

(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
2011年3月3日(03.03.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/024592 A1

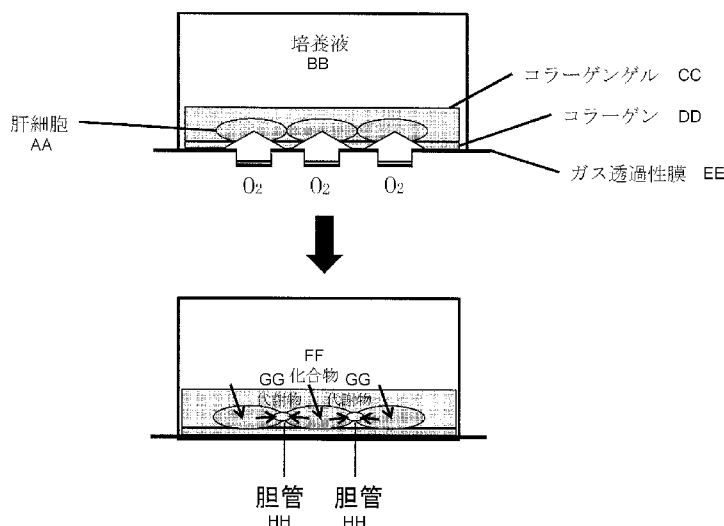
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/062707
- (22) 国際出願日: 2010年7月28日(28.07.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-195869 2009年8月26日(26.08.2009) JP
特願 2010-073486 2010年3月26日(26.03.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 三菱化学メディエンス株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE CORPORATION) [JP/JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 松井 等 (MATSUI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学メディエンス株式会社内 Tokyo (JP). 酒井 康行 (SAKAI, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 藤井 輝夫 (FUJII, Teruo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 竹内 昌治 (TAKEUCHI, Shoji) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 津田 行子 (TSUDA, Yukiko) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6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,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CULTURE OF HEPATOCYTES

(54) 発明の名称: 肝細胞の培養方法

[図1]



AA... HEPATOCYTE
 BB... LIQUID CULTURE MEDIUM
 CC... COLLAGEN GEL
 DD... COLLAGEN
 EE... GAS-PERMEABLE MEMBRANE
 FF... COMPOUND
 GG... METABOLITE
 HH... BILE DUCT

(57) Abstract: Disclosed is a method for culturing hepatocytes, which is characterized by placing hepatocytes embedded in an extracellular matrix on a gas-permeable membrane and culturing the hepatocytes while supplying oxygen from the gas-permeable membrane side. The method enables the induction of polarization of hepatocytes at an early stage to form bile canaliculi, and also enables the extension of the polarity formation period of hepatocytes.

(57) 要約: ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする、肝細胞培養方法。これにより、肝細胞に早期に極性を誘導させて毛細胆管を形成させることができ、また、極性形成期間を長くすることもできる。

WO 2011/024592 A1



BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

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：肝細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、肝細胞に効率よく極性を誘導させ、毛細胆管を形成させることができる肝細胞培養法、該方法による毛細胆管を形成した肝培養細胞の製造方法、該肝培養細胞の使用法、及び該肝培養細胞を用いた装置に関する。

背景技術

[0002] 創薬研究において、生体肝組織における薬物等の取り込み・代謝・排出を正しく評価することが極めて重要である。また、大規模な薬物スクリーニング等を簡便に行うため、あるいは、倫理的な面で、インビトロの試験法が望まれている。そのため的手段としては培養細胞が用いられるが、できるだけ生体を反映したものが望ましく、例えば、肝細胞培養系としては、細胞膜が血管側と毛細胆管膜の各々の領域に明確に分かれているような生体肝組織の正しい極性を良好に再現可能なものが求められている。

[0003] 例えば、特許文献1では、マイクロスケール基板に結合タンパク質または接着タンパク質を結合させ、その上で肝細胞を培養させることによって、毛細胆管の形成が促進されると考えられると記載されている。また、特許文献2では、小型肝細胞をコラーゲンで被覆したポリカーボネート性の多孔性シート上で培養すると、培養30日目で毛細胆管様の構造を形成したことが記載されている。

上記の3次元培養方法では極性を持った肝細胞を初代細胞から作製するためには数週間から数カ月の時間を要する。

それに対して、コラーゲングルサンドイッチ法（非特許文献1：LeCluyse et al., Am J Physiol Cell Physiol, 1994, vol.266, pp.1764-1774）を用いるとコラーゲングル重層後3～4日程度で毛細胆管の形成と胆汁成分排出活性が検出され始める。しかし、コラーゲングルサンドイッチ法を用いても、胆汁成分排出活性が得られるまでには日数を要する。また、生体と同じよ

うに出口のある胆管によって連続的に代謝物を解析することはできない。薬物スクリーニングに使用するためには、形成される毛細胆管の数が少なく、活性が低いことも問題となる。

- [0004] さらに、非特許文献2 (Tissue Engineering vol.13 Number 8 2007 2105-2117) や非特許文献3 (Acta Biomaterialia 5 2009 613-620) では、ガス透過性のPDMS (polydimethylsiloxane) 上で肝細胞を培養する際、その表面をPEMでコートするか、直径1~3 μ mの細いピラーを造形することで3日間接着を維持できることが示されているが、長期的には接着を維持できず、安定に試験に使用するために問題がある。また、一般的には肝細胞を接着培養するのにPDMSは適していないと考えられていた。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1 : 特表2008-539787
特許文献2 : W02005/047496

非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : LeCluyse et al., Am J Physiol Cell Physiol, 1994, vol.266, pp.1764-1774
非特許文献2 : Tissue Engineering vol.13 Number 8 2007 2105-2117
非特許文献3 : Acta Biomaterialia 5 2009 613-620

発明の概要

- [0007] 従来の方法によれば、肝細胞に極性を誘導して毛細胆管を効率よく形成することが難しく、極性を誘導するのに時間がかかるうえ、その持続期間が短かった。また、培養系の全ての肝細胞に極性を誘導して毛細胆管を形成することはできなかったため、実験間のばらつきの増大や低感度の原因になっていた。さらに、出口のない閉じた毛細胆管をもった肝細胞培養系では、胆汁を連続的に回収して解析することができないばかりでなく、胆汁うったいが生じて、全般的な肝機能が低下することが考えられる。このような培養系で

は、薬物輸送検定やハイスループットなスクリーニングに利用できるような、安定した品質の高い毛細胆管を形成した肝培養細胞を作製することができなかった。

[0008] 本発明は、上記の問題に鑑みてなされたものであり、肝細胞に早期に極性を誘導させて毛細胆管を形成させるための細胞培養法、及び、極性（毛細胆管）形成期間を長くできる肝細胞の培養方法を提供することを目的とするものである。さらに、これにより、該細胞培養による毛細胆管を形成した肝培養細胞の製造方法、及び、該肝培養細胞の使用法、該肝培養細胞を用いた装置など安定して高感度に薬物輸送検定等を行うことができる手段を提供することも目的とする。

[0009] 上記の課題を解決するために、本発明は以下を提供する。

（１）ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする、肝細胞培養方法。

（２）ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、（１）に記載の方法。

（３）ガス透過性膜がコラーゲンコート面を内側にして筒状に配置されており、該筒状の内部で細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、（２）に記載の方法。

（４）前記細胞外マトリクスが溝を構成し、該溝に肝細胞が配置された、（１）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）前記ガス透過性膜がポリジメチルシロキサン膜である、（１）～（４）のいずれかの方法。

（６）前記ガス透過性膜がフルオロカーボン膜である、（１）～（４）のいずれかの方法。

（７）コラーゲンコーティングが共有結合によるものである、（１）～（６）のいずれかの方法。

(8) 細胞外マトリクスがコラーゲンゲルまたはマトリゲル（商標）である、(1)～(7)のいずれかの方法。

(9) 細胞外マトリクスが非生体成分からなる、(1)～(7)のいずれかの方法。

(10) ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする、毛細胆管を形成した培養肝細胞の製造方法。

(11) ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、(10)に記載の方法。

(12) ガス透過性膜上に溝を有する細胞外マトリクス層が配置され、該細胞外マトリクス層の溝に肝細胞が配列された、(10)または(11)に記載の方法。

(13) (10)～(12)のいずれかの方法により毛細胆管を形成した培養肝細胞を製造し、得られた培養肝細胞を用いて化合物の代謝を評価する、化合物の代謝検定方法。

(14) (10)～(12)のいずれかの方法により毛細胆管を形成した培養肝細胞を製造し、得られた培養肝細胞を用いて化合物の輸送を評価する、化合物の輸送検定方法。

(15) 培養肝細胞を含む本体部と、本体部に化合物を供給する化合物供給部と、本体部から化合物またはその代謝物を回収する回収部とを有する培養肝細胞を用いた化合物検定装置であって、前記本体部は、

ガス透過性膜と、

該ガス透過膜上に配置された細胞外マトリクスと、

該細胞外マトリクスに包埋された肝細胞と、

を有することを特徴とする、装置。

(16) ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配

置された、(15)に記載の装置。

(17) 前記ガス透過性膜は、コラーゲンコート面を内側にして筒状にした筒状体を形成しており、該筒状体の内部にコラーゲンコート面に接着された肝細胞とそれを包埋する細胞外マトリクスを含む、(16)の装置。

(18) 前記本体部は、前記化合物供給部からの供給物が流れるように半透膜で画定された空間を前記筒状体の軸方向に形成する流路であって、該半透膜を介して該供給物を前記細胞外マトリクスに包埋された肝細胞に供給可能な供給物用流路を、更に有する(17)の装置。

(19) 前記回収部が、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜をコラーゲンコート面を内側にして筒状にした筒状体と、該筒状体の内側のコラーゲンコート面に接着された肝細胞と、該肝細胞を包埋する細胞外マトリクスと、該肝細胞の毛細胆管によって形成される流路を有する、(18)の装置。

(20) 前記細胞外マトリクスが溝を構成し、該溝に肝細胞が配置された、(15)～(19)のいずれかに記載の方法。

(21) 前記ガス透過性膜がポリジメチルシロキサン膜である、(15)～(20)のいずれかの装置。

(22) 前記ガス透過性膜がフルオロカーボン膜である、(15)～(20)のいずれかの装置。

(23) コラーゲンコーティングが共有結合によるものである、(15)～(22)のいずれかの装置。

(24) 細胞外マトリクスがコラーゲングルまたはマトリゲル(商標)である、(15)～(23)のいずれかの装置。

(25) 細胞外マトリクスが非生体成分からなる、(15)～(23)のいずれかの装置。

(26) 化合物代謝検定装置である、(15)～(25)のいずれかの装置。

(27) 化合物輸送検定装置である、(15)～(25)のいずれかの装置

。

[0010] 本発明では、ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする。好ましくは、コラーゲンでコートしたガス透過性の高い素材上に肝細胞を接着させたのち、細胞外マトリクスに包埋することで、肝細胞に効率よく極性を誘導させることができる。このようにして培養された肝細胞集団内では、周囲の細胞や細胞外マトリクスなどから安定して高い活性の極性誘導シグナルの授受を行うことができると考えられ、それがより広い範囲への毛細胆管誘導と長期間の極性維持につながる。これにより、肝細胞に長く連結した毛細胆管を長期間維持させることができる。また、早期に高感度で薬物輸送検定を行うことが可能となる。

また、「包埋」されている状態とは、該肝細胞の周辺が少なくとも1層の細胞外マトリクスで囲まれていることを言う。毛細胆管が効率的に形成される限り、該細胞外マトリクスは連続的でも非連続的でも構わない。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]本発明の肝細胞培養方法の一態様の模式図。
- [図2A]本発明の肝細胞培養器の一態様の模式図（側面図）。
- [図2B]本発明の肝細胞培養器の一態様の模式図（a-a断面図）。
- [図3A]本発明の化合物検定装置の第一の態様の模式図（側面図）。
- [図3B]本発明の化合物検定装置の第一の態様の模式図（a-a断面図）。
- [図4A]本発明の化合物検定装置の第二の態様の模式図（側面図）。
- [図4B]本発明の化合物検定装置の第二の態様の模式図（b-b断面図）。
- [図5]PDMS膜を用いた培養器で培養された肝細胞における5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (GDCF)の代謝を示す図（写真）。
- [図6]ポリスチレン培養器を用いた培養器で培養された肝細胞における5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (GDCF)の代謝を示す図（写真）。
- [図7]毛細胆管の面積の経時変化を示すグラフ。■がPDMS膜を用いた培養器、●がポリスチレン培養器。

[図8]フルオレセインジアセテートを用いて毛細胆管の形成を観察した結果を示す図(写真)。(a)、(c)がコラーゲンを吸着結合させた培養器であり、(a)が培養4日目、(c)が培養7日目；(b)、(d)がコラーゲンを共有結合させた培養器であり、(b)が培養4日目、(d)が培養7日目。

[図9]フルオレセインジアセテートを用いて毛細胆管の形成を観察した結果を示す図(写真)。コラーゲンゲルサンドイッチ(a)、マトリゲルサンドイッチ群(b)、無処理群(c)。

[図10]胆汁排出反応5分におけるポリスチレン(PS)とPDMS膜のBEI(胆汁排出インデックス)比較。

[図11]MRP2タンパク質の局在解析の結果を示す図(写真)。

[図12]マトリゲル(MG)濃度150 μ g/mLと50 μ g/mLのときのBEI比較。

[図13]肝細胞播種密度 2×10^5 個/穴、 4×10^5 個/穴、 6×10^5 個/穴のときのBEI比較。

[図14A]コラーゲン吸着結合したPDMS膜製培養器およびコラーゲンコートポリスチレン製プレートにおけるBEI比較。

[図14B]コラーゲン吸着結合したPDMS膜製培養器およびコラーゲンコートポリスチレン製プレートにおける2日後および4日後の細胞の蛍光顕微鏡写真。

[図15]コラーゲン吸着結合したPDMS膜製培養器(48時間)およびコラーゲンコートポリスチレン製プレート(48時間および96時間)におけるMRP2およびCD147の局在を示す蛍光顕微鏡写真。

[図16]PDMS膜上で培養した肝細胞の電子顕微鏡写真(A)。(B)はタイト結合部分の拡大写真、(C)は腔壁に微小絨毛(MV)をもつ毛細胆管の写真である。スケールバーは(A)および(C)が2 μ m、(B)が1 μ mである。

[図17]フルオロカーボン膜を使用したガス透過性プレートおよびポリスチレンプレート(PS)におけるBEI比較。

[図18]連続的毛細胆管の作製手順を示す模式図。(A)は凹部(溝)を持ったゲルの作製手順を示し、(B)は凹部において肝細胞を培養する手順を示す。

[図19]凹部において培養した肝細胞の顕微鏡写真。

[図20]連続的毛細胆管におけるGDCFの代謝を示す図（写真）。

[図21]連続的毛細胆管にGDCFを代謝させてフルオレセインを蓄積させ、毛細胆管の一端を細いガラス管で開口したときの図（写真）。Aは組織の明視野像、Bは開口前、Cは開口約60秒後の蛍光像を示す。白の矢印は開口箇所を示す。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明の肝細胞培養方法は、ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする。好ましくは、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜のコラーゲンコート面に肝細胞を接着させ、該肝細胞を細胞外マトリクスで包埋された状態で、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ培養することを特徴とする。
- [0013] 本発明に用いるガス透過性膜の素材は酸素ガスを透過できるものであれば良いが、多孔質で疎水性の高いものが適している。例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、フルオロカーボン、ポリテトラフルオロエチレン（4フッ化）、ポリウレタンが挙げられ、これらの誘導體や類似物質も含まれる。
- [0014] PDMS膜の作製方法は非特許文献(M Nishikawa et al. Biotechnology and Bioengineering, vol. 99, pp. 1472-1481)に述べられている。ただし、PDMS膜の作製方法はこれに限らず、一般的に知られている膜の作製方法を用いて作製することができる。例えば、バーコーターで塗布する方法（バーコート法）やギャップコーターで塗布する方法（ギャップコート法）で作製することができる。他の素材を用いる場合も同様にして膜を作製することができる。
- また、フルオロカーボン膜が培養面に配置された培養プレートLumox（In vitro systems and services社製）等、を適宜購入して使用することもできる。
- [0015] ガス透過性膜の厚さは、ガス透過性の観点から可能な限り薄いことが好ましいが、50 μ mから2.0mmが適当である。しかしながら、最適な膜の厚さはその材質の丈夫さおよび扱う用途によって異なるため、上記範囲に限定される

ものではない。

[0016] ガス透過性膜を有する培養器の態様としては、培養器全体が該ガス透過性膜で構成されていても良いが、少なくとも肝細胞が播種される部位が該ガス透過性膜で構成されていれば良い。培養器の態様に合わせて、適宜変更することができる。

[0017] ガス透過性膜を覆うコラーゲンは、公知の方法で調製されたものが使用できるが、市販のコラーゲン溶液(例えば、ベクトンディッキンソン社製のラット尾コラーゲン)を用いて酸素を透過できる厚さに被覆することができる。また、該コラーゲンで該ガス透過性膜を覆う方法は、公知方法を使用することができる。例えば、酸素プラズマ処理をして該コラーゲンを該ガス透過性膜に吸着させる方法や化学的に反応する官能基を使用して共有結合させる方法が挙げられる。共有結合を使用したPDMS膜へのコラーゲンの結合方法は、例えば、非特許文献(M. Nishikawa et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, vol. 99, pp1472-1481)に述べられている方法に従って行うことができる。効率良く、安定かつ長期的に、毛細胆管を形成した肝細胞を調製することができるため、共有結合によりコラーゲンでガス透過性膜を覆う方が好ましい。

一方、短期的な毛細胆管の形成効率は共有結合でも吸着結合でも同様であることから、短期的な測定に使用する場合には、いずれも使用することができる。試験に必要な毛細胆管を形成できるかぎり、肝細胞の培養条件に合わせて、適宜、最適な結合を選択することができる。

[0018] 培養可能な肝細胞は、いずれの動物由来でも良く、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ミニブタ、ハムスター、フェレット、ウサギ、ラット、マウスが挙げられる。また、該動物から肝細胞を単離する方法は、公知の方法に従って行うことができる。肝細胞の由来は胎児、新生児、成体のいずれであってもよい。また、胚性幹(ES)細胞および誘導多能性(iPS)幹細胞、または臍帯血、骨髓、脂肪、血液由来組織性幹細胞から分化誘導される肝細胞を用いることもできる。これらの細胞から肝細胞を誘導する方法は公知の方法

に従って行うことができる。

播種する細胞密度は、該細胞が正常に増殖可能であれば良い。通常、細胞密度は約 $0.1 \sim 12.0 \times 10^5$ cells/cm²の間で播種することが好ましく、細胞が2～3層になるように播種してもよい。培養条件や使用する培養器具などに合わせて、適宜、好ましい細胞密度を設定することができる。

[0019] 肝細胞を包埋する細胞外マトリクスとしては、公知のコラーゲンゲルサンドイッチ法で使用可能なものが挙げられる。例えば、コラーゲンI、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、ゼラチン、エラスチン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、マトリゲル（商標：ベクトンディッキンソン社）、グロースファクター（ベーシックFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF、TGFベータなど）およびこれらの混合物を適宜選択して、細胞外マトリクスゲルとして使用することができるが、効率良く毛細胆管を形成した肝細胞を調製することができるため、コラーゲンゲルやマトリゲルが好ましく、さらに安定かつ長期的に該細胞を調製することができるため、コラーゲンゲルがより好ましい。該細胞外マトリクスゲルの作製方法は（非特許文献1：LeCluyse et al., Am J Physiol Cell Physiol, 1994, vol. 266, pp. 1764-1774）に記載の方法で行うことができる。この場合の肝細胞を包埋する細胞外マトリクス層の厚さは栄養分や試験化合物の透過性の観点から、適宜決定することができるが、10～100マイクロメートルが好適である。

[0020] また、該細胞外マトリクスのシートを用いて肝細胞を覆うようにしても良い。このような態様も「包埋」に含まれる。例えば、市販のコラーゲン膜（商品名ビトリゲル、旭テクノグラス社製）を肝細胞に重層することによりコラーゲンゲルと同様の効果を導くことができる。この場合のシートの厚さは栄養分や試験化合物の透過性の観点から、適宜決定することができるが、10～100マイクロメートルが好適である。

[0021] また、非生体成分からなる細胞外マトリクス様の物質を用いて肝細胞を覆うようにしても良い。このような態様も「包埋」に含まれる。例えば、非特

許文献4 (TISSUE ENGINEERING, Volume 12, 2006, 2181-2191) に記載のコラーゲンコーティングセルロース膜や、非特許文献5 (Biomaterials, volume 29, 2008, 3993-4002) に記載の多孔質の窒化ケイ素膜、非特許文献6 (Biomaterials, volume 29, 2008, 290-301) に記載のポリエチレンテレフタレート膜のような半透膜の使用は、物理的なシグナルで毛細胆管の形成を誘導し、且つ、培地成分などを供給可能な物質を肝細胞に重層することによりコラーゲングルと同様の効果を導くことができる。

また、具体的な非生体成分からなる半透膜の例として、再生セルロース（セロファン）、アセチルセルロース、ポリアクリロニトリル、テフロン（登録商標）、ポリエステル系ポリマーアロイあるいはポリスルホンの多孔質膜が挙げられる。

また、上記の非生体成分の細胞外マトリクス様の物質に、該細胞外マトリクスを組み合わせ使用することもできる。

[0022] 図1を用いて、単純な本発明の肝細胞の培養方法を説明する。ガス透過性膜をコラーゲンで覆い、その上に肝細胞を播種し、接着進展した肝細胞をコラーゲングルなどの細胞外マトリクスゲルで包埋し、ガス透過性膜側から酸素を供給しながら培養を行う。

[0023] 細胞で覆われていないガス透過性膜の側は、酸素が供給可能なように気相になっていることが望ましい。

この場合、ガス透過性膜越しの気相は細胞への酸素供給のために酸素濃度1~20%の空気とすることができる。生体内の肝臓に倣って酸素濃度5~13%の間が最適である。この酸素濃度調節は市販のマルチガスインキュベーター（例えば、サンヨー電機社製MC0-5M）の設定によって容易に行うことができる。

また、上記の酸素供給の別の態様としては、ガス透過性膜越しに配置された人工素材や血管細胞からなる人工血管により供給されてもよい。

[0024] 培養条件は公知の肝細胞を培養する方法に準じて行えば良く、培地としては、例えば、ダルベッコ修飾イーグル培地やウィリアムズE培地に血清、イン

スリン・トランスフェリン・セレンウム塩、デキサメタゾンを添加した培地を用いることができる。

そして、一般的な細胞培養と同じく、通常37°C、5%CO₂の条件で培養を行う。ただし、特殊な細胞や条件で培養を行う場合は、温度やCO₂濃度は適宜変更すればよい。培養条件を調節することによって、肝細胞を2次元あるいは3次元に培養することや、毛細胆管の数を調節することができる。

[0025] このようにして培養を行うことにより、肝細胞に3次元的位置情報を付与することができる。

すなわち、本発明の培養方法によれば、肝細胞の膜が分極し、肝細胞同士の間隙に沿って毛細胆管膜が、それ以外の部分には基底膜が形成される。この毛細胆管膜によって形成される毛細胆管は通常幅1~2マイクロメートル、長さは100マイクロメートル以上連結している。この毛細胆管ネットワークの途中には幅が5マイクロメートル程度に広がったたまり場が形成されることがある。

[0026] 基底膜には化合物を取り込むための有機アニオン輸送体群、およびナトリウム/タウロコール酸共輸送体群が発現している。代表的なものはOATP (Organic anion transporting polypeptide) 1a1, OATP1b2, OATP1b3, OAT2, OATP4, OATP8であり、これらに特異的な抗体を用いた細胞抗体染色によって存在を確認することができる。

[0027] 毛細胆管ネットワークには主要なATP binding cassette (ABC) トランスポータータンパク質が発現する。代表的なものはMRP2 (Multidrug-Resistance Protein 2), MDR1 (Multidrug-Resistance 1), BCRP (breast cancer resistance protein) であり、それぞれestradiol-17 β -glucuronide、Digoxin、Taurocholateの輸送活性から存在の有無を判別できる。また、MRP2, MDR1, BCRPに特異的な抗体を用いた細胞抗体染色によっても確認することができる。

[0028] 図1のように、肝細胞同士が接触する面に毛細胆管が形成されるので、化合物を肝細胞に添加し、毛細胆管に排出される代謝物を解析することにより、化合物の代謝特性を検定することができる。

すなわち、本発明の化合物検定装置は、本体部と、本体部に化合物を供給する化合物供給部と、本体部から化合物またはその代謝物を回収する化合物またはその代謝物の回収部とを有する培養肝細胞を用いた化合物検定装置であって、前記本体部は、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜と、該透過性膜のコラーゲンコート面に接着された肝細胞と、該肝細胞を包埋する細胞外マトリクスを有する。

[0029] なお、本発明の別の態様においては、ガス透過性膜には微細加工が施されていてもよい。

例えば、ガス透過性膜に微細加工を施し、ガス透過性膜の表面に溝や窪みや隔壁を形成してもよい。例えば、微細加工で施される隔壁により細胞の接着範囲と方向を限定して、細胞の配列方向および接着範囲、そしてそれにより形成される毛細胆管の配列方向および範囲を制御することができる。

また、ガス透過性膜上にコラーゲングルなどの細胞外マトリクスで溝や窪み（凹部）を形成し、その溝や窪みに細胞を配置することで、細胞の配列方向および接着範囲と方向を限定することができ、それにより形成される毛細胆管の配列方向および範囲を制御することで、毛細胆管内に排出された代謝物を連続的に回収することができる。このように、溝を有する細胞外マトリクスの溝に肝細胞を配置することも、「包埋」に含まれる。更に、前記の溝に配置された肝細胞を、細胞外マトリクスで覆うことで毛細胆管の形成を促進することができる。

溝や窪みの形状は、毛細胆管が形成された肝細胞が作製できれば、何でも良いが、生体内の肝細胞の配置を再現するため、肝細胞が約2列で配列できる幅が好ましい。すなわち、幅 $20\mu\text{m}$ 以上 $70\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $30\mu\text{m}$ 以上 $50\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは $30\mu\text{m}$ 程度が望ましい。また、溝や窪みの底面からガス透過性膜までの距離は狭い方が好ましいが、ガス透過性膜から十分に酸素を供給できる距離であれば良く、側面の高さは $10\mu\text{m}$ 以上 1mm 以下、好ましくは $50\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下、更に好ましくは $100\mu\text{m}$ 程度が望ましい。

[0030] 図2Aに示すように、培養器Aでは、ガス透過性膜11上に2つ、同じく

ガス透過性膜からなる隔壁 1 1' が設けられており、ガス透過性膜 1 1 と 2 つの隔壁 1 1' で囲まれた空間で肝細胞の培養が行われる。図 2 A の a-a 断面図である図 2 B に示すように、ガス透過性膜 1 1 はコラーゲンコート層 1 2 を有し、その上に肝細胞 1 3 を接着させ、コラーゲンマトリクス 1 5 で包埋する。そして、ガス透過性膜 1 1 と 2 つの隔壁 1 1' の外側に設置された図示しない酸素供給装置を用いて酸素を供給し、培地 1 6 を添加して培養が行われる。肝細胞 1 3 同士が接触する面に毛細胆管 1 4 が形成される。

この隔壁は隣接する肝細胞同士が接着を妨げられる大きさであればよく、具体的には 1 マイクロメートル以上であることが好ましい。

また、図 1 8 で、溝や窪みで毛細胆管が形成された肝細胞を培養する方法の一例を説明する。図 2 のコラーゲンコート層 1 2 を有するガス透過性膜 1 1 の上に、図 1 8 (A) で示した溝が形成されたコラーゲングルなどの細胞外マトリクスを配置する。まず、前記ガス透過性膜 1 1 の上に、ゲル化前のコラーゲン溶液（濃度は 0.1-30mg/mL、好ましくは 0.3-3mg/mL、更に好ましくは約 2.0mg/mL）を撒く。次に、該コラーゲン溶液が完全にゲル化する前に、凸部を持った PDMS 製の型を配置して、放置することでゲル化させることで凹部をもったコラーゲングルを作製する。前記凸部をもった型の形状としては、形成された溝の幅が、20 μm 以上 70 μm 以下、好ましくは 30 μm 以上 50 μm 以下、さらに好ましくは 30 μm 程度であり、高さが 10 μm 以上 1mm 以下、好ましくは 50 μm 以上 500 μm 以下、更に好ましくは 100 μm 程度であり、また、長さは適宜変更して使用できる。また前記凸部をもった型の素材としては、ゲル化したコラーゲンの形を壊さないようなものであれば良く、例えば、重さや加工や取り扱いのし易さから PDMS 製のものが良い。

続いて、図 1 8 (B) で示すように、上記で作製した凹部を持ったゲルに、培養培地に溶かした肝細胞を播き、何度か培地で洗浄することで、凹部のみに肝細胞を配列させて培養を行う。

続いて、約 24 時間後培養後、ゲル化前のコラーゲン溶液（濃度は 0.1-30mg/mL、好ましくは 0.3-3mg/mL、更に好ましくは約 2.0mg/mL）もしくはマトリ

ゲル溶液（濃度は、5-5000 $\mu\text{g/mL}$ 、好ましくは50-500 $\mu\text{g/mL}$ 、更に好ましくは約150 $\mu\text{g/mL}$ ）を細胞上に重層し、さらに2-9日培養する。2日から毛細胆管の形成が認められるが、長期間培養する方がより長い毛細胆管を作らせることができる。薬物の評価試験等に最適な状態を適宜選択することができる。

[0031] また、本発明の別の態様においては、該ガス透過性膜は円柱形または立方形等、筒状の流路を象っていてもよい。

すなわち、ガス透過性膜がコラーゲンコート面を内側にして筒状に配置され、該筒状空間の内部で肝細胞を細胞外マトリクスに包埋して培養する態様も本発明の培養方法に含まれる。

[0032] この培養方法によって培養された肝細胞を含む本発明の化合物検定装置の一態様について図3Aと図3Aのa-a断面図である図3Bを参照して説明する。

本発明の化合物検定装置Bは、本体部2と、本体部に化合物を供給する化合物供給部1と、本体部から化合物またはその代謝物を回収する回収部3とを有する装置であって、前記本体部2は、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜21をコラーゲンコート面22を内側にして筒状にした筒状体28と、筒状体28の内側のコラーゲンコート面22に接着された肝細胞23と、肝細胞23を包埋する細胞外マトリクス25とを有する。

そして、本体部2は、さらに、半透膜26で画定された空間を筒状体28の軸方向に形成してなる流路27を有する。この流路から半透膜26を介して該供給物を細胞外マトリクスに包埋された肝細胞に供給することができる。

ここで、半透膜の素材は化合物や培地成分を透過できるものであれば特に制限されないが、例えば、再生セルロース（セロファン）、アセチルセルロース、コラーゲンコーティングセルロース、ポリアクリロニトリル、テフロン（登録商標）、多孔質の窒化ケイ素、ポリエチレンテレフタレート、ポリエステル系ポリマーアロイあるいはポリスルホンの多孔質膜などが例示される。

なお、これらの素材は非生体成分の細胞マトリクス様物質として使用できるものであるため、これらの素材からなる半透膜を肝細胞を覆うように配置することにより、別途細胞外マトリクスを加えなくても極性を誘導させ、毛細胆管を形成させることができる。

化合物検定装置Bにおいては、肝細胞を培養・維持するための培地も化合物供給部1から供給され、流路27を通過する際に、培地成分が半透膜26を介して肝細胞に供給される。ただし、本発明の化合物検定装置においては、培地を供給する培地供給部は化合物供給部とは別に設けられていてもよい。

なお、流路27の形状は円筒形状に限定されず、その他の形状であってもよく、枝分かれしていてもよい。また、その径も特に制限されない。また、流路は複数設けられていてもよく、培地が通過する流路と化合物が通過する流路が別々になっていてもよい。

さらに、流路27および半透膜26は必須ではなく、ガス透過性膜によって形成される筒状体の内部全てが肝細胞とそれを包埋する細胞外マトリクスであってもよい。この場合は、培地や化合物が筒状体の内部に封入された細胞外マトリクスの中を通過するようにすればよい。

[0033] 図3Bでは、ガス透過性膜21の内壁（コラーゲンコート面22）に沿って肝細胞23が並べられており、その内側には細胞外マトリクス25、さらにその内側には半透膜26により仕切られた培地および化合物を添加するためのスペース（流路27）が設けられており、ガス透過性膜21の外側から酸素を供給して培養することにより、細胞外マトリクスによって毛細胆管24が誘導されている。ガス透過性膜21の外側は気相となっており、肝細胞へ触れる酸素濃度の調節が可能となっている。

[0034] このような本発明の装置を用いることにより、化合物の代謝特性の評価を行うこともできる。すなわち、培地供給部1から試験化合物を流路27へ供給することにより、半透膜26を介して、肝細胞が化合物に暴露される。そして、肝細胞によって代謝された化合物が回収部3において、回収され、分

析される。

[0035] 化合物またはその代謝物を回収する回収部は流路または細胞外マトリクスから化合物または代謝物を含む培地などの液体を分取できる部材であればよいが、本体部に接続された筒状体であって、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜をコラーゲンコート面を内側にして筒状にした筒状体と、該筒状体の内側のコラーゲンコート面に接着された肝細胞と、該肝細胞を包埋する細胞外マトリクスと、該肝細胞の毛細胆管によって形成される流路を有するものであってもよい。

すなわち、本発明の方法で培養された肝細胞集団によって形成された胆管が集合して流路（腔）を形成し、代謝物が流れるようにしたものであってもよい。

このような態様の本発明の肝細胞培養装置について図4Aと図4Aのb-b断面図である4Bを参照して説明する。なお、a-a断面図は図3Bと同様である。

図4Aに示すように、本体部102はその径が徐々に小さくなるように形成され、回収部103に接続されている。そして、回収部103では、ガス透過性膜の内部に、毛細胆管腔を中心に形成するように肝細胞が導入されている。

形成させた毛細胆管からは極細の管や胆管上皮細胞からなる流路が設けられており、毛細胆管に排出された代謝物が滞りなく排泄され、分析のためのリザーバーに回収される。

このような化合物検定装置は後述するような薬物（化合物）輸送検定に好適に用いることができる。

[0036] 本発明の方法で作製した毛細胆管を形成した肝細胞は、薬物輸送検定や医薬候補物質のハイスループットなスクリーニングに使用することができる。

薬物輸送検定としては、薬物がどのくらいの量と速度で肝細胞に取り込まれ、胆汁に排出されるかどうかの検定が例示される。または、ある化合物Aが化合物Bの輸送を阻害・促進するかどうかの検定が例示される。

薬物輸送検定の方法としては、例えば、非特許文献 (Liu X et al., Am J Physiol, 1999, vol. 277, pp. G12-21) の方法が挙げられる。

ハイスループットなスクリーニングの具体的な方法としては、例えば、微細な流路と高感度な検出器でごく微量の化合物を解析でき、さらにこれを自動あるいは半自動で行うような以下の方法などが挙げられる。

ハイスループットなスクリーニングのためには、ガス透過性膜上の区切られたごく微小な区画、または図2のようなガス透過性流路の極細流路の中で細胞外マトリクスに包埋され毛細胆管を形成した肝細胞が培養されている培養部分それぞれに、試験化合物暴露させる注入口と、それぞれの区画の肝細胞で代謝され毛細胆管に排出される代謝物を回収するための口が設けられたマイクロ流路デバイスを構築することで可能となる。

[0037] 上記マイクロ流路デバイスの注入口には化合物ライブラリから化合物溶液を分取し送液するポンプ、出口には代謝物を高速液体クロマトグラフィやLC/MS/MSに送って代謝物の定量や組成分析結果を導く流路が接続され、これらの動作をコンピューターなどで操作するようなものが例示される。

[0038] 以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により制限されるものではない。

実施例 1

[0039] 本発明の方法による肝細胞の培養と毛細胆管形成の確認
肝細胞の単離

5週齢のラット (購入先: 三共ラボサービス) の肝臓から非特許文献 (Segl en P0, 1976, in Methods in cell biology (Prescott DM ed) 13th ed, pp29-83, Academic press, New York) に従って肝臓由来の細胞を分離した。

[0040] コラーゲンを共有結合させたPDMS膜製24穴培養器の作製

方法は非特許文献 (M. Nishikawa et al. Biotechnology and Bioengineering, 2008, vol. 99, pp. 1472-1481) に述べられている方法に従った。Silpot 184 (東レ・ダウコーニング社製) の主剤と硬化剤を10:2で混合した混合液30gを258mm×174mm×45mmのプラスチック製容器に薄く伸ばし、80°Cで2時間加熱し

硬化させ、厚さ約1mmのPDMS膜を作製した。主剤と硬化剤の割合は10:2に限らず、10:1~10:2の間で作製されるのが通常である。このPDMS膜を24個の穴が開いたポリカーボネート製の枠と、枠と同じ位置に穴の開いた厚さ1.5mmのSU S製板の間に挟み、ねじで固定することでPDMS膜製24穴培養器を作製した。これに酸素プラズマ処理（5秒）を行った後、ウェルに1%酢酸, 2%アミノシラン（信越シリコン社製）を加えて、室温で45分反応させた後、80°Cで90分間加熱した。次いで、このように処理されたウェルに0.5mM Sulfosuccinimidyl 2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-1, 3'-dithiopropionate溶液（Thermo Fisher Scientific社製）を加えて紫外線照射（1分を2回）したのち、0.3mg/mLコラーゲン溶液（新田ゼラチン社製）を添加して18時間室温で放置し、PBSで洗浄して当日のうちに以下の実験に使用した。

[0041] コラーゲングルサンドイッチ法による肝細胞の培養と毛細胆管形成の確認

コラーゲングルサンドイッチ法は非特許文献1（LeCluyse et al., Am J P hysiol, 1994, vol. 266, pp. 1764-1774）に準じた。上記で調製した培養器に1穴あたり肝実質細胞を 2×10^5 個播種し、その4時間後、培地を交換した後、播種24時間後に1.7mg/mlコラーゲン溶液（ベクトンディッキンソン社製）を20 μ L重層して、37°Cで1時間ゲル化を行わせたあと、血清不含培地を500 μ L加え、37°C/5%CO₂で培養を行った。また、培養液は2日に1度の割合で交換した。

[0042] 肝細胞は、5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF)を投与すると、この物質を細胞質に取り込み代謝することにより、蛍光物質であるフルオレセインにして毛細胆管内に排出するという性質を有する。この性質を利用して、毛細胆管の形成過程と面積を調べた。5 μ Mの濃度で培養液にフルオレセインジアセテートを添加し、37°Cで15分静置した後、冷却した培養液で細胞を洗浄し、蛍光観察装置を付けた顕微鏡でフルオレセインの蛍光を観察した。図5に示すように、PDMS膜上で培養した肝細胞は、2日目から管状構造が蛍光色素で染色されはじめた。このことは、毛細胆管が形成されていることを示す。

[0043] 一方、図6に示すように、従来のポリスチレン培養器（製品名：BioCoatコ

ラーゲンコート24穴ウェル、ベクトンディッキンソン社製)上で培養した肝細胞は、2日目には管状構造はほとんど見られず、排出活性を持たないため細胞内が染色された細胞が多数を占めた。

毛細胆管の面積を経時的に比較したところ、2日目から10日目までPDMS膜上のほうが従来のポリスチレン上での培養より、毛細胆管形成面積が広がった。一方、従来のポリスチレン上での培養では毛細胆管の経時的な漸減が見られたが、PDMS膜上の培養では顕著な毛細胆管の減少は見られなかった(図7)。

以上より、PDMS膜上で培養することにより、効率よく、安定かつ長期的に、毛細胆管を形成した肝細胞を調製できることがわかった。

実施例 2

[0044] PDMS膜の前処理方法検討

実施例1で作製したコラーゲンを共有結合させたPDMS膜培養器と、コラーゲンを吸着結合させたPDMS膜培養器との、毛細胆管形成の効率を比較した。

[0045] PDMS膜24穴培養器の作製

コラーゲンを共有結合させたPDMS膜24穴培養器は実施例1と同様に作製した。コラーゲンを吸着結合させたPDMS膜24穴培養器は、実施例1のアミノシラン処理工程の後、酸素プラズマ処理したPDMS膜製24穴培養器に対して、1.7mg/mLのコラーゲン溶液(ベクトンディッキンソン社製)をウェルに少量添加して覆い、18時間室温で置いた後、PBSで洗浄して作製した。いずれも、当日のうちに以下の実験に用いた。

[0046] コラーゲンゲルサンドイッチの作製と毛細胆管の可視化

実施例1と同様の方法でコラーゲンゲルサンドイッチ肝細胞カルチャーを作製した。フルオレセインジアセテートを用いて毛細胆管の形成を観察したところ(図8)、培養4日目(コラーゲンゲル重層3日後)にはコラーゲンを吸着結合させた培養器(a)、共有結合させた培養器(b)どちらも毛細胆管の形成が見られた。しかしながら、培養7日目では、コラーゲンを吸着結合させた培養器(c)のほうが共有結合させた培養器(d)より細胞の剥離が顕著となり、毛

細胆管も消失してしまった。

このことから、コラーゲンを共有結合させた方が、安定かつ長期的に毛細胆管を形成した肝細胞を調製できる。

実施例 3

[0047] 重層する細胞外マトリクス成分の検討

実施例 1 で作製したコラーゲンを共有結合させたPDMS膜培養器において、重層する細胞外マトリクス成分による毛細胆管形成の効率を比較した。

[0048] 重層する細胞外マトリクス成分以外は、実施例 1 の方法に従って実施した。上記で調製した培養器に1穴あたり肝実質細胞を 2×10^5 個播種し、その4時間後、培地を交換した。播種24時間後に1.7mg/mlコラーゲン溶液(ベクトンディッキンソン社製) 20 μ Lを重層して、37°Cで1時間ゲル化を行わせたものをコラーゲンゲルサンドイッチ群とした。一方、播種後24時間後に血清不含培地でマトリゲル(ベクトンディッキンソン社製)を50倍希釈(150 μ g/mLに相当)して添加したものをマトリゲルサンドイッチ群とした。何も添加しないものを無処理群とした。

[0049] フルオレセインジアセテートを用いて毛細胆管の形成を見たところ(図9)、培養4日目

(細胞外マトリクス成分添加3日後)にはコラーゲンゲルサンドイッチ(a)、マトリゲルサンドイッチ群(b)とも毛細胆管の形成が観察され、培養7日目まで維持された。無処理群では毛細胆管が全く形成されず、培養3日目から細胞の剥離が顕著になり、5日目にはほとんどの細胞が剥がれてしまった(c)。

以上より、PDMS膜上ではコラーゲンの重層でもマトリゲルの重層でも毛細胆管の形成が可能なことがわかった。

実施例 4

[0050] 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF)によるMRP2活性測定

実施例 1 で作製したPDMS膜培養器で培養された毛細胆管を形成したコラーゲンゲルサンドイッチ肝細胞を使用して、5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF)の取り込みによる薬物トランスポーター(MRP2)の

活性を非特許文献 (Liu X et al., Am J Physiol, 1999, vol.277, pp.12-21) に従って以下のように測定した。また、従来のポリスチレン培養器で培養された肝細胞を比較として使用した。

[0051] 材料

Ca/Mg(+) HBSSは、HBSS (Invitrogen, 14175-079) を50mL、14g/L CaCl₂を500 μL、10g/L MgCl₂/6H₂Oを500 μL加え用時調製した。CDCF溶液は、用時に1mM CDCF (in dimethyl sulfoxide: Molecular Probes, C-369)を用いて、Ca/Mg(+) HBSSで5 μM CDCF溶液を作成し、37°Cウォーターバスで保温した。Ca/Mg(-) HBSSは、HBSS (Invitrogen, 14175-079) 50mLに100mM EGTAを500 μL加えて調製した。0.5% Triton X-100/PBSは、PBSバッファーに0.5%になるようにTriton X-100を加えて調製した。

[0052] 化合物適用・回収操作 (24穴プレートの場合)

培養開始4日後 (ゲル重層3日後) の肝細胞培養を二つ用意した。続いて、それぞれの培養を別々に温Ca/Mg(+) HBSS または 温Ca/Mg(-) HBSSバッファ0.5mLで2回洗浄した。続いて、それぞれの培養を別々に温Ca/Mg(+) HBSS または 温Ca/Mg(-) HBSSバッファ0.5mL中で37°Cに10分間放置したのち、液を除いた。続いて、両培養に5 μM CDCFを含んだ温Ca/Mg(+) HBSSバッファ0.5mLを加え、5分間インキュベートののち、CDCF溶液を除去した。続いて、両培養を0.5mLの冷Ca/Mg(+) HBSSバッファで3回洗浄し、液を除いた。続いて、0.5% Triton X-100を含むPBS を500 μL加えて、室温で20分間浸透したのち、回収した液を13000 x g, 15分、4°Cで遠心して、上澄みを回収し、100 μLを取って、励起492nm、蛍光530nmを蛍光マイクロプレートリーダーで計測して、CDCF量を定量した。また、原液25 μLをBCAプロテインアッセイキット (Thermo社製) によりタンパク量を計測した。胆汁排出インデックス (Bile Excretion Index: BEI) はタンパク量当たりの蛍光輝度値 (Accumulation) からの以下の計算式より求めた。

[0053]

[数1]

$$BEI = \frac{\text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(+)) - \text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(-))}{\text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(+)}) \cdot 100$$

[0054] 結果を図10に示す。ガス透過性膜を使用した場合は、BEI値は約40%であり、ポリスチレン（PS）基板を使用した場合は、BEI値は約20%であった。

以上より、ガス透過性膜のほうがポリスチレン製基板を用いるより、肝細胞にMRP排出活性が高い毛細胆管構造を構築させることができることがわかり、高感度（少量の化合物で精度良く）に化合物の評価を行えることがわかった。

実施例 5

[0055] MRP2タンパク質の局在解析

実施例1で作製したPDMS膜培養器で培養された毛細胆管を形成した肝細胞を使用して、MRP2タンパク質の局在を、常法に従い細胞抗体染色により調べた。また、従来のポリスチレン培養器で培養された肝細胞を比較として使用した。

PDMS培養器と従来のポリスチレン培養器ともにMRP2タンパクが細胞間に検出されるが、PDMS培養器のほうがより広範囲にMRP2タンパクが発現している（図11）。MRP2は胆汁排出に関わる主要なトランスポーターであることから、PDMS培養器で作製した毛細胆管のほうがより高い胆汁排出活性を持っていると推測できる。

実施例 6

[0056] コラーゲン吸着結合したPDMS膜とマトリゲルによる早期極性形成の検討

実施例2で作製したコラーゲン吸着結合したPDMS膜製24穴培養器およびコラーゲンコートポリスチレン製24穴プレート（Beckton Dickinson）に、ラットから調製した肝細胞を播種した。播種2時間後に培地を除いてマトリゲルを含んだWilliam's Medium E（含5 μ g/mLインスリン、5 μ g/mLトランスフェリン、5 μ g/mL亜セレン酸、1 μ Mデキサメタゾン）に交換した。

マトリゲル (MG) 濃度の検討のため、コラーゲン吸着結合したPDMS膜製 24 穴培養器 1 穴辺り 2×10^5 個の細胞を播種し、播種 2 時間後に交換する培地中のマトリゲル濃度を 50 および $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ にして 48 時間培養した後に実施例 4 に記載の方法の通り BEI 測定した。その結果、図 12 に示すように、 $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ マトリゲルの方が $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ より高い BEI を示した。

また、細胞播種密度の検討のため、肝細胞播種密度をコラーゲン吸着結合した PDMS 膜製 24 穴培養器 1 穴辺り 2×10^5 個、 4×10^5 個、 6×10^5 個にして、 $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ マトリゲルで 48 時間培養した後に実施例 4 に記載の方法の通り BEI 測定した。その結果、図 13 に示すように、 2×10^5 個がもっとも BEI が高く、 4×10^5 個、 6×10^5 個の順に BEI は低下した。

[0057] 続いて、培養期間の最適ポイントの検討を行った。上記のようにして決定したマトリゲル濃度 ($150 \mu\text{g}/\text{mL}$) と細胞播種密度 (2×10^5 個) において、肝細胞播種後 24、48、72、96 時間に実施例 4 に記載の方法の通り BEI 測定した。

図 14 A に示すように、PDMS 膜上では播種後 24 時間および 48 時間後に、ポリスチレン上で 96 時間培養した肝細胞と同等の BEI を示した。図 14 B は PDMS 膜製 24 穴培養器およびコラーゲンコートポリスチレン製 24 穴プレート上に肝細胞を播種後 48 時間および 96 時間後に CDGF が蓄積している部位を蛍光顕微鏡で撮影したものである。この像からも PDMS 膜上の肝細胞のほうが従来の培養方法のそれより早期に活性をもった毛細胆管が形成されていることが確認できる。以上の結果から、PDMS 膜製 24 穴培養器を用いてマトリゲルを重層して極性を誘導すると、播種後 24 時間後には極性が形成され、機能的な毛細胆管が現れる。これは、従来法によるものが同等の BEI 値に到達するより 72 時間も早いことがわかった。

実施例 7

[0058] 極性マーカーの局在・発現の実証

実施例 6 で作製した毛細胆管を形成した肝細胞を使用して、MRP2 および基底膜マーカー CD147 の局在を、常法に従い細胞抗体染色により調べた。また、

コラーゲンコートポリスチレン製24穴プレートで培養した肝細胞と比較した。

図15に示すように、PDMS膜上で培養すると、培養48時間後にはMRP2タンパク質とCD147タンパク質が細胞間に検出される。一方、従来のポリスチレン上ではCD147の発現は見られるがMRP2タンパク質の局在はほとんど見られない。ポリスチレン上でも極性が形成されている培養120時間後と比較してもPDMS膜上の肝細胞のほうが広範囲にMRP2タンパク質が発現している。CD147の局在様式は両者でほとんど同様である。これらの結果から、PDMS膜上で培養された肝細胞はポリスチレン上によるものに比べてより早くMRP2分子の局在が生じるとともに、MRP2の発現はポリスチレン上より増強されることが示された。

実施例 8

[0059] 超微細構造観察による極性形成の実証

実施例6で作製した培養48時間後の肝細胞の微細構造を透過型電子顕微鏡(JEM1400 JEOL社製)で観察した。

図16Aで示すように、PDMS膜上で極性を誘導した肝細胞において、極性をもった肝細胞に典型的に見られる、毛細胆管腔(BC)、タイト結合(TJ)が見られる。図16Bはタイト結合部分の拡大写真、図16Cは腔壁に微小絨毛(MV)をもつ毛細胆管を示した。

この結果から、本法によって培養される肝細胞には構造的に生体と同等の極性が形成されることが示された。

実施例 9

[0060] フルオロカーボン膜を使用したガス透過性プレートによる肝細胞の早期極性形成の検討

ガス透過性を持つフルオロカーボン膜が培養面に配置された24穴培養プレートLumox (In vitro systems and services社製)にラットから調製した肝細胞を1穴辺り 1.0×10^5 個または 2.0×10^5 個播種した。播種2時間後に培地を除いて $150 \mu\text{g/mL}$ マトリゲルを含んだWilliam's Medium E (含 $5 \mu\text{g/mL}$ インスリン、 $5 \mu\text{g/mL}$ トランスフェリン、 $5 \mu\text{g/mL}$ 亜セレン酸、 $1 \mu\text{M}$ デキサメタゾン)

に交換した。肝細胞播種後 4 8 時間に実施例 4 に記載の方法の通り BEI 測定し、極性形成の程度を解析した。コラーゲンコートポリスチレン製 2 4 穴プレートで培養した細胞を比較対照とした。

図 1 7 に示すように、Lumox 上ではポリスチレン (P S) 製 2 4 穴プレートより高い BEI を示した。細胞播種密度 1 穴辺り 1.0×10^5 個と 2.0×10^5 個では 1.0×10^5 個のほうが高い BEI を与えた。

実施例 10

[0061] 代謝物の連続解析のための連続的毛細胆管の作製

実施例 1 に記載の要領で作製したフルオロカーボン製の膜に $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ コラーゲン I-P (新田ゼラチン社製) を含む 0.001N HCl 溶液を塗布したのち乾燥させ、コラーゲンコート処理を行った。

次に、前記で作製した基板の上に肝細胞を規則正しく並べた。図 1 8 A に示すように、ゲル化前のコラーゲン溶液 (濃度 $2.1\text{mg}/\text{mL}$) に、幅が $30 \mu\text{m}$ で高さが $100 \mu\text{m}$ で長さが 10mm の凸部を持った PDMS 製の型を配置して、 37°C で 60 分間放置することでゲル化させることで凹部をもったコラーゲンゲルを作製した。

次に、図 1 8 B に示したように、作製した凹部を持ったゲルに、培養培地に懸濁したラットの肝細胞を播き、2 回培地で洗浄することで、凹部のみに肝細胞を配列させて培養を行った。

24 時間後に、コラーゲン溶液 (濃度 $2.1\text{mg}/\text{mL}$) を細胞上に重層し、さらに 9 日間培養した。このようにして配列させた 9 日目の肝細胞の写真を図 1 9 に示す。連続的に毛細胆管が形成しているように観察された。

[0062] 次に、上記の毛細胆管が、実際に連続的に形成しているか確認するため、実施例 1 に記載したようにして CDCF を培地中に添加して、上記で作製した連続的毛細胆管に代謝物のフルオロセインを蓄積させて、その蛍光を観察した。2 日目では、一部に毛細胆管が形成している様子が観察でき、6 日目では、それらの毛細胆管が連続している様子が観察できた。そして、9 日目には、更に長く連続している様子が観察できた。9 日目の結果を図 2 0 に示す。蛍光が

連続的に観察されていることから、1mmを超える連続した毛細胆管を作製できることが確認できた。

[0063] さらに、作製した連続的毛細胆管にフルオレセインを蓄積させ、毛細胆管の一端（図2 1A）を細いガラス管で開口した。その結果、開口前（図2 1B）に毛細胆管内に蓄積していたフルオロセインが、開口約60秒後（図2 1C）に消失したことがわかった。これによりこの毛細胆管の連続性が実証でき、さらに、胆汁の連続回収解析への利用可能であることも実証された。

また、上記において、フルオロカーボン製酸素透過膜のコラーゲンコート処理の有無は結果に影響しなかった。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明の培養方法によって得られる培養肝細胞は肝細胞を用いた医薬品候補化合物スクリーニングの試験などに利用できる。そして、医薬品候補化合物等の肝細胞における取り込み・代謝・排泄の解析精度と効率の上昇に寄与し、創薬プロセスの高効率化につながる。

符号の説明

[0065] A：培養器、B、C：化合物検定装置、
1、101：化合物供給部；2、102：本体部；3、103：回収部；11：ガス透過性膜；11'：隔壁；12：コラーゲンコート層；13：肝細胞；14：毛細胆管；15：コラーゲンマトリクス；16：培地；21：ガス透過性膜；22：コラーゲン；23：肝細胞；24：毛細胆管；25：細胞外マトリクス；26：半透膜；27：流路；28：筒状体。

請求の範囲

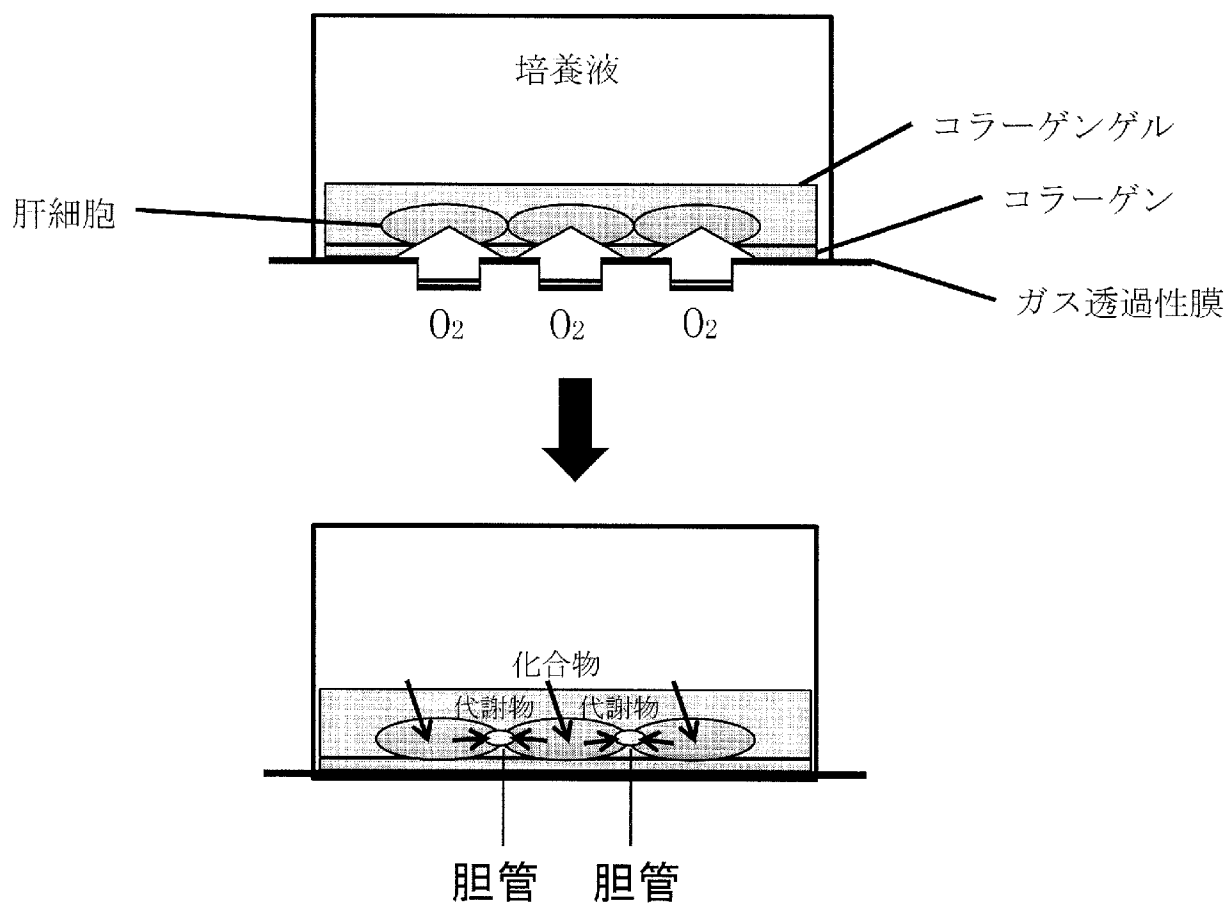
- [請求項1] ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする、肝細胞培養方法。
- [請求項2] ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、請求項1に記載の肝細胞培養方法。
- [請求項3] ガス透過性膜がコラーゲンコート面を内側にして筒状に配置されており、該筒状の内部で細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記細胞外マトリクスが溝を構成し、該溝に肝細胞が配置された、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記ガス透過性膜がポリジメチルシロキサン膜である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記ガス透過性膜がフルオロカーボン膜である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] コラーゲンコーティングが共有結合によるものである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 細胞外マトリクスがコラーゲングルまたはマトリゲル（商標）である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 細胞外マトリクスが非生体成分からなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] ガス透過膜上に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞を配置し、ガス透過性膜側から酸素を供給しつつ肝細胞を培養することを特徴とする、毛細胆管を形成した培養肝細胞の製造方法。
- [請求項11] ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置される、請求項10に記載の方法。

- [請求項12] ガス透過性膜上に溝を有する細胞外マトリクス層が配置され、該細胞外マトリクス層の溝に肝細胞が配列された、請求項10または11に記載の方法。
- [請求項13] 請求項10～12のいずれか一項記載の方法により毛細胆管を形成した培養肝細胞を製造し、得られた培養肝細胞を用いて化合物の代謝を評価する、化合物の代謝検定方法。
- [請求項14] 請求項10～12のいずれか一項に記載の方法により毛細胆管を形成した培養肝細胞を製造し、得られた培養肝細胞を用いて化合物の輸送を評価する、化合物の輸送検定方法。
- [請求項15] 培養肝細胞を含む本体部と、本体部に化合物を供給する化合物供給部と、本体部から化合物またはその代謝物を回収する回収部とを有する培養肝細胞を用いた化合物検定装置であって、前記本体部は、
ガス透過性膜と、
該ガス透過膜上に配置された細胞外マトリクスと、
該細胞外マトリクスに包埋された肝細胞と、
を有することを特徴とする、装置。
- [請求項16] ガス透過性膜の表面がコラーゲンコーティングされており、該ガス透過性膜のコラーゲンコート面に細胞外マトリクスで包埋された肝細胞が配置された、請求項15に記載の装置。
- [請求項17] 前記ガス透過性膜は、コラーゲンコート面を内側にして筒状にした筒状体を形成しており、該筒状体の内部にコラーゲンコート面に接着された肝細胞とそれを包埋する細胞外マトリクスを含む、請求項16に記載の装置。
- [請求項18] 前記本体部は、前記化合物供給部からの供給物が流れるように半透膜で画定された空間を前記筒状体の軸方向に形成する流路であって、該半透膜を介して該供給物を前記細胞外マトリクスに包埋された肝細胞に供給可能な供給物用流路を、更に有する請求項17に記載の装置。
- [請求項19] 前記回収部が、表面がコラーゲンコーティングされたガス透過性膜を

コラーゲンコート面を内側にして筒状にした筒状体と、該筒状体の内側のコラーゲンコート面に接着された肝細胞と、該肝細胞を包埋する細胞外マトリクスと、該肝細胞の毛細胆管によって形成される流路を有する、請求項 18 に記載の装置。

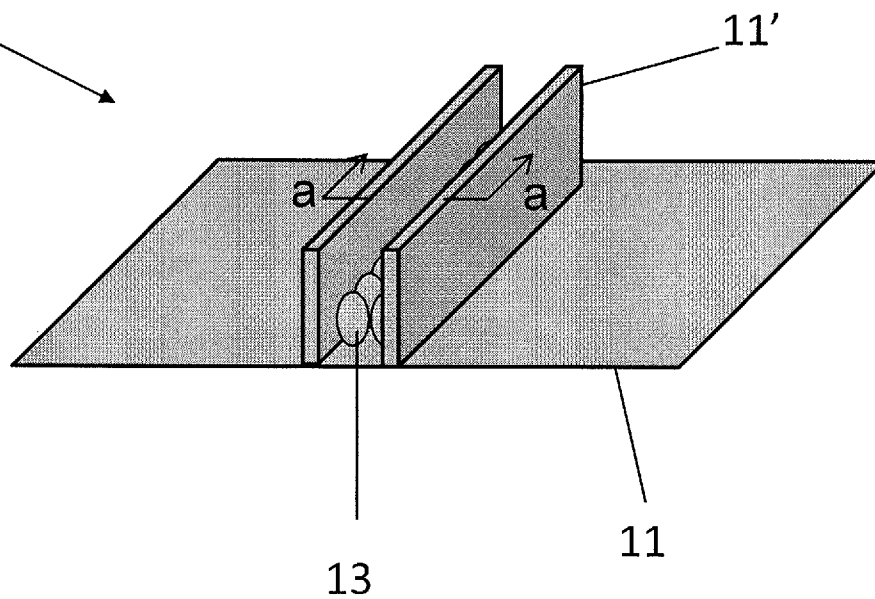
- [請求項20] 前記細胞外マトリクスが溝を構成し、該溝に肝細胞が配置された、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項21] 前記ガス透過性膜がポリジメチルシロキサン膜である、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項22] 前記ガス透過性膜がフルオロカーボン膜である、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項23] コラーゲンコーティングが共有結合によるものである、請求項 15 ~ 22 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項24] 細胞外マトリクスがコラーゲングルまたはマトリゲル（商標）である、請求項 15 ~ 23 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項25] 細胞外マトリクスが非生体成分からなる、請求項 15 ~ 23 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項26] 化合物代謝検定装置である、請求項 15 ~ 25 のいずれか一項に記載の装置。
- [請求項27] 化合物輸送検定装置である、請求項 15 ~ 25 のいずれか一項に記載の装置。

[図1]

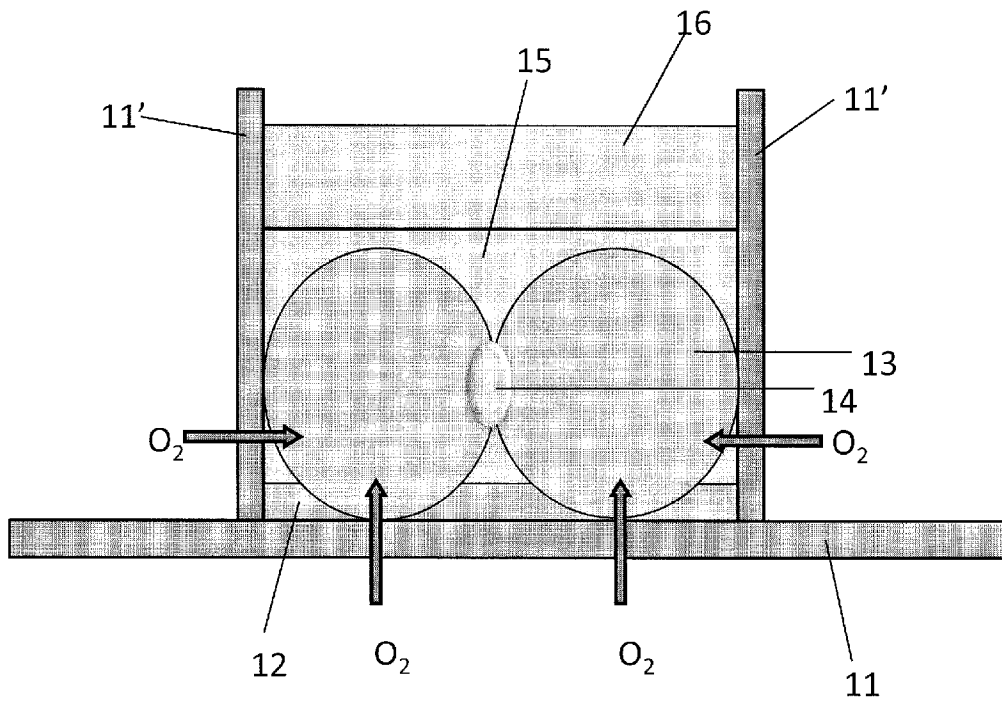


[図2A]

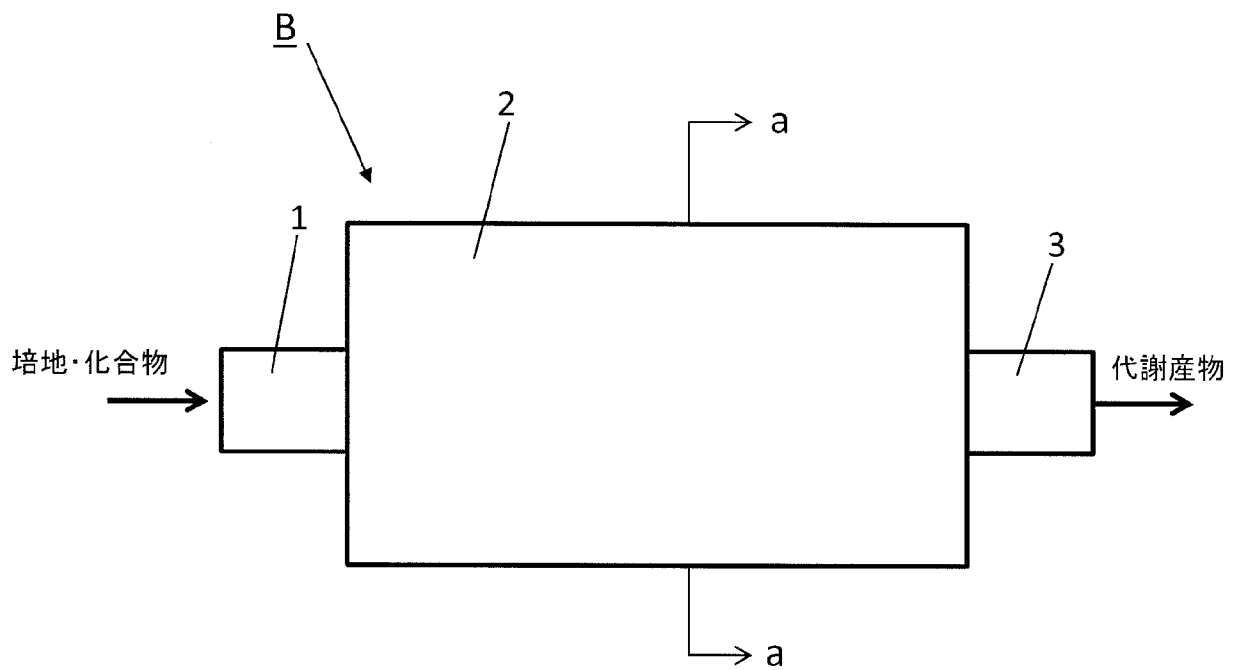
A



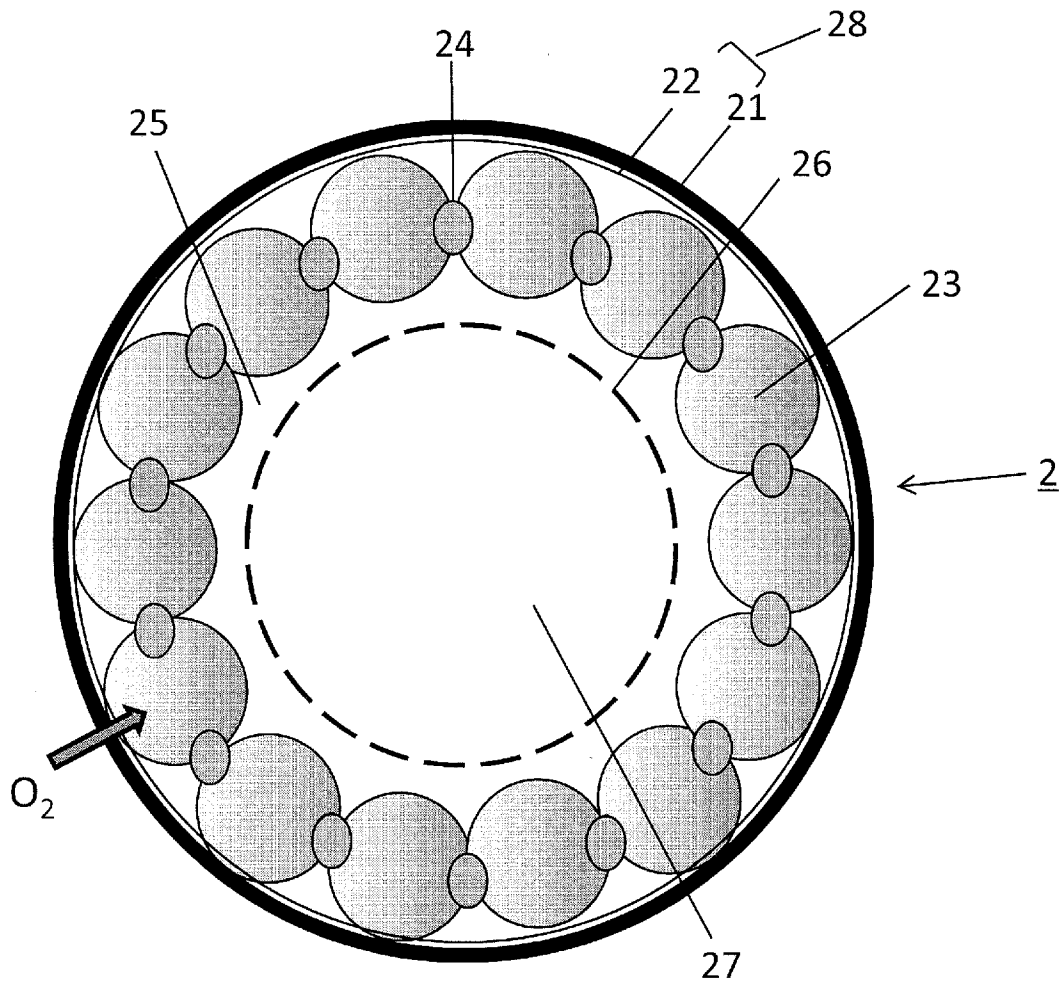
[図2B]



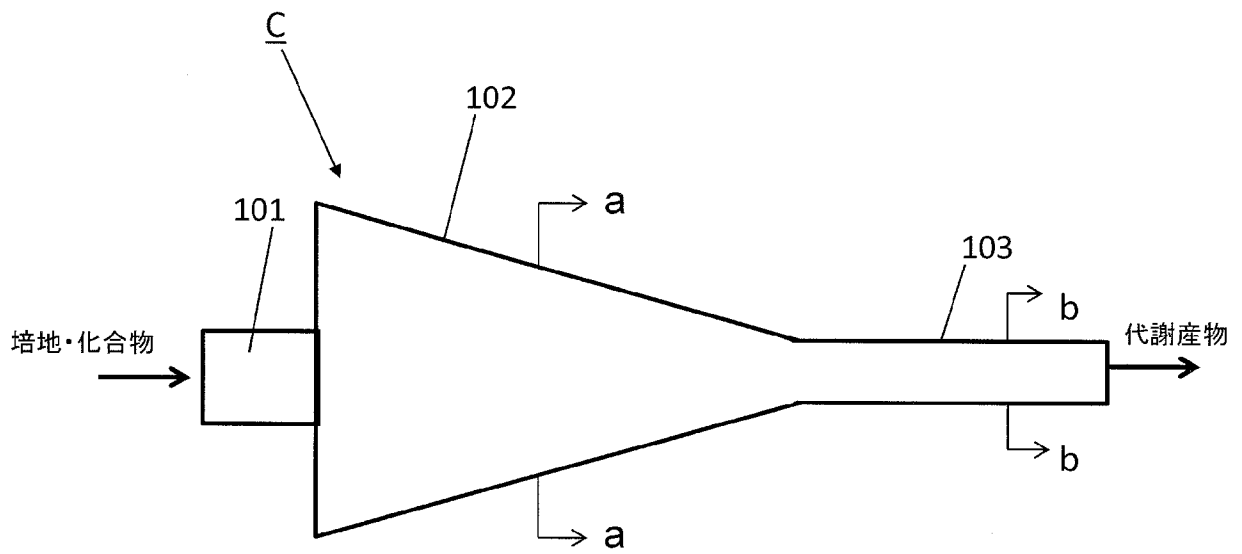
[図3A]



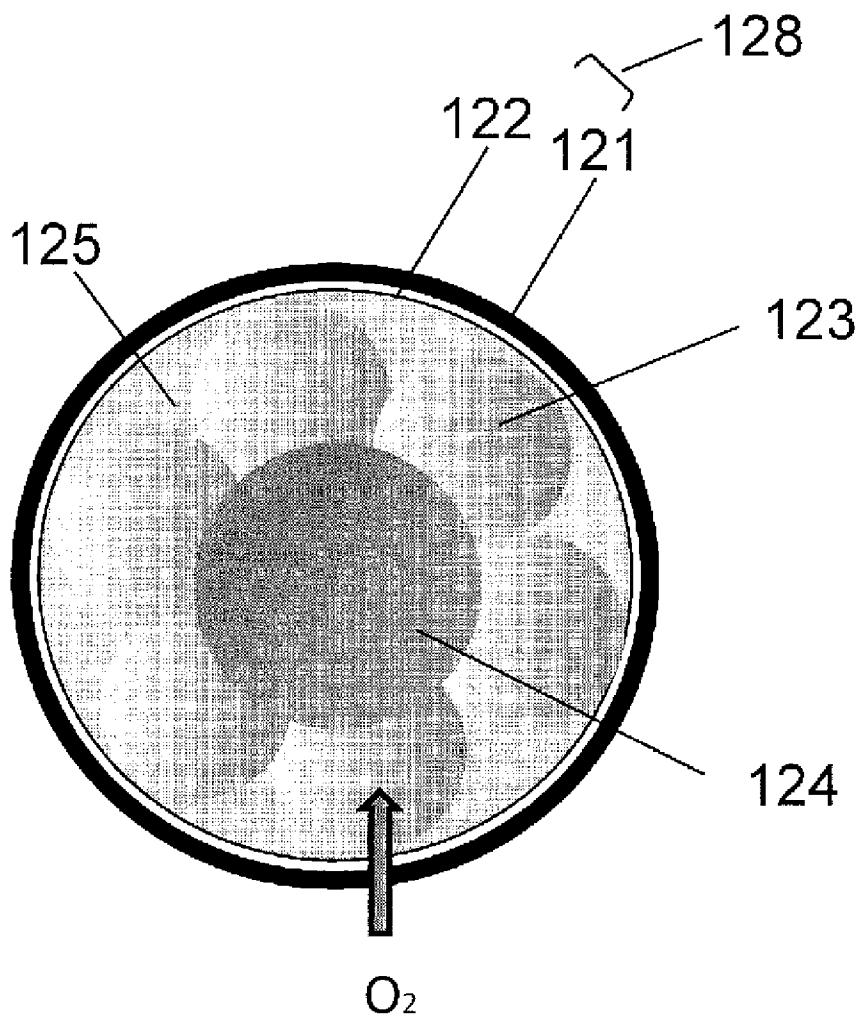
[図3B]



[図4A]

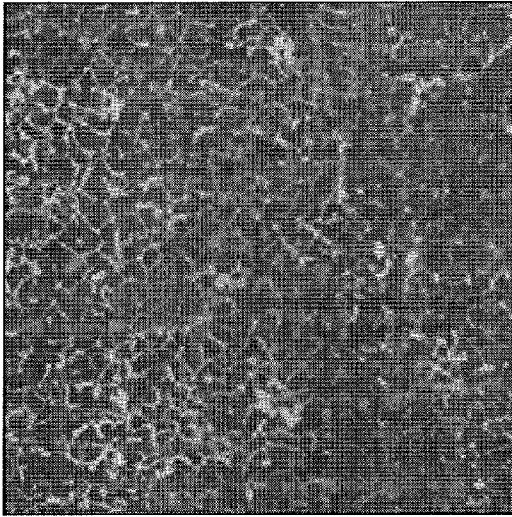


[図4B]

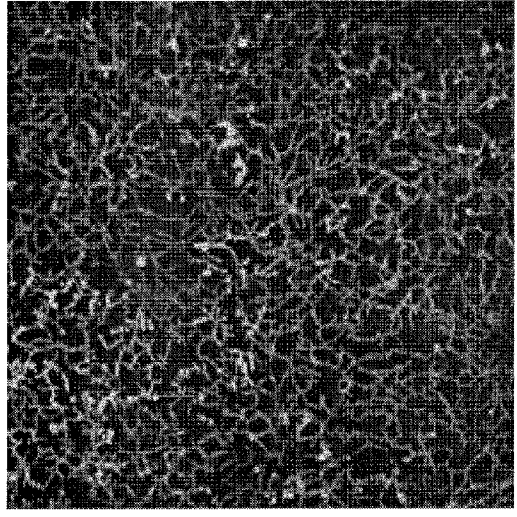


[図5]

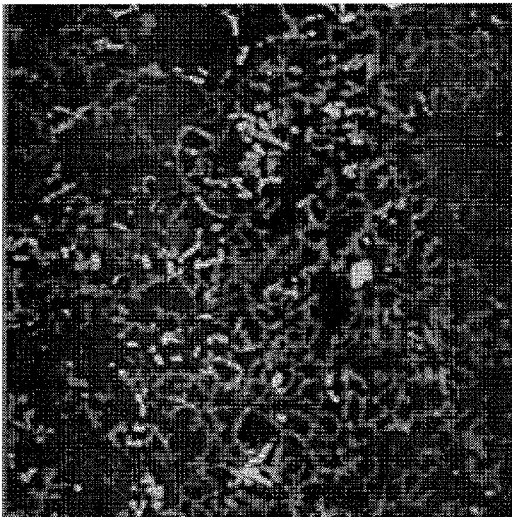
5日目



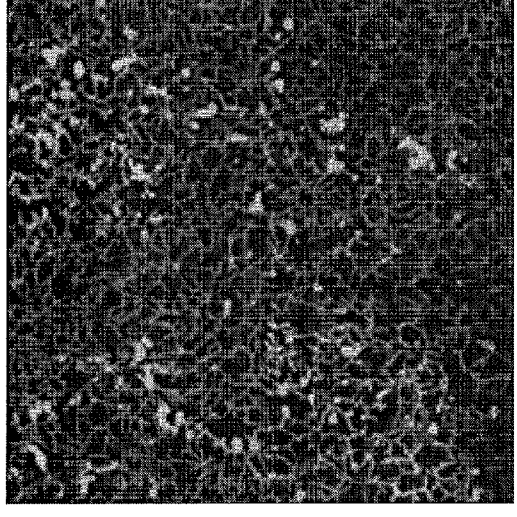
8日目



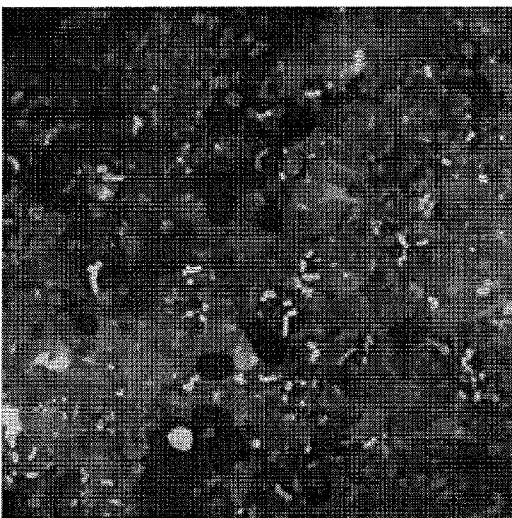
4日目



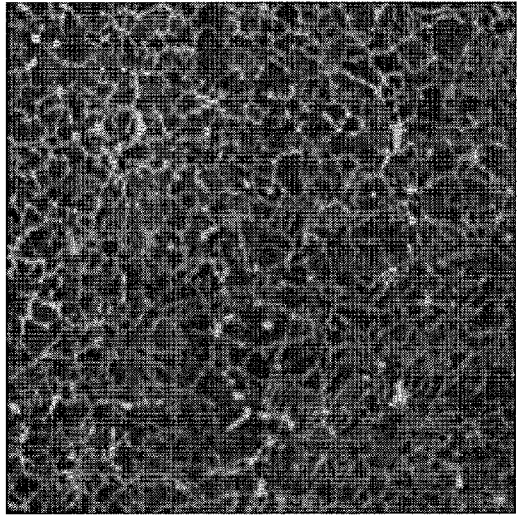
7日目



2日目

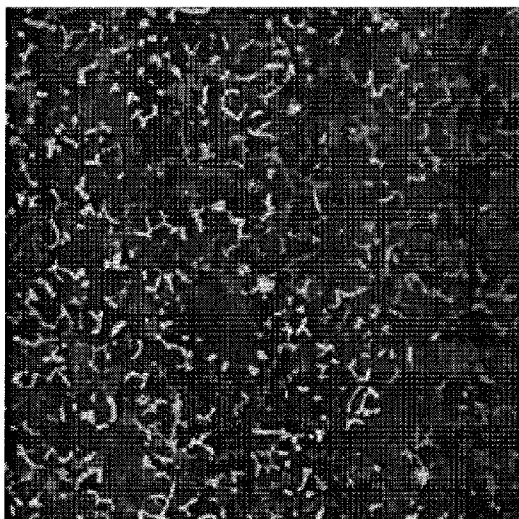


6日目

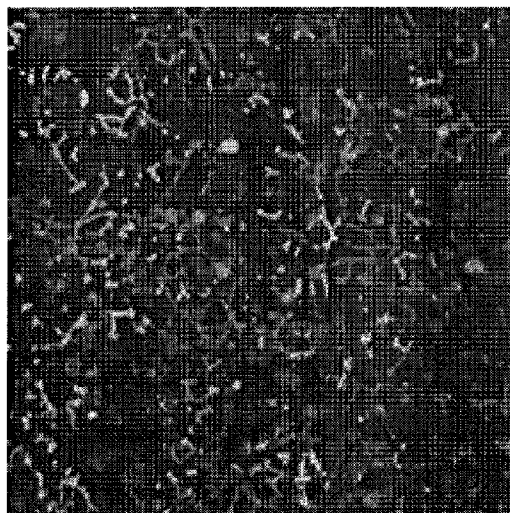


[図6]

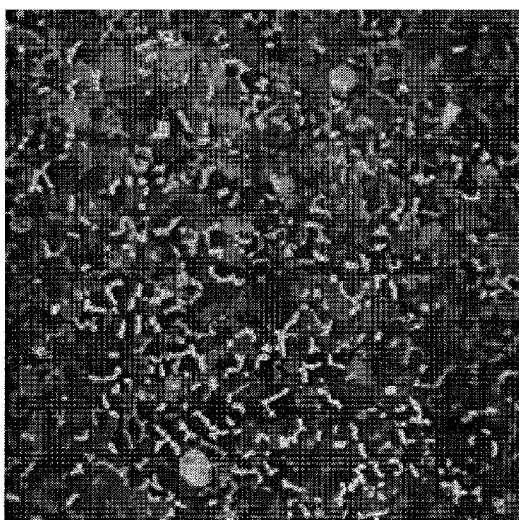
5日目



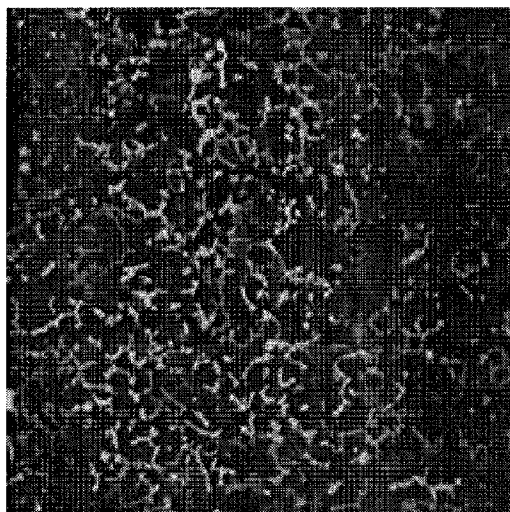
8日目



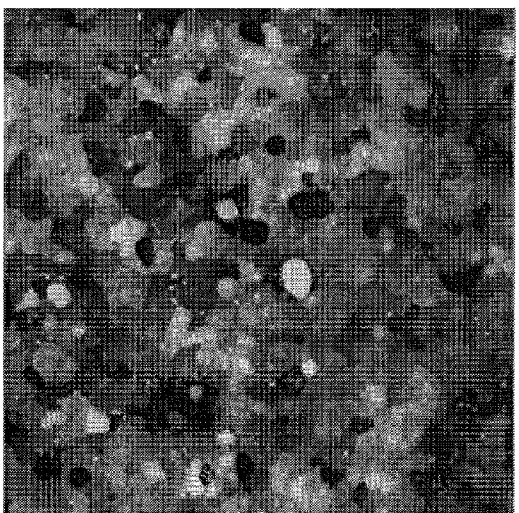
4日目



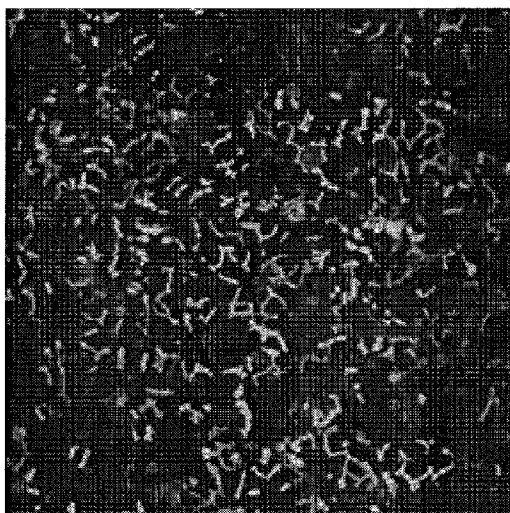
7日目



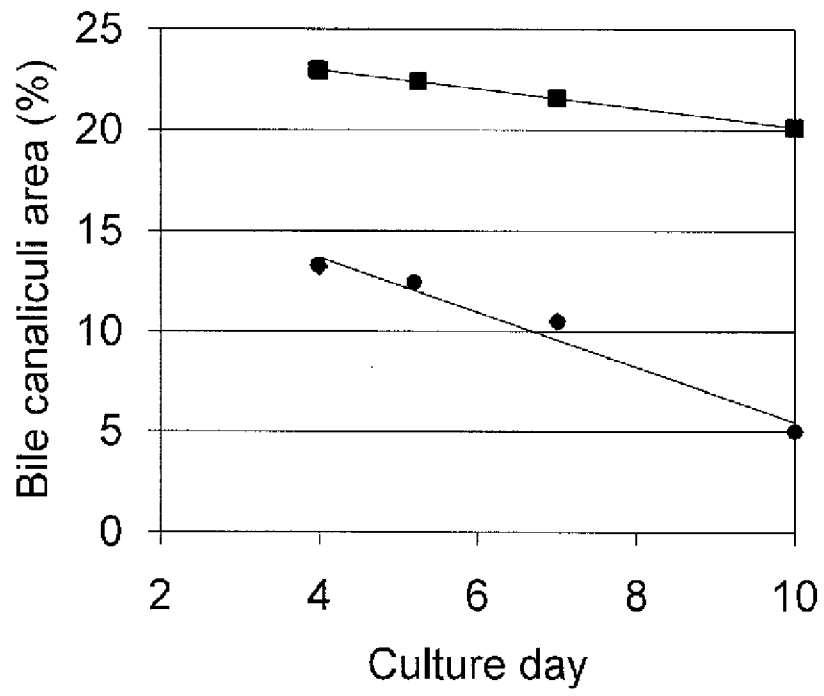
2日目



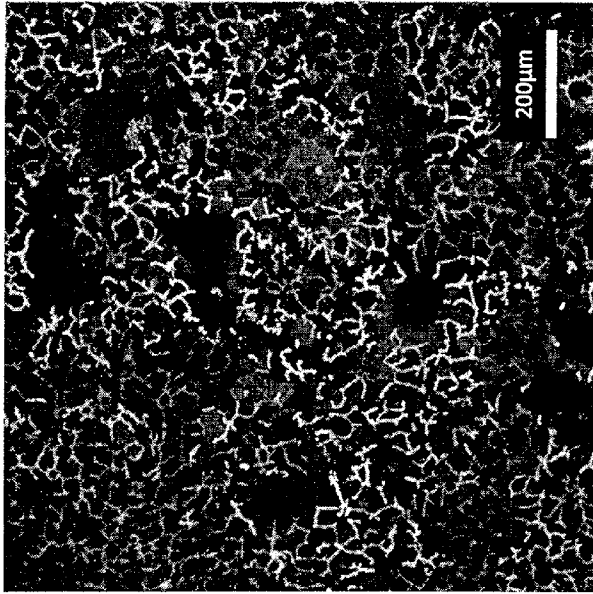
6日目



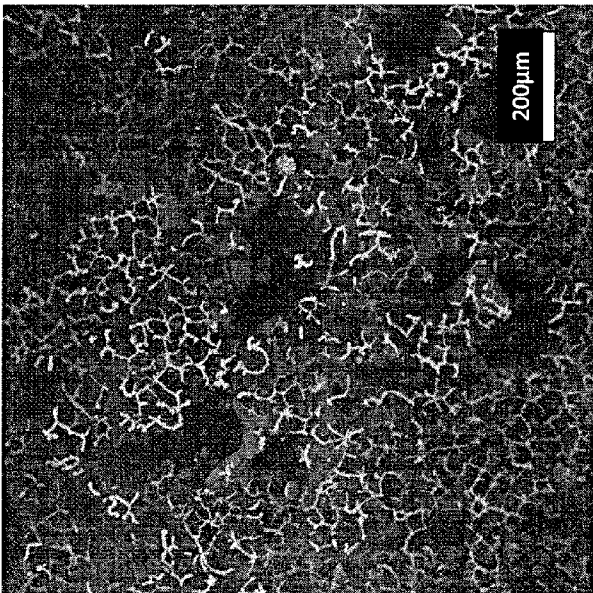
[図7]



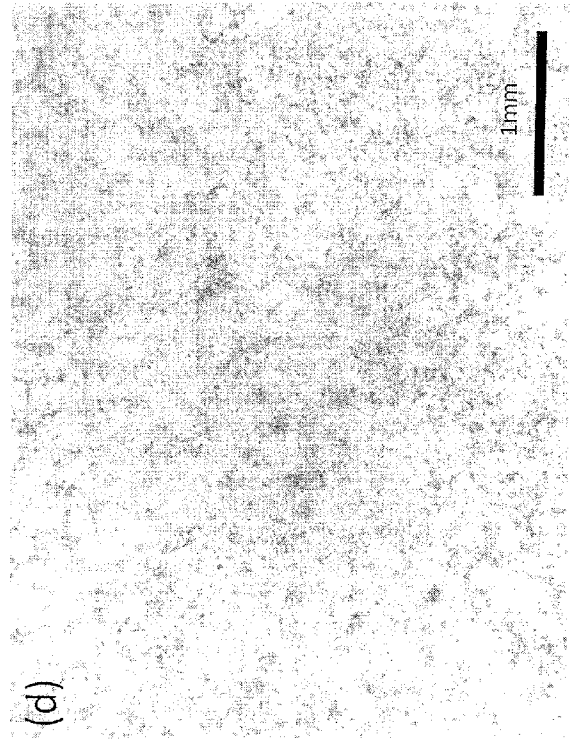
[図8]



(b)



(a)



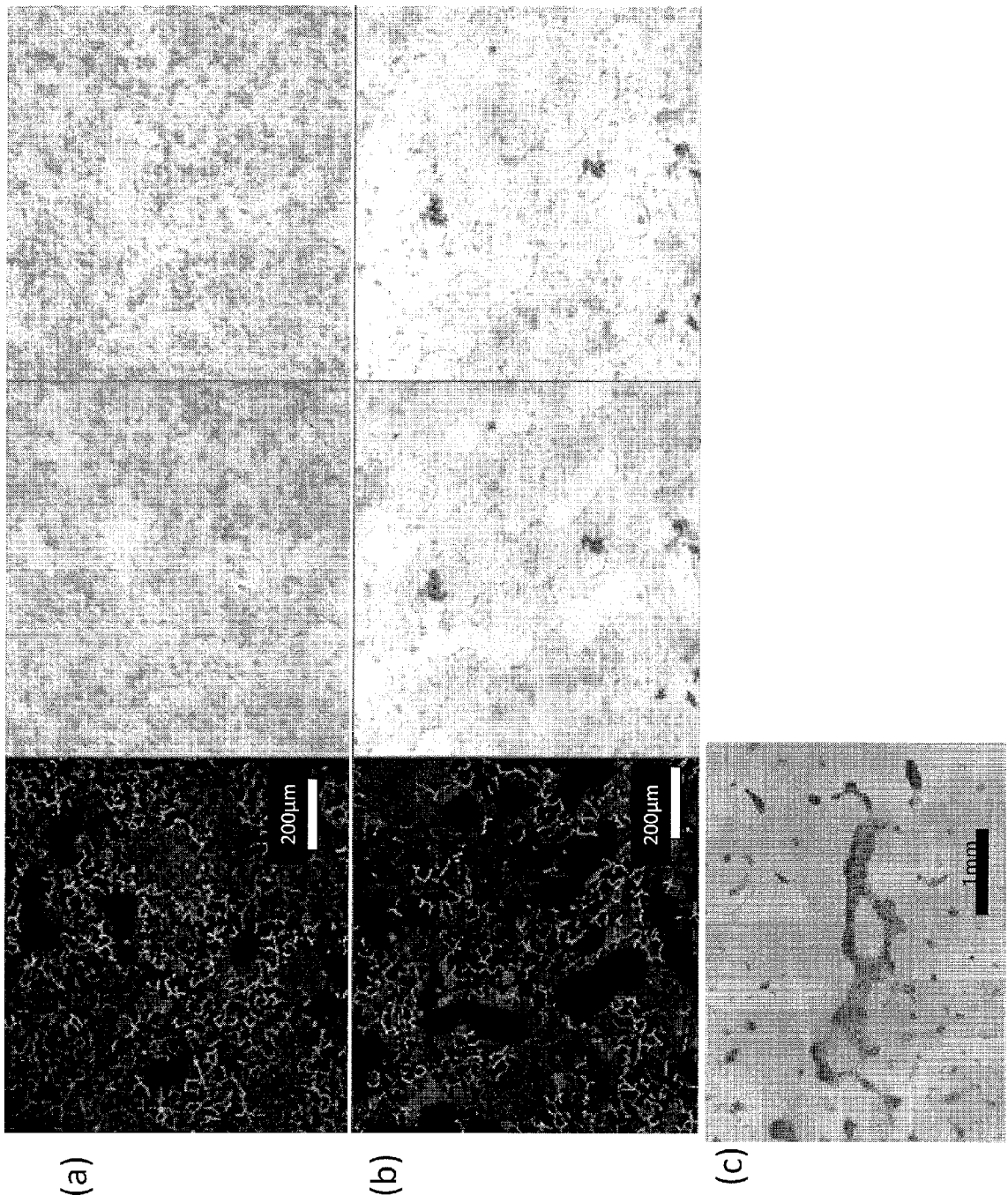
(d)



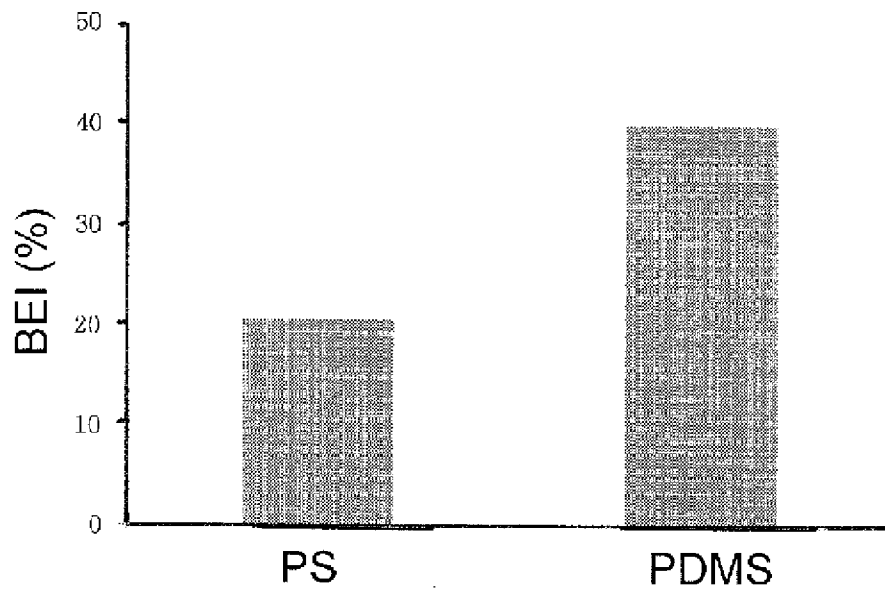
(c)

[図9]

毛細胆管像 明視野像 重ね合わせ

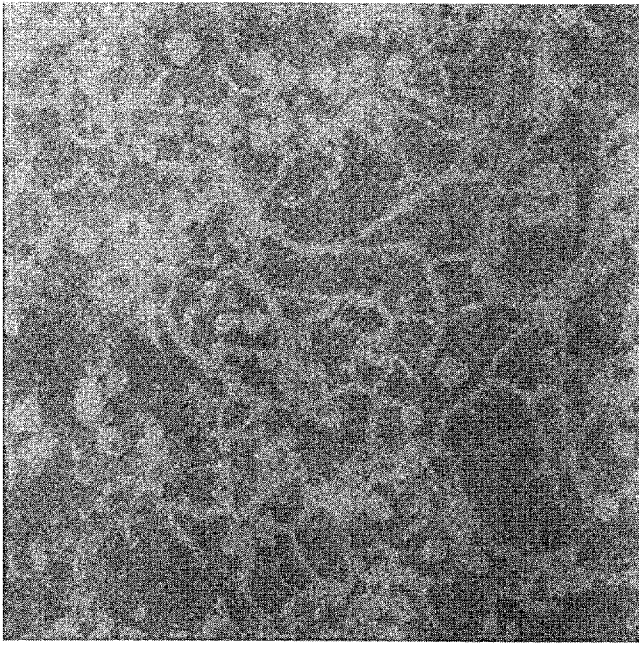


[図10]



[図11]

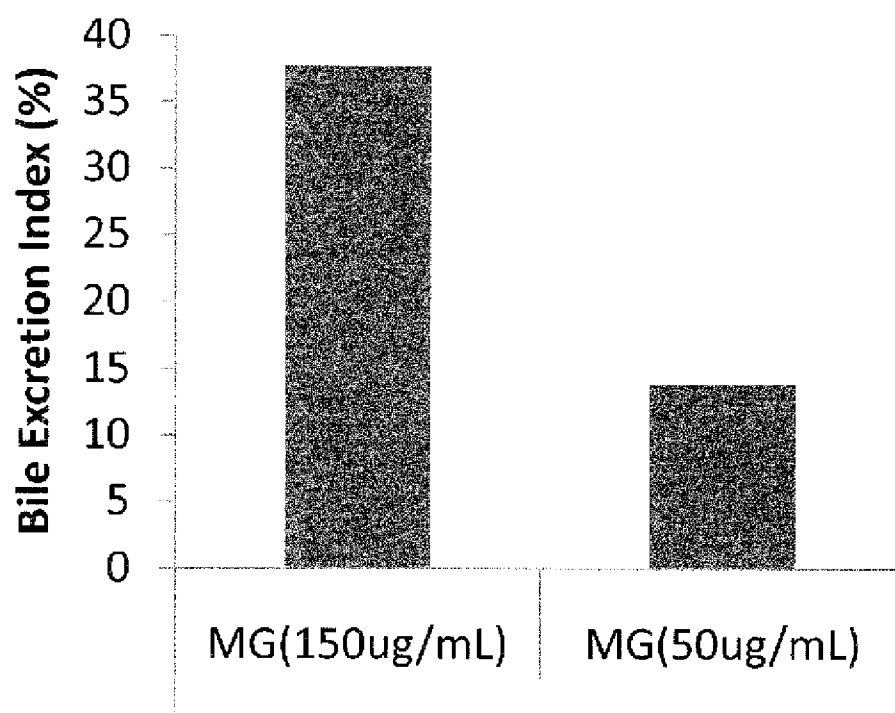
PDMS



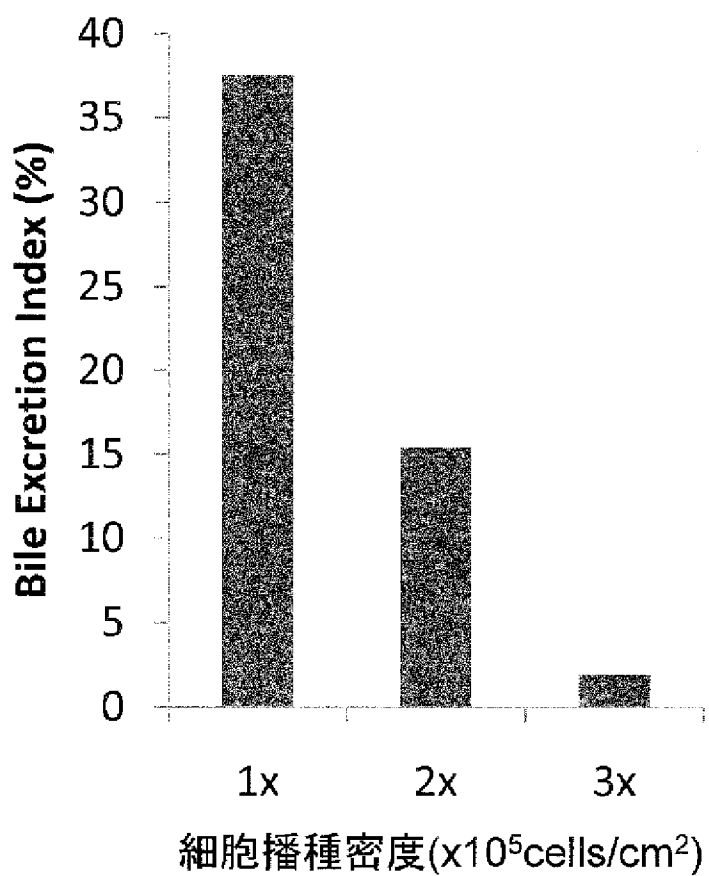
ポリスチレン



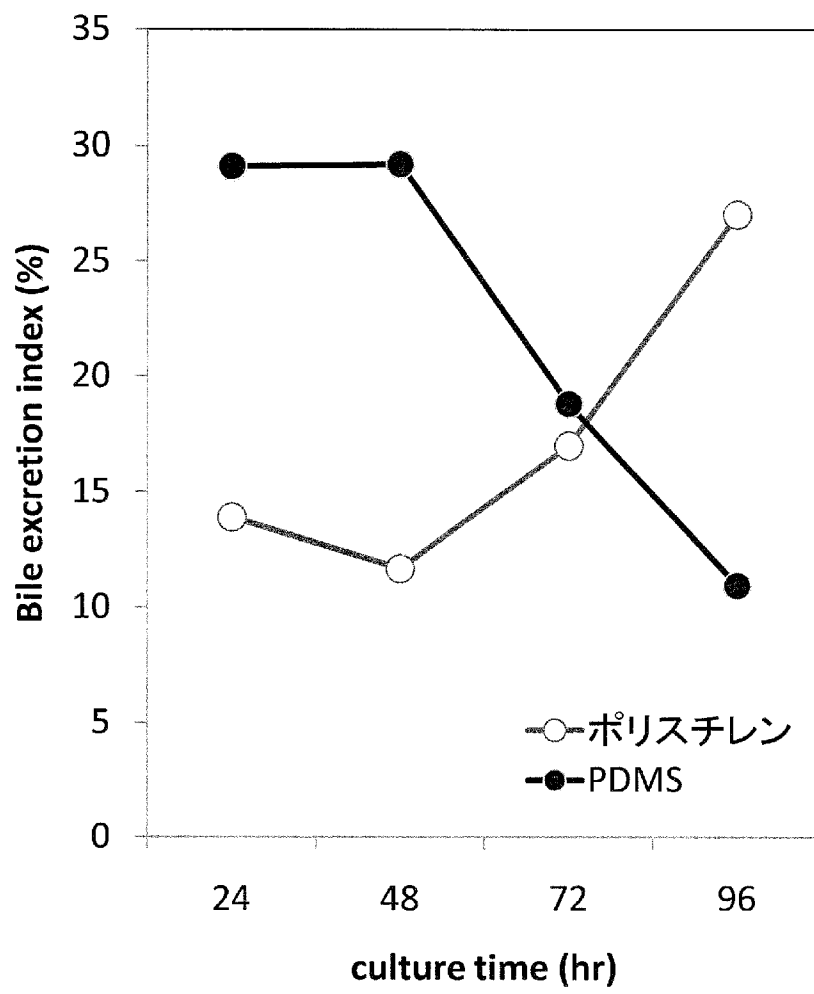
[図12]



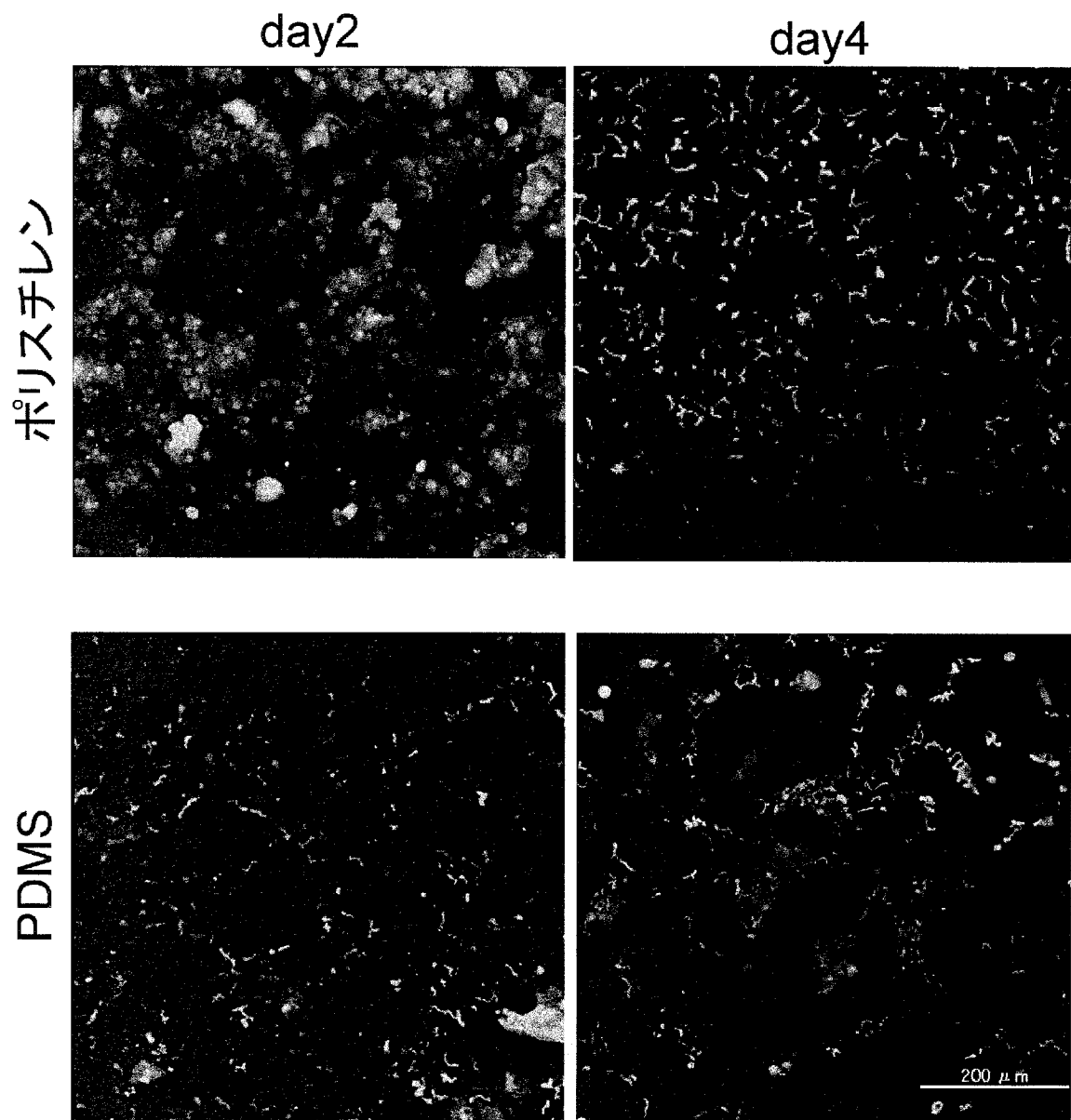
[図13]



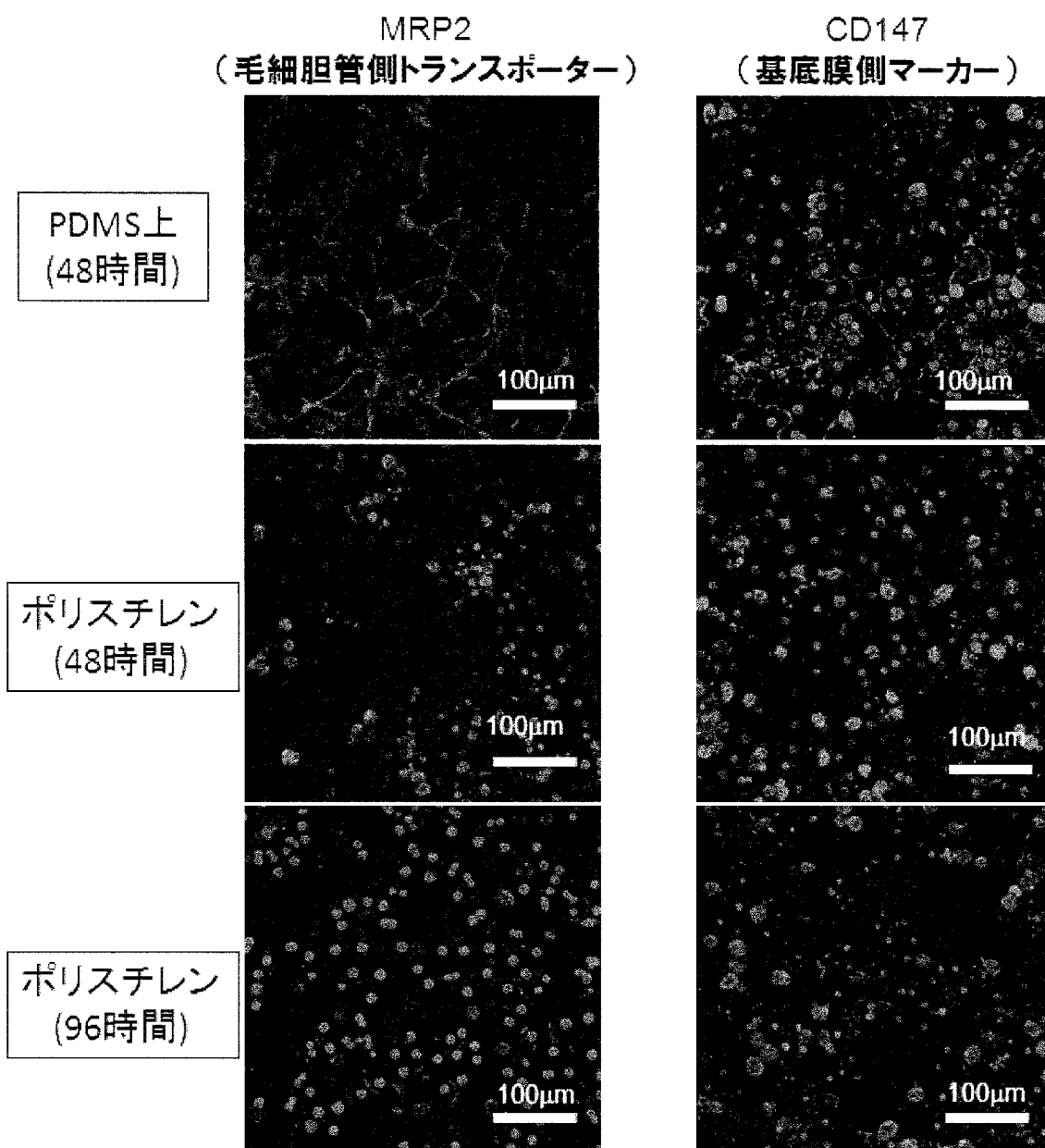
[図14A]



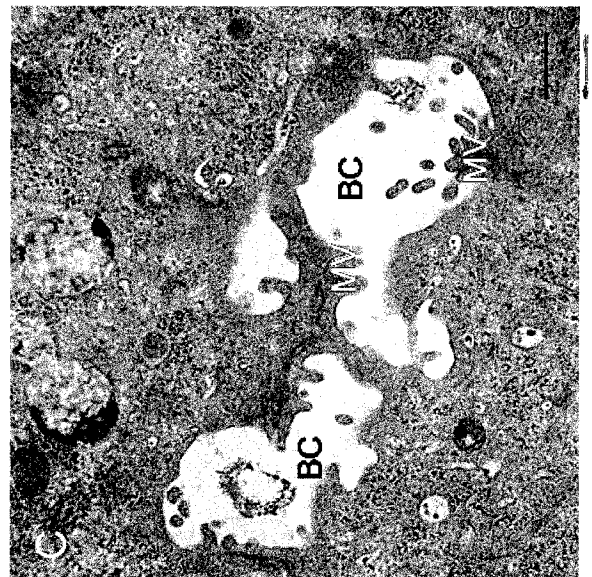
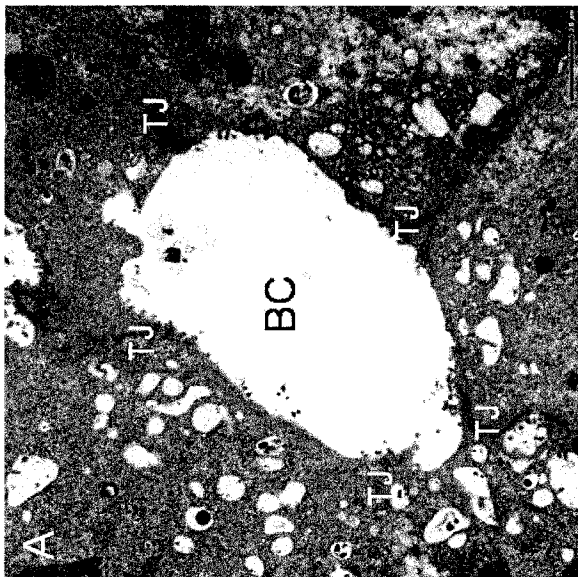
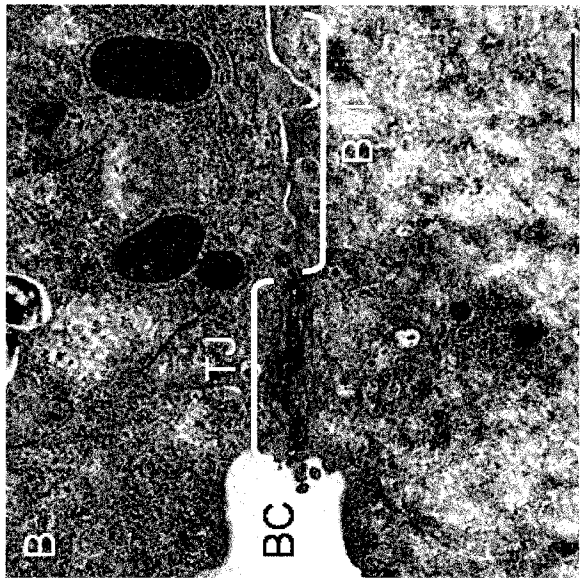
[図14B]



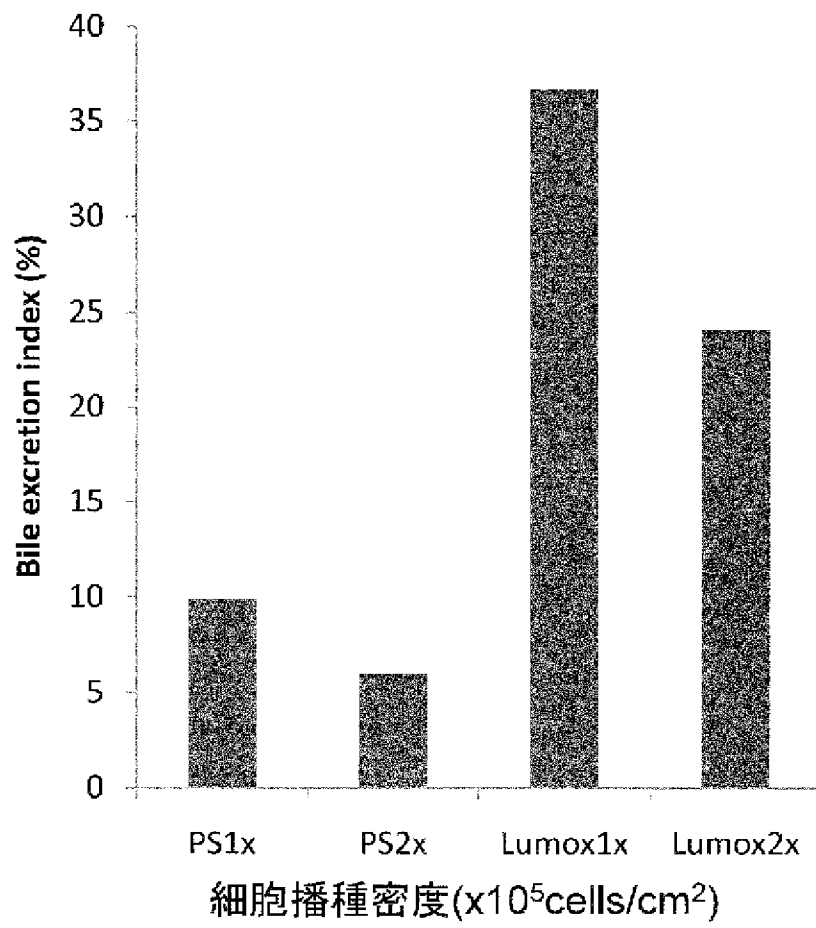
[図15]



[16]

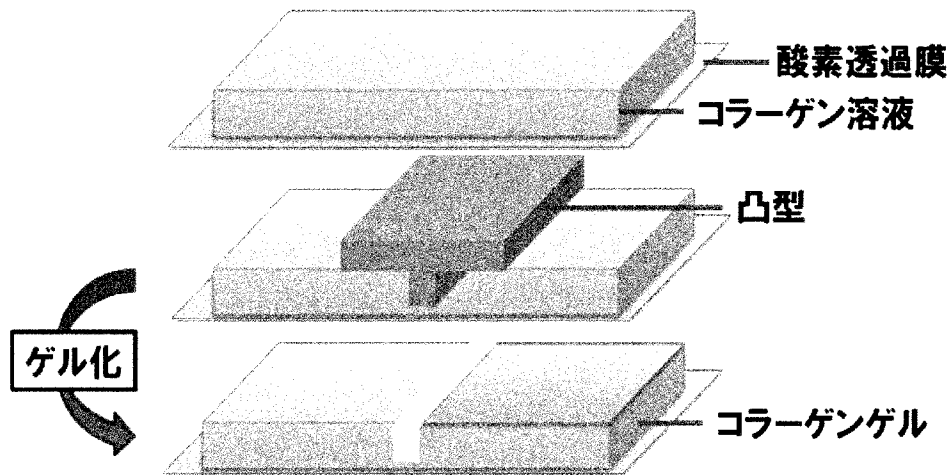


[図17]

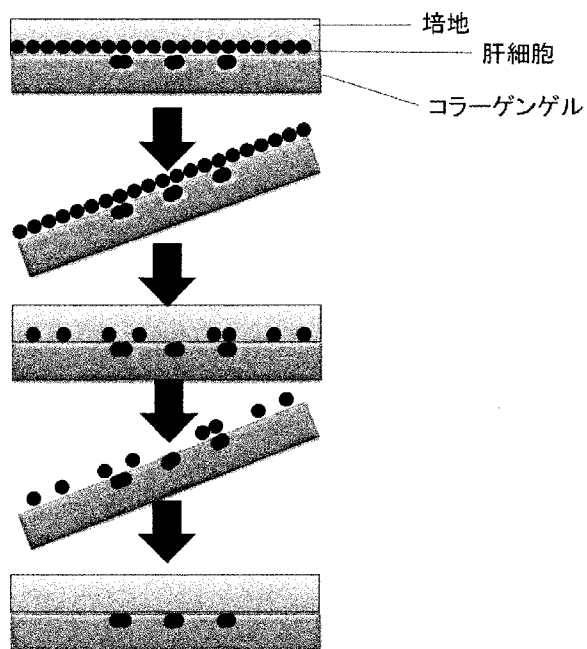


[図18]

(A)



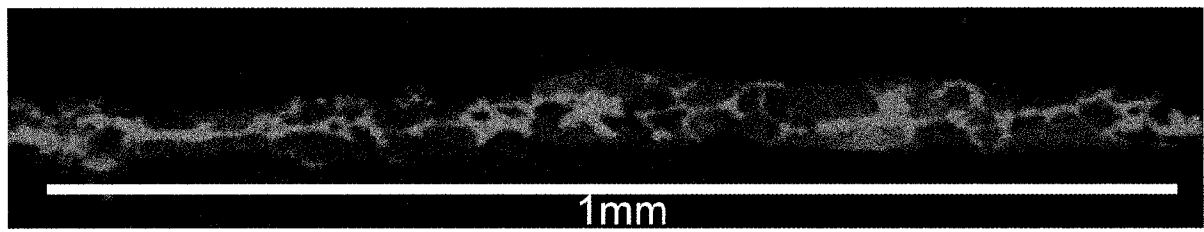
(B)



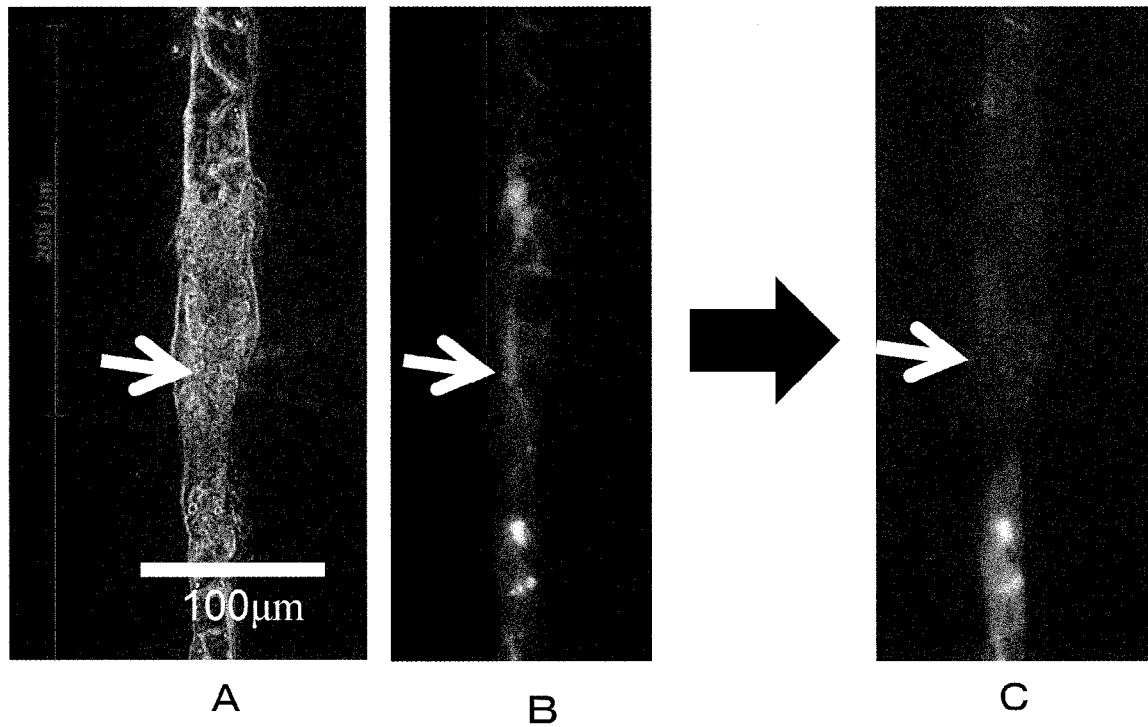
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062707

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/077(2010.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/02(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)

C12N5/077, C12M1/34, C12Q1/02

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masaki NISHIKAWA et al., "Development of highly functional hepatic tissue through mimicking spatio-temporal environment in the liver (<Featured Theme 2>Engineering and Biotechnology)", Monthly Journal of Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 2008.03, vol.60, no.2, pages 52 to 59, entire text	1-27
Y	LECLUYSE, E L. et al., Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration, American Journal of Physiology - Cell Physiology, Vol. 266, 1994, pp. C1764-C1774, MATERIALS AND METHODS, RESULTS	1-27

 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
18 August, 2010 (18.08.10)Date of mailing of the international search report
31 August, 2010 (31.08.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062707

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUI, H., et al., ENHANCED DEVELOPMENT OF A BILE CANALICULI NETWORK IN HEPATOCYTE SANDWICH CULTURE WITH DIRECT OXYGEN SUPPLY THROUGH POLYDIMETHYLSILOXANE MEMBRANES, 7th World Congress on alternatives and animal use in the life science(2009) Final Programme, 2009.08.04, P. 47, ID ABS: 165	1-27

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/077(2010.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/02(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. C12N5/077, C12M1/34, C12Q1/02

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	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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）
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii

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
Y	西川昌輝ら, 生体内環境の時空間的な模倣を通じた高機能肝組織の構築 (<特集>工学とバイオ), 生産研究, 2008.03, Vol. 60, No. 2, pp. 52-59, 全文	1-27
Y	LECLUYSE, E L. et al., Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration, American Journal of Physiology - Cell Physiology, Vol. 266, 1994, pp. C1764-C1774, MATERIALS AND METHODS, RESULTS	1-27

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
 18.08.2010

国際調査報告の発送日
 31.08.2010

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）
 太田 雄三
 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
A	MATSUI, H., et al., ENHANCED DEVELOPMENT OF A BILE CANALICULI NETWORK IN HEPATOCYTE SANDWICH CULTURE WITH DIRECT OXYGEN SUPPLY THROUGH POLYDIMETHYLSILOXANE MEMBRANES, 7th World Congress on alternatives and animal use in the life science(2009) Final Programme, 2009.08.04, P. 47, ID ABS: 165	1-27