胞、パネート細胞、腸内分泌細胞、杯細胞、吸収上皮細胞、M細胞、腸壁細胞、結合組織細胞、筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。腸は、十二指腸、小腸、大腸、または結腸のいずれであってもよく、またいずれか2つ以上の混合でもかまわない。

[0035] 心臓由来の細胞には、心筋細胞、神経細胞、結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、血液細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0036] 脳由来の細胞には、神経細胞、グリア細胞、下垂体細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0037] 胃由来の細胞には、主細胞、壁細胞、副細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0038] 胚膜由来の細胞には、羊膜、漿膜、尿膜、および卵黄嚢からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0039] 肝臓由来の細胞には、実質細胞（すなわち肝細胞）、非実質細胞（例えば、類洞壁細胞、筋繊維芽細胞、胆管上皮細胞、結合組織細胞、肝星細胞など）、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0040] 腎臓由来の細胞には、子球体を構成する上皮細胞、内皮細胞、メサングウム細胞、臓側上皮細胞、壁側臓費細胞、尿細管を構成する内皮細胞、上皮細胞と、それ以外の組織を埋める結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択さ

れる一つ以上の細胞が含まれる。

[0041] 肺由来の細胞には、内皮細胞、肺胞上皮細胞、およびそれらの前駆細胞または幹細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が含まれる。

[0042] 細胞は、初代培養細胞であっても、樹立された培養細胞株であってもよい。また、組織や器官の形状で培養されていてもよく、細胞塊の形状で培養されていてもよく、個々に分離された細胞であってもよい。

[0043] 培養は、浮遊培養であっても、接着培養であってもよい。また、平面培養であっても立体培養であってもよい。細胞種によってどの培養を選択するかは、当業者によって容易に、そして適切に判断できる。

[0044] 具体的な細胞培養方法は、当業者が、上述した培養系を用い、培養目的の細胞に適したやり方を選択することができる。

[0045] 培養に、他の細胞種を培養した培養上清を用いる場合、培養上清は、例えば、細胞を 1×10^4 個/〜 1×10^7 個/mL の密度で細胞容器に播種し、1〜30日程度培養した後で回収することができる。その後、遠心して細胞残渣などの沈殿を除去してもよい。得られた培養上清は、そのまま用いて（すなわち、細胞上清100%で）、増殖させる目的の細胞を培養してもよいが、新鮮な培地を10%以上、30%以上、50%以上、あるいは70%以上加えた培地を用いてもよい。2種以上の細胞の培養上清を、増殖させる細胞の培地に添加する場合、培養上清を得るための2種以上の細胞は、別々に培養して、その上清を混合してもよいが、一部または全部の細胞を共培養してもよい。共培養する場合、共培養する細胞のうち、一部または全部の細胞を1つの培養容器で培養してもよいが、各細胞用に独立した培養容器を設け、培地を共有して培養することにより、細胞を別々に増殖させてもよい。後者の場合、各培養容器の間に培地が連通するように、培養容器同士を結合させてもよい。培養容器同士の結合の仕方は目的に合わせて適宜決めることができる。例えば、一部またはすべての培養容器を環状に結合させてもよく、その中に、増殖対象の細胞と同種の細胞の培養容器を含めてもよい。

[0046] <培養上清を得るための培養系>

以下に、培養容器及び容器を連結する管を含む培養装置を利用した、培養上清を得るための培養系の一例を図1を用いて示すが、培養系の実施形態は、これに限られず、当業者であれば、様々な改良や修正を容易に加えることができる。

[0047] この培養系は、細胞培養のための足場20、培養細胞41～43、培養上清51～53を含む複数の培養容器101～103を有する。各培養容器101～103で培養される培養細胞41～43は同じ種類であっても異なった種類であってもよく、得られる上清を用いて増殖させるための細胞種を含んでもよい。培養容器101～103は連通管10によって、培養上清51～53を循環させることができるように連結しており、各容器101～103間には三方弁61～63が設けられている。この培地の循環系から各三方弁61～63を制御して上清を回収容器90に回収することができるように、回収管31～33が設けられている。また、この培地の循環系に対し、新鮮な培地55の入った培地容器400が三方弁70を用いて連結されている。連通管10及び回収管30には、送液ポンプ80が設けられている。そして培養容器101～103及び培地容器400には、開閉弁71～73、74が付いた、外気に開く管が設けられており、管には外気から微生物や微小物が混入しないようにフィルターが設けられている。

[0048] このような装置を用いることで、目的に合致した上清を回収することができる。例えば、弁61を培養容器101から回収容器90の方向のみ開き、弁63及び弁70を培地容器400から培養容器101の方向のみを開くことで、培養細胞41のみを培養した培養上清が得られる。あるいは、弁61～63及び弁70を培地が循環するような方向のみ開くことで、培養細胞41～43を共培養した、均一化された培養上清が循環系を循環する。その後、弁71を開放し、弁63を容器103から回収容器90の方向のみに開くことで、均一化された培養上清を回収することができる。その後、弁71を閉じ、弁73及び弁74を開放し、弁61～63を培地が循環するような方向のみ開き、弁70を培地容器400から容器101の方向にのみ開くこと

で、培養容器 101～103 に新鮮な培地が供給される。あるいは、各弁の開閉を適切に組み合わせることによって、各培養容器 101～103 の培地量や回収する培地の組み合わせなどを自由に制御できる。

- [0049] こうして、目的に合った上清を回収容器 90 に集めることができ、回収された上清は、増殖させるための細胞を培養するために利用できる。なお、回収容器 90 と増殖させるための細胞の培養容器とを連通させ、回収容器 90 に集められた上清を自動的に増殖させるための細胞の培養容器に供給するような構成を有してもよい。この際、上清の供給量、供給頻度、供給回数などをコンピュータ制御してもよい。

実施例

- [0050] [1] 細胞の調製方法

各組織（筋肉、皮膚、胃、心臓、脳、腸、胚、肝臓、腎臓、肺）から、以下のようにして細胞を調製した。

- [0051] まず、ニワトリ有精卵を孵卵し、12日胚から各組織をそれぞれ回収し、メッシュ（100 μm ）を用いた物理的処理によって組織を単一の細胞に分散し、回収した。

- [0052] [2] 細胞の培養方法

回収した細胞を、連通管でつながる3つの細胞培養用プレートに、それぞれ表1で示した細胞#1～#3を足場と共に播種し、0.05%の酵母エキスを添加したDMEMを培地に用いて37℃、5%CO₂存在下で培養した。培養6日後に培地を50%交換し、培養12日後に細胞を回収して細胞数を計測した。得られた細胞数について、#1～#3のプレートとは別にそれぞれ単一種の細胞を同条件で培養して得られた細胞数を1とした時の相対的な数値を算出した。それぞれ9回繰り返して実験を行い、表1はその平均値±標準偏差を記載した。

- [0053] [3] 結果

[表1]

組織			結果		
#1	#2	#3	#1	#2	#3
筋肉	皮膚	皮膚	1.35 ± 0.71	1.47 ± 0.81	1.68 ± 0.87
筋肉	皮膚	腸	1.24 ± 0.36	1.66 ± 0.88	1.15 ± 0.42
筋肉	皮膚	心臓	1.16 ± 0.24	1.61 ± 0.93	1.00 ± 0.34
筋肉	皮膚	脳	1.25 ± 0.41	1.58 ± 0.74	1.12 ± 0.26
筋肉	皮膚	胃	1.19 ± 0.28	1.53 ± 0.70	0.97 ± 0.26
筋肉	皮膚	胚膜	1.19 ± 0.29	1.46 ± 0.79	1.26 ± 0.88
筋肉	皮膚	肝臓	1.21 ± 0.34	1.47 ± 0.57	0.85 ± 0.19
筋肉	皮膚	腎臓	1.29 ± 0.25	1.56 ± 0.56	1.30 ± 0.56
筋肉	皮膚	肺	1.16 ± 0.32	1.65 ± 0.78	1.13 ± 0.57
筋肉	腸	腸	1.18 ± 0.38	1.01 ± 0.30	1.13 ± 0.27
筋肉	腸	心臓	1.22 ± 0.30	0.95 ± 0.11	0.97 ± 0.23
筋肉	腸	脳	1.21 ± 0.30	0.92 ± 0.16	1.48 ± 0.59
筋肉	腸	胃	1.16 ± 0.27	0.90 ± 0.20	0.93 ± 0.17
筋肉	腸	胚膜	1.11 ± 0.44	0.91 ± 0.34	1.27 ± 0.82
筋肉	腸	肝臓	1.29 ± 0.28	1.03 ± 0.17	0.90 ± 0.22
筋肉	腸	腎臓	1.26 ± 0.36	1.11 ± 0.33	1.53 ± 0.96
筋肉	腸	肺	1.21 ± 0.27	1.09 ± 0.28	1.17 ± 0.80
筋肉	心臓	心臓	1.23 ± 0.22	0.92 ± 0.29	0.92 ± 0.25
筋肉	心臓	脳	1.13 ± 0.32	0.83 ± 0.10	1.34 ± 0.53
筋肉	心臓	胃	1.10 ± 0.30	0.82 ± 0.18	1.00 ± 0.20
筋肉	心臓	胚膜	1.11 ± 0.26	0.98 ± 0.36	1.09 ± 0.54
筋肉	心臓	肝臓	1.26 ± 0.36	1.06 ± 0.40	0.88 ± 0.28
筋肉	心臓	腎臓	1.23 ± 0.53	1.10 ± 0.35	1.61 ± 1.36
筋肉	心臓	肺	1.11 ± 0.23	0.91 ± 0.13	1.23 ± 0.70
筋肉	脳	脳	1.30 ± 0.49	1.16 ± 0.22	1.16 ± 0.27
筋肉	脳	胃	1.33 ± 0.36	1.24 ± 0.32	1.02 ± 0.31
筋肉	脳	胚膜	1.20 ± 0.28	1.31 ± 0.39	1.14 ± 0.47
筋肉	脳	肝臓	1.35 ± 0.29	1.30 ± 0.30	0.80 ± 0.23
筋肉	脳	腎臓	1.17 ± 0.26	1.20 ± 0.42	1.22 ± 0.40
筋肉	脳	肺	1.09 ± 0.29	1.21 ± 0.54	1.20 ± 0.77
筋肉	胃	胃	1.04 ± 0.28	0.99 ± 0.24	0.96 ± 0.33
筋肉	胃	胚膜	1.19 ± 0.33	1.04 ± 0.36	1.21 ± 0.84
筋肉	胃	肝臓	1.06 ± 0.32	1.03 ± 0.35	0.87 ± 0.34
筋肉	胃	腎臓	1.18 ± 0.32	0.92 ± 0.27	1.45 ± 1.13
筋肉	胃	肺	1.33 ± 0.49	1.06 ± 0.45	1.20 ± 0.45
筋肉	胚膜	胚膜	1.21 ± 0.19	1.03 ± 0.85	1.21 ± 0.61
筋肉	胚膜	肝臓	1.27 ± 0.40	0.96 ± 0.55	0.76 ± 0.11
筋肉	胚膜	腎臓	1.08 ± 0.41	1.58 ± 1.23	1.29 ± 0.79
筋肉	胚膜	肺	1.02 ± 0.35	1.30 ± 0.68	1.09 ± 0.40
筋肉	肝臓	肝臓	1.22 ± 0.43	0.77 ± 0.26	0.75 ± 0.20
筋肉	肝臓	腎臓	1.10 ± 0.29	0.90 ± 0.30	1.29 ± 0.70
筋肉	肝臓	肺	1.22 ± 0.36	0.76 ± 0.17	1.09 ± 0.50
筋肉	腎臓	腎臓	1.06 ± 0.41	1.32 ± 0.62	1.5 ± 0.7
筋肉	腎臓	肺	1.14 ± 0.32	1.30 ± 0.67	1.33 ± 0.68
筋肉	肺	肺	1.13 ± 0.30	1.24 ± 0.46	1.17 ± 0.61

[0054] 表1に示すように、筋肉細胞を、様々な細胞種の上清を添加した培地で培養することによって、増殖を促進することができるようになる。特に、

(1) 腸細胞と、肝臓細胞、腎臓細胞、心臓細胞、脳細胞および肺細胞から

なる群から選ばれる細胞、

(2) 皮膚細胞と、腎臓細胞、脳細胞、腸細胞、および肝臓細胞からなる群から選ばれる細胞、

(3) 脳細胞と、肝臓細胞または胃細胞

(4) 心臓細胞と、腎臓細胞または肝臓細胞

(5) 胚膜細胞と肝臓細胞

(6) 肝臓細胞と肺細胞

(7) 胃細胞と肺細胞

からなる群から選ばれる組み合わせの細胞と共培養するか、または、皮膚細胞、脳細胞、心臓細胞、胚膜細胞、および肝臓細胞からなる群から選ばれる1種の細胞と共培養すると、筋肉細胞の増殖が顕著に促進された。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明によって、筋肉由来の細胞の培養方法および筋肉由来の細胞を含む培養装置を提供できる。

請求の範囲

- [請求項1] 筋肉由来の細胞と、
 皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
 胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
 および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞とを、
 共培養する工程を備えることを特徴とする細胞培養方法。
- [請求項2] 筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、
 皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
 胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
 および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第
 2の培養容器とが接続された培養装置において、
 第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地を環流させる工程を
 含む、細胞培養方法。
- [請求項3] 筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、
 皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
 胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
 および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第
 2の培養容器と、
 皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
 胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
 および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第
 3の培養容器と、が接続された培養装置において、
 第1～第3の培養容器の間で培地を環流させる工程を含む、請求項
 2に記載の細胞培養方法。
- [請求項4] 筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、
 皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
 胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
 および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第

2 の培養容器と、

皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器と、が接続された培養装置において、

第1の培養容器と第2の培養容器の間で培地を連通させる工程と、
第1の培養容器と第3の培養容器の間で培地を連通させる工程と、を含む、請求項2に記載の細胞培養方法。

[請求項5]

筋肉由来の細胞を含む第1の培養容器と、

皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第2の培養容器とを含み、

第1の培養容器と第2の培養容器との間で培地が環流するように接続されている、細胞培養装置。

[請求項6]

皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器とをさらに含み、

第1～第3の培養容器の間で培地が環流するように接続されている、請求項5に記載の細胞培養装置。

[請求項7]

皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞を含む第3の培養容器とをさらに含み、

第1の培養容器と第2の培養容器の間で培地が連通し、第1の培養容器と第3の培養容器の間で培地が連通するように接続されている、請求項5に記載の細胞培養装置。

- [請求項8] 筋肉由来の細胞と、
皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、
胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、
および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種以上の細胞とを共培
養する、培養系。
- [請求項9] 筋肉由来の細胞を、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細
胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞
、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種
以上の細胞を培養して得られた培養上清の存在下で培養する工程を含
む、細胞培養方法。
- [請求項10] 前記培養上清は、さらに、筋肉由来の細胞を培養して得られた培養
上清を含む、請求項 9 に記載の培養方法。
- [請求項11] 前記培養が共培養である、請求項 9 または 10 に記載の培養方法。
- [請求項12] 筋肉由来の細胞を、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細
胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞
、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選ばれる一種
以上の細胞を培養して得られた培養上清の存在下で培養する、培養系
。
- [請求項13] 前記培養上清は、さらに、筋肉由来の細胞を培養して得られた培養
上清を含む、請求項 12 に記載の培養方法。
- [請求項14] 前記培養が共培養である、請求項 12 または 13 に記載の培養方法
。