

## 明 細 書

発明の名称：炎症性疾患を処置するための細胞培養物

### 技術分野

[0001] 本発明は炎症性疾患を処置するための、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物、当該細胞培養物の製造方法、当該細胞培養物を製造するためのキット、および当該細胞培養物を用いた炎症性疾患の処置方法等に関する。

### 背景技術

[0002] 近年、損傷した組織などの修復のために、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、心筋梗塞など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細胞など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例として、細胞をシート状に成形したシート状細胞培養物が開発されており、その一部は臨床応用の段階に入っている。そのような応用の例としては、例えば、内視鏡的粘膜下層剥離術後穿孔等を予防するために、施術箇所の外側に貼付して使用されるシート状細胞培養物（特許文献1）や、分泌されるアディポネクチンにより心臓疾患の患者における心機能を改善する、脂肪細胞を含有するシート状細胞培養物（特許文献2）などがある。

[0004] 炎症性腸疾患は主にクローン病、潰瘍性大腸炎からなる、発症の原因が明確に判明していない難病であり、現在、わが国においては両疾患併せて22万人を超える患者が存在するとされている。これらの疾患の治療方法としては、現在、ステロイド剤、免疫抑制剤、抗TNF- $\alpha$ 抗体製剤等の投与などが行われている。

炎症性腸疾患の新たな治療法として、組織分化や血管新生、免疫機能の調節など様々な作用を有する間葉系幹細胞を投与する方法が提案されている。例えば、間葉系幹細胞または脂肪幹細胞を腸炎や慢性関節リウマチの動物モ

デルに静注またはリンパ系内投与する方法（特許文献3～5）、間葉系幹細胞の培養上清を腸炎のラットモデルに腸注または静注する方法（特許文献6および7）、遺伝子導入した間葉系幹細胞により末梢免疫反応を調節する方法（特許文献8）などが知られている。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：特願2018-140977  
特許文献2：特許第5661048号公報  
特許文献3：特開2017-35094  
特許文献4：特願2009-7321  
特許文献5：特許第6512759号公報  
特許文献6：特開2017-137268  
特許文献7：特許第6132459号公報  
特許文献8：特開2019-6790

### 非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Haraguchi et al., Stem Cells Transl Med. 2012 Feb;1(2):136-41

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は炎症性疾患を処置するための、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物、当該細胞培養物の製造方法、当該細胞培養物を製造するためのキット、および当該細胞培養物を用いた炎症性疾患の処置方法などの提供を目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の治療においては、投与対象に適合する間葉系幹細胞を薬剤として投与可能なレベルの量で培養することが困難であること、間葉系幹細胞を静脈注射またはリンパ系内投与をした際に、所望

の部位における生着が不十分であること、などといった課題が残存している。

本発明者らは、骨格筋由来の細胞を含むシートの培養上清に、マイオカイン等の炎症性腸疾患の治療に有益な成分が含まれていることを見出し、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。

[0009] すなわち、本発明は以下に関する。

[1] 炎症性疾患を処置するための、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物。

[2] 細胞培養物が、シート状細胞培養物である、[1]に記載の細胞培養物。

[3] マイオカインを分泌する、[1]または[2]に記載の細胞培養物。

[4] 炎症性疾患が、下部消化管において生じている炎症性疾患である、[1]～[3]のいずれか1つに記載の細胞培養物。

[5] 炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、[1]～[4]のいずれか1つに記載の細胞培養物。

[6] 消化管の漿膜側に移植するための、[1]～[5]のいずれか1つに記載の細胞培養物。

[7] [2]～[6]のいずれか1つに記載のシート状細胞培養物を製造する方法であって、

基材上に細胞を播種すること、

播種した細胞をシート化すること、および

形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離すること

を含む、前記方法。

[0010] [8] [1]～[6]のいずれか1つに記載の細胞培養物を製造するためのキットであって、細胞、ならびに該細胞を培養するための培地および基材を含む、前記キット。

[9] 炎症性疾患を処置するための方法であって、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物を移植することを含む、前記方法。

[10] 細胞培養物が、シート状細胞培養物である、[9]に記載の方法。

〔１１〕細胞培養物がマイオカインを分泌する、〔９〕または〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕炎症性疾患が、下部消化管において生じている炎症性疾患である、〔９〕～〔１１〕のいずれか１つに記載の方法。

〔１３〕炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、〔９〕～〔１２〕のいずれか１つに記載の方法。

〔１４〕細胞培養物の移植が、消化管の漿膜側への移植である、〔９〕～〔１３〕のいずれか１つに記載の方法。

### 発明の効果

〔００１１〕 本発明によれば、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物を移植することにより、炎症性疾患の治癒を促進することができる。

### 図面の簡単な説明

〔００１２〕〔図１〕図１は、Bio-Plex（商標）マルチシステムを用いて測定した、ヒト骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物の培養上清中に含まれる各種サイトカインの量を示す。

〔図２〕図２は、マウス大腸炎モデルにおける移植試験の計画を示す。Ａ群は経過観察群を、Ｂ群は試験群を指す。両群において試験開始日から４日目まで２％ＤＳＳ（デキストラン硫酸ナトリウム）の自由飲水が実施された。図中の細い矢印は、シート状細胞培養物の移植を実施した日を指し、太い矢印は、剖検した日を指す。

〔図３〕図３は、試験開始後３１日目の剖検により、シート状細胞培養物移植群のマウスと偽手術群のマウスからそれぞれ回収した組織の写真である。（Ａ）は、シート状細胞培養物移植群のマウスから取り出した下部消化管の写真であり、（Ｂ）は、その下部消化管を切り開いて確認した消化管内膜の写真である。（Ｃ）は、偽手術群のマウスから取り出した下部消化管の写真であり、（Ｄ）は、その下部消化管を切り開いて確認した消化管内膜の写真である。

〔図４Ａ〕図４は、試験開始後３１日目の剖検により得られた、シート状細胞培

養物移植群のマウスと偽手術群のマウスの結腸組織の画像を示す。図4 Aは、試験開始後31日目に剖検したシート状細胞培養物移植群のマウスの結腸組織の断面の画像である。

[図4B]図4 Bは、図4 Aにおいて破線で囲んだ部分の拡大像である。

[図4C]図4 Cは、試験開始後31日目に剖検した偽手術群のマウスの結腸組織の断面の画像である。

[図4D]図4 Dは、図4 Cにおいて破線で囲んだ部分の拡大像である。

[0013] [図5]図5は、シート状細胞培養物移植群と偽手術群の体重の変化を示したグラフである。四角が偽手術群を、黒丸がシート状細胞培養物移植群を示す。縦軸はマウスの体重を示し、横軸は試験の経過日数を示す。試験開始後11日目においてシート状細胞培養物の移植が実施された。

[図6]図6は、シート状細胞培養物移植群と偽手術群の試験開始後11日目の各々のマウスの体重を基準とした体重変化を示したグラフである。四角が偽手術群を、黒丸がシート状細胞培養物移植群を示す。縦軸は基準からの体重変化を示し、横軸は試験の経過日数を示す。

[図7]図7は、シート状細胞培養物移植群と偽手術群のマウスにおける炎症スコアを表したグラフである。縦軸は炎症スコア(DAI)の値を示し、横の項目軸はスコアを測定した日を示す。四角が偽手術群を、黒丸がシート状細胞培養物移植群を示す。

### 発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の一側面は、炎症性疾患を処置するための、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物に関する。

本発明において、炎症性疾患とは、炎症の症状を特徴とする疾患である。炎症性疾患の例としては、以下に限定されるものではないが、アレルギーまたは免疫複合体疾患などの全身または局所の炎症疾患、クローン病、潰瘍性、急性または虚血性の大腸炎、腸管ベーチェット病、憩室炎または胆嚢炎などの胃腸管系疾患、皮膚炎などの皮膚関連疾患、心内膜炎、心筋炎などの心

血管系疾患、喘息、結核、気管支拡張症または慢性閉鎖性疾患（COPD）などの呼吸器系疾患、リウマチ性関節炎、骨髄炎、筋膜炎などの結合組織関連疾患、腎炎などの泌尿生殖系疾患、髄膜炎、脳炎または多発性硬化症などの神経系関連疾患、ウイルス、真菌または微生物などの感染による疾患、甲状腺炎などの自己免疫性疾患、およびがんなどが挙げられる。

一態様において、炎症性疾患は、特に炎症性サイトカインの異常な放出に由来するものを指す。好ましくは、本発明における炎症性疾患は、炎症性腸疾患を指す。

[0015] 本発明において「細胞培養物」は、細胞培養ステップを経て得られる組成物を指す。一態様において、本発明の細胞培養物は、シート状細胞培養物である。本発明において「シート状細胞培養物」は、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子など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、電気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層など）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。

[0016] 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

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（PVD F）製の膜等が知られているが、本開示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、本開示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。

[0017] 本発明において、細胞培養物は骨格筋由来の細胞を含む。本発明において、骨格筋由来の細胞とは、衛星細胞、骨格筋芽細胞、骨格筋細胞、骨格筋管および骨格筋線維を指す。好ましくは、骨格筋由来の細胞とは、骨格筋芽細胞である。本発明の細胞培養物を構成する細胞は、骨格筋由来の細胞を、50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上含み、好ましくは60%以上含む。

[0018] 骨格筋芽細胞は当該技術分野においてよく知られており、骨格筋から任意の既知の方法（例えば、特開2007-89442号公報記載の方法など）により調製することもできるし、例えば、ロンザジャパン株式会社のカタログ番号：CC-2580、コスモ・バイオ株式会社の商品コード3520など、商業的に入手することもできる。骨格筋芽細胞は、これらに限定されるものではないが、CD56、 $\alpha$ 7インテグリン、ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖II d（IIx）、MyoD、Myf5、Myf6、ミオゲニン、デスミン、PAX3などのマーカーにより同定することができる。一態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性である。一態様において、骨格筋芽細胞はCD56陽性およびデスミン陽性である。

[0019] 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。本発明に係る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においてよく知られており、TE-7（例えば、Rosendaal et al., J Cell Sci. 1994; 107(Pt1): 29-37、Goodpaster et al. J Histochem Cytochem. 2008; 56(4): 347-358など参照）などのマーカーにより同定することができる。

一態様において、本発明の細胞培養物を構成する細胞は、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。

[0020] 本発明の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するため、好ましくない。したがって一態様において、本発明の細胞培養物の製造において用いられる細胞集団は、TE-7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。

本発明の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、かかる細胞は少ないほど好ましい。したがってCD56陽性率およびTE-7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%以上などであり得、好ましくは90%以上である。

[0021] 本発明において、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物からは、サイトカインが分泌される。

本発明において、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物から分泌されるサイトカインは、一般的にマイオカインと称されるものであり、これらに限定されるものではないが、例えば、IL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、エオタキシン、FGF-basic、G-CSF、GM-CSF、IFN-g、IP-10、MCP-1(MCAF)、MIP-1a、PDGF-bb、MIP-1b、RA

NTES、TNF- $\alpha$ 、HGF-1、SDF-1、およびVEGFなどが挙げられる。

[0022] 本発明の細胞培養物がシート状細胞培養物である場合に、シート状細胞培養物の厚みは特に限定されていない。シート状細胞培養物として単層のシートを用いる場合、その厚みは通常細胞1個分以上の厚みを有し、シート状細胞培養物のシートを形成する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、 $30\mu\text{m}$ 以上の厚みを有し、好ましい一態様において、 $50\mu\text{m}$ 以上の厚みを有する。本発明のシート状細胞物の値の範囲としては、例えば $30\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、好ましくは $50\mu\text{m}\sim 150\mu\text{m}$ 、より好ましくは $60\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 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 $\times$ 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枚重ねたシートを用いる場合、その厚みは $150\mu\text{m}$ 以上の厚みを有し、好ましい一態様において、 $250\mu\text{m}$ 以上の厚みを有する。その場合におけるシート状細胞物の値の範囲としては、例えば $150\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $250\mu\text{m}\sim 750\mu\text{m}$ 、より好ましくは $300\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ が挙げられる。

[0023] 細胞培養物を構成する細胞は、細胞培養物による処置に供する任意の生物に由来することができ、かかる生物は、これらに限定されるものではないが、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、モルモットなど）、ウサギなどを含む。また、細胞培養物を構成する細胞は、1種類のみであってもよいが、2種類以上の細胞を用いることもできる。本発明の好ましい態様において、細胞培養物を構成する細胞が2種類以上ある場合、最も多い細胞の含有比率（純度）は、細胞培養物製造終了時において、60%以上、好ましくは、70%以上、より好ましくは75%以上である。

[0024] 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」は、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意味する。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などが異種由来細胞に該当する。また、「同種由来細胞」は、レシピエントと同一の種の生物に由来する細胞を意味する。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、本開示においては好ましい。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総称することもある。本開示の一態様において、細胞は自家細胞または他家細胞である。本開示の一態様において、細胞は自家細胞である。本開示の別の態様において、細胞は他家細胞である。

- [0025] 本発明において、細胞培養物がシート状細胞培養物である場合に、シート状細胞培養物は、当業者に既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-081829、特開2011-110368など参照）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、基材上に細胞を播種するステップ、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。本開示の製造方法は、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。

[0026] 一態様において、本発明の細胞培養物は、細胞培養物を構成する細胞により産生された細胞外マトリックスを介して、細胞同士が接合している。一態様において、本発明の細胞培養物は、細胞外マトリックスを含む。

本発明において、細胞培養物を構成する細胞により産生された細胞外マトリックスは、種々の条件によるが、例えば、細胞の播種後、24時間以上、例えば、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、66時間、72時間、培養することにより生じる。

細胞外マトリックスは、細胞培養物が移植部位に接着することに寄与し、細胞培養物を移植する際に、例えば縫合などの、移植部位に細胞培養物を接着するステップを簡略化することができる。また細胞外マトリックスは細胞由来成分であるため、本発明に係る細胞培養物と共に移植に供することにおいてなんら問題はない。

[0027] 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などを含む。容器は、培養液などの液体を透過させない構造・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、細胞培養ボトルなどが挙げられる。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、計数などが可能となる。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、上記のごとき種々の材料のプレートや容器などが、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などが挙げられる。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よい。好ましい基材としては、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など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など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などの細胞接着因子などを表面にコーティングした基材などが挙げられる。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など）。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。

[0028] 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リルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリ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

ーオキソ－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などの公知のものを用いることができる（例えば、特開平２－２１１８６５、特開２００３－３３１７７参照）。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、例えば、株式会社セルシードのUpCell（登録商標）やDIC株式会社のCepalliet（登録商標））、これらを本開示の製造方法に使用することができる。

[0029] 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 $1\text{ cm}^2$ ～約 $200\text{ cm}^2$ 、約 $2\text{ cm}^2$ ～約 $100\text{ cm}^2$ 、約 $3\text{ cm}^2$ ～約 $50\text{ cm}^2$ などであってよい。例えば、基材として直径 $10\text{ cm}$ の円形の培養皿が挙げられる。この場合、面積は $56.7\text{ cm}^2$ となる。

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、基材の表面に血清成分が付着している状態を意味する。かかる状態は、限定されずに、例えば、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。

[0030] 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）などが異種血清に該当する。また、「同種血清」は、レシピエントと同一の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、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総称することもある。

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定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などが挙げられる。

[0031] 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など）、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など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。希釈濃度は、血清成分が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。

[0032] インキュベート時間も、血清成分が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。

[0033] 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、ピペットなどによる吸引や、デカンテーションなどの慣用の液体廃棄手法を用いることができる。本開示の好ましい態様においては、血清廃棄後に、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、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など）、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など）、L15、SkBM、RITC80-7など）等で行うことができる。洗浄手法としては、慣用の基材洗浄手法、例えば、限定することなく、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、廃棄する手法などを用いることができる。

[0034] 本開示において、基材を、成長因子でコートしてもよい。ここで、「成長因子」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意味し、例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）などを含む。成長因子による基材のコート手法、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0.0001μg/mL～約1μg/mL、好ましくは約0.0005μg/mL～約0.05μg/mL、より好ましくは約0.001μg/mL～約0.01μg/mLである以外は、基本的に血清と同じである。

[0035] 本開示において、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」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、クッシング症候群などの悪影響を及ぼし得るものをいう。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 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ～約 $100 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは約 $0.4 \mu\text{g/mL}$ ～約 $40 \mu\text{g/mL}$ 、より好ましくは約 $1 \mu\text{g/mL}$ ～約 $10 \mu\text{g/mL}$ である以外は、基本的に血清と同じである。

[0036] 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。

[0037] 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 $4^{\circ}\text{C}$ 以下、好ましくは約 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下、より好ましくは約 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下に保つことにより長期間保存することができる。

[0038] 一態様において、本発明は、下部消化管に生じた炎症性疾患を処置するための細胞培養物である。本発明において、下部消化管は、小腸および大腸のことを指す。ここで、小腸は空腸、回腸を含み、大腸は、虫垂、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S状結腸、直腸S上部、上部直腸、下部直腸、肛門管を含む。消化管下部に生じた炎症性疾患としては、これらに限定されないが、小腸がん、大腸がんなどの悪性腫瘍に起因する炎症、感染性腸炎、憩室炎および炎症性腸疾患などが挙げられる。

[0039] 一態様において、本発明は、炎症性腸疾患を処置するための細胞培養物である。本発明において、炎症性腸疾患とは、慢性または寛解・再燃性の腸管における炎症性疾患を指し、具体的には、潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管

ベーチェット病などを指す。

[0040] 一態様において、本発明に係る細胞培養物は、消化管の漿膜側、すなわち、消化管の外側に移植される。細胞培養物は、本発明の効果を奏する限りにおいて、炎症が生じている部位から離れて移植してもよいが、細胞培養物の全部または一部が、炎症が生じている部位に対応する、筋層を挟んだ正反対の位置に移植することが好ましい。一態様において、炎症が生じている部位に対応する位置を除く消化管の漿膜側に移植されてもよい。一態様において、細胞培養物は、細胞外マトリックスを含む。本発明の一態様において、本発明の細胞培養物は、シート状細胞培養物である。

炎症が生じている部位が複数箇所である場合、1つの細胞培養物を移植してもよいが、炎症が生じている部位の数に応じて、複数の細胞培養物をそれぞれ移植してもよい。複数の細胞培養物を移植する場合、複数の細胞培養物は、それぞれ独立して、本発明の効果を奏する限りにおいて、炎症が生じている部位から離れて移植してもよいが、全部または一部が、炎症が生じている部位に対応する、筋層を挟んだ正反対の位置に移植することが好ましい。

[0041] 本発明に係る細胞培養物を対象に移植するためには、形態は特に限定されないが、シート状細胞培養物の形態であることが好ましい。

本発明に係る細胞培養物は、マイオカインを分泌する。本発明に係る細胞培養物が、シート状細胞培養物の形態であっても、マイオカインを分泌する。また、マイオカインを分泌するシート状細胞培養物を炎症性疾患を有する対象に移植することにより、炎症性疾患を処置することができる。

特定の理論に拘束されることはないが、本発明に係る細胞培養物の炎症性疾患への作用は、本発明に係る細胞培養物から分泌されるマイオカインが、炎症を生じている部位の細胞に直接的および／または間接的に作用し、腸上皮細胞の増殖効果、抗炎症効果、および抗アポトーシス効果を奏することによるものと考えられる。また、本発明に係る細胞培養物が細胞外マトリックスを含んでいる場合には、細胞培養物の移植部位への生着性が高くなり、細胞培養物から分泌されるマイオカインは、より多く産生されることで、炎症

を生じている部位の細胞に効率的に作用すると考えられる。

- [0042] 本発明の別の側面は、基材上に細胞を播種すること、播種した細胞をシート化すること、形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離することを含む、炎症性疾患を処置するための、骨格筋由来の細胞を含むシート状細胞培養物を製造する方法に関する。

シート状細胞培養物は、上記の基材上に細胞を播種すること、播種した細胞をシート化すること、形成されたシート状細胞培養物を基材から剥離することを含む、既知の任意の方法で製造することができる。

- [0043] 本発明において、シート状細胞培養物は、上述のとおり、当業者に既知の任意の方法（例えば、特許文献1、特開2010-081829、特開2011-110368など参照）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、基材上に細胞を播種するステップ、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。

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。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など、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] 一態様において、播種は、約 $7.1 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $7.3 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $2.8 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $7.5 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $2.5 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $7.8 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $2.3 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $8.0 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $2.0 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $8.5 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $1.8 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $9.0 \times 10^5$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $1.6 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ 、約 $1.0 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ ～約 $1.6 \times 10^6$ 個/ $\text{cm}^2$ などの密度で行うことができる。

- [0045] 本発明のまた別の側面は、細胞培養物を製造するための細胞、該細胞を培養するための培地および基材を含む、上記の炎症性疾患を処置するための、

骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物などを製造するためのキットに関する。

本発明におけるキットは、これらに限定されるものではないが、例えば、洗浄液、緩衝液、チューブ、細胞培養に使用する器具、輸送容器、使用方法に関する指示などをさらに含んでもよい。

細胞培養に使用する器具としては、例えば、ピペット、セルストレーナー、セルスクレーパーなどが挙げられる。使用方法に関する指示としては、例えば、使用説明書、製造方法や使用方法に関する情報を記録した媒体、例えば、フレキシブルディスク、CD、DVD、ブルーレイディスク、メモリーカード、USBメモリーなどが挙げられる。

[0046] 本発明のさらに別の側面は、炎症性疾患を処置するための方法であって、骨格筋由来の細胞を含む細胞培養物を移植することを含む方法に関する。一態様において、本発明に係る細胞培養物を、炎症性疾患における炎症を抑えるために、炎症が生じている部位またはその周辺に移植することができる。本発明に係る細胞培養物を構成する細胞は、骨格筋由来の細胞を、50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上含み、好ましくは60%以上含む。本発明の一態様において、細胞培養物は、シート状細胞培養物である。

一態様において、炎症性疾患の処置は、下部消化管において生じている炎症性疾患の処置である。一態様において、炎症性疾患の処置は、炎症性腸疾患の処置である。

一態様において、本発明に係る細胞培養物は、漿膜側、すなわち、消化管の外側に移植される。細胞培養物は、本発明の効果を奏する限りにおいて、炎症が生じている部位から離れて移植してもよいが、細胞培養物の全部または一部が、炎症が生じている部位に対応する、筋層を挟んだ正反対の位置に移植することが好ましい。一態様において、炎症が生じている部位に対応する位置を除く消化管の漿膜側に移植されてもよい。一態様において、細胞培養物は、細胞外マトリックスを含む。本発明の一態様において、本発明の細胞培養物は、シート状細胞培養物である。

炎症が生じている部位が複数箇所である場合、1つの細胞培養物を移植してもよいが、炎症が生じている部位の数に応じて、複数の細胞培養物をそれぞれ移植してもよい。複数の細胞培養物を移植する場合、複数の細胞培養物は、それぞれ独立して、本発明の効果を奏する限りにおいて、炎症が生じている部位から離れて移植してもよいが、全部または一部が、炎症が生じている部位に対応する、筋層を挟んだ正反対の位置に移植することが好ましい。

[0047] 一態様において、本発明に係る細胞培養物がシート状細胞培養物である場合に、シート状細胞培養物は、移植の際に、フィブリンゲルなどの生体分解性ゲルによる支持層を有していてもよい。支持層の形成は、これに限定されるものではないが、例えばシート状細胞培養物上にフィブリノーゲン液を滴下し、その後トロンビン液を噴霧することによりフィブリンゲル層を形成する方法（特許6495603号公報参照）などが挙げられる。

## 実施例

[0048] 例1. ヒト骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物の培養上清の分析

### (1) シート状細胞培養物の作成

凍結保存されたヒト骨格筋芽細胞（ヒト骨格筋試料由来）を37℃で解凍し、0.5%血清アルブミンを含む緩衝液を用いて2回洗浄した。5×10<sup>6</sup>～5×10<sup>7</sup>個の細胞を20%血清含有培地に懸濁し、フラスコに播種した後、2～3日間培養した。

UpCell（登録商標）（3.5cmディッシュまたは24穴マルチウェル、株式会社セルシード）に、培養表面が全て覆われる程度の20%血清含有培地を添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境で3時間～3日間処理した。処理後、添加した培地は廃棄した。

培養した細胞を回収し、20%血清含有培地に懸濁し、処理済みUpCell（登録商標）に2～20×10<sup>5</sup>個/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境で約1日間、シート化培養を行った。

### (2) 分泌サイトカインのアッセイ

Bio-Plex（商標）Assay Kits（BIO-RAD製）を用いて、製造元の指示に従い

、（１）で作製したシート状細胞培養物の培養上清を、２７種類のサイトカインについて分析した。

（３）結果

結果を図１に示す。ヒト骨格筋芽細胞を含むシート状細胞培養物の培養上清中には、VEGF、IL-6、IL-8、RANTES、G-CSF、IL-12、IL-10、IP-10などが分泌されていた。

[0049] 例２．マウス大腸炎モデルにおける移植試験

（１）シート状細胞培養物の作製

１８週齢のC57BL/6マウス（日本チャールス・リバー株式会社）の下肢から骨格筋を採取し、コラゲナーゼおよびトリプシンを含む溶液で処理し、単一の細胞に分散させた。かかる細胞を３７℃、５％CO<sub>2</sub>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、細胞を回収した。回収した細胞を、４８穴の温度応答性培養容器（UpCell（登録商標））に１×１０<sup>6</sup>個播種し、２０％FBS含有DMEM/F12培地で６時間以上培養し、シート化培養を行った。その後、温度を２０℃まで下げることで、シート状細胞培養物を温度応答性培養容器から剥離させ、回収した。

[0050] （２）試験方法

試験を、以下の方法に従って実施した。マウスの群構成および剖検ならびに移植時期の計画を図２に示す。

大腸炎の誘導のために、７週齢のC57BL/6マウス（日本チャールス・リバー株式会社）に、２％デキストラン硫酸ナトリウム（DSS、株式会社エムピーバイオジャパン）を４日間自由飲水で経口投与した。マウスをランダムに経過観察群と、試験群に分けた。経過観察群については、自由飲水開始から数えて４日目、１０日目、１７日目および３１日目に剖検し、組織の状態を調べた（以下、日数の数え方はすべて同様に自由飲水開始を基準にする）。試験群については、さらにシート状細胞培養物移植群と偽手術群とに分けた。シート状細胞培養物移植群は、１１日目に全身麻酔下で開腹し、

大腸の炎症が生じている消化管の漿膜側へ（１）で作製したシート状細胞培養物を移植した。偽手術群には、シート状細胞培養物を移植することなく、全身麻酔下で開腹手術のみ実施した。シート状細胞培養物移植群および偽手術群のマウスを３１日目に剖検し、組織の状態を調べた。また、両群のマウスから下部消化管を回収し、大腸の長さを測定した。さらに、下部消化管から結腸組織を回収し、結腸組織を、ヘマトキシリン・エオジン染色により染色し、組織染色像を得た。

また、上記の組織学的実験に加えて、シート状細胞培養物の移植群ならびに偽手術群について、試験開始後３日目、９日目、１６日目および２３日目に、体重の変化、便の性状、および血便の程度を観察し、以下の表１に従って炎症スコア（ＤＡＩ）を算出した。合計１２点満点であり、数値が高いほど炎症の程度が重度であることを示す。

[表1]

表１、炎症スコア

| スコア | 体重減    | 便性状 | 血便 |
|-----|--------|-----|----|
| 0   | 1%未満   | 正常  | 正常 |
| 1   | 1～5%   |     |    |
| 2   | 5～10%  | 軟便  | 少量 |
| 3   | 10～20% |     |    |
| 4   | 20%以上  | 水様便 | 多量 |

[0051] （３）結果

シート状細胞培養物移植群のマウスから回収した下部消化管の写真を図３（Ａ）に、その下部消化管を切り開いて確認した消化管内膜の写真を図３（Ｂ）に示し、偽手術群のマウスから取り出した下部消化管の写真を図３（Ｃ）に、その下部消化管を切り開いて確認した消化管内膜の写真を図３（Ｄ）に示す。シート状細胞培養物移植群のマウスの大腸の長さは、７３ｍｍであり、偽手術群のマウスの大腸の長さは、６７±５ｍｍであった。

３１日目に剖検されたシート状細胞培養物移植群のマウスおよび偽手術群

のマウスから得られた組織染色像のうち、シート状細胞培養物移植群のマウスから得た組織染色像を図 4 A に示し、その破線部分の拡大像を図 4 B に示す。また偽手術群のマウスから得た組織染色像を図 4 C に示し、その破線部分の拡大像を図 4 D に示す。

4 日目、10 日目、17 日目および 31 日目に剖検した経過観察群のマウス、ならびに 31 日目に剖検したシート状細胞培養物移植群および偽移植群のマウスの組織の病理組織学的評価を以下の表 2 に示す。

表 2. 各群のマウスの組織の病理組織学的評価

[表2]

|       |         | 経過観察群  |    |    |    |        |    |    |    |        |    |    |    |        |    |    |    | 移植群    |    |    |    |        |    |    |    |        |    |    |    | 偽移植群   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|---------|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|       |         | Day 4  |    |    |    | Day 10 |    |    |    | Day 17 |    |    |    | Day 31 |    |    |    | Day 31 |    |    |    | Day 31 |    |    |    | Day 31 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |         | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  | 1      | 2  | 3  | 4  |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 経過    | 炎症      | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 | 炎症     | 炎症 | 炎症 | 炎症 |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 大腸    | 浮腫      | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | びらん     | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 潰瘍      | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | リンパ球浸潤  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 好中球浸潤   | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 巨噬細胞浸潤  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 腸生体組織壊死 | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 炎症スコア   | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 炎症スコア   | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 炎症スコア   | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  | +  | +      | +  | +  |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 炎症スコア |         | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS 処置 |    |    |    | DSS    |    |    |    |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

31 日目に剖検した偽移植群のマウスの大腸において、びらん、潰瘍、リンパ球浸潤および好中球浸潤が確認されたが、31 日目に剖検したシート状細胞培養物移植群のマウスの大腸においては、異常は確認されなかった。

シート状細胞培養群のマウスおよび偽手術群のマウスの体重変化について、図 5 に示す。さらに試験開始後 11 日目以降の、シート状細胞培養物移植群と偽手術群の各群のマウスの試験開始後 11 日目の体重を基準とした体重変化を図 6 に示す。四角が偽手術群のマウスを、黒丸がシート状細胞培養物移植群のマウスを示す。シート状細胞培養物移植群のマウスにおいて、シート状細胞培養物の移植後、偽手術群のマウスと比べて体重の著しい増加がみられた。

[0052] シート状細胞培養物移植群および偽手術群についての炎症スコア (D A I

）を図 7 に示す。四角が偽手術群を、黒丸がシート状細胞培養物移植群を示す。偽手術群においては、開腹手術後である 16 日目および 23 日目においてもスコアは高い状態であった。これに対し、シート状細胞培養物移植群においては、驚くべきことに、開腹手術後である 16 日目のスコアは 0 であり、23 日目においても、0 であった。