(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-105609
(P2012-105609A)
(43)公開日　平成24年6月7日(2012.6.7)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12M	3/04	(2006.01)	C12M	3/04	Z	4B029
C12N	5/071	(2010.01)	C12N	5/00	202A	4B065
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	

審査請求 未請求　請求項の数 8　ＯＬ　（全 26 頁）

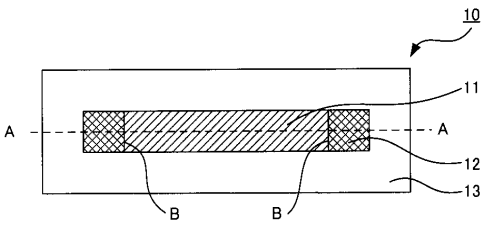
(21)出願番号　特願2010-258293 (P2010-258293)
(22)出願日　平成22年11月18日 (2010.11.18)

(71)出願人　000002897
大日本印刷株式会社
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号
(71)出願人　591173198
学校法人東京女子医科大学
東京都新宿区河田町８－１
(74)代理人　100101203
弁理士　山下　昭彦
(74)代理人　100104499
弁理士　岸本　達人
(72)発明者　冨山　裕美子
東京都新宿区市谷加賀町一丁目１番１号
大日本印刷株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】糸状浮遊細胞パターニング基材

(57)【要約】
【課題】本発明は、細胞を浮遊培養可能な糸状浮遊細胞パターニング基材を提供することを主目的とする。
【解決手段】本発明は、刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性領域と、細胞易接着性を有する細胞接着領域と、細胞非接着性を有する細胞非接着領域と、を有し、上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合い、上記刺激応答性領域および上記細胞接着領域の境界部分である少なくとも２つの分離された接着境界を有し、上記刺激応答性領域が、上記接着境界間を結ぶように配置され、上記細胞非接着領域が、上記刺激応答性領域の周囲に配置されていることを特徴とする糸状浮遊細胞パターニング基材を提供することにより、上記目的を達成する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性領域と、
細胞易接着性を有する細胞接着領域と、
細胞非接着性を有する細胞非接着領域と、
を有し、
前記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において前記細胞接着領域と隣り合い、
前記刺激応答性領域および前記細胞接着領域の境界部分である少なくとも２つの分離された接着境界を有し、
前記刺激応答性領域が、前記接着境界間を結ぶように配置され、
前記細胞非接着領域が、前記刺激応答性領域の周囲に配置されていることを特徴とする糸状浮遊細胞パターニング基材。
【請求項２】
２つの前記接着境界が対向して設けられていることを特徴とする請求項１に記載の糸状浮遊細胞パターニング基材。
【請求項３】
上記刺激応答性領域が、２つの前記接着境界を結ぶ領域と接しない領域を含むものであることを特徴とする請求項２に記載の糸状浮遊細胞パターニング基材。
【請求項４】
前記刺激応答性領域が、温度変化により細胞接着性が変化する温度応答性材料を含むことを特徴とする請求項１から請求項３までのいずれかの請求項に記載の糸状浮遊細胞パターニング基材。
【請求項５】
前記温度応答性材料が、ポリイソプロピルアクリルアミドであることを特徴とする請求項４に記載の糸状浮遊細胞パターニング基材。
【請求項６】
請求項１から請求項５までのいずれかの請求項に記載の糸状浮遊細胞パターニング基材に含まれる刺激応答性領域および細胞接着領域上に、前記刺激応答性領域が細胞易接着性を有する条件で、血管内皮細胞を播種・培養することにより、前記刺激応答性領域および前記細胞接着領域に接着したシート状血管内皮細胞を形成する血管内皮細胞培養工程と、
前記刺激応答性領域に刺激を与え、細胞非接着性を発現させることにより、前記シート状血管内皮細胞のうち前記刺激応答性領域に接着していた血管内皮細胞を培地中に浮遊させ、前記細胞接着領域に接着した糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を形成する刺激付与工程と、
前記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を培地中に浮遊させた状態で培養し、管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とする管腔化工程と、
を有することを特徴とする糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法。
【請求項７】
前記刺激応答性領域の幅が、前記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を管腔化可能なものであることを特徴とする請求項６に記載の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法。
【請求項８】
細胞易接着性を有する細胞接着領域を有する基板と、
前記細胞接着領域に２箇所で接着し、培地中に浮遊している管腔化血管内皮細胞を含む糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団と、
を有することを特徴とする糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞を浮遊培養可能な糸状浮遊細胞パターニング基材に関するものである。

【背景技術】
【０００２】
現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。
【０００３】
何かに接着して生育する接着依存性細胞は、何かに接着していない浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための表面を有する培養皿が用いられている。
【０００４】
一方、培養細胞を基材上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような表面がパターンをなしているような基材を用い、この表面で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。
【０００５】
例えば、特許文献１では、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成した電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特許文献２では、細胞非接着性あるいは細胞易接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィ法によりパターニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。
【０００６】
さらに、特許文献３では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質がパターニングされた細胞培養基材と、この基材をフォトリソグラフィ法によって作製する方法について開示している。このような基材の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターニングされた表面により多くの細胞を接着させ、細胞のパターニングを実現している。
【０００７】
しかしながら、このような方法では、平面パターン状に細胞を培養することは可能となるが３次元パターン状に細胞を培養することが困難であるといった問題があった。
このため、生体内において３次元パターン状に存在する血管等の細胞についての評価、すなわち、３次元パターン状であることによる細胞への影響や、３次元パターン状となるメカニズム等の評価に用いることができなかった。
【０００８】
一方、３次元的に培養する方法としては、マトリゲルやゼラチン等のゲル材料に細胞を埋包する方法が用いられてきた。
このような方法によれば確かに３次元的なパターンに細胞を培養することは可能であるが、細胞がゲル材料内で無秩序に増殖するため、細胞を所望の３次元パターンとなるように培養することは困難であった。このため、同一の３次元パターンの細胞に対して様々な条件で培養した際の評価を定量的に行うことは困難であった。
また、このようなゲル材料で細胞を培養した場合、細胞は、これらのゲル材料に接着した状態となる。このため、足場材料としてのゲル材料の影響を排除した上での細胞の３次元培養や評価、すなわち、足場材料のない状態での３次元培養や評価を行うことが困難であるといった問題があった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００９】
【特許文献１】特開平２－２４５１８１号公報
【特許文献２】特開平３－７５７６号公報

【特許文献３】特開平５－１７６７５３号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、細胞を浮遊培養可能な糸状浮遊細胞パターニング基材を提供することを主目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
上記目的を達成するために、本発明は、刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性領域と、細胞易接着性を有する細胞接着領域と、細胞非接着性を有する細胞非接着領域と、を有し、上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合い、上記刺激応答性領域および上記細胞接着領域の境界部分である少なくとも２つの分離された接着境界を有し、上記刺激応答性領域が、上記接着境界間を結ぶように配置され、上記細胞非接着領域が、上記刺激応答性領域の周囲に配置されていることを特徴とする糸状浮遊細胞パターニング基材を提供する。
【００１２】
本発明によれば、上記糸状浮遊細胞パターニング基材上に細胞を播種・培養しシート状細胞を形成した後に、上記刺激応答性領域に刺激を与えることにより、上記細胞接着領域では細胞が担持された状態であり、かつ上記刺激応答性領域では細胞が上記刺激応答性領域表面から剥離した状態となるので、培地中に浮遊している細胞を含む糸状浮遊培養細胞結合集団を形成することができる。すなわち、細胞を容易に３次元パターン状かつ足場のない状態で浮遊培養し、種々の評価を行うことができる。
また、上記細胞接着領域の距離等を調整することにより、上記細胞への張力による影響についても評価することができる。
【００１３】
本発明においては、２つの上記接着境界が対向して設けられていることが好ましい。上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成することができるからである。
【００１４】
本発明においては、上記刺激応答性領域が、２つの上記接着境界を結ぶ領域と接しない領域を含むものであることが好ましい。
上記糸状浮遊培養細胞結合集団の再接着抑制を、上記刺激応答性領域に細胞非接着性を継続して発現させることなく達成することができるからである。その結果、細胞非接着性を継続して発現させるために、低温度条件等の細胞培養に不適な刺激や、紫外線等の細胞にダメージを与える刺激を継続して付与する必要がある刺激応答性領域を用いた場合であっても、このような刺激の付与を行うことなく、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に保持し培養することが可能となるからである。
例えば、上記刺激応答性領域として最適な細胞培養温度より低温で細胞非接着性を発現する温度応答性領域を用いる場合であっても、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を低温で培養せずとも、上記刺激応答性領域に再接着することなく安定的に保持し培養することが可能となる。したがって、良好な培養条件下で上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に培養し、評価を行うことが可能となるからである。
【００１５】
本発明においては、上記刺激応答性領域が、温度変化により細胞接着性が変化する温度応答性材料を含むことが好ましい。刺激の付与が容易だからである。
【００１６】
本発明においては、上記温度応答性材料が、ポリイソプロピルアクリルアミドであることが好ましい。細胞の培養に適した温度において細胞易接着性を有し、細胞へのダメージの少ない温度で細胞非接着性を発現することから、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を容易に形成することができるからである。
【００１７】

本発明は、上述の糸状浮遊細胞パターニング基材に含まれる刺激応答性領域および細胞接着領域上に、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を有する条件で、血管内皮細胞を播種・培養することにより、上記刺激応答性領域および上記細胞接着領域に接着したシート状血管内皮細胞を形成する血管内皮細胞培養工程と、上記刺激応答性領域に刺激を与え、細胞非接着性を発現させることにより、上記シート状血管内皮細胞のうち上記刺激応答性領域に接着していた血管内皮細胞を培地中に浮遊させ、上記細胞接着領域に接着した糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を形成する刺激付与工程と、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を培地中に浮遊させた状態で培養し、管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とする管腔化工程と、を有することを特徴とする糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法を提供する。

【００１８】

本発明によれば、上記糸状浮遊細胞パターニング基材を用いることにより、容易に糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を得ることができる。

【００１９】

本発明においては、上記刺激応答性領域の幅が、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を管腔化可能なものであることが好ましい。容易に糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を得ることができるからである。

【００２０】

本発明は、細胞易接着性を有する細胞接着領域を有する基板と、上記細胞接着領域に２箇所で接着し、培地中に浮遊している管腔化血管内皮細胞を含む糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団と、を有することを特徴とする糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板を提供する。

【００２１】

本発明によれば、３次元パターン状に形成された糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の評価を容易に行うことができる。

【発明の効果】

【００２２】

本発明は、細胞を浮遊培養可能な糸状浮遊細胞パターニング基材を提供できるといった効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の一例を示す概略平面図である。
【図２】図１のＡ－Ａ線断面図である。
【図３】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図４】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図５】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図６】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図７】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図８】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図９】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図１０】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図１１】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図１２】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図１３】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略平面図である。
【図１４】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略断面図である。
【図１５】本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の他の例を示す概略断面図である。
【図１６】本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法を示す工程図である。
【図１７】図１６のＸ－Ｘ線断面図である。
【図１８】実施例で作製した共焦点顕微鏡観察結果である。

【発明を実施するための形態】
【００２４】
本発明は、糸状浮遊細胞パターニング基材およびそれを用いた糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法、ならびに、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板に関するものである。
以下、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法、および糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板について詳細に説明する。
【００２５】
Ａ．糸状浮遊細胞パターニング基材
まず、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材について説明する。
本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材は、刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性領域と、細胞易接着性を有する細胞接着領域と、細胞非接着性を有する細胞非接着領域と、を有し、上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合い、上記刺激応答性領域および上記細胞接着領域の境界部分である少なくとも２つの分離された接着境界を有し、上記刺激応答性領域が、上記接着境界間を結ぶように配置され、上記細胞非接着領域が、上記刺激応答性領域の周囲に配置されていることを特徴とするものである。
【００２６】
このような本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材について図を参照して説明する。図１は、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の一例を示す概略平面図であり、図２は、図１のＡ－Ａ線断面図である。
図１および図２に例示するように、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材１０は、刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性材料を含む刺激応答性層１と、細胞易接着性を有する細胞接着材料を含む細胞接着層２と、細胞非接着性を有する細胞非接着材料を含む細胞非接着層３と、を有し、上記刺激応答性層１の露出表面である刺激応答性領域１１および上記細胞接着層２の露出表面である細胞接着領域１２の境界部分である２つの分離された接着境界Ｂを有し、上記刺激応答性領域１１が上記接着境界Ｂ間を結ぶように配置され、上記細胞非接着層３の露出表面である細胞非接着領域１３が上記刺激応答性領域１１の周囲に配置されているものである。また、上記刺激応答性層１、細胞接着層２および細胞非接着性層３を支持する基材４を有するものである。
【００２７】
従来の方法では、所望の３次元パターン状に細胞を培養することが難しく、同一の３次元パターンの細胞に対して様々な条件で培養した際の評価を定量的に行うことは困難であった。また、足場材料のない状態で３次元パターン状の細胞を培養する方法がなく、足場材料の影響を排除した上で評価を行うことは困難であった。
これに対して、本発明によれば、上記糸状浮遊細胞パターニング基材上に細胞を播種・培養することにより、細胞間結合で細胞同士が少なくとも単層で結合されたシート状細胞を形成した後に、上記刺激応答性領域に刺激を与えることにより、上記シート状細胞のうち上記刺激応答性領域に接着していた部分のみが剥離し、培地中に浮遊する。また、剥離した細胞は、一般的に足場のない状態では収縮し、糸状となる。このため、培地中に浮遊し、かつ、両端が固定された糸状の細胞結合集団である糸状浮遊培養細胞結合集団を形成することができる。すなわち、培地中で細胞を所望の３次元パターン状に培養することが可能となる。
【００２８】
ここで、通常、支持体に接着した細胞の剥離には、プロテアーゼ（タンパク質分解酵素）等の酵素を用いて、細胞間接着分子を構成するタンパク質等を分解する方法が用いられる。このような方法では、細胞－支持体表面の結合だけでなく、細胞－細胞間の結合も弱めてしまう。このため、上記シート状細胞にダメージを与えてしまうといった問題があった。

しかしながら、本発明においては、上記刺激応答性領域を用いるものであるため、このような酵素の使用を不要なものとすることができるため、上記シート状細胞にダメージを与えることなく、上記刺激応答性領域から剥離することができる。さらに、上記細胞－細胞間の結合を弱めることがないため、上記刺激応答性領域から剥離した際に、上記シート状細胞から細胞を分離することや、上記シート状細胞が切断されることを抑制することができる。

したがって、３次元パターン状の糸状浮遊培養細胞結合集団を容易かつ安定的に形成できるのである。

【００２９】

また、細胞を培地中に浮遊した状態とすることができるため、通常、足場のない状態での培養が困難な細胞であっても、足場のない状態で安定的に培養することができる。

さらに、細胞は、一般的に足場のない状態では収縮し、上記糸状浮遊培養細胞結合集団に張力が発生する。したがって、例えば、上記刺激応答性領域と境界を形成する細胞接着領域の距離等を調整することにより、上記糸状浮遊培養細胞結合集団の張力による影響を評価することが可能となる。

このように、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材を用いることにより、所望の３次元パターン状かつ足場のない状態の細胞を容易かつ安定的に浮遊培養することを可能とすることができるのである。また、その結果、今までにない新規な評価を行うことが可能となるのである。

【００３０】

本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材は、刺激応答性領域、細胞接着性領域および細胞非接着性領域を少なくとも有するものである。

以下、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の各構成について詳細に説明する。

【００３１】

１．刺激応答性領域

本発明における刺激応答性領域は、刺激応答性材料を含む刺激応答性層の表面のうち、露出した範囲であり、刺激により細胞接着性を変化させることにより培養する細胞の接着および剥離を行なうことができるものである。

【００３２】

（１）刺激応答性領域

本発明における刺激応答性領域は、上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合い、上記細胞接着領域との間に２つの分離された接着境界を形成し、上記接着境界間を結ぶように配置されるものであり、上記細胞非接着領域により周囲が囲まれるものである。

【００３３】

本発明における刺激応答性領域は、特定の刺激により細胞接着性が良好な細胞易接着性を発現している状態から、細胞の接着性が悪い性質である細胞非接着性を発現している状態に変化し得るものである。

ここで、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を発現しているとは、上記刺激応答性領域上で、細胞が接着、伸展しやすく、細胞接着伸展率が高い状態であることをいうものである。本発明において、このような細胞接着伸展率が高い状態としては、具体的には、細胞接着伸展率が６０％以上である状態とすることができる。

本発明においては、なかでも、８０％以上であることが好ましい。効率的に細胞を培養し、シート状細胞を形成させることができるからである。

【００３４】

なお、本発明における細胞接着伸展率は、播種密度が４０００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}以上３００００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}未満の範囲内でウシ血管内皮細胞を播種し、３７℃インキュベーター内(CO_2濃度５％)に保管し、１４．５時間培養した時点で接着伸展している細胞の割合（｛（接着している細胞数）／（播種した細胞数）｝×１００（％））を表すものである。

また、上記細胞の播種は、１０％ＦＢＳ(血清)入りＤＭＥＭ培地に懸濁させて培養基材上に播種し、その後、上記細胞ができるだけ均一に分布するよう、上記細胞が播種された培養基材をゆっくりと振とうすることにより行うものである。

さらに、細胞接着伸展率の測定は、測定直前に培地交換を行って接着していない細胞を除去した後に行う。また、細胞接着伸展率の測定箇所としては、細胞の存在密度が特異的になりやすい箇所（例えば、存在密度が高くなりやすい所定領域の中央、存在密度が低くなりやすい所定領域の周縁）を除いて測定を行うものである。

【００３５】

また、上記刺激応答性領域が細胞非接着性を発現している場合には、上記刺激応答性領域上で細胞が接着、伸展しにくく、細胞接着伸展率が低い状態であることをいうものである。本発明において、このような細胞接着伸展率が低い状態としては、具体的には、上記細胞接着伸展率が５％以下である状態とすることができる。本発明においては、なかでも２％以下であることが好ましい。

したがって、上記刺激応答性領域に細胞を播種すると、細胞易接着性を発現している際には細胞が上記刺激応答性領域に接着するが、細胞非接着性を発現している際には細胞が上記刺激応答性領域に接着することを阻害されるため、上記刺激応答性領域に接着していた細胞を剥離することができる。

【００３６】

本発明に用いられる刺激応答性領域の形状としては、上記接着境界間を結ぶように配置、すなわち、上記接着境界間で連続して設けられ、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を形成することができるものであれば特に限定されるものではなく、例えば、既に説明した図１に示すように、上記接着境界間を結ぶ直線状のもの、図３に例示する円弧状等の曲線状のもの、図４に例示する複数の直線を組み合わせて形成されたパターン状のもの、および図５に例示する楕円形状等によるライン状や、円形状、多角形状のもの等とすることができる。また、図６に例示するように、刺激応答性領域の形状が網目状のもの等であってもよい。また、既に説明した図１～図６に示す刺激応答性領域および細胞接着領域のパターンを複数組み合わせたものであってもよい。

本発明においては、なかでも、上記細胞非接着領域との境界に多角形状の頂点を含まない形状であることが好ましい。例えば、既に説明した図４に示すように、上記非接着境界に多角形の頂点が存在する場合、上記頂点において細胞が固着し、上記刺激応答性領域に刺激を与えたとしてもシート状細胞が安定的に剥離することができない可能性があるからである。

なお、図３～図６中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００３７】

また、本発明においては、上記刺激応答性領域の形状が、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材を用いて形成される糸状浮遊培養細胞結合集団の培地中に浮遊する部位が平面視上位置する領域と重ならない領域を含む形状であることが好ましい。

上記糸状浮遊培養細胞結合集団の再接着抑制を、上記刺激応答性領域に細胞非接着性を継続して発現させることなく達成することができるからである。その結果、細胞非接着性を継続して発現させるために、低温度条件等の細胞培養に不適な刺激や、紫外線等の細胞にダメージを与える刺激を継続して付与する必要がある刺激応答性領域を用いた場合であっても、このような刺激の付与を行うことなく、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に保持し培養することが可能となるからである。

例えば、上記刺激応答性領域として最適な細胞培養温度より低温で細胞非接着性を発現する温度応答性領域を用いる場合であっても、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を低温で培養せずとも、上記刺激応答性領域に再接着することなく安定的に保持し培養することが可能となる。したがって、良好な培養条件下で上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に培養し、評価を行うことが可能となるからである。

【００３８】

本発明においては、２つの上記接着境界が対向して設けられている場合には、上記刺激応答性領域が、２つの上記接着境界を結ぶ領域と接しない領域を含むもの、すなわち、２つの上記接着境界を結ぶ領域のうち、上記刺激応答性領域と重複する領域が少ないことが好ましく、なかでも、上記糸状浮遊培養細胞結合集団の浮遊している部分の長さが、５０μｍ以上とすることができるものであることが好ましく、特に、１００μｍ以上とすることができるものであることが好ましい。上記糸状浮遊培養細胞結合集団の評価を安定的に行うことができるからである。

【００３９】

本発明に用いられる刺激応答性領域の幅としては、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成できるものであれば特に限定されるものではなく、刺激応答性領域の形状、細胞の種類等に応じて適宜設定されるものである。

本発明においては、２０μｍ～２０００μｍの範囲内であることが好ましく、なかでも４０μｍ～５００μｍの範囲内であることが好ましい。

また、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材が糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団の形成に用いられる場合には、上記幅が、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を管腔化可能なものであることが好ましい。糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を容易に形成可能とすることができるからである。

このような管腔化可能な幅としては、２０μｍ～１０００μｍの範囲内であることが好ましく、なかでも４０μｍ～４００μｍの範囲内であることが好ましい。

【００４０】

本発明に用いられる刺激応答性領域の数としては、本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材内に少なくとも１つ含まれるものであれば特に限定されるものではない。本発明においては、既に説明した図１に示すように、糸状浮遊細胞パターニング基材内に１つであっても良く、図７に例示するように、複数有するものであっても良い。

なお、図７中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００４１】

本発明に用いられる刺激応答性領域の種類としては、１種類のみであっても良く、異なる刺激に応答する複数の刺激応答性領域を含むものであっても良い。

【００４２】

本発明における上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合い、上記細胞接着領域との境界である少なくとも２つの分離された接着境界を有するものである。

ここで、上記接着境界とは、上記刺激応答性領域および細胞接着領域の境界であり、上記刺激応答性領域および細胞接着領域上に細胞同士が結合した、連続したシート状細胞を形成でき、上記刺激応答性領域に刺激を与えた後に、上記刺激応答性領域および細胞接着領域上で連続したシート状細胞を維持できるものであれば特に限定されるものではない。

したがって、通常、上記接着境界は、上記刺激応答性領域と上記細胞接着領域とが平面視上接している箇所を示すものであるが、本発明においては、これに限定されるものではない。例えば、図８に例示するように、上記刺激応答性領域１１および細胞接着領域１２の間に、上記刺激応答性領域１１および細胞接着領域１２上で培養される細胞３０同士が接着することができる幅で配置された細胞非接着領域１３ａ等の他の領域が存在するものであっても良い。

本発明においては、なかでも、平面視上、上記刺激応答性領域および細胞接着領域が接する箇所であること、すなわち、上記刺激応答性領域および細胞接着領域の間に細胞非接着領域を含まない箇所であることが好ましい。本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材を用いて糸状浮遊培養細胞結合集団を形成した際に、上記接着境界で糸状浮遊培養細胞結合集団が切断する等の不具合を低減させ、安定的に糸状浮遊培養細胞結合集団を形成することができるためである。

なお、図８中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここ

での説明は省略する。

【００４３】

また、本発明における接着境界は、上記糸状浮遊培養細胞結合集団が浮遊した糸状となる細胞の起点と終点となる部位である。したがって、既に説明した図１、図３および図５においては、上記刺激応答性領域および細胞接着領域の境界のうち、対向する２辺が接着境界Ｂとなる。

【００４４】

このような本発明おける接着境界同士の位置関係としては、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成できる配置であれば特に限定されるものではなく、例えば、上記接着境界が２つの場合には、２つの上記接着境界が対向して設けられていることが好ましい。上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成することができるからである。

【００４５】

本発明における接着境界の位置としては、上記接着境界間を結ぶように配置された刺激応答性領域、すなわち、上記接着境界間に連続した刺激応答性領域を有するように配置されるものであれば特に限定されるものではない。

例えば、既に説明した図１に示すように、平面視上、上記刺激応答性領域の外周に配置されるものや、図９に例示するように、平面視上、上記刺激応答性領域内に配置されるものや、図１０に例示するように、上記刺激応答性領域内および上記刺激応答性領域の外周に配置されるものとすることができる。

なお、図９および図１０中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。また、上記刺激応答性領域は少なくとも２箇所において上記細胞接着領域と隣り合うものであるが、隣り合うとは、上述のように、上記刺激応答性領域内に配置されるものも含むものである。

【００４６】

本発明に用いられる接着境界の数としては、少なくとも２つであれば特に限定されるものではなく、用途に応じて適宜設定することができる。

例えば、図１１（ａ）および（ｂ）に例示するように３つとすることもできる。

なお、図１１中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００４７】

また、本発明において上記各細胞接着領域との間で形成される接着境界の数としては、１つの刺激応答性領域との間に少なくとも２つの接着境界を形成できるものであれば良い。

したがって、１つの細胞接着領域に１つの上記接着境界を形成するものであっても良く、1つの細胞接着領域に複数の上記接着境界を形成するものであっても良い。

具体的には、既に説明した図１に例示するように、１つの細胞接着領域に１つの接着境界を形成するものであっても良く、図１２（ａ）および（ｂ）に例示するように、１つの細胞接着領域に複数の接着境界Ｂを有するものであっても良い。

なお、図１２中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００４８】

本発明における接着境界の長さとしては、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成できる距離であれば特に限定されるものではなく、２０μｍ以上が好ましい。

【００４９】

本発明に用いられる刺激応答性領域の上記細胞接着領域に対する高さとしては、安定的に糸状浮遊培養細胞結合集団を形成可能であれば特に限定されるものではないが、上記刺激応答性領域および細胞接着領域が同一の高さ、すなわち同一平面上に形成されるものであっても良く、異なるものであっても良い。

【００５０】

本発明に用いられる刺激応答性領域は、上記細胞非接着領域により周囲が囲まれるもの

、すなわち、上記細胞非接着領域が上記刺激応答性領域の周囲に配置され、外周に上記細胞非接着領域との非接着境界を有するものである。

ここで、上記非接着境界は、上記刺激応答性領域に刺激を与えた際に、上記非接着境界に沿って、上記シート状細胞を培地中に浮遊させることができるものであれば特に限定されるものではない。このような非接着境界は、通常、平面視上、上記細胞非接着領域と接しているが、例えば、上記刺激応答性領域および細胞非接着領域の間に、上記刺激応答性領域に刺激を与えた際に、上記非接着境界に沿って、上記シート状細胞を培地中に浮遊させることができる程度の幅で形成された細胞接着領域等の他の領域が存在する箇所も含むものである。

本発明においては、なかでも、平面視上、上記細胞非接着領域と接する箇所であること、すなわち、上記刺激応答性領域および細胞非接着領域の間に他の領域を含まない箇所であることが好ましい。安定的に糸状浮遊培養細胞結合集団を形成することができるからである。

【００５１】

本発明に用いられる刺激応答性領域の上記細胞非接着領域との位置関係としては、少なくとも上記刺激応答性領域の周囲が上記細胞非接着領域により囲まれるものであれば特に限定されるものではなく、既に説明した図１に示すように、平面視上、上記刺激応答性領域の外周において上記非接着境界を有する関係や、図１３に例示するように、上記刺激応答性領域の外周において上記非接着境界を有する関係と上記非接着境界が上記刺激応答性領域内に含まれる関係とを組み合わせたものとすることができる。

なお、図１３中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００５２】

本発明に用いられる刺激応答性領域の上記細胞非接着領域に対する高さとしては、安定的に糸状浮遊培養細胞結合集団を形成可能であれば特に限定されるものではない。

【００５３】

（２）刺激応答性層

本発明に用いられる刺激応答性層は、上記刺激応答性材料を含み、平面視上、露出した表面である刺激応答性領域を有するものである。

【００５４】

（ａ）刺激応答性材料

本発明に用いられる刺激応答性材料としては、刺激の有無により細胞接着性が変化し、培養する細胞の接着および剥離を行なうことができる刺激応答性材料を含むものであれば特に限定されるものではなく、例えば、温度、光、ｐＨ、電位および磁力によりそれぞれ細胞接着性が変化する温度応答性材料、光応答性材料、ｐＨ応答性材料、電位応答性材料、および磁力応答性材料等を挙げることができる。

本発明においては、なかでも、温度応答性材料であることが好ましい。刺激の付与が容易だからである。

【００５５】

本発明に用いられる刺激応答性材料の細胞接着性の変化としては、少なくとも、細胞易接着性を有する状態から細胞非接着性を有する状態に変化することができるものであれば特に限定されるものではなく、可逆的に変化するものであっても良く、非可逆的に変化するものであっても良く、用途によって選択されるものである。

【００５６】

本発明に用いられる刺激応答性材料の上記刺激応答性層中の含有量としては、刺激により上記刺激応答性層の表面である刺激応答性領域に所望の接着性の変化を得られるものであれば特に限定されるものではなく、上記材料の種類等によって異なるものである。

【００５７】

本発明に用いられる温度応答性材料は、温度変化により、細胞接着性が変化するものであれば特に限定されるものではない。

本発明における温度応答性材料の細胞易接着性を発揮する温度領域が、１０℃～４５℃の範囲内であることが好ましく、なかでも、３３℃～４０℃の範囲内であることが好ましい。上記温度領域が上述の範囲内であることにより、細胞を安定的に培養することができるからである。

【００５８】

本発明における温度応答性材料の細胞非接着性を発揮する温度領域が、１℃～３６℃の範囲内であることが好ましく、なかでも、４℃～３２℃の範囲内であることが好ましい。上記温度領域が上述の範囲内であることにより、細胞へのダメージの少ないものとすることができるからである。

【００５９】

このような本発明に用いられる温度応答性材料としては、具体的には、ポリ－Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＰＩＰＡＡｍ）、ポリ－Ｎ－ｎ－プロピルアクリルアミド、ポリ－Ｎ－ｎ－プロピルメタクリルアミド、ポリ－Ｎ－エトキシエチルアクリルアミド、ポリ－Ｎ－テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、ポリ－Ｎ－テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド、及び、ポリ－Ｎ，Ｎ－ジエチルアクリルアミド等を挙げることができ、なかでもＰＩＰＡＡｍ、ポリ－Ｎ－ｎ－プロピルメタクリルアミド、ポリ－Ｎ，Ｎ－ジエチルアクリルアミドを好ましく用いることができ、特に、ＰＩＰＡＡｍを好ましく用いることができる。細胞易接着性を有する温度領域および細胞非接着性を有する温度領域が上述の温度領域であり、ダメージの少ないものとすることができるからである。

また、本発明においては、上記温度応答性材料が１種類のみからなるものであっても良く、２種類以上含むものであっても良い。また、温度領域の調整するため、上記温度応答性材料同士および／またはその他のポリマーと共重合したものを用いるものであっても良い。

【００６０】

本発明に用いられる光応答性材料としては、光照射の有無により細胞接着性が変化するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、特開２００５－２１０９３６号公報に開示されるような、光触媒や、アゾベンゼン、ジアリールエテン、スピロピラン、スピロオキサジン、フルギドおよびロイコ色素等の光応答成分を含むものを用いることができる。

【００６１】

本発明に用いられる電位応答性材料としては、電位の印加により、細胞接着性が変化するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、特開２００８－２９５３８２号公報に開示されるような、電極と、ＲＧＤ配列を含むペプチド等の細胞易接着性部分を有し、上記電極表面にチオレートを介して結合するアルカンチオール、システイン、アルカンジスルフィド等のスペーサ物質とを有するものを挙げることができる。

【００６２】

本発明に用いられる磁力応答性材料としては、磁力の付与・除去により細胞接着性が変化するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、特開２００５－３１２３８６号公報に開示されるような、フェライト等の磁性粒子を正電荷リポソームに封入した磁性粒子封入正電荷リポソームを挙げることができる。

【００６３】

（ｂ）刺激応答性層

本発明に用いられる刺激応答性層は、少なくとも上記刺激応答性材料を含むものである。

本発明においては、上記刺激応答性を阻害しない範囲内において、必要に応じて、レベリング剤、可塑剤、界面活性剤、消泡剤、増感剤等の添加剤や、ポリビニルアルコール、不飽和ポリエステル、アクリル樹脂、ポリエチレン、ジアリルフタレート、エチレンプロピレンジエンモノマー、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、ポリウレタン、メラミン樹脂、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、ポリイミド、スチレンブタジエンゴム、クロロプレンゴム、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、

ナイロン、ポリエステル、ポリブタジエン、ポリベンズイミダゾール、ポリアクリルニトリル、エピクロルヒドリン、ポリサルファイド、ポリイソプレンや、ポリエチレングリコール、ＭＰＣポリマー（商品名）等の両性イオン高分子等のバインダー樹脂を含むものであっても良い。

【００６４】

本発明に用いられる刺激応答性層の膜厚としては、刺激応答性を発揮することができるものであれば特に限定されるものではなく、具体的には、０．５ｎｍ～ ３００ｎｍの範囲内であることが好ましく、なかでも１ｎｍ～１００ｎｍの範囲内であることが好ましい。

【００６５】

本発明に用いられる刺激応答性層の形成方法としては、所望のパターンに形成可能であれば特に限定されるものではない。

具体的には、上記刺激応答性材料を含む刺激応答性材料組成物をスピンコート等の公知の塗布方法を用いて塗布し、フォトリソ法によりパターニングする方法や、グラビア印刷やフレキソ印刷、スクリーン印刷、インクジェット法などの公知のパターン塗布法を用いて上記刺激応答性材料組成物をパターン状に塗布する方法を挙げることができる。

また、上記刺激応答性層が、刺激応答性材料として光触媒等の無機物のみからなるものである場合には、スパッタリング法、ＣＶＤ法、真空蒸着法等の真空製膜法を用いる方法を挙げることができる。均一な膜厚の層とすることができるからである。

【００６６】

２．細胞接着領域

本発明に用いられる細胞接着領域は、上記細胞接着材料を含む細胞接着層の表面のうち、露出した範囲であり、細胞易接着性を有し細胞を接着することができるものである。

【００６７】

（１）細胞接着領域

本発明における細胞接着領域は、上記刺激応答性領域との間で接着境界を形成するものである。

【００６８】

このような細胞接着領域の細胞接着性の程度としては、所望の細胞易接着性を示すものであれば特に限定されるものではなく、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を発現している場合の細胞接着性と同様とすることができる。

【００６９】

本発明における細胞接着領域の数、形状、配置としては、刺激応答性領域と細胞接着領域とが少なくとも２つの接着境界を有することができるものであれば良い。既に説明した図１に示すように細胞接着領域が複数の領域に分かれたものであっても良く、また図１２に示すように刺激応答性領域と１の細胞接着領域が少なくとも２つの接着境界をもつように配置されたものであっても良い。

【００７０】

本発明に用いられる細胞接着領域の形状としては、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に接着・支持できるものであれば特に限定されるものではない。

【００７１】

本発明に用いられる細胞接着領域の１つ当りの面積としては、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に接着・支持できるものであれば特に限定されるものではない。

【００７２】

本発明に用いられる細胞接着領域の種類としては、１種類のみであっても良く、異なる細胞接着材料を含む細胞接着領域を含むものであっても良い。

【００７３】

本発明に用いられる細胞接着領域の上記細胞非接着領域との関係としては、上記細胞非接着領域とが接していても良く、接していない状態であっても良い。目的とする糸状浮遊培養細胞結合集団のパターンに応じて適宜設定されるものである。

【００７４】
本発明に用いられる細胞接着領域の上記細胞非接着領域に対する高さとしては、安定的に糸状浮遊培養細胞結合集団を形成可能であれば特に限定されるものではなく、既に説明した図２に示すように、上記細胞非接着領域より低いものであっても良く、図１４に例示するように、上記細胞非接着領域より高いものであっても良い。
なお、図１４中の符号については、図１のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。
【００７５】
（２）細胞接着層
本発明に用いられる細胞接着層としては、上記細胞接着材料を含むものであれば特に限定されるものではなく、例えば生物化学的特性により細胞易接着性を有するものであってもよく、また物理化学的特性により細胞易接着性を有するもの等であってもよい。
このような細胞接着材料としては、一般的な細胞培養基板等に用いられる細胞接着材料を用いることができ、例えば物理化学的特性により細胞と接着する材料としては、例えば親水化ポリスチレン、ポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、Ｎ－（２－アミノエチル）－３－アミノプロピルトリメトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。
また、生物化学的に細胞と接着性を有する材料としては、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、ＲＧＤ（アルギニン－グリシン－アスパラギン酸）配列含有ペプチド、ＹＩＧＳＲ（チロシン－イソロイシン－グリシン－セリン－アルギニン）配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、およびこれらの混合物、例えばマトリゲル等が挙げられる。
また、各種ガラス、プラズマ処理を施したポリスチレン、ポリプロピレン等が挙げられる。
【００７６】
本発明に用いられる細胞接着層が含有可能な添加剤やバインダー樹脂、ならびに膜厚および形成方法としては、上記「１．刺激応答性領域」の項に記載の内容と同様とすることができる。
【００７７】
３．細胞非接着領域
本発明に用いられる細胞非接着領域は、上記細胞非接着材料を含む細胞非接着層の表面のうち、露出した範囲であり、細胞非接着性を有するものである。
【００７８】
（１）細胞非接着領域
本発明に用いられる細胞非接着領域は、少なくとも上記刺激応答性領域の周囲に配置されるものである。
【００７９】
このような細胞非接着領域の細胞接着性の程度としては、所望の細胞非接着性を示すものであれば特に限定されるものではなく、上記刺激応答性領域が細胞非接着性を発現している場合の細胞接着性と同様とすることができる。
【００８０】
本発明における細胞非接着領域の数としては、上記刺激応答性領域の形状のシート状細胞を形成することができるものであれば特に限定されるものではなく、既に説明した図１に示すように１つであっても良く、既に説明した図１２および１３に示すように複数であっても良い。
【００８１】
本発明に用いられる細胞非接着領域の形状としては、少なくとも上記刺激応答性領域の周囲を囲み、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に形成できるものであれば特に限定されるものではない。
【００８２】

本発明に用いられる細胞非接着領域の種類としては、１種類のみであっても良く、異なる細胞非接着材料を含む複数の細胞非接着領域を含むものであっても良い。

【００８３】

本発明に用いられる細胞非接着領域の上記刺激応答性領域との非接着境界からの幅としては、上記刺激応答性領域の形状に細胞を接着させ培養することができるものであれば良く、例えば、５μｍ以上であることが好ましく、なかでも、１０μｍ以上であることが好ましい。

【００８４】

（２）細胞非接着層

本発明に用いられる細胞非接着層は、細胞非接着材料を含むものである。

このような細胞非接着材料としては、細胞と非接着性を有するものであれば良く、例えば水和能の高い材料を用いることができる。水和能の高い材料を細胞非接着材料として用いた場合には、細胞非接着材料の周りに水分子が集まった水和層が形成される。通常、このような水和能の高い物質は水分子との親和性の方が細胞との親和性より高いことから、細胞は上記水和能の高い材料と接着することができず、細胞との接着性が低いものとなるのである。ここで、上記水和能とは、水分子と水和する性質をいい、水和能が高いとは、水分子と水和しやすいことをいうこととする。

本発明において水和能が高く細胞非接着材料として用いられる材料としては、例えばポリエチレングリコールや、ベタイン構造等を有する両性イオン材料、リン脂質含有材料等が挙げられる。

【００８５】

また、上記細胞非接着材料として、撥水性または撥油性を有する材料や、超親水性を有する材料も用いることができる。

細胞非接着材料の撥水性や撥油性、または超親水性によって、細胞と細胞非接着材料との間における相互作用を小さいものとすることができ、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。

上記撥水性または撥油性を有する材料としては、例えば撥水性または撥油性の有機置換基を有するものを用いることができ、具体的にはゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等や撥水性または撥油性の有機置換基を有する界面活性剤も用いることができる。

上記界面活性剤としては、例えば、日光ケミカルズ（株）製ＮＩＫＫＯＬ　ＢＬ、ＢＣ、ＢＯ、ＢＢの各シリーズ等の炭化水素系、デュポン社製ＺＯＮＹＬ　ＦＳＮ、ＦＳＯ、旭硝子（株）製サーフロンＳ－１４１、１４５、大日本インキ化学工業（株）製メガファックＦ－１４１、１４４、ネオス（株）製フタージェントＦ－２００、Ｆ２５１、ダイキン工業（株）製ユニダインＤＳ－４０１、４０２、スリーエム（株）製フロラードＦＣ－１７０、１７６等のフッ素系あるいはシリコーン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

さらに上記超親水性を有する材料としては、エネルギー照射に伴う光触媒の作用等によって、上記オルガノポリシロキサン等の有機置換基を分解したもの等が挙げられる。

【００８６】

なお、上記細胞非接着材料は、界面活性を有することが好ましい。例えば、上記細胞非接着材料を含有する細胞非接着材料組成物を塗布した後、乾燥させる際等に、塗膜表面に偏在する割合が高まり、結果として良好な細胞非接着性を得られるからである。

【００８７】

本発明に用いられる細胞非接着層が含有可能な添加剤やバインダー樹脂、ならびに膜厚および形成方法としては、上記「１．刺激応答性領域」の項に記載の内容と同様とすることができる。

【００８８】

４．糸状浮遊細胞パターニング基材

本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材は、少なくとも、上記刺激応答性領域、細胞接着領域、および細胞非接着領域を含むものである。

本発明においては、既に説明した図２に示すように、上記刺激応答性領域、細胞接着領域、および細胞非接着領域を構成する刺激応答性層、細胞接着層および細胞非接着層を支持する基材を含むものであっても良い。

【００８９】

このような基材としては、上記刺激応答性層、細胞接着層および細胞非接着層等を支持することができるものであれば特に限定されるものではない。

このような基材としては、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）、ポリスチレン（ＰＳ）、ポリカーボネート（ＰＣ）、ＴＡＣ（トリアセチルセルロース）、ポリイミド（ＰＩ）、ナイロン（Ｎｙ）、低密度ポリエチレン（ＬＤＰＥ）、中密度ポリエチレン（ＭＤＰＥ）、塩化ビニル、塩化ビニリデン、ポリフェニレンサルファイド、ポリエーテルサルフォン、ポリエチレンナフタレート、ポリプロピレン、アクリル等が挙げられる。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクタン、もしくはその共重合体のような生分解性ポリマーであってもよい。

本発明においては、なかでも、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリカーボネートを好ましく用いることができ、特に、ポリエチレンテレフタレートを好ましく用いることができる。透明性、寸法安定性、機械的性質、電気的性質、耐薬品性等の性質に優れているからである。

【００９０】

また、図１５（ａ）および（ｂ）に例示するように、上記刺激応答性層１が、上記細胞接着層２および細胞非接着層３を支持する基材として用いられるように、上記刺激応答性層、細胞接着層および細胞非接着層のいずれかを、他の層を支持する基材とするものであっても良い。

【００９１】

さらに、必要に応じて、露出表面を有さない他の層や、他の領域となる露出表面を有する他の層を含むものであっても良い。

【００９２】

本発明の糸状浮遊細胞パターニング基材の用途としては、種々の細胞からなる糸状浮遊培養細胞結合集団が形成された糸状浮遊培養細胞結合集団付基板に用いることができる。

なお、このような用途に用いられる細胞としては、血球系等の非接着性細胞、細胞間結合の弱い細胞以外なら、生体に存在するあらゆる組織とそれに由来する細胞を用いることができる。

具体的には、後述する血管内皮細胞や、心筋細胞等の筋肉系の細胞等を用いることができ、これらの細胞からなる糸状浮遊培養細胞結合集団（糸状浮遊細胞パターン）が形成された浮遊培養細胞結合集団付基板（糸状浮遊細胞パターン付基板）を形成し、さらに、上記浮遊培養細胞結合集団付基板を用いて化合物アッセイ等種々の評価・分析等に用いることができる。

【００９３】

Ｂ．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法

次に、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法について説明する。

本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法は、上記糸状浮遊細胞パターニング基材に含まれる刺激応答性領域および細胞接着領域上に、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を有する条件で、血管内皮細胞を播種・培養することにより、上記刺激応答性領域および細胞接着領域に接着したシート状血管内皮細胞を形成する血管内皮細胞培養工程と、上記刺激応答性領域に刺激を与え、細胞非接着性を発現させることにより、上記シート状血管内皮細胞のうち上記刺激応答性領域に接着していた血管内皮細胞を培地中に浮遊させ、上記細胞接着領域に接着した糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を形成する刺激付与工程と、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を培地中に浮遊させた状態で培

養し、管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とする管腔化工程と、を有することを特徴とするものである。

【００９４】

このような本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法について、図を参照して説明する。図１６は、本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法の一例を示す工程図であり、図１７は図１６のＸ－Ｘ線断面図である。図１６および１７に例示するように、本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法は、上記糸状浮遊細胞パターニング基材１０に含まれる刺激応答性層１の刺激応答性領域１１および細胞接着層の細胞接着領域１２上に、上記刺激応答性領域１１が細胞易接着性を有する条件で、血管内皮細胞３１を播種・培養することにより(図１６（ａ）および図１７（ａ))、上記刺激応答性領域１１および細胞接着領域１２に接着したシート状血管内皮細胞３２を形成する血管内皮細胞培養工程(図１６（ｂ）および図１７（ｂ))と、上記刺激応答性領域１１に刺激を与え、細胞非接着性を発現させることにより、上記シート状血管内皮細胞３２のうち上記刺激応答性領域１１に接着していた血管内皮細胞を培地中に浮遊させ、上記細胞接着領域１２に接着した糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団３３を形成する刺激付与工程(図１６（ｃ）および図１７（ｃ))と、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団３３を培地中に浮遊させた状態で培養し、管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団３４を形成し、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団３４を有する糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板２０を形成する管腔化工程(図１６（ｄ）および図１７（ｄ))と、を有するものである。

なお、図１６および１７中の符号については、図１および２のものと同一の部材を示すものであるので、ここでの説明は省略する。

【００９５】

本発明によれば、上記糸状浮遊細胞パターニング基材を用いることにより、容易に糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を得ることができる。

【００９６】

本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法は、血管内皮細胞培養工程、刺激付与工程および管腔化工程を少なくとも有するものである。

【００９７】

１．血管内皮細胞培養工程

本発明の製造方法における血管内皮細胞培養工程は上述の糸状浮遊細胞パターニング基材に含まれる刺激応答性領域および細胞接着領域上に、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を有する条件で、血管内皮細胞を播種・培養することにより、上記刺激応答性領域および細胞接着領域に接着したシート状血管内皮細胞を形成する工程である。

【００９８】

本工程において用いられる血管内皮細胞は、培養により血管を形成する細胞であれば特に限定されるものではなく、各生物、特に動物より得られるものを用いることができる。

【００９９】

本工程において、上記刺激応答性領域が細胞易接着性を有する条件としては、上記刺激応答性領域を構成する刺激応答性材料の種類により異なるものであり、上述の細胞易接着性を発揮することができる条件であれば特に限定されるものではない。

具体的には、上記刺激応答性材料がＰＩＰＡＡｍである場合には、上記刺激応答性領域を３２℃より高い温度条件とすることが挙げられる。

【０１００】

本工程において上記血管内皮細胞を播種する方法としては、上記刺激応答性領域および上記刺激応答性領域と少なくとも２つの分離された接着境界を形成する細胞接着領域上に均一に血管内皮細胞を播種する方法であれば特に限定されるものではなく、一般的な播種方法を用いることができる。例えば、上記糸状浮遊細胞パターニング基材を培地中に浸漬させた状態で、上記血管内皮細胞を播種する方法を挙げることができる。

【０１０１】

本工程において上記血管内皮細胞を培養する方法としては、上記刺激応答性領域および細胞接着領域に接着したシート状血管内皮細胞を形成することができる方法であれば特に限定されるものではなく、一般的な培養方法を用いることができる。

【０１０２】

本工程において形成されるシート状血管内皮細胞は、血管内皮細胞同士が結合しているものであり、上記刺激応答性領域から剥離した場合であっても、細胞同士が結合した状態を維持できるものである。

【０１０３】

２．刺激付与工程

本発明の製造方法における刺激付与工程は、上記刺激応答性領域に刺激を与え、細胞非接着性を発現させることにより、上記シート状血管内皮細胞のうち上記刺激応答性領域に接着していた血管内皮細胞を培地中に浮遊させ、上記細胞接着領域に接着した糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を形成する工程である。

【０１０４】

本工程において上記刺激応答性領域に刺激を与える方法としては、上記刺激応答性領域に細胞非接着性を発現させ、上記刺激応答性領域から上記シート状血管内皮細胞を剥離させることにより、糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を形成できることができる方法であれば良く、上記刺激応答性領域の種類により異なるものである。

具体的には、上記刺激応答性材料がＰＩＰＡＡｍである場合には、上記シート状血管内皮細胞が付着した糸状浮遊細胞パターニング基材を、３２℃以下の温度に設定されたインキュベーター内に静置する方法等を用いることができる。

【０１０５】

また、本工程においては、上記刺激応答性領域に刺激を与えた後に、上記刺激応答性領域にピペッティング等の外部応力を加える処理を行うものであっても良い。上記シート状血管内皮細胞をより安定的に剥離させることができるからである。

【０１０６】

なお、上記刺激応答性領域から剥離され、足場を失ったシート状血管内皮細胞の各細胞は表面積を小さくするように収縮する。したがって、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団は、上記刺激応答性領域から剥離したシート状血管内皮細胞により自発的に形成される。

【０１０７】

３．管腔化工程

本発明の製造方法における管腔化工程は、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を培地中に浮遊させた状態で培養し、管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とする工程である。

【０１０８】

本工程において、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を培地中に浮遊させた状態で培養する方法としては、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団を管腔化させ糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とすることができる方法であれば特に限定されるものではない。

【０１０９】

本工程においては、なかでも、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団が上記刺激応答性領域に再接着しない条件で培養する培養方法であることが好ましい。糸状の糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団が浮遊した状態を保つことにより、３次元培養による影響をより精度良く評価することができるからである。

このような培養方法としては、例えば、上記刺激応答性領域が細胞非接着性を発現させた状態で培養する方法を挙げることができる。より具体的には、上記刺激応答性材料がＰＩＰＡＡｍである場合、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団が上記細胞接着領域に付着した糸状浮遊細胞パターニング基材を、３２℃以下の温度に設定されたインキュベーター内に静置して培養する方法を用いることができる。

また、上記刺激応答性領域が、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団の培地中に浮遊する部位が平面視上位置する領域と重ならない形状の糸状浮遊細胞パターニング基材を使用する培養方法であっても良い。

【０１１０】

また、本工程における培養方法としては、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団に管腔化を促す成長因子等を培地中に添加した状態で培養する方法であることが好ましい。

なお、このような成長因子等としては、例えば、ｂＦＧＦやＶＥＧＦ等を挙げることができる。

【０１１１】

４．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法

本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法は、血管内皮細胞培養工程、刺激付与工程および管腔化工程を少なくとも有するものである。

本発明においては、上記工程に加えて、上記血管内皮細胞の状態を確認する確認工程等のその他の工程を含むものであっても良い。

【０１１２】

Ｃ．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板

次に糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板について説明する。

本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板は、細胞易接着性を有する細胞接着領域を有する基板と、上記細胞接着領域に２箇所で接着し、培地中に浮遊している管腔化血管内皮細胞を含む糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団と、を有することを特徴とするものである。

【０１１３】

このような糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板について、図を参照して説明する。既に説明した図１６（ｄ）および図１７（ｄ）に例示するように、本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板２０は、細胞接着領域１２を含む糸状浮遊細胞パターニング基材１０と、上記糸状浮遊細胞パターニング基材１０に含まれる刺激応答性領域１１と少なくとも２つの分離された接着境界を形成する細胞接着領域１２に接着し、培地中に浮遊している管腔化血管内皮細胞を含む糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団３４とを有するものである。

【０１１４】

本発明によれば、３次元パターン状に形成された糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の評価を容易に行うことができる。

【０１１５】

本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板は、基板と、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団とを有するものである。

以下、本発明の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板の各構成について説明する。

【０１１６】

１．基板

本発明に用いられる基板は、細胞易接着性を有する細胞接着領域を有するものである。

このような細胞接着領域を有する基板としては、糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を所望のパターンで接着可能なものであれば特に限定されるものではなく、上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団が２箇所で接着可能なように設けられた細胞接着領域のみを有する基板や、上記糸状浮遊細胞パターニング基材を用いることができる。本発明においては、なかでも、上記糸状浮遊細胞パターニング基材であることが好ましい。上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団を容易に形成できるからである。

なお、上記糸状浮遊細胞パターニング基材の各構成については、上記「Ａ．糸状浮遊細胞パターニング基材」の項に記載した内容と同様であるので、ここでの説明は省略する。

【０１１７】

本発明においては、なかでも、上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団が上記刺

激応答性領域に再接着しないものであることが好ましい。糸状の糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団が浮遊した状態を保つことにより、３次元培養による影響をより精度良く評価することができるからである。

上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団が上記刺激応答性領域に再接着しないものとしては、例えば、上記刺激応答性領域が細胞非接着性を発現させた状態のものを用いることができる。より具体的には、上記刺激応答性材料がＰＩＰＡＡｍである場合には、上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団が付着した糸状浮遊細胞パターニング基材を、３２℃以下の温度まで低下させたものを用いることができる。

また、上記刺激応答性領域が、上記糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団の培地中に浮遊する部位が平面視上位置する領域と重ならない形状の糸状浮遊細胞パターニング基材を用いるものであっても良い。細胞にダメージを与えるような刺激を継続して与えなければ細胞非接着性を発現しない刺激応答性材料を用いた場合であっても、上記刺激を一度与えるだけで、上記糸状浮遊培養細胞結合集団を安定的に保持し培養することができ、細胞へのダメージの少ないものとすることができるからである。

【０１１８】

２．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団

本発明に用いられる糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団は、上記細胞接着領域に接着し、培地中に浮遊している管腔化血管内皮細胞を含むものであれば特に限定されるものではない。

【０１１９】

このような糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の数は、１本であっても良く、２本以上であっても良い。

また、上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団は、分岐を有するものであっても良く、分岐を含まないものであっても良い。

【０１２０】

本発明に用いられる糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の形成方法としては、上記基板の細胞接着領域に安定的に接着させたものとする方法であれば特に限定されるものではなく、例えば、上記「Ｂ．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法」の項に記載の方法や、ピンセット等を用いて上記管腔化血管内皮細胞の端部を上記基板に含まれる細胞接着領域に接着させる方法を用いることができる。本発明においては、なかでも、上記「Ｂ．糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の製造方法」の項に記載の方法を用いることが好ましい。上記糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団の形成が容易だからである。

【０１２１】

なお、本発明は、上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

【実施例】

【０１２２】

以下、本発明について実施例および比較例を用いて具体的に説明する。

【０１２３】

［実施例１］

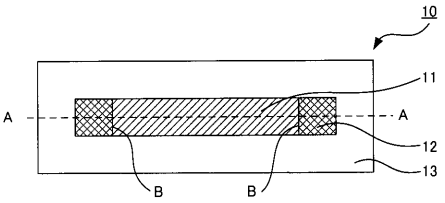
（１）温度応答性フィルムの作製

Ｎ－イソプロピルアクリルアミドを、最終濃度２０重量％になるようにイソプロピルアルコール（ＩＰＡ）に溶解させた。市販の易接着性ポリエチレンテレフタレートフィルム（三光産業社より入手、透明５０－Ｆセパ１０９０）（以下において「易接着ＰＥＴ」と略することがある）を調達し、これを１０ｃｍ角に切断した。ここに上記溶液を、易接着ＰＥＴの易接着面に展開し、ミヤバーでコーティングした。電子線照射装置（岩崎電気社製）を用いて該サンプル上に電子線照射を行い、該溶液をグラフト重合した。このときの電子線照射線量は３００ｋＧｙであった。

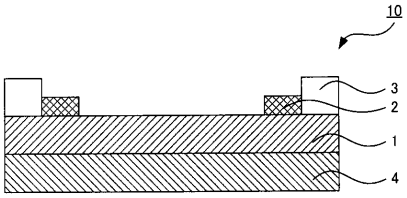
【０１２４】
（２）細胞接着阻害領域の形成
メタクリロキシシラン（モメンティブパフォーマンスマテリアルズ社より入手、ＴＳＬ８３７０）を用意し、これをイソプロピルアルコール（ＩＰＡ）で０．１重量％になるように希釈した。
上記で得られたフィルムを、０．７ｍｍ厚ガラスにテープで固定し、スピンナー（ミカサ製）を用いて、メタクリロキシシランをコーティングし、シラン処理を行った。このときのスピンナー法の条件は７００ｒｐｍ×３秒であった。
次いで、ポリエチレングリコールジアクリレート（分子量３００、アルドリッチ社より入手）が最終濃度５０重量％になるように、純水で希釈し、ここに、重合開始剤として、２－ヒドロキシ－４’－（２－ヒドロオキシエトキシ）－２－メチルプロピオフェノン（アルドリッチ社より入手）を最終濃度１重量％になるように加えた。この溶液をスターラーで１５分間攪拌した。
【０１２５】
これをシラン処理したフィルム上に１ｍＬ展開し、１５０μｍ厚ＰＥＴフィルム（東レ株式会社製）を用いて所望のパターン形状が形成されるように、マスキングした。次いで、フォトマスクをマスキングフィルム上からギャップ２００μｍ離してセットし、５００ｍＷマルチライト（ウシオ電機社製）を用いて、１０秒間光照射した。光照射条件は、波長、３６５ｎｍで、照度は７５ｍＷ／ｃｍ^{2}であった。
その後、マスキングフィルムを剥離し、シラン処理基材上にポリエリレングリコールジアクリレートが固定化されていることを目視で確認した。これにより、２００μｍ線幅の網状温度応答性領域を残して細胞非接着領域を設けた。
【０１２６】
（３）細胞接着領域の形成
６０ｍｍφディッシュに細胞非接着領域が設けられた温度応答性フィルムを貼り付け、ＥＯＧ滅菌後、網パターン周囲にコラーゲンTypeⅠで細胞接着領域を設け、３７℃インキュベーターにて２時間放置した。
これにより、細胞接着領域と、細胞非接着領域と、細胞接着領域および細胞非接着領域の開口部に形成された刺激応答性領域（温度応答性領域）と、を有する糸状浮遊細胞パターニング基材を作製した。
【０１２７】
（４）細胞培養
続いて、上記糸状浮遊細胞パターニング基材上に、ウシ血管内皮細胞(Ｐ２０)を1×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}の密度で播種し６日間培養後、２０℃インキュベーターに移した。２０℃インキュベーター内では、温度応答性領域が細胞非接着領域となるため、網状パターンに接着していた細胞結合集団は基材から剥離した。
そして、周囲を把持されパターンを維持した状態で培地中を浮遊した状態となった。２０℃で７日間培養後、３７℃で２４時間培養し、細胞をCalcein(同仁化学社製Calcein-AM solution)染色した。共焦点顕微鏡で観察すると、図１８に示すように、糸状浮遊培養細胞結合集団結合集団の断面が中空管構造となっている様子が観察された。
【符号の説明】
【０１２８】
１　…　刺激応答性層
２　…　細胞接着層
３　…　細胞非接着層
４　…　基材
１０　…　糸状浮遊細胞パターニング基材
１１　…　刺激応答性領域
１２　…　細胞接着領域
１３　…　細胞非接着領域

２０　…　糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団付基板
２１　…　細胞
３１　…　血管内皮細胞
３２　…　シート状血管内皮細胞
３３　…　糸状浮遊培養血管内皮細胞結合集団
３４　…　糸状浮遊培養管腔化血管内皮細胞結合集団

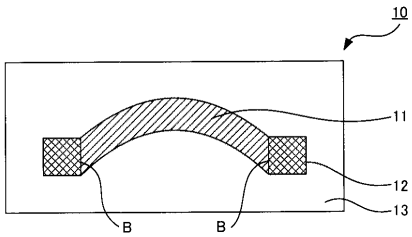
【図１】



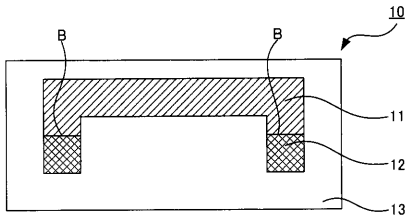
【図２】



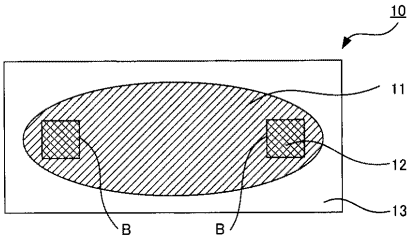
【図３】



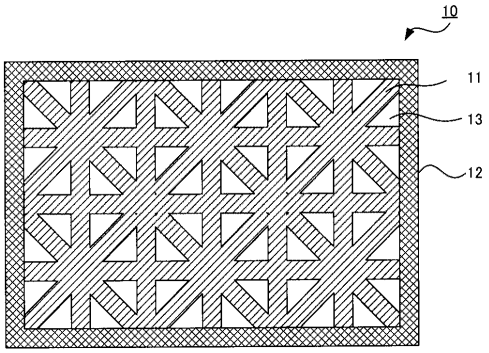
【図４】



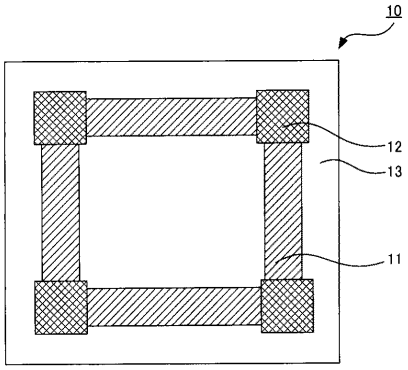
【図５】



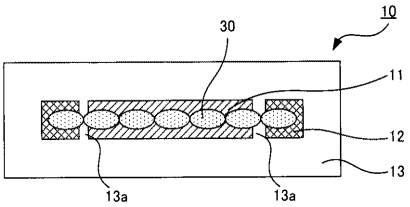
【図６】



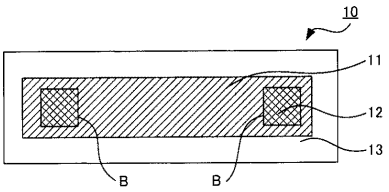
【図７】



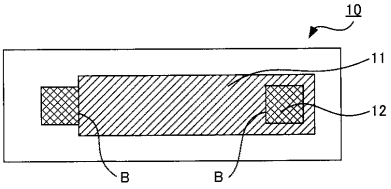
【図８】



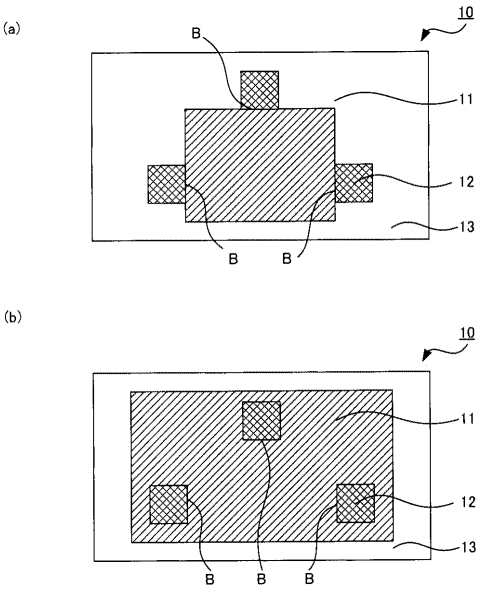
【図９】



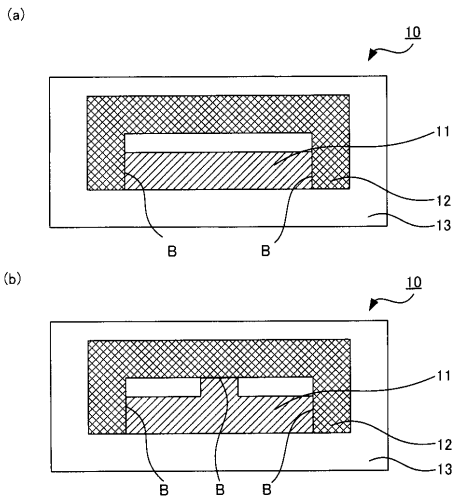
【図１０】



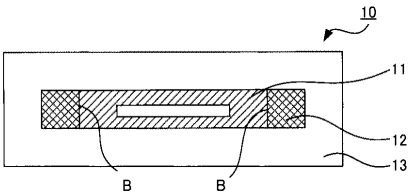
【図１１】



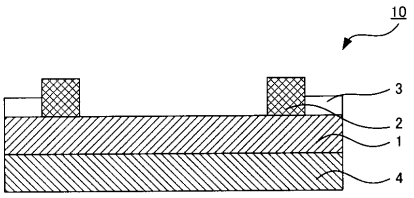
【図１２】



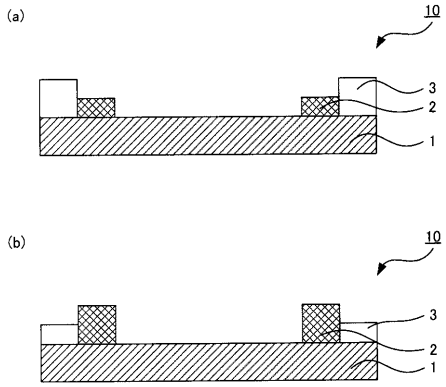
【図１３】



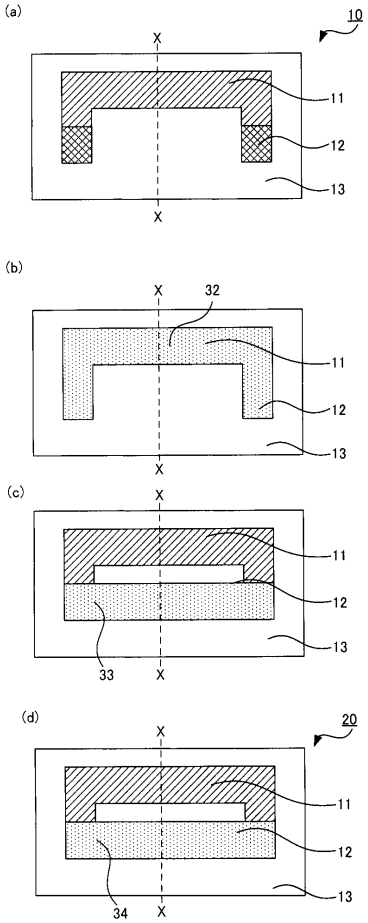
【図１４】



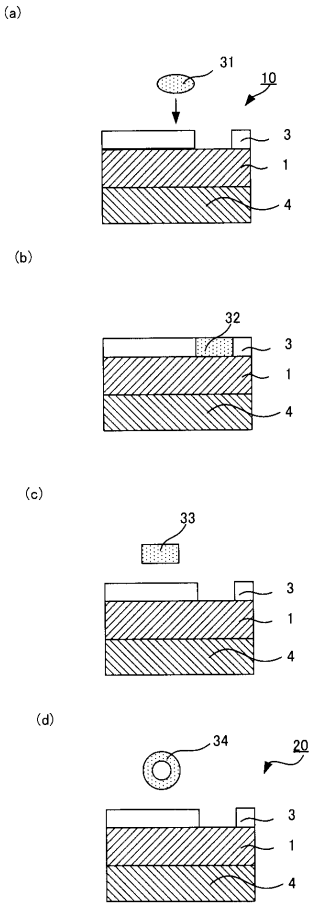
【図１５】



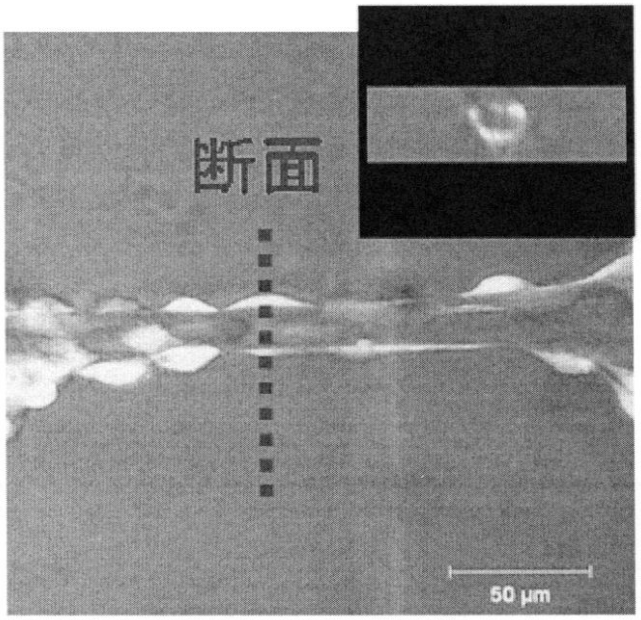
【図１６】



【図１７】



【図１８】



フロントページの続き

(72)発明者　岡野　光夫
東京都新宿区河田町８－１　学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者　大和　雅之
東京都新宿区河田町８－１　学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者　清水　達也
東京都新宿区河田町８－１　学校法人東京女子医科大学内

Ｆターム(参考) 4B029 AA21 BB11 CC01 CC02
4B065 AA90X AC20 BC41 CA44