

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3981929号  
(P3981929)

(45) 発行日 平成19年9月26日(2007.9.26)

(24) 登録日 平成19年7月13日(2007.7.13)

(51) Int.C1.

F 1

C 12M 3/00 (2006.01)  
C 12N 11/02 (2006.01)C 12M 3/00 Z N A A  
C 12N 11/02

請求項の数 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2004-315600 (P2004-315600)  
 (22) 出願日 平成16年10月29日 (2004.10.29)  
 (65) 公開番号 特開2006-121991 (P2006-121991A)  
 (43) 公開日 平成18年5月18日 (2006.5.18)  
 審査請求日 平成19年3月19日 (2007.3.19)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 802000031  
 財団法人北九州産業学術推進機構  
 福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号  
 (74) 代理人 110000154  
 特許業務法人はるか国際特許事務所  
 (72) 発明者 中澤 浩二  
 福岡県北九州市若松区ひびきの1-20-  
 201  
 (72) 発明者 福田 淳二  
 福岡県北九州市若松区小敷557パークヒ  
 ルズJ B-201  
 審査官 森井 隆信

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞組織体マイクロチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

互いに結合を形成できる細胞から細胞組織体を形成させるための細胞組織体マイクロチップであって、

前記細胞を保持するための細胞保持キャビティを複数有し、  
 前記細胞保持キャビティの底面の面積は  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  の範囲であり、  
 前記底面は、細胞接着性を示す1つの接着性領域と、当該接着性領域を囲み、細胞非接着性を示す非接着性領域と、からなる、  
 ことを特徴とする細胞組織体マイクロチップ。

【請求項2】

前記接着性領域は、前記細胞保持キャビティ底面の中央付近に形成される、  
 ことを特徴とする請求項1に記載の細胞組織体マイクロチップ。

【請求項3】

前記細胞保持キャビティ底面の径は、前記細胞の径の2~50倍の範囲である、  
 ことを特徴とする請求項1又は2に記載の細胞組織体マイクロチップ。

【請求項4】

前記接着性領域には、生体から取得され若しくは合成された細胞接着性物質又はこれらの誘導体が固定されている、  
 ことを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の細胞組織体マイクロチップ。

【請求項5】

10

20

前記非接着性領域には、生体から取得され若しくは合成された細胞非接着性物質又はこれらの誘導体が固定されている。

ことを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の細胞組織体マイクロチップ。

【請求項 6】

前記接着性領域に、前記細胞から形成された細胞組織体が接着している。

ことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の細胞組織体マイクロチップ。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の細胞組織体マイクロチップの前記細胞保持キャビティ内において前記互いに結合を形成できる細胞を培養し、前記接着性領域に接着した前記細胞組織体を形成させる、

ことを特徴とする細胞組織体形成方法。

【請求項 8】

前記細胞を、前記各細胞保持キャビティあたり  $2 \sim 1 . 5 \times 10^5$  個の範囲で培養する

、  
ことを特徴とする請求項 7 に記載の細胞組織体形成方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を保持するマイクロチップに関し、特に、細胞組織体を形成させるマイクロチップに関する。

【背景技術】

【0002】

現在、細胞の培養技術を利用した医療技術の開発や医薬品の開発等が盛んに行われている。すなわち、例えば、生体の組織や臓器に特有の機能を発現する細胞を培養する技術は、当該細胞を、当該組織や臓器の生体外におけるモデルとして利用した、薬物の毒性試験、内分泌搅乱作用の評価、新薬のスクリーニング等に応用されつつある。

【0003】

このような細胞培養技術においては、一般に、コラーゲン等の細胞接着性物質を塗布した平面基材上において、細胞を単層状（すなわち二次元的）に接着させて培養を行うが、例えば、生体肝臓から取り出した初代肝細胞等については、このような単層状態で培養すると極めて短期間のうちに肝臓特有の機能を消失し、又は死滅してしまう。

【0004】

これに対し、近年、この初代肝細胞を単層状に培養する代わりに、細胞同士が互いに三次元的に結合した集合体である細胞組織体として培養することによって、その生存状態及び肝臓特有の機能をより長期間にわたって維持することができるとの知見が得られている。

【0005】

このような肝細胞組織体を形成する方法としては、従来、例えば、特許文献 1 において、培養液中に特定の増殖因子を加えることにより、ポリウレタンフォームの孔内において球状の肝細胞組織体を形成することが開示されている。

【0006】

また、特許文献 2 においては、フェニルボロン酸を有するモノマー、アミノ基を有するモノマー、及び 2 - ヒドロキシエチルメタクリレート共重合体からなる高分子物質をコーティングした平面上において、肝細胞組織体を形成することが開示されている。

【特許文献 1】特開平 10 - 29951 号公報

【特許文献 2】特許第 3020930 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、上記従来の方法においては、形成される細胞組織体の形状やサイズが不

10

20

30

40

50

均一なものとなっていた。このため、例えば、細胞による特定の薬物の代謝機能を評価する場合には、細胞組織体ごとに当該薬物に接触する細胞（特に細胞組織体表面付近の細胞）の数が異なる等のため、正確な評価結果を得ることが困難であった。

#### 【0008】

また、上記従来の方法においては、細胞が比較的弱く接着する（すなわち細胞接着性が比較的低い）培養基材表面が用いられ、形成される細胞組織体は当該培養基材表面から脱着して培養液中に浮遊した状態となるために、例えば、培養の過程において、栄養分が消費された培養液を除去し、替わりに新鮮な培養液を入れる操作等を行う際に、培養液とともに細胞や細胞組織体が除去されてしまい、その後の培養の続行が不可能になることがあった。

10

#### 【0009】

本発明は、上記問題に鑑みて為されたものであって、均一な形状及びサイズの細胞組織体を形成させるとともに、当該形成された細胞組織体を長期間にわたって培養することのできるマイクロチップを提供することをその目的の一つとする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

上記従来の課題を解決するため、本発明の一実施形態に係る細胞組織体マイクロチップは、細胞を保持するための細胞保持キャビティを複数有し、前記細胞保持キャビティの底面は、細胞接着性を示す1つの接着性領域と、当該接着性領域を囲み、細胞非接着性を示す非接着性領域と、を含む、ことを特徴とする。

20

#### 【0011】

また、前記接着性領域は、前記細胞保持キャビティ底面の中央付近に形成されることとしてもよい。

#### 【0012】

また、前記細胞保持キャビティ底面の径は、前記細胞の径の2～50倍の範囲であることとしてもよい。

#### 【0013】

また、前記接着性領域には、生体から取得され若しくは合成された細胞接着性物質又はこれらの誘導体が固定されていることとしてもよい。

#### 【0014】

30

また、前記非接着性領域には、生体から取得され若しくは合成された細胞非接着性物質又はこれらの誘導体が固定されていることとしてもよい。

#### 【0015】

また、前記接着性領域に、前記細胞から形成された細胞組織体が接着していることとしてもよい。

#### 【0016】

また、本発明の一実施形態に係る細胞組織体形成方法は、前記細胞組織体マイクロチップの前記細胞保持キャビティ内において細胞を培養し、前記接着性領域において細胞組織体を形成させることを特徴とする。

#### 【0017】

40

また、前記細胞を、前記各細胞保持キャビティあたり $2 \sim 1.5 \times 10^5$ 個の範囲で培養することとしてもよい。

#### 【発明の効果】

#### 【0018】

本発明によれば、均一な形状及びサイズの細胞組織体を形成させるとともに、当該形成された細胞組織体を長期間にわたって培養することのできるマイクロチップを提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0019】

以下、本発明の一実施の形態に係る細胞組織体マイクロチップについて、図面を参照しつつ説明する。なお、本発明に係る細胞組織体マイクロチップは、以下の実施形態に限ら

50

れるものではない。

【0020】

図1は、本実施形態に係る細胞組織体マイクロチップ(以下、本マイクロチップ1と呼ぶ。)についての説明図である。図1に示すように、本マイクロチップ1は、基板10上に、細胞を保持するための所定深さをもつ有底孔として形成された細胞保持キャビティ12を複数有する。

【0021】

本マイクロチップ1においては、この細胞保持キャビティ12内に細胞を分散した培養液を入れ、当該細胞保持キャビティ12の底面20を当該細胞の培養基材表面として用いることにより、当該細胞から細胞組織体を形成させる。

10

【0022】

ここで、この細胞組織体を形成させる細胞としては、細胞同士の間で互いに結合を形成するものであれば、由来とする動物種や臓器・組織の種類等を問わず用いることができる。具体的に、この細胞としては、例えば、ヒトやブタ、イヌ、ラット、マウス等の動物由来の肝臓、脾臓、腎臓、神経、皮膚等から採取される初代細胞、ES細胞(Embryonic Stem cell)、樹立されている株化細胞、又はこれらに遺伝子操作等を施した細胞等を用いることができる。また、この細胞としては、一種類の細胞を単独で用いることもできるし、二種類以上の細胞を任意の比率で混在させて用いることもできる。

【0023】

また、培養液としては、用いる細胞の生存状態や機能等を維持することができるよう、必要な塩類や栄養成分等を適切な濃度で含む水溶液であれば任意の組成のものを用いることができる。具体的に、例えば、この培養液としては、D MEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)等の基礎培地に抗生物質等を添加したものや、いわゆる生理食塩水等を用いることができる。

20

【0024】

また、本マイクロチップ1の基板10は、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエステル(ポリエチレンテレフタレート等)、ポリウレタン、ポリスルホン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリビニル、シリコン等の合成樹脂、EPDM(Ethylene Propylene Diene Monomer)等の合成ゴムや天然ゴム、ガラス、セラミック、ステンレス鋼等の金属材料等からなり、例えば、板状体として成形される。

30

【0025】

また、細胞保持キャビティ12は、基板10の材質等に応じて選択される任意の加工方法を用いて当該基板10上に形成することができ、例えば、マシニングセンタ等を用いた穿孔加工、レーザー等を用いた光微細加工、エッティング加工、エンボス加工等により当該基板10上に形成し、又は射出成形、プレス成形、ステレオリソグラフィー等による当該基板10の成形時に形成することができる。

【0026】

このような加工方法により、細胞保持キャビティ12は、例えば、所定厚さの基板10表面に、当該基板厚さより小さい深さをもつ有底孔として形成することができ、又は基板10を貫通する穴を形成した後に、当該基板10の片面に他の部材を貼り合わせて底面とすることにより形成することができる。なお、この細胞保持キャビティ12の底面を形成するための部材としては、例えば、当該貫通孔を形成した基板10と同じ又は異なる材質の基板やフィルム等を用いることができる。

40

【0027】

また、この細胞保持キャビティ12は、図1に示すように、基板10上に所定の間隔で規則的に配置される。この規則的に配置される複数の細胞保持キャビティ12は、例えば、CAD(Computer Aided Design)プログラムにより加工位置を精密に制御するマシニングセンタ等を用いることにより形成することができる。

【0028】

50

図2は、本マイクロチップ1の一部についての走査型電子顕微鏡写真である。図2に示すように、基板10上に形成された細胞保持キャビティ12は、その孔構造を形成する底面20と側面22とを有してなる。また、図2に示すように、この細胞保持キャビティ12の底面20と側面22とは、実質的に平滑な表面を有して形成される。

#### 【0029】

この底面20の形状は特に限られるものではなく、例えば、図2に示すように円形状であってもよいし、その他、橢円形状、多角形等であってもよい。また、この底面20の径は、用いる細胞の径の2～50倍程度の範囲であることが好ましく、特に4倍～30倍程度の範囲であることが好適である。すなわち、この底面20の面積は、細胞の大きさがその種類や状態等によって異なるため一概には言えないが、例えば、 $100 \sim 1 \times 10^6 \mu m^2$  の範囲であることが好ましく、特に $300 \sim 3 \times 10^5 \mu m^2$  の範囲であることが好適である。10

#### 【0030】

これは、この底面20上に播種された細胞（すなわち、細胞保持キャビティ12内に播種された細胞）が当該底面20上で細胞組織体を形成するため、この底面20のサイズは、当該底面20上で形成される細胞組織体に含まれる細胞の数を規定するものであり、当該サイズが上記下限値より小さい場合には、当該底面20上に細胞組織体を形成するために必要な数の細胞を保持することができず、またこの底面20が上記上限値より大きい場合には、当該底面20上に保持すべき細胞の数が多すぎるために巨大な細胞組織体が形成され、当該細胞組織体の内部に位置する細胞が、当該細胞組織体外の培養液から栄養や酸素を十分に受けることができず、死滅してしまうことがあるためである。20

#### 【0031】

また、この細胞保持キャビティ12の深さは、用いる細胞の径の1～50倍程度の範囲であることが好ましく、特に2倍～30倍程度の範囲であることが好適である。これは、この細胞保持キャビティ12の深さが上記下限値より小さい場合には、当該細胞保持キャビティ12内に細胞を確実に保持することが困難となり、またこの深さが上記上限値より大きい場合には、当該細胞保持キャビティ12の底面20上の細胞に対する酸素や栄養分の供給が不十分となることがあるためである。

#### 【0032】

図3は、本マイクロチップ1が有する複数の細胞保持キャビティ12のうちの1つについての説明図である。図3に示すように、この細胞保持キャビティ12の底面20は、細胞接着性を示す1つの接着性領域30と、当該接着性領域30を囲み、細胞非接着性を示す非接着性領域32と、を含む。30

#### 【0033】

この接着性領域30は、例えば、培養液等の溶液中において、細胞が接着する上で好適な荷電状態や親水性・疎水性をもつ細胞接着性の表面を有する。ここで、この細胞接着性表面とは、例えば、培養液中において、細胞が当該表面上に沈降した場合に、細胞が球形から変形して、比較的扁平な形状を示す程度に接着することができる表面であることを意味する。

#### 【0034】

具体的に、この接着性領域30の表面は、例えば、細胞保持キャビティ12を形成する際に当該細胞保持キャビティ12の底面20として露出した基板10の材料表面そのものとして形成し、又は当該露出した基板10の表面上に生体から取得され若しくは合成された細胞接着性物質又はこれらの誘導体が固定化された表面として形成することができる。40

#### 【0035】

この接着性領域30に固定化される細胞接着性物質としては、例えば、用いる細胞の細胞膜に存するたんぱく質等の細胞表面分子（例えば、インテグリンや糖鎖受容体等）のうち特定のものに対して結合し得る物質を用いることができる。

#### 【0036】

具体的に、例えば、生体から取得された細胞接着性物質としては、コラーゲン、フィブ

50

ロネクチン、ラミニン等を用いることができ、またこれらの誘導体としては、例えば、当該細胞接着性物質に任意の官能基や高分子鎖等を結合させた（例えば、縮合反応等を用いて共有結合させた）ものを用いることができる。

#### 【0037】

また、合成された細胞接着性物質としては、細胞接着性を示す特定のアミノ酸配列（例えば、アルギニン・グリシン・アスパラギン酸（いわゆる RGD）配列等）や特定の糖鎖配列（例えば、ガラクトース側鎖等）を有する化合物等を用いることができ、またこれらの誘導体としては、当該細胞接着性物質に任意の官能基や高分子等を結合させたものを用いることができる。

#### 【0038】

これら生体から取得され若しくは合成された細胞接着性物質又はこれらの誘導体は、例えば、当該細胞接着性物質等の水溶液を底面 20 上で乾燥させることにより、又は当該細胞接着性物質等の水溶液中において、当該細胞接着性物質が有する官能基と底面 20 上の官能基との間で化学反応（例えば、カルボキシル基やアミノ基等の間の縮合反応等）を起こさせて共有結合を形成させること等により、当該底面 20 上に固定化することができる。

#### 【0039】

一方、非接着性領域 32 は、例えば、培養液中において、細胞が実質的に接着できないような、細胞の接着には不適切な荷電状態や親水性・疎水性をもつ細胞非接着性の表面を有する。ここで、この細胞非接着性を示す表面とは、例えば、培養液中において、細胞が当該表面上に沈降した場合に、その細胞形状が球状からほとんど変化しない程度に極めて弱く接着するが培養液の流れ等によって容易に脱着し、又は当該細胞が全く接着できず球形のまま培養液中で浮遊状態を維持することとなる表面である。

#### 【0040】

具体的に、この非接着性領域 32 の表面は、例えば、細胞保持キャビティ 12 を形成する際に当該細胞保持キャビティ 12 の底面 20 として露出した基板 10 の材料表面そのものとして形成し、又は当該露出した基板 10 の表面上に生体から取得され若しくは合成された細胞非接着性物質又はこれらの誘導体が固定化された表面として形成することができる。

#### 【0041】

この非接着性領域 32 に固定化される細胞非接着性物質としては、例えば、用いる細胞の細胞膜に存するたんぱく質や糖鎖等の細胞表面分子に対して結合しない生体由来又は合成された細胞非接着性物質を用いることができる。

#### 【0042】

具体的に、例えば、生体由来の細胞非接着性物質としては、アルブミン等の高い親水性を示すたんぱく質等を用いることができ、またこれらの誘導体としては、例えば、当該細胞非接着性物質に任意の官能基や高分子鎖等を結合させたものを用いることができる。

#### 【0043】

また、例えば、合成された細胞非接着性物質としては、ポリエチレングリコール等の極めて高い親水性を示す高分子や、MPC (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)、poly HEMA (ポリヒドロキシエチルメタクリレート)、SPC (セグメント化ポリウレタン) 等を用いることができ、これらの誘導体としては、当該細胞非接着性物質に任意の官能基や高分子等を結合させたものを用いることができる。

#### 【0044】

これら生体から取得され若しくは合成された細胞非接着性物質又はこれらの誘導体は、例えば、当該細胞非接着性物質等の水溶液を底面 20 上で乾燥させることにより、又は当該細胞非接着性物質等の水溶液中において、当該細胞非接着性物質等が有する官能基と底面 20 上の官能基との間で化学反応を起こさせて共有結合を形成させること等により、当該底面 20 上に固定化することができる。

#### 【0045】

10

20

30

40

50

また、接着性領域30は、細胞保持キャビティ12の底面20の中央付近に形成されてもよい。この場合、例えば、図1に示すように、本マイクロチップ1上に細胞保持キャビティ12が規則的に配置されていれば、当該細胞保持キャビティ12の底面20のうち接着性領域30上で形成される細胞組織体もまた、本マイクロチップ1上に規則的に配置することができるとともに、当該形成される細胞組織体の形状を均一なものとすることができます。

#### 【0046】

したがって、例えば、各細胞組織体に蛍光色素等を用いた染色処理等を施し、その染色の程度等によって当該各細胞組織体の機能を評価するような場合には、均一な形状の細胞組織体の各位置を本マイクロチップ1上に設定した座標値等により正確に特定することができるため、当該染色の程度を自動解析装置等を用いて簡便、迅速且つ確実に解析することができる。

#### 【0047】

また、これら接着性領域30と非接着性領域32とを含む底面20は、図3に示すように、その全体が平面となるように形成されてもよいし、少なくとも一方の領域の一部又は接着性領域30と非接着性領域32との間に段差等を有するように形成されてもよい。

#### 【0048】

次に、本マイクロチップ1を用いて細胞組織体を形成する方法について、その概略を説明する。まず、用いる細胞を培養液中に所定の密度となるように分散し、当該細胞分散液を各細胞保持キャビティ12内に所定量ずつ入れることにより細胞の播種を行い、当該細胞を細胞保持キャビティ12の底面20上に沈降させる。

#### 【0049】

ここで、1つの細胞保持キャビティ12内に播種する細胞の数は、底面20上に沈降した細胞同士が互いに結合を形成する上で必要な程度に接触することができ、且つ当該細胞が集合して形成される細胞組織体の大きさが所定の範囲内に抑えられるように決定することが好ましい。

#### 【0050】

具体的に、例えば、この播種細胞数は、細胞保持キャビティ12あたり、 $2 \sim 1.5 \times 10^5$  個の範囲であることが好ましく、特に $5.0 \sim 3.0 \times 10^4$  個の範囲であることが好ましい。また、細胞保持キャビティ底面20の単位面積あたりの播種細胞数は、 $3.0 \sim 1.5 \times 10^4$  個/ $\text{mm}^2$  の範囲であることが好ましい。

#### 【0051】

これは、細胞組織体を形成するためには、細胞保持キャビティ12あたり少なくとも2個の細胞が保持される必要があり、また、播種細胞の数が多くなると、当該細胞から形成される細胞組織体が巨大なものとなり、その内部の細胞が栄養や酸素の不足により壊死してしまうことがあるためである。

#### 【0052】

次に、このようにして細胞が播種された本マイクロチップ1を水平に保ちつつ、所定の期間、静置状態で維持することにより、当該細胞の培養を行う。この静置培養期間において、各細胞保持キャビティ12の底面20上に沈降した細胞のうち、接着性領域30上に沈降した細胞を当該接着性領域30の表面に接着させる。なお、非接着性領域32上に沈降した細胞は、当該非接着性領域32の表面に接着せず浮遊状態を維持し、又は極めて弱く接着する。

#### 【0053】

その後、さらにこの静置培養を維持し、又は本マイクロチップ1を水平面上で円弧を描くように揺動させながら培養を継続する。これにより、培養期間の経過に伴って、各細胞保持キャビティ12の底面20上に沈降した細胞は互いに結合し、当該底面20のうち、接着性領域30に集まるように徐々に移動し、当該接着性領域30上において、当該細胞同士が三次元的に結合した細胞組織体を形成する。この細胞組織体は、培養液中に浮遊することなく、接着性領域30上に接着した状態で細胞保持キャビティ12内に安定して保

10

20

30

40

50

持されたまま長期間にわたって培養することができる。

#### 【0054】

なお、本マイクロチップ1においては、各細胞保持キャビティ12の側面22の一部に、当該細胞保持キャビティ12に培養液を流入させるための流入口と、当該細胞保持キャビティ12から当該培養液を流出するための出口と、をさらに形成することにより、接着性領域30上に細胞組織体を形成した後に、当該細胞保持キャビティ12内に培養液を流通させながら培養することができる。

#### 【0055】

##### [実施例]

次に、本マイクロチップ1を用いて細胞組織体を形成させた実施例について説明する。 10

#### 【0056】

##### [細胞組織体マイクロチップの作製]

本実施例においては、本マイクロチップ1の基板10として、ポリメチルメタクリレート製の平板(24mm×24mm、厚さ200μm)を用いた。すなわち、このポリメチルメタクリレート平板の表面の一部に、10mm角の矩形範囲にわたって、マシニングセンタ(卓上型NC微細加工機、株式会社ピーエムティー製)を用いた穿孔加工処理を施すことにより、直径300μmの円形の貫通孔を約1000個形成した。この円形貫通孔は、互いにその中心間距離が400μmとなるように規則的に配置した。

#### 【0057】

また、本マイクロチップ1の細胞保持キャビティ12の底面20として、ガラス製の平板(22mm×22mm、厚さ400μm)を用いた。すなわち、このガラス平板の表面の一部に12mm角の矩形範囲にわたって、スパッタリング装置(E-1030、日立株式会社製)を用いたスパッタリング処理を施すことにより、プラチナ(Pt)の薄膜(厚さ9nm)を形成した。そして、このガラス平板のプラチナ表面部分と、上記ポリメチルメタクリレート平板上の貫通孔を形成した部分とを位置合わせし、シリコン系接着剤(TSE389、GE東芝シリコーン株式会社製)を用いて、当該ガラス平板と当該ポリメチルメタクリレート平板とを接着した。このようにして、図2に示すような、直径300μmの円形の底面20を有する、深さ200μmの細胞保持キャビティ12を形成した。 20

#### 【0058】

一方、直径100μm、長さ200μmの円筒状突起を複数有するPDMs(Poly(Dimethyl Siloxane))製のスタンプをモールド成形により作製した。このスタンプは、各円筒状突起の位置が、本マイクロチップ1上の各細胞保持キャビティ12の位置に対応するよう、当該突起先端の円形断面の中心間距離を400μmとした。そして、このスタンプを用いたマイクロコンタクトプリントイングにより、次のようにして細胞保持キャビティ12の底面20に接着性領域30を形成した。 30

#### 【0059】

すなわち、接着性領域30の表面に固定化する細胞接着性物質として、細胞接着性のRGD配列を有するペプチド(アミノ酸配列:RGDSAAAAAC、Thermo Electron Corporation製)を用意した。そして、この細胞接着性ペプチドを1.78mg/mLの濃度で含むDMSO(ジメチルスルフォキサイド)溶液に、上記作製したスタンプの各円筒状突起の先端を浸すことにより、当該各円筒状突起の先端面に当該ペプチド溶液を塗布した。 40

#### 【0060】

次に、位相差顕微鏡下において観察しながら、ペプチド溶液を塗布したスタンプの各円筒状突起の位置を、上記プラチナが蒸着された本マイクロチップ1の各細胞保持キャビティ12の底面の中央付近に位置合わせし、当該各円筒状突起の先端を当該底面20に押し当てることにより、当該各円筒状突起の先端に塗布されていたペプチド溶液を、当該各細胞保持キャビティ12の底面20の中央付近に塗布し、窒素雰囲気下において乾燥させた。これにより細胞接着性ペプチド分子末端のシステインが有するチオール基と底面20のプラチナ表面との間に化学結合を形成させ、当該プラチナ表面に当該細胞接着性ペプチド 50

を固定化した。

【0061】

このようにして、直径は $300\text{ }\mu\text{m}$ の細胞保持キャビティ12の底面20の中央付近に、細胞接着性ペプチドが固定化された直径約 $100\text{ }\mu\text{m}$ の接着性領域30を1つ形成した。

【0062】

次に、この接着性領域30を含む底面20上に、次のようにして非接着性領域32を形成した。すなわち、非接着性領域32の表面に固定化する細胞非接着性物質として、分子量5000のポリエチレングリコール(PEG)鎖を有する細胞非接着性の合成高分子(化学式： $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{SH}$ 、Nektar Therapeutics社製)を用意した。

【0063】

そして、上記接着性領域30を形成した各細胞保持キャビティ12内に、この細胞非接着性高分子を $25\text{ mg/mL}$ の濃度で含むエタノール溶液を過剰量加え、窒素雰囲気下において当該細胞非接着性高分子が有するチオール基と底面20のプラチナ表面との間に化学結合を形成させることにより、当該プラチナ表面(すなわち、底面20のうち接着性領域30を除く領域)に当該細胞非接着性高分子を固定化した。その後、本マイクロチップ1の全体をエタノール溶液によって十分に洗浄して余剰の細胞非接着性高分子を除去するとともに、さらに約2時間、エタノール中に浸漬することにより滅菌処理を行った。

【0064】

このようにして、各細胞保持キャビティ12の底面20の中央付近に接着性領域30を形成し、当該接着性領域30以外の領域に非接着性領域32を形成した本マイクロチップ1を作製し、以下の培養実験に用いた。

【0065】

[細胞の準備]

本実施例においては、細胞として、ラットの肝臓から公知のコラゲナーゼ灌流法を用いて調製した初代肝細胞を用いた。ここで、この肝細胞の調製法について簡単に説明する。すなわち、まず、7週齢のウイスター系ラット(体重 $250\text{ g}$ )の門脈(肝臓につながる血管の一つ)にカニューレを挿入し、当該カニューレから肝臓に所定の組成の脱血液を導入した後、コラゲナーゼ(和光純薬社製)を $0.5\text{ mg/mL}$ の濃度で溶解した消化液を灌流し、肝臓内における肝細胞同士の結合等を切断する消化処理を行った。そして、この消化処理された肝臓を摘出し、メスやピペット等を用いた分散処理と培養液等を用いた洗浄処理により、個々の細胞が分散した単離状態の肝細胞を得た。

【0066】

また、培養液としては、ダルベッコ改变イーグル培地(DMEM、ギブコ社製) $13.5\text{ g/L}$ に、 $60\text{ mg/L}$ のプロリン(シグマ社製)、 $50\text{ mg/mL}$ の上皮細胞成長因子(EGF、フナコシ社製)、 $7.5\text{ mg/L}$ のヒドロコルチゾン(和光純薬社製)、 $0.1\text{ }\mu\text{M}$ の硫酸銅・5水和物(和光純薬社製)、 $3\text{ }\mu\text{g/L}$ のセレン酸(和光純薬社製)、 $50\text{ }\mu\text{M}$ の硫酸亜鉛・7水和物(和光純薬社製)、 $50\text{ }\mu\text{g/L}$ のリノール酸(シグマ社製)、 $58.8\text{ mg/L}$ のペニシリン(明治製菓社製)、 $100\text{ mg/L}$ のストレプトマイシン(明治製菓社製)、 $1.05\text{ g/L}$ の炭酸水素ナトリウム(和光純薬社製)、 $1.19\text{ g/L}$ の $2-[4-(2-\text{ヒドロキシエチル})-1-\text{ピペラジニル}]\text{エタンスルホン酸}$ (HEPES、同人堂社製)、を加えた無血清培養液を用いた。

【0067】

[細胞組織体の形成]

このようにして得た肝細胞を、 $5.0 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ の密度となるように培養液に分散した。そして、ポリスチレン製の培養容器(直径 $35\text{ mm}$ 、ファルコン社製)の底部に上記滅菌処理後の本マイクロチップ1を載置し、当該本マイクロチップ1上に、この細胞分散液の一部を $2.0\text{ mL}$ 加え、 $5\%$ 炭酸ガス、 $95\%$ 空気の雰囲気下、 $37^\circ\text{C}$ にて静置状態で培養を行った。

【0068】

10

20

30

40

50

また、第一の対照実験として、直径35mmのポリスチレン製の培養容器の底部に本マイクロチップ1の細胞保持キャビティ底部20を形成するために用いたものと同様のガラス製の平板(22mm×22mm、厚さ400μm)を載置し、当該ガラス平板上に、この細胞分散液の他の一部を2.0mL加え、同様に静置培養を行った。

#### 【0069】

また、第二の対照実験として、直径35mmのポリスチレン製の培養容器の底部に本マイクロチップ1の細胞保持キャビティ底部20を形成するために用いたものと同様のガラス製の平板(22mm×22mm、厚さ400μm)上にコラーゲン(Cel1matrinx Type I-C、新田ゼラチン社製)をコーティングしたものを載置し、当該コラーゲンコートガラス平板上に、この細胞分散液のさらに他の一部を2.0mL加え、同様に静置培養を行った。本マイクロチップ1及び対照実験に用いた培養容器内の培養液は、培養開始後2日毎に新鮮な培養液に交換した。10

#### 【0070】

図4は、細胞保持キャビティ12内に形成された肝細胞組織体(図4中のT)の培養3日目における位相差顕微鏡写真を示す。図3に示すように、各細胞保持キャビティ12内には、1つの肝細胞組織体が形成され、その形状は、いずれも表面が平滑化した球状であった。なお、このような球状の肝細胞組織体は、本マイクロチップ1の各細胞保持キャビティ12内において、培養開始後1~2日の間に形成された。

#### 【0071】

また、図3に示すように、各細胞保持キャビティ12内において、各肝細胞組織体は、底面20の中央付近に形成された。すなわち、各肝細胞組織体は、各細胞保持キャビティ12の底面20のうち接着性領域30上に接着し、培養液中に浮遊することなく安定に保持されていた。なお、非接着性領域32上には、肝細胞はほとんど存在しなかった。20

#### 【0072】

これに対し、第一の対照実験においては、ガラス平板上の全体に、播種された細胞の一部から、形状がいびつで様々なサイズの肝細胞組織体が、培養液中に浮遊した状態で形成された(図示せず)。また、第二の対照実験においては、肝細胞は、コラーゲンをコーティングされたガラス平板上に扁平に伸展した単層状態で接着していた(図示せず)。

#### 【0073】

図5は、本マイクロチップ1の細胞保持キャビティ12内において形成された肝細胞組織体と、第一の対照実験において形成された肝細胞組織体と、についての粒径分布を示すヒストグラムである。図5において、横軸は肝細胞組織体の直径(μm)、縦軸は、本マイクロチップ1内又は対照実験のそれぞれにおいて、粒径測定の対象となった肝細胞組織体の総数に対する、各横軸が示す直径を有する肝細胞組織体の個数の割合(%)をそれぞれ示す。また、図5において、丸印は本マイクロチップ1を用いて形成された肝細胞組織体についての結果を、また四角印は第一の対照実験において形成された肝細胞組織体についての結果を、それぞれ示す。30

#### 【0074】

図5に示すように、本マイクロチップ1において形成された肝細胞組織体のうち、86%の肝細胞組織体の直径は160~180μmの範囲であった。すなわち、本マイクロチップ1の各細胞保持キャビティ12内においては、粒径の揃った、極めて均一なサイズの肝細胞組織体が形成された。40

#### 【0075】

これに対し、第一の対照実験において形成された肝細胞組織体は、様々な粒径のものを含み、全体としてサイズが不均一であった。なお、この肝細胞組織体の粒径の測定は、顕微鏡下での観察結果を画像解析することにより行った。

#### 【0076】

また、本マイクロチップ1において形成された肝細胞組織体と、第二の対照実験における単層状の肝細胞とについて、肝臓に特有の解毒機能の一つであるアンモニア(生体内における老廃物質の一つ)除去能力を評価した。このアンモニア除去能力の評価においては50

、培養開始後 3、7、10、14 日目において、肝細胞組織体又は単層の肝細胞を含む培養容器内の培養液を所定濃度のアンモニアを添加した培養液に交換して培養し、所定時間経過後に当該アンモニア添加培養液を回収して、当該回収した培養液中アンモニア濃度の当該添加後所定時間内での減少量を市販の測定キット（和光純薬社製）を用いて測定することにより行った。

#### 【0077】

図 6 は、アンモニア除去能力の評価結果を示す。図 6 において、横軸は培養時間（培養日数）、縦軸は単位細胞数（ $10^6$  個）あたり、単位時間（時間）あたりのアンモニア除去量（ $\mu\text{mol}$ ）をそれぞれ示す。また、図 6 において、丸印は本マイクロチップ 1 を用いて形成された肝細胞組織体についての結果を、また四角印は第二の対照実験における单層状の肝細胞についての結果を、それぞれ示す。

10

#### 【0078】

図 6 に示すように、本マイクロチップ 1 において形成された肝細胞組織体は、培養開始後 2 週間にわたって、アンモニア除去能力を発現し続けた。これに対し、第二の対照実験における单層状の肝細胞のアンモニア除去能力は、図 6 に示すように、培養 1 週間以降は単調に低下し、培養 2 週間の時点では完全に消失した。なお、第一の対照実験においては、形成された肝細胞組織体が浮遊状態であり、培養液の交換等の際に当該肝細胞組織体の多くが除去されてしまうため、アンモニア除去能力の評価を行うことは困難であった。

#### 【0079】

このように、本マイクロチップ 1 を用いることにより、肝臓特有の機能を高いレベルで発現し続ける肝細胞組織体を、各細胞保持キャビティ 12 の底面 20 の中央付近に安定に固定した状態で、長期間にわたって培養することができた。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0080】

【図 1】本発明の一実施形態に係る細胞組織体マイクロチップについての説明図である。

【図 2】本発明の一実施形態に係る細胞保持キャビティについての電子顕微鏡写真である。

【図 3】本発明の一実施形態に係る細胞保持キャビティの底面についての説明図である。  
【図 4】本発明の一実施形態に係る細胞組織体マイクロチップにおいて形成された肝細胞組織体の位相差顕微鏡写真である。

30

【図 5】本発明の一実施形態に係る細胞組織体マイクロチップにおいて形成された肝細胞組織体の粒径分布を示すヒストグラムである。

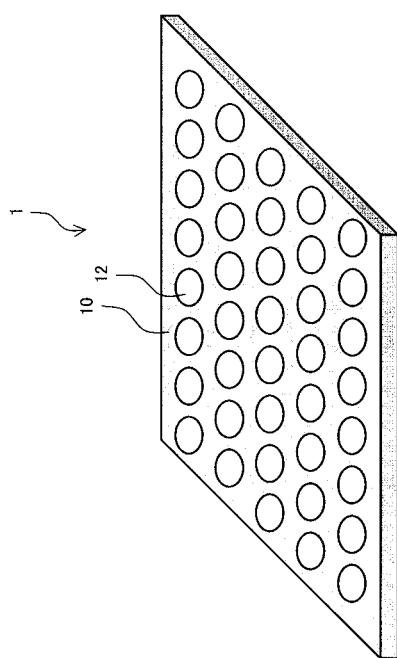
【図 6】本発明の一実施形態に係る細胞組織体マイクロチップにおいて形成された肝細胞組織体の肝機能を評価した結果を示すグラフである。

#### 【符号の説明】

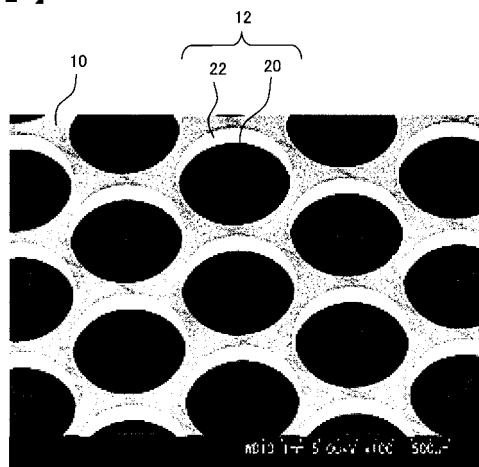
#### 【0081】

1 細胞組織体マイクロチップ、10 基板、12 細胞保持キャビティ、20 底面  
、22 側面、30 接着性領域、32 非接着性領域。

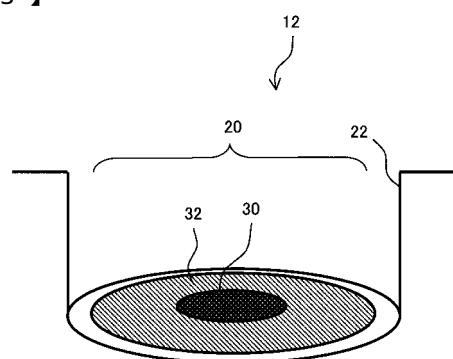
【図1】



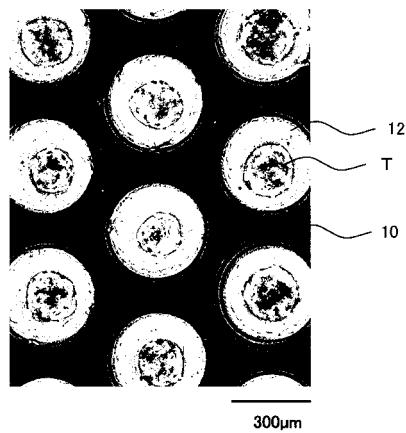
【図2】



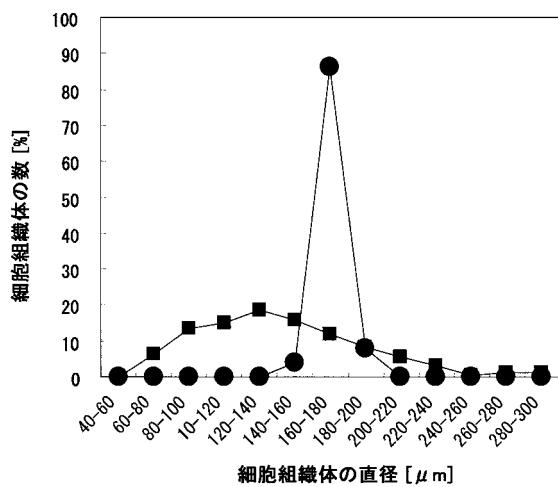
【図3】



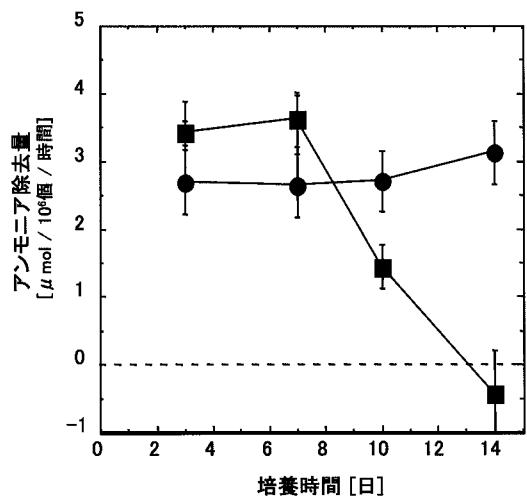
【図4】



【図5】



【図6】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2002-153260(JP,A)

Biomaterials, 2003年, Vol.24, No.18, 3021-3026

Biotechnol. Prog., 2003年, Vol.19, No.2, 243-253

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 M 3 / 0 0

C 12 N 1 1 / 0 0

B I O S I S / W P I D S ( S T N )

J S T P l u s ( J D r e a m 2 )