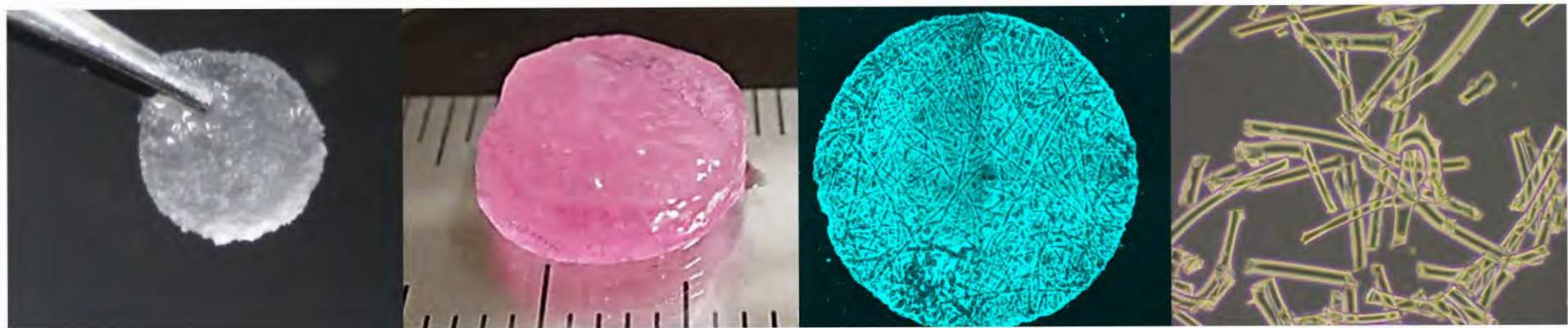


細胞培養用ゼラチン繊維基材 *Genocel*® の紹介と使用方法について



2020年3月14日
日本毛織株式会社 研究開発センター
松野 久美子 中村 耕一郎

お問い合わせ先

<製造元> 技術情報について

株式会社ニッケ・メディカル：nrdc@nikke.co.jp

<販売者> 商品のご用命

コスモ・バイオ株式会社 製品情報部：tech@cosmobio.co.jp

ご購入、お見積、用途のご相談など、
お気軽にお問い合わせください。



マスコットシープ う~るん

- 1、ニッケについて P.4
- 2、*Genocel*[®]の特長 P.10
- 3、使用例① 3次元培養 P.20
- 4、使用例② 高効率・高密度播種 P.26
- 5、使用例③ 細胞シートキャリア P.37
- 6、使用例④ 細胞シートでの動物組織再生 P.42
- 7、*Genocel*[®] パウダータイプの紹介 P.51
8. 価格表 P.56

ニッケについて



社名	日本毛織株式会社 (通称 ニッケ)
創立	1896年12月3日
本社	大阪府中央区
資本金	6,465 百万円
社員数	5,096名 (連結) 491名 (単体) (2019年11月30日現在)
売上 (2019)	126,401 百万円 (連結) 33,464 百万円 (単体)



大阪本社



印南工場 (兵庫)



マスコット う~るん

弊社は創立120年
あまりで、
売上げが連結で
1200億程度の会社
です。
ニッケ・メディカルは、
グループ会社です。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す



4つの事業部

NIKKE
Group

弊社はウールの生地
の製造を祖業とし、
現在は4つの事業を
展開しております。



Textile & Clothing
Materials



Industrial
Machinery & Materials



Human & Future
Development



Consumer
Goods & Services



人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケ グループ

ニッケの技術

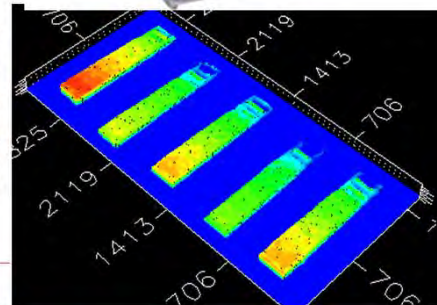
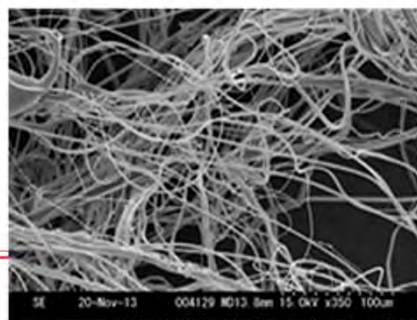
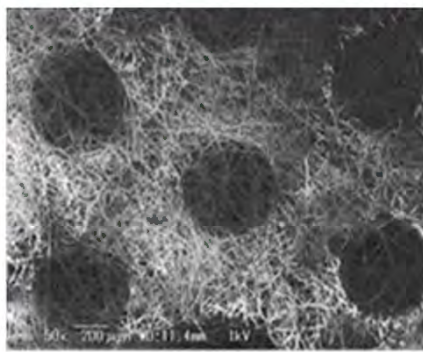
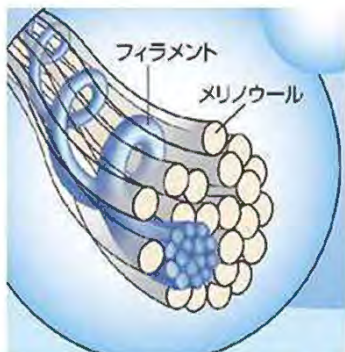


糸、織物

フェルト
不織布
ナノファイバー

フィラメント
組紐

工場装置
の設計、製造
外観検査装置



その中で多くの繊維加工技術を有しており、ライフサイエンス分野に生かすべく、開発を進めております。

ライフサイエンス分野への応用



生体適合性素材

ポリ乳酸等の合成高分子や、ゼラチン等の天然高分子など、様々な材料に対応

糸の加工

ナノ・マイクロファイバー不織布や
モノ・マルチフィラメントの紡糸

シート、チューブ構造への加工

織り・編み・不織布など、ご希望の形状にお応え
いたします

具体的には、お客様のニーズに合った素材を選定し、これを糸状に加工して、さらにシートやチューブ状の3次元形状へ加工します。

お気軽にご用命ください。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

 グループ

モノフィラメント、マルチフィラメントの作製

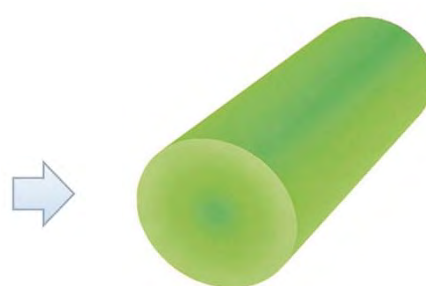
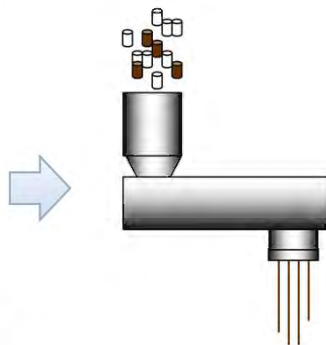


希望に応じ、特性を制御

(素材、分解期間、強度、柔軟性、クリーンルーム製造・・・etc)



合成高分子
天然高分子
生体吸収性素材
非吸収素材
・
・
・



モノフィラメント
(一本の太い糸)
剛直



マルチフィラメント
(細い糸の束)
しなやか

糸の作製においても、ご希望に応じて素材や物性を変更することができます。

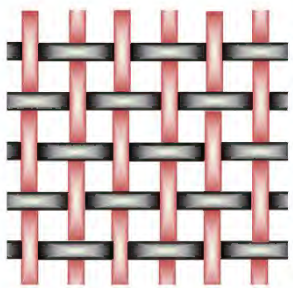

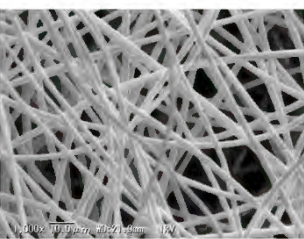
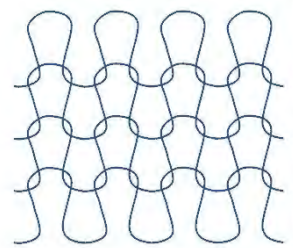
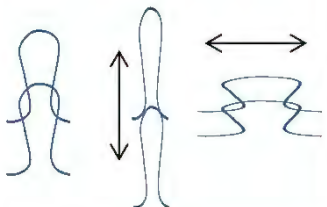

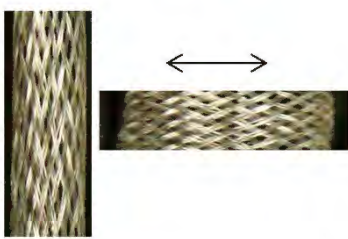
例えば、同じ素材でも、太いモノフィラメントにすれば、剛直な糸になりますし、マルチフィラメントと呼ばれる細い糸の束にすれば、しなやかな糸になります。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す



3次元形状への加工



	織物	不織布	編み	組紐
構造	 		 	 
特徴	<ul style="list-style-type: none"> • 寸法が安定 • 高強度 	<ul style="list-style-type: none"> • 高い空隙率 • 寸法安定性低 • 低強度 	<ul style="list-style-type: none"> • 伸縮性 • 低強度 	<ul style="list-style-type: none"> • 伸縮性 • 高強度
一般用途例	<ul style="list-style-type: none"> • スーツ • エアバック • 消防ホース 	<ul style="list-style-type: none"> • フィルター • マスク • 吸音断熱材 	<ul style="list-style-type: none"> • 靴下 • 下着 • ジャージ 	<ul style="list-style-type: none"> • 縫合糸 • 靴ひも • ランプの紐

さらに、糸を織物や不織布、編み、組紐といった繊維加工で、様々な特徴を出すことができます。

例えば、一般的な用途をイメージいただくと分かりやすいですが、寸法が安定している織物はスーツ、多くの隙間がある不織布はマスクやフィルター、伸縮性に富む編みは靴下、しなやかである程度の伸縮性と強度を兼ね備えている組紐は、靴紐や縫合糸などに使用されます。

Genocel® の特徴

3次元培養の重要性



生体内で、細胞は3次元的に相互作用することで、機能が発揮されています。

- 生体内で細胞は3次元的に相互作用することで、機能が発揮されている。
- 生体外で生体を模倣するには、3次元培養が1手段。

3次元培養に期待される点

- 細胞の分化促進
- 細胞機能の増強
- 移植後の定着
- より生体に近い、薬への感受性

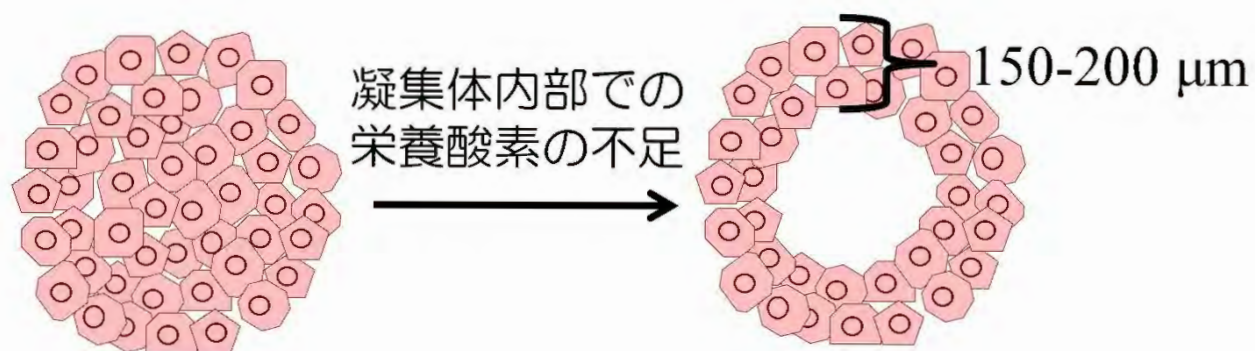
人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す



3次元培養の課題

直径200 μm 以上の細胞凝集体では、
栄養酸素の不足により、細胞死が生じる。

しかしながら、
既報のとおり、厚さが200 μm 以上の細胞凝集体では、
内部の細胞まで栄養酸素が届かず、
細胞が死ぬことが課題です。



凝集体内部で細胞死
イメージ図

参考: C. Szot et al, *Biomater.* **32** (2011)

ゼラチンハイドロゲルの利点



- 医療機器、医薬品添加物としての長い実績
- 優れた生体適合性
- 架橋度で分解期間を調整可能。

細胞が産生するプロテアーゼで分解が進行。

- **ハイドロゲルの水相を介した、栄養酸素の透過**
- **細胞凝集体に含めることで、細胞生存率、機能が向上**

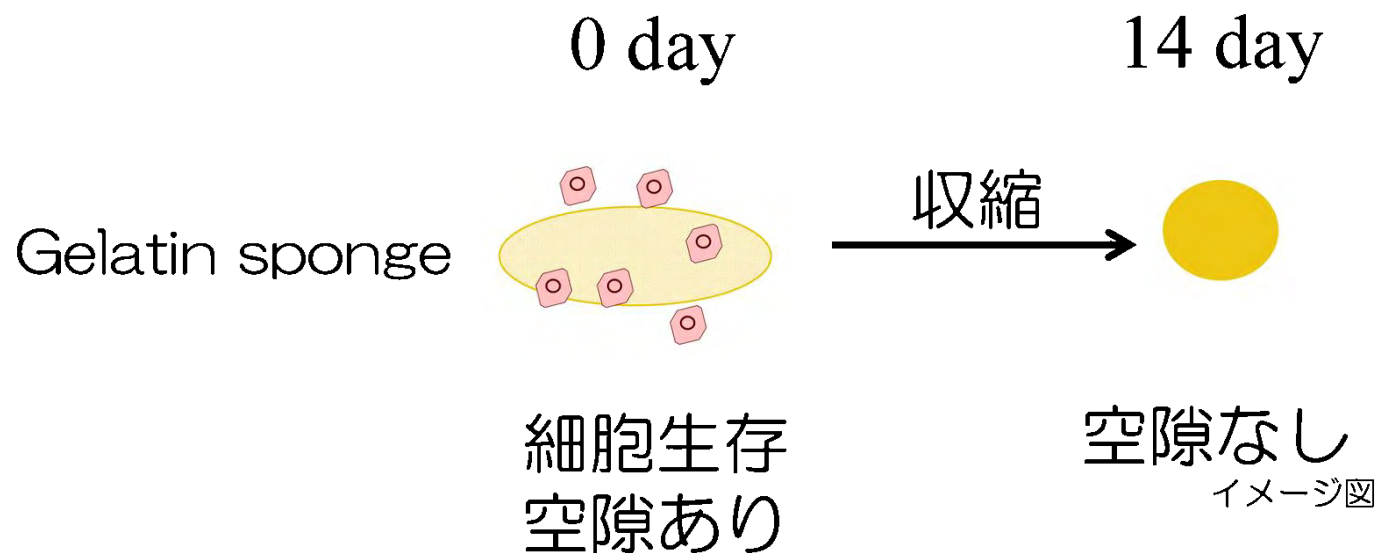
参考： S. Tajima et al, *Tissue Eng. Regen. Med.* 7 (2013)

T. Matsuo et al, *Sci. rep.* 5:16842 (2015)

ゼラチンハイドロゲルは、優れた生体適合性をはじめとした優れた長所があります。さらには、ゼラチンハイドロゲルの粒子を細胞凝集体に加えると、細胞凝集体内部でも細胞が生存する報告があります。

ゼラチンハイドロゲルの欠点

- 足場材として、強度が不十分
- 培養中に変形し、細胞が生存する空隙がなくなる。



参考: X. Liu et al, *Biomater.* 30(2009)

一方、短所もあります。
ゼラチンハイドロゲルを足場として用いると、単体では強度が弱く、
細胞培養中に、細胞が生存する空隙がなくなることが課題です。

Genocel[®] の特徴



Gelatin Nonwoven for Cell Culture Substratum



弊社が開発したゼラチンハイドロゲルの不織布Genocelは、ゼラチン単体から構成され、特殊な内部構造を有しています。架橋剤なしで、ゼラチンと水のみで構成されているにも関わらず、培養中に変形しないことが特徴です。

- **ゼラチンと水のみ**から構成される特殊な内部構造をもつ不織布
- 優れた力学物性により、**湿潤状態でハンドリングでき、培養中に変形しない。**

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケ グループ

Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE CO., LTD. All Rights Reserved.

15

優れた変形回復性

圧縮
ひずみ

0%



70%



圧縮後、瞬時に形状回復した。
繰り返し圧縮しても、力学特性を維持した。

この写真は、70%ひずみまで圧縮し、戻した際のゼラチン不織布の変形挙動を示しています。変形後に速やかに元の形に戻り、優れた変形回復性を示します。

優れた透明性



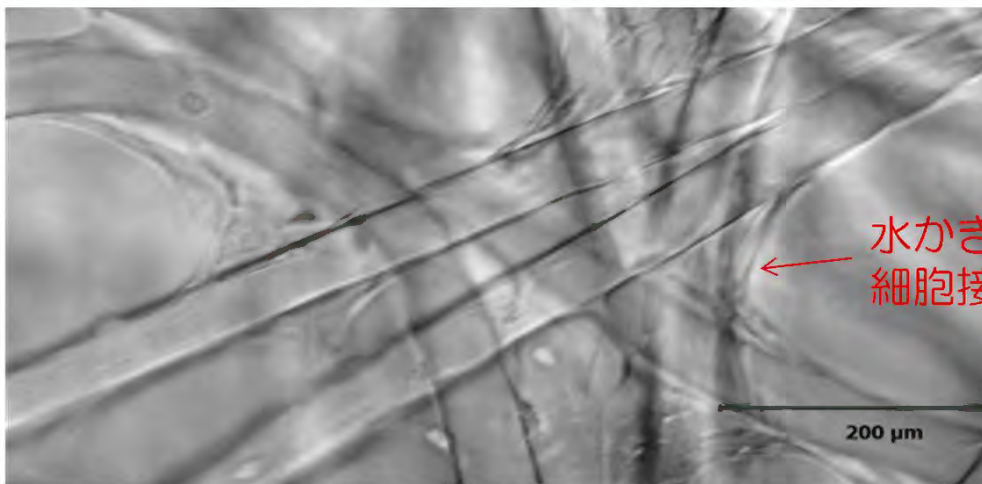
Genocel[®] (厚さ:1.7 mm)



Collagen sponge



Polymer scaffold



さらにGenocelは、水に濡れると透明性をもつことが特徴です。ゼラチンスポンジやナノファイバーの足場材は、不透明です。Genocelでは、顕微鏡の明視野観察が可能です。細胞は、ゼラチン繊維の交点に水かき状に接着することが多いです。

優れた膨潤挙動



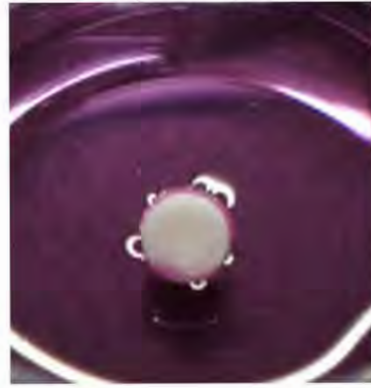
膨潤開始8秒後の写真

Genocel®

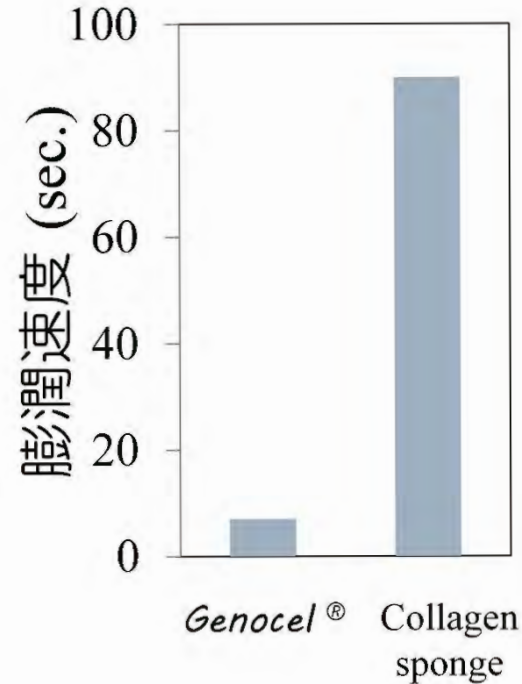


膨潤完了

Collagen sponge



膨潤途中



膨潤速度が速いことも特徴です。
一般的なコラーゲンスポンジと比較し、10倍以上膨潤が速いです。
Genocel内部への、細胞や酸素、栄養の良好な浸透が期待できます。

Genocel®は、培養液中で速やかに膨潤した

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す



製品ラインナップ

NIKKE
Group

Genocel® シートタイプ

サイズ : φ5 mm、φ8 mm

用途例 : **細胞シートキャリア**
(P.37から紹介)

3次元培養

単層培養

両面培養



膨潤前

膨潤後

Genocel® ブロックタイプ

サイズ : φ4 mm x 0.7 mm
→φ6 mm x 1.6 mm

用途例 : **3次元培養**(次ページから紹介)



膨潤前

膨潤後

Genocel® パウダータイプ

用途例 : **細胞凝集体、細胞シートの作製** (P.51から紹介)

Genocelのラインナップです。現在、3つのタイプを展開しています。

シートタイプは薄いゼラチン不織布で、細胞シートのキャリアや単層培養、両面培養、3次元培養に適しています。

細胞シートキャリアの用途例は、37ページから紹介しておりますのでご覧ください。

ブロックタイプは厚みのあるゼラチン不織布で、3次元培養に適しております。次ページから紹介しております。

もう一つのパウダータイプは、ゼラチン短繊維です。

細胞凝集体、細胞シートの作製に適しており、51ページから紹介しております。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケ グループ

Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE CO., LTD. All Rights Reserved.

使用例①

ブロックタイプを用いた3次元培養

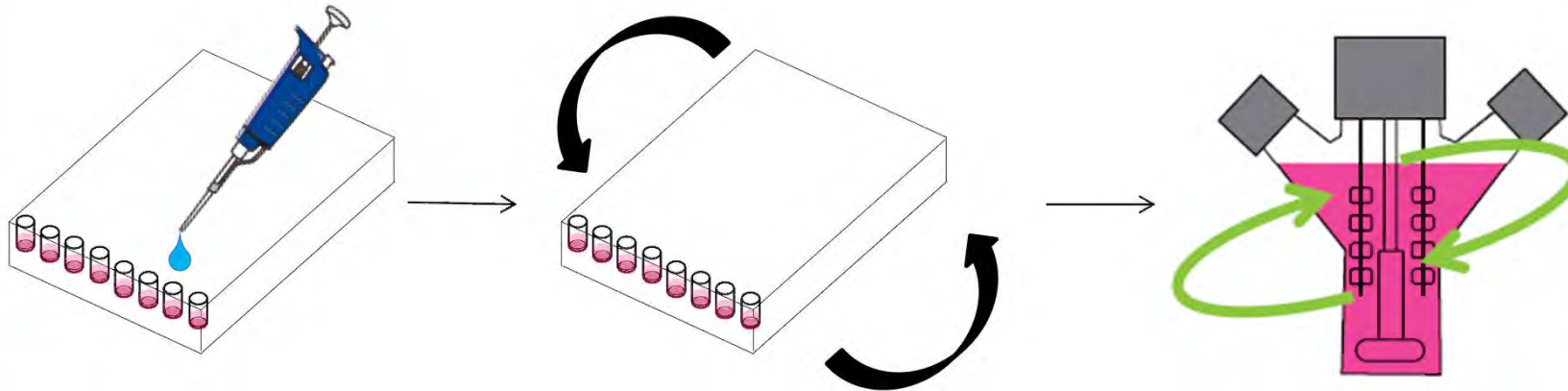
Genocel® を用いた3次元培養



細胞懸濁液を滴下
hMSC 2.0×10^6 cells/ml 200 μ l

振盪
(300rpm)

攪拌培養
(70rpm)



三次元培養の実験例についてご紹介いたします。
Genocelブロックタイプを96ウェルプレートに置き、細胞懸濁液を滴下した後、振盪しました。
振盪により、Genocel内部まで均一に播種することができます。
プレートからGenocelを取り出し、注射針にて固定した後、スピナーフラスコを用いた攪拌培養を行いました。

八七地味に「アセロ」の「カ」が「正」来「ル」ノ「ロ」相「ツ」

攪拌培養の様子



播種直後

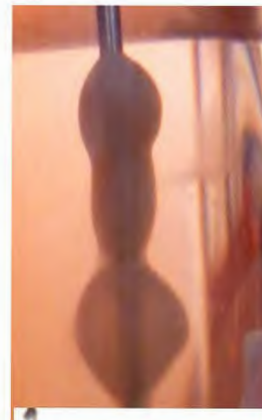
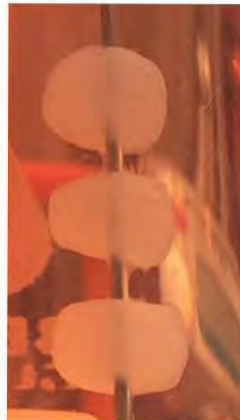
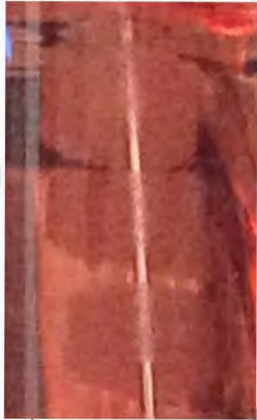
7 day

14 day

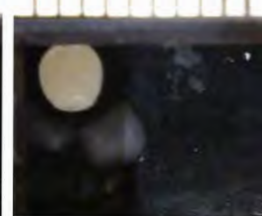
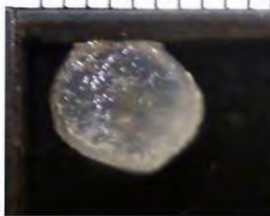
25 day

35 day

培養中



回収後



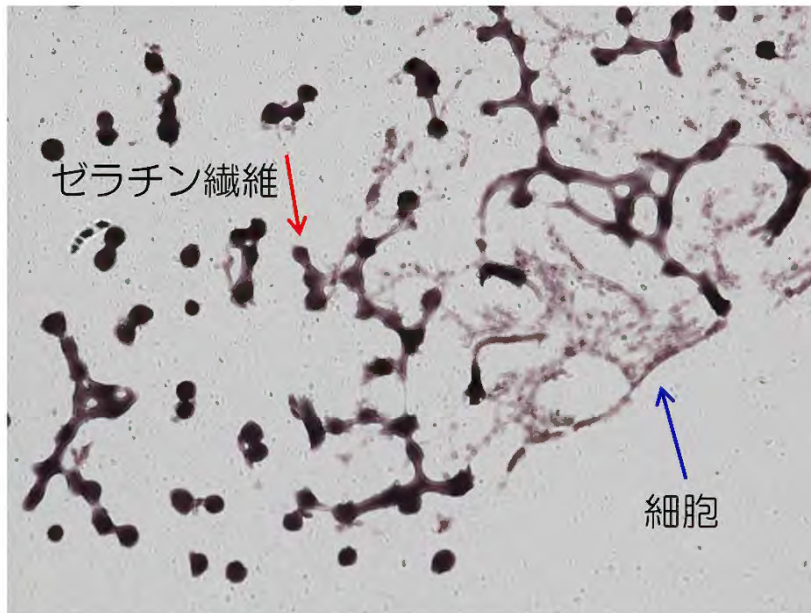
- 培養に伴い、透明性が低下し、足場の形状が変化した。
- 長期培養後、*Genocel*®を足場として、細胞凝集体が形成され、それらが結合してより大きな細胞凝集体を形成した。

攪拌培養した *Genocel* の経時変化を示しています。時間経過に伴い、*Genocel* 内で細胞が凝集体を形成すると同時に、足場の形状が変化していることが分かります。

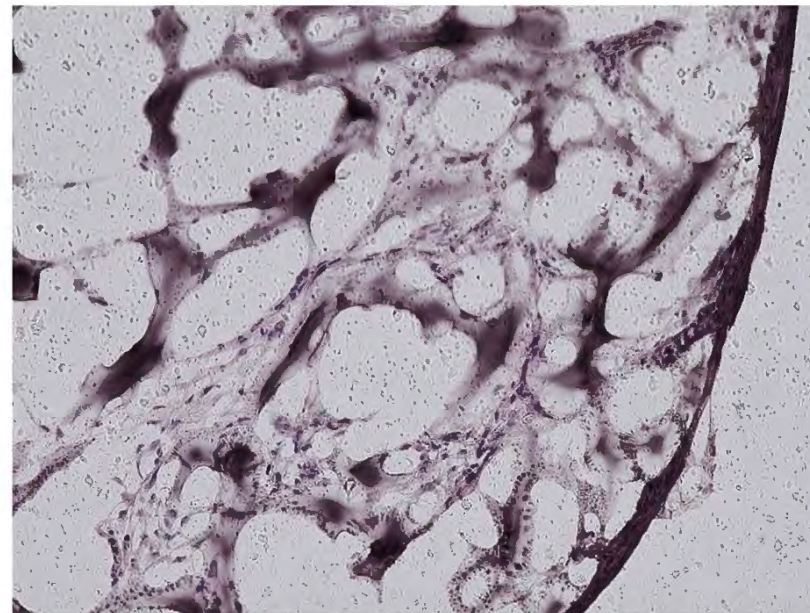
Genocel® 内部の細胞増殖挙動

NIKKE
Group

Day 7
(HE x10)



Day 14
(HE x20)



- 増殖した細胞により、繊維間の空隙が満たされた。
- 培養14日以降に、ゼラチン繊維が徐々に消失した。

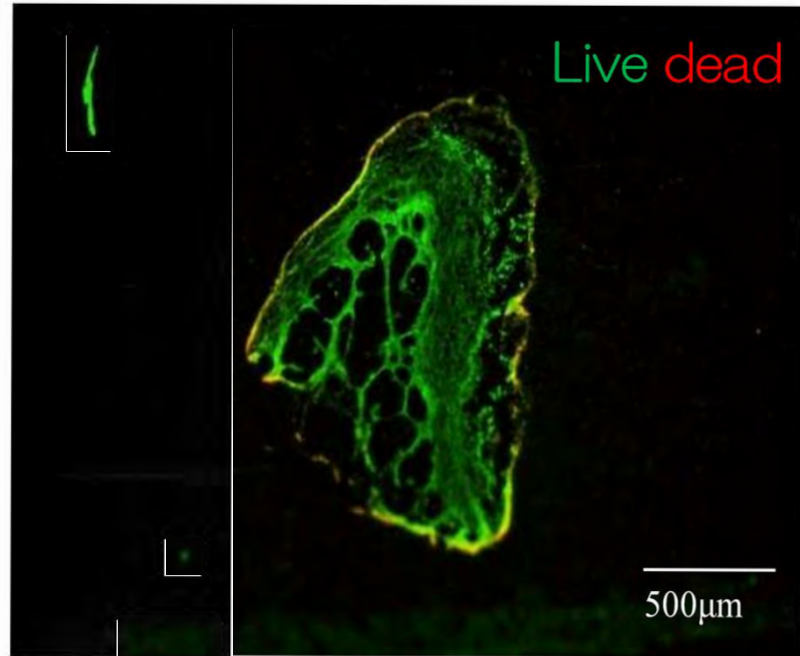
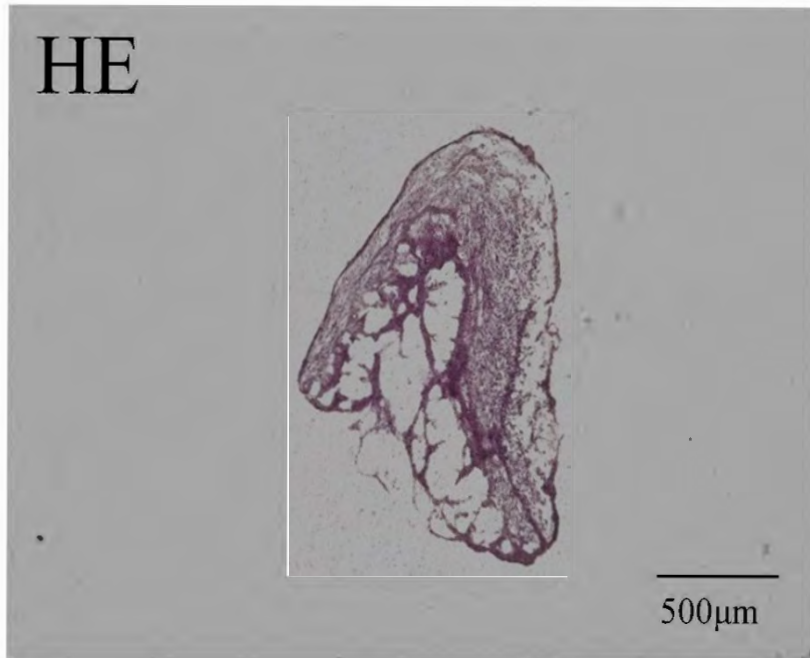
ゼラチン不織布内部での細胞増殖挙動を、凍結切片のHE染色によって観察しました。赤矢印がゼラチン繊維の断面で、青矢印が細胞です。繊維間の空隙が、増殖した細胞によって満たされています。さらに培養14日目には、ゼラチン繊維が徐々に消失しました。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケグループ

25日間培養した際の細胞生死

x 4



- 直径1mm以上の細胞凝集体が形成され、ゼラチン繊維が消失した。
- 細胞凝集体内部においても、多くの細胞が生存していた。

人と地球に「やさしく、あたたかい」企業グループを目指す



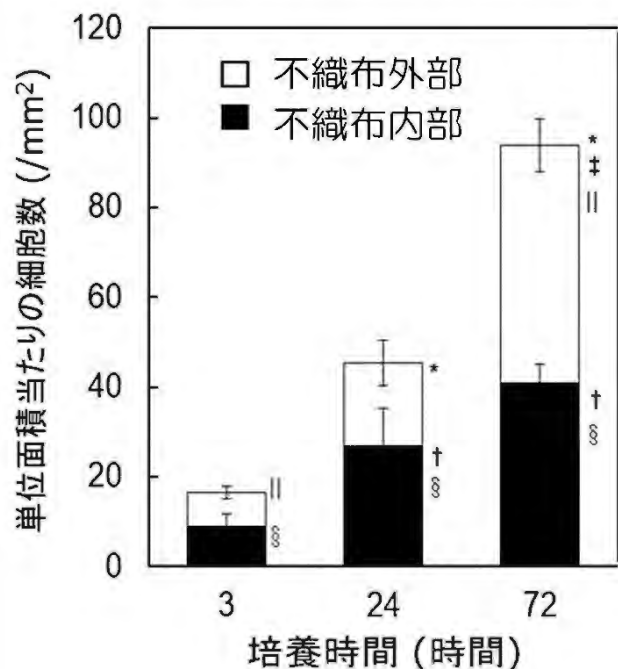
培養25日目のHE染色とLive/Dead染色結果です。直径1mm以上の細胞凝集体が形成され、その内部でゼラチン繊維は消失しておりました。さらにその内部では、多くの細胞が生存していました(緑色蛍光)。

12ページで述べたように、直径200 μm以上の細胞凝集体では、細胞死が生じることを考慮すると、当結果は驚くべきものです。

播種後の細胞分布

播種条件

KUM6 2.0×10^6 cells/ml 50 μ l



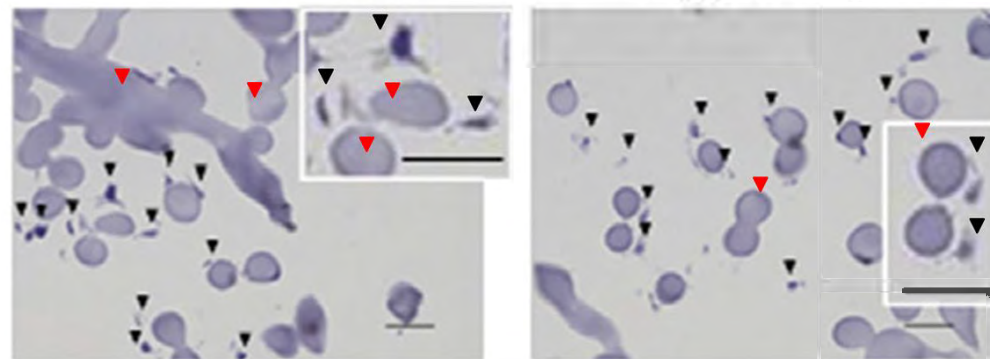
播種72時間後 HE染色

▼ ゼラチン繊維断面

▼ 細胞

不織布外部

不織布内部



K. Matsuno *et al.*, Regenerative Therapy, 14 (2020)

こちらは、Genocelブロックタイプへの細胞播種後の細胞分布を示しています。細胞凝集体を早期に効率良く作製するためには、播種した細胞が均一に分布することが重要です。22ページでは、細胞懸濁液滴下後に振盪しておりましたが、振盪しなくとも均一に播種可能なことが分かりました。細胞の増殖性も良く、取り扱いのしやすい培養基材です。

- 細胞懸濁液を滴下するのみで、不織布内**均一に播種**可能。
- 時間経過に応じ、不織布内**均一に**細胞が増殖した。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

グループ

本結果は、弊社で論文発表しておりますので、ぜひご覧ください。どなたでも無料でダウンロードいただけます。

使用例②

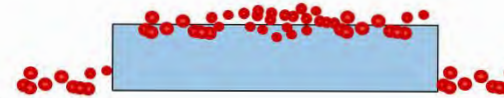
シートタイプを用いた高効率・高密度播種

Genocel®の細胞播種効率の課題

NIKKE
Group

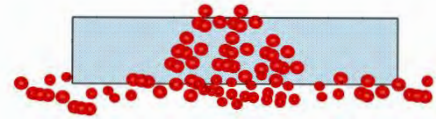
1. 緻密な素材の場合（例：ナノファイバー）

- 細胞が足場表面に留まりやすい
- 足場の周囲を回り込んで、培養皿底面に脱落する

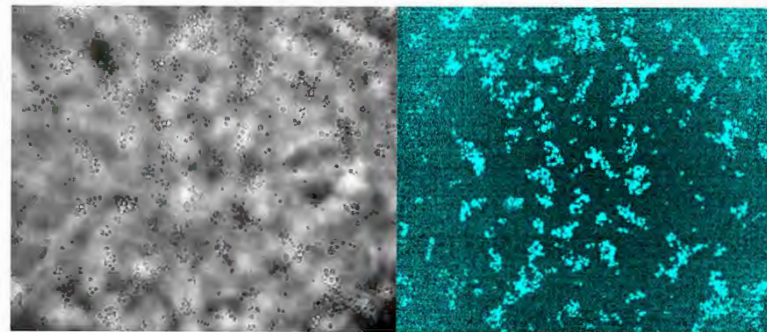


2. 疎な素材の場合（Genocel®）

- 細胞が足場内部に侵入する。
- 足場内を貫通して、脱落する。
- 足場の周囲を回り込んで、培養皿底面に脱落する



Genocel®に細胞播種後の培養皿底面



- 足場内に留まる細胞数の再現性が悪い
- 足場内で高密度化させることが困難。

（増殖性細胞：長期培養が必要、非増殖性細胞：不可）

一方で、Genocelの課題として、細胞播種効率の悪さがあります。例として、ナノファイバーのような緻密な足場では、細胞を播種すると、足場表面に留まりやすく、足場の周囲を回り込んで細胞が脱落します。

一方、Genocelのように疎な足場材では、細胞が足場材の内部に侵入する一方で、足場内を貫通したり、足場の周囲を回り込んで脱落します。

実際にGenocelに細胞播種した際の培養皿底面では、細胞が多く脱落しています。

このように播種効率が悪いと、足場内に留まる細胞数の再現性が取れませんし、足場内で細胞を高密度化させることが難しくなります。

Genocel®を設置する培養皿の濡れ性に着目



- 培養皿には、主に親水化処理の有無で、
接着細胞用と非接着細胞用がある

親水化処理：接着性のある細胞用

未処理：非接着性の細胞用

- Genocel®を設置する培養皿の濡れ性で、
培養液の留まり方が異なる

未処理培養皿に設置

- 培養液が足場上に留まり、
培養皿へ流れない
- 足場の濡れ性
> 培養皿の濡れ性



親水化処理培養皿に設置

- 培養液が足場から培養皿へ
引っ張られる
- 足場内の濡れ性
< 培養皿の濡れ性



そこで、Genocelを設置する培養皿の濡れ性に着目しました。培養皿には、親水化処理されているものと、未処理のものがあります。Genocelを未処理の培養皿上に設置し、細胞懸濁液を滴下した際の培養液の留まり方が違うことに着目しました

具体的には、未処理の培養皿に設置し、細胞懸濁液を滴下すると、足場の濡れ性が培養皿の濡れ性を上回るため、培養液が足場の上に留まります。

一方で、親水化処理の培養皿では、足場の濡れ性よりも培養皿の濡れ性の方が高いため、細胞懸濁液が流出します。

新規播種方法の概略



Genocel®シートタイプを
培養液やPBSで膨潤



余分な液
を吸う



乾燥状態の
親水化未処理
培養皿に設置



足場中心に
細胞懸濁液20μlを
ゆっくり滴下



3時間以上培養し、
培養液を添加

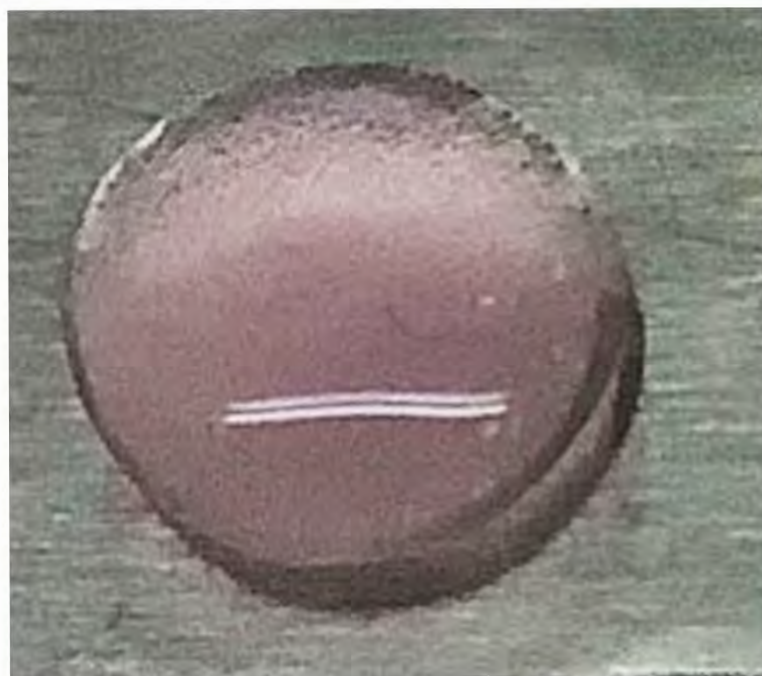


こちらは新規播種
方法の模式図です。

はじめに、Genocel
シートタイプ5mmφ
を膨潤させます。
その後、余分な液を
吸い、
乾燥状態の細胞接
着処理なしの培養
皿に設置します。
ここに細胞懸濁液を
20μl滴下し、3時間
以上培養した後、
培養液を添加しま
す。

細胞懸濁液滴下後の様子

- HEK293細胞 4.0×10^6 cells/ cm^2
($\phi 8$ mmの足場に、 1.0×10^7 cells/ mlを20 μ l播種)
- 解凍後、事前培養なしで播種



こちらは、HEK293細胞の懸濁液を20 μ l滴下したものです。足場上に細胞懸濁液がドーム状に留まっています。ゆらしても、細胞懸濁液は流出しませんので、懸濁液から細胞がGenocellに侵入しやすい状況となっています。

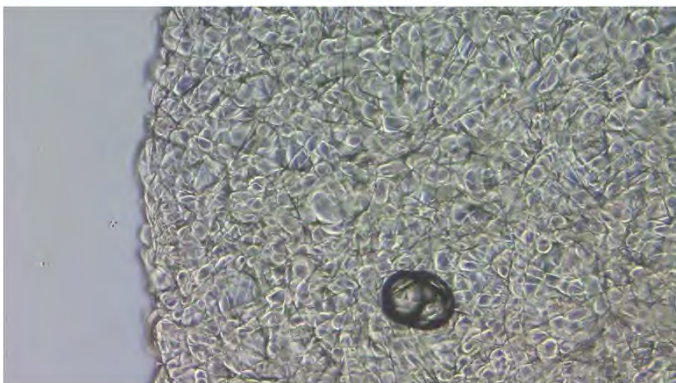
- 細胞懸濁液が足場上に留まる

培養液添加後

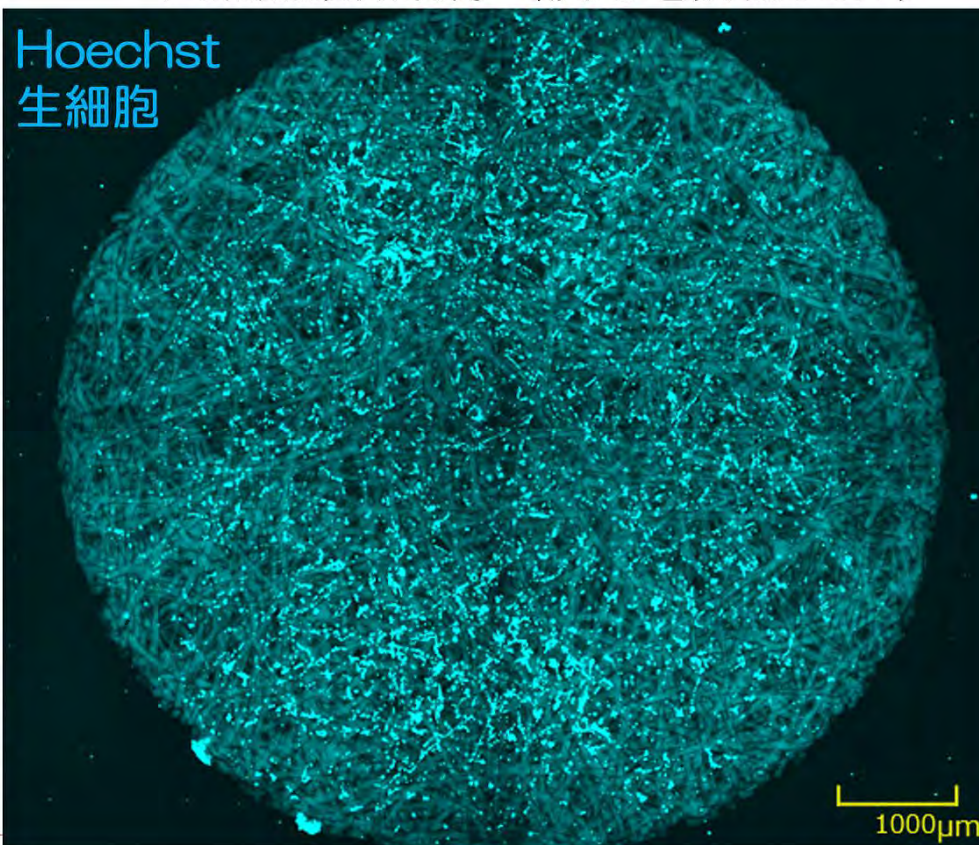
- 3時間培養後、足場が完全に浸る量の培養液を添加

x4 光学顕微鏡

共焦点顕微鏡像（横河電機社CQ1）



（比較）親水性培養皿上での播種



Hoechst
生細胞

- 細胞が足場内に留まり、流出しない

31

次に3時間後に培養液を添加した際の結果です。

横河電機社の共焦点顕微鏡で観察しますと、

足場内に細胞が留まり、

足場外には全く細胞が出ていないことが分かります。

一方、親水化処理した培養皿で播種した場合は、

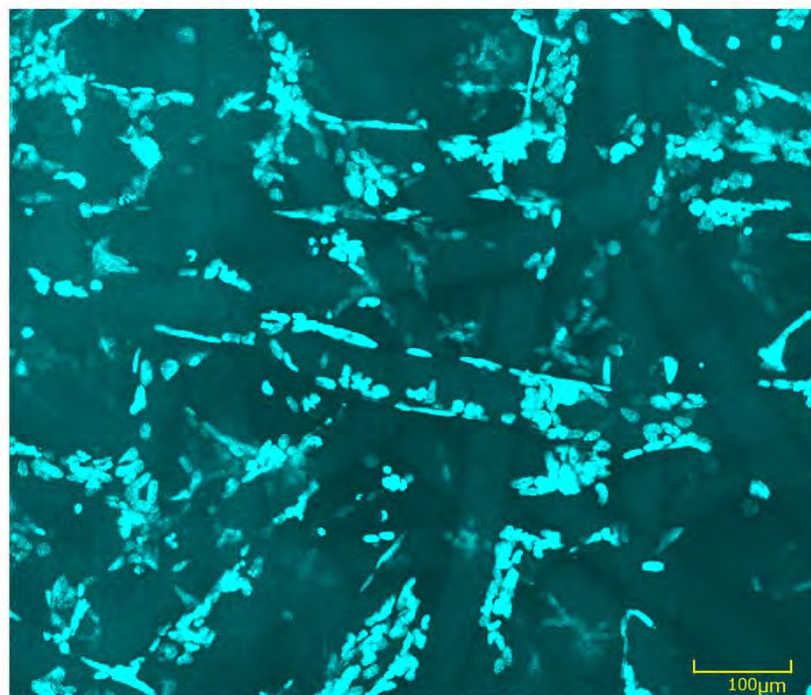
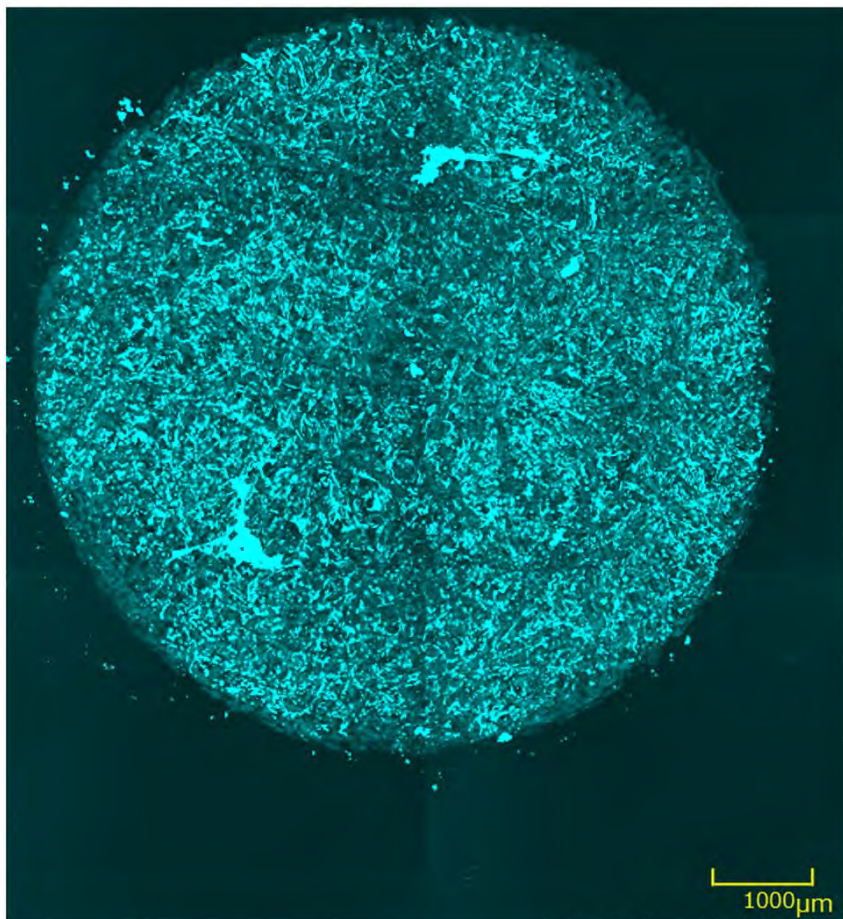
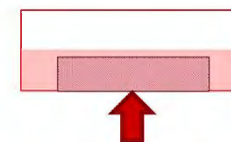
細胞が多く流出しています。

足場内の細胞分布（培養皿側）

- 3日間培養後、足場底面を生細胞（hoechst）観察

全体像

x20



- 細胞が繊維表面に存在
- 繊維間の空隙に細胞なし

培養3日目に、培養皿側から観察した画像です。

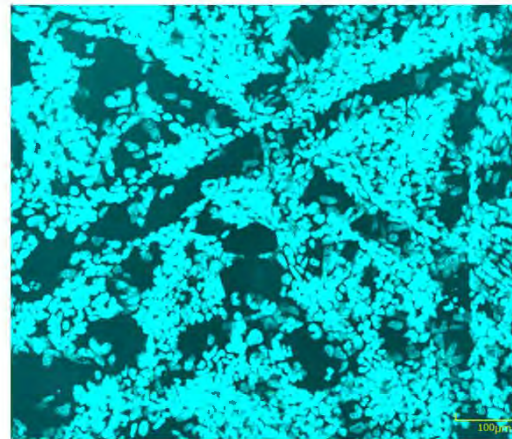
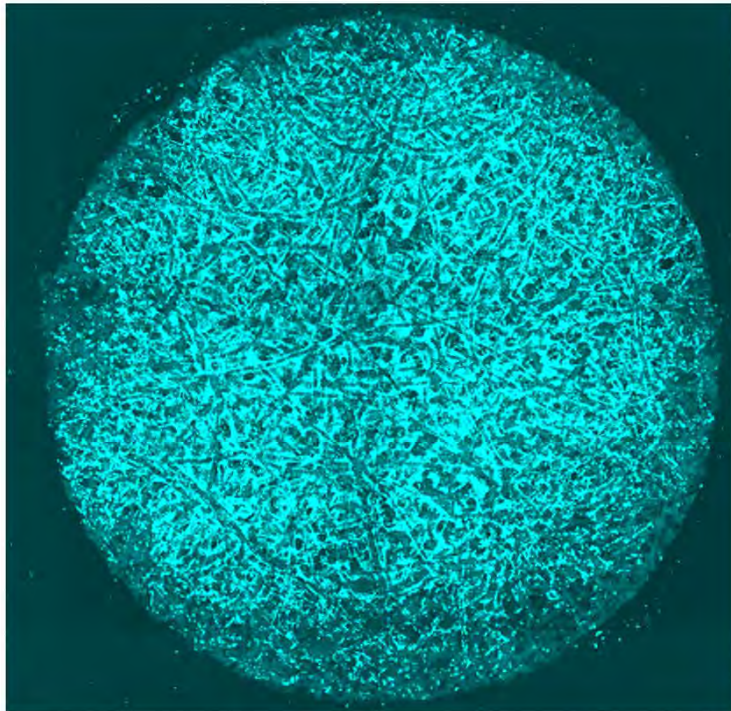
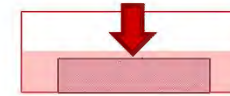
細胞はあまり高密度ではありませんが、

繊維に沿って細胞が付いていることがわかります。

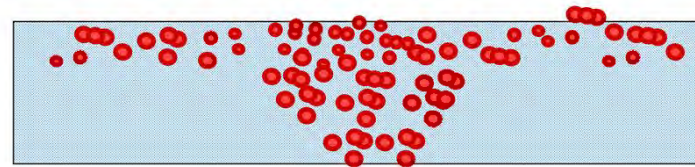
足場内の細胞分布（培養皿と反対側）



- 3日間培養後、反転し、足場上面を生細胞観察



x20



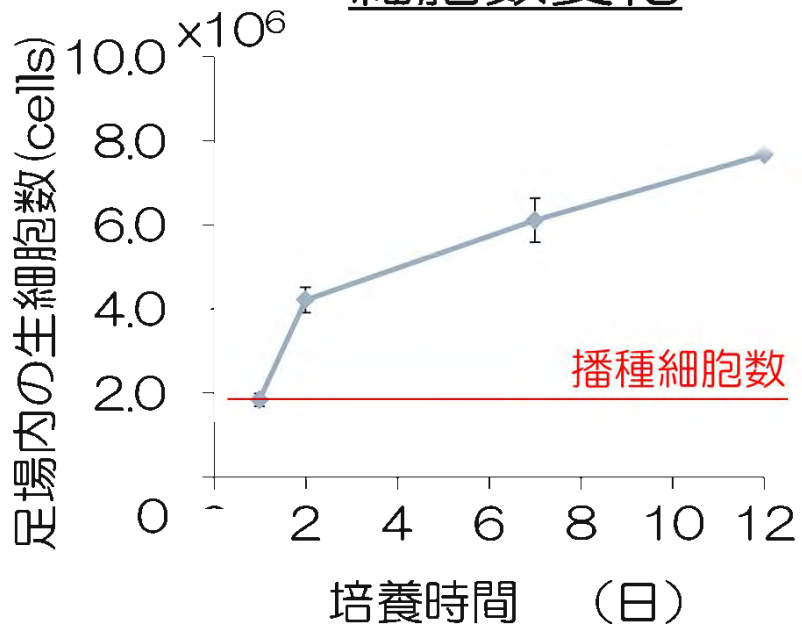
- 細胞が繊維間の空隙まで密に存在
- 細胞播種時に細胞が足場表面に留まりやすい

こちらは、同じ足場を反転して、観察した結果です。繊維間の空隙まで、密に細胞が存在しており、細胞は足場の表面によく留まっていることがわかります。

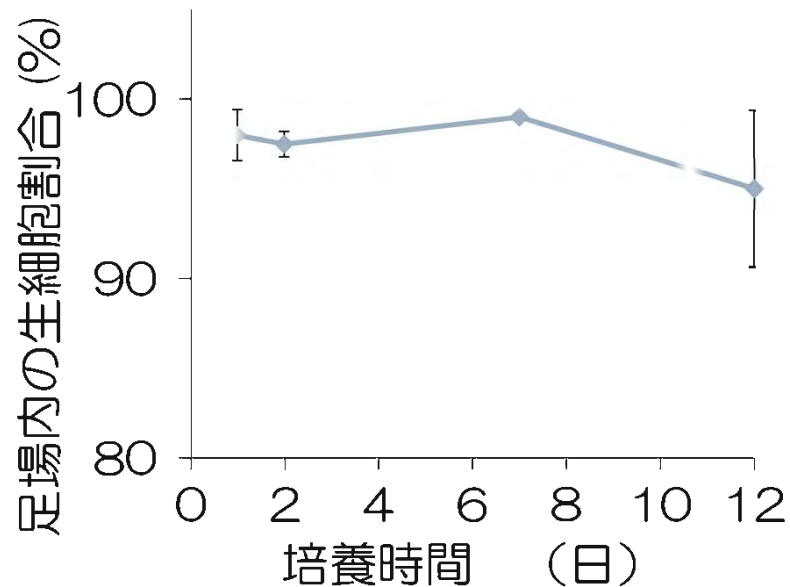
細胞数変化

- HEK293細胞（プレカルチャーなし） **20万個** を足場に播種
- トリプシンEDTAで処理し、Genocel® を溶解、トリパンプルー染色

細胞数変化



生細胞割合



- 優れた細胞播種効率
- 培養により、さらに細胞増殖

細胞の大量培養担体としても利用可能

これらのグラフは足場内の細胞数変化を示しています。トリプシンEDTAで処理しますと、Genocelが溶解しますので、取り出した細胞をトリパンプルー染色して計数しました。播種翌日の細胞数は、播種細胞数と同じで播種効率がよく、培養を継続すると、1週間で3倍、12日で4倍になりました。90%以上の細胞が生存しておりますので、細胞の大量培養担体としても使用いただけます。

まとめ

(1) Genocel®について

- ゼラチン単体から構成された特殊構造の**ハイドロゲル不織布**
- 膨潤状態で**強度**を有し、優れた変形回復性を示す
- 3次元培養に使用すると、長期培養により、**直径1mm以上の凝集体**が形成され、その内部で細胞が**生存**する
- 容易に**均一に細胞播種**が可能

(2) Genocel®シートタイプへの高効率播種方法について

- 細胞接着処理未処理の培養皿に設置して、細胞播種することで、**高効率の細胞播種が可能**
- 細胞播種濃度を濃くすることで、培養翌日から足場表面に**密な細胞集合体を形成**

※高効率播種方法は、製品プロトコルに掲載しております。

以上、まとめです。
高効率播種方法は、Genocelシートタイプのプロトコルに掲載しておりますので、是非ご活用ください。

ブロックタイプ・シートタイプの用途提案

- 細胞の大量培養
- 増殖/非増殖細胞の3次元培養、短期での高密度化
- 細胞シート形成が困難な細胞での細胞凝集体形成
- 細胞移植（動物実験）
- 欠損充填剤（動物実験）
- 組織再生（動物実験）
- 薬剤の応答性の評価

使用例③ 細胞シートキャリア

Genocel[®]の細胞シートキャリアとしての利用



METHODS ARTICLE

A Gelatin Hydrogel Nonwoven Fabric Facilitates Metabolic Activity of Multilayered Cell Sheets

Koichiro Nakamura, MEng,^{1,2} Toshiki Saotome, PhD,^{1,2} Naoki Shimada, PhD,¹
Kumiko Matsuno, MSci,^{1,2} and Yasuhiko Tabata, PhD, DMedSci, DPharm²

Tissue Eng C 25 (2019) 344

- 細胞シートは柔らかく、ハンドリングが難しい。
- Genocel[®]は剥離した細胞シートをよく吸着し、簡便・短時間に移動が可能。
- インキュベートによって接着でき、培養や移植に使用可能。

細胞シートは再生医療のための移植や創薬研究の組織モデルに応用されている技術です。

一方で、細胞シートは柔らかくハンドリングが難しいという課題があります。

この課題に対して、Genocelを細胞シートキャリアとして

利用することを提案しています。

Genocelに剥離した細胞シートに付着させることで、

ピンセットで簡単にハンドリングできるようになります。

この利用方法については表記の論文にまとめましたので、ぜひご覧ください。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE CO., LTD. All Rights Reserved.

ニッケグループ

38

細胞シートキャリアのデモ

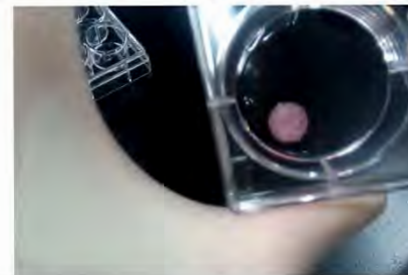
NIKKE
Group



○細胞シートは柔らかいためピンセットではつまめない。



○Genocel®を貼り付けることで移送や積層が簡単になる。



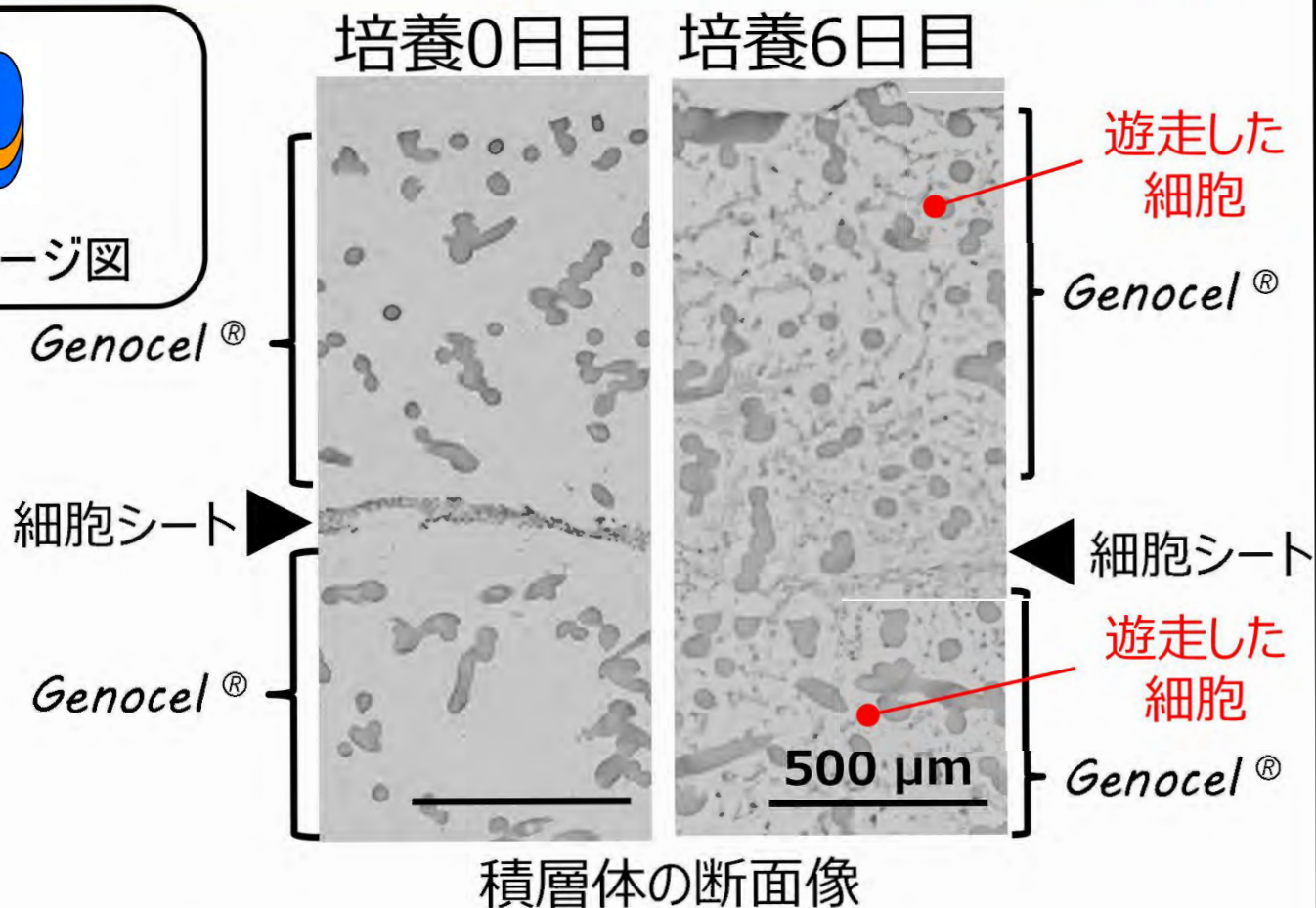
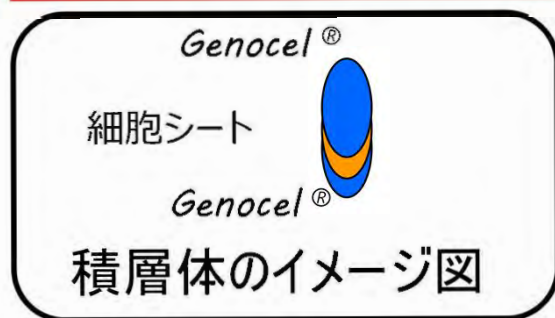
デモ動画はニッケメディカルHPよりご覧いただけます。
<https://nikkemedical.com/product/features.html>

39

使い方の説明のスライドです。
培養皿で細胞シートを作製したのち、培養皿から剥離します。剥離した細胞シートにGenocelを載せると、細胞シートが吸着されて一体化します。Genocelと一体化した細胞シートはピンセットでピックアップできます。20分ほどのインキュベーションで両者は接着しますので、その後の細胞培養や動物移植に用いることができます。

Genocel[®]と細胞シートの積層体培養

NIKKE
Group



・培養によって、細胞シートからGenocel[®]へ細胞が遊走し、3次元細胞体が形成した。

前ページでは細胞シートの片側にGenocelを貼り付けましたが、本ページでは両側に貼り付けて積層体としています。

この積層体を培養しました。

培養0日目ではGenocelと細胞シートの境界がはっきり観察できます。

培養6日目ではその境界が見えなくなり、細胞シートからGenocelへの細胞の遊走が確認できました。

このことからGenocel内で細胞が遊走、増殖することがわかります。

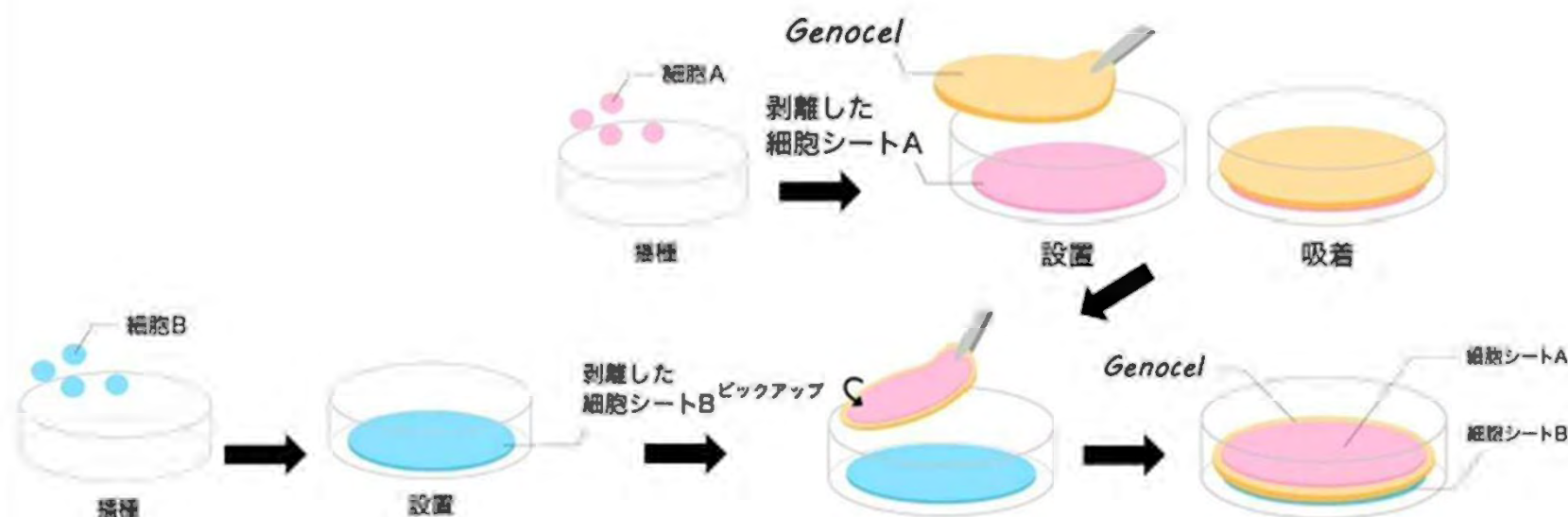
またこの結果、Genocelと細胞シートを複合化した細胞3次元体を作製することができました。

40

用いた細胞はヒトMSCです。

内部への遊走性を生かした実験例

NIKKE
Group



○異種細胞シートの積層

- ・2種の細胞シートをGenocel[®]の両面に貼り付け
→Genocel[®]内部で2種の細胞の自己組織化

Genocel内で細胞が遊走、増殖することから

図のような実験で使えと考えられます。Genocelの片面に細胞シートを、もう片面に別種の細胞シートを張り付けて細胞複合体とします。Genocel内部で両者の細胞を出会わせることができれば、自己組織化ができると考えられます（例えばMSCシートと、上皮細胞シートを両面培養し、内部で上皮間葉組織を自己組織化する）。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE CO., LTD. All Rights Reserved.

ニッケ グループ

使用例④

Genocel® + 細胞シートで動物組織再生

ユーザー様のご紹介



ユーザーの信州大学今村先生のご研究を紹介します。



信州大学 医学部 泌尿器科学教室
今村 哲也先生



Genocel®シートタイプを使用いただき、

「ハイブリット型骨髄由来細胞シートを用いた
新規膀胱拡大術による機能的な膀胱再生の試み」

最優秀ポスター賞を受賞されました！

第1回
細胞シート工学イノベーションフォーラム

The 1st Cell Sheet Engineering Innovation Forum
～細胞シートの未来を語ろう！～

会期 2019年7月19日(金)

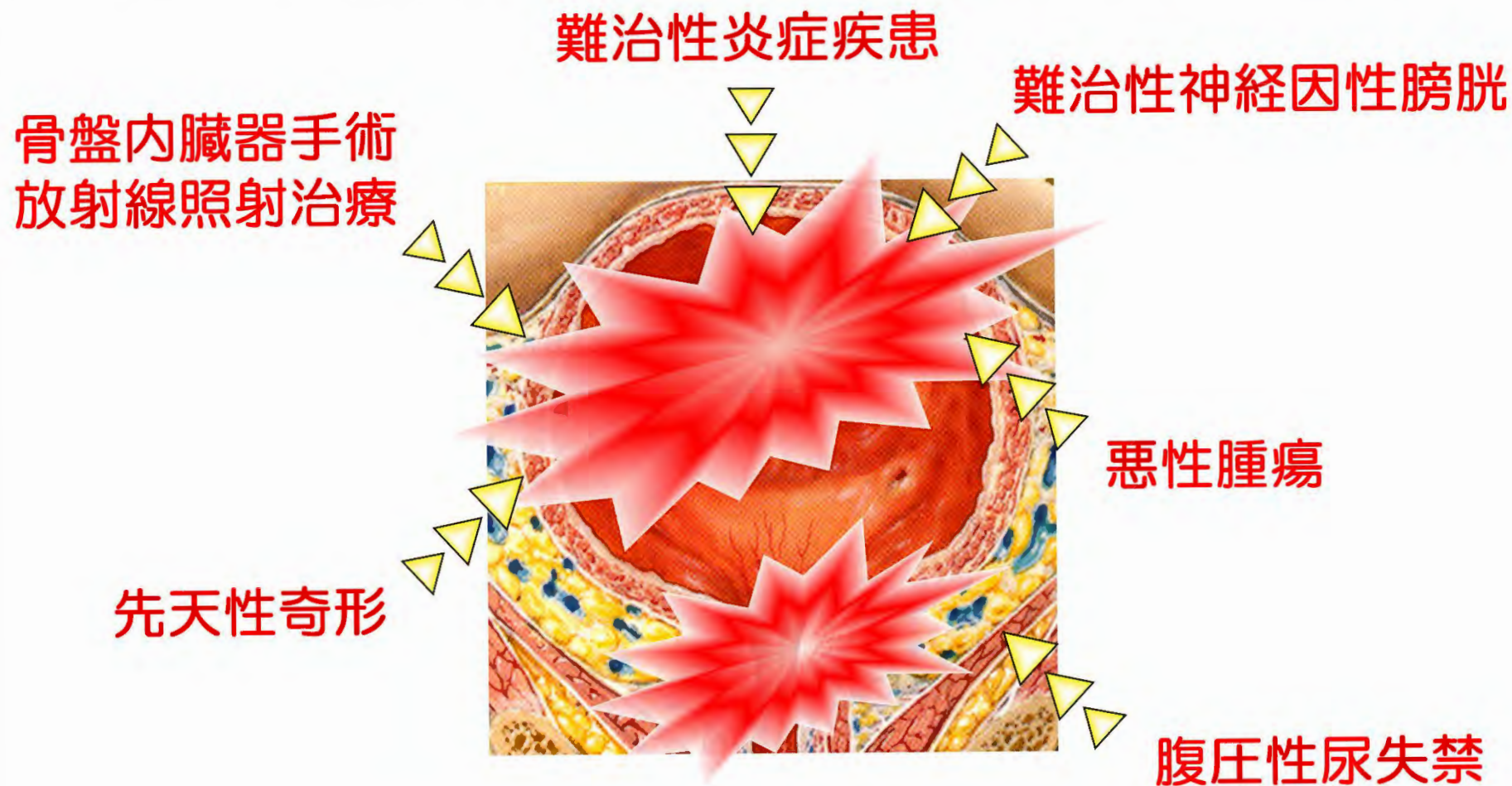
場所 地方独立行政法人
東京都立産業技術研究センター

研究内容を以下でご紹介いたします。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケグループ

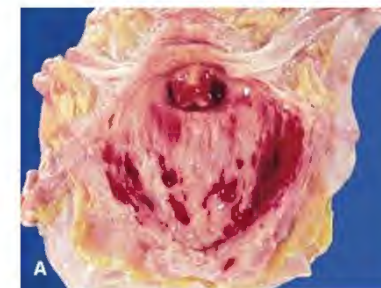
何らかの原因によって生じた下部尿路の機能障害は、長期にわたり、また、煩雑な排尿管理が必要となり患者の生活の質を著しく低下させる。



本研究の対象疾患

低コンプライアンス膀胱と膀胱萎縮

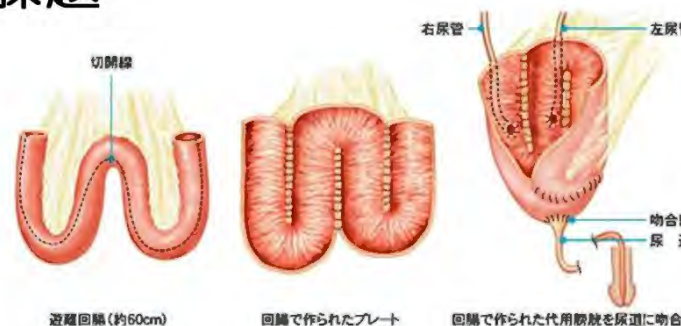
膀胱の伸展が障害されて、大量の残尿と高圧蓄尿などの蓄尿症状が生じる。線維化が進行して、蓄尿症状の悪化、腎機能障害が生じる。



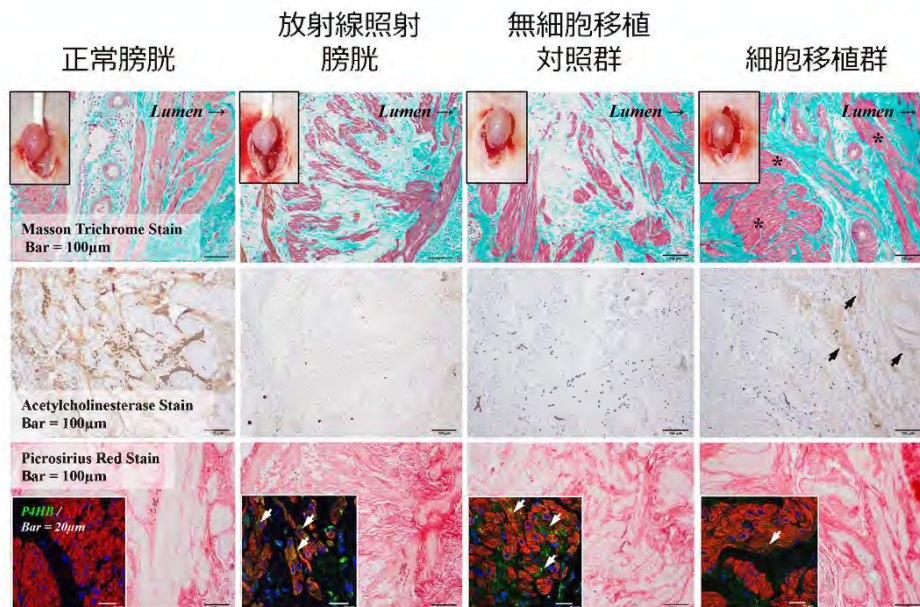
コンプライアンス：
物体の伸縮性、可塑性を定量化した物理量
低コンプライアンス膀胱： 硬くなった膀胱
腸管イレウス： 腸閉塞

腸管利用膀胱拡大術・尿路変向術の課題

- 消化管を利用する侵襲の高い手術
膀胱結石・上部尿路結石・慢性下痢・腸管イレウスなどの合併症
発癌のリスク
- 自排尿の消失（自己間欠導尿が必要）



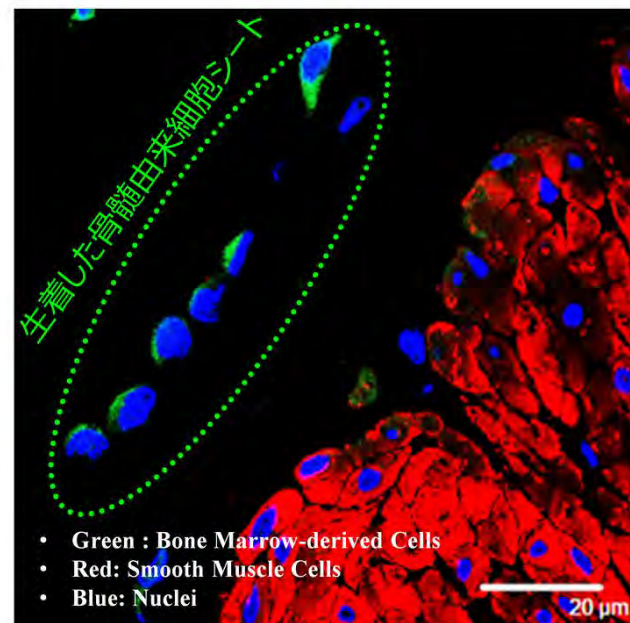
骨髓由来細胞を用いた膀胱再生



放射線照射した膀胱への骨髓由来細胞注入移植

↑ Imamura, Ishizuka, Zhang, Hida, Gautam, Kato, Nishizawa. Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstruct bladder tissues in rats. *Tissue Engineering Part A*, 18: 1698-1709; 2012

Imamura, Ogawa, Minagawa, Yokoyama, Nakazawa, Nishizawa, Ishizuka. Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary bladder. *Tissue Engineering Part A*, 21: 160-1610; 2015 ↓

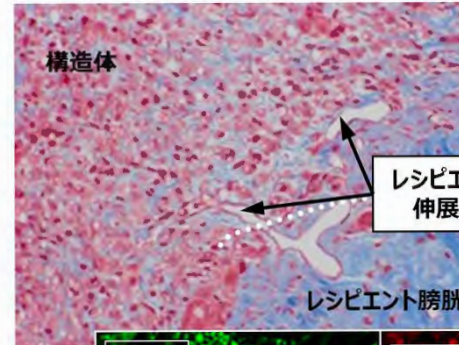
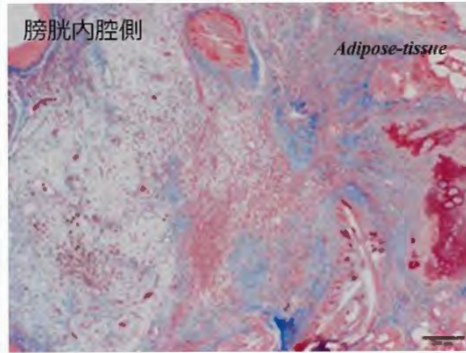
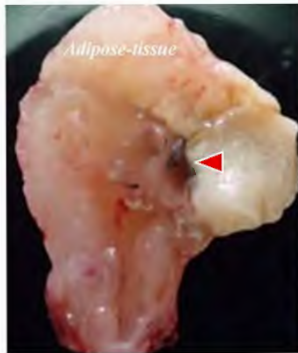


放射線照射した膀胱への骨髓由来細胞シート移植

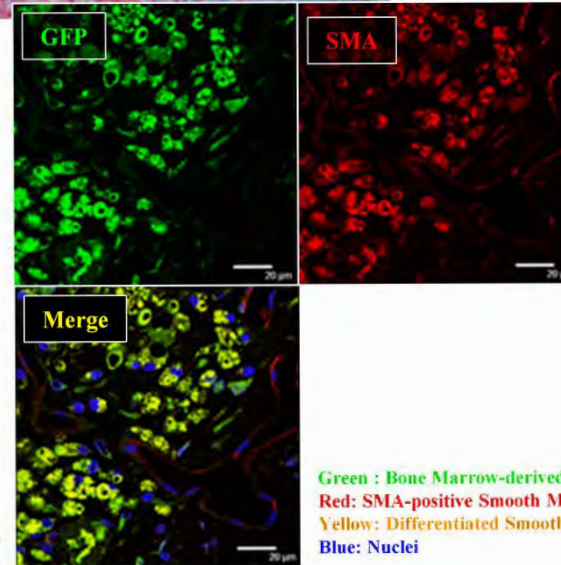
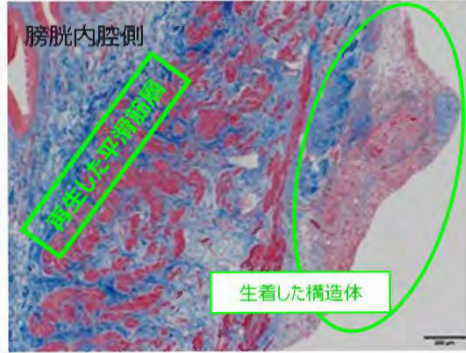
今村先生のご研究は、再生の手法として細胞懸濁液の注入（左図）、細胞シート移植（二次元体；右図）、細胞三次元体移植（次ページ）と発展させていらっしゃいます。

立体型細胞構造体を用いた膀胱再生

偽手術
対照群



骨髄由来細胞
構造体移植群



今村先生のご研究は、再生の手法として細胞懸濁液の注入（前ページ左図）、細胞シートの移植（二次元体；前ページ右図）、細胞三次元体の移植（本ページ）と発展させていらっしゃいます。

Imamura, Shimamura, Ogawa, Minagawa, Nagai, Sudha, and Ishizuka: Biofabricated structures reconstruct functional urinary bladders in radiation-injured rat bladders. Tissue Engineering Part A, 24: 1574-1587; 2018

Genocel™

細胞培養用ゼラチン繊維基材

Nikke Medical

株式会社ニッケ・メディカル

NIKKE Group



3次元
足場用途



細胞シート
キャリア



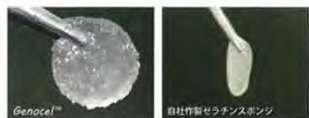
異種細胞の
積層

Genocel™は、ニッケ・メディカル社独自の不織布構造のゼラチンを用いた、広く活用が期待される細胞培養用基材です。強度が高く、容易に細胞培養を行うことができます。

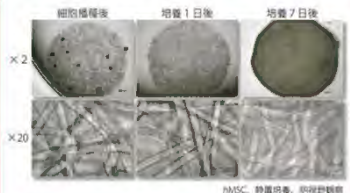
実験協力：京都大学 ウィルス 再生医学研究所 生体材料科学分野 田畑研究室

特長 01 不織布構造のゼラチン基材
濡れても強度があり、細胞増殖する空隙を保持。

特長 02 培養中も形状維持
従来品だと重みで形状が変形されてしまいますが、強度があるためピンセットによるハンドリングができ、形状を維持することができます。



特長 03 培養下での観察が可能
液中で半透明なので、培養下での観察が可能。下記の画像では、繊維の交点に細胞接着後、繊維に沿って細胞が増殖し、繊維間の隙間を細胞が満たす様子がわかります。



特長 04 硬さ、厚みは変更可能
基材の硬さ、厚みは細胞・実験用途に合わせてフレキシブルに変更が可能。オーダーメイドによる製品を作製することができます。

特長 05 長期生存
足場の深部へ細胞が移動し、長期間生存。

NIKKE Group 株式会社ニッケ・メディカルは、ニッケ（日本毛織株式会社）のグループ企業で、再生医療などライフサイエンス分野で活きる様々な繊維加工製品の開発を行っています。

理想的な移植可能な再生ソースとしての立体構造体の作製ができる。

今村先生は、細胞シート移植の発展として材料との複合化に着目されました。

Genocel[®]を利用した立体構造体の作製



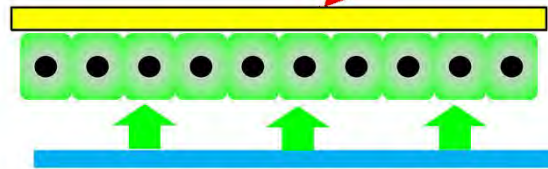
GFP-Tg SDラット骨髄由来細胞
or
PKH26標識ウサギ脂肪由来細胞



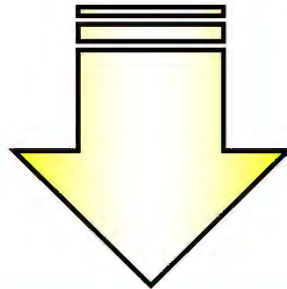
温度応答性培養皿
(37°C: 疎水性)



Genocel[®]シートタイプ



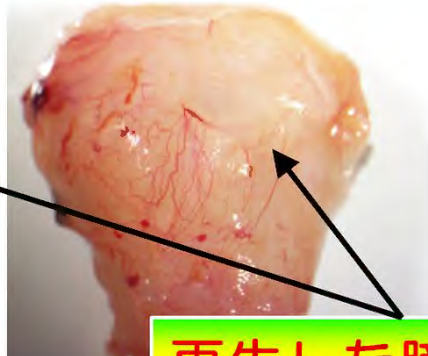
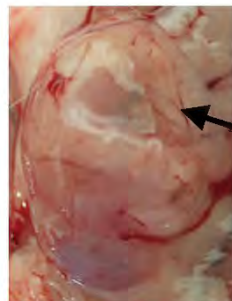
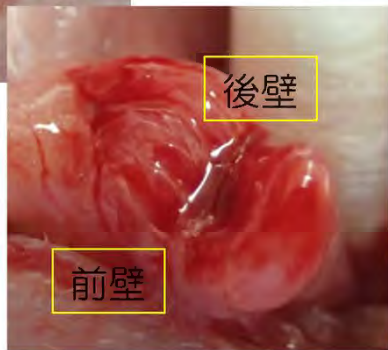
温度応答性培養皿
(20°C: 親水性)



温度応答性培養皿から回収した細胞-Genocel[®]を
移植部位に適した形に加工する。

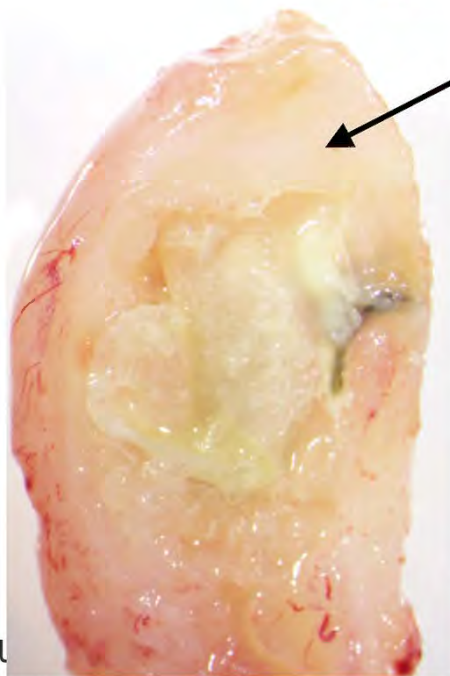
細胞シートと材料の複合化法はGenocelの細胞シートキャリアを応用した方法です。細胞シートをGenocelに貼り付けた後、移植部位に適した形に加工しています。

Cell-Genocel[®]立体構造体を用いた膀胱再生(膀胱拡大術)



術後4週間

再生した膀胱組織



膀胱を切開し、
細胞-Genocel[®]を当てた

人と地球に「やさし

切開した膀胱部に Genocelと細胞シート複合体を移植した結果です。術後4週間で、再生した膀胱組織が確認できました。

Genocel[®] パウダータイプ

Genocel[®]パウダータイプ

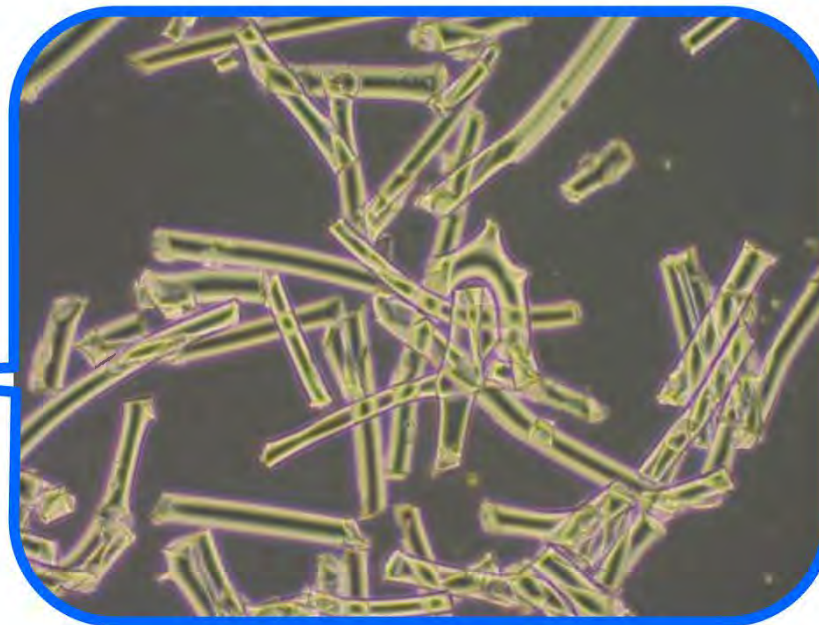
NIKKE
Group



パウダー



培地添加



- 生体適合性、栄養・酸素透過性をそのままにGenocel[®]をパウダー化。
- 短辺 約50 μm 、長辺 200~300 μm の繊維状。
- 3次元細胞体の成型時に混ぜ込むことが可能。

Genocelパウダータイプは微細繊維状の粉末です。乾燥状態でご提供しております。培地を添加することで膨潤し懸濁液となります。懸濁液はピペットで取り扱えますので、培養皿に簡単に添加することができます。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケ グループ

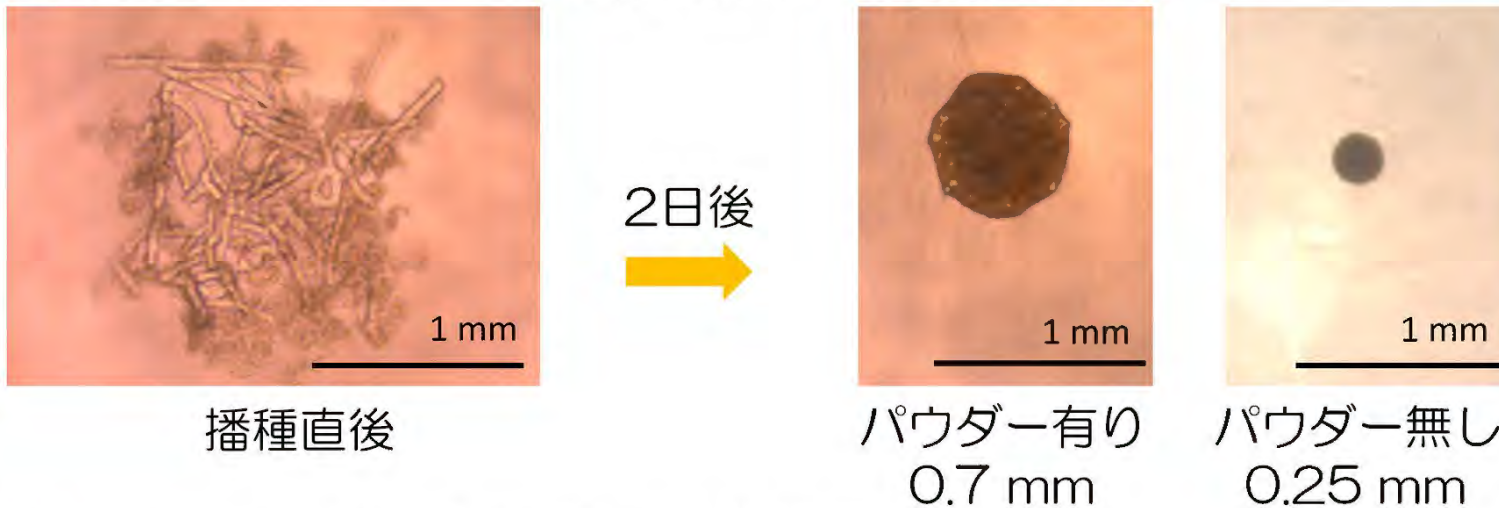
Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE.CO.,LTD. All Rights Reserved.

52

スフェロイドのサイズアップ



U底96ウェルプレートでの作製例 (マウス線維芽細胞)



- スフェロイドの大きさが増加した。
- バイオ3Dプリンタで必要な細胞数の低減などの用途に。

パウダーを用いてスフェロイドを作製した例です。

U底の96穴のウェルプレートに細胞懸濁液とパウダー懸濁液を播種し培養しました。

細胞とパウダーが徐々に凝集し、スフェロイドを形成しました。

作製方法は製品プロトコルに記載しています。

同じ細胞播種数で、パウダーを添加しないものに比べて大きさが増加しました。

パウダーをかさ増し材として使うことで、スフェロイド作製に必要な細胞播種数を低減できます。

細胞シート収縮の抑制

NIKKE
Group

METHODS ARTICLE

Gelatin Hydrogel-Fragmented Fibers Suppress Shrinkage of Cell Sheet

Koichiro Nakamura, MEng,^{1,2} Kimiaki Nobutani, MEng,¹ Naoki Shimada, PhD,¹ and Yasuhiko Tabata, PhD, DMedSci, DPharm²



Tissue Eng C **26** (2020) 216

- 細胞シートは培養皿からの剥離時に収縮し、面積が減少する。
- *Genocel*®パウダーの添加によって、剥離時の収縮が抑制され、大面積の細胞シートが得られた。
- 大サイズの細胞シート移植などの用途に。

細胞シートは培養皿から剥離の際に収縮します(例えば、口腔粘膜上皮シートは面積が50%、肝細胞シートは16%低下します)。細胞シートの作製時にパウダーを添加することで収縮を抑制できます。

細胞シートを大きなまま移植したいときや、積層して三次元体を作製するときに応用できます。

この利用方法については表記の論文にまとめましたので、ぜひご覧ください。

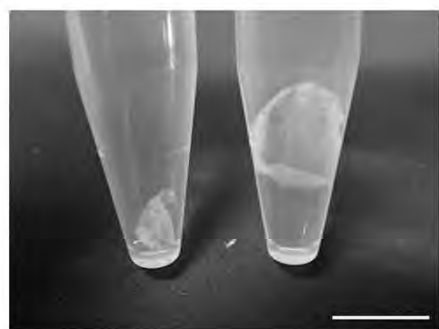
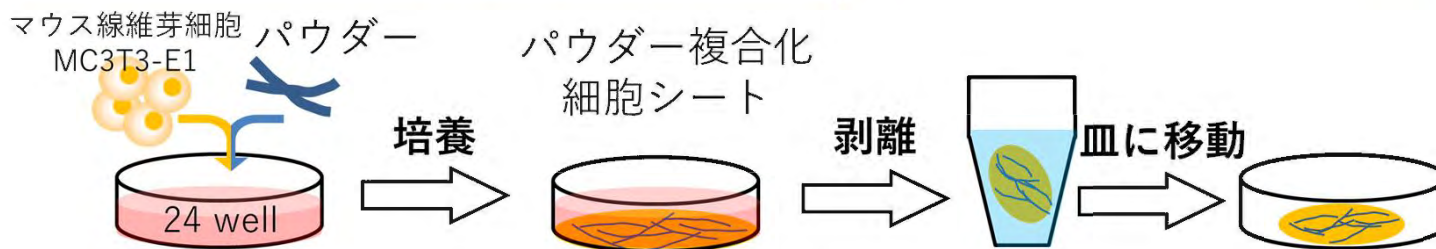
人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

ニッケ グループ

Copyright © THE JAPAN WOOL TEXTILE.CO.,LTD. All Rights Reserved.

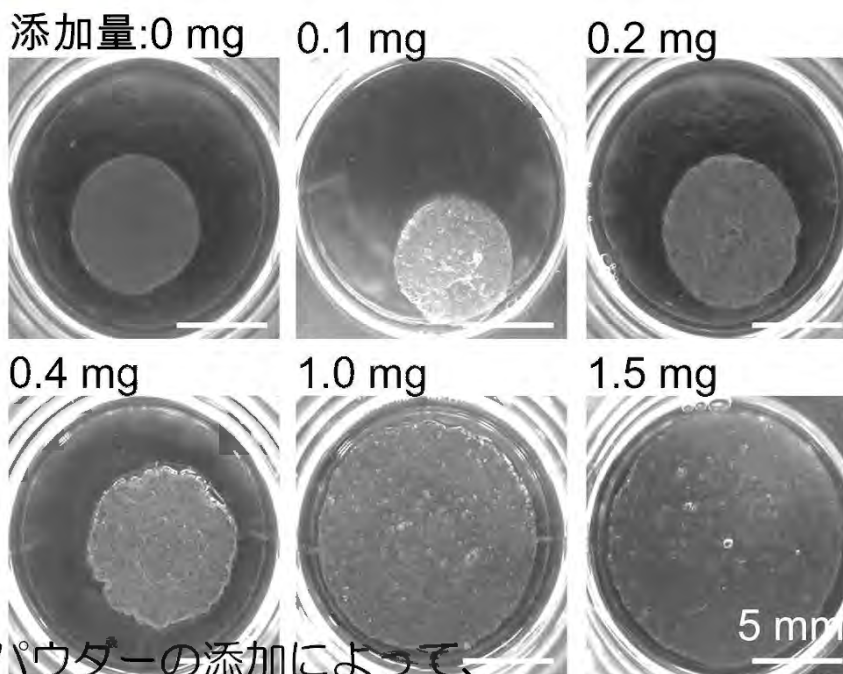
54

細胞シート収縮の抑制



1 cm

パウダー複合化細胞シートはPBS中でもシート形状を維持した。



パウダーの添加によって、収縮が抑制され大面積の細胞シートが得られた。

パウダーを用いて細胞シートを作製した例です。

ウェルプレートに細胞懸濁液とパウダー懸濁液を播種し培養しました。



細胞シート内に、パウダーが取り込まれました。

細胞シートを培養皿から剥離したところ、PBS中でもシート形状を維持しました。また、パウダーの添加量に応じてシートの収縮が抑制されました。

作製方法は製品プロトコルに記載しています。

人と地球に「やさしい、めづかしい」正業ソリューションを日々作り

通常価格表

タイプ	品名	形状 左：乾燥時 右：膨潤時	乾燥時サイズ (膨潤時は約 1.5 倍)	用途	品番	包装	希望販売価格
シート	Genocel® Sheet type φ 5mm (48well)		直径：5 mm 厚さ：約 0.3 mm	積層細胞シート 単層培養 両面培養	GCS-10005B	3 PC	¥43,000
	Genocel® Sheet type φ 8mm (24well)		直径：8 mm 厚さ：約 0.3 mm		GCS-10008B	3 PC	¥110,000
ブロック	Genocel® Block type φ 4mm		直径：4 mm 厚さ：約 0.7 mm	3次元培養	GCB-35004F	3 PC	¥97,000
パウダー	NEW! Genocel® Powder type		繊維径：約 50 μm 平均繊維長：200 μm *パウダータイプは 膨潤時サイズ。 繊維 1本の平均値。	スフェロイド 3次元化の添加材 大量培養の マイクロキャリアに	GCP-300010	10 mg	¥18,000

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す

 グループ

初回限定サンプル価格



初回のご注文に限り、上記価格にてご提供いたします。

品名	品番	包装	希望販売価格
Genocel® Sheet type φ 5mm(48well) Sample	GCS-10005BS1	1 PC	¥9,000
	GCS-10005BS3	3 PC	¥25,000
Genocel® Sheet type φ 8mm(24well) Sample	GCS-10008BS1	1 PC	¥20,000
	GCS-10008BS3	3 PC	¥58,000
Genocel® Block type φ 4mm Sample	GCB-35004FS1	1 PC	¥18,000
	GCB-35004FS3	3 PC	¥52,000
NEW! Genocel® Powder type Sample	GCP-300010S	10 mg	¥9,000



人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社



FAQ、
有償サンプル申込書
詳細情報は Web へ

記事 ID 検索 **33991**

コスモ・バイオ Web サイトのトップページ「記事 ID 検索」を使うと、ダイレクトにページに行くことができます。
上記の数字を検索窓に入力して検索してください。

人と地球に「やさしく、あったかい」企業グループを目指す



謝辞

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

生体材料学分野

田畑 泰彦 先生

東京大学 薬学部

化学物質安全性評価システム構築社会連携講座

澤田 光平 先生

馬場 敦 先生

加藤 英里子 氏

信州大学 医学部 泌尿器科学教室

今村 哲也 先生

コスモ・バイオ株式会社 様

横河電機株式会社 様

日本毛織株式会社.

早乙女 俊樹 博士

延谷 公昭 氏

島田 直樹 博士

松崎 佑佳 氏

田川 絵理 氏

遠山 由貴 氏

葛西 涼子 氏

伊勢 智一 氏

株式会社ニッケ・メディカル

上杉 昭二 氏

尾井 政夫 氏

芝田 靖子 氏