

明 細 書

発明の名称：

肝臓由来の細胞の培養方法および肝臓由来の細胞を含む培養系

技術分野

[0001] 本発明は、肝臓由来の細胞の培養方法および肝臓由来の細胞を含む培養系に関する。

背景技術

[0002] 従来、肝細胞は、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞などから製造したフィーダー細胞と培養され（特開２００９－１８３２９９；特開２０１０－１４８３８６；特表２００７－５１６７０６）、それにより、肝細胞がスフェロイドを形成したり（特開２０１０－１４８３８６）、フィーダー細胞が肝細胞に、細胞内マトリックス、および肝臓細胞の増殖および拡大培養のための成長因子のような拡散可能な因子を提供したりすることが知られていた（例えば、特許文献３参照）。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、肝臓由来の細胞の培養方法および肝臓由来の細胞を含む培養系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、肝臓由来の細胞の培養方法であって、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養する、培養方法である。頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞が共培養されてもよい。

[0005] 本発明の他の実施態様は、肝臓由来の細胞の培養方法であって、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞

胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清は、さらに、肝臓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。

[0006] 本発明のさらなる実施態様は、胚膜由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞と、腸由来の細胞、肺由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞とを共培養する、培養方法である。

[0007] 本発明のさらなる実施態様は、胚膜由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、腸由来の細胞、肺由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、胚膜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。

[0008] 本発明のさらなる実施態様は、肺由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞と、腸由来の細胞、胚膜由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞とを共培養する、培養方法である。

[0009] 本発明のさらなる実施態様は、肺由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、腸由来の細胞、胚膜由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、肺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、腎臓由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞と、胚膜由来の細胞および肺由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞とを共培養する、培養方法である。

[0011] 本発明のさらなる実施態様は、腎臓由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、胚膜由来の細胞および肺由来の

細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、腎臓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。

[0012] 本発明のさらなる実施態様は、腸由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞と、共培養する、培養方法である。肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が共培養されてもよい。

[0013] 本発明のさらなる実施態様は、腸由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清は、さらに、腸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。

[0014] 本発明のさらなる実施態様は、頭部由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞と、共培養する、培養方法である。腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が共培養されてもよい。

[0015] 本発明のさらなる実施態様は、頭部由来の細胞の培養方法であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。前記培養上清は、さらに、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清は、さらに、頭部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。

[0016] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、肝臓由来の細胞、および腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から

選択される一つ以上の細胞、を共培養する培養系である。さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞が共培養されてもよい。

[0017] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、並びに腸由来の細胞、肺由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を共培養する、培養系である。

[0018] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、肺由来の細胞、肝臓由来の細胞、並びに腸由来の細胞、胚膜由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を共培養する、培養系である。

[0019] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、腎臓由来の細胞、肝臓由来の細胞、並びに胚膜由来の細胞および肺由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を共培養する培養系である。

[0020] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、腸由来の細胞と、肝臓由来の細胞と、を共培養する培養系である。さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が共培養されてもよい。

[0021] 本発明のさらなる実施態様は、細胞の培養系であって、頭部由来の細胞と、肝臓由来の細胞と、を共培養する培養系である。さらに、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞が共培養されてもよい。

[0022] 本発明のさらなる実施態様は、肝臓由来の細胞の培養系であって、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清を含む、培養系である。前記培養上清が、さらに頭部由来の細胞および／または腎臓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。前記培養上清は、さらに、肝臓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。

- [0023] 本発明のさらなる実施態様は、胚膜由来の細胞の培養系であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、腸由来の細胞、肺由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清を含む、培養系である。前記培養上清は、さらに、胚膜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。
- [0024] 本発明のさらなる実施態様は、肺由来の細胞の培養系であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、腸由来の細胞、胚膜由来の細胞、腎臓由来の細胞、および頭部由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清を含む、培養系である。前記培養上清は、さらに、肺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。
- [0025] 本発明のさらなる実施態様は、腎臓由来の細胞の培養系であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清と、胚膜由来の細胞および肺由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清を含む、培養系である。前記培養上清は、さらに、腎臓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。
- [0026] 本発明のさらなる実施態様は、腸由来の細胞の培養系であって、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清を含む、培養系である。前記培養上清は、さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。前記培養上清は、さらに、腸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。
- [0027] 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。

[0028] ==関連文献とのクロスリファレンス==

本出願は、2022年1月7日付で出願した日本国特願2022-001828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

[0029] [図1]図1は、増殖させる対象の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

[0030] 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。

[0031] [1] 培養方法

<肝臓由来の細胞の培養方法>

本発明の一実施形態の肝臓由来の細胞の培養方法は、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養する、培養方法である。さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養してもよい。

[0032] 本発明の他の実施形態の肝臓由来の細胞の培養方法は、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養し

て得られた培養上清であってもよい。培養上清は、いずれの場合も、さらに肝臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0033] <頭部由来の細胞の培養方法>

本発明の一実施形態の頭部由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞と共培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞と共培養する、培養方法である。

[0034] 本発明の他の実施形態の頭部由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞の培養上清および胚膜由来の細胞の培養上清を含むか、または肝臓由来の細胞の培養上清および肺由来の細胞の培養上清と共培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、いずれの場合も、さらに頭部由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0035] <腸由来の細胞培養方法>

本発明の一実施形態の腸由来の細胞培養方法は、肝臓由来の細胞と共培養する、培養方法である。さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養してもよい。

[0036] 本発明の他の実施形態の腸由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、さらに、肺由来の細胞の培養上清、胚膜由来の細胞の培養上清、頭部由来の細胞の培養上清、および腎臓由来の細胞の培養上清からなる群から選択される一つ以上の培養上清を含んでもよい。培養上清は、いずれの場合も、さらに腸由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0037] <腎臓由来の細胞の培養方法>

本発明の一実施形態の腎臓由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞と共培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞と共培養する、培養方法である。

[0038] 本発明の他の実施形態の腎臓由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞の培養上清および胚膜由来の細胞の培養上清を含むか、または肝臓由来の細胞

の培養上清および肺由来の細胞の培養上清を含む培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、いずれの場合も、さらに腎臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0039] <肺由来の細胞の培養方法>

本発明の一実施形態の肺由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、と共培養する、培養方法である。

[0040] 本発明の他の実施形態の腎臓由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞の培養上清、並びに頭部由来の細胞の培養上清、腎臓由来の細胞の培養上清、肺由来の細胞の培養上清、および胚膜由来の細胞の培養上清からなる群から選択される一つ以上の培養上清を含む培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、いずれの場合も、さらに肺由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0041] <胚膜由来の細胞の培養方法>

本発明の一実施形態の胚膜由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および腸由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、と共培養する、培養方法である。

[0042] 本発明の他の実施形態の胚膜由来の細胞の培養方法は、肝臓由来の細胞の培養上清、並びに頭部由来の細胞の培養上清、腎臓由来の細胞の培養上清、肺由来の細胞の培養上清、および肺由来の細胞の培養上清からなる群から選択される一つ以上の培養上清を含む培養上清の存在下で培養する、培養方法である。培養上清は、いずれの場合も、さらに胚膜由来の細胞を共培養して得られた培養上清であってもよい。

[0043] [2] 培養系

<肝臓由来の細胞の培養系>

本発明の一実施形態の肝臓由来の細胞の培養系は、肝臓由来の細胞を、腸

由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養する培養系である。さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養してもよい。

[0044] 本発明の他の実施形態の肝臓由来の細胞の培養系は、肝臓由来の細胞を、腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。培養上清は、さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。培養上清は、いずれの場合も、さらに肝臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0045] <頭部由来の細胞の培養系>

本発明の一実施形態の頭部由来の細胞の培養系は、頭部由来の細胞を、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞と共培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞と共培養する培養系である。

[0046] 本発明の他の実施形態の頭部由来の細胞の培養系は、頭部由来の細胞を、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞を培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、いずれの場合も、さらに頭部由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0047] <腸由来の培養系>

本発明の一実施形態の腸由来の細胞の培養系は、腸由来の細胞を、肝臓由来の細胞と共培養する培養系である。さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、および腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養してもよい。

[0048] 本発明の他の実施形態の腸由来の細胞の培養系は、腸由来の細胞を、肝臓由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、さらに、肺由来の細胞、胚膜由来の細胞、頭部由来の細胞、お

よび腎臓由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られた培養上清を含んでもよい。培養上清は、いずれの場合も、さらに腸由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0049] <腎臓由来の細胞の培養系>

本発明の一実施形態の腎臓由来の細胞の培養系は、腎臓由来の細胞を、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞と共培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞と共培養する培養系である。

[0050] 本発明の他の実施形態の腎臓由来の細胞の培養系は、腎臓由来の細胞を、肝臓由来の細胞および胚膜由来の細胞を培養するか、または肝臓由来の細胞および肺由来の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、いずれの場合も、さらに腎臓由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0051] <肺由来の細胞の培養系>

本発明の一実施形態の肺由来の細胞の培養系は、肺由来の細胞を、肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、と共培養する培養系である。

[0052] 本発明の他の実施形態の肺由来の細胞の培養系は、肺由来の細胞を、肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、を培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、いずれの場合も、さらに肺由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0053] <胚膜由来の細胞の培養系>

本発明の一実施形態の胚膜由来の細胞の培養系は、胚膜由来の細胞を、肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、と共培養する培養系である。

[0054] 本発明の他の実施形態の胚膜由来の細胞の培養系は、胚膜由来の細胞を、

肝臓由来の細胞、並びに頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、および肺由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、と共培養して得られる培養上清の存在下で培養する培養系である。培養上清は、いずれの場合も、さらに胚膜由来の細胞を共培養して得られた培養上清を含んでもよい。

[0055] <具体的な培養系>

培養系とは、細胞培養容器を含む培養装置、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。培養装置に、新鮮な細胞培養用培地を供給する培地供給容器や、培養済みの細胞培養用培地を回収する培地回収容器などを設けてもよい。細胞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。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。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。

[0056] 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、各培養容器の間で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、増殖対象の細胞の培養容器を含め、一部またはすべての培養容器を環状に結合させてもよい。あるいは、増殖対象の細胞の培養容器を、共培養する細胞の培養容器各々と独立に結合させてもよい。

[0057] 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。

[0058] 培養容器同士を結合させる連通管としてのチューブには、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、培養容器間のチューブに、ポンプを設けて、培地をいずれかの方向に流してもよい。

[0059] 例えば、培養容器が2つの場合、1本のチューブで結合してもよく、2本またはそれ以上のチューブで結合してもよい。複数のチューブで培養容器を結合することで、培地を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、適切な培養系を形成することができる。

[0060] 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。

[0061] 具体的な細胞の調製方法および培養方法は、以下に説明する。

[0062] [3] 具体的な細胞の調製方法と培養方法

<細胞の由来>

各細胞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、肝臓由来の細胞、頭部由来の細胞、腎臓由来の細胞、肺由来の細胞、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、ヒツジ、ヤギ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。

[0063] <細胞の種類と調製方法>

肝臓由来の細胞、頭部由来の細胞、腸由来の細胞、腎臓由来の細胞、および肺由来の細胞は、動物胚から、肝臓、頭部（首より上部であって、首は含んでも含まなくてもよい。）、腸、腎臓、および肺をそれぞれ取り出し、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・破碎や、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。

[0064] 肝臓由来の細胞は、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。

[0065] 頭部由来の細胞は、網膜細胞、神経細胞、グリア細胞、下垂体細胞、筋細胞、結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管外皮細胞、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。

[0066] 腸由来の細胞は、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。

[0067] 腎臓由来の細胞は、子球体を構成する上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、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。

- [0068] 肺由来の細胞は、肺泡大食細胞、II型肺泡上皮細胞、I型肺泡上皮細胞、基底細胞、繊毛細胞、杯細胞、粘液細胞、漿液細胞、結合組織細胞、筋細胞、線維芽細胞、血管内皮／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。
- [0069] 胚膜由来の細胞は、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。
- [0070] 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。
- [0071] 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。
- [0072] <具体的な細胞培養方法>
- 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。
- [0073] 共培養する場合は、複数の種類の細胞を混合して培養してもよいが、培養容器を各細胞用の区画に分け、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。あるいは、各細胞に対して個別の容器を準備し、それらの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、容器同士を結合させてもよい。あるいは、各細胞に対して個別の容器を準備し、培地が連通できるように容器を結合させるが、それらの容器の間で培地が連通する期間と、培地が連通せず各容器内でとどまっている期間があるように培地の流れを制御してもよい。
- [0074] 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／ $\sim 1 \times 10^7$ 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、各培養容器の間で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。

[0075] <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。

[0076] 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、7

4 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。

[0077] 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 6 1 を培養容器 1 0 1 から回収容器 9 0 の方向のみ開き、弁 6 3 及び弁 7 0 を培地容器 4 0 0 から培養容器 1 0 1 の方向のみを開くことで、培養細胞 4 1 のみを培養した培養上清が得られる。あるいは、弁 6 1 ～ 6 3 及び弁 7 0 を培地が循環するような方向のみ開くことで、培養細胞 4 1 ～ 4 3 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 7 1 を開放し、弁 6 3 を容器 1 0 3 から回収容器 9 0 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 7 1 を閉じ、弁 7 3 及び弁 7 4 を開放し、弁 6 1 ～ 6 3 を培地が循環するような方向のみ開き、弁 7 0 を培地容器 4 0 0 から容器 1 0 1 の方向にのみ開くことで、培養容器 1 0 1 ～ 1 0 3 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 1 0 1 ～ 1 0 3 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。

[0078] こうして、目的に合った上清を回収容器 9 0 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 9 0 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 9 0 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

[0079] [実施例 1]

<細胞の調製方法>

各組織から、以下のようにして細胞を調製した。

まず、ニワトリ有精卵を孵卵し、12 日胚から、胚膜と尿症膜と卵黄膜の混合膜（本明細書では 3 M i x と称する）、頭部、肝臓、腎臓、肺、腸をそれぞれ回収し、コラゲナーゼによる化学的処理、またはメッシュ（100 μ

m) を用いた物理的処理によって組織を単一細胞に分散した。

[0080] 回収した細胞は500mlの培養ボトル(BioCell:CESCO社)に 1×10^8 個播種し、2週間培養を行った。培地にはFBS(牛胎児血清)を10%添加したDMEMを用いた。

[0081] <細胞の培養方法>

(1) 各細胞の組み合わせの培養上清の調製

上記培地を用いて、細胞を500mlの培養ボトルに 1×10^8 個以上の細胞を播種し、BioNOCIIMatリックス(CESCO Bioengineering社)を用いて、37℃、5%CO₂存在下で培養を行った。培養開始2週間後、それぞれの培養上清を回収し、遠心して細胞残渣などの沈殿を除去し、得られた培養上清を以下の培養に用いた。

[0082] (2) 培養

増殖を調べる対象の細胞を、細胞足場とともに細胞培養用プラスチックディッシュにそれぞれ 5×10^5 個/ml以上の密度で播種し、10日間、37℃、5%CO₂存在下で培養した。培養開始時に使用する培地は食品用基礎培地を用い、(1)で得られた他の細胞種の培養上清を50%添加した。培養0～6日までは、2日に一回、培地を50%交換した。培養6～10日までは、培地を毎日50%交換した。なお、培地交換には、培養上清を含まない上記培地を用いた。培養10日後に細胞を回収して、細胞数を計測し、播種したときの細胞数を1とした時の数値を算出し、結果を表1の結果Iに記載した。なお、それぞれ3個のシャーレを用いて実験を行い、表1には、その平均値を記載した。また、単独で培養したときの増殖率を1とした時の増殖率を算出し、結果を表1の結果IIに記載した。

[0083]

[表1]

	培養細胞	上清		結果	
				I	I I
1	肝臓	—	—	0.3	1.0
2		3Mix	—	1.0	3.3
3		肺	—	1.0	3.3
4		腎臓	—	0.3	1.0
5		腸	—	0.5	1.7
6		頭部	—	0.3	1.0
7		3Mix	肺	1.9	6.3
8		3Mix	腎臓	1.3	4.3
9		3Mix	腸	0.8	2.7
10		3Mix	頭部	2.1	7.0
11		肺	腎臓	2.3	7.7
12		肺	腸	1.8	6.0
13		肺	頭部	18.0	60.0
14		腎臓	腸	1.3	4.3
15		腎臓	頭部	0.4	1.3
16		腸	頭部	0.9	3.0
17	3Mix	—	—	1.9	1.0
18		肝臓	—	1.7	0.9
19		肝臓	肺	3.0	1.6
20		肝臓	腎臓	2.4	1.3
21		肝臓	腸	3.0	1.6
22		肝臓	頭部	2.9	1.5
23	肺	—	—	1.4	1.0
24		肝臓	—	1.4	1.0
25		肝臓	3Mix	2.2	1.6
26		肝臓	腎臓	3.7	2.6
27		肝臓	腸	8.3	5.9
28		肝臓	頭部	2.3	1.6
29	腎臓	—	—	1.0	1.0
30		肝臓	—	0.4	0.4
31		肝臓	3Mix	2.5	2.5
32		肝臓	肺	3.7	3.7
33		肝臓	腸	0.3	0.3
34		肝臓	頭部	0.6	0.6
35	腸	—	—	2.2	1.0
36		肝臓	—	3.6	1.6
37		肝臓	3Mix	8.5	3.0
38		肝臓	肺	8.3	3.8
39		肝臓	腎臓	7.2	3.3
40		肝臓	頭部	5.9	2.7
41	頭部	—	—	0.4	1.0
42		肝臓	—	0.3	0.8
43		肝臓	3Mix	1.7	4.3
44		肝臓	肺	2.3	5.8
45		肝臓	腎臓	0.4	1.0
46		肝臓	腸	0.6	1.5

[0084] <結果分析>

各細胞を単独で培養した時と比較し、他の細胞の培養上清を培地に添加した場合に、増殖が促進する場合、結果 11 における数値が 1.0 より大きくなる。肝臓の細胞に対しては、3 M i x、肺、または腸の細胞の上清、および頭部の細胞の上清と腎臓の細胞の上清との混合上清、3 M i x の細胞に対しては、肝臓の細胞の上清と、肺、腸、腎臓または頭部の細胞の上清との混合上清、肺の細胞に対しては、肝臓の細胞の上清と、3 M i x、腸、腎臓または頭部の細胞の上清との混合上清、腎臓の細胞に対しては、肝臓の細胞の上清と、3 M i x または肺の細胞の上清との混合上清、腸の細胞に対しては、肝臓の細胞の上清、頭部の細胞に対しては、肝臓の細胞の上清、好ましくは肝臓の細胞の上清と、3 M i x、肺、または腸の細胞の上清との混合上清を用いて、細胞増殖を促進することができた。

[実施例 2]

[0085] <細胞の調製方法>

各組織から、以下のようにして細胞を調製した。

まず、ニワトリ有精卵を孵卵し、12 日胚から、3 M i x、肝臓、肺をそれぞれ回収し、ハサミまたはメッシュ (100 μ m) を用いた物理的处理によって組織を分散した。

[0086] <還流培養式の培養方法>

(1) 各細胞の組み合わせの培養上清の調製

還流培養式の培養は、ダイヤフラム式定量送液ポンプ (S I M D O S 社) を中心に、1つの500ml培地用ボトルとB i o N O C I Iマトリックス (C E S C O B i o e n g i n e e r i n g 社) を入れた3つの500ml培養用ボトルをチューブで環状に連結した培養方式で構成した。実施例1と同じ食品用基礎培地を用いて、3 M i x、肝臓、及び肺細胞を別々の培養用ボトルに 1×10^8 個で播種し、37℃、5%CO₂存在下で培養を行った。培養開始12日後、培養上清を回収し、遠心して細胞残渣などの沈殿を除去し、得られた培養上清を以下の実験に用いた。

[0087] (2) 培養

増殖を調べる対象の細胞（アヒル肝臓由来細胞）を、細胞培養用プラスチックプレートに 2×10^4 個／m l の密度で播種し、2日間、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。培養開始時に使用する培地は食品用基礎培地を用い、(1) で得られた培養上清を 50% 添加した。培養2日後目にCellTiter-Glo 2.0 Cell viability assay kit (Promega社) を用いて、細胞数の指標としてATP量を測定し、食品用培地のみで培養したときの細胞数を1とした時の数値を算出した。なお、実験1回あたり、それぞれ3ウェルを用いて実験を行い、その平均値を算出したところ、5.0～24.4の値が得られた。

このように、上清を得るための複数の細胞を共培養し、得られた上清を用いた場合でも、肝臓由来細胞を増殖させる効果がある。

産業上の利用可能性

[0088] 本発明によって、肝臓由来の細胞の培養方法および肝臓由来の細胞を含む培養系を提供できる。

請求の範囲

- [請求項1] 肝臓由来の細胞の培養方法であって、
腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞と共培養する、培養方法。
- [請求項2] さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を共培養される、請求項1に記載の培養方法。
- [請求項3] 肝臓由来の細胞の培養方法であって、
腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清の存在下で培養する、培養方法。
- [請求項4] 前記培養上清は、さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を培養して得られた培養上清を含む、請求項3に記載の培養方法。
- [請求項5] 前記培養上清は、さらに、肝臓由来の細胞を培養して得られた培養上清を含む、請求項3または4に記載の培養方法。
- [請求項6] 前記培養が共培養である、請求項3～5のいずれか1項に記載の培養方法。
- [請求項7] 前記肝臓由来の細胞が、実質細胞（肝細胞）、非実質細胞（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）、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である、請求項1～6のいずれか1項に記載の培養方法。
- [請求項8] 前記腸由来の細胞が、腸管上皮細胞、CBC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／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である、請求項1～6のいずれか1項に記載の培養方法。
- [請求項9] 前記肺由来の細胞が、肺胞大食細胞、II型肺胞上皮細胞、I型肺胞上皮細胞、基底細胞、繊毛細胞、杯細胞、粘液細胞、漿液細胞、結合

組織細胞、筋細胞、線維芽細胞、血管内皮／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である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の培養方法。

[請求項10] 前記胚膜由来の細胞が、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である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の培養方法。

[請求項11] 前記頭部由来の細胞が、網膜細胞、神経細胞、グリア細胞、下垂体細胞、筋細胞、結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮／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である、請求項 2 または 4 に記載の培養方法。

[請求項12] 前記腎臓由来の細胞が、子球体を構成する上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、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／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である、請求項 2 または 4 に記載の培養方法。

[請求項13] 無血清培地を用いて培養する、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の培養方法。

[請求項14] 細胞の培養系であって、
肝臓由来の細胞、および
腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞、
を共培養する培養系。

[請求項15] さらに、頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞が共培養される、請求項 14 に記載の培養系。

[請求項16] 肝臓由来の細胞の培養系であって、
腸由来の細胞、肺由来の細胞、および胚膜由来の細胞からなる群から選択される一つ以上の細胞を培養して得られる培養上清を含む、

培養系。

- [請求項17] 前記培養上清が、さらに頭部由来の細胞および／または腎臓由来の細胞を培養して得られた培養上清を含む、請求項16に記載の培養系。
- [請求項18] 前記培養上清は、さらに、肝臓由来の細胞を培養して得られた培養上清を含む、請求項16または17に記載の培養系。
- [請求項19] 前記培養が共培養である、請求項16～18のいずれか1項に記載の培養系。
- [請求項20] 前記肝臓由来の細胞が、実質細胞（肝細胞）、非実質細胞（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）、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である、請求項16～19のいずれか1項に記載の培養系。
- [請求項21] 前記腸由来の細胞が、腸管上皮細胞、CBC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／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である、請求項16～19のいずれか1項に記載の培養系。
- [請求項22] 前記肺由来の細胞が、肺胞大食細胞、II型肺胞上皮細胞、I型肺胞上皮細胞、基底細胞、繊毛細胞、杯細胞、粘液細胞、漿液細胞、結合組織細胞、筋細胞、線維芽細胞、血管内皮／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である、請求項16～19のいずれか1項に記載の培養系。
- [請求項23] 前記胚膜由来の細胞が、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である、請求項16～19のいずれか1項に記載の培養系。
- [請求項24] 前記頭部由来の細胞が、網膜細胞、神経細胞、グリア細胞、下垂体細胞、筋細胞、結合組織細胞、線維芽細胞、血管内皮／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

上の細胞である、請求項 17 または 19 に記載の培養系。

[請求項25] 前記腎臓由来の細胞が、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／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である、請求項 17 または 19 に記載の培養系。

[請求項26] 無血清培地を含む、請求項 16 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の培養系。