(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 10 月 2 日(02.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/156455 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054875

(22) 国際出願日: 2014 年 2 月 27 日(27.02.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-069810 2013 年 3 月 28 日(28.03.2013) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 後藤　俊(GOTO, Shun); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地　富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 伊藤　晃寿(ITO, Koju); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地　富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 小橋　創一(KOHASHI, Souichi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地　富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 山崎　英数(YAMAZAKI, Hidekazu); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地　富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 小林　和憲(KOBAYASHI, Kazunori); 〒1700004 東京都豊島区北大塚２丁目２５番１号 太陽生命大塚ビル３階 Tokyo (JP).

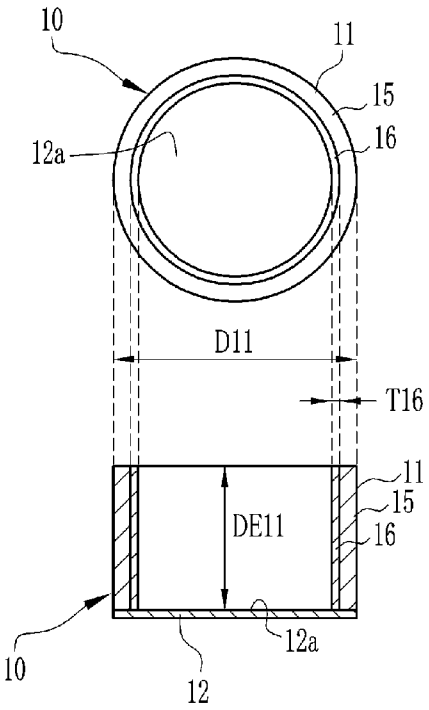
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) **Title**: CELL CULTURING TOOL

(54) 発明の名称 : 細胞培養用具



(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to culture cells while preventing the migration of the cells to the periphery of a culturing surface. A well (10) is equipped with a container main body (11) and a culture support (12). The culture support (12) has multiple pores formed on a culturing surface (12a) thereof on which cells are to be cultured, and is therefore formed unevenly. The percentage of the volume of a zone in the culture support (12), which is located between the culturing surface (12a) and an area located at a depth of 0.1 μm, is 5 to 80% inclusive, and the culturing surface (12a) has an aperture ratio of 30 to 95% inclusive. The container main body is composed of a cylindrical member (15) made of polystyrene and a low-affinity part (16). The low-affinity part (16) is formed as a coating film that covers the inside surface of a side wall of the cylindrical member (15). The low-affinity part (16) is made of PEG and has lower affinity for cells compared with the culturing surface (12a).

(57) 要約:　細胞を培養面の周囲に移動させることなく培養する。　ウェル（１０）は、容器本体（１１）と培養担体（１２）とを備える。培養担体（１２）は、細胞を培養する培養面（１２ａ）に複数の孔が形成されており凹凸がある。培養担体（１２）の培養面（１２ａ）から深さ０．１μｍまでの範囲における容積率は５％以上８０％以下の範囲であり、培養面（１２ａ）における開口率は３０％以上９５％以下の範囲である。容器本体は、ポリスチレン製の円筒部材（１５）と、低親和性部（１６）とから構成されている。低親和性部（１６）は、円筒部材（１５）の側壁内面を覆う被膜として形成されている。低親和性部（１６）は、ＰＥＧにより形成されており、培養面（１２ａ）よりも細胞との親和性が低い。

WO 2014/156455 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 細胞培養用具

技術分野

[0001] 本発明は、細胞を培養する細胞培養用具に関する。

背景技術

[0002] 微小な孔がフィルム面に沿って複数並んで形成されることによりハニカム構造とされたハニカム構造フィルムは、細胞を培養する培養担体として利用されている。このハニカム構造フィルムは、例えば、結露法により製造される。結露法は、フィルムを形成するための溶液を流延して流延膜を形成し、この流延膜に結露させて溶媒と水滴とを蒸発させることによりフィルムを製造する方法である。この結露法によると、極めて微小な孔が形成されるので、得られるフィルムは、細胞を培養する培養面が平坦なフィルム及び細胞培養シャーレに比べて、伸長が抑えられた細胞がうまれやすいとともにスフェロイド（細胞凝集体）が形成しやすい。

[0003] スフェロイドは、生体に類似した挙動を示すために、生体外で生体内の細胞挙動を模倣した実験を行う場合等に非常に有用である。このようにスフェロイドを形成する培養担体としては、結露法で形成されたハニカム構造フィルムの他に、ナノインプリント法を用いて製造されたものがある。例えば、特許文献１の培養担体は、ナノインプリント法により、培養面におけるセル間の幅が３μｍ以下、深さが１０ｎｍ以上で、培養面の垂直方向からみたセルの形状が多角形とされている。このように、特許文献１の培養担体も結露法で形成されたハニカム構造フィルムと同様に、培養面に微小な凹部をもつ。

[0004] また、特許文献２の培養容器は、培養床と親水性の層とを備える。培養床は培養容器の内面の細胞が接触する部分に設けられ、親水性の層は培養容器の内面の培養液が接触する部分に設けられる。これにより、特許文献２の培養容器は、培養床以外の部分に生理活性物質が接着することを防止するとと

もに、細胞の接着も防止している。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第４１５９１０３号公報

特許文献2：特開２００４－２９０１１１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、結露法により得られたハニカム構造フィルムを培養担体とし、この培養担体を培養容器に入れて細胞を培養すると、細胞が培養担体の周囲に移動してしまい、目的とする数の細胞が培養担体上に残らない。この現象は、特許文献１の培養担体を用いた場合も同様に確認される。このように、細胞が周囲に移動してしまう現象は、培養面に凹凸が形成され、凹部と凸部とのいずれか一方の大きさが５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲内である場合に特に顕著である。また、特許文献２の培養容器は、細胞を積極的に接着する培養担体を備えており、そもそも細胞が遊走せず、培養担体の周囲へ移動することがない。したがって、特許文献２に記載される発明は、ハニカム構造フィルムのように細胞が移動してしまう培養担体を用いた場合の解決策にはならない。

[0007] そこで本発明は、凹凸が形成された培養面をもつ培養担体を備え、細胞の培養面の周囲への移動を抑制しながら、細胞を培養する細胞培養用具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

[0008] 上記課題を解決するために、本発明の細胞培養用具は、培養担体と低親和性部とを備えている。培養担体は、細胞を培養する培養面に凹凸が形成され、前記培養面から深さ０．１μｍまでの範囲における容積率が５％以上８０％以下の範囲内であり、前記培養面における開口率が３０％以上９５％以下の範囲内である。低親和性部は、培養面の周囲を囲んで設けられ、細胞との

親和性が培養面よりも低い。

[0009] 低親和性部は、培養面に対して起立した姿勢で設けられていることが好ましい。培養液を収容し、内面が低親和性部により形成されている容器本体を備え、培養担体が容器本体の底に設けられていることが好ましく、培養面は、容器本体の内部の側面から離間して形成されていることが好ましい。

[0010] 培養担体は、一定の大きさの凹部が培養面に沿って複数並んで形成されることにより、培養面を垂直方向からみたときにハニカム構造とされているフィルムであること、または、一定の高さ及び形状をもつ複数の凸部が培養面に沿って並んで形成されているフィルムであることが好ましい。

発明の効果

[0011] 本発明によると、凹凸が形成された培養面の周囲に低親和性部を設けているので、細胞の培養面の周囲への移動を抑制しながら、細胞を培養することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]第１実施形態であるウェルの平面及び断面の概略図である。

[図2]培養担体の平面概略図である。

[図3]図１のIII－III線の沿う断面図である。

[図4]容積率の求め方を説明する説明図である。

[図5]開口率の求め方を説明する説明図である。

[図6]第２実施形態であるウェルの平面及び断面の概略図である。

[図7]第３実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図8]第４実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図9]第５実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図10]第６実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図11]第７実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図12]第８実施形態であるウェルの断面概略図である。

[図13]第９実施形態であるチップの平面及び断面の概略図である。

[図14]第１０実施形態であるマルチウェルプレートの概略図である。

[図15]マルチウェルプレートの断面図である。

[図16]第１１実施形態であるマルチチッププレートの概略図である。

[図17]マルチチッププレートの断面図である。

[図18]培養担体の概略を示す断面図である。

[図19]培養担体の概略を示す断面図である。

[図20]培養担体の概略を示す断面図である。

[図21]培養担体の概略を示す断面図である。

[図22]培養担体の概略を示す平面図である。

[図23]図２２のXXIII－XXIII線に沿う断面図である。

[図24]図２２のXXIV－XXIV線に沿う断面図である。

[図25]培養担体の概略を示す平面図である。

[図26]図２５のXXVI－XXVI線に沿う断面図である。

[図27]培養担体の概略を示す平面図である。

[図28]図２７のXXVIII－XXVIII線に沿う断面図である。

[図29]培養担体の概略を示す平面図である。

[図30]図２９のXXX－XXX線に沿う断面図である。

発明を実施するための形態

[0013] 図１及び図２を参照しながら、本発明の第１実施形態である細胞培養用具について説明する。細胞培養用具としてのウェル（マイクロフラスコとも呼ばれる）１０は、培養液を収容するための容器本体１１と、細胞を培養する培養床、すなわち培養基材としての培養担体１２とから構成される。容器本体１１は、円筒形状であり、外径Ｄ１１が概ね１６ｍｍ、深さＤＥ１１が概ね１０ｍｍである。ただし、容器本体１１の大きさはこれに限定されず、細胞培養後の利用形態や培養した細胞の利用目的等に応じて、適宜設定すればよい。例えば、培養した細胞がウェル１０に入っている状態で創薬スクリーニングを行うことが予定される場合には、外径が１ｍｍ以上１６ｍｍ以下の範囲内とすることが好ましい。また、培養した細胞をウェル１０に入っている状態で観察することが予定される場合には、外径が１ｍｍ以上１５０ｍｍ

以下の範囲内とすることが好ましい。

[0014] 培養担体１２は、フィルム状に形成されており、容器本体１１の下端面に設けられ、ウェル１０の底部を構成している。培養担体１２のウェル１０の内面を成す上面は、細胞を培養する培養面１２ａである。培養担体１２は、孔１３を複数有する。各孔１３は培養面１２ａに開口しており、培養担体１２の凹部を形成する。複数の孔１３は、一定の大きさをもち、密に配列している。これにより、培養担体１２は、培養面１２ａを垂直方向から見たときにハチの巣状、いわゆるハニカム構造とされている。

[0015] なお、本明細書において、ハニカム構造とは、上記のように、一定形状、一定サイズの孔が培養面１２ａに沿って並び、規則的に配列している構造を意味する。ハニカム構造をなす基本構造は、培養面１２ａにおいて、任意の１つの孔を囲むように複数（例えば、６個）の孔が配されるものである。任意の１つの孔を囲む孔の数は、６個に限らず、３～５個或いは７個以上でも良い。

[0016] そして、孔１３の寸法や形成密度は、後述する製造条件によって異なる。なお、孔の形成密度とは、培養面１２ａの単位面積あたりの孔の数である。培養担体１２の形態は特に限定されるものではないが、例えば、図３に示すように、厚みＴＨ１２は０．０５μｍ以上２０μｍ以下の範囲内であることが好ましく、０．１μｍ以上２０μｍ以下の範囲内であることがより好ましく、０．１μｍ以上１０μｍ以下の範囲内であることが特に好ましい。また、孔１３の径Ｄ１３は０．０５μｍ以上３０μｍ以下の範囲内であることが好ましく、０．０５μｍ以上２０μｍ以下の範囲内であることがより好ましく、０．１μｍ以上２０μｍ以下の範囲内であることが特に好ましい。孔１３のピッチＰ１３は０．０５μｍ以上５０μｍ以下の範囲内であることが好ましく、０．０５μｍ以上４０μｍ以下の範囲内であることがより好ましく、０．１μｍ以上４０μｍ以下の範囲内であることが特に好ましい。

[0017] 凸部の頂きとなる培養面１２ａから孔１３の底部１３ａまでの深さをＤＥ１３とすると、ＤＥ１３／Ｄ１３の値は、０．０５以上１．２以下であるこ

とが好ましく、０．２以上１．０以下であることがより好ましい。

[0018] 培養担体１２の容積率について図４を参照しながら説明する。図４においては、培養面１２ａから深さ０．１μｍまでに対応する範囲に符号ＤＥａを付す。ここで、培養面１２ａに孔１３が形成されていない場合、すなわち培養面が平坦な場合における深さ０．１μｍの範囲の容積をＶＳとし、培養面１２ａから深さＤＥａ０．１μｍにおける孔１３の容積をＶ１３とする。ＶＳは図４における斜線のハッチングで示す部分とクロスハッチングで示す部分との容積の和であり、Ｖ１３はクロスハッチングで示す部分の容積である。培養担体１２の培養面１２ａから深さ０．１μｍまでの範囲の容積率（以下、単に容積率と称する）ＶＲ（単位；％）は、｛（ＶＳ－Ｖ１３）／ＶＳ｝×１００で求められる。

[0019] 培養担体１２は上記の通り孔１３が培養面１２ａに形成されているから容積率ＶＲは１００％ではなく、５％以上８０％以下の範囲内とされる。容積率ＶＲが８０％以下であることにより、８０％よりも大きい場合に比べて、スフェロイドが形成しやすい。また、容積率ＶＲが５％以上であることにより、５％未満である場合に比べてより確実に細胞が培養される。容積率ＶＲが５％未満であると、培養中に細胞が孔１３の中に入り込む、または死滅（アポトーシス）する等の問題がある。容積率ＶＲは、スフェロイドが形成しやすい、また細胞を確実に培養する観点で、３５％以上５５％以下の範囲内であることがより好ましい。

[0020] 培養面１２ａにおける開口率について図５を参照しながら説明する。ここで、培養面１２ａをその垂直方向から見た場合に、培養面１２ａにおける孔１３の開口の面積をＳ１３とし、培養面１２ａの面積をＳ１２ａとする。孔１３の開口の面積Ｓ１３は、図５におけるクロスハッチングで示す部分の面積であり、培養面１２ａの面積Ｓ１２ａは斜線で示すハッチング部分の面積である。培養面１２ａにおける開口率ＳＲ（単位；％）は、｛Ｓ１３／（Ｓ１２ａ＋Ｓ１３）｝×１００で求められる。

[0021] 培養担体１２は、培養面１２ａにおける開口率ＳＲが３０％以上９５％以

下の範囲内とされる。開口率ＳＲが９５％以下であることにより、９５％よりも大きい場合に比べて、細胞がより確実に培養される。９５％よりも大きいと、培養中に細胞が孔１３の中に入り込む、または死滅（アポトーシス）する等の問題がある。また、開口率ＳＲが３０％以上であることにより、３０％未満である場合に比べて培養中に細胞が遊走しやすいので細胞同士が集合しやすく、そのためスフェロイドが形成しやすい。開口率ＳＲは、細胞をより確実に培養し、またスフェロイドの形成しやすさの観点で、４０％以上７０％以下の範囲内であることがより好ましい。

[0022] 本実施形態では、培養担体１２は、ポリスチレン（ＰＳ）製としているが、これに限られない。例えば、培養担体１２は、ポリスチレンに代えて、ポリブタジエン、ポリカーボネート、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリグリコール酸等のいずれかひとつのポリマーから構成してもよい。

[0023] 容器本体１１は、円筒部材１５と、低親和性部１６とにより構成される。円筒部材１５は、収容された培養液を堰き止めるためのものであり、ポリスチレン製とされている。また、円筒部材１５は、培養中における外乱による影響（例えば、培養液の蒸発等）を低減し、培養環境を一定に維持する機能も有する。

[0024] 本実施形態では、円筒部材１５はポリスチレン製としているが、これに限られない。例えば、円筒部材１５は、ポリスチレンに代えて、ポリカーボネート（ＰＣ）、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）等のポリマーや、ステンレス鋼（例えばＳＵＳ）やアルミニウム等の金属、ガラス、あるいはこれらの中の少なくとも２つから構成される複合体から構成してもよい。

[0025] 低親和性部１６は、培養担体１２、具体的には培養面１２ａよりも、細胞との親和性が低い。低親和性部１６は、水の接触角が４０°以下としてある。これに対し、培養面１２ａの接触角は概ね１２０°である。このように、培養面１２ａよりも接触角を小さくすることで低親和性部１６としての機能が発現する。低親和性部１６としての機能を発現するために、培養面１２ａとの接触角の差は、概ね２０°以上１３０°以下の範囲内であることが好ま

しい。低親和性部１６は、円筒部材１５の内壁面を覆う被膜であり、これにより、容器本体１１の側壁の内面を形成している。このように、低親和性部１６は、培養面１２ａに対して起立した姿勢で設けられている。

[0026] 低親和性部１６は、固体のポリエチレングリコールで形成されている。ポリスチレン製の円筒部材１５の内壁面を低親和性部１６で被覆しているので、細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で細胞は増えていく。培養面１２ａには、径Ｄ１３が０．０５μｍ以上３０μｍ以下の範囲内である孔１３が形成されているため、細胞は増えるにあたりスフェロイドを形成しやすい。したがって、このウェル１０により培養されて得られた細胞は、生体外で生体内に類似した挙動を示すことが多く、創薬スクリーニングや化粧品の安全試験への利用が期待できる。

[0027] 低親和性部１６の厚みＴ１６は、概ね１００ｎｍとしてあるが、これに限られない。なお、厚みＴ１６が大きいほど細胞との親和性は上がってしまう傾向がある。その理由は、厚みＴ１６が大きいほど低親和性部は自由水を含むようになりその自由水と一緒にタンパク質が低親和性部１６の表面に付着する。そのタンパク質を介して、細胞が付着すると考えられる。そのため、低親和性部１６は、厚みＴ１６ができるだけ小さくなるように薄く形成することが好ましく、これによりタンパク質ないしは細胞の付着はより確実に防止される。なお、上記タンパク質は、培養液にもともと含まれていたり、細胞が生産して放出することで、培養液中に存在する。

[0028] 低親和性部１６は、円筒部材１５の内面に、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を溶媒に溶かした溶液を塗布し、形成した塗膜を乾燥して溶媒成分を蒸発させることで形成している。溶液中におけるＰＥＧの濃度や溶媒の種類、乾燥条件を調整することにより厚みＴ１６を調整することができる。塗布により低親和性部１６を形成する材料は、ＰＥＧに限られず、例えば、アルブミン、チトクローム、キチン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイド硫酸、ヘパリン硫酸、デオキシリボ核酸、リボ核酸、ポリ（２－メトキシエチルアクリレート）（ＰＭＥＡ）、ポリエチレンオキサイド、ポリアクリルア

ミド、ポリシロキサン、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンポリマー（ＭＰＣポリマー）、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリビニルピロリドン、ポリメチルビニルエーテル、ポリテトラヒドロフルフリルアクリレート、ポリ（２－ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリスルホベタイン、シリコーン、ポリビニルアルコールとしてもよい。これらの被膜で低親和性部１６を構成しても、水の接触角が４０°以下になり、培養面１２ａよりも細胞との親和性が確実に低くなる。ポリビニルアルコールの場合には、例えば、ポリビニルアルコールが溶媒に溶解した溶液を、円筒部材１５の内面に塗布し、この塗膜を乾燥させることにより、被膜が形成される。

[0029] 低親和性部１６は、円筒部材１５の内壁面に被膜として形成されたものに限られず、帯電部として形成されたものでもよい。例えば、円筒部材１５の内壁面に放電処理や静電気処理を行うことにより負電荷または正電荷を帯びさせることで、電荷を帯びた帯電部を形成する。この帯電部が低親和性部として機能する。これにより、細胞との親和性が培養面１２ａよりも確実に低くなる。ポリスチレン製である培養面１２ａの電位は概ね－８０ｍＶであり、この場合には、例えば、電位が－３０ｍＶ以上０ｍＶ未満の範囲内である帯電部を形成することでこの帯電部は低親和性部としての機能を発現する。

[0030] このように、培養面１２ａと異なる電位の帯電部は低親和性部としての機能する。なお、低親和性部としての機能は、培養面１２ａとの電位差があることで発現する。したがって、円筒部材１５の内壁面と培養面１２ａとの各電位に応じて、これら両方にそれぞれ所定の帯電処理をしてもよいし、いずれか一方にのみ所定の帯電処理をしてもよい。ただし、細胞は、電位が正または負であるよりも０（ゼロ）である場合の方が親和性が低く、正の電位域と負の電位域とそれぞれについて０に近いほど親和性が低くなる傾向がある。したがって、このような電位における親和性の傾向を考慮した上で、円筒部材１５の内壁面と培養面１２ａとの各電位に応じた帯電処理を行うことが好ましい。なお、負電荷を帯びた帯電部を形成する方法としては、スルホン

化処理もある。スルホン化処理は、例えば、正の電位をもつ円筒部材の中に３０℃の濃硫酸を１分間入れておくことで行われる。円筒部材を３０℃の濃硫酸に１分間浸漬することにより、円筒部材の全面をスルホン化してもよい。なお、スルホン化処理の後は、水等で洗浄することが好ましい。

[0031] 本実施形態においては、容器本体１１は円筒形状としてあるが、これに限られず、例えば、矩形や多角形の筒状でもよい。ただし、スフェロイドを形成する観点では、培養単体は、本実施形態のように円形であることが好ましい。

[0032] 本実施形態においては、培養担体１２は容器本体１１の下端面に接着剤により固定されているが、固定の方法はこれに限られない。例えば、接着剤に代えて両面粘着テープとしてもよいし、培養担体１２を例えば環状のホルダに固定し、このホルダを容器本体１１と嵌合させてもよい。接着剤と両面粘着テープとは、いずれも、細胞にとって無毒性のものとする。また、熱溶着や超音波溶着により、培養担体１２を容器本体１１の下端面に固定してもよい。また、容器本体１１または円筒部材１５の中に、培養担体１２を形成するための溶液を入れて流延膜を形成し、後述の結露法により容器本体１１または円筒部材１５に培養担体１２を形成してもよい。

[0033] また、容器本体１１と培養担体１２とに電荷を付与する、または磁気を帯びさせることにより、培養担体１２を着脱自在としてもよい。培養担体１２を着脱自在とすることにより、培養された細胞を培養担体１２とともに容器本体１１から取り外すことができる。電荷を付与する場合には、容器本体１１と培養担体１２との一方がマイナス（－）の電荷、他方がプラス（＋）の電荷を帯びるようにする。磁気を帯びさせる場合には、容器本体１１と培養担体１２とが互いに異なる磁極をもつようにし、一方をＮ極、他方をＳ極にする。

[0034] 上記のウェル１０は、容器本体１１の底部内面の全体に培養面１２ａが形成されているが、培養面１２ａが形成されている領域はこれに限られない。第２実施形態としてのウェル２０は、図６に示すように、培養液を収容する

ための容器本体２１と、培養基材としての培養担体１２とから構成される。なお、図６においては、図１と同じ部材には、図１と同じ符号を付し、説明を略す。

[0035] 容器本体２１は、円筒部材１５と同じ材料から形成された円筒部材２５と、円筒部材２５の内面に設けられた低親和性部１６とから構成され、下端を内側に折り曲げた形状をもつ。この折り曲げた下端の内側に、フィルム状の培養担体１２は設けられているので、培養面１２ａの径Ｄ１２ａは、容器本体２１の側壁における内径ｄ２１よりも小さい。

[0036] このように、培養担体１２はウェル２０の底部の一部、具体的には底部の中央を構成しており、培養面１２ａは容器本体２１の側壁の内面と離間している。培養液は、細胞培養中に淀むことがあり、淀むと細胞の増殖が阻害されることがある。淀みは、ウェル２０の底部の側壁近傍で特に顕著である。しかし、このウェル２０は、培養面１２ａの周縁が側壁から離れているため、培養面１２ａ全体が細胞の培養に効果的に作用し、ウェル１０に比べて培養面１２ａ上でスフェロイドがより早く形成されたり、より大きく形成される。

[0037] 第１，第２実施形態においては、培養担体１２がウェル１０，２０の底部を構成しているが、この態様に限られない。例えば、下記の第３実施形態及び第４実施形態のように、底部が予め形成されている容器本体３１，４１の中に培養担体１２を収容してもよい。

[0038] 第３実施形態としてのウェル３０は、図７に示すように、培養液を収容するための容器本体３１と、培養担体１２とから構成される。なお、図７においては、図１と同じ部材については、図１と同じ符号を付し、説明を略す。容器本体３１は、一端部が底部とされる円筒形状の容器（以下、円筒容器と称する）３５と、この円筒容器３５の内面に形成された低親和性部１６とから構成される。培養担体１２は、底部上に固定されている。この固定は、本実施形態においては、ウェル１０における容器本体１１と培養担体１２との固定方法と同じく接着剤によるが、前述の他の方法により固定してもよい。

また、培養担体１２は容器本体１１には固定せずに、着脱自在に設置してもよい。

[0039] 円筒容器３５は、ウェル１０の円筒部材１５と同様にポリスチレン製であり、この円筒容器３５の内壁面を低親和性部１６で被覆しているので、細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え、スフェロイドを形成する。

[0040] 第４実施形態としてのウェル４０は、図８に示すように、容器本体３１と、培養担体１２とから構成される。なお、図８においては、図７と同じ部材については、図７と同じ符号を付し、説明を略す。培養担体１２は、底部上に設置されているが固定されていない。培養液がウェル４０内に入れられると、培養中等において培養担体１２が浮いてくることがあるので、これを防止するために、押さえ部材４２が培養担体１２上に置かれる。

[0041] 押さえ部材４２は、培養担体１２の周縁部を覆い、培養担体１２の中央部を開口したリング形状とされている。この開口により露呈した培養担体１２の表面が、細胞を培養する培養面１２ａとして機能する。押さえ部材４２は、培養担体１２の浮き上がりを抑制するいわゆる重りであり、本実施形態ではガラス製としてあり、表面が細胞との親和性が培養面１２ａよりも低くされた被膜４２ａで覆われている。被膜４２ａの材料は、低親和性部１６と同様の材料を用いることができる。このように、本実施形態においても、細胞は培養面１２ａから周辺や培養担体１２の側面に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え、スフェロイドを形成する。なお、図７に示すウェル３０において培養担体１２を容器本体１１上に固定することなく設置する場合にも、培養担体１２上に押さえ部材４２を載せることにより培養担体１２の浮き上がりを防止することが好ましい。

[0042] 押さえ部材４２は、被膜４２ａを形成された押さえ部材本体が、ガラスに代えて、金属、固体のポリマー、あるいは、ガラスと金属と固体のポリマーのうち少なくとも２つの複合体で構成されたものでもよい。また、押さえ部材４２は、被膜４２ａに代えて、例えばステンレス製の押さえ部材本体の表

面に前述のスルホン化処理やポリビニルアルコールの被膜を設けることにより負電荷を帯びた層を形成したものでもよい。

[0043] なお、培養担体１２は、容器本体３１に対して、第１～第３実施形態１０、２０、３０の培養担体１２と同様に固定してもよい。固定は、ウェル１０における容器本体１１と培養担体１２との固定方法と同じく接着剤により為されていてもよいし、前述の他の方法により固定してもよい。

[0044] 培養担体１２はこれを支持する支持体とともにウェルを構成してもよい。例えば、第５実施形態のウェル５０は、図９に示すように、図１のウェル１０と同じ容器本体１１と、培養担体１２と、培養担体１２を支持する支持体５２とを備える。支持体５２は、培養担体１２を下方から、すなわち培養面１２ａと反対側の面から支持する。本実施形態においては、支持体５２はガラス製としてあるが、ガラスに代えてＰＥＴ等のポリマーにより支持体５２を構成してもよい。培養担体１２と支持体５２とは、一体にされてから容器本体１１へ固定されてもよいし、あるいは培養担体１２と容器本体１１とを固定してから培養担体１２を一体にしてもよい。

[0045] 培養担体１２は、支持体５２に固定されている。培養担体１２は支持体５２に対して、ウェル１０における容器本体１１と培養担体１２との固定と同じく接着剤により固定されている。ただし、培養担体１２の支持体５２への固定の方法は、ウェル１０の容器本体１１と培養担体１２との前述の他の方法であってもよい。また、支持体５２上に培養担体１２を形成するための溶液を流延して流延膜を形成し、後述の結露法により培養担体１２を形成する方法でも、支持体５２上に固定された培養担体１２が得られる。

[0046] この例においても、円筒部材１５の内壁面を低親和性部１６で被覆しているので、細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え、培養面１２ａ上にスフェロイドが形成される。

[0047] 第６実施形態のウェル６０は、図１０に示すように、図６のウェル２０と同じ容器本体２１と、培養担体１２と、支持体５２とを備える。この例でも細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え

、培養面１２ａ上にスフェロイドが形成される。さらに、この例では、図６のウェル２０と同様に、培養面１２ａが容器本体２１の側壁の内面と離間している。このため、図９のウェル５０に比べて培養面１２ａ上でスフェロイドがより早く形成されたり、より大きく形成される。

[0048] 一体にされた支持体５２と培養担体１２とを容器本体２１に対して着脱自在にすることにより、培養後の培養担体１２を支持体５２とともに容器本体２１から取り外すことができる。培養した後の細胞を観察する場合には、培養後に支持体５２と培養担体１２とを容器本体２１から取り外し、このように取り外した状態で細胞を観察する方がよい。

[0049] 第７実施形態のウェル７０は、図１１に示すように、図７のウェル３０と同じ容器本体３１と、培養担体１２と、支持体５２とを備える。培養担体１２は、支持体５２と一体にされて容器本体３１の底部上に設置される。培養担体１２と支持体５２とは、容器本体３１の底部の上面と同じ面積とされており、底部上面を覆う。この例でも細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え、培養面１２ａ上にスフェロイドが形成される。

[0050] 第８実施形態のウェル８０は、図１２に示すように、図１１のウェル７０と同じく、容器本体３１と、培養担体１２と、支持体５２とを備え、培養担体１２は、支持体５２と一体にされて容器本体３１の底部上に設置される。培養担体１２と支持体５２とは、容器本体３１の底部の上面よりも面積が小さく、側面から離間して設けられている。この例でも細胞は培養面１２ａから周辺に向かって移動せずに、培養面１２ａ上で増え、培養面１２ａ上にスフェロイドが形成される。さらに、図１１のウェル７０に比べて培養面１２ａ上でスフェロイドがより早く形成されたり、より大きく形成される。

[0051] ウェル８０は、培養中における培養担体１２の浮き上がりを防止するために、図８と同様の押さえ部材４２を備えることが好ましい。なお、図１１のウェル７０も同様に、押さえ部材４２を備えることにより培養中における培養担体１２の浮き上がりが防止される。

[0052] 上記の実施形態はいずれもウェルであるが、本発明の細胞培養用具はチップでもよい。第９実施形態であるチップ９０は、図１３に示すように、円形の培養担体１２と、低親和性部１６とから構成される。培養担体１２は円形であり、低親和性部１６は環状に形成されており、培養担体１２の周縁部を覆う。低親和性部１６は、培養担体の孔１３（図２，図３参照）が形成されている表面上に設けられる。環状の低親和性部１６の開口から露呈した部分、すなわち低親和性部１６で囲まれた部分が培養面１２ａである。培養液は、この低親和性部１６で囲まれた部分へ収容される。

[0053] チップ９０の径Ｄ９０は概ね２５ｍｍ、培養面１２ａの径Ｄ１２ａは概ね１５ｍｍ、低親和性部１６の幅Ｗ１６は概ね５ｍｍ、低親和性部１６の厚みＴＨ１６は概ね１００μｍとしてある。ただし、チップ９０及び培養面１２ａの各径Ｄ９０，Ｄ１２ａ、低親和性部１６の幅Ｗ１６は、これに限定されず、図１に示す容器本体１１の大きさと同様に、細胞培養後の利用形態や培養した細胞の利用目的等に応じて、適宜設定すればよい。低親和性部１６の厚みＴＨ１６は１０μｍ以上が好ましく、これにより、培養液が確実に収容される。

[0054] この例でも、低親和性部１６の内周面が培養面１２ａから起立した姿勢で形成されている。このため、細胞は、培養面１２ａから周囲へ移動することなく培養面１２ａ上で増え、スフェロイドが培養面１２ａ上で形成される。

[0055] 上記の各例は、ひとつの培養面１２ａをもつ細胞培養用具であるが、培養面１２ａが複数ある細胞培養用具であってもよい。細胞培養用具の第１０実施形態であるマルチウェルプレート１００は、図１４，図１５に示すように、容器本体としてのプレート本体１０１の上面に複数のウェル部１０２が形成されている。本実施形態ではウェル部１０２は、プレート本体１０１に複数のウェル部１０２がマトリックス状に形成されているが、この配置態様はマトリックス状に限定されない。また、本実施形態のマルチウェルプレート１００はウェル部１０２を２４個備えるが、ウェル部１０２の個数はこれに限定されず、２～２３個、２５個以上のように複数であればよい。

[0056] プレート本体１０１はウェル１０の容器本体１１と同じ材料から構成されており、ウェル部１０２の内部は、図１のウェル１０の内部と同様の構成をもつ。すなわち、プレート本体１０１は、各ウェル部１０２を形成するための複数の円形の穴が形成されたポリスチレン製のプレート部材１０３と、このプレート部材１０３の各穴の側面に形成された低親和性部１６とを備える。培養担体１２は、プレート本体１０１の下部に配されてウェル部１０２の平坦な底部を構成している。低親和性部１６に囲まれた部分が培養面１２ａである。

[0057] この例でも、培養面１２ａは低親和性部１６により周囲を囲まれている。このため、細胞は培養面１２ａから周囲へ移動することなく、培養面１２ａ上で増え、培養面１２ａ上でスフェロイドが形成される。

[0058] なお、本実施形態におけるウェル部１０２の内部は、図１のウェル１０の内部と同じ構成をもつが、これに限定されない。例えば、図６に示すウェル２０の内部と同様に、ウェル部１０２の底部の中央が培養面１２ａとされ、この培養面１２ａの周縁が低親和性部１６で形成されている側面から離間していてもよい。また、プレート本体１０１が図７，６に示す容器本体３１のように低親和性部１６で覆われたポリスチレン等からなる底部を有し、この底部の上に培養担体１２が設置されたものでもよい。また、図９～図１２に示すウェル５０，６０，７０，８０と同様に、培養担体１２が支持体５２により支持されていてもよい。さらにまた、ウェル部１０２の培養担体１２は、プレート本体１０１に着脱自在に設けられていてもよいし、固定されていてもよい。

[0059] 細胞培養用具の第１１実施形態であるマルチチッププレート１１０は、図１６，図１７に示すように、容器本体としてのプレート本体１１１の上面に複数のチップ部１１２が形成されている。本実施形態ではチップ部１１２は、プレート本体１１１に複数のチップ部１１２がマトリックス状に形成されているが、この配置態様はマトリックス状に限定されない。また、本実施形態のマルチチッププレート１１０はチップ部１１２を２４個備えるが、チッ

プ部１１２の個数はこれに限定されず、２～２３個、２５個以上のように複数であればよい。

[0060] プレート本体１１１はウェル１０の容器本体１１と同じ材料から構成されており、チップ部１１２の内部は、図１３のチップ９０と同様の構成をもつ。すなわち、プレート本体１１１は、各チップ部１１２を形成するための複数の円形の穴が形成されたポリスチレン製のプレート部材１１３と、各穴の側面に形成された低親和性部１６とを備える。培養担体１２は、プレート本体１１１の下部に配されてチップ部１１２の平坦な底部を構成している。低親和性部１６に囲まれた部分が培養面１２ａである。

[0061] この例でも、培養面１２ａは低親和性部１６により周囲を囲まれている。このため、細胞は培養面１２ａから周囲へ移動することなく、培養面１２ａ上で増え、培養面１２ａ上でスフェロイドが形成される。

[0062] 上記のマルチウェルプレート１００及びマルチチッププレート１１０は、プレート本体１０１，１１１にウェル部１０２，チップ部１１２が形成されたものである。しかし、マルチウェルプレート、マルチチッププレートはこれらの態様に限られない。例えば、貫通孔または非貫通の穴が複数形成されたプレート本体（図示無し）の貫通孔または非貫通の穴のそれぞれに、ウェル１０，２０，３０，４０，５０，６０，７０，８０、チップ９０が嵌め合わせられたものでもよい。

[0063] 培養担体１２の製造方法について説明する。培養担体１２を製造する培養担体製造工程は、溶液調製工程と、流延膜形成工程と、フィルム形成工程とを有する。溶液調製工程は、培養担体１２を形成するための溶液を調製する工程である。具体的には、例えば、培養担体１２を形成する疎水性ポリマーを、溶媒に溶解して溶液とする。

[0064] 流延膜形成工程は、溶液調製工程で得られた溶液を支持体の上に流下して広げ、流延膜を形成する工程である。支持体は、予め温度を調整しておき、流延膜を形成する間も温度を調整していることが好ましい。

[0065] フィルム形成工程は、水滴形成工程と、蒸発工程とを有する。水滴形成工

程は、流延膜の膜面に結露させて水滴を形成する工程である。水滴は、流延膜の周辺の雰囲気の温度よりも低い温度となるように支持体を冷却することで形成される。ここで、複数の水滴の発生のタイミングを揃えたり、形成される水滴の大きさを均一に揃える観点では、支持体が所定の温度に保持されるように支持体の温度を調整しつつ、加湿した気体（例えば空気）を流延膜上に供給することが好ましい。

[0066] 蒸発工程は、溶媒と水滴形成工程で形成した水滴とを蒸発させる工程である。孔１３（図２，図３参照）は、水滴が型となって形成されるものであるので、水滴が流延膜中に沈むように溶媒を水滴よりも早く蒸発させる。そのためには、水よりも蒸発速度が大きい溶媒を用いることが好ましい。ただし、水滴が蒸発し始めるタイミングは、溶媒のすべてが蒸発し終わった後でなくてもよい。また、形成された孔１３が維持される程度であれば、水滴の蒸発が完了した後に多少の溶媒が流延膜に残っていてもよく、残存している溶媒は水滴の蒸発が完了した後に蒸発してもよい。このように、フィルム形成工程は、多孔フィルムの製造方法として周知である結露法の工程である。

[0067] 培養担体１２に代えて、他の培養担体としてもよい。他の培養担体について、説明する。図１８に示す培養担体１２０は、複数の孔１２１が培養担体１２の孔１３に比べてより深くまで形成されている。これにより、培養担体１２０では、培養担体１２の孔１３よりも球形に近い孔１２１となっている。また、図１９に示す培養担体１２５は、厚み方向を貫通した孔１２６を有し、孔１２６は培養面１２０ａに加えて反対側の面でも開口している。培養面１２０ａに沿って並ぶ複数の孔１２６は、互いに独立している。

[0068] 図２０に示す培養担体１３０においては、培養面１３０ａに沿って並ぶ孔１３１同士が連通している。孔１３１の径Ｄ１３１は、１０ｎｍ以上１００μｍ以下の範囲とされる。図２１に示す培養担体１３５は、厚み方向を貫通した孔１３６を有し、孔１３６は培養面１３５ａに加えて、反対側の面でも開口している。培養面１３５ａに沿って並ぶ孔１３６同士は連通している。孔１３６の径Ｄ１３６は、１０ｎｍ以上１００μｍ以下の範囲とされる。な

お、以上の培養担体１２０，１２５，１３０，１３５の各平面図は、図２と同様であるので、図示は略す。以上のように、培養担体１２０，１２５，１３０，１３５はいずれも一定の大きさの孔１２１，１２６，１３１，１３６が凹部として培養面１２０ａ，１２５ａ，１３０ａ，１３５ａに形成されており、孔１２１，１２６，１３１，１３６はいずれも一定のピッチで並んで形成されている。

[0069] 図２２～図２４に示すフィルム状の培養担体１４０は、一方のフィルムの面に柱状の凸部１４１が複数の形成されたいわゆるピラー構造フィルムである。複数の凸部１４１は、互いに略一定の高さ及び形状をもつ。複数の凸部１４１は、一定のピッチで並び、規則的に配列することにより、その先端面１４１ａで培養面１４０ａを構成している。このように、培養担体は、孔が形成されてハニカム構造であるものに限られず、一定のパターンの凹凸が表面に形成されたものであればよい。

[0070] 凸部１４１の先端面１４１ａは、培養担体１４０を培養面１４０ａの垂直方向から見たときに、図２２に示すように、例えば、内側に凸の３つの円弧に囲まれた形状をしている。隣り合う凸部１４１と凸部１４１との距離Ｌ１は５０ｎｍ以上２５０μｍの範囲でそれぞれ一定とされる。厚みＴＡは５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲とされている。この場合には、凸部１４１の大きさが５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲である。なお、凸部１４１を培養面１４０ａの垂直方向から見たときに、凸部１４１の最も長い寸法部分Ｄ１４１を凸部１４１の大きさとみなす。なお、図示は略すが、培養担体としてのピラー構造のフィルムには、凸部の先端が図２２～図２４の凸部１４１と異なり、尖鋭な形状、すなわち先細りとされているものもあり、このようなものでもよい。

[0071] 以上の培養担体１２，１２０，１２５，１３０，１３５，１４０は、いずれも前述の結露法で製造することができる。培養担体１２に代えて用いることができる他の培養担体としては、例えば、ナノインプリンティング、ボローゲンリーチング、相分離法、ファイバ溶着法により得られる多孔質材料が

挙げられる。ファイバ溶着法により得られる多孔質材料としては、いわゆるニットメッシュ形状のものがある。

[0072] 図２５及び図２６に示す培養担体１５０は、ナノインプリンティングで得られる多孔質材料の一例である。培養担体１５０は、格子状に形成された凸部１５１が複数形成されており、この凸部１５１によって培養面１５０ａが形成されている。凸部１５１に囲まれた凹部１５２は略正方形の矩形とされている。この場合には、凹部１５２の大きさが５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲内である。なお、培養面１５０ａにおける凹部１５２の開口の面積と同じ円１５３を描いたときに、その円の直径Ｄ１５１を凹部の大きさとみなす。本実施形態の凹部１５１は略正方形とされているがこれに限られない。例えば、長方形、台形、平行四辺形等のその他の四角形、三角形、五角形等の多角形でもよいし、真円や楕円のような円形でもよい。

[0073] 図２７及び図２８に示す培養担体１６０は、ナノインプリンティングで得られる多孔質材料の一例である。培養担体１６０は、円錐の頂部を一定の高さで切り取った截頭円錐状の複数の凸部１６１がマトリックス状に形成されており、この凸部１６１により培養面１６０ａが形成されている。この場合には、凸部の大きさは５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲内である。なお、凸部１６１の先端の円の直径Ｄ１６１を、凸部の大きさとする。本実施形態の凸部１６１は、截頭円錐状としてあるが、これに限られない。例えば、頂部をいっていの高さで切り取った截頭角錐状であってもよい。

[0074] 図２９及び図３０に示す培養担体１７０は、相分離法で得られる多孔質材料の一例である。培養担体１７０は、不定形に形成された凸部１７１を有し、この凸部１７１により培養面１７０ａが形成されている。凹部１７２は凸部１７１に囲まれた部分として形成されており、凸部１７１と同様に不定形である。この例では、凸部１７１と凹部１７２とが海島構造（凸部１７１が海部、凹部１７２が島部）として形成されており、凸部１７１が海状、凹部１７２が島状に形成されている。この場合には、凹部１７２の大きさが５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲内である。なお、培養面１７０ａにおける凹部

１７２の開口の面積と同じ円１７２を描いたときに、その円１７２の直径Ｄ１７２を凹部１７２の大きさとみなす。なお、本実施形態では、各凹部１７２が独立した島部とされているが、海島構造が逆であってもよい。すなわち、凸部が島部、凹部が海部であり、各凸部が独立していてもよい。

[0075] 培養担体１２０，１２５，１３０，１３５，１４０，１５０，１６０，１７０は、培養担体１２と同様に、培養面１２０ａ，１２５ａ，１３０ａ，１３５ａ，１４０ａ，１５０ａ，１６０ａ，１７０ａから深さ０．１μｍまでの範囲の容積率ＶＲが２０％以上８０％以下の範囲内であり、培養面における開口率ＳＲが３０％以上９０％以下の範囲とされている。

[0076] また、培養担体１２，１２０，１２５，１３０，１３５，１４０，１５０，１６０，１７０はいずれもフィルム状のものであるが、ブロック状のものでもよい。ブロック状の培養担体の場合にも、５０ｎｍ以上５０μｍ以下の範囲内である凹部または凸部が形成されている培養面を備えるものとする。

[0077] 以下に本発明の実施例を示すが、詳細は実施例１に記載し、本発明に対する比較例１については、実施例１と異なる条件のみを記載する。

実施例 １

[0078] 支持体５２としてのガラス板に、ポリスチレンの溶液を流延して流延膜を形成した。流延膜に加湿した空気を供給しながら流延膜を乾燥することで、流延膜の表面に結露させて水滴を形成し、最終的に溶媒と水滴とを蒸発させた。水滴を蒸発させるために、吹き付ける空気を加湿したものから乾燥したものへと切り替えた。このフィルム形成工程により、ポリスチレン製であり、孔１３が培養面１２ａに沿って並んだハニカム構造の培養担体１２を形成した。このように、本実施例では結露法により培養担体１２を形成した。得られた培養担体１２は、孔径が均一であり、平均孔径（孔径の平均値）は約５μｍであった。容積率ＶＲは約３５％、培養面１２ａにおける開口率ＳＲは約５０％であった。

[0079] ポリスチレン製の円筒容器３５の内面を低親和性部１６で覆った容器本体３１を用意した。まず、円筒容器３５の内面に、スパッタリング装置（Ｅ－

１０３０，日立株式会社製）を用いて、厚みが９ｎｍのプラチナ（Ｐｔ）の被膜を形成した。次に、このＰｔ被膜の上に、低親和性部１６を形成した。低親和性部１６は、重量平均分子量３００００のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖とチオール基とを有する合成ポリマー（日本油脂株式会社製）の溶液を塗布して溶媒を蒸発させることにより形成した。この容器本体３１を用いて、図８に示すウェル４０を作成した。すなわち、この容器本体３１の底部上に、支持体５２と一体の培養担体１２を載せ、培養担体１２の上に押さえ部材４２を載せることにより培養担体１２の浮き上がりを防いだ。ＰＥＧの被膜４２ａで覆われたガラス製の押さえ部材４２を用いた。

[0080] ウェル４０の内部に、培養すべき細胞と培養液（液体培地）とを入れた。細胞は、ヒト肝由来細胞（ＨｅｐＧ２）であり、培養液は、ウィリアムズＥ培地（Ｗｉｌｌｉａｍｓ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ Ｅ、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）１０．８ｇ／Ｌに、５８．８ｍｇ／Ｌのペニシリン（ＭｅｉｊｉＳｅｉｋａファルマ（株）製）、１００ｍｇ／Ｌのストレプトマイシン（ＭｅｉｊｉＳｅｉｋａファルマ（株）製）、２．２ｇ／Ｌの炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業（株）製）、１０％の牛胎児血清（ＦＢＳ、インビトロジェン（株）製）、を加えた血清添加培養液である。仕込んだ細胞の数は、５０００である。培養液は、液面がウェル４０の深さの中間位置になる量（５分目）とした。培養は、二酸化酸素濃度５％、温度３７℃下で２４時間行った。

[0081] 培養開始から２４時間後に、ウェル４０の内部にある細胞の数を数えたところ１００００であり、そのうち、培養面１２ａ上にある細胞の数は９０００以上であった。また、培養面１２ａ上にはスフェロイドが形成されていた。

[0082] ［比較例１］

実施例１と同じ円筒容器３５を用意し、この円筒容器３５の内面には低親和性部１６を形成しなかった。この円筒容器３５の底部に、実施例１と同じ培養担体１２を支持体５２とともに設置した。また、押さえ部材４２と同

様にリング状に形成された押さえ部材で、培養担体１２の周縁部を押さえた。ただし用いた押さえ部材は、被膜４２ａが形成されていないものである。その他の条件は実施例１と同じにして、実施例１と同じ細胞を培養した。

[0083] 培養開始から２４時間後に、培養面１２上にはスフェロイドは形成されていたものの、ウェルの内部にある細胞の数を数えたところ１００００であり、そのうち、培養面１２ａ上にある細胞の数は１０００以下であった。

符号の説明

[0084] １０，２０，３０，４０，５０，６０，７０，８０　ウェル

１２，１２０，１２５，１３０，１３５，１４０　培養担体

９０　チップ

１００　マルチウェルプレート

１１０　マルチチッププレート

１３，１２１，１２６，１３１，１３６，１４１　孔

１４１　凸部

請求の範囲

[請求項1] 細胞を培養する培養面に凹凸が形成され、前記培養面から深さ０．１μｍまでの範囲における容積率が５％以上８０％以下の範囲内であり、前記培養面における開口率が３０％以上９５％以下の範囲内である培養担体と、

前記培養面の周囲を囲んで設けられ、前記細胞との親和性が前記培養面よりも低い低親和性部と、

を備える細胞培養用具。

[請求項2] 前記低親和性部が、前記培養面に対して起立した姿勢で設けられている請求項１に記載の細胞培養用具。

[請求項3] 培養液を収容し、内面が前記低親和性部により形成されている容器本体を備え、

前記培養担体が前記容器本体の底に設けられている請求項１または２に記載の細胞培養用具。

[請求項4] 前記培養面が、前記容器本体の内部の側面から離間して形成されている請求項３に記載の細胞培養用具。

[請求項5] 前記培養担体は、一定の大きさの凹部が前記培養面に沿って複数並んで形成されることにより、前記培養面を垂直方向からみたときにハニカム構造となるフィルムである請求項１または２に記載の細胞培養用具。

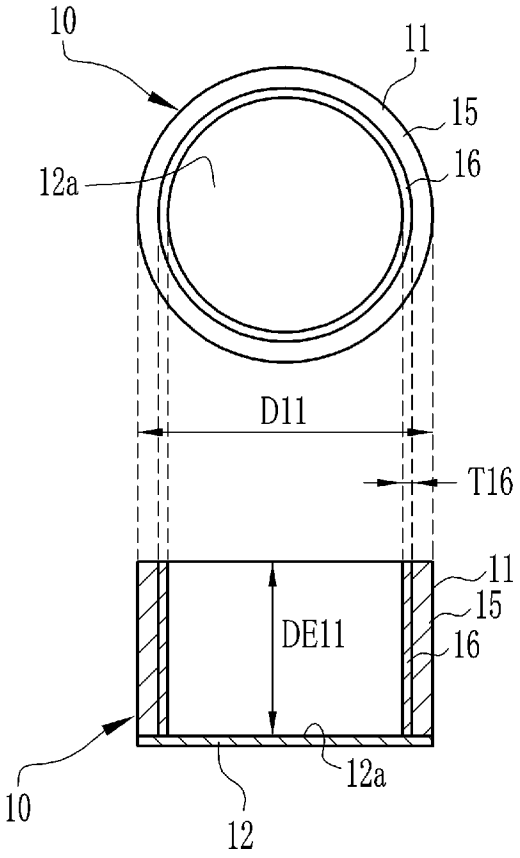
[請求項6] 前記培養担体は、一定の大きさの凹部が前記培養面に沿って複数並んで形成されることにより、前記培養面を垂直方向からみたときにハニカム構造とされているフィルムである請求項３に記載の細胞培養用具。

[請求項7] 前記培養担体は、一定の高さ及び形状をもつ複数の凸部が前記培養面に沿って並んで形成されているフィルムである請求項１または２に記載の細胞培養用具。

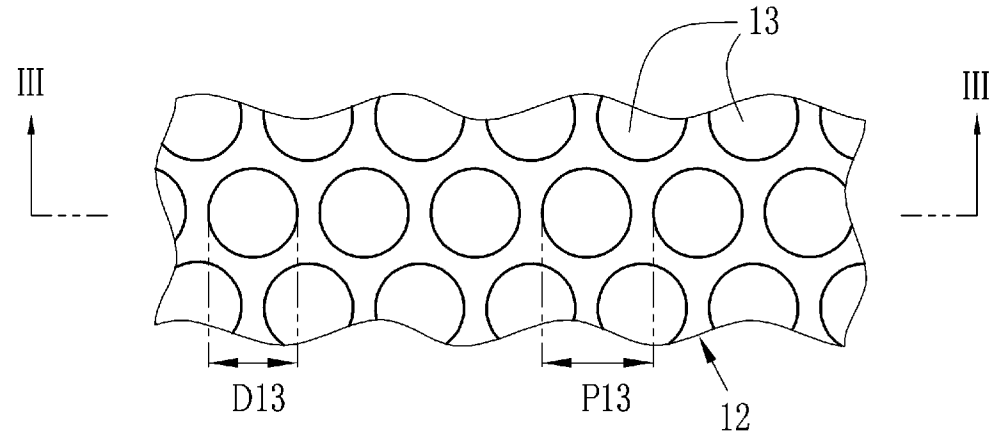
[請求項8] 前記培養担体は、一定の高さ及び形状をもつ複数の凸部が前記培養

面に沿って並んで形成されているフィルムである請求項３に記載の細胞培養用具。

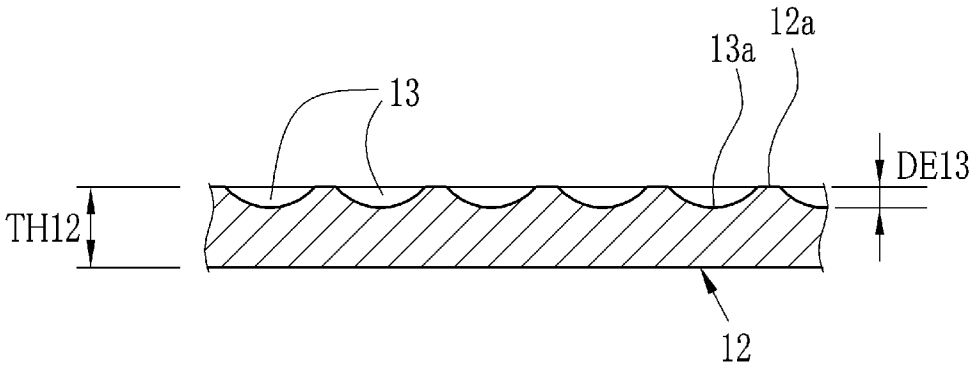
[図1]



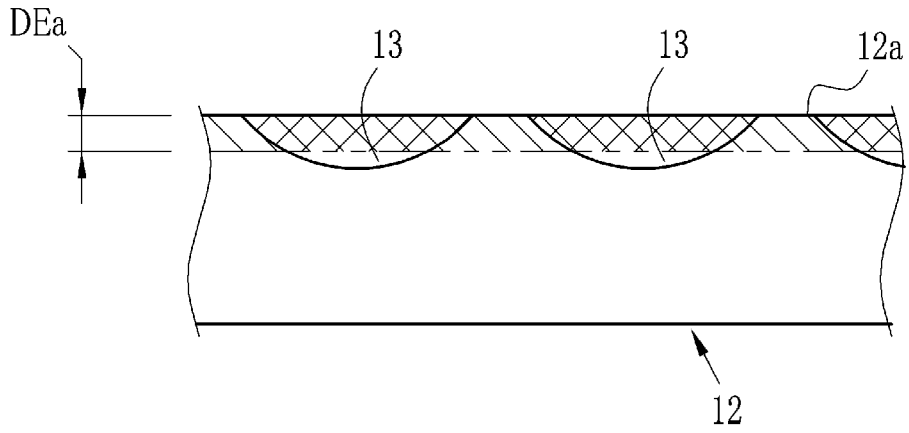
[図2]



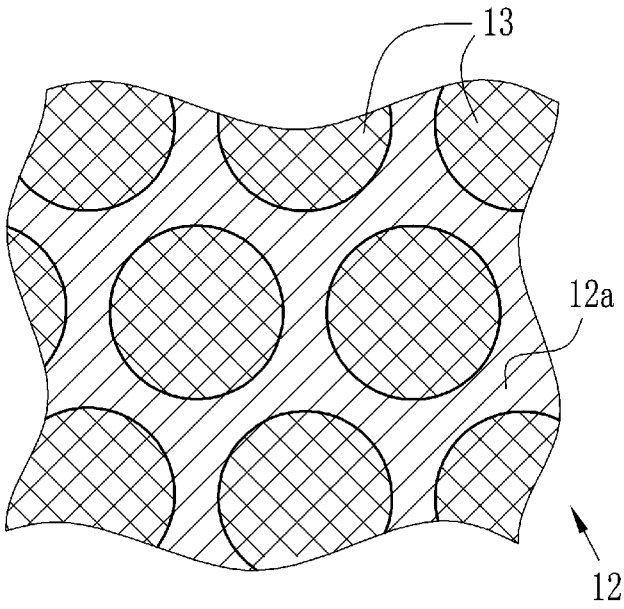
[図3]



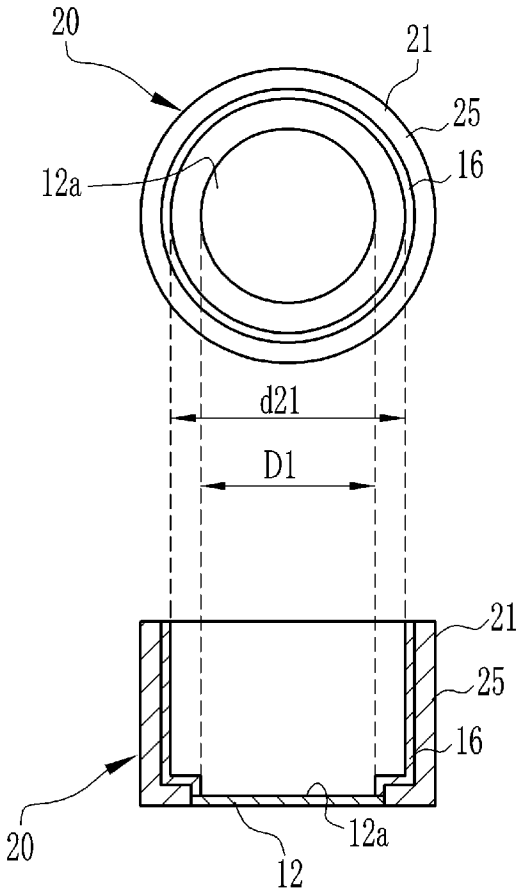
[図4]



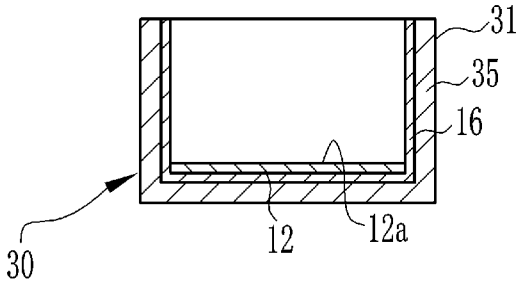
[図5]



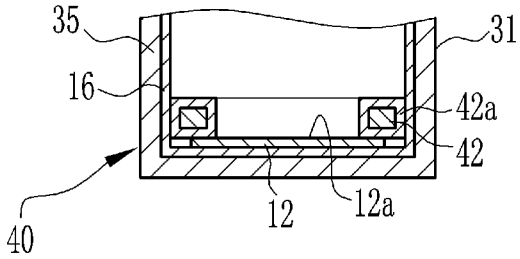
[図6]



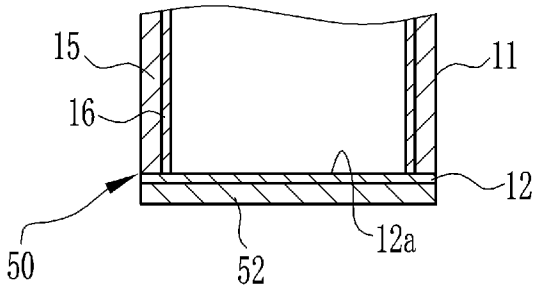
[図7]



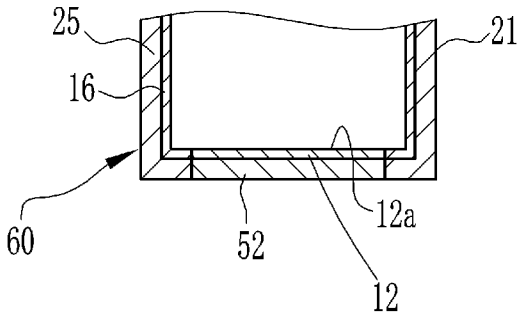
[図8]



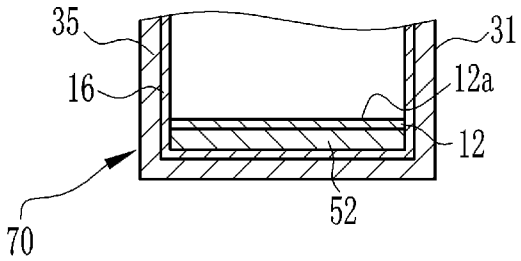
[図9]



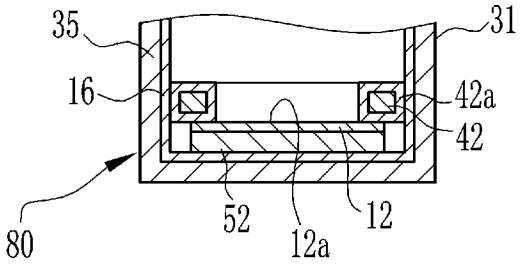
[図10]


25
21
16
60
52
12a
12

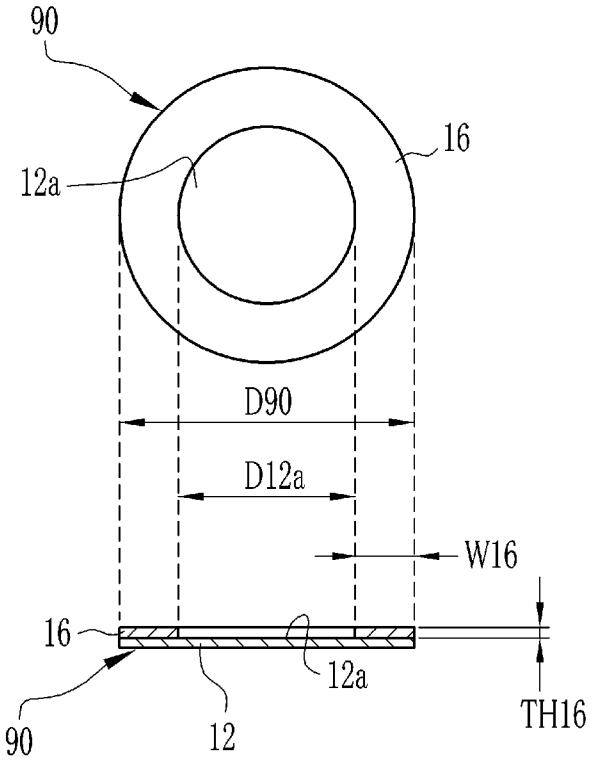
[図11]


35
31
16
12a
12
70
52

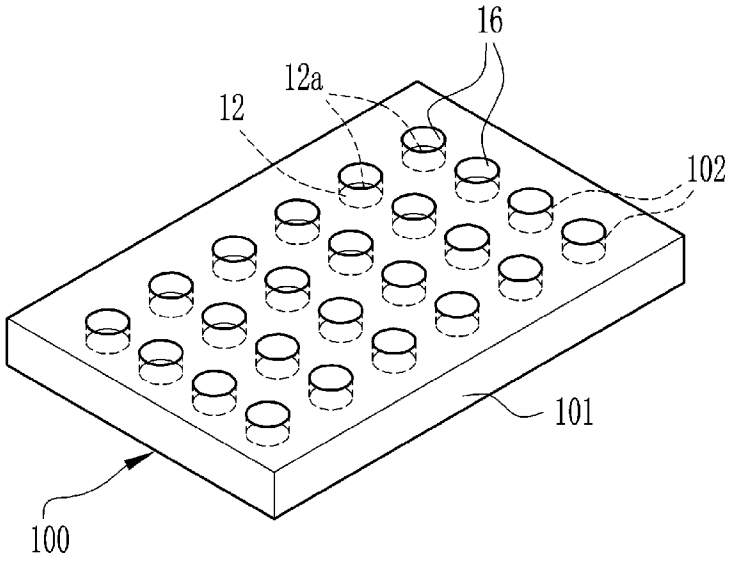
[図12]


35
31
16
42a
42
80
52
12a
12

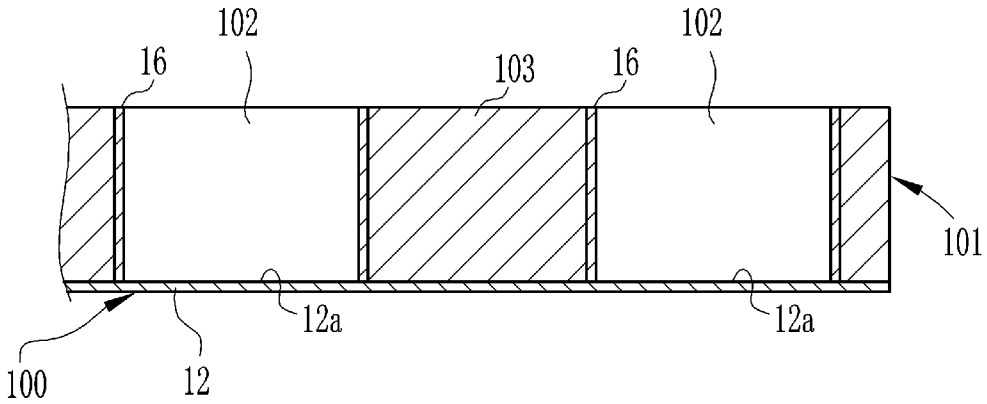
[図13]



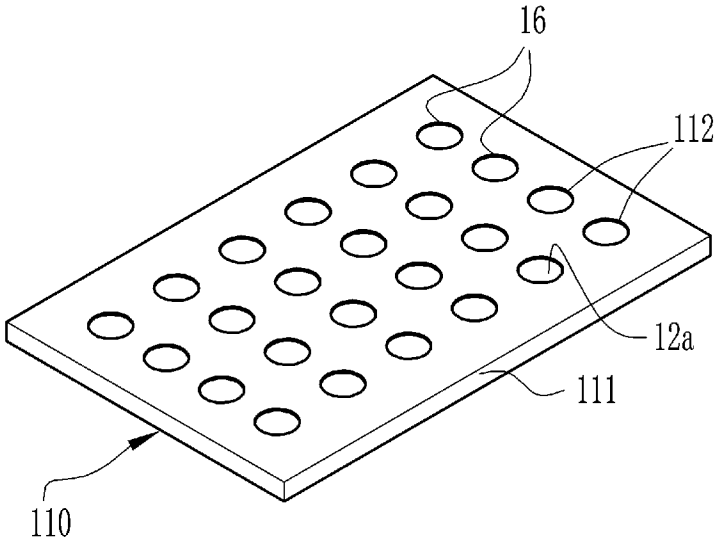
[図14]



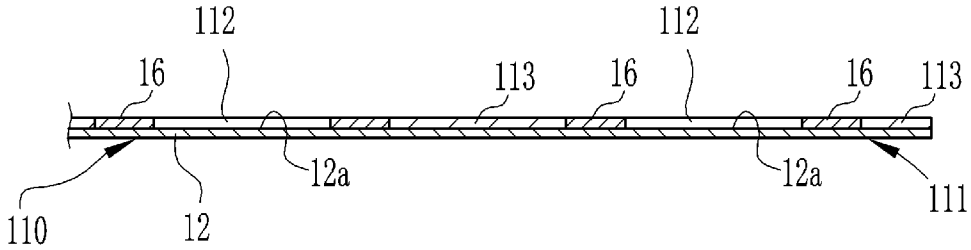
[図15]



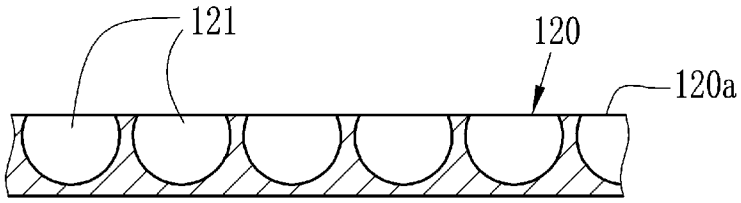
[図16]



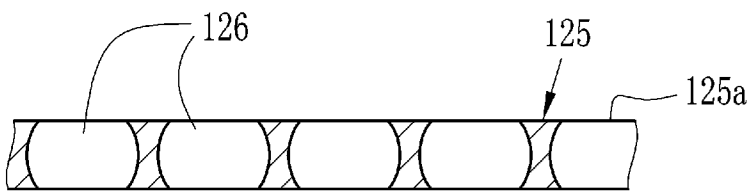
[図17]



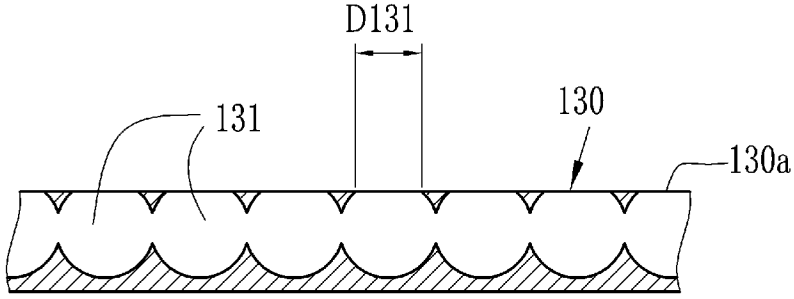
[図18]



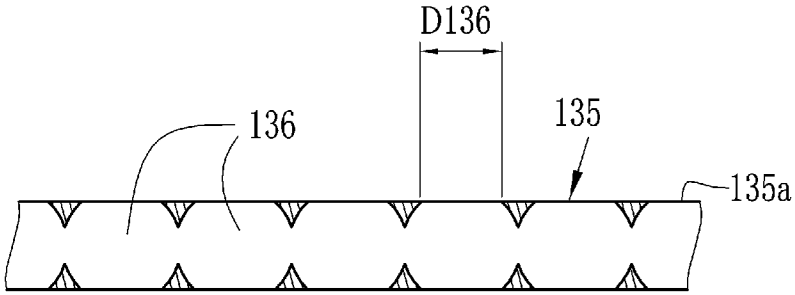
[図19]



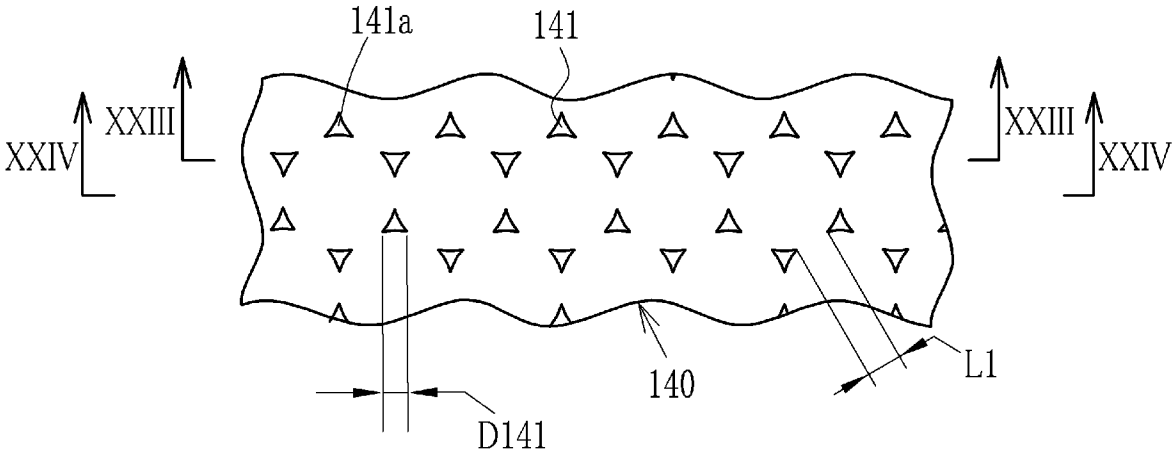
[図20]



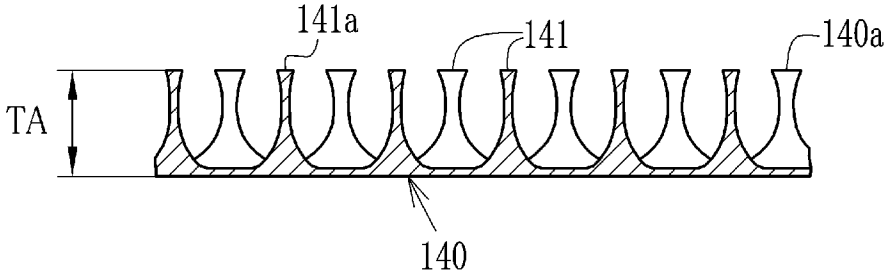
[図21]



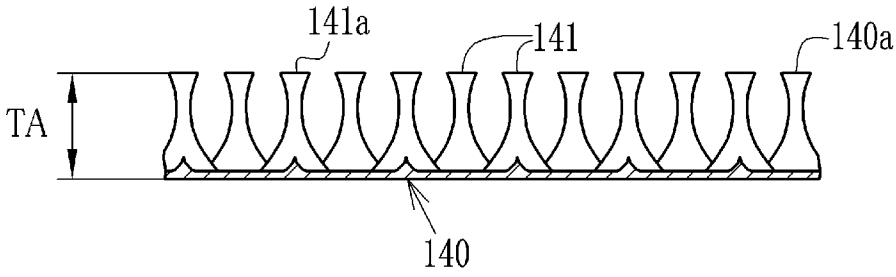
[図22]



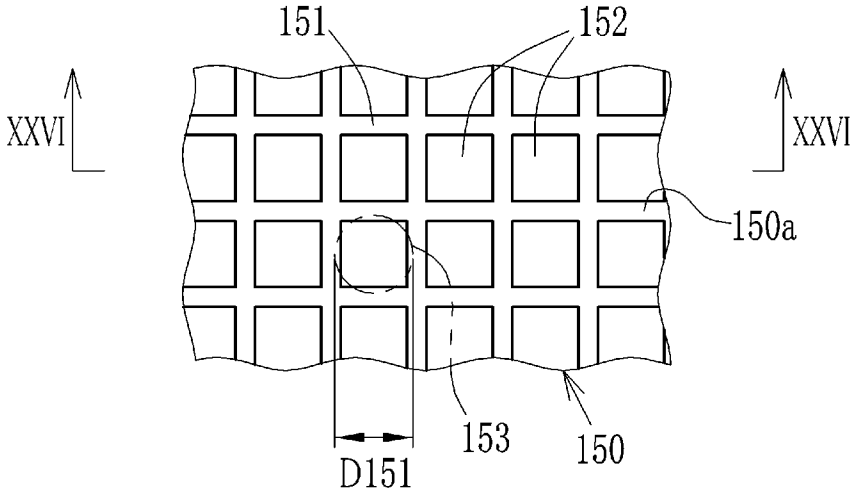
[図23]



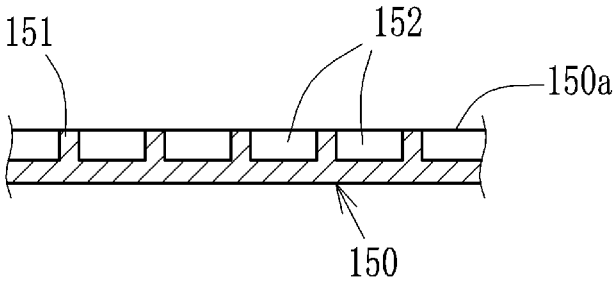
[図24]


141a
141
140a
TA
140

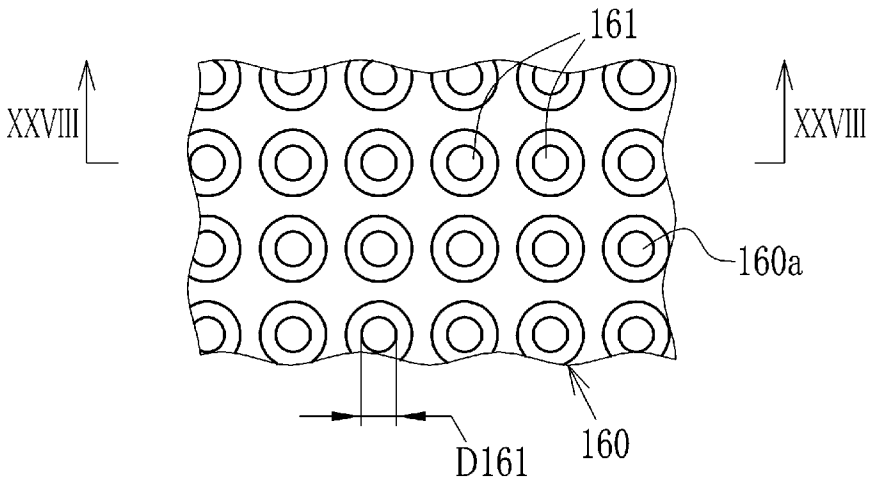
[図25]


151
152
XXVI
XXVI
150a
153
150
D151

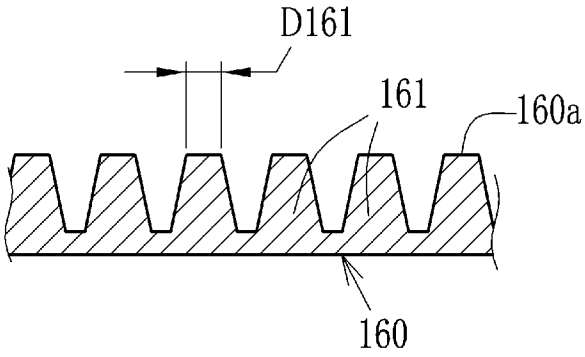
[図26]


151
152
150a
150

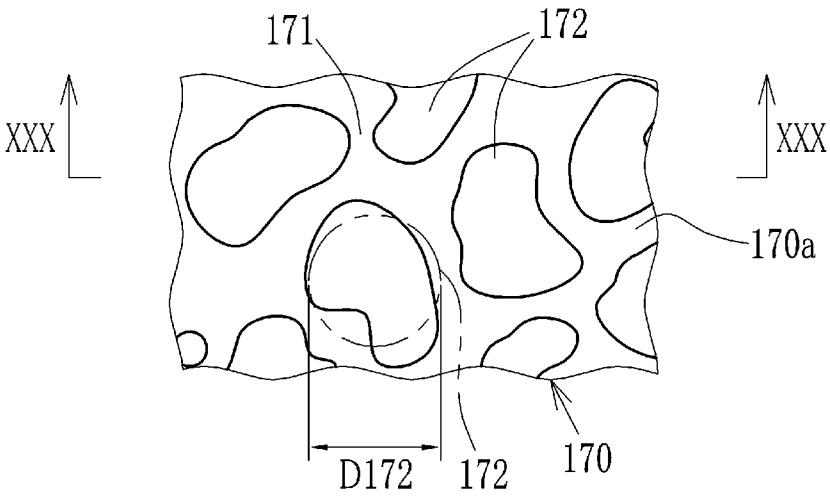
[図27]



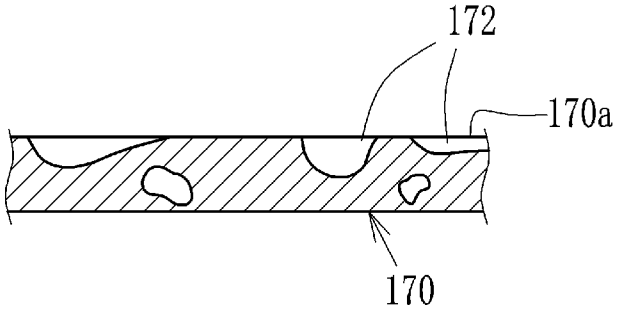
[図28]



[図29]



[図30]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/054875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/00(2006.01)i, *C12M3/00*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M1/00-C12M3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2008-199962 A (Fujifilm Corp.), 04 September 2008 (04.09.2008), paragraphs [0017] to [0019], [0064] to [0071]; examples; fig. 2 & US 2008/0215073 A1 & EP 1961809 A1	1-6 1-8
X Y	Yusuke SAKAI et al., "Honeycomb Film o Riyo shita Spheroid Array no Kaihatsu", Polymer Preprints, Japan (CD-ROM), 2009 Nen, vol.58, no.2, Disk 1, 2T1-09	1-6 1-8
X Y	JP 2009-213421 A (Fujifilm Corp.), 24 September 2009 (24.09.2009), paragraphs [0011] to [0020]; fig. 1 (Family: none)	1,5 1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 May, 2014 (21.05.14)	03 June, 2014 (03.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/054875

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2013/030940 A1 (Hitachi, Ltd.), 07 March 2013 (07.03.2013), paragraphs [0008] to [0017]; examples; fig. 1 (Family: none)	1,7 1-8
X Y	JP 2011-234646 A (Hitachi, Ltd.), 24 November 2011 (24.11.2011), examples 4 to 5 & US 2012/0100612 A1 & EP 2447354 A1 & WO 2010/150521 A1 & KR 10-2012-0024831 A & CN 102803466 A	1,7 1-8
Y	WO 2009/034927 A1 (Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry, Science and Technology), 19 March 2009 (19.03.2009), paragraphs [0032] to [0037] & JP 4576539 B2 & US 2011/0003389 A1 & EP 2189519 A1 & CN 101815782 A	1-8
Y	WO 2007/055056 A1 (Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry, Science and Technology), 18 May 2007 (18.05.2007), paragraphs [0022] to [0024], [0045] & JP 4332653 B2	1-8
P,X	Koji NAKAZAWA et al., "Honeycomb Film o Riyo shita Spheroid Array-ka Baiyo", Dai 35 Kai The Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials Yokoshu (2013), 25 November 2013 (25.11.2013), page 94, 1B-21	1-6
P,X	Yuki GOTO et al., "Honeycomb Film o Riyo shita Spheroid Chip no Kaihatsu", The Society of Chemical Engineers, Japan Dai 45 Kai Shuki Taikai Koen Yoshishu (CD-ROM), 16 August 2013 (16.08.2013), ZB2P51	1-6
A	JP 2008-278769 A (National University Corporation Hokkaido University), 20 November 2008 (20.11.2008), abstract; fig. 2 (Family: none)	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５４８７５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00-C12M3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2008-199962 A（富士フイルム株式会社）2008.09.04, ［００１７］－［００１９］、［００６４］－［００７１］、実施例、図２ & US 2008/0215073 A1 & EP 1961809 A1	１－６ １－８
X Y	堺裕輔、他５名，“ハニカムフィルムを利用したスフェロイドアレイの開発”， 高分子学会予稿集（ＣＤ－ＲＯＭ）、２００９年、５８巻、２号、Ｄｉｓｋ１、２Ｔ１－０９	１－６ １－８

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２１．０５．２０１４	０３．０６．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　５０８２
竹内　祐樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｘ Ｙ	JP 2009-213421 A (富士フイルム株式会社) 2009.09.24, ［００１１］－［００２０］、図１ (ファミリーなし)	１，５ １－８
Ｘ Ｙ	WO 2013/030940 A1 (株式会社日立製作所) 2013.03.07, ［０００８］－［００１７］、実施例、図１ (ファミリーなし)	１，７ １－８
Ｘ Ｙ	JP 2011-234646 A (株式会社日立製作所) 2011.11.24, 実施例４－５ & US 2012/0100612 A1 & EP 2447354 A1 & WO 2010/150521 A1 & KR 10-2012-0024831 A & CN 102803466 A	１，７ １－８
Ｙ	WO 2009/034927 A1 (財団法人北九州産業学術推進機構) 2009.03.19, ［００３２］－［００３７］ & JP 4576539 B2 & US 2011/0003389 A1 & EP 2189519 A1 & CN 101815782 A	１－８
Ｙ	WO 2007/055056 A1 (財団法人北九州産業学術推進機構) 2007.05.18, ［００２２］－［００２４］、［００４５］ & JP 4332653 B2	１－８
Ｐ，Ｘ	中澤浩二、他７名，“ハニカムフィルムを利用したスフェロイドアレイ化培養”， 第３５回日本バイオマテリアル学会大会　予稿集（２０１３）、２０１３年１１月２５日、９４頁、１Ｂ－２１	１－６
Ｐ，Ｘ	後藤優希、他７名，“ハニカムフィルムを利用したスフェロイドチップの開発”， 化学工学会第４５回秋季大会講演要旨集（ＣＤ－ＲＯＭ)、２０１３年８月１６日、ＺＢ２Ｐ５１	１－６
Ａ	JP 2008-278769 A (国立大学法人　北海道大学) 2008.11.20, 要約、図２ (ファミリーなし)	１－８