

明 細 書

発明の名称：三次元（３Ｄ）組織培養用のサポータリングバス

技術分野

[0001] 本発明は、三次元（３Ｄ）組織培養用のサポータリングバス(supporting bath)およびそれを用いる培養三次元組織の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、培養三次元組織の製造方法には、三次元細胞積層法または三次元（３Ｄ）バイオプリンティング(bio-printing)法などの様々な方法がある。三次元バイオプリンティング法は、サポータリングバスとして、粒子で構成されたチキソトロピー性(thixotropy)を有するゲルを使用することが報告されている（特許文献１）。サポータリングバスを用いる三次元バイオプリンティング法は、従来の空気中で行われる三次元バイオプリンティング法と比較して、サポータリングバスの内部に細胞を配置することによって、細胞または組織の維持または乾燥の防止に役立つ。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献１：国際公開２０１７／０４９０６６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 従来の三次元組織培養用のサポータリングバスは、粒子で構成されたチキソトロピー性を有するゲルを含む。しかしながら、粒子で構成されたゲルは、ゲルを調製すること、ゲルの特性を調節すること、またはゲルを取り除くこと等が困難である。そのため、ゲルを調製すること、ゲルの特性を調節すること、またはゲルを取り除くこと等が容易であるゲルを含むバスおよびそれを用いる培養三次元組織の製造方法が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、高分子お

よび水を含み、チキソトロピー性を有するゲルがバス中に形成されており、ゲルが溶媒に溶解可能である、三次元組織培養用のサポータリングバスを見だし、本発明を完成させるに至った。

[0006] すなわち、本発明は以下を提供する：

[1] 高分子および水を含み、チキソトロピー性を有するゲルがバス中に形成されており、ゲルが溶媒に溶解可能である、三次元組織培養用のサポータリングバス。

[2] 水と高分子の合計に対する高分子の濃度が0.01重量%以上である、[1]に記載のサポータリングバス。

[3] 高分子が多糖類である、[1]または[2]に記載のサポータリングバス。

[4] 多糖類がジェランガムである、[3]に記載のサポータリングバス。

[5] 溶媒が、ゲルを形成している水、または溶解のために追加する溶液である、[1]～[4]のいずれかに記載のサポータリングバス。

[6] (i) [1]～[5]のいずれかに記載のサポータリングバスに三次元バイオプリンティング法を用いて三次元組織前駆体を形成する工程、

(ii) サポータリングバス中のゲルを溶解させる工程、および

(iii) 得られた溶液中で三次元組織を培養する工程

を含む、培養三次元組織の製造方法。

[7] 溶媒にゲルを溶解させる、[6]に記載の製造方法。

[8] 溶媒が、ゲルを形成している水または溶解のために追加する溶液である、[7]に記載の製造方法。

[9] 溶解のために追加する溶液がトリス水溶液である、[8]に記載の製造方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、例えば、ゲルが高分子および水から調製されうるので、ゲルを容易かつ効率的に調製することができる。例えば、ゲルを高収率または低コストで調製することができる。

- [0008] 本発明によれば、ゲルが様々な種類および様々な濃度の高分子から調製されうるので、ゲルの特性を調節することができる。例えば、ゲルの粘度、透過性、耐久性、透明度または色を調節することができる。
- [0009] 本発明によれば、ゲルが溶媒に溶解可能であるので、ゲルを溶解して取り除くことができる。例えば、物理的または化学的に、ゲルを形成している水にまたは溶解のために追加する溶液に、ゲルを溶解させることができる。
- [0010] 本発明によれば、プリントゲルへのサポーターリングバスの取り込み量を減少させることができるので、培養される三次元組織へのサポーターリングバスの過剰または不必要な取り込み量を減少させることができる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]図1 (a) は、ゲルまたは溶液を含むサポーターリングバス中でのプリンティングの模式図である。図1 (b) は、プリンティング後のゲルの溶解および溶液の除去ならびに形成された三次元組織前駆体の培養の模式図である。図1 (c) は、DMEMを溶媒として使用した0.1 wt % ジェランガムがゲル状であること (左)、およびDMEMを溶媒として使用した0.1 wt % ゼラチンが液体状であること (右) を示す。図1 (d) は、0.1 wt % ジェランガムゲルのせん断速度による粘度の測定結果である。
- [図2]図2 (a) は、サポーターリングバス中のPBS 1xに溶解させた0.15 wt % ジェランガムゲル中への三次元細胞プリンティング後の写真を示す。図2 (b) は、ジェランガムゲルをTris-HCl bufferで溶解した後の写真を示す。図2 (c) は、5日間培養後の写真 (左) および細胞生存確認のためのcalcein AM (緑色蛍光、生細胞) とEthidium homodimer-1 (赤色蛍光、死細胞) で処理した後の蛍光写真 (右) を示す。
- [図3]図3は、F-GGバルクゲル (直鎖状ゲル) を用いた場合の、Tris-HClでの除去前および除去後の得られた蛍光強度 (a. u.) の結果、すなわちプリントゲルへのサポーターリングバスの取り込み量を示す。
- [図4]図4は、F-GGバルクゲル (直鎖状ゲル) を用いた場合の、回復粘度

を示す。

[図5]図5は、0.15wt%のジェランガム(GG)のバルクゲル(直鎖状ゲル)のサポータリングバスについて、ゾルーゲル転移ありの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、一実施形態において、高分子および水を含み、チキソトロピー性を有するゲルがバス中に形成されており、ゲルが溶媒に溶解可能である、三次元組織培養用のサポータリングバスを提供する。

[0013] 本発明において、チキソトロピー性は、物理的刺激、例えば圧力によって、ゲルがゾルに変わり、これを放置しておくとき再びゲルに戻る性質(ゾルーゲル転移)を有する流体特性を指す。すなわち、チキソトロピー性は、液体がずりを受ける間に粘度が低下する現象を有し、ずり応力-ずり速度曲線にヒステリシスが見られ、降伏値がある現象を有する。このようなチキソトロピー性の特徴を最もよく測定できる装置として、おもにストレス制御式レオメーターが知られている。ストレス制御レオメーターは、制御されたトルク(ずり応力)をサンプルに与え、その結果として流動が始まり回転する角変位速度(ずり速度)を測定して、ずり応力-ずり速度曲線が容易に得ることができる。これは、他の一般に用いられているB型粘度計のような回転粘度計や毛管粘度計、落球粘度計とは違い、ずり応力-ずり速度曲線における降伏値の測定が極めて正確に行うことができる。本発明において、チキソトロピー性は、例えば、ずり応力存在下および非存在下の差として、0.00001Pasから100000Pas、0.0001Pasから10000Pas、0.001Pasから1000Pas、または0.01Pasから100Pasを有してよい。

[0014] 本発明において、サポータリングバスは、室温またはそれより高温で急速ゲル化を受けることができる。サポータリングバスは、ゲル化前に液体であり、ゲル化中は固体状態を維持する。サポータリングバスは、例えば、三次元バイオプリンティング法にて用いられるディスペンサーのノズルの圧力によって液体となり、圧力が解消した後は再びゲルに戻る。あるいは、サポ-

ティングバスは、例えば、ゲル化前の液体状態において三次元バイオプリンティング法が行われ、その後ゲル化処理されてもよい。サポーティングバスは、ゲルの状態において、三次元組織前駆体を維持することができる。サポーティングバスは、例えば、細胞生存条件（例えば温度およびpH）下で維持される。サポーティングバスは、例えば、細胞成長が阻害されない条件（例えば温度およびpH）下で維持される。サポーティングバスは、ゲル化前の液体状態において、例えば0℃～10℃、特に4℃で維持される。サポーティングバスは、ゲルの状態において、例えば30℃～40℃、特に37℃で維持される。サポーティングバスは、例えばpH7.0～pH7.8、特にpH7.4で維持される。サポーティングバスは、容器中に、例えば、透明な円柱型の容器中に収容または保持されていてもよい。サポーティングバスは、無菌状態に置かれてもよい。

[0015] 本発明において、サポーティングバスは、高分子および水に加えて、例えば、三次元組織を培養するための培養成分をさらに含んでもよい。培養成分は、溶解可能な物質、例えば、タンパク質、例えば、ゼラチンで被覆されていてもよい。溶解可能な物質が溶解される条件は、サポーティングバス中のゲルが溶解される条件と同じであっても、異なってもよい。溶解可能な物質は、様々な刺激によって、例えば時間の経過によって、物理的刺激、例えば光、温度または圧力によって、または化学的刺激、例えばゲルを溶解する溶液、例えば酵素を含む溶液によって溶解され、被覆されていた成分をバスに放出することができる。例えば、溶解可能な物質は、三次元組織を培養する条件で、例えば37℃で、溶解されて、被覆されていた培養成分をバスに放出することができる。

[0016] 本発明において、サポーティングバスは、さらに、三次元組織前駆体を形成するために支持体を含んでもよい。支持体は、例えば足場（スキャフォールド）である。三次元バイオプリンティング法によって三次元組織前駆体が、支持体上に配置またはプロットされる。培養三次元組織は、三次元組織前駆体および支持体と一緒に構成されてもよい。2つ以上の支持体

が、例えば三次元組織前駆体の両末端に、配置されてもよい。

- [0017] 本発明において、ゲルは、例えばハイドロゲルである。ハイドロゲルは、ゾルーゲル転移を通して水を分散媒とする液体が固まって流動性を喪失し多孔性構造を成す物質を指す。
- [0018] 本発明において、ゲルは、親水性ポリマー鎖のネットワークを含むマトリックスである。ゲルは、ゲル材料である高分子を架橋することにより得られる。使用されるゲルは、好ましくは、細胞適合架橋反応により架橋された親水性ポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）（PEG）ベースのポリマー、最も好ましくはマルチアーム（つまり、分岐状）PEGベースのポリマーにより構成される。
- [0019] 本発明において、ゲルは、油性ゲルであってもよく、例えばハイドロゲルが挙げられる。ゲル材料（分散媒である水に分散させることによってゲルを形成する材料）である高分子は、例えば、寒天、ゼラチン、アガロース、キサンタンガム、ジェランガム、スクレロチウガム、アラビヤガム、トラガントガム、カラヤガム、セルロースガム、タマリンドガム、グアーガム、ローカストビーンガム、グルコマンナン、キトサン、カラギーナン、クインシード、ガラクトン、マンナン、デンプン、デキストリン、カードラン、カゼイン、ペクチン、コラーゲン、フィブリン、ペプチド、マトリゲル、コンドロイチン硫酸ナトリウム等のコンドロイチン硫酸塩、ヒアルロン酸（ムコ多糖類）及びヒアルロン酸ナトリウム等のヒアルロン酸塩、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、及びアルギン酸カルシウム等のアルギン酸塩、並びにこれらの誘導体等の天然高分子；メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体及びこれらの塩；ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリル酸・メタクリル酸アルキルコポリマー、等のポリ（メタ）アクリル酸類及びこれらの塩；ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート（PPEGDA、PPEGDM）、ポリヒドロキシエチ

ルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリ（N，N-ジメチルアクリルアミド）、ポリ2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリビニルピロリドン、ポリスチレンスルホン酸、ポリエチレングリコール、カルボキシビニルポリマー、アルキル変性カルボキシビニルポリマー、無水マレイン酸コポリマー、ポリアルキレンオキサイド系樹脂、ポリ（メチルビニルエーテル-*alt*-マレイン酸無水物）とポリエチレングリコールとの架橋体、ポリエチレングリコール架橋体、N-ビニルアセトアミド架橋体、アクリルアミド架橋体、デンプン・アクリル酸塩グラフトコポリマー架橋物等の合成高分子；シリコーン；相互侵入網目構造ハイドロゲル及びセミ相互侵入網目構造ハイドロゲル（DNハイドロゲル）；これらの2種以上の混合物等が挙げられる。

[0020] 本発明において、ゲル材料である高分子は、例えば、コラーゲン（例えば、I型、II型、III型、IV型、V型、及びXI型からなる群より選択される1以上）、グルコマンナン、フィブリン、アルギン酸、ポリビニルアルコール、PPEGDA、PPEGDM、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリ（N，N-ジメチルアクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、シリコーン、DNハイドロゲル、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、グリコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸）、プロテオグリカン、及びゼラチン、及びこれらの2種以上の混合物であることが好ましい。本発明において、ゲル材料である高分子は、例えば、ナノファイバー、例えばセルロースナノファイバーであってもよい。本発明において、ゲル材料である高分子は、1種単独で用いてもよく、2種以上組み合わせて用いてもよい。本発明において、ゲルは、均一または均質であってもよい。

[0021] 本発明において、ポリマーのゲルは、粒子ゲル（ゲル微粒子）であってもよく、またはバルク（直鎖状または線状）ゲルであってもよい。粒子ゲルまたはバルクゲルは、ゲルの外観形状をいう。本発明のサポーティングバスに使用されるポリマーのゲルは、好ましくはバルク（直鎖状または線状）ゲル

[0023] 本発明において、水と高分子の合計に対する高分子の濃度は、例えば、0.001重量%以上、0.005重量%以上、0.01重量%以上、0.05重量%以上、0.1重量%以上または1重量%以上である。水と高分子の合計に対する高分子の濃度は、例えば、5.0重量%以下、4.5重量%以下、4.0重量%以下、3.5重量%以下、3.0重量%以下、2.5重量%以下、または2.0重量%以下である。水と高分子の合計に対する高分子の濃度は、例えば、0.001重量%～5.0重量%、0.001重量%～4.5重量%、0.001重量%～4.0重量%、0.001重量%～3.5重量%、0.001重量%～3.0重量%、0.001重量%～2.5重量%、0.001重量%～2.0重量%、0.005重量%～5.0重量%、0.005重量%～4.5重量%、0.005重量%～4.0重量%、0.005重量%～3.5重量%、0.005重量%～3.0重量%、0.005重量%～2.5重量%、0.005重量%～2.0重量%、0.01重量%～5.0重量%、0.01重量%～4.5重量%、0.01重量%～4.0重量%、0.01重量%～3.5重量%、0.01重量%～3.0重量%、0.01重量%～2.5重量%、0.01重量%～2.0重量%、0.05重量%～5.0重量%、0.05重量%～4.5重量%、0.05重量%～4.0重量%、0.05重量%～3.5重量%、0.05重量%～3.0重量%、0.05重量%～2.5重量%、0.05重量%～2.0重量%、0.1重量%～5.0重量%、0.1重量%～4.5重量%、0.1重量%～4.0重量%、0.1重量%～3.5重量%、0.1重量%～3.0重量%、0.1重量%～2.5重量%、0.1重量%～2.0重量%、0.5重量%～5.0重量%、0.5重量%～4.5重量%、0.5重量%～4.0重量%、0.5重量%～3.5重量%、0.5重量%～3.0重量%、0.5重量%～2.5重量%、0.5重量%～2.0重量%、1重量%～5.0重量%、1重量%～4.5重量%、1重量%～4.0重量%、1重量%～3.5重量%、1重量%～3.0重量%、1重量%～2.5重量%、1重量%～2.0重量%、5重量%～5.0重量%、5重量%～4.5重量%、5重量%～4.0重量%、5重量%～3.5重量%、5重量%～3.0重量%、5重量%～2.5重量%、5重量%～2.0重量%、5重量%～1重量%である。

0重量%、0.05重量%～2.5重量%、0.05重量%～2.0重量%、0.1重量%～5.0重量%、0.1重量%～4.5重量%、0.1重量%～4.0重量%、0.1重量%～3.5重量%、0.1重量%～3.0重量%、0.1重量%～2.5重量%、または0.1重量%～2.0重量%である。

[0024] 本発明において、ゲルの種類および水と高分子の合計に対する高分子の濃度は、ゲルの特性、例えばゲル調製の収率またはコスト、ゲルの粘度、透過性、耐久性、透明度、色または溶解性、または細胞の特性、例えば細胞種、生体適合性または細胞生存性を考慮して、当業者によって適宜調節することができる。

[0025] 本発明において、ゲル材料である高分子がジェランガムである場合、水と高分子の合計に対する高分子の濃度は、通常、0.01重量%～2.0重量%、例えば、0.05重量%～1.0重量%または0.08重量%～0.5重量%、好ましくは、0.1重量%～0.2重量%、例えば、0.11重量%～0.19重量%、0.12重量%～0.18重量%、または0.13重量%～0.17重量%、より好ましくは0.14重量%～0.16重量%、例えば0.15重量%である。

[0026] 本発明において、例えば、高分子の70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または100%が、ゲルを構成することができる。

[0027] 例えば、ゲルは、三次元組織前駆体または三次元組織をゲル中に維持することができる粘度に調節することができる。例えば、ゲルは、三次元組織前駆体または三次元組織がゲル中を沈んでいかない粘度に調節することができる。例えば、ゲルの粘度は、例えばテクスチャーアナライザーを使用して測定される。ゲルの粘度は、例えば、三次元バイオプリンティング法にて用いられるディスペンサーのノズルの強度に依存して適宜、調節することができる。ゲルの粘度は、例えば、ディスペンサーのノズルが、折れない、曲がない、または変形しない粘度である。

- [0028] 例えば、ゲルは、水、栄養素および空気などを細胞に送達することができる透過性に調節することができる。
- [0029] 例えば、ゲルは、乾燥などに対して高い耐久性に調節することができる。
例えば、ゲルは、30分以上、1時間以上、1日間以上、2日間以上、3日間以上、4日間以上、5日間以上、10日間以上、15日間以上、または20日間以上、使用することができる。
- [0030] 例えば、ゲルは、ゲル中の組織を容易に観察することができるように高い透明度を有する。
- [0031] 例えば、ゲルは、細胞毒性または細胞挙動阻害性を有さないか、または細胞毒性または細胞挙動阻害性が低いゲルである。
- [0032] ゲルは、様々な刺激によって、例えば時間の経過によって、物理的刺激、例えば光、温度または圧力によって、または化学的刺激、例えばゲルを溶解する溶液、例えば酵素を含む溶液によって溶解される。ゲルは、溶媒に、例えば、ゲルを形成している水または溶解のために追加する溶液に、溶解される。例えば、ゲルは、トリス（トリスヒドロキシメチルアミノメタン）水溶液で、ゲルを形成している水である溶媒に溶解される。例えば、トリス（トリスヒドロキシメチルアミノメタン）水溶液は、約50 mMである。
- [0033] 本発明において、ゲルのポリマーは、例えば、共有結合または非共有結合の架橋反応を介して架橋されている。共有結合架橋反応は、酵素反応であってもよい。共有結合架橋反応は、穏やかな化学選択的反応であってもよい。
- [0034] 本発明において、水は、不純物を含まない、または実質的に含まない水、例えば蒸留水であってもよく、または別の成分を含む水、例えば生理食塩水または緩衝液であってもよい。緩衝液は、例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水、塩化ナトリウム溶液、リン酸溶液、水またはリン酸緩衝液である。
- [0035] 本発明において、高分子は、水に溶解されるとチキソトロピー性を有するゲルを構成することができ、その後にゲルは溶解可能である、あらゆる高分子である。高分子は、タンパク質または多糖類などであってもよい。例えば、高分子は、細胞毒性または細胞挙動阻害性を有さないか、または細胞毒性ま

たは細胞挙動阻害性が低い高分子である。多糖類は、例えばジェランガムである。

[0036] 本発明において、溶媒は、ゲルを形成している水および／または溶解のために追加する溶液である。ゲルは、時間の経過によって、または物理的刺激によって、ゲルを形成している水に溶解されうる。ゲルは、化学的刺激によって、ゲルの溶解のために追加する溶液に溶解されうる。ゲルの溶解のために追加する溶液は、例えば、細胞毒性または細胞挙動阻害性を有さないか、または細胞毒性または細胞挙動阻害性が低い緩衝液である。緩衝液は、例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水、塩化ナトリウム溶液、リン酸溶液、リン酸緩衝液またはトリス（トリスヒドロキシメチルアミノメタン）水溶液である。

[0037] 本発明において、細胞は、ヒト由来の細胞であってよく、またはヒト以外の動物由来の細胞であってもよい。動物は、例えば、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類または哺乳類である。動物は、例えば、カエル、ニワトリ、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、マウスまたはウサギである。動物は、例えば、ウシまたはヒトである。細胞は、例えば、間葉系幹細胞、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞等の由来の細胞である。細胞は、例えば、健常細胞または非健常細胞由来の細胞である。細胞は、培養細胞であってもよい。培養細胞としては、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等が挙げられる。また、細胞は、あらゆる組織由来の細胞であってよい。細胞は、例えば皮膚線維芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、筋細胞または筋芽細胞である。

[0038] 本発明において、三次元組織は、例えば、培養された細胞と細胞外マトリックスとを含む細胞の集合体である。三次元組織は、例えば、成熟された組織または臓器である。三次元組織は、さらに、血管構造を有していてもよい。三次元組織は、あらゆる組織であってよく、例えば、上皮組織、結合組織、筋組織、神経組織である。三次元組織は、例えば上皮組織、筋組織である。三次元組織は、また、あらゆる臓器であってよく、例えば、腸、胃、肝臓、脾臓、肺、心臓、脳である。三次元組織は、複数個以上、例えば、2個、

5個、10個、20個、30個、40個、50個、100個または500個以上の細胞から構成される。三次元組織は、例えば、1000個、5000個、10000個以下の細胞から構成される。三次元組織は、細胞外マトリックスを介して配置され三次元構造を形成していてもよい。

[0039] 本発明において、組織前駆体は、例えば、成熟された組織が形成される前の状態である。例えば、組織前駆体は、サポーターバス中に、三次元バイオプリンティング法を用いて形成された成熟前の細胞の集団である。

[0040] 本発明において、細胞外マトリックスは、*in vitro*細胞培養において役割を果たしうる物質または、人工的に合成された物質を含んでもよい。細胞外マトリックスは、限定はされないが、フィブロネクチン、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン及びポリリジン等を含む。細胞外マトリックスは、一種類であってもよいし、二種類以上であってもよい。細胞外マトリックスは、隣接する細胞同士の細胞間接着を形成してもよい。

[0041] 本発明は、一実施形態において、上記サポーターバスを用いる培養三次元組織の製造方法を提供する。この方法は、

(i) 上記サポーターバスに三次元バイオプリンティング法を用いて三次元組織前駆体を形成する工程、

(i i) サポーターバス中のゲルを溶解させる工程、および

(i i i) 得られた溶液中で三次元組織を培養する工程

を含む。

[0042] 本発明において、上記培養三次元組織の製造方法は、形成された三次元組織前駆体を培養して、三次元組織を製造することができる。

[0043] 上記工程(i)において、三次元バイオプリンティング法は、サポーターバスに、三次元組織前駆体を形成する細胞が配置またはプロットされるプロセスである。三次元バイオプリンティング法は、自動化または半自動化のコンピューター支援であってよく、または手動であってもよい。例えば、三次元バイオプリンティング法は、ノズルを有するディスペンサー、例えばマルチノズルディスペンサーを用いて、サポーターバスに細胞を配置ま

たはプロットする方法である。マルチノズルディスペンサーは、例えば2個、4個、8個、16個、32個の細胞を一度に配置またはプロットすることができる。ノズルによって、細胞を所定のサポーターバス位置に噴射することができる。ノズル口径は、配置またはプロットされる細胞が通過することができる大きさ以上、例えば $5\mu\text{m}$ 以上、 $10\mu\text{m}$ 以上、 $50\mu\text{m}$ 以上、 $100\mu\text{m}$ 以上、 $500\mu\text{m}$ 以上または $1000\mu\text{m}$ 以上である。ノズルの移動速度は、例えば 0.1mm/s 以上、 0.5mm/s 以上、 1mm/s 以上、 2mm/s 以上または 5mm/s 以上である。ノズルの移動速度は、例えば 20mm/s 以下、 10mm/s 以下、 5mm/s 以下、 2mm/s 以下または 1mm/s 以下である。

[0044] 上記工程(i)は、例えば $0^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ で実施される。上記工程(i)において、三次元バイオプリンティング後は、細胞が保持される温度、例えば $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、特に 37°C で維持される。上記工程(i)において、三次元組織前駆体を形成するのと同時に、三次元組織前駆体を形成保持するために三次元組織前駆体を成熟および安定化させてもよい。

[0045] 上記工程(ii)において、サポーターバス中のゲルを溶媒に溶解させることによって、サポーターバスを三次元組織から取り除くことができる。例えば、この手段は、サポーターバスを三次元組織から物理的に取り除く(例えば削る、または洗浄する)ときと比較して、より精練に、容易にかつ迅速にサポーターバスを三次元組織から取り除くことができる。例えば、この手段は、また、サポーターバスを三次元組織から物理的に取り除く(例えば削る、または洗浄する)ときと比較して、三次元組織を傷つけにくい。ゲルは、3日以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、3時間以内または1時間以内で溶媒に溶解されてよい。

[0046] 上記工程(ii)において、ゲルを溶解させた後に、溶解されたゲルを取り除く工程を含んでもよい。

[0047] 上記工程(iii)において、三次元組織を培養するための培養成分を加えてもよい。

- [0048] 上記工程 (i i i) において、三次元組織を分化誘導する工程、三次元組織を電気刺激する工程および／または細胞の生存を確認する工程をさらに含んでもよい。
- [0049] 上記工程 (i i i) は、維持、成長および／または分化に適切な条件で細胞を保持する工程を指す。条件は、例えば、細胞が保持される温度、培養成分、CO₂含有量および細胞密度を指す。条件は、例えば37℃、5%CO₂である。
- [0050] 以下に実施例を示して本発明をさらに具体的かつ詳細に説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されると解すべきではない。

実施例

[0051] 実施例 1

1. ジェランガムゲルの調製

8.9 mL Ca²⁺非含有DMEM (DMEM/Gibco/10569010) (10% FBS (FBS/Corning/35-010-CV)、1% antibiotics (Antibiotics/Nacalai/02892-54)) に10 mg ジェランガム (Gellan gum (KELCOGE L AFT)/SANSHO/-/Lot.# 4H9829A) を摂氏100度で溶解させて、0.1 wt % ジェランガム溶液を調製した。その後、1 mL FBSと100 μL antibioticsを追加した。その後、2.65 mg CaCl₂を追加した。調製されたジェランガムゲルはゲル状を示した (図1 (c) 参照)。

[0052] 2. ゼラチン溶液の調製

10 mL DMEM (10% FBS、1% antibiotics) に10 mg ゼラチンを混合後、摂氏37度で1時間にわたって溶解させて調製した。調製されたゼラチン溶液は液体を示した (図1 (c) 参照)。

[0053] 3. ジェランガムゲルのレオロジー特性の測定

チキソトロピー性を測定するために、せん断速度による粘度を測定した。レオメーター基板 (Thermo Scientific HAKKE RheoStress 6000, ThermoFisher Scientific) にジェランガムゲルを約800 μLでロードした後、初期3

0秒間は0.01/sのせん断速度で次の30秒間は100/sのせん断速度で、その後再び0.01/sのせん断速度を適用して測定した。0.1wt% ジェランガムゲルは、初期に高い粘度を持ち(約822Pa・s)、せん断力を加えると非常に低下して(約0.082Pa・s)液状になった。せん断力を除去すれば、再び増加した(約734Pa・s)(図1(d)参照)。

[0054] 実施例2

1. ジェランガムのサポータリングバスの作成

PBS 1xに0.15wt% ジェランガムを摂氏100度で溶解させた後、プリンティング容器内でゲルを形成させた。

[0055] 2. 細胞培養

皮膚線維芽細胞を付着細胞用培養フラスコで培養液(DMEM、10% FBS、1% antibiotics)を使用して培養した。培養フラスコ中の細胞がコンフルエント80%以上になると継代培養を行って細胞を増殖させた。

ヒト臍帯静脈内皮細胞は、培養液(EGM-2)を使用する以外、皮膚線維芽細胞と同様に付着細胞用培養フラスコで培養した。

[0056] 3. バイオインクの調製

皮膚線維芽細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞を培養フラスコから回収し、次のような組成を持つバイオインクを調製した。皮膚線維芽細胞: 6.6×10^5 細胞/mLおよびヒト臍帯静脈内皮細胞: 3.4×10^5 細胞/mL、コラーゲンマイクロ繊維: 1.2wt%、およびフィブリノーゲン: 5mg/mL。

[0057] 4. 細胞プリンティング

調製されたバイオインクをシリンジに挿入し、サポータリングバス中に連続的なライン形態で細胞プリンティングを実施した。プリンティングは22Gノズル(内径0.39mm、外径0.72mm)を使用され、移動速度は2mm/sであった。約450μL バイオインクを使用した(図2(a))

参照)。プリンティング後、摂氏37度で20分間インキュベートした。その後、Tris-HCl buffer (pH 7.4、50 mM) で摂氏37度1時間処理してサポータリングバス中のジェランガムゲルを溶解し(図2(b)参照)、サポータリングバス中の溶液を除去した。その後、皮膚線維芽細胞培養液およびヒト臍帯静脈内皮細胞用培養液を1:1で混合した培養液を加えて、細胞を培養した。

[0058] 5. 細胞生存能測定

7日間細胞培養後、培養液を除去し、PBS 1xで細胞を洗浄した。洗浄後、染色溶液(PBS 1x中に2 μ M Calcein AM と4 μ M Ethidium homodimer-1)で細胞を摂氏37度で15分間処理した。PBS 1xで洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡を使用して三次元組織を撮影した(図2(c)参照)。

[0059] 実施例3

1. 粒子ゲルまたはバルクゲル(直鎖状ゲル)のサポータリングバスの調製
所定濃度にPBSへ溶解したジェランガム(GG)を用いてサポートバスを作製した。1 wt %のGGを溶解後に室温まで冷却し、ホモジナイザーで6分間処理することで粒径20 μ mの粒子ゲルを得た。また、さらにソニケーション処理を行うことで粒径6 μ mの粒子ゲルを得た。さらに、オリーブ油とspan 80をGG水溶液中に分散させることでW/Oエマルションを作製し、ゲル化させることで粒径50 nmの粒子ゲルを得た。バルクゲルバスは、0.15 wt %のGG溶液を加熱後に室温へ冷却することで作製した。各サポータリングバスへフルオレセイン修飾GG(F-GG)が0.015 wt %で含まれるように調整することで、蛍光ラベル化サポータリングバスを調製した。

[0060] 2. プリントゲルへのサポータリングバスの取り込み量の確認

各蛍光ラベル化サポータリングバスに、2 wt %フィブリノーゲンと0.6 U/mlのトロンピンを含むPBS溶液をプリントし、1時間ゲル化させることで円柱状のゲルを得た。得られたプリントゲルを回収し、PBSで優

しく洗浄後に共焦点レーザー顕微鏡にて3次元的に観察することで、プリントゲルに取り込まれた蛍光GGを観察した。40 mLの50 mM Tris-HClにプリントゲルを1日浸漬させ、さらに、新鮮な40 mLの50 mM Tris-HClにプリントゲルを1日浸漬させた。また、得られたプリントゲルをトリプシンを用いて溶解し、得られた溶液の蛍光強度 (a. u.) を蛍光スペクトルにより定量した。Tris-HClでの除去前および除去後の得られた蛍光強度 (a. u.) の結果は図3に示される。粒径の増加に伴い、プリントゲルへのサポータリングバスの取り込み量は減少した。プリントゲルへのF-GGバルクゲルのサポータリングバスの取り込み量は、プリントゲルへのF-GG粒子ゲルのサポータリングバスの取り込み量より、少なかった。

[0061] 3. 回復粘度の測定

チキソトロピー性を測定するために、せん断速度による粘度を測定した。レオメーター基板 (Thermo Scientific HAKKE RheoStress 6000, ThermoFisher Scientific) にジェランガムゲルを約800 μ Lでロードした後、初期30秒間は0.01 / sのせん断速度で、次の30秒間は100 / sのせん断速度で、その後再び0.01 / sのせん断速度を適用して測定した。粒径の増加に伴い回復粘度は増加した。回復粘度は、再び0.01 / sのせん断速度を適用した後に測定された粘度である。F-GGバルクゲルは、F-GG粒子ゲルよりも、回復粘度が低い。F-GG粒子ゲルについて、回復粘度が高いほどF-GG粒子ゲルの取り込み量を低減できることを見出した。F-GGバルクゲルは、低い回復粘度に関わらず、F-GG粒子ゲルよりも、プリントゲルへのサポータリングバスの取り込み量は少なかった (図4参照)。

[0062] 実施例4

1. サポータリングバスのゾルーゲル転移の確認

0.15 wt %のジェランガム (GG) のバルクゲル (直鎖状ゲル) のサポータリングバスについて、レオメーター基板 (Thermo Scientific HAKKE R

heoStress 6000, ThermoFisher Scientific) を用いて、周波数依存的に貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率 (G'') を測定した。使用された条件は以下の通りである。

条件: $p = 2.0$ T i L (直径 20 mm、平板); $300 \mu\text{L}$; $gap = 0.5$ mm; $mode = CS$; $\tau = 10.0$ Pa; 周波数 = $0.1 \sim 10$ Hz;
 $T = 20^\circ\text{C}$

0.15 wt% の直鎖状のジェランガム (GG) のサポーターバスがゾルーゲル転移を有することが、図 5 に示される。図 5 において、緑青色線が貯蔵弾性率 (G') を示し、濃い青色線が損失弾性率 (G'') を示す。