



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월07일
 (11) 등록번호 10-0877306
 (24) 등록일자 2008년12월29일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7010597

(22) 출원일자 2007년05월10일

심사청구일자 2007년05월10일

번역문제출일자 2007년05월10일

(65) 공개번호 10-2007-0065905

(43) 공개일자 2007년06월25일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2005/019427

국제출원일자 2005년10월21일

(87) 국제공개번호 WO 2006/046490

국제공개일자 2006년05월04일

(30) 우선권주장

JP-P-2004-00315600 2004년10월29일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

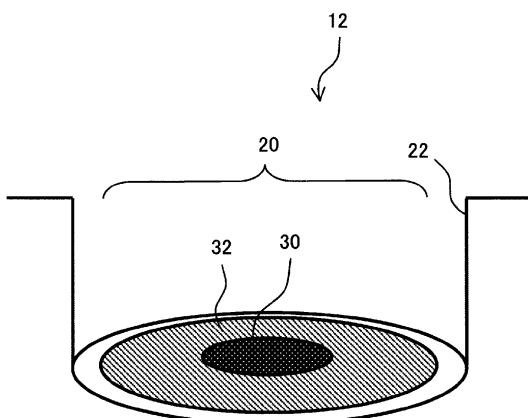
Biomaterials. Vol.24(18), pp.3021-3026 (2003)

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 신경아

(54) 세포 조직체 마이크로칩 및 세포 조직체의 형성 방법**(57) 요 약**

본 발명은 균일한 형상 및 크기의 세포 조직체를 형성시킬 뿐만 아니라 상기 형성된 세포 조직체를 장기간에 걸쳐 배양할 수 있는 마이크로칩을 제공한다. 세포를 보유하기 위한 세포 보유 캐비티(12)를 복수개 가지며, 상기 세포 보유 캐비티의 밑면(20)은 세포 접착성을 나타내는 하나의 접착성 영역(30)과, 상기 접착성 영역(30)을 둘러싸며 세포 비접착성을 나타내는 비접착성 영역(32)을 포함하는 세포 조직체 마이크로칩을 제공한다.

대 표 도 - 도3

특허청구의 범위

청구항 1

서로 결합을 형성할 수 있는 세포로부터 세포 조직체를 형성시키기 위한 세포 조직체 마이크로칩에 있어서, 상기 세포를 보유하기 위한 세포 보유 캐비티를 복수개 갖고,

상기 세포 보유 캐비티의 밑면의 면적은 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 의 범위이며,

상기 밑면은, 세포 접착성을 나타내는 하나의 접착성 영역과, 상기 접착성 영역을 둘러싸며 세포 비접착성을 나타내는 비접착성 영역으로 이루어진 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 접착성 영역은 상기 세포 보유 캐비티 밑면의 중앙부근에 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 세포 보유 캐비티 밑면의 직경은 상기 세포 직경의 2~50배의 범위인 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 접착성 영역에는 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 접착성 물질 또는 이들의 유도체가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 비접착성 영역에는 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 비접착성 물질 또는 이들의 유도체가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 접착성 영역에 상기 세포로부터 형성된 세포 조직체가 접착되어 있는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 마이크로칩.

청구항 7

제 1항에 기재된 세포 조직체 마이크로칩의 상기 세포 보유 캐비티 내에서 상기 서로 결합을 형성할 수 있는 세포를 배양하는 단계; 및 상기 접착성 영역에 접착한 상기 세포 조직체를 형성시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 형성방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 세포를 상기 각 세포 보유 캐비티당 $2 \sim 1.5 \times 10^5$ 개의 범위로 접종하여 배양하는 것을 특징으로 하는 세포 조직체 형성방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 세포를 보유하는 마이크로칩에 관한 것이며, 특히 세포 조직체의 형성에 관한 것이다.

배경기술

<2> 현재, 세포의 배양 기술을 이용한 의료기술의 개발이나 의약품의 개발 등이 널리 행하여져 있다. 즉, 예를 들면 생체의 조직이나 장기에 특유의 기능을 발현하는 세포를 배양하는 기술은, 해당 세포를 해당 조직이나 장기의 생체 외 모델로서 이용한 약물의 독성시험, 내분비 교란 작용의 평가 또는 신약의 스크리닝 등에 응용되고

있다.

<3> 이러한 세포배양 기술은 일반적으로, 콜라겐 등의 세포 접착성 물질을 도포한 평면 기재상에, 세포를 단층형(즉 2차원적)으로 접착시켜서 배양한다. 이 경우, 예를 들면 생체 간으로부터 취출한 초대 간세포(primary hepatocyte) 등에 대하여, 이러한 단층형으로 배양하면 매우 단기간 내에 간 특유의 기능을 소실하거나 사멸해 버린다.

<4> 이에 대하여, 최근 상기 초대 간세포를 단층형으로 배양하는 대신에 세포들이 서로 3차원적으로 결합한 집합체인 세포 조직체로 배양함으로써, 그 생존 상태 및 간 특유의 기능을 보다 장기간에 걸쳐 유지할 수 있음을 알게 되었다.

<5> 이러한 간세포 조직체를 형성하는 방법으로서는, 종래, 예를 들면 특허문헌 1에 있어서, 배양액 중에 특정한 증식인자를 첨가함으로써 폴리우레탄 폼의 기공 내에 구상의 간세포 조직체를 형성하는 것이 개시되어 있다.

<6> 또한, 특허문헌 2에는, 페닐보론산을 갖는 모노머, 아미노기를 갖는 모노머 및 2-하이드록시-에틸메타크릴레이트 공중합체로 이루어진 고분자물질을 코팅한 평면상에 간세포 조직체를 형성하는 것이 개시되어 있다.

<7> 특허문헌 1: 일본국 공개특허 평 10-29951호

<8> 특허문헌 2: 일본국 특허 제3020930호

발명의 상세한 설명

<9> 발명의 개시

<10> 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 그러나, 상기 종래의 방법에 있어서는, 형성되는 세포 조직체의 형상이나 크기가 불균일하게 되어 있었다. 이 때문에, 예를 들면 세포에 의한 특정한 약물의 대사 기능을 평가할 경우에는, 세포 조직체마다 해당 약물에 접촉하는 세포(특히 세포 조직체 표면 부근의 세포)의 수가 다르다는 점 등의 이유로, 정확한 평가 결과를 수득하기가 곤란하였다.

<12> 또한 상기 종래의 방법에 있어서는, 세포가 비교적 약하게 접착하는(즉 세포 접착성이 비교적 낮은) 배양 기재 표면이 이용되어, 형성되는 세포 조직체가 해당 배양 기재 표면으로부터 탈착하여 배양액 중에 부유하는 상태로 되어 있었다. 이 때문에, 예를 들면 배양 과정에 있어서, 영양분이 소비된 배양액을 제거하고 대신에 신선한 배양액을 넣는 조작 등을 행할 때에, 배양액과 함께 세포 또는 세포 조직체가 제거되어버려, 그 후 배양의 속행이 불가능하게 되는 경우가 있었다.

<13> 본 발명은, 상기 문제를 고려하여 이루어진 것으로, 균일한 형상 및 크기의 세포 조직체를 형성시킴과 동시에, 상기 형성된 세포 조직체를 장기간에 걸쳐 배양할 수 있는 마이크로칩 및 상기 마이크로칩을 이용한 세포 조직체의 형성 방법을 제공하는 것을 그 목적 중의 하나로 한다.

<14> 발명을 해결하기 위한 수단

<15> 상기 종래의 과제를 해결하기 위해서, 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 마이크로칩은 세포를 보유하기 위한 세포 보유 캐비티(cell-retaining cavity)를 복수개 가지며, 상기 세포 보유 캐비티의 밑면은 세포 접착성을 나타내는 하나의 접착성 영역과, 상기 접착성 영역을 둘러싸며 세포 비접착성을 나타내는 비접착성 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

<16> 또한 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 형성 방법은 상기 세포 조직체 마이크로칩의 상기 세포 보유 캐비티 내에서 세포를 배양하고, 상기 접착성 영역에서 세포 조직체를 형성시키는 것을 특징으로 한다.

<17> 발명의 효과

<18> 본 발명에 의하면, 균일한 형상 및 크기의 세포 조직체를 형성시킴과 동시에, 상기 형성된 세포 조직체를 장기간에 걸쳐 배양할 수 있는 마이크로칩 및 상기 마이크로칩을 이용한 세포 조직체의 형성 방법을 제공할 수 있다.

<19> 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

<20> 이하, 본 발명의 일 실시태양에 관한 세포 조직체 마이크로칩에 대해서, 도면을 참조하면서 설명한다. 또한,

본 발명에 따른 세포 조직체 마이크로칩은 이하의 실시태양에 한정되는 것이 아니다.

- <21> 도 1은 본 실시태양에 관한 세포 조직체 마이크로칩(이하, 본 마이크로칩(1)이라고 명명)에 대한 설명도이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 마이크로칩(1)은 기판(10) 상에, 세포를 보유하기 위한 소정 깊이를 가지는 유저 공(bottomed hole)으로서 형성된 세포 보유 캐비티(12)를 복수개 갖는다.
- <22> 본 마이크로칩(1)에 있어서는, 상기 세포 보유 캐비티(12) 내에 세포를 분산한 배양액을 넣고, 상기 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20)(도 2 및 도 3 참조)을 상기 세포의 배양 기재 표면으로서 사용함으로써, 해당 세포로부터 세포 조직체를 형성시킨다.
- <23> 여기에서, 이 세포 조직체를 형성시키는 세포로서는, 세포들 사이에서 서로 결합을 형성하는 것이라면 유래하는 동물 종이나 장기·조직의 종류 등을 막론하고 이용할 수 있다. 구체적으로, 이 세포로서는, 예를 들면 인간이나 돼지, 개, 뱃, 마우스 등의 동물 유래의 간, 혀장, 신장, 신경, 피부 등으로부터 채취되는 초대 세포, ES(embryonic stem) 세포, 수립되어 있는 주화 세포 또는 이들에 유전자 조작 등을 시행한 세포 등을 이용할 수 있다. 또한 이 세포로서는, 1종류의 세포를 단독으로 이용할 수도 있고, 2종류 이상의 세포를 임의의 비율로 혼재시켜서 이용할 수도 있다.
- <24> 또한 배양액으로서는, 이용하는 세포의 생존 상태나 기능 등을 유지할 수 있도록 필요한 염류나 영양성분 등을 적절한 농도로 포함하는 수용액이면 임의의 조성의 것을 이용할 수 있다. 구체적으로, 예를 들면 이러한 배양액으로서는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 등의 기초 배지에 항생 물질 등을 첨가한 것 또는 소위 생리 식염수 등을 이용할 수 있다.
- <25> 또한 본 마이크로칩(1)의 기판(10)은, 예를 들면 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트, 폴리아미드, 폴리아세탈, 폴리에스터(폴리에틸렌테레프탈레이트 등), 폴리우레탄, 폴리실폰, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리비닐, 실리콘 등의 합성 수지, EPDM(에틸렌프로필렌디엔모노머) 등의 합성 고무나 천연고무, 유리, 세라믹, 스테인레스강 등의 금속재료 등으로 이루어진다. 또한 이 기판(10)은, 예를 들면 판형(plate shape)으로 형성된다.
- <26> 또한 세포 보유 캐비티(12)는, 기판(10)의 재질 등에 따라 선택되는 임의의 가공 방법을 이용하여 상기 기판(10) 상에 형성될 수 있다. 구체적으로, 예를 들면, 이 세포 보유 캐비티(12)는 머시닝 센터 등을 이용한 천공 가공, 레이저 등을 이용한 광 미세가공, 에칭 가공, 엠보싱 가공 등에 의해 해당 기판(10) 상에 형성되고, 또는 사출 성형, 프레스 성형, 스테레오 리소그래피 등에 의한 해당 기판(10)의 형성 시에 형성할 수 있다.
- <27> 이러한 가공 방법에 의해, 세포 보유 캐비티(12)는, 예를 들면 소정 두께의 기판(10) 표면에, 상기 기판 두께보다 작은 깊이를 가지는 유저공으로서 형성될 수 있다. 또한 이 세포 보유 캐비티(12)는, 예를 들면 기판(10)을 관통하는 구멍을 형성한 후에, 상기 기판(10)의 한 면에 다른 부재를 서로 붙여 밑면으로 함으로써 형성할 수 있다. 또한, 이 세포 보유 캐비티(12)의 밑면을 형성하기 위한 부재로서는, 예를 들면 상기 관통 구멍을 형성한 기판(10)과 같거나 다른 재질의 기판이나 필름 등을 이용할 수 있다.
- <28> 또한 이 세포 보유 캐비티(12)는, 도 1에 도시된 바와 같이 기판(10) 상에 소정의 간격으로 규칙적으로 배치된다. 이 규칙적으로 배치되는 복수의 세포 보유 캐비티(12)는, 예를 들면 CAD(computer aided design) 프로그램에 의하여 가공 위치를 정밀하게 제어하는 머시닝 센터 등을 사용함으로써 형성될 수 있다.
- <29> 도 2는 본 마이크로칩(1)의 일부에 관한 주사형 전자현미경 사진이다. 도 2에 도시된 바와 같이 기판(10) 상에 형성된 세포 보유 캐비티(12)는 그 구멍 구조를 형성하는 밑면(20)과 측면(22)을 갖게 된다. 또한 도 2에 도시된 바와 같이 이 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20)과 측면(22)은 실질적으로 평활한 표면을 갖는다.
- <30> 이 밑면(20)의 형상은 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 도 2에 도시된 바와 같이 원 형상이어도 좋고, 그 외, 타원형상, 다각형 등이어도 무방하다. 또한 이 밑면(20)의 직경은 이용하는 세포 직경의 2~50배 정도의 범위인 것이 바람직하며, 특히 4배~30배 정도의 범위인 것이 바람직하다. 즉, 이 밑면(20)의 면적은, 세포의 크기가 그 종류나 상태 등에 따라 다르기 때문에 일률적으로는 말할 수 없지만, 예를 들어 $100\sim1\times10^6 \mu\text{m}^2$ 의 범위인 것이 바람직하며, 특히 $300\sim3\times10^5 \mu\text{m}^2$ 의 범위인 것이 바람직하다.
- <31> 이는, 상기 밑면(20) 상에 접종된 세포(즉, 세포 보유 캐비티(12) 내에 접종된 세포)가 해당 밑면(20) 상에서 세포 조직체를 형성하므로, 상기 밑면(20)의 크기는 해당 밑면(20) 상에서 형성되는 세포 조직체에 포함되는 세포의 수를 규정하기 때문이다. 즉, 상기 밑면(20)의 크기가 상기 하한값보다 작을 경우에는 해당 밑면(20) 상

에 세포 조직체를 형성하기 위하여 필요한 수의 세포를 보유할 수 없다. 또한, 상기 밑면(20)이 상기 상한값보다 클 경우에는, 해당 밑면(20) 상에 보유될 세포의 수가 지나치게 많기 때문에 거대한 세포 조직체가 형성된다. 이 경우, 세포 조직체의 내부에 위치하는 세포가 상기 세포 조직체 외의 배양액으로부터 영양이나 산소를 충분히 받을 수 없어 사멸해버리는 경우가 있다.

<32> 또한 이 세포 보유 캐비티(12)의 깊이는, 이용하는 세포 직경의 1~50배 정도의 범위인 것이 바람직하며, 특히 2배~30배 정도의 범위인 것이 바람직하다. 이는, 이 세포 보유 캐비티(12)의 깊이가 상기 하한값보다 작을 경우에는 상기 세포 보유 캐비티(12) 내에 세포를 확실하게 보유하는 것이 곤란하게 되기 때문이다. 또한 이 세포 보유 캐비티(12)의 깊이가 상기 상한값보다 클 경우에는, 상기 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20) 상의 세포에 대한 산소나 영양분의 공급이 불충분하게 되는 경우가 있기 때문이다.

<33> 도 3은 본 마이크로칩(1)이 갖는 복수의 세포 보유 캐비티(12) 중 하나에 관한 설명도이다. 도 3에 도시된 바와 같이, 이 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20)은 세포 접착성을 나타내는 1개의 접착성 영역(30)과, 상기 접착성 영역(30)을 둘러싸며 세포 비접착성을 나타내는 비접착성 영역(32)을 포함한다.

<34> 상기 접착성 영역(30)은 예를 들면 배양액 등의 용액 중에서 세포가 접착하기에 적절한 하진 상태나 친수성·소수성을 가지는 세포 접착성 표면을 갖는다. 여기에서, 상기 세포 접착성 표면이라는 것은 예를 들면 배양액 중에서 세포가 상기 표면 위에 침강했을 경우에, 세포가 구형으로부터 변형하여 비교적 편평한 형상으로 접착할 수 있는 표면을 의미한다.

<35> 구체적으로, 상기 접착성 영역(30)의 표면은 예를 들면, 세포 보유 캐비티(12)를 형성할 때에 상기 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20)으로서 노출된 기판(10)의 재료 표면 그 자체로서 형성할 수 있다. 또한 상기 접착성 영역(30)의 표면은 예를 들면, 상기 노출된 기판(10)의 표면상에 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 접착성 물질 또는 이러한 유도체가 고정화된 표면으로 형성될 수 있다.

<36> 이 접착성 영역(30)에 고정화되는 세포 접착성 물질로서는, 예를 들면 이용하는 세포의 세포막에 존재하는 단백질 등의 세포 표면 분자(예를 들면 인테그린이나 당 수용체 등) 중 특정한 것에 대하여 결합할 수 있는 물질을 이용할 수 있다.

<37> 구체적으로, 예를 들면 생체로부터 취득된 세포 접착성 물질로서는 콜라겐, 피브로네틴, 라미닌 등을 이용할 수 있다. 또한 이를 유도체로서는 예를 들면 상기 세포 접착성 물질에 임의의 작용기나 고분자쇄 등을 결합시킨 (예를 들면 축합반응 등을 이용해서 공유결합시킨) 것을 이용할 수 있다.

<38> 또한 합성된 세포 접착성 물질로서는 세포 접착성을 나타내는 특정한 아미노산 서열(예를 들면 아르기닌·글리신·아스파라긴산(즉 RGD) 서열 등)이나 특정한 당쇄 서열(예를 들면 갈락토오스 측쇄 등)을 갖는 화합물 등을 이용할 수 있다. 또한 이를 유도체로서는, 상기 세포 접착성 물질에 임의의 작용기나 고분자 등을 결합시킨 것을 이용할 수 있다.

<39> 이들 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 접착성 물질 또는 이러한 유도체는, 예를 들면 상기 세포 접착성 물질 등의 수용액을 밑면(20) 상에서 건조시킴으로써 상기 밑면(20) 위에 고정화할 수 있다. 또한 이 세포 접착성 물질 등은 예를 들면 상기 세포 접착성 물질 등의 수용액 중에 있어서, 상기 세포 접착성 물질이 갖는 작용기와 밑면(20) 상의 작용기 사이에서 화학반응(예를 들면 카복실기나 아미노기 등 사이의 축합반응 등)을 일으키게 하여 공유결합을 형성시키는 것 등에 의해, 상기 밑면(20) 위에 고정화할 수 있다.

<40> 한편, 비접착성 영역(32)은 예를 들면 배양액 중에서 세포가 실질적으로 접착될 수 없도록, 세포의 접착에는 부적절한 하진 상태나 친수성·소수성을 가지는 세포 비접착성 표면을 갖는다. 여기에서, 상기 세포 비접착성을 나타내는 표면이란, 예를 들면 배양액 중에서 세포가 상기 표면상에 침강했을 경우에, 그 세포 형상이 구형으로부터 거의 변화되지 않을 정도로 매우 약하게 접착되지만 배양액의 흐름 등에 의해 용이하게 탈착하고, 또는, 상기 세포가 전혀 접착될 수 없어 구형인 채로 배양액 중에 부유 상태를 유지하게 하는 표면이다.

<41> 구체적으로, 상기 비접착성 영역(32)의 표면은, 예를 들면 세포 보유 캐비티(12)를 형성할 경우에 상기 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20)으로서 노출된 기판(10)의 재료 표면 바로 그 자체로 형성할 수 있다. 또한 이 비접착성 영역(32)의 표면은, 예를 들면 상기 노출된 기판(10)의 표면상에 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 비접착성 물질 또는 이러한 유도체가 고정화된 표면으로서 형성할 수 있다.

<42> 이 비접착성 영역(32)에 고정화되는 세포 비접착성 물질로서는, 예를 들면 이용하는 세포의 세포막에 존재하는 단백질이나 당쇄 등의 세포표면 분자에 대하여 결합하지 않는 생체 유래된 또는 합성된 세포 비접착성 물질을

이용할 수 있다.

- <43> 구체적으로, 예를 들면 생체 유래의 세포 비접착성 물질로서는, 알부민 등의 높은 친수성을 나타내는 단백질 등을 이용할 수 있다. 또한 이들 유도체로서는 예를 들면 상기 세포 비접착성 물질에 임의의 작용기나 고분자 쇄를 결합시킨 것을 이용할 수 있다.
- <44> 또한 예를 들면 합성된 세포 비접착성 물질로서는, 폴리에틸렌글리콜 등의 매우 높은 친수성을 나타내는 고분자나, MPC(2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린), poly-HEMA(폴리-하이드록시에틸 메타크릴레이트), SPC(세그먼트화 폴리우레탄) 등을 이용할 수 있다. 또한 이들 유도체로서는 상기 세포 비접착성 물질에 임의의 작용기나 고분자 등을 결합시킨 것을 이용할 수 있다.
- <45> 이들 생체로부터 취득되거나 합성된 세포 비접착성 물질 또는 이들 유도체는, 예를 들면 상기 세포 비접착성 물질 등의 수용액을 밀면(20) 상에서 건조시킴으로써, 상기 밀면(20) 위에 고정화할 수 있다. 또한 상기 세포 비접착성 물질 등은, 예를 들면 상기 세포 비접착성 물질 등의 수용액 중에서, 상기 세포 비접착성 물질 등이 갖는 작용기와 밀면(20) 상의 작용기 사이에서 화학반응을 일으키게 하여 공유결합을 형성시키는 것 등에 의해, 상기 밀면(20) 위에 고정화할 수 있다.
- <46> 또한 접착성 영역(30)은, 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)의 중앙부근에 형성되어도 좋다. 이 경우, 예를 들면 도 1에 도시된 바와 같이 본 마이크로칩(1) 위에 세포 보유 캐비티(12)가 규칙적으로 배치되어 있으면, 상기 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20) 중 접착성 영역(30) 위에서 형성되는 세포 조직체도 또한 본 마이크로칩(1) 위에 규칙적으로 배치할 수 있는 동시에, 상기 형성되는 세포 조직체의 형상도 균일하게 제조될 수 있다.
- <47> 따라서, 예를 들면 각 세포 조직체에 형광색소 등을 이용한 염색 처리 등을 시행하고, 그 염색의 정도 등에 의해 상기 각 세포 조직체의 기능을 평가하는 경우에는, 균일한 형상의 세포 조직체의 각 위치를 본 마이크로칩(1) 위에 설정한 좌표값 등에 의해 정확하게 특정할 수 있기 때문에, 상기 염색의 정도를 자동 해석 장치 등을 이용해서 간편, 신속 및 확실하게 해석할 수 있다.
- <48> 또한 이들 접착성 영역(30)과 비접착성 영역(32)을 포함하는 밀면(20)은, 도 3에 도시된 바와 같이 그 전체가 평면이 되도록 형성되어도 좋고, 적어도 한쪽 영역의 일부 또는 접착성 영역(30)과 비접착성 영역(32)과의 사이에 단차 등을 갖도록 형성되어도 좋다.
- <49> 다음에 본 마이크로칩(1)을 이용해서 세포 조직체를 형성하는 방법에 대해 그 개략을 설명한다. 우선, 사용할 세포를 배양액 중에 소정의 밀도가 되도록 분산한다. 그리고, 상기 세포 분산액을 각 세포 보유 캐비티(12) 내에 소정량씩 넣음으로써 세포를 접종한다. 이렇게 해서, 상기 세포를 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20) 위로 침강시킨다.
- <50> 여기에서, 하나의 세포 보유 캐비티(12) 내에 접종되는 세포의 수는, 밀면(20) 위에 침강한 세포들이 서로 결합을 형성하기에 필요할 정도로 접촉할 수 있고, 또한 상기 세포가 집합해서 형성되는 세포 조직체의 크기가 소정의 범위 내로 억제되도록 결정하는 것이 바람직하다.
- <51> 구체적으로, 예를 들면 이 접종 세포수는 세포 보유 캐비티(12)당, $2\sim1.5\times10^5$ 개의 범위인 것이 바람직하며, 특히 $50\sim3.0\times10^4$ 개의 범위인 것이 바람직하다. 또한, 세포 보유 캐비티 밀면(20)의 단위 면적당 접종 세포수는 $30\sim1.5\times10^4$ 개/ mm^2 의 범위인 것이 바람직하다.
- <52> 이는 세포 조직체를 형성하기 위해서 세포 보유 캐비티(12)당 적어도 2개의 세포가 보유될 필요가 있기 때문이다. 또한 접종 세포의 수가 지나치게 많으면 상기 세포로부터 형성되는 세포 조직체가 거대하게 되고, 그 내부의 세포가 영양이나 산소의 부족에 의해 괴사해 버리는 경우가 있다.
- <53> 다음에 이와 같이 하여 세포가 접종된 본 마이크로칩(1)을 수평으로 유지하면서 소정의 기간, 정치 상태로 유지함으로써 상기 세포를 배양한다. 이 정치 배양 기간에 있어서, 각 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20) 위에 침강한 세포 중, 접착성 영역(30) 위에 침강한 세포를 상기 접착성 영역(30)의 표면에 접착시킨다. 또한, 비접착성 영역(32) 위에 침강한 세포는, 상기 비접착성 영역(32)의 표면에 접착하지 않고 부유 상태를 유지하거나 매우 약하게 접착된다.
- <54> 그 후 좀더 상기 정치 배양을 유지하거나 본 마이크로칩(1)을 수평면 상에서 원호를 그리는 것 같이 회전시키면서 배양을 계속한다. 이로 인해, 배양 기간의 경과에 따라, 각 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20) 위에 침강한 세포는 서로 결합한다. 이 결과, 세포는 상기 밀면(20) 중, 접착성 영역(30)에 모이도록 서서히 이동하고, 상

기 접착성 영역(30) 위에서 상기 세포들이 3차원적으로 결합한 세포 조직체를 형성한다. 이 세포 조직체는 배양액 중에 부유하지 않고, 접착성 영역(30) 위에 접착한 상태에서 세포 보유 캐비티(12) 내에 안정하게 보유된 채 장기간에 걸쳐 배양될 수 있다.

<55> 또한, 본 마이크로칩(1)에 있어서는, 각 세포 보유 캐비티(12)의 측면(22)의 일부에, 상기 세포 보유 캐비티(12)에 배양액을 유입시키기 위한 유입구와, 상기 세포 보유 캐비티(12)로부터 상기 배양액을 유출하기 위한 유출구를 또한 형성함으로써, 접착성 영역(30) 위로 세포 조직체를 형성한 후, 상기 세포 보유 캐비티(12) 내에 배양액을 유통시키면서 배양할 수 있다.

실시예

<62> 다음에 본 마이크로칩(1)을 이용해서 세포 조직체를 형성시킨 실시예에 관하여 설명한다.

<63> [세포 조직체 마이크로칩의 제작]

<64> 본 실시예에서는, 본 마이크로칩(1)의 기판(10)으로서, 폴리메틸메타크릴레이트제의 평판($24\text{mm} \times 24\text{mm}$, 두께 $200\mu\text{m}$)을 이용하였다. 즉, 상기 폴리메틸메타크릴레이트 평판의 표면 일부에, 10 mm^2 사각형 범위에 걸쳐, 머시닝 센터(탁상형 NC미세가공기, PMT사 제품)를 이용한 천공가공을 처리함으로써, 직경 $300\mu\text{m}$ 의 원형의 관통 구멍을 약 1000개 형성하였다. 이 원형 관통 구멍은 서로 그 중심간 거리가 $400\mu\text{m}$ 가 되도록 규칙적으로 배치하였다.

<65> 또한 본 마이크로칩(1)의 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)으로서, 유리로 만든 평판($22\text{mm} \times 22\text{mm}$, 두께 $400\mu\text{m}$)을 이용하였다. 즉, 이 유리 평판의 표면의 일부에 12mm^2 의 사각형 범위에 걸쳐, 스퍼터링 장치(E-1030, 히타치 주식회사 제품)를 이용한 스퍼터링 처리를 행함으로써, 백금(Pt) 박막(두께 9nm)을 형성하였다. 그리고, 이 유리 평판의 백금 표면 부분과, 상기 폴리메틸메타크릴레이트 평판상의 관통 구멍을 형성한 부분의 위치를 맞추고, 실리콘계 접착제(TSE389, GE 도시바 실리콘 주식회사 제품)를 이용하여 상기 유리 평판과 상기 폴리메틸메타크릴레이트 평판을 접착하였다. 이렇게 하여, 도 2에 도시된 바와 같은, 직경 $300\mu\text{m}$ 의 원형의 밀면(20)을 갖는 깊이 $200\mu\text{m}$ 의 세포 보유 캐비티(12)를 형성하였다.

<66> 한편, 직경 $100\mu\text{m}$, 길이 $200\mu\text{m}$ 의 원통형 돌기를 복수 갖는 PDMS(폴리(디메틸실록산))제의 스템프를 몰드 성형으로 제작하였다. 상기 스템프는 각 원통형 돌기의 위치가 본 마이크로칩(1) 상의 각 세포 보유 캐비티(12)의 위치에 대응하도록, 상기 돌기 첨단의 원형 단면의 중심간 거리를 $400\mu\text{m}$ 로 하였다. 그리고, 상기 스템프를 이용한 마이크로 컨택트 프린팅에 의해, 다음과 같이 하여 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)에 접착성 영역(30)을 형성하였다.

<67> 즉, 접착성 영역(30)의 표면에 고정화하는 세포 접착성 물질로서, 세포 접착성의 RGD서열을 갖는 웹타이드(아미노산 서열: RGDSAAAAC, 싸모 일렉트론사 제품)를 준비하였다. 그리고, 이 세포 접착성 웹타이드를 $1.78\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 DMSO(디메틸설폐사이드) 용액에, 상기 제작한 스템프의 각 원통형 돌기의 첨단을 담금으로써, 상기 각 원통형 돌기의 첨단 면에 상기 웹타이드 용액을 도포하였다.

<68> 다음에 위상차 현미경 아래에 두고 관찰하면서, 웹타이드 용액을 도포한 스템프의 각 원통형 돌기의 위치를 상기 백금이 증착된 본 마이크로칩(1)의 각 세포 보유 캐비티(12) 밀면의 중앙부근 위치에 맞추었다. 그리고, 상기 각 원통형 돌기의 첨단을 상기 밀면(20)에 눌러 덮음으로써, 상기 각 원통형 돌기의 첨단에 도포되어 있던 웹타이드 용액을 상기 각 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)의 중앙부근에 도포하고, 질소 분위기 하에서 건조시켰다. 이에 따라 세포 접착성 웹타이드 문자 말단의 시스테인이 갖는 티올기와 밀면(20)의 백금 표면과의 사이에 화학결합을 형성시켜, 상기 백금 표면에 상기 세포 접착성 웹타이드를 고정화하였다.

<69> 이와 같이 하여, 직경 $300\mu\text{m}$ 의 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)의 중앙부근에 세포 접착성 웹타이드가 고정화된 직경 약 $100\mu\text{m}$ 의 접착성 영역(30)을 하나 형성하였다.

<70> 다음에 상기 접착성 영역(30)을 포함하는 밀면(20) 위에, 다음과 같이 해서 비접착성 영역(32)을 형성하였다. 즉, 비접착성 영역(32)의 표면에 고정화하는 세포 비접착성 물질로서, 분자량 5000의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 사슬을 갖는 세포 비접착성의 합성 고분자(화학식: $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{SH}$, Nektar Therapeutics사 제품)를 준비하였다.

<71> 그리고, 상기 접착성 영역(30)을 형성한 각 세포 보유 캐비티(12) 내에, 상기 세포 비접착성 고분자를 $25\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 함유하는 에탄올 용액을 과잉량 첨가하였다. 그리고, 질소 분위기 하에서 상기 세포 비접착성 고분자가 갖는 티올기와 밀면(20)의 백금 표면과의 사이에 화학결합을 형성시킴으로써, 상기 백금 표면 (즉, 밀면

(20) 중 접착성 영역(30)을 제외한 영역)에 상기 세포 비접착성 고분자를 고정화하였다. 그 후에 본 마이크로칩(1)의 전체를 에탄올 용액으로 1분간 세정해서 잉여의 세포 비접착성 고분자를 제거함과 동시에, 추가로 약 2시간 동안 에탄올 중에 침지시킴으로써 멸균 처리하였다.

<72> 이렇게 하여, 각 세포 보유 캐비티(12) 밑면(20)의 중앙부근에 접착성 영역(30)을 형성하고, 상기 접착성 영역(30) 이외의 영역에 비접착성 영역(32)을 형성한 본 마이크로칩(1)을 제작하고, 이하의 배양 실험에 이용하였다.

<73> [세포의 준비]

<74> 본 실시예에서는, 세포로서 랫의 간으로부터 공지의 콜라겐분해효소 관류법을 이용하여 제조한 초대 간세포를 이용하였다. 여기에서, 이 간 세포의 제조법에 대해서 간단하게 설명한다. 즉, 우선, 7주령의 위스터계 랫(체중 250g)의 문맥(간에 연결되는 혈관의 하나)에 캐뉼러를 삽입하고, 상기 캐뉼러로부터 간에 소정 조성의 혈액제거 용액을 도입한 후, 콜라겐분해효소(와코 준야쿠사 제품)를 0.5mg/ml의 농도로 용해한 소화액을 관류하고, 간 내에 있어서의 간세포들의 결합 등을 절단하는 소화 처리를 행하였다. 그리고, 이 소화 처리된 간을 적출하고, 메스나 피펫 등을 이용한 분산 처리와 배양액 등을 이용한 세정 처리에 의해, 개개의 세포가 분산된 단리 상태의 간세포를 수득하였다.

<75> 또한 배양액으로서는, 둘베코 개변 이글 배지(DMEM, GIBCO사 제품) 13.5g/l 앤, 60mg/l 의 프롤린(시그마사 제품), 50mg/ml의 상피세포성장인자(EGF, 후나코시사 제품), 7.5mg/l 의 히드로코르티손(와코 준야쿠사 제품), 0.1 μM의 황산구리 · 5수화물(와코 준야쿠사 제품), 3 μg/l 의 셀렌산(와코 준야쿠사 제품), 50pM의 황산아연 · 7수화물(와코 준야쿠사 제품), 50 μg/l 의 리놀레산(시그마사 제품), 58.8mg/l 의 페니실린(메이지세이카사 제품), 100mg/l 의 스트렙토마이신(메이지세이카사 제품), 1.05g/l 의 탄산수소나트륨(와코 준야쿠사 제품), 1.19g/l 의 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진]에탄설�onium(HEPES; 도진도사 제품)을 가한 무혈청 배양액을 이용하였다.

<76> [세포 조직체의 형성]

<77> 이렇게 하여 수득한 간세포를 5.0×10^5 개/ml의 밀도가 되도록 배양액에 분산하였다. 또한 폴리스티렌제의 배양용기(직경 35mm, 팔콘사 제품)의 바닥부에 상기 멸균 처리 후의 본 마이크로칩(1)을 탑재하였다. 그리고, 상기 본 마이크로칩(1) 위에 이 세포분산액의 일부를 2.0ml 가하고, 5% 이산화탄소, 95% 공기의 분위기 하에서, 37°C에서 정지 상태로 배양하였다.

<78> 또한 제1 대조 실험으로서, 직경 35mm의 폴리스티렌제의 배양 용기의 바닥부에 본 마이크로칩(1)의 세포 보유 캐비티 밑면(20)을 형성하기 위해 이용한 것과 동일한 유리로 만든 평판(22mm × 22mm, 두께 400μm)을 탑재하였다. 그리고, 상기 유리 평판 위에 이 세포 분산액의 다른 일부를 2.0ml 가하고, 동일하게 정지 배양을 행하였다.

<79> 또한, 제2 대조 실험으로서, 직경 35mm의 폴리스티렌제의 배양 용기의 바닥부에 본 마이크로칩(1)의 세포 보유 캐비티 밑면(20)을 형성하기 위해 이용한 것과 동일한 유리로 만든 평판(22mm × 22mm, 두께 400μm) 위에 콜라겐(Cellmatrix Type I-C, 니타 젤라틴사 제품)을 코팅한 것을 탑재하였다. 그리고, 상기 콜라겐 코팅 유리 평판 위에 이 세포 분산액의 또 다른 일부를 2.0ml 가하고, 동일하게 정지 배양을 행하였다. 본 마이크로칩(1) 및 대조 실험에 이용한 배양 용기 내의 배양액은 배양 시작 후 2일 마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

<80> 도 4는 세포 보유 캐비티(12) 내에 형성된 간세포 조직체(도 4 가운데의 T)의 배양 3일째에 있어서의 위상차 현미경 사진을 나타낸다. 도 3에 도시된 바와 같이 각 세포 보유 캐비티(12) 내에는 하나의 간세포 조직체가 형성되었다. 이 각 간세포 조직체의 형상은 모두 표면이 평활화한 구형이었다. 또한, 이러한 구형의 간세포 조직체는 본 마이크로칩(1)의 각 세포 보유 캐비티(12) 내에 있어서 배양 시작 후 1~2일 사이에 형성되었다.

<81> 또한, 도 3에 도시된 바와 같이 각 세포 보유 캐비티(12) 내에 있어서, 각 간세포 조직체는 밑면(20)의 중앙부근에 형성되었다. 즉, 각 간세포 조직체는 각 세포 보유 캐비티(12)의 밑면(20) 중 접착성 영역(30) 위에 접착하고, 배양액 중에 부유하지 않으며 안정하게 보유되어 있었다. 또한, 비접착성 영역(32) 위에는 간세포는 거의 존재하지 않았다.

<82> 이에 대하여 제1 대조 실험에 있어서는, 유리 평판 상의 전체에, 접종된 세포의 일부로부터, 형상이 찌그러지고 크기가 다양한 간세포 조직체가 배양액 중에 부유하는 상태로 형성되었다(도시 생략). 또한 제2 대조 실험에 있어서, 간세포는 콜라겐이 코팅된 유리 평판 위에 편평하게 확산한 단층 상태로 접착되어 있었다(도시 생략).

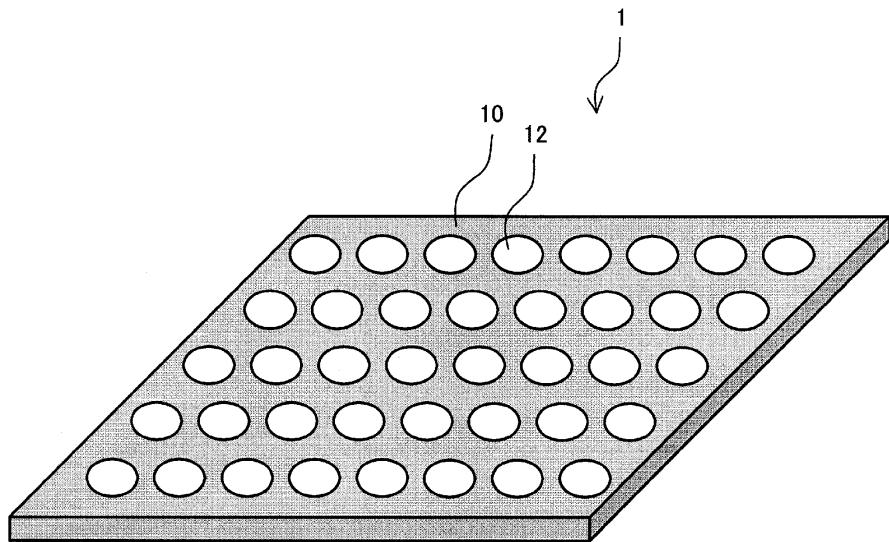
- <83> 도 5는 본 마이크로칩(1)의 세포 보유 캐비티(12) 내에서 형성된 간세포 조직체와 제1 대조 실험에서 형성된 간세포 조직체에 대한 입경 분포를 나타내는 히스토그램이다. 도 5에 있어서, 가로축은 간 세포 조직체의 직경 (μm)을 나타낸다. 또한 세로축은 본 마이크로칩(1) 내 또는 대조 실험의 각각에 있어서, 입경 측정의 대상이 된 간세포 조직체의 총수에 대한 각 가로축이 나타내는 직경을 갖는 간세포 조직체의 개수의 비율(%)을 나타낸다. 또한 도 5에 있어서, 원 표시는 본 마이크로칩(1)을 이용해서 형성된 간세포 조직체에 관한 결과를, 또 사각 표시는 제1 대조 실험에 있어서 형성된 간세포 조직체에 관한 결과를 각각 나타낸다.
- <84> 도 5에 도시된 바와 같이 본 마이크로칩(1)에서 형성된 간세포 조직체 중, 86%의 간세포 조직체의 직경은 160 ~180 μm 의 범위였다. 즉, 본 마이크로칩(1)의 각 세포 보유 캐비티(12) 내에 있어서는, 입경이 비슷하고 매우 균일한 크기의 간세포 조직체가 형성되었다.
- <85> 이에 대하여 제1 대조 실험에서 형성된 간세포 조직체는 여러가지 입경의 것을 포함하여, 전체적으로 크기가 불균일하였다. 또한, 이 간세포 조직체의 입경의 측정은 현미경 하에서의 관찰 결과를 화상 해석함으로써 수행하였다.
- <86> 또한 본 마이크로칩(1)에서 형성된 간세포 조직체와 제2 대조 실험에서의 단층상의 간세포에 대해서, 간에 특유한 해독 기능의 하나인 암모니아(생체 내 노폐물질 중 하나) 제거 능력을 평가하였다. 이 암모니아 제거 능력의 평가에 있어서는, 우선, 배양 시작 후 3, 7, 10, 14일째에 있어서, 간세포 조직체 또는 단층의 간세포를 포함하는 배양 용기 내의 배양액을 소정 농도의 암모니아를 첨가한 배양액으로 교환해서 배양하였다. 그리고, 소정 시간 경과 후에 상기 암모니아 첨가 배양액을 회수하고, 상기 회수한 배양액 중 암모니아 농도의 상기 첨가 후 소정 시간 내에서의 감소량을 시판의 측정 키트(와코 준야쿠사 제품)를 이용해서 측정하였다.
- <87> 도 6은 암모니아 제거 능력의 평가 결과를 나타낸다. 도 6에 있어서, 가로축은 배양 시간(배양 일수)을, 세로축은 단위 세포 수(10^6 개)당, 단위 시간(시간)당의 암모니아 제거량(μmol)을 각각 나타낸다. 또한 도 6에 있어서, 원 표시는 본 마이크로칩(1)을 이용해서 형성된 간세포 조직체에 관한 결과를, 또 사각 표시는 제2 대조 실험에서의 단층상의 간세포에 관한 결과를 각각 나타낸다.
- <88> 도 6에 도시된 바와 같이 본 마이크로칩(1)에서 형성된 간세포 조직체는 배양 시작 후 2주간에 걸쳐 암모니아 제거 능력이 계속해서 발현되었다. 이에 대하여 제2 대조 실험에서의 단층상의 간세포의 암모니아 제거 능력은 도 6에 도시된 바와 같이 배양 1주간 이후는 단조로 저하하고, 배양 2주간의 시점에서는 완전하게 소실되었다. 또한, 제1 대조 실험에 있어서는 형성된 간세포 조직체가 부유 상태이며, 배양액의 교환 등의 경우에 상기 간세포 조직체가 많이 제거되기 때문에 암모니아 제거 능력을 평가하는 것은 곤란하였다.
- <89> 이와 같이, 본 마이크로칩(1)을 사용함으로써 간 특유의 기능이 높은 레벨에서 계속해서 발현되는 간세포 조직체를 각 세포 보유 캐비티(12)의 밀면(20)의 중앙 부근에 안정적으로 고정한 상태에서 장기간에 걸쳐 배양할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

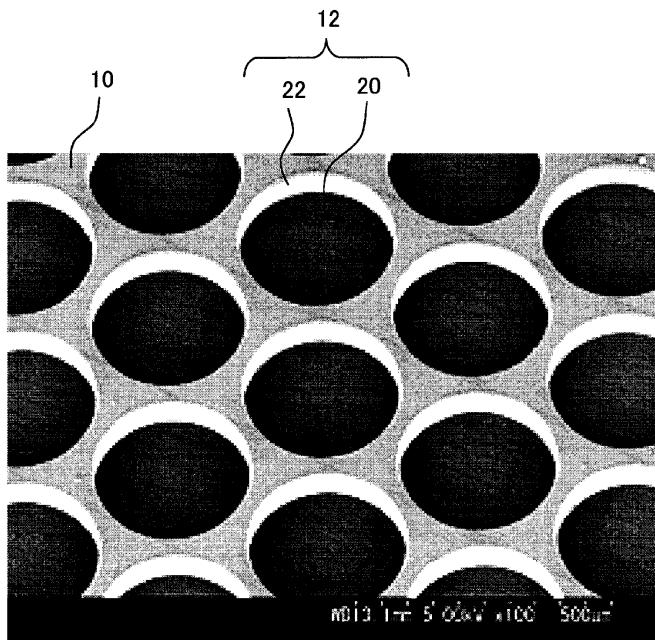
- <56> 도 1은 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 마이크로칩에 관한 설명도이다.
- <57> 도 2는 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 보유 캐비티에 관한 전자현미경 사진이다.
- <58> 도 3은 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 보유 캐비티의 밀면에 관한 설명도이다.
- <59> 도 4는 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 마이크로칩에서 형성된 간세포 조직체의 위상차 현미경 사진이다.
- <60> 도 5는 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 마이크로칩에서 형성된 간세포 조직체의 입경 분포를 나타내는 히스토그램이다.
- <61> 도 6은 본 발명의 일 실시태양에 따른 세포 조직체 마이크로칩에서 형성된 간세포 조직체의 간기능을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

도면

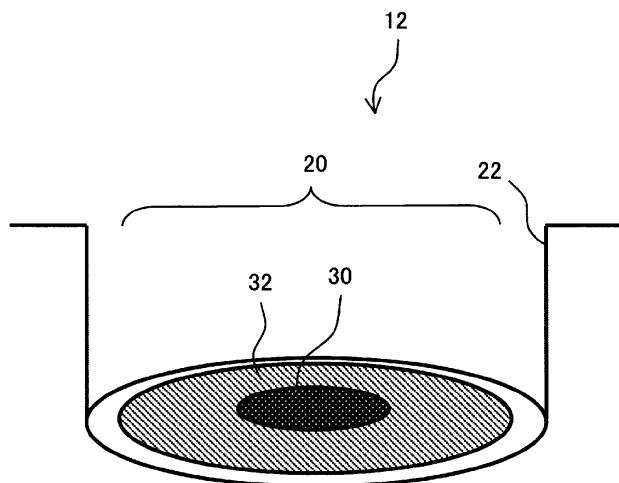
도면1



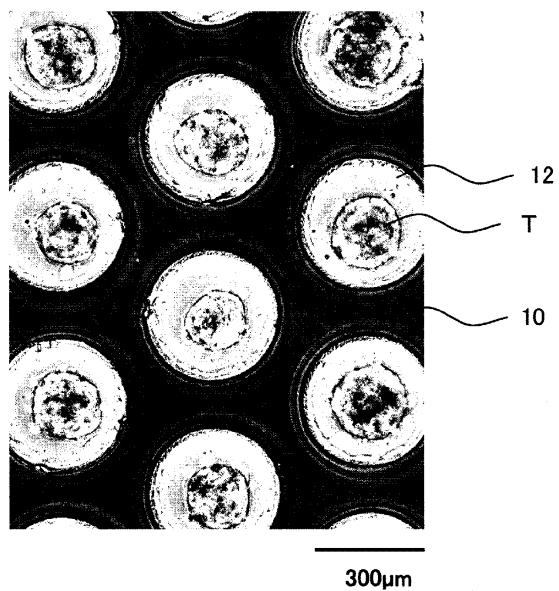
도면2



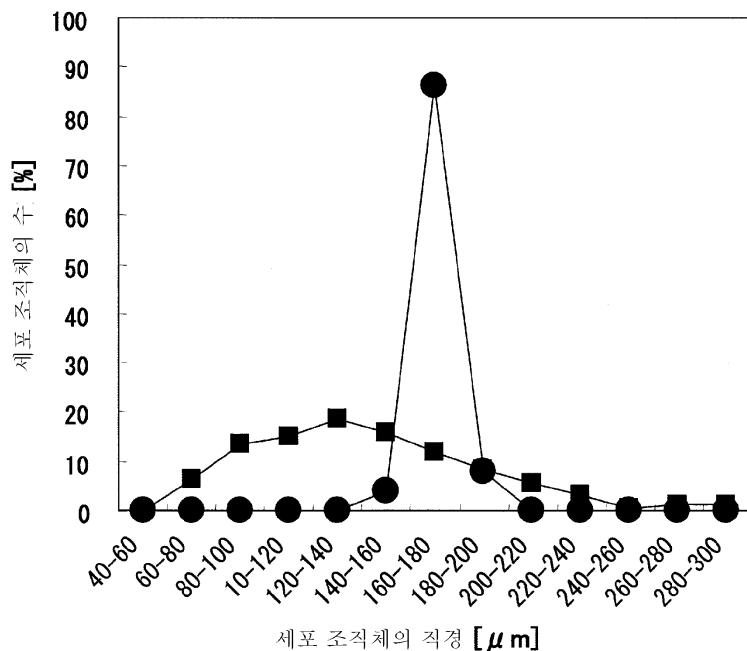
도면3



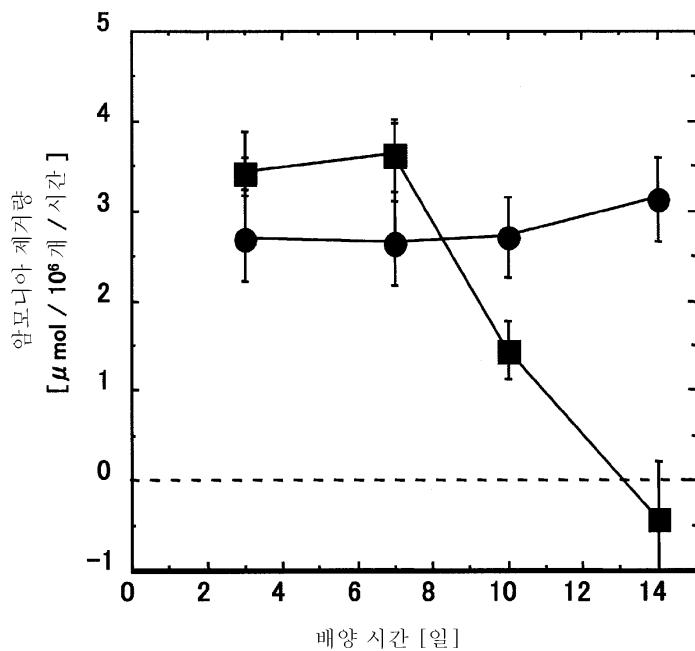
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry, Science and Technology
 <120> Cellular Tissue Microchip and Method of Forming Cellular Tissue

<150> JP2004-315600

<151> 2004-10-29

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of cell adhesion peptide

<400> 1

Arg Gly Asp Ser Ala Ala Ala Ala Cys
1 5 10