(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
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/182307 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01)　*C12M 3/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/008513

(22) 国際出願日：　2021年3月4日(04.03.2021)

(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 2020-039862　2020年3月9日(09.03.2020)　JP

(71) 出願人:シャープ株式会社(**SHARP KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒5908522 大阪府堺市堺区匠町１番地 Osaka (JP). 地方独立行政法人鳥取県産業技術センター(**TOTTORI INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒6891112 鳥取県鳥取市若葉台南７丁目１－１ Tottori (JP).

(72) 発明者: 田口 登喜生 (**TAGUCHI Tokio**). 寺西 知子(**TERANISHI Tomoko**). 中松 健一郎(**NAKAMATSU Kenichiro**). 山根 侑(**YAMANE Yu**). 芝井 康博(**SHIBAI Yasuhiro**). 竹林 勲(**TAKEBAYASHI Isao**). 杉根 光晃(**SUGINE Mitsuaki**). 杉本 優子(**SUGIMOTO Yuko**).

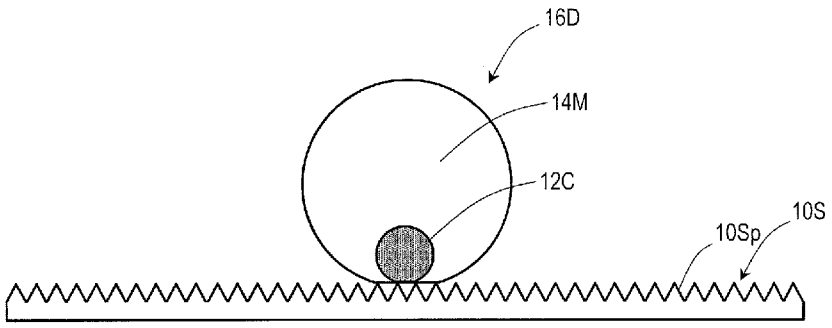
(74) 代理人: 奥田 誠司(**OKUDA Seiji**); 〒5410041 大阪府大阪市中央区北浜一丁目８番１６号 大阪証券取引所ビル１０階 奥田国際特許事務所 Osaka (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) **Title:** THREE-DIMENSIONAL CULTURE METHOD, THREE-DIMENSIONAL CULTURE STRUCTURE, AND PRODUCTION METHOD FOR THREE-DIMENSIONAL CULTURE STRUCTURE

(54) 発明の名称： 三次元培養法、三次元培養構造体、および三次元培養構造体の製造方法



(57) **Abstract:** This three-dimensional culture method comprises: a step for preparing a cell suspension that contains cells (12C) and a culture medium (14M); a step for preparing a solid surface (10S) formed from a porous alumina layer that has a plurality of first recesses; a step for adhering droplets (16D) of the cell suspension on the solid surface; and a step for culturing the cells in the droplets while in a state in which the solid surface faces the direction in which gravity acts on the droplets.

(57) 要約：三次元培養法は、細胞（１２Ｃ）と培地（１４Ｍ）とを含む細胞懸濁液を用意する工程と、複数の第１凹部を有するポーラスアルミナ層から形成された固体表面（１０Ｓ）を用意する工程と、固体表面上に、細胞懸濁液の液滴（１６Ｄ）を付着させる工程と、液滴に作用する重力の方向が固体表面に向かう状態で、細胞を液滴中で培養する工程とを包含する。

WO 2021/182307 A1

［続葉有］

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, 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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

三次元培養法、三次元培養構造体、および三次元培養構造体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、三次元細胞培養法（以下、「三次元培養法」という。）、三次元培養に用いられる構造体（容器を含む）、および三次元培養構造体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、創薬や再生医療に欠かせない技術として、三次元細胞培養法（以下、「三次元培養法」という。）が注目されている（例えば、特許文献１～４、非特許文献１～３）。

[0003] 三次元培養法は、in vitroで、細胞を三次元的に相互作用させながら、培養する方法であり、in vivoにおける細胞の性質を良く反映したスフェロイドを得ることができる。このように、三次元培養法によって得られたスフェロイドは、二次元培養法によって得られた細胞よりも、培養された細胞が由来する生体組織の性質や機能を、生体に近い態様で発現し得る。本明細書において、スフェロイドが有するこのような性質を「組織再現性」といい、細胞内の遺伝子発現により生成されたタンパク質が生体に近い形で生理的に機能するほど、組織再現性が高いという。

[0004] 三次元培養法として、微細な凹凸構造を有する表面を利用する培養法が、例えば、特許文献１～３および非特許文献１に記載されている。これらに記載の培養法は、底面に微細な凹凸構造を有する容器に、細胞と培地（ここでは、培養液、液体培地のことをいう。）とを含む細胞懸濁液を注ぎ、細胞の一部が液体中で容器の底面に接着した状態で培養される。以下、本明細書において、特許文献１～３および非特許文献１等に記載の培養方法を「微接着三次元培養法」という。

[0005] また、液滴内で細胞を培養するハンギングドロップ法が、例えば、特許文

献４、非特許文献２、３に記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００５－１６８４９４号公報

特許文献2：国際公開第２００７／０９７１２０号

特許文献3：国際公開第２０１７／１２６５８９号

特許文献4：国際公開第２００７／１１４３５１号

特許文献5：特許第４２６５７２９号公報

特許文献6：特開２００９－１６６５０２号公報

特許文献7：国際公開第２０１１／１２５４８６号

特許文献8：国際公開第２０１３／１８３５７６号

特許文献9：国際公開第２０１５／１６３０１８号

特許文献10：特開２０１０－２２６９７５号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Yoshii Y, Furukawa T, Aoyama H, Adachi N,Zhang MR, Wakizaka H, Fujibayashi Y, Saga T,"Regorafenib as a potential adjuvantchemotherapy agent in disseminated small colon cancer: Drug selection outcome of anovel screening system using nanoimprinting 3-dimensional culture with HCT116-RFP cells", Int. J. Oncol., 2016 Apr;48(4):1477-84.

非特許文献2：Singla DK and Sobel BE, Biochem Biophys Res Commun. 2005 335(3):637-42

非特許文献3：Foty, R., "A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids". JoVE., 51, 2720 (2011).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、本発明者の検討によると、上記の従来の三次元培養法は、作業性または量産性に改善の余地が残されている。また、組織再現性をさら

に向上させたスフェロイドを得ることができる三次元培養法の開発が望まれている。

[0009] 底面の微細な凹凸構造を利用する微接着三次元培養法においては、底面の微細な凹凸構造は、細胞の足場として作用する。底面の凹凸構造と細胞との相互作用が、細胞間の相互作用よりも強いと、細胞が厚さ方向に十分に増殖できず、面内方向の増殖が支配的となり、その結果、三次元的な組織構造を十分に再現できないことがある。また、微接着三次元培養法においては、細胞が面内方向にランダムに遊走する間に細胞同士の接触と接着を繰り返し、細胞分裂を伴いながらスフェロイドを形成するので、スフェロイドを構成する細胞の数にばらつきが大きく、スフェロイドの形状やサイズの再現性が低いという問題もある。

[0010] ハンギングドロップ法は、液滴中で培養を行うので、細胞数の制御が容易であり、スフェロイドの形状やサイズの再現性が高いという利点を有している。しかしながら、液滴中に細胞の足場となる表面がないので、足場依存性の高い細胞種においては生存性を維持できないことがある。また、ハンギングドロップ法は、液滴を付着させた表面を下に向ける（重力方向に向ける）ので、作業性が低いという問題もある。

[0011] また、上記のいずれかの三次元培養法によって得られるスフェロイドの組織再現性は、二次元培養法（平面培養法）によって得られたスフェロイドの組織再現性よりも高いものの、一層の向上が求められている。

[0012] そこで、本発明の実施形態は、従来の三次元培養法よりも、作業性または量産性に優れた、および／または、組織再現性の高いスフェロイドを得ることができる三次元培養法を提供することを目的とする。また、本発明の他の実施形態は、そのような三次元培養法に好適に用いられる三次元培養構造体および／または三次元培養構造体の製造方法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

[0013] 本発明の実施形態によると、以下の項目に記載の解決手段が提供される。

［項目１］

細胞と培地とを含む細胞懸濁液を用意する工程と、

複数の第１凹部を有するポーラスアルミナ層から形成された固体表面を用意する工程と、

前記固体表面上に、前記細胞懸濁液の液滴を付着させる工程と、

前記液滴に作用する重力の方向が前記固体表面に向かう状態で、前記細胞を前記液滴中で培養する工程と

を包含する、三次元培養法。

［項目２］

前記ポーラスアルミナ層の表面は、前記複数の第１凹部と、隣接する前記複数の第１凹部の側面が交わることにより形成された第１稜線と、それぞれが前記複数の第１凹部のいずれかの中に形成された複数のミクロな凹部とを有する、項目１に記載の三次元培養法。

［項目３］

前記ポーラスアルミナ層を形成する工程は、

透明基材上のアルミニウム膜を部分的に陽極酸化することによって、予備ポーラスアルミナ層を形成する工程（ａ）と、

前記工程（ａ）の後に、前記予備ポーラスアルミナ層をエッチング液に接触させることによって、前記予備ポーラスアルミナ層を実質的に完全に除去する工程（ｂ）と、

前記工程（ｂ）の後に、前記アルミニウム膜のうち陽極酸化されずに残ったアルミニウム残存層を陽極酸化する工程（ｃ）と

を包含し、

前記アルミニウム残存層の表面は、複数の第２凹部と、隣接する前記複数の第２凹部の側面が交わることにより形成された第２稜線とを有し、

前記複数の第１凹部は、前記複数の第２凹部が反映されたものであり、前記第１稜線は、前記第２稜線が反映されたものであり、

前記工程（ｃ）は、前記アルミニウム残存層を陽極酸化することによって、前記複数のミクロな凹部を形成する工程を包含する、項目２に記載の三次

元培養法。

［項目４］

前記工程（ｃ）で行われる陽極酸化工程は、前記工程（ａ）で行われる陽極酸化工程と同じ電解液を用いて行われる、項目３に記載の三次元培養法。

［項目５］

前記ポーラスアルミナ層を形成する工程は、

前記工程（ｃ）の後に、前記ポーラスアルミナ層をエッチング液に接触させることによって、前記複数のミクロな凹部を拡大させる工程（ｄ）をさらに包含する、項目３または４に記載の三次元培養法。

［項目６］

前記工程（ｄ）で用いられるエッチング液は、前記工程（ｂ）で用いられるエッチング液と同じである、項目５に記載の三次元培養法。

［項目７］

前記工程（ｃ）は、前記残ったアルミニウム膜を実質的に完全に陽極酸化する工程を包含する、項目３から６のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目８］

波長５５０ｎｍにおける前記ポーラスアルミナ層の透過率は、４０％以上である、項目１から７のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目９］

前記固体表面は、フッ素系離型剤で離型処理されている、項目１から８のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目１０］

前記フッ素系離型剤は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素化合物を含む、項目９に記載の三次元培養法。

［項目１１］

前記フッ素系離型剤は、パーフルオロアルキル基（－（CF_2）$_p$－基、ｐは０以上２以下の整数）を有するフッ素化合物を含む、項目９に記載の三次元培養法。

［項目１２］

前記固体表面の水に対する接触角が１０８°以上１２８°以下である、項目１から１１のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目１３］

前記固体表面のヘキサデカンに対する接触角が５７°以上８５°以下である、項目１から１２のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目１４］

項目１から１３のいずれかに記載の三次元培養法に用いられる固体表面を有する、三次元培養構造体。

［項目１５］

前記固体表面を有する三次元培養構造体を用意し、項目１から１３のいずれかに記載の三次元培養法を用いて培養されたスフェロイドを前記固体表面に有する三次元培養構造体を製造する方法。

本発明の他の実施形態によると、以下の項目に記載の解決手段も提供される。

［項目１６］

細胞と培地とを含む細胞懸濁液を用意する工程と、高さが１０ｎｍ以上１ｍｍ以下の複数の凸部を有する固体表面を用意する工程と、前記固体表面上に、前記細胞懸濁液の液滴を付着させる工程と、前記液滴に作用する重力の方向が前記固体表面に向かう状態で、前記細胞を前記液滴中で培養する工程とを包含する、三次元培養法。

［項目１７］

前記固体表面の法線方向から見たとき、前記複数の凸部の２次元的な大きさは１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲内にある、項目１６に記載の三次元培養法。

［項目１８］

前記複数の凸部の高さは、１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下である、項目１６または１７に記載の三次元培養法。

［項目１９］

前記複数の凸部の隣接間距離は、１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下である、項目１６から１８のいずれかに記載の三次元培養法。前記複数の凸部の隣接間距離は、５００ｎｍ以下であってもよい。

［項目２０］

前記複数の凸部は略円錐形の先端部分を有する、項目１６から１９のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目２１］

前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１７°以上である、項目１６から２０のいずれかに記載の三次元培養法。なお、少なくとも着滴から１０秒後において前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１７°以上であればよい。

［項目２２］

前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が９０°以上である、項目１６から２１のいずれかに記載の三次元培養法。なお、少なくとも着滴から１０秒後において前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が９０°以上であればよい。

［項目２３］

前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する滑落角は４５°以上である、項目１６から２２のいずれかに記載の三次元培養法。滑落角は着滴から２０秒後の値で評価すればよい。

［項目２４］

前記固体表面は、合成高分子から形成されている、項目１６から２３のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目２５］

前記液滴の体積は１０μＬ以上５０μＬ以下である、項目１６から２４のいずれかに記載の三次元培養法。

適当な形状の液滴の形成および操作性等の観点から、上記の範囲が好まし

い。

［項目２６］

前記液滴に含まれる前記細胞の播種密度は１０^{3}細胞／ｍＬ以上１０^{7}細胞／ｍＬ以下である、項目１６から２５のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目２７］

前記液滴の高さは１ｍｍ以上である、項目１６から２６のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目２８］

前記細胞を前記液滴中で培養している間に、前記液滴に前記培地を付与する工程をさらに包含する、項目１６から２７のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目２９］

前記培地を付与する前に、前記液滴から前記培地の一部を吸い取る工程をさらに包含する、項目２８に記載の三次元培養法。

［項目３０］

項目１６から２９のいずれかに記載の三次元培養法に用いられる固体表面を有する、三次元培養構造体。

三次元培養構造体は、容器の一部として提供される。

［項目３１］

前記固体表面を有する三次元培養構造体を用意し、項目１６から２９のいずれかに記載の三次元培養法を用いて培養されたスフェロイドを前記固体表面に有する三次元培養構造体を製造する方法。

項目１６から２９のいずれかに記載の三次元培養法を用いて培養されたスフェロイドは三次元培養構造体（例えば容器）とともに提供され得る。

発明の効果

[0014] 本発明の実施形態によると、従来の三次元培養法よりも、作業性または量産性に優れた、および／または、組織再現性の高いスフェロイドを得ることができる三次元培養法が提供される。また、本発明の他の実施形態によると

、そのような三次元培養法に好適に用いられる三次元培養構造体が提供される。本発明のさらに他の実施形態によると、従来よりも組織再現性の高いスフェロイドを表面に有する三次元培養構造体（例えば容器）が提供される。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]本発明の実施形態による三次元培養法における培養状態を模式的に示す図である。

[図2A]本発明の実施形態による三次元培養法に用いられるモスアイ構造を表面に有する合成高分子膜３４Ａの模式的な断面図である。

[図2B]本発明の実施形態による三次元培養法に用いられるモスアイ構造を表面に有する合成高分子膜３４Ｂの模式的な断面図である。

[図3A]ヒト肝がん由来細胞株ＨｅｐＧ２をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）である。

[図3B]ドロップ培養法で得られたＨｅｐＧ２のスフェロイドを電子顕微鏡の上面像（左）と、側面像（右）である。

[図3C]ドロップ培養中の肝がん細胞株ＨｅｐＧ２の細胞生存数を求めた結果を示すグラフである。

[図3D]ドロップ培養法で得られた肝がん細胞ＨｅｐＧ２スフェロイドのＣＹＰ活性を評価した結果を示すグラフである。

[図4A]ヒト胎児腎臓上皮細胞ＨＥＫ２９３をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）である。

[図4B]マウス脂肪前駆細胞３Ｔ３－Ｌ１をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）である。

[図4C]マウス間葉系幹細胞Ｃ３Ｈ１０ｔ１／２をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）である。

[図4D]マウス筋芽細胞Ｃ２Ｃ１２をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）である。

[図5A]ドロップ培養法で得られたスフェロイド（レベル１）の光学顕微鏡像である。

[図5B]ドロップ培養法で得られたスフェロイド（レベル２）の光学顕微鏡像である。

[図5C]ドロップ培養法で得られたスフェロイド（レベル３）の光学顕微鏡像である。

[図5D]ドロップ培養法で得られたスフェロイド（レベル４）の光学顕微鏡像である。

[図5E]ドロップ培養法で得られたスフェロイド（レベル５）の光学顕微鏡像である。

[図6A]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な断面図である。

[図6B]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な断面図である。

[図6C]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な断面図である。

[図6D]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な断面図である。

[図6E]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な断面図である。

[図7A]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な平面図である。

[図7B]ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明するための模式的な平面図である。

[図8A]試料サンプルＮｏ．１０１のＳＥＭ像である。

[図8B]試料サンプルＮｏ．１０２のＳＥＭ像である。

[図8C]試料サンプルＮｏ．１０３のＳＥＭ像である。

[図8D]試料サンプルＮｏ．１０４のＳＥＭ像である。

[図8E]試料サンプルＮｏ．１０５のＳＥＭ像である。

[図9]ドロップ培養法で得られたスフェロイドの光学顕微鏡像（左上：試料サ

ンプルＮｏ．１０１、右上：試料サンプルＮｏ．１０２、左下：試料サンプルＮｏ．１０３、右下：試料サンプルＮｏ．１０４）である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明の実施形態による三次元培養法、三次元培養構造体、および三次元培養構造体の製造方法を説明する。

[0017] 本発明の実施形態による三次元培養法は、図１に模式的に示す様に、固体表面１０Ｓ上に、細胞１２Ｃと培地１４Ｍとを含む細胞懸濁液の液滴１６Ｄを付着させ、液滴１６Ｄに作用する重力の方向が固体表面１０Ｓに向かう状態で、細胞１２Ｃを液滴１６Ｄ中で培養する方法である。この三次元培養法（以下、「ドロップ培養法」という。）では、液滴１６Ｄ中で細胞１２Ｃを培養するので、ハンギングドロップ法と同様に、細胞数の制御が容易であり、スフェロイドの形状やサイズの再現性が高いという利点が得られる。さらに、液滴１６Ｄに作用する重力の方向が固体表面１０Ｓに向かう状態で培養が行われるので、固体表面１０Ｓが足場として作用するので、足場依存性の高い細胞種であっても、比較的高い生存性を維持できる。また、液滴１６Ｄを付着させた表面１０Ｓを下に向ける（重力方向に向ける）必要がないので、ハンギングドロップ法よりも作業性が高い。固体表面１０Ｓは足場として作用し得る複数の凸部１０Ｓｐを有する。

[0018] 液滴１６Ｄは、固体表面１０Ｓと接触する部分以外は雰囲気ガス（例えば空気）と接触しており、閉じられた培養空間を形成する。なお、図１では、液滴１６Ｄの底面が凸部１０Ｓｐの先端に接触し、液滴１６Ｄは凸部１０Ｓｐの先端よりも上側にのみ存在しているように図示しているが、液滴１６Ｄの底部の一部が隣接する凸部１０Ｓｐの間に浸入していてもよい。液滴１６Ｄの体積は、例えば１０μＬ以上５０μＬ以下である。

[0019] 安定した液滴１６Ｄを形成し、かつ、効率よく細胞を培養できる固体表面１０Ｓは、後に実験結果を示す様に、高さが１０ｎｍ以上１ｍｍ以下の複数の凸部１０Ｓｐを有する固体表面である。高さが１０ｎｍ以上１ｍｍ以下の複数の凸部を有する固体表面を利用することによって、三次元培養できるこ

とは、例えば特許文献１（特許第４５０７８４５号として登録）にも記載されている。しかしながら、上述した様に、底面の微細な凹凸構造を利用する微接着三次元培養法では、三次元的な組織構造を十分に再現できない、あるいは、スフェロイドの形状やサイズの再現性が低いという問題がある。

[0020] ドロップ培養法では、液滴１６Ｄ中の細胞を培養するので、微接着三次元培養法の上記の欠点を解消することができる。細胞１２Ｃは、三次元的に閉ざされた液滴１６Ｄの中で、重力の作用を受けて、固体表面１０Ｓと接触する底面上に堆積するように集まる。したがって、固体表面１０Ｓの複数の凸部１０Ｓｐと相互作用する細胞が一定量存在するとともに、その上に細胞同士間だけで相互作用する細胞が存在する。その結果、微接着三次元培養とは異なり、厚さ方向にも適度に増殖し、三次元的な組織構造の再現性が高いスフェロイドが得られると考えられる。

[0021] 以下では、モスアイ構造を有する固体表面１０Ｓを用いた実験例を示して、本発明の実施形態による三次元培養法（ドロップ培養法）を説明する。本出願人の内の一方が、反射防止膜または殺菌性を有する合成高分子膜として開発してきた、モスアイ構造を有する固体表面は、ドロップ培養法に好適に用いられる。参考のために、特許文献５～８（反射防止膜）、特許文献９（殺菌性を有する合成高分子膜）の開示内容を本明細書に援用する。

[0022] 特許文献５～９に記載されているように、陽極酸化ポーラスアルミナ層を利用すると、高い量産性で、モスアイ構造を表面に有する合成高分子膜（例えば、光硬化性樹脂を硬化させることによって形成された光硬化樹脂膜や、熱硬化性樹脂を硬化させることによって形成された熱硬化樹脂膜等）を製造することができる。以下に示す実験例は、上述の方法で形成されたモスアイ構造を表面に有する光硬化樹脂膜を用いた例であり、上記の項目２～９に記載の特徴を備えている。ただし、特許文献１に記載されているように、複数の凸部の大きさ、高さや、隣接凸部間の距離（規則的に配列されている場合はピッチ）は、これらに限られないと考えられる。なお、モスアイ構造を形成する材料は、有機材料、無機材料のいずれであってもよい。

[0023] 図２Ａおよび図２Ｂを参照して、ドロップ培養法に用いられるモスアイ構造を表面に有する合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの構造を説明する。合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂは、本発明の実施形態による三次元培養構造の例である。

[0024] 図２Ａおよび図２Ｂは、合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの模式的な断面図をそれぞれ示す。ここで例示する合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂは、いずれもベースフィルム４２Ａおよび４２Ｂ上にそれぞれ形成されているが、もちろんこれに限られない。合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂは、任意の物体の表面に直接形成され得る。

[0025] 図２Ａに示すフィルム５０Ａは、ベースフィルム４２Ａと、ベースフィルム４２Ａ上に形成された合成高分子膜３４Ａとを有している。合成高分子膜３４Ａは、表面に複数の凸部３４Ａｐを有しており、複数の凸部３４Ａｐは、モスアイ構造を構成している。合成高分子膜３４Ａの法線方向から見たとき、凸部３４Ａｐの２次元的な大きさD_pは１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲内にある。ここで、凸部３４Ａｐの「２次元的な大きさ」とは、表面の法線から見たときの凸部３４Ａｐの面積円相当径を指す。例えば、凸部３４Ａｐが円錐形の場合、凸部３４Ａｐの２次元的な大きさは、円錐の底面の直径に相当する。また、凸部３４Ａｐの典型的な隣接間距離D_{int}は１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下である。図２Ａに例示するように、凸部３４Ａｐが密に配列されており、隣接する凸部３４Ａｐ間に間隙が存在しない（例えば、円錐の底面が部分的に重なる）場合には、凸部３４Ａｐの２次元的な大きさD_pは隣接間距離D_{int}と等しい。凸部３４Ａｐの典型的な高さD_hは、１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下である。合成高分子膜３４Ａの厚さt_sに特に制限はなく、凸部３４Ａｐの高さD_hより大きければよい。

[0026] 図２Ａに示した合成高分子膜３４Ａは、特許文献５～８に記載されている反射防止膜と同様のモスアイ構造を有している。反射防止機能を発現させるためには、表面に平坦な部分がなく、凸部３４Ａｐが密に配列されていることが好ましい。また、凸部３４Ａｐは、空気側からベースフィルム４２Ａ側

に向かって、断面積（入射光線に直交する面に平行な断面、例えばベースフィルム４２Ａの面に平行な断面）が増加する形状、例えば、円錐形であることが好ましい。また、光の干渉を抑制するために、凸部３４Ａｐを規則性がないように、好ましくはランダムに、配列することが好ましい。しかしながら、合成高分子膜３４Ａをドロップ培養に用いる場合には、これらの特徴は必要ではない。例えば、凸部３４Ａｐは密に配列される必要はなく、また、規則的に配列されてもよい。D_p、D_{int}、D_hの上限値および下限値も、可視光の反射を防止する必要がないので、可視光の波長範囲を超えてもよい。

[0027] 図２Ｂに示すフィルム５０Ｂは、ベースフィルム４２Ｂと、ベースフィルム４２Ｂ上に形成された合成高分子膜３４Ｂとを有している。合成高分子膜３４Ｂは、表面に複数の凸部３４Ｂｐを有しており、複数の凸部３４Ｂｐは、モスアイ構造を構成している。フィルム５０Ｂは、合成高分子膜３４Ｂが有する凸部３４Ｂｐの構造が、フィルム５０Ａの合成高分子膜３４Ａが有する凸部３４Ａｐの構造と異なっている。フィルム５０Ａと共通の特徴については説明を省略することがある。

[0028] 合成高分子膜３４Ｂの法線方向から見たとき、凸部３４Ｂｐの２次元的な大きさD_pは１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲内にある。また、凸部３４Ｂｐの典型的な隣接間距離D_{int}は１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下であり、かつ、$D_p < D_{int}$である。すなわち、合成高分子膜３４Ｂでは、隣接する凸部３４Ｂｐの間に平坦部が存在する。凸部３４Ｂｐは、空気側に円錐形の部分を有する円柱状であり、凸部３４Ｂｐの典型的な高さD_hは、１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下である。また、凸部３４Ｂｐは、規則的に配列されていてもよいし、不規則に配列されていてもよい。凸部３４Ｂｐが規則的に配列されている場合、D_{int}は配列の周期をも表すことになる。このことは、当然ながら、合成高分子膜３４Ａについても同じである。

[0029] なお、本明細書において、「モスアイ構造」は、図２Ａに示した合成高分子膜３４Ａの凸部３４Ａｐの様に、断面積（膜面に平行な断面）が増加する形状の凸部で構成される、優れた反射防止機能を有するナノ表面構造だけな

く、図２Ｂに示した合成高分子膜３４Ｂの凸部３４Ｂｐの様に、断面積（膜面に平行な断面）が一定の部分を有する凸部で構成されるナノ表面構造を包含する。凸部の先端は、円錐形である必要は必ずしもない。

[0030] 実施例で例示した固体表面が有する複数の凸部は、略円錐形の先端部を有するが、複数の凸部の形状はこれに限られない。ただし、型を用いて複数の凸部を形成する場合には、離型性の観点から、凸部の先端ほど細い（型の凹部の底に近いほど細い）形状が好ましい。先端が尖っている必要はない。また、凸部の高さ（型の凹部の深さ）が５００ｎｍを超えると、離型性が低下する、あるいは、型の製造に時間がかかるなどの不利益がある。

[0031] 合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの表面は、必要に応じて、処理されていてもよい。例えば、表面張力（ドロップの接触角）を調整するために、撥水撥油剤や表面処理剤を付与してもよい。撥水撥油剤や表面処理剤の種類によっては、合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの表面に薄い高分子膜が形成される。また、合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの表面をプラズマなどを用いて改質してもよい。例えば、プラズマ処理によって、合成高分子膜３４Ａおよび３４Ｂの表面に親油性を付与することができる。

[0032] 図２Ａおよび図２Ｂに例示したようなモスアイ構造を表面に形成するための型（以下、「モスアイ用型」という。）は、モスアイ構造を反転させた、反転されたモスアイ構造を有する。反転されたモスアイ構造を有する陽極酸化ポーラスアルミナ層をそのまま型として利用すると、モスアイ構造を安価に製造することができる。特に、円筒状のモスアイ用型を用いると、ロール・ツー・ロール方式によりモスアイ構造を効率良く製造することができる。このようなモスアイ用型は、特許文献５～８に記載されている方法で製造することができる。

[0033] なお、モスアイ用型の製造方法は、上記の方法に限定されない。例えば、干渉露光リソグラフィーや電子線リソグラフィーなどの各種リソグラフィー法、または、グラッシーカーボン基板に酸素イオンビームを照射して構造を形成する方法など、公知のナノ構造を形成する方法を用いることができる。

[0034] 固体表面と細胞との相互作用（あるいは、固体表面の足場としての作用）がスフェロイド形成に与える影響については、細胞種によっても異なるので、今後の研究を待たないとわからない点も多いが、少なくともこれまでの実験結果から、上記の項目２～９に記載の特徴を有する固体表面がドロップ培養法に好適に用いられる。

[0035] 後に示す実験例では、特願２０１８－０４１０７３号（出願日２０１８年３月７日）およびこれに基づく米国出願１６／２９３，９０３に記載の合成高分子膜を用いた。参考のために、上記特許出願の開示内容のすべてを本明細書に援用する。なお、上記特許出願に記載されている合成高分子膜は、表面に付着した液滴のｐＨが変化しないという特徴を有している。具体的には、合成高分子膜の表面に２００μＬの水を滴下後、５分後の水溶液のｐＨが６．５以上７．５以下であり得る。光硬化性樹脂を用いて作製された合成高分子膜は、重合開始剤に起因して生成される酸が、表面に付着した水に溶出されることがある。これを防止するためには、重合開始剤として、例えば、エタノン，１－［９－エチル－６－（２－メチルベンゾイル）－９Ｈ－カルバゾール－３－イル］－，１－（Ｏ－アセチルオキシム）、２－ヒドロキシ－１－｛４－［４－（２－ヒドロキシ－２－メチル－プロピオニル）－ベンジル］フェニル｝－２－メチル－プロパン－１－オン、および１－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）－フェニル］－２－ヒドロキシ－２－メチル－１－プロパン－１－オンからなる群から選択される１以上の重合開始剤を用いればよい。具体的には、ＩＲＧＡＣＵＲＥ　ＯＸＥ０２（ＢＡＳＦ社）、Ｏｍｎｉｒａｄ　１２７（ＩＧＭ　Ｒｅｓｉｎｓ社）、Ｏｍｎｉｒａｄ　２９５９（ＩＧＭ　Ｒｅｓｉｎｓ社）を例示することができる。

[0036] 固体表面に付着した液滴のｐＨの変化が大き過ぎると、細胞の成長速度が低下する、あるいは、スフェロイドの形態が一定しない、スフェロイドの組織再現性が低下するなどのおそれがある。このような観点からも上記特許出願に記載の合成高分子膜は好適に用いられる。

[0037] 図３Ａに、ヒト肝がん由来細胞株ＨｅｐＧ２をドロップ培養した結果（左

）と、平面培養した結果（右）の倒立型位相差顕微鏡を用いて観察した像を示す。また、図３Ｂに、ドロップ培養法で得られたＨｅｐＧ２のスフェロイドを電子顕微鏡で観察した像を示す。図３Ｂの左は上面像であり、図３Ｂの右は側面像である。

[0038] ドロップ培養は、以下の方法で行った。

[0039] まず、ヒト肝がん由来細胞株ＨｅｐＧ２細胞を、一般的な培養条件であるダルベッコ改変イーグル培地（Ｄ－ＭＥＭ）に最終濃度１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を添加した培地（細胞培養液）を用いて、温度３７℃、二酸化炭素濃度５％、相対湿度９５％の大気条件で、接着細胞培養用シャーレ（例えば、住友ベークライト株式会社製ＭＳ－１１６００）で維持培養を行った。

[0040] 次に、この維持培養を行っていたＨｅｐＧ２細胞を、一般的な細胞剥離液であるトリプシン溶液を用いて培養皿より剥離し、細胞が浮遊した状態における細胞密度を全自動細胞計測機（セルカウンター）で計測し、上記培地に1×10^5細胞／ｍＬになるように、細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液２５μＬを計量し、モスアイ構造を表面に有する光硬化樹脂膜の表面に液滴を形成するように付着させた。液滴は、３５ｍｍφディッシュ上に貼られたナノ突起フィルム上であれば、６～９個が最適であった。この液滴（２５μＬ）を上記と同じ大気条件（温度３７℃、二酸化炭素濃度５％、相対湿度９５％）で３日間培養した。液滴はこの大気条件においても、また培地中の浸透圧を調整するために培養液をその半量または全量を交換しても、その形状を維持していた。

[0041] 図３Ａの左に示したように、モスアイ構造を有する表面上でドロップ培養を行うと、概ね円形の外周を持ち、且つ、立体的なスフェロイドが形成された。立体的なスフェロイドが形成されていることは、図３Ｂの電子顕微鏡像からも確認できる。

[0042] 一方、図３Ａの右は、一般的な平面培養による結果を示している。図３Ａの右には、スフェロイドの形成は認められなかった。なお、一般的な平面培養は、ここでは、以下のようにして行った。

[0043] 一般的な細胞接着表面コート（親水性コート等）を施した培養用シャーレ（例えば、住友ベークライト株式会社製ＭＳ－３０９６又はＭＳ－１１３５０など、試験のための容量に合わせて選択する）に調製された細胞懸濁液を適量（９６穴プレートでは１００μＬ、３５ｍｍディッシュでは２ｍＬ）播種し、細胞が平面状に生育出来るよう培養を行った。

[0044] 図３Ｃにドロップ培養中の肝がん細胞株ＨｅｐＧ２の細胞生存数を求めた結果を示す。ここでは、同一細胞株の生細胞が同量持つエネルギーであることが知られているアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）を測定することで定量した。図３Ｃ中の３Ｄがドロップ培養法、２Ｄは、一般的な平面培養法の結果を示す。

[0045] 図３Ｃから分かるように、ドロップ培養法による細胞生存数は、平面培養法による細胞生存数に対し、ほぼ同程度ある。従来の三次元培養法（例えば特許文献１）では、細胞生存数は、平面培養法よりも減少し、平面培養法による細胞生存数の７０％～８０％が得られれば、高効率に細胞が生存していると言われている。細胞生存数は、細胞密度にも依存するが、典型的な１×10^5細胞／ｍＬという播種密度においては、ドロップ培養法においては平面培養法とほぼ同等の細胞生存率が得られることが分かった。

[0046] 図３Ｄに、ドロップ培養法で得られた肝がん細胞ＨｅｐＧ２スフェロイドの組織再現性（または「遺伝子発現性」）を評価した結果を示す。図３Ｄ中の３Ｄがドロップ培養法、２Ｄは、一般的な平面培養法の結果を示す。

[0047] ＨｅｐＧ２細胞においては、平面培養では肝細胞の機能はほとんど維持しないが、三次元培養を行うことで極性に従った細胞の配位が可能となり、特徴的な肝機能の１つである薬剤代謝酵素チトクロームＰ４５０の活性（以下、「ＣＹＰ活性」と略すことがある。）を回復させることが知られており、培養されたスフェロイドの組織再現性を評価する指標の１つとして用いられている。そこで、以下のようにして、Ｐ４５０活性を測定することによって、ドロップ培養法で得られた肝細胞スフェロイドの組織再現性を評価した。

[0048] ドロップ培養法で得られたスフェロイドを用いて、Ｐ４５０－ＧＩｏ™Ｌ

ｕｃｉｆｅｒｉｎ－ＩＰＡキット（プロメガ社製）を用い、インストラクションに従って細胞中の酵素活性を測定した。このとき、比較対象として、ＨｅｐＧ２細胞を液滴と同細胞数になるように平面培養を行い、同じ方法でＰ４５０活性の測定を行った。平面培養とドロップ培養においては、その細胞生育速度が異なることが予想されたため、細胞当たりの酵素活性の補正値を算出する必要がある。そのため、Ｐ４５０酵素活性の測定時と同条件で、ドロップ培養または平面培養を行った際の生細胞数を測定するため、ＡＴＰの定量を、Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　ＧｌｏR キット（プロメガ社製）を用いて行い、インストラクションに従ってＲＬＵ値を測定した。平面培養あるいはドロップ培養を行った際のＰ４５０酵素活性をＡＴＰ値で除し、平面培養の細胞あたり酵素活性値を１とした際のドロップ培養中のＨｅｐＧ２細胞の相対Ｐ４５０酵素活性値を求めグラフにしたものを図３Ｄに示した。

[0049] 図３Ｄから分かるように、ドロップ培養法で形成したＨｅｐＧ２スフェロイドでは、ＣＹＰ活性が３日間の培養で約１０倍に上昇しており、形成されたスフェロイドが高い組織再現性を有していると考えられる。

[0050] 上記のことから、固体表面上に液滴（ドロップ）を形成して培養を行うことによって、高い組織再現性を有するスフェロイドを形成できることがわかった。

[0051] 図４Ａ、図４Ｂ、図４Ｃ、図４Ｄに、種々の細胞をドロップ培養した結果（左）を平面培養した結果（右）と併せ示す。図４Ａは、ヒト胎児腎臓上皮細胞ＨＥＫ２９３をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）を示し、図４Ｂは、マウス脂肪前駆細胞３Ｔ３－Ｌ１をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）を示し、図４Ｃは、マウス間葉系幹細胞Ｃ３Ｈ１０ｔ１／２をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）を示し、図４Ｄは、マウス筋芽細胞Ｃ２Ｃ１２をドロップ培養した結果の光学顕微鏡像（左）と、平面培養した結果の光学顕微鏡像（右）を示す。

[0052] 図４Ａ、図４Ｂ、図４Ｃ、図４Ｄの結果から理解されるように、ドロップ培養法によると、スフェロイドの形成が確認されたのに対し、平面培養では、いずれもスフェロイドは形成されなかった。このことから理解されるように、ドロップ培養法は、幅広い細胞種の培養に好適に用いられる。

[0053] 次に、ドロップ培養法に好適に用いられる固体表面を検討した結果を説明する。

[0054] ［合成高分子膜］

（実験例１）

組成の異なる紫外線硬化性樹脂を用いて、図２Ａに示したフィルム５０Ａと同様の構造を有する試料フィルムを作製した。各試料フィルムの合成高分子膜３４Ａを形成する紫外線硬化性樹脂に使用した原材料を表１に示し、紫外線硬化性樹脂Ａ、ＢおよびＣの組成を表２に示す。樹脂Ａ、ＢおよびＣは、それぞれ、フッ素系の撥水撥油剤（撥水添加剤）を混合した。

[0055] また、モスアイ構造を表面に形成する型は、上記特許文献５～８、上記特願２０１８－０４１０７３号に記載の方法で作製したポーラスアルミナ層を用いた。平坦な「型」としては、厚さが０．７ｍｍの無アルカリガラス（ＣＯＲＮＩＮＧ社製　ＥＡＧＬＥ　ＸＧ）を用いた。

[0056] また、合成高分子膜３４Ａを形成する際に、各型に表３に示す離型処理を行った。フッ素系離型剤ＵＤ５０９（ダイキン工業株式会社製、ＯＰＴＯＯＬ　ＵＤ５０９、変性パーフルオロポリエーテル）の濃度を変えた３種類の処理を行った。

[0057] 型および合成高分子膜の表面（ドロップ培養法における固体表面）を特徴付けるパラメータとして、接触角を測定した。表３に型の表面の接触角を示す。固体表面の細胞懸濁液に対する接触角は、固体表面と細胞とが接触する面積（「液滴の底面積」ともいう。）および液滴の形状に影響を与える。細胞種にも依存するが、接触角によって、得られるスフェロイドの形状等が変わる。細胞種に応じて接触角を調整することが好ましい。

[0058] 接触角（静的接触角）の測定は、一般的な、θ／２法（ｈａｌｆ－ａｎｇ

ｌｅ　Ｍｅｔｈｏｄ：（θ／２＝ａｒｃｔａｎ（ｈ／ｒ）、θ：接触角、ｒ：液滴の半径、ｈ：液滴の高さ））で行った。純水を用いた接触角の測定には、１μＬおよびドロップ培養法に用いられる液滴の体積を考慮し、１０μＬから７０μＬの液滴を用いた。培地を用いた接触角の測定には、ドロップ培養法に用いられる液滴の体積を考慮し、１０μＬから７０μＬの液滴を用いた。接触角は、時間に依存して変化する。したがって、液滴を付着させてから１秒後と、１０秒後の接触角を測定した。固体表面を特徴付けるための接触角は、液滴が固体表面に付着してから１０秒後の静的接触角をいうことにする。なお、「着滴せず」は接触角が１４０°以上であることを意味する。また、滑落角の測定には、接触角の測定と同様に、１０μＬから７０μＬの液滴を用いた。滑落角とは、液滴が付着した表面を水平方向から傾斜させ、液滴が下方に滑り始めた傾斜角をいう。

[0059] 培地としては、Ｄ－ＭＥＭ（Ｌｏｗ　Ｇｌｕｃｏｓｅ　１．０ｇ／Ｌ　Ｇｌｕｃｏｓｅ）／１０％ＦＢＳを用いた。なお、培地の種類、濃度による接触角および滑落角への影響はばらつきの範囲内であった。また、培地に細胞を加えることによる接触角への影響もばらつきの範囲内であった。

[0060] 表４に実験に用いた合成高分子膜（比較例１～１２、実施例１～１２）の作製に用いた型（離型処理の種類）および樹脂組成と、各合成高分子膜の表面の水に対する接触角を測定した結果を示す。接触角は、１μＬの純水を用いて測定した。液滴を表面に付着させてから１秒後および１０秒後の接触角と、１０秒後の接触角から１秒後の接触角を引いた差（Δ）を測定した結果を示す。

[0061] 表４から分かるように、多少のばらつきはあるものの、濃度の高い離型処理剤で処理した型を用いて作製した合成高分子膜程、撥水性が高い。また、平坦な表面とモスアイ構造を有する表面（以下、モスアイ表面という。）とを比較すると、モスアイ表面の方が接触角が大きく、撥水性が高い（ロータス効果）。実施例１、２、３のモスアイ表面は、接触角を測定する際に針先に形成された液滴をモスアイ表面に接触させても、液滴がモスアイ表面に付

着せず、針先に残ったため、接触角を測定できなかった。接触角が概ね１４０°を超えると、このように液滴が、対象の表面に付着しないという現象が起こった。

[0062] また、接触角の時間変化（Δ）を見ると、実施例１０、１１を除き、いずれも接触角の時間変化は小さく、安定している。実施例１０、１１の接触角の時間変化が大きかった理由については、離型剤の濃度が低く、モスアイ表面に撥水撥油剤が均一かつ十分に引き寄せられなかったためと考えられる。硬化性樹脂に含まれる撥水撥油剤は、型の離型処理によってモスアイ表面に引き寄せられるからである。

[0063] 表５、表７、表９、表１１に、液滴量（液滴の体積）を変えて、水に対する接触角と、培地に対する接触角とを測定した結果を示す。表５（比較例１－１～１２－１、実施例１－１～１２－１）は１０μＬの液滴を用いた結果を示し、表７（比較例１－２～１２－２、実施例１－２～１２－２）は３０μＬの液滴を用いた結果を示し、表９（比較例１－３～１２－３、実施例１－３～１２－３）は５０μＬの液滴を用いた結果を示し、表１１（比較例１－４～１２－４、実施例１－４～１２－４）は７０μＬの液滴を用いた結果を示している。

[0064] 接触角は、水および培地のいずれについても、モスアイ表面の方が平坦な表面よりも大きく、撥水性が高い。液滴の体積が大きくなるにつれて、重力の影響を受けて、液滴の形状が扁平になり、接触角が小さくなる傾向が、水および培地について認められる。また、ばらつきはあるものの、濃度の高い離型処理剤で処理した型を用いて作製した合成高分子膜程、撥水性が高い傾向が認められる。

[0065] 滑落角も、液滴の体積が大きくなるにつれて、重力の影響を受けて、小さくなる傾向が、水および培地について認められる。滑落角は、モスアイ表面の方が平坦な表面よりも大きく、モスアイ表面が有する微細な凸部の作用によると考えられる。すなわち、モスアイ表面は、高い撥水性を有しつつ、高い滑落角を維持できることが分かる。

[0066] それぞれの合成高分子膜の表面を用いて三次元培養を行った結果を表６（比較例１－１～１２－１、実施例１－１～１２－１）、表８（比較例１－２～１２－２、実施例１－２～１２－２）、表１０（比較例１－３～１２－３、実施例１－３～１２－３）、表１２（比較例１－４～１２－４、実施例１－４～１２－４）に示す。

[0067] スフェロイド化の評価は、光学顕微鏡による形態の観察によった。スフェロイド化のレベルを５段階で評価し、レベルの数字が大きい方がスフェロイド化の状態が良い状態（高密度集積）であると判定した。光学顕微鏡による形態観察結果の例を図５Ａ（レベル１）、図５Ｂ（レベル２）、図５Ｃ（レベル３）、図５Ｄ（レベル４）、図５Ｅ（レベル５）に示す。表６、８、１０および１２においては、レベル３以上のスフェロイドが形成されたものを○（良）、レベル２または１のスフェロイドが得られたものを△（可）とし、スフェロイドが認められなかったものを×（不可）とした。図５Ａは実施例１０－４、図５Ｂの左は実施例１０－３、中央は実施例１１－４、右は実施例１０－１、図５Ｃの左は実施例９－２、右は実施例８－４、図５Ｄは実施例６－２、図５Ｅの左は実施例３－２、右は実施例１－１のスフェロイドの光学顕微鏡像と、培地の接触角（１０秒後）および、接触角の変化（▼はマイナスを示す）を示している。

[0068] 培地交換の作業性は、接触角で評価した。接触角が１１０°以上を◎（優）、９０°以上１１０°未満を○（良）、９０°未満を△（可）とした。ただし、液滴の高さが１ｍｍを下回ると、培地交換の作業性が低下するので、×（不可）とした。ドロップ培養法は、生存性が高いので、細胞種によっては培養期間が長い（数日を超える）場合もある。そうすると、液滴中の培地が蒸発によって減少する。また、液滴中の老廃物が増加する。そのため、液滴に培地を付与する工程や、さらに、培地を付与する前に液滴から培地の一部を吸い取る工程を行うことが好ましい。このような培地を交換する操作をディスペンサーを用いて効率よく行うためには、液滴の高さは１ｍｍ以上であることが好ましい。θ／２法で求められる接触角は、液滴の形状を円の一

部と仮定して求められる（θ／２＝ａｒｃｔａｎ（ｈ／ｒ）、θ：接触角、ｒ：液滴の半径、ｈ：液滴の高さ）。この関係から、例えば、液滴の体積が７０μＬのとき、接触角が１７°のとき、高さｈが１ｍｍとなる（５０μＬのときは２０°、３０μＬのときは２６°、１０μＬのときは４４°で、それぞれ高さｈが１ｍｍとなる）。したがって、１０秒後の培地の接触角が１４．５°と１７°未満の実施例１０－４だけを×と判定した。

[0069] ハンドリング性は、作業中に液滴が固体表面に安定に保持され易さを滑落角で評価した。固体表面上の液滴は、固体表面が傾斜する、あるいは、振動すると、移動する（滑るまたは転がる）ことがある。これを防止するためには、培養中に、固体表面を傾斜させない、あるいは、振動させない状態を維持する必要が生じるので、作業性が低下する。例えば、固体表面の培地に対する滑落角を４５°以上とすることによって、液滴を固体表面上に比較的安定に保持することができる。ハンドリング性は、滑落角が９０°以上を◎（優）、４５°以上９０°未満を〇（良）、１０°以上４５°未満を△（可）、１０°未満を×（不可）とした。

[0070] 表６、８、１０、１２におけるスフェロイド化の評価結果をみると、平坦な表面を用いた比較例では、いずれもスフェロイドの形成が認められなかったのに対し、モスアイ表面を用いた、すべての実施例でスフェロイドの形成が認められたことがわかる。また、実施例においては、図５Ａ～図５Ｅからも分かるように、接触角が大きいほど、良い状態のスフェロイドが得られる傾向が認められる。これは、接触角が大きいほど、液滴の形状が球に近く、液滴の底面で細胞が高密度に集積させるためと考えられる。接触角は、少なくとも１７°以上であることが好ましく、９０°以上であることがさらに好ましい。接触角は着滴から１０秒後の値が上記の条件を満足すればよい。

[0071] また、実施例１１－４（図５Ｂ中央）および実施例１０－１（図５Ｂ右）と、実施例８－４（図５Ｃ右）とを比較すると分かるように、接触角の差Δが小さい方が、良い状態のスフェロイドが得られる傾向が認められる。これは、着滴後１０秒間での接触角変化量が小さいほど、培養期間中の液滴の形

状が維持されやすく（扁平になり難く）、その結果、液滴の形状による細胞の集積効果が、より多く得られたと考えられる。

[0072] 液滴の形成および操作性等の観点から、液滴の体積は１０μＬ以上５０μＬ以下であることが好ましい（表６、８、１０参照、特に実施例１～６）。

[0073] 液滴に含まれる細胞の播種密度は、例えば、10^3細胞／ｍＬ以上10^7細胞／ｍＬ以下である。液滴に含まれる細胞の数を正確に制御できる点がドロップ培養法の利点の１つである。細胞の数は、典型的に上記の範囲であるが、細胞種や液滴の体積等に応じて、適宜調整され得る。

[0074] 上述したように、ハンドリング性の観点から、液滴の滑落角は４５°以上であることが好ましく、９０°以上であることがさらに好ましい。滑落角は着滴から２０秒後の値で評価すればよい。

[0075]

[表1]

原材料種		製品名	メーカー名	一般名称
モノマー	M280	M280	MIWON	ポリエチレングリコール(400)ジアクリレート
	M282	M282	MIWON	ポリエチレングリコール(200)ジアクリレート
	ACMO	ACMO®	KJ ケミカルズ(株)	N,N-アクリロイルモルホリン
離型剤	MT70	FOMBLIN® MT70	SOLVAY	パーフルオロポリエーテル誘導体 80% メチルエチルケトン(溶剤)20%
	FAAC6	CHEMINOX FAAC-6	ユニマテック	2-(パーフルオロヘキシル)エチルアクリレート
	KY1203E	X71-KY1203E	信越シリコーン(株)	含フッ素アクリル化合物 20% メチルエチルケトン(溶剤)80%
重合開始剤	OXE02	IRGACURE OXE02	BASF 社	エタノン,1-[9-エチル-6-(2-メチルベンゾイル)-9H-カルバゾール-3-イル]-,1-(O-アセチルオキシム)

[0076]

[表2]

	モノマー			開始剤	撥水撥油剤		
	M280	M282	ACMO	OXE02	MT70	FAAC6	KY1203E
樹脂 A	28.6%	63.8%	2.9%	1.0%	–	–	3.8%
樹脂 B	29.1%	65.0%	2.9%	1.0%	1.9%	–	–
樹脂 C	27.5%	61.5%	2.8%	0.9%	3.7%	3.7%	–

[0077] [表3]

	離型処理	水 接触角(°) 1μL		
型	離型剤(UD509)濃度	着滴1秒後	着滴10秒後	⊿
平坦 1	0.1%	105.05	104.85	−0.2
平坦 2	0.001%	100.1	99.05	−1.05
平坦 3	0.0001%	72.35	69.55	−2.8
平坦 4	0.00001%	59.25	58.35	−0.9
モスアイ 1	0.1%	着滴せず(＞140)		
モスアイ 2	0.001%	128.5	128.05	−0.45
モスアイ 3	0.0001%	124.6	124.55	−0.05
モスアイ 4	0.00001%	124.3	122.85	−1.45

[0078]

[表4]

	型	樹脂	水 接触角(°) 1μL		
			1秒後	10秒後	⊿
比較例 1	平坦1	A	105.8	105.4	−0.4
比較例 2	平坦1	B	108.1	107.0	−1.1
比較例 3	平坦1	C	107.3	107.8	0.5
比較例 4	平坦2	A	96.1	96.9	0.8
比較例 5	平坦2	B	98.2	95.6	−2.6
比較例 6	平坦2	C	104.1	103.4	−0.7
比較例 7	平坦3	A	77.4	75.1	−2.3
比較例 8	平坦3	B	82.1	77.2	−4.9
比較例 9	平坦3	C	86.9	82.0	−4.9
比較例 10	平坦4	A	64.0	61.5	−2.6
比較例 11	平坦4	B	59.8	57.8	−2.0
比較例 12	平坦4	C	70.9	66.6	−4.3
実施例 1	モスアイ1	A	着滴せず(＞140)		
実施例 2	モスアイ1	B	着滴せず(＞140)		
実施例 3	モスアイ1	C	着滴せず(＞140)		
実施例 4	モスアイ2	A	131.0	131.1	0.1
実施例 5	モスアイ2	B	134.3	134.5	0.2
実施例 6	モスアイ2	C	138.5	138.6	0.1
実施例 7	モスアイ3	A	113.2	107.5	−5.7
実施例 8	モスアイ3	B	112.3	109.9	−2.3
実施例 9	モスアイ3	C	133.5	132.2	−1.3
実施例 10	モスアイ4	A	108.0	91.2	−16.8
実施例 11	モスアイ4	B	94.6	63.8	−30.8
実施例 12	モスアイ4	C	120.0	118.0	−2.1

[0079]

[表5]

液滴量10μL	型	樹脂	水				培地(LG/F)			
			接触角(°)1秒後	接触角(°)10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)	接触角(°)1秒後	接触角(°)10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)
比較例1-1	平坦1	A	67.8	66.7	-1.1	90.0	98.8	98.6	-0.2	63.1
比較例2-1	平坦1	B	99.7	99.3	-0.4	60.1	98.2	97.6	-0.6	65.5
比較例3-1	平坦1	C	83.5	82.4	-1.1	78.5	95.6	95.6	0.0	64.0
比較例4-1	平坦2	A	81.1	77.7	-3.4	90.0	78.0	74.8	-3.2	90.0
比較例5-1	平坦2	B	101.6	100.6	-1.0	58.0	98.1	97.6	-0.5	75.3
比較例6-1	平坦2	C	98.4	98.1	-0.3	78.0	96.1	95.1	-1.0	90.0
比較例7-1	平坦3	A	61.7	60.6	-1.1	90.0	57.2	56.6	-0.6	90.0
比較例8-1	平坦3	B	80.3	78.0	-2.3	90.0	76.3	73.8	-2.5	90.0
比較例9-1	平坦3	C	80.5	78.6	-1.9	90.0	75.4	73.7	-1.7	90.0
比較例10-1	平坦4	A	69.5	66.3	-3.2	90.0	64.0	61.8	-2.2	90.0
比較例11-1	平坦4	B	71.1	70.1	-1.0	90.0	66.1	64.6	-1.5	90.0
比較例12-1	平坦4	C	72.2	73.3	1.1	90.0	70.2	70.8	0.6	90.0
実施例1-1	モスアイ1	A	着滴せず(>140)			5°以下	137.0	137.9	0.9	90.0
実施例2-1	モスアイ1	B	着滴せず(>140)			5°以下	137.1	136.9	-0.2	90.0
実施例3-1	モスアイ1	C	着滴せず(>140)			5°以下	137.5	137.9	0.4	90.0
実施例4-1	モスアイ2	A	138.6	138.4	-0.2	90.0	120.1	116.6	-3.5	90.0
実施例5-1	モスアイ2	B	136.5	136.5	0.0	90.0	131.1	128.1	-3.0	90.0
実施例6-1	モスアイ2	C	135.8	134.6	-1.2	90.0	132.7	128.6	-4.1	90.0
実施例7-1	モスアイ3	A	117.2	117.5	0.3	90.0	103.2	94.1	-9.1	90.0
実施例8-1	モスアイ3	B	129.0	128.6	-0.4	90.0	127.8	121.8	-6.0	90.0
実施例9-1	モスアイ3	C	133.3	132.5	-0.8	90.0	123.7	122.3	-1.4	90.0
実施例10-1	モスアイ4	A	114.1	112.1	-2.0	90.0	91.0	68.0	-23.0	90.0
実施例11-1	モスアイ4	B	121.9	121.8	-0.1	90.0	115.4	112.7	-2.7	90.0
実施例12-1	モスアイ4	C	131.4	131.0	-0.4	90.0	131.5	128.2	-3.3	90.0

[0080]

[表6]

液滴量 10μL	スフェロイド化	培地交換の作業性	ハンドリング性
比較例 1-1	x	○	○
比較例 2-1	x	○	○
比較例 3-1	x	○	○
比較例 4-1	x	△	◎
比較例 5-1	x	○	○
比較例 6-1	x	○	◎
比較例 7-1	x	△	◎
比較例 8-1	x	△	◎
比較例 9-1	x	△	◎
比較例 10-1	x	△	◎
比較例 11-1	x	△	◎
比較例 12-1	x	△	◎
実施例 1-1	○	◎	◎
実施例 2-1	○	◎	◎
実施例 3-1	○	◎	◎
実施例 4-1	○	◎	◎
実施例 5-1	○	◎	◎
実施例 6-1	○	◎	◎
実施例 7-1	○	○	◎
実施例 8-1	○	◎	◎
実施例 9-1	○	◎	◎
実施例 10-1	△	△	◎
実施例 11-1	○	◎	◎
実施例 12-1	○	◎	◎

[0081]

[表7]

液滴量 30 μL	水				培地(LG/F)			
	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	Δ接触角(°)	滑落角(°)	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	Δ接触角(°)	滑落角(°)
比較例 1-2	59.9	60.5	0.6	67.9	78.3	77.6	-0.7	61.2
比較例 2-2	78.1	81.9	3.8	29.5	77.8	77.8	0.0	43.1
比較例 3-2	74.9	74.5	-0.4	32.6	82.5	81.0	-1.5	50.3
比較例 4-2	69.3	68.8	-0.5	71.0	66.0	65.9	-0.1	65.3
比較例 5-2	78.2	79.1	0.9	51.0	74.7	75.9	1.2	45.0
比較例 6-2	78.2	78.7	0.5	33.0	76.2	75.2	-1.0	40.2
比較例 7-2	57.0	57.8	0.8	75.1	52.8	53.3	0.5	70.3
比較例 8-2	65.6	65.6	0.0	72.0	61.1	61.4	0.3	67.5
比較例 9-2	66.4	66.5	0.1	80.0	61.3	61.0	-0.3	73.6
比較例 10-2	59.3	59.5	0.2	72.2	57.2	55.8	-1.4	65.6
比較例 11-2	59.8	59.2	-0.6	61.9	54.8	53.7	-1.1	69.5
比較例 12-2	60.3	58.7	-1.6	73.7	56.8	54.2	-2.6	68.2
実施例 1-2	着滴せず(>140)			5°以下	115.4	116.3	0.9	90.0
実施例 2-2	着滴せず(>140)			5°以下	125.8	125.0	-0.9	90.0
実施例 3-2	着滴せず(>140)			5°以下	133.0	132.7	-0.3	90.0
実施例 4-2	129.3	129.9	0.6	90.0	114.6	113.6	-1.0	90.0
実施例 5-2	127.3	126.8	-0.5	90.0	131.0	128.7	-2.3	90.0
実施例 6-2	124.5	123.6	-0.9	90.0	118.8	117.5	-1.4	90.0
実施例 7-2	92.1	91.8	-0.3	90.0	93.6	86.9	-6.7	90.0
実施例 8-2	103.5	102.4	-1.1	90.0	109.1	107.8	-1.3	90.0
実施例 9-2	119.2	119.8	0.6	90.0	87.0	86.7	-0.3	90.0
実施例 10-2	87.4	87.4	0.0	90.0	56.5	41.9	-14.6	90.0
実施例 11-2	100.2	100.7	0.5	90.0	102.0	99.1	-2.9	90.0
実施例 12-2	103.2	103.5	0.3	90.0	112.7	112.0	-0.7	90.0

[0082]

[表8]

液滴量 30μL	スフェロイド化	培地交換の作業性	ハンドリング性
比較例 1-2	×	△	○
比較例 2-2	×	△	△
比較例 3-2	×	△	○
比較例 4-2	×	△	○
比較例 5-2	×	△	○
比較例 6-2	×	△	△
比較例 7-2	×	△	○
比較例 8-2	×	△	○
比較例 9-2	×	△	○
比較例 10-2	×	△	○
比較例 11-2	×	△	○
比較例 12-2	×	△	○
実施例 1-2	○	◎	◎
実施例 2-2	○	◎	◎
実施例 3-2	○	◎	◎
実施例 4-2	○	◎	◎
実施例 5-2	○	◎	◎
実施例 6-2	○	◎	◎
実施例 7-2	○	△	◎
実施例 8-2	○	○	◎
実施例 9-2	○	△	◎
実施例 10-2	△	△	◎
実施例 11-2	○	○	○
実施例 12-2	○	◎	◎

[0083]

[表9]

液滴量 50μL	水				培地(LG/F)			
	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)
比較例 1-3	57.7	57.2	-0.5	35.0	77.3	78.5	1.2	51.7
比較例 2-3	85.3	83.9	-1.4	21.8	75.5	75.4	-0.1	43.1
比較例 3-3	71.8	72.2	0.4	25.9	84.4	83.5	-0.9	48.0
比較例 4-3	75.6	73.6	-2.0	48.2	70.6	68.1	-2.5	55.1
比較例 5-3	77.5	75.8	-1.7	50.9	72.2	70.2	-2.0	52.5
比較例 6-3	77.1	76.9	-0.2	57.7	72.6	71.7	-0.8	51.3
比較例 7-3	57.0	56.1	-0.9	48.9	51.9	50.7	-1.2	58.6
比較例 8-3	62.3	62.3	0.0	52.5	57.3	57.0	-0.3	54.7
比較例 9-3	62.7	63.2	0.5	57.1	58.2	57.7	-0.5	55.4
比較例 10-3	55.8	55.6	-0.2	47.3	54.5	53.2	-1.3	35.1
比較例 11-3	56.4	56.4	0.0	46.6	51.3	51.1	-0.2	48.3
比較例 12-3	57.7	57.8	0.1	44.1	52.3	52.2	-0.1	46.9
実施例 1-3	着滴せず(>140)			5°以下	112.3	112.1	-0.2	47.0
実施例 2-3	着滴せず(>140)			5°以下	125.4	124.6	-0.8	36.5
実施例 3-3	着滴せず(>140)			5°以下	128.5	128.1	-0.4	26.5
実施例 4-3	123.0	123.2	0.2	50.6	117.8	117.4	-0.4	90.0
実施例 5-3	117.5	117.6	0.1	46.6	111.7	111.6	-0.1	90.0
実施例 6-3	117.5	117.7	0.2	48.6	112.5	112.3	-0.2	39.0
実施例 7-3	89.5	89.5	0.0	90.0	83.7	79.8	-3.9	90.0
実施例 8-3	97.9	97.8	-0.1	90.0	104.6	102.0	-2.6	70.6
実施例 9-3	115.8	115.6	-0.2	68.3	98.7	96.8	-1.9	61.5
実施例 10-3	86.9	86.9	0.0	90.0	31.6	27.0	-4.6	90.0
実施例 11-3	94.2	94.2	0.0	90.0	96.7	93.2	-3.5	90.0
実施例 12-3	123.0	123.2	0.2	50.6	117.8	117.4	-0.4	90.0

[0084]

[表10]

液滴量 50μL	スフェロイド化	培地交換の作業性	ハンドリング性
比較例 1-3	x	△	○
比較例 2-3	x	△	△
比較例 3-3	x	△	○
比較例 4-3	x	△	○
比較例 5-3	x	△	○
比較例 6-3	x	△	○
比較例 7-3	x	△	○
比較例 8-3	x	△	○
比較例 9-3	x	△	○
比較例 10-3	x	△	△
比較例 11-3	x	△	○
比較例 12-3	x	△	○
実施例 1-3	○	◎	○
実施例 2-3	○	◎	△
実施例 3-3	○	◎	△
実施例 4-3	○	◎	◎
実施例 5-3	○	◎	◎
実施例 6-3	○	◎	△
実施例 7-3	○	△	◎
実施例 8-3	○	○	○
実施例 9-3	○	○	○
実施例 10-3	△	△	◎
実施例 11-3	○	○	◎
実施例 12-3	○	○	○

[0085]

[表11]

液滴量 70μL	水				培地(LG/F)			
	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)	接触角(°) 1秒後	接触角(°) 10秒後	⊿接触角(°)	滑落角(°)
比較例 1-4	88.6	88.5	-0.1	18.7	84.1	83.5	-0.6	13.2
比較例 2-4	89.3	89.5	0.2	18.3	84.5	84.2	-0.3	12.7
比較例 3-4	87.4	87.6	0.2	24.0	82.2	82.5	0.3	18.6
比較例 4-4	72.0	72.0	0.0	37.1	66.9	66.6	-0.3	32.0
比較例 5-4	73.2	74.7	1.5	36.2	68.7	68.0	-0.7	31.2
比較例 6-4	73.9	73.9	0.0	44.8	68.7	68.1	-0.6	39.5
比較例 7-4	56.6	56.4	-0.2	39.3	51.3	50.7	-0.6	33.8
比較例 8-4	58.5	58.7	0.2	40.0	53.4	53.2	-0.2	34.9
比較例 9-4	61.9	61.8	-0.1	44.1	56.5	56.5	0.0	38.9
比較例 10-4	41.5	41.0	-0.5	53.0	36.3	35.5	-0.8	48.0
比較例 11-4	52.0	52.0	0.0	35.7	46.5	46.2	-0.3	30.6
比較例 12-4	52.8	53.6	0.8	35.5	47.7	47.7	0.0	39.0
実施例 1-4	着滴せず(>140)			5°以下	108.1	108.6	0.5	35.2
実施例 2-4	着滴せず(>140)			5°以下	124.1	121.6	-2.5	24.0
実施例 3-4	着滴せず(>140)			5°以下	127.1	125.3	-1.8	26.5
実施例 4-4	118.5	119.1	0.6	51.4	113.2	113.3	0.1	25.5
実施例 5-4	115.0	115.3	0.3	44.1	110.0	109.5	-0.5	34.7
実施例 6-4	112.6	112.8	0.2	39.0	107.5	107.1	-0.4	24.7
実施例 7-4	83.8	83.4	-0.4	63.2	73.7	71.1	-2.6	36.3
実施例 8-4	84.7	84.9	0.2	62.7	66.1	63.0	-3.1	60.1
実施例 9-4	100.8	101.0	0.2	53.4	96.5	94.4	-2.1	39.9
実施例 10-4	78.9	79.0	0.1	69.9	25.8	14.5	-10.6	45.5
実施例 11-4	84.5	84.0	-0.5	68.6	79.1	69.0	-10.1	52.3
実施例 12-4	103.9	103.9	0.0	57.4	98.1	98.4	0.3	42.3

[0086]

[表12]

液滴量 70μL	スフェロイド化	培地交換の作業性	ハンドリング性
比較例 1-4	×	△	△
比較例 2-4	×	△	△
比較例 3-4	×	△	△
比較例 4-4	×	△	△
比較例 5-4	×	△	△
比較例 6-4	×	△	△
比較例 7-4	×	△	△
比較例 8-4	×	△	△
比較例 9-4	×	△	△
比較例 10-4	×	△	○
比較例 11-4	×	△	△
比較例 12-4	×	△	△
実施例 1-4	○	○	△
実施例 2-4	○	◎	△
実施例 3-4	○	◎	△
実施例 4-4	○	△	△
実施例 5-4	○	○	△
実施例 6-4	○	○	△
実施例 7-4	○	△	△
実施例 8-4	○	△	○
実施例 9-4	○	○	△
実施例 10-4	△	×	○
実施例 11-4	△	△	○
実施例 12-4	○	○	△

[0087] [陽極酸化ポーラスアルミナ層]

上述した実験例１ではモスアイ構造を表面に有する光硬化樹脂膜を用いたが、以下では、固体表面の異なる例として、複数の凹部を表面に有する陽極酸化ポーラスアルミナ層を用いた例を示す。

[0088] 図６Ａ～図６Ｅ、図７Ａおよび図７Ｂを参照しながら、ドロップ培養法に用いられるポーラスアルミナ層の構造および形成方法を説明する。なお、図

６Ａ～図６Ｅ、図７Ａおよび図７Ｂでは、簡単のために、ポーラスアルミナ層が有する凹部が高い規則性を有する（周期性を有する）配列を形成している例を図示しているが、このような例に限られない。後に示す試料サンプルのＳＥＭ像（図８Ａ～図８Ｅ）からも分かるように、ここでは、ポーラスアルミナ層６４が有する凹部６４ｐ１およびミクロな凹部６４ｐ２は不規則に配列されている（周期性を有しない）。ポーラスアルミナ層が有する凹部（細孔）は特定の条件下では高い規則性を有する（周期性を有する）配列を形成し、条件によってはある程度規則性の乱れた配列、あるいは不規則（周期性を有しない）な配列を形成することが知られている。ポーラスアルミナ層をドロップ培養法に用いる場合、凹部の配置が規則性を有するか否かに起因した有意な差（細胞培養の結果の差）は認められていない。

[0089] まず、図６Ａに示すように、透明基板（透明基材）６２と、透明基板６２の上に形成されたアルミニウム膜６８とを用意する。

[0090] 透明基板６２は、例えば、ガラス基板、プラスチック基板等であり、可視光透過率が９０％以上であればよい。透明基板６２の厚さは、例えば０．０３ｍｍ以上１ｍｍ以下である。

[0091] アルミニウム膜６８は、例えば、特許文献７に記載されているように、純度が９９．９９ｍａｓｓ％以上のアルミニウムで形成された膜（以下、「高純度アルミニウム膜」ということがある。）である。アルミニウム膜６８は、例えば、真空蒸着法またはスパッタ法を用いて形成される。アルミニウム膜６８の厚さは、例えば１００ｎｍ以上１μｍ以下である。

[0092] また、アルミニウム膜６８として、高純度アルミニウム膜に代えて、特許文献８に記載されている、アルミニウム合金膜を用いてもよい。特許文献８に記載のアルミニウム合金膜は、アルミニウムと、アルミニウム以外の金属元素と、窒素とを含む。本明細書において、「アルミニウム膜」は、高純度アルミニウム膜だけでなく、特許文献８に記載のアルミニウム合金膜を含むものとする。

[0093] 上記アルミニウム合金膜を用いると、反射率が８０％以上の鏡面を得るこ

とができる。アルミニウム合金膜を構成する結晶粒の、アルミニウム合金膜の法線方向から見たときの平均粒径は、例えば、１００ｎｍ以下であり、アルミニウム合金膜の最大表面粗さＲｍａｘは６０ｎｍ以下である。アルミニウム合金膜に含まれる窒素の含有率は、例えば、０．５ｍａｓｓ％以上５．７ｍａｓｓ％以下である。アルミニウム合金膜に含まれるアルミニウム以外の金属元素の標準電極電位とアルミニウムの標準電極電位との差の絶対値は０．６４Ｖ以下であり、アルミニウム合金膜中の金属元素の含有率は、１．０ｍａｓｓ％以上１．９ｍａｓｓ％以下であることが好ましい。金属元素は、例えば、ＴｉまたはＮｄである。但し、金属元素はこれに限られず、金属元素の標準電極電位とアルミニウムの標準電極電位との差の絶対値が０．６４Ｖ以下である他の金属元素（例えば、Ｍｎ、Ｍｇ、Ｚｒ、ＶおよびＰｂ）であってもよい。さらに、金属元素は、Ｍｏ、ＮｂまたはＨｆであってもよい。アルミニウム合金膜は、これらの金属元素を２種類以上含んでもよい。アルミニウム合金膜は、例えば、ＤＣマグネトロンスパッタ法で形成される。アルミニウム合金膜の厚さは１００ｎｍ以上１μｍ以下の範囲にあることが好ましい。

[0094] 次に、図６Ｂに示すように、アルミニウム膜６８を部分的に陽極酸化することによって、予備ポーラスアルミナ層６９を形成する。ここでは、アルミニウム膜６８のうち、アルミニウム膜６８の表面６８ｓを含む一部のみを陽極酸化する。すなわち、予備ポーラスアルミナ層６９は、アルミニウム膜６８のうち陽極酸化されずに残ったアルミニウム残存層６８ｒの上に形成される。予備ポーラスアルミナ層６９は、凹部（細孔）６９ｐを有するポーラス層６９ａと、バリア層６９ｂ（凹部（細孔）６９ｐの底部）とを有している。ポーラス層６９ａの厚さは、凹部６９ｐの深さＤｄｐに相当する。

[0095] 次に、予備ポーラスアルミナ層６９をエッチング液に接触させることによって、図６Ｃに示すように、予備ポーラスアルミナ層６９を実質的に完全に除去する。アルミニウム残存層６８ｒの表面は、予備ポーラスアルミナ層６９のバリア層６９ｂの底部の形状を反映している。アルミニウム残存層６８

ｒの表面は、複数の凹部６８ｐと、隣接する凹部６８ｐの側面が交わることにより形成された、稜線６８ｄとを有する。

[0096] 図７Ａの平面図を参照して、予備ポーラスアルミナ層６９およびアルミニウム残存層６８ｒの形状を説明する。表面の法線方向から見たとき、凹部６９ｐの中心６３ｏは例えば正三角格子状に配置されている。凹部６９ｐは平面図では中心６３ｏを中心とした円として示される。ここでは凹部６９ｐは円筒形であり、断面がＵ字状の底部を有する。アルミニウム残存層６８ｒの凹部６８ｐを示す、中心６３ｏを中心とした円は、隣接する円が互いに重なり合い、隣接する凹部６８ｐの間に稜線６８ｄが形成される。稜線６８ｄは、凹部６８ｐを上から見たときの円に内接する正六角形の辺であり、正六角形の角には、尖状突起６８ｃが形成されている。稜線６８ｄを横から見ると、２つの尖状突起６８ｃの間に局所的な凹部を形成しており、この凹部を鞍部ということもある。凹部６８ｐの２次元的な大きさＤ６８ｐは、凹部６８ｐの隣接間距離Ｄ０にほぼ等しく（Ｄ６８ｐ＝Ｄ０）、凹部６９ｐの２次元的な大きさＤ６９ｐは、凹部６９ｐの隣接間距離Ｄ０よりも小さい（Ｄ６９ｐ＜Ｄ０）。凹部の２次元的な大きさは、表面の法線方向から見たときの凹部の面積円相当径を指す。凹部６９ｐの隣接間距離Ｄ０は、バリア層６９ｂの厚さｔｃのほぼ２倍に相当し、陽極酸化時の電圧にほぼ比例することが知られている。凹部６８ｐの隣接間距離Ｄ０、凹部６９ｐの隣接間距離Ｄ０および凹部６８ｐの２次元的な大きさＤ６８ｐは、例えば１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下であり、凹部６９ｐの２次元的な大きさＤ６９ｐは、例えば５ｎｍ以上５００ｎｍ以下である。凹部６９ｐの深さＤｄｐは、例えば５０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下である。

[0097] 次に、図６Ｄに示すように、透明基板６２上のアルミニウム残存層６８ｒを陽極酸化することによって、複数の凹部（細孔）６４ｐ２を有するポーラスアルミナ層６４を形成する。ここでは、アルミニウム残存層６８ｒを実質的に完全に陽極酸化する。ドロップ培養において、細胞を観察するためにポーラスアルミナ層の可視光透過率は高いことが好ましいためである。

[0098] 図７Ｂの平面図をあわせて参照して、ポーラスアルミナ層６４の形状を説明する。ポーラスアルミナ層６４の表面は、アルミニウム残存層６８ｒの表面形状を反映している。ポーラスアルミナ層６４の表面は、複数の凹部６４ｐ１と、隣接する凹部６４ｐ１の側面が交わることにより形成された稜線６４ｄとを有する。凹部６４ｐ１および稜線６４ｄは、それぞれ、アルミニウム残存層６８ｒの表面の凹部６８ｐおよび稜線６８ｄが反映されたものである。稜線６４ｄは、凹部６４ｐ１を上から見たときの円に内接する正六角形の辺であり、正六角形の角には、尖状突起６４ｃが形成されている。稜線６４ｄを横から見ると、２つの尖状突起６４ｃの間に局所的な凹部を形成しており、この凹部を鞍部ということもある。ポーラスアルミナ層６４の表面は、それぞれが、複数の凹部６４ｐ１のいずれかの中に形成された複数のミクロな凹部６４ｐ２をさらに有する。凹部６４ｐ１およびミクロな凹部６４ｐ２の隣接間距離（中心間距離またはピッチ）はいずれもＤ０であり、凹部６４ｐ１の２次元的な大きさＤｐ１は、凹部６４ｐ１の隣接間距離Ｄ０にほぼ等しく（Ｄｐ１＝Ｄ０）、ミクロな凹部６４ｐ２の２次元的な大きさＤｐ２は、ミクロな凹部６４ｐ２の隣接間距離Ｄ０よりも小さい（Ｄｐ２＜Ｄ０）。

[0099] ポーラスアルミナ層６４は、例えば、酸性の電解液中でアルミニウム残存層６８ｒの表面を陽極酸化することによって形成される。ポーラスアルミナ層６４を形成する工程で用いられる電解液は、例えば、蓚酸、酒石酸、燐酸、硫酸、クロム酸、クエン酸およびリンゴ酸からなる群から選択される酸を含む水溶液である。図６Ｂに示す陽極酸化工程（１回目の陽極酸化工程）と、図６Ｄに示す陽極酸化工程（２回目の陽極酸化工程）とは、例えば同じ電解液（同じ種類、同じ濃度、同じ温度の電解液）を用いて行うことができる。

[0100] 次に、図６Ｅに示すように、ポーラスアルミナ層６４をアルミナのエッチャントに接触させることによって所定の量だけエッチングすることによりミクロな凹部６４ｐ２の開口を拡大する。すなわち、ミクロな凹部６４ｐ２の

２次元的な大きさＤｐ２を増大させる。このとき、稜線６４ｄおよび尖状突起６４ｃの形状も変化する（例えば図６Ｅに示すようにより尖る）。エッチング液の種類・濃度、およびエッチング時間を調整することによって、エッチング量（すなわち、ミクロな凹部６４ｐ２の２次元的な大きさおよび深さ）を制御することができる。エッチング液としては、例えば１０ｍａｓｓ％の燐酸や、蟻酸、酢酸、クエン酸などの有機酸や硫酸の水溶液やクロム酸燐酸混合水溶液を用いることができる。１回目のエッチング工程（予備ポーラスアルミナ層６９を除去する工程）と、２回目のエッチング工程（ミクロな凹部６４ｐ２の開口を拡大する工程）とは、例えば同じエッチング液（同じ種類、同じ濃度、同じ温度のエッチング液）を用いて行うことができる。２回目のエッチング工程によって、稜線６４ｄおよび尖状突起６４ｃの断面形状をより先鋭にする（尖らせる）ことによって、表面積が拡大され、ポーラスアルミナ層６４の表面の撥水性が向上され得る。なお、２回目のエッチング工程は省略可能である。

[0101] このようにして、ドロップ培養法に用いられる固体表面を有するポーラスアルミナ層６４が形成される。

[0102] 図６Ｅに示すポーラスアルミナ層６４において、凹部６４ｐ１の隣接間距離Ｄ０、ミクロな凹部６４ｐ２の隣接間距離Ｄ０および凹部６４ｐ１の２次元的な大きさＤｐ１は、例えば１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下であり、ミクロな凹部６４ｐ２の２次元的な大きさＤｐ２は、例えば５ｎｍ以上５００ｎｍ以下である。ポーラスアルミナ層６４は、ポーラス層６４ａ（厚さｔｓ）と、バリア層（ミクロな凹部６４ｐ２の底部）６４ｂ（厚さｔｂ）とを有している。ポーラス層６４ａは、アルミニウム残存層６８ｒの表面が有する凹部６８ｐが反映された凹部６４ｐ１と、アルミニウム残存層６８ｒを陽極酸化することによって形成されるミクロな凹部（細孔）６４ｐ２とを有する。ポーラス層６４ａの厚さｔｓは、凹部６４ｐ１の深さＤｄ１およびミクロな凹部６４ｐ２の深さＤｄ２の和に相当する。凹部６４ｐ１の深さＤｄ１は、例えば５ｎｍ以上５００ｎｍ以下であり、ミクロな凹部６４ｐ２の深さＤｄ

２は、例えば５０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下である。ポーラス層６４ａの厚さｔｓは、例えば５５ｎｍ以上１５００ｎｍ以下である。なお、陽極酸化工程において形成される陽極酸化皮膜は元のアルミニウムよりも体積が大きいことがあるので、ポーラスアルミナ層６４の厚さは、元のアルミニウム層の厚さ（例えば１０００ｎｍ）よりも大きくなることがある。

[0103] アルミニウム残存層６８ｒの陽極酸化およびエッチングを交互に複数回ずつ行ってもよい。陽極酸化工程およびエッチング工程のどちらで終わってもよい。ポーラスアルミナ層を型として用いて反射防止膜を形成する場合は、陽極酸化工程で終わることが好ましい。すなわち、凹部の底部を点にできるので、先端が尖った凸部を形成することができる型が得られるためである。しかしながら、ポーラスアルミナ層をドロップ培養法に用いる場合は、凹部の底部の形状は細胞培養に影響しないので、陽極酸化工程で終わる必要がない。

[0104] ポーラスアルミナ層の表面を用いてドロップ培養法を行う前に、ポーラスアルミナ層の表面を滅菌処理することが好ましい。滅菌処理は、ポーラスアルミナ層の表面形状を変形させない処理、すなわち、ポーラスアルミナ層の凹部を封孔しない処理であればよく、例えばＵＶ滅菌、酸化エチレンガス（ethylene oxide gas：ＥＯＧ）滅菌、γ線滅菌を行うことができる。

[0105] なお、ポーラスアルミナ層を用いた細胞培養は知られているが（例えば特許文献１０）、本発明の実施形態によるドロップ培養法を行うためには、ポーラスアルミナ層の表面の形状や化学的性質をドロップ培養に好適なように調整する必要がある。例えば、ポーラスアルミナ層の表面が適度な撥水性を有するように、ポーラスアルミナ層の表面に離型処理を行ってもよい。離型処理によって、後に示すように、ポーラスアルミナ層の表面の化学的性質（例えば接触角）を調整することができる。また、離型剤に限られず、表面処理剤をポーラスアルミナ層の表面に付与することによって、ポーラスアルミナ層の表面の化学的性質を調整することができる。

[0106] 本発明者は、ドロップ培養法によって得られるスフェロイドの組織再現性

に寄与する要因の一つとして、細胞の固体表面への接着の程度（強さ）があることを見出した。本発明者の検討によると、細胞種にも依存するが、細胞（細胞の仮足）の固体表面への接着が弱すぎると、得られたスフェロイドの組織再現性が低い傾向が見られた。以下で実験例を示すように、上記のポーラスアルミナ層をドロップ培養法に用いる場合は、ポーラスアルミナ層の離型処理に用いる離型剤の種類やポーラスアルミナ層の表面の撥水性によって、細胞の固体表面への接着性が変化することが認められた。

[0107] （実験例２）

ドロップ培養法の固体表面として用いられるポーラスアルミナ層の表面について、細胞が適度な接着性を有するポーラスアルミナ層を検討した結果を説明する。

[0108] 図６Ａ～図６Ｅ、図７Ａおよび図７Ｂを参照しながら説明した方法を用いて、図６Ｅと同様の構造を有する試料サンプルＮｏ．１０１～１０５を作製した。試料サンプルＮｏ．１０１～１０５のそれぞれは、ガラス基板６２と、ガラス基板６２上に形成されたポーラスアルミナ層６４とを有する。表１３に示すように、試料サンプルＮｏ．１０１～１０４は、離型処理に用いた離型剤の種類においてのみ互いに異なり、試料サンプルＮｏ．１０５は、試料サンプルＮｏ．１０１～１０４とは異なる条件でポーラスアルミナ層６４を形成した。各試料サンプルを作製するために、ガラス基板（ＡＧＣ株式会社製、製品名：ＡＮ１００、無アルカリガラス、厚さ０．７ｍｍ）６２上にスパッタ法で形成されたアルミニウム膜６８（厚さ：１０００ｎｍ）を用いた。アルミニウム膜は、スパッタ装置（キヤノンアネルバ株式会社製、製品名：Ｃ－３５００）を用いてガラス基板上に成膜した。株式会社アルバック製のアルミニウムターゲット（純度９９．９９９％）を用いて、電圧５００Ｖ電流４００Ａで、非加熱で間欠的に堆積することによってアルミニウム膜を得た。間欠的に堆積するとは、具体的には、ある厚さまで堆積した段階で中断し、ある時間が経過した後に、堆積を再開するという工程を繰り返して、所望の厚さ（例えば１μｍ）のアルミニウム膜を得ることをいう。非加熱

で間欠的に成膜を行うことによって、ガラス基板の表面温度が不必要に上昇することを抑制し、その結果、アルミニウム膜の表面のグレイン（結晶粒）のサイズのばらつきを抑えることができる。

[0109] ガラス基板６２上にアルミニウム膜６８を形成した後の、各試料サンプルの製造工程（すなわち、陽極酸化工程、エッチング工程および離型処理工程）の条件を表１３に示す。表１３中、１回目の陽極酸化工程は、図６Ｂに示した予備ポーラスアルミナ層６９を形成する工程であり、１回目のエッチング工程は、図６Ｃに示した、予備ポーラスアルミナ層６９を実質的に完全に除去する工程であり、２回目の陽極酸化工程は、アルミニウム残存層６８ｒを陽極酸化することによって、図６Ｄに示したポーラスアルミナ層６４を形成する工程であり、２回目のエッチング工程は、図６Ｅに示した、ポーラスアルミナ層６４をエッチャントに接触させる工程である。各試料サンプルのポーラスアルミナ層６４は、アルミニウム残存層６８ｒに対して陽極酸化およびエッチングを１回ずつ行うことによって得た。

[0110] 表１３の「電極間距離」は、陽極酸化工程における、陰極と試料サンプル（陽極）との間の距離を示す。表１３の「導線接続」は、試料サンプル（陽極）と陽極酸化処理電源との接続方法であり、アルミニウム膜の表面（すなわち、１回目の陽極酸化工程ではアルミニウム膜６８の表面６８ｓ、２回目の陽極酸化工程ではアルミニウム残存層６８ｒの表面）と導線との接続の方法を示す。「導線半田付け」とは、陽極酸化処理電源に接続された導線をアルミニウム膜の表面に半田付けにより接続する方法であり、「アルミホイル＋クリップ」とは、アルミニウム膜の表面の一部にアルミホイルをクリップで挟んで面接触させ、アルミホイルと陽極酸化処理電源とを接続する方法である。

[0111]

[表13]

	試料サンプル No.	101-104	105
陽極酸化 [1 回目] (電解液：シュウ酸水溶液)	シュウ酸濃度[質量%]	0.30	0.30
	シュウ酸温度[℃]	30	10
	電圧[V]	80	80
	時間[min]	2	10
	電極間距離[mm]	120	150
	導線接続	導線半田付け	アルミホイル＋クリップ
エッチング [1 回目] (エッチング液：リン酸水溶液)	リン酸濃度[質量%]	9.6	9.6
	リン酸温度[℃]	30	30
	時間[min]	150	150
陽極酸化 [2 回目] (電解液：シュウ酸水溶液)	シュウ酸濃度[質量%]	0.30	0.30
	シュウ酸温度[℃]	30	10
	電圧[V]	80	80
	時間	0.02A を超えない間	0.02A を超えない間
	電極間距離[mm]	120	150
	導線接続	導線半田付け	アルミホイル＋クリップ
エッチング [2 回目] (エッチング液：リン酸水溶液)	リン酸濃度[質量%]	9.6	9.6
	リン酸温度[℃]	30	30
	時間[min]	5	5
	撹拌	有	無
離型処理	前処理	ハンドシャワー	ハンドシャワー
	離型剤	No.101:FAS3 No.102:FAS9 No.103:FAS13 No.104:FAS17	FAS17

[0112] 離型剤として、以下のフルオロアルキルシラン（ＦＡＳ）を用いた。ＦＡＳ３（3,3,3-トリフルオロプロピルトリメトキシシラン）、ＦＡＳ９（ノナフルオロヘキシルトリメトキシシラン）、ＦＡＳ１３（トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチルトリメトキシシラン）およびＦＡＳ１７（ヘプタデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロデシルトリメトキシシラン）を用いた。フルオロアルキルシランは、パーフルオロアルキル基（－（CF_2）$_p$－基）を有する。ＦＡＳ３、ＦＡＳ９、ＦＡＳ１３およびＦＡＳ１７の化学式は、CF_3－（CF_2）$_p$－（CH_2）$_2$Ｓｉ（OCH_3）$_3$で表される。ここで、ＦＡＳ３、ＦＡＳ９、ＦＡＳ１３およびＦＡＳ１７において、それぞれ、ｐ＝０、ｐ＝３、ｐ＝５およびｐ＝７である。

[0113] 離型処理は、化学気相蒸着により行った。テフロン（登録商標）製の密閉容器の中に、フルオロアルキルシラン（離型剤）を入れたビーカーとポーラ

スアルミナ層６４を有する試料サンプルとを入れて密閉し、密閉した容器を電気炉中で加熱し、１５０℃で１時間保持した。このようにして、フルオロアルキルシランを蒸発させ、試料サンプル上（すなわちポーラスアルミナ層６４の表面上）にフルオロアルキルシランを化学気相蒸着させた。

[0114] 離型剤の撥水性を調べるために、平坦な表面上に各離型剤を付与し、離型剤が付与された表面の撥水性および撥油性を調べた。結果を表１４に示す。平坦な表面として、表１３に示した試料サンプルＮｏ．１０１～１０４の陽極酸化［１回目］までの処理条件と同一の処理を行うことによって得たポーラスアルミナ層の表面を用いた。すなわち、ここで用いたポーラスアルミナ層は、図６Ｂに示した予備ポーラスアルミナ層６９と同様の構造を有する。予備ポーラスアルミナ層６９の表面は複数の凹部６９ｐを有するが、複数の凹部６９ｐの２次元的な大きさＤ６９ｐは、凹部６９ｐの隣接間距離Ｄ０よりも小さく（Ｄ６９ｐ＝約１０ｎｍ、Ｄ０＝約２００ｎｍ）、かつ、予備ポーラスアルミナ層６９の表面は、凹部６９ｐと凹部６９ｐの間に平坦部を有する。このように、予備ポーラスアルミナ層６９の表面は、ポーラスアルミナ層６４の表面よりも平坦性が高く、接触角の測定においてはほぼ平坦な表面とみなすことができる。接触角の測定は、一般的な、θ／２法（ｈａｌｆ－ａｎｇｌｅ Ｍｅｔｈｏｄ：（θ／２＝ａｒｃｔａｎ（ｈ／ｒ）、θ：接触角、ｒ：液滴の半径、ｈ：液滴の高さ））で行った。接触角の測定に用いた純水およびヘキサデカンの液量は１μＬとした。また、滑落角の測定には、純水２０μＬの液滴を用いた。滑落角とは、液滴が付着した表面を水平方向から傾斜させ、液滴が下方に滑り始めた傾斜角をいう。

[0115] 表１４から分かるように、離型剤が付与された平坦な表面の水に対する接触角およびヘキサデカンに対する接触角は、ともに、ＦＡＳ１７が最も大きく、ＦＡＳ１３、ＦＡＳ９、ＦＡＳ３の順に小さくなる。すなわち、離型剤ＦＡＳ３が付与された表面の撥水性および撥油性が最も低く、離型剤ＦＡＳ１７が付与された表面の撥水性および撥油性が最も高い。

[0116]

[表14]

	平坦な表面での評価		
離型剤	接触角[°]（水 1μL）	接触角[°]（ﾍｷｻﾃﾞｶﾝ 1μL）	滑落角[°]（水 20μL）
FAS3	81.5	38.6	64.3
FAS9	101.5	60.6	52.7
FAS13	106.4	64.5	46.3
FAS17	107.3	66.5	36.9

[0117] 図８Ａ～図８Ｅは、試料サンプルＮｏ．１０１～１０５（離型処理後）のＳＥＭ像をそれぞれ示す。図８Ａ～図８Ｅのそれぞれについて、左上および右上は、ポーラスアルミナ層の表面ＳＥＭ像（５００００倍）であり、左上は表面の法線方向から観察した表面ＳＥＭ像であり、右上は表面の法線方向から４５°傾いた角度から観察した表面ＳＥＭ像である。左下および右下は、それぞれの試料サンプルの断面ＳＥＭ像であり、右下は断面に垂直な方向から観察した断面ＳＥＭ像（３００００倍）であり、左下は断面に垂直な方向から４５°傾いた角度から観察した断面ＳＥＭ像（２００００倍）である。

[0118] 表１５に、各試料サンプルのポーラスアルミナ層６４の表面構造をＳＥＭ像から求めた結果を示す。面積あたりのミクロな凹部６４ｐ２の数は、表面ＳＥＭ像を用いて画像処理によりカウントした。ミクロな凹部６４ｐ２の平均ピッチは孔数から算出した。ポーラス層６４ａの厚さｔｓは、断面ＳＥＭ像から求めた。なお、ポーラスアルミナ層６４の厚さは、元のアルミニウム層の厚さの１．５倍程度にまで膨張し得るので、ポーラス層６４ａの厚さｔｓがアルミニウム層の厚さ（ここでは１０００ｎｍ）よりも大きい場合がある。

[0119] 表１５には、各試料サンプルのポーラスアルミナ層６４の表面（ドロップ培養法における固体表面）を特徴付けるパラメータとして、実験例１と同様の方法で接触角および滑落角を測定した結果もあわせて示す。ここでは、純水またはヘキサデカンを用いた接触角の測定には、それぞれの１μＬの液滴を用い、滑落角の測定には２０μＬの純水の液滴を用い、滑落角は着滴から

６０秒後の値で評価した。接触角は、表１４に示した平坦な表面の評価結果と同様の傾向が見られ、離型剤ＦＡＳ３が付与された表面の撥水性および撥油性が最も低く、離型剤ＦＡＳ１７が付与された表面の撥水性および撥油性が最も高かった。

[0120] 表１５には、各試料サンプルのポーラスアルミナ層６４の波長５５０ｎｍにおける透過率を測定した結果も示す。紫外可視近赤外分光光度計V7100（日本分光株式会社製）を用いて波長５５０ｎｍの透過率を測定した。波長５５０ｎｍにおけるポーラスアルミナ層６４の透過率は、試料サンプルＮｏ．１０１～１０４ではいずれも５０％程度だった。表１４に示したように、試料サンプルＮｏ．１０１～１０４は、同じ陽極酸化工程およびエッチング工程を用いて作製されたものである。ポーラスアルミナ層の透過率は離型剤の種類によってほとんど変化しないことが分かる。波長５５０ｎｍにおけるポーラスアルミナ層の透過率は、例えば４０％以上であることが好ましい。

[0121] [表15]

試料サンプル No.	101	102	103	104	105
面積あたりのミクロな凹部64p2の数 [個/mm^2]	156	-	-	-	162
ミクロな凹部64p2の平均ピッチ [nm]	170	-	-	-	167.0
ポーラス層64aの厚さts [μm]	0.96	1.03	1.12	1.12	0.627
接触角 [°]（純水 1μL）	108.5	128.6	127.5	129.6	127.3
接触角 [°]（ﾍｷｻﾃﾞｶﾝ 1μL）	57.2	85.0	90.6	91.6	83.7
滑落角 [°]（純水 20μL）	90	90	90	90	90
透過率（波長 550nm）	52%	50%	49%	50%	32%

[0122] 表１６および図９に、試料サンプルＮｏ．１０１～１０４の表面を用いたドロップ培養法によって細胞を培養した結果を示す。図９は、ドロップ培養法で得られたスフェロイドの光学顕微鏡像（左上：試料サンプルＮｏ．１０１、右上：試料サンプルＮｏ．１０２、左下：試料サンプルＮｏ．１０３、右下：試料サンプルＮｏ．１０４）である。

[0123] ドロップ培養法は、実験例１と同様の条件（ＨｅｐＧ２細胞、１×１０^{5}細胞／ｍＬ、培地の液滴の体積２５μＬ）で行った。

[0124] 表１６の「スフェロイド大きさ」は、スフェロイド（細胞集塊）を上から見たときの面積円相当径のうち最も大きいものを、+／++／+++の３段階で評価した。+：面積円相当径が７０μｍ未満、++：面積円相当径が７０μｍ以上２００μｍ未満、+++：面積円相当径が２００μｍ以上とした。

[0125] 表１６の「スフェロイド高さ」は、スフェロイド（細胞集塊）の高さを、上から見たときの黒さ（色の濃さ）の程度によって評価した。上から見たときに黒いほど（色が濃いほど）、高さは大きいと評価した。+／++／+++の３段階で評価した。

[0126] 表１６の「スフェロイド均一性」は、スフェロイド（細胞集塊）の、上から見たときの面積のばらつきを、+／++／+++の３段階で評価した。

[0127] 表１６の「孤立細胞数量」は、孤立細胞の数を、+／++／+++の３段階で評価した。ここで、複数の細胞が集まって（結合して）構成されるスフェロイド（細胞集塊）に対し、細胞同士が集まらず（結合せず）、ばらばらに存在している細胞を孤立細胞と定義した。+：孤立細胞数１００個以上、++：孤立細胞数３０個以上１００個未満、+++：孤立細胞数３０個未満とした。図９の左上および右上の光学顕微鏡像中に、スフェロイド（細胞集塊）の例を実線丸印で示し、孤立細胞の例を点線丸印で示している。

[0128] 表１６の「仮足成長」は、スフェロイド（細胞集塊）から延びる繊維状の仮足の長さを+／++／+++の３段階で評価した。×は、仮足が観察されなかったことを示す。

[0129] 表１６の「固体表面の細胞に対する接着性」は、細胞の固体表面への接着の程度（強さ）を、以下のように評価した結果である。培地交換時毎（２４時間毎）に意図的に培養容器に振動を加えた（培養容器を揺らした）。３日間培養した後、細胞の培養容器に対する接着の程度および細胞の仮足の有無を目視で観察した。固体表面（培養容器）への細胞の接着の程度を以下の基準で評価し、固体表面が有する細胞に対する接着性の程度として表した。

×：仮足は観察されず、かつ、培養容器に振動を与えた状態を観察した際、細胞の移動が見られた。すなわち、振動による培地（液滴）の揺れによって細胞が固体表面から離れて移動した。

△：一部仮足は観察されるが、培養容器に振動を与えた状態を観察した際、細胞の移動が見られた。

○：仮足は観察されるが、培養容器に振動を与えた状態を観察した際、細胞の移動が見られた。ただし、強制的に振動を与えず、容器を軽く動かしただけでは細胞は移動しなかった。

◎：仮足は観察され、かつ、培養容器に振動を与えた状態を観察した際、細胞の移動が見られなかった。

[0130] 離型剤ＦＡＳ３を用いた試料サンプルＮｏ．１０１においては、細胞の仮足が成長していることが認められ、かつ、細胞の仮足が固体表面に対して適度な強さで接着されていることが認められた。これに対して、離型剤ＦＡＳ９、ＦＡＳ１３およびＦＡＳ１７がそれぞれ用いられた試料サンプルＮｏ．１０２～１０４においては、細胞仮足が成長しておらず、かつ、細胞の仮足が固体表面に対して適度な強さで接着されていなかった。試料サンプルＮｏ．１０２～１０４の表面の撥水性が高すぎることに起因して、細胞の固体表面に対する接着性が弱いと考えられる。試料サンプルＮｏ．１０１で得られたスフェロイドの大きさの均一性は、試料サンプルＮｏ．１０２～１０４に比べて高かった。スフェロイドの大きさの均一性の観点からは、フッ素系離型剤として、例えば、パーフルオロアルキル基（－（CF_2）$_p$－基、ｐは０以上２以下の整数）を有するフッ素化合物を含むフッ素系離型剤を用いることが好ましいことが分かる。このようなフッ素系離型剤を用いることによって、固体表面が適度な撥水性および撥油性を有することができる。固体表面の水に対する接触角は、例えば１０８°以上１２８°以下である。固体表面のヘキサデカンに対する接触角は、例えば５７°以上８５°以下である。

[0131] 試料サンプルＮｏ．１０２～１０４では、得られたスフェロイドの大きさの均一性は試料サンプルＮｏ．１０１よりも低いものの、より大きいスフェ

ロイドが得られる傾向にあった。なお、用途によっては均一な大きさのスフェロイドが得られることが好ましい場合もあるし、スフェロイドが大きいほど好ましい場合（例えば非接着型細胞（造血細胞））もある。スフェロイドの用途によって、ドロップ培養法に用いられる固体表面を選択し、固体表面の化学的性質（例えば接触角）を調整すればよい。

[0132] [表16]

試料サンプルNo.	離型剤	スフェロイド大きさ	スフェロイド高さ	スフェロイド均一性	孤立細胞数量	仮足成長	固体表面の細胞に対する接着性
101	FAS3	++	++	++	+	++	◎
102	FAS9	+++	++	+	++	×	×
103	FAS13	+++	++	+	++	×	×
104	FAS17	+++	++	+	++	×	×

[0133] 上述したように、本発明の実施形態によると、従来の三次元培養法よりも、作業性または量産性に優れた、および／または、組織再現性の高いスフェロイドを得ることができる三次元培養法が提供される。

[0134] 実施例で例示したモスアイ構造を有する表面を備える合成高分子膜の様に、高さが１０ｎｍ以上１ｍｍ以下の複数の凸部を有する固体表面を備える三次元培養構造体は、ドロップ培養法に好適に用いられる。そのような三次元培養構造体は、例えば、シャーレの内側底面に、上記の合成高分子膜を貼り付けることによって得られる。すなわち、三次元培養構造体は、例えばシャーレ等の容器として提供され得る。

[0135] また、そのような三次元培養構造（例えば容器）を用いてドロップ培養を行うことによって、従来よりも組織再現性の高いスフェロイドを表面に有する三次元培養構造（例えば容器）を製造することができる。このようなスフェロイドを表面に有する三次元培養構造は、創薬や再生医療の研究開発に好適に用いられる。

産業上の利用可能性

[0136] 本発明の実施形態による三次元細胞培養法は、創薬や再生医療等に広く用いられ得る。

符号の説明

[0137] １０Ｓ　固体表面

１０Ｓｐ　凸部

１２Ｃ　細胞

１４Ｍ　培地

１６Ｄ　液滴

請求の範囲

[請求項1] 細胞と培地とを含む細胞懸濁液を用意する工程と、

複数の第１凹部を有するポーラスアルミナ層から形成された固体表面を用意する工程と、

前記固体表面上に、前記細胞懸濁液の液滴を付着させる工程と、

前記液滴に作用する重力の方向が前記固体表面に向かう状態で、前記細胞を前記液滴中で培養する工程と

を包含する、三次元培養法。

[請求項2] 前記ポーラスアルミナ層の表面は、前記複数の第１凹部と、隣接する前記複数の第１凹部の側面が交わることにより形成された第１稜線と、それぞれが前記複数の第１凹部のいずれかの中に形成された複数のミクロな凹部とを有する、請求項１に記載の三次元培養法。

[請求項3] 前記ポーラスアルミナ層を形成する工程は、

透明基材上のアルミニウム膜を部分的に陽極酸化することによって、予備ポーラスアルミナ層を形成する工程（ａ）と、

前記工程（ａ）の後に、前記予備ポーラスアルミナ層をエッチング液に接触させることによって、前記予備ポーラスアルミナ層を実質的に完全に除去する工程（ｂ）と、

前記工程（ｂ）の後に、前記アルミニウム膜のうち陽極酸化されずに残ったアルミニウム残存層を陽極酸化する工程（ｃ）と

を包含し、

前記アルミニウム残存層の表面は、複数の第２凹部と、隣接する前記複数の第２凹部の側面が交わることにより形成された第２稜線とを有し、

前記複数の第１凹部は、前記複数の第２凹部が反映されたものであり、前記第１稜線は、前記第２稜線が反映されたものであり、

前記工程（ｃ）は、前記アルミニウム残存層を陽極酸化することによって、前記複数のミクロな凹部を形成する工程を包含する、請求項

２に記載の三次元培養法。

[請求項4] 前記工程（ｃ）で行われる陽極酸化工程は、前記工程（ａ）で行われる陽極酸化工程と同じ電解液を用いて行われる、請求項３に記載の三次元培養法。

[請求項5] 前記ポーラスアルミナ層を形成する工程は、

前記工程（ｃ）の後に、前記ポーラスアルミナ層をエッチング液に接触させることによって、前記複数のミクロな凹部を拡大させる工程（ｄ）をさらに包含する、請求項３または４に記載の三次元培養法。

[請求項6] 前記工程（ｄ）で用いられるエッチング液は、前記工程（ｂ）で用いられるエッチング液と同じである、請求項５に記載の三次元培養法。

[請求項7] 前記工程（ｃ）は、前記残ったアルミニウム膜を実質的に完全に陽極酸化する工程を包含する、請求項３から６のいずれかに記載の三次元培養法。

[請求項8] 波長５５０ｎｍにおける前記ポーラスアルミナ層の透過率は、４０％以上である、請求項１から７のいずれかに記載の三次元培養法。

[請求項9] 前記固体表面は、フッ素系離型剤で離型処理されている、請求項１から８のいずれかに記載の三次元培養法。

[請求項10] 前記フッ素系離型剤は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素化合物を含む、請求項９に記載の三次元培養法。

[請求項11] 前記フッ素系離型剤は、パーフルオロアルキル基（－（CF_2）$_p$－基、ｐは０以上２以下の整数）を有するフッ素化合物を含む、請求項９に記載の三次元培養法。

[請求項12] 前記固体表面の水に対する接触角が１０８°以上１２８°以下である、請求項１から１１のいずれかに記載の三次元培養法。

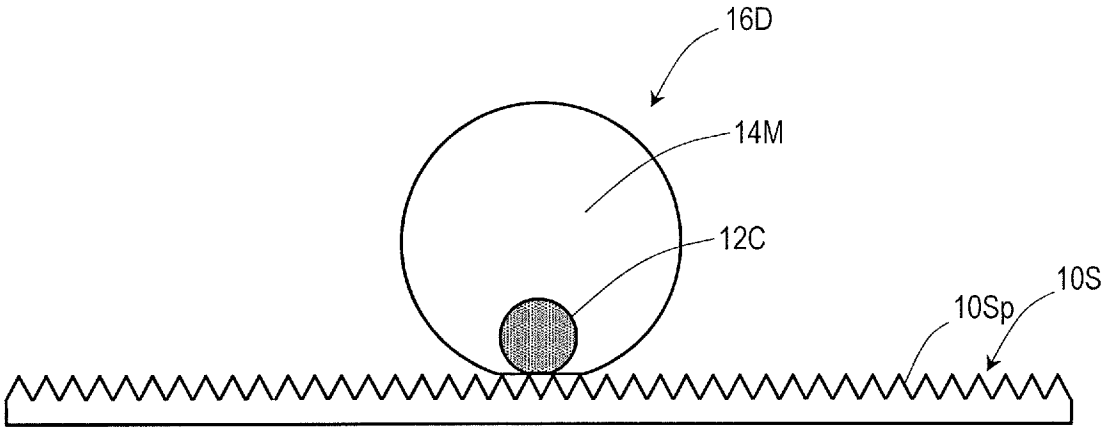
[請求項13] 前記固体表面のヘキサデカンに対する接触角が５７°以上８５°以下である、請求項１から１２のいずれかに記載の三次元培養法。

[請求項14] 請求項１から１３のいずれかに記載の三次元培養法に用いられる固

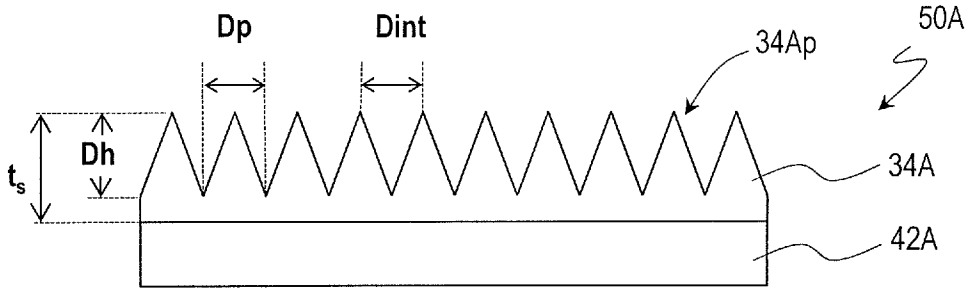
体表面を有する、三次元培養構造体。

[請求項15] 前記固体表面を有する三次元培養構造体を用意し、請求項１から１３のいずれかに記載の三次元培養法を用いて培養されたスフェロイドを前記固体表面に有する三次元培養構造体を製造する方法。

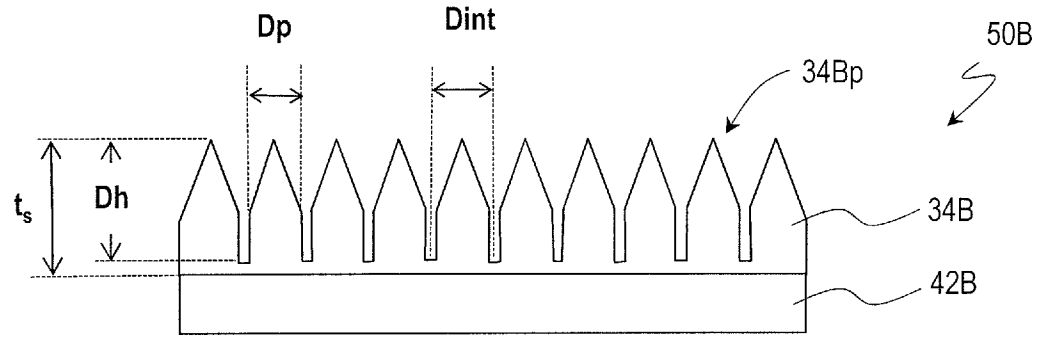
[図1]



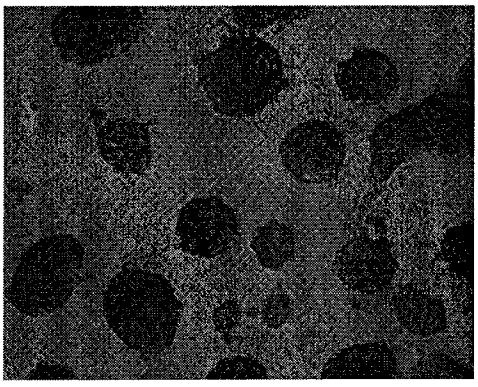
[図2A]

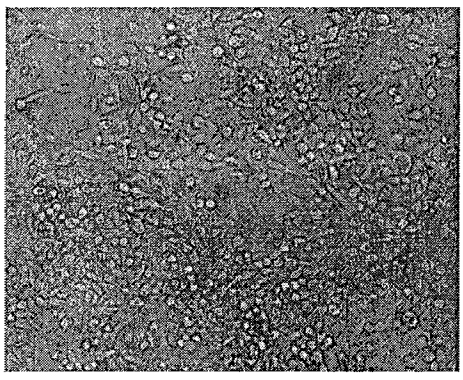


[図2B]

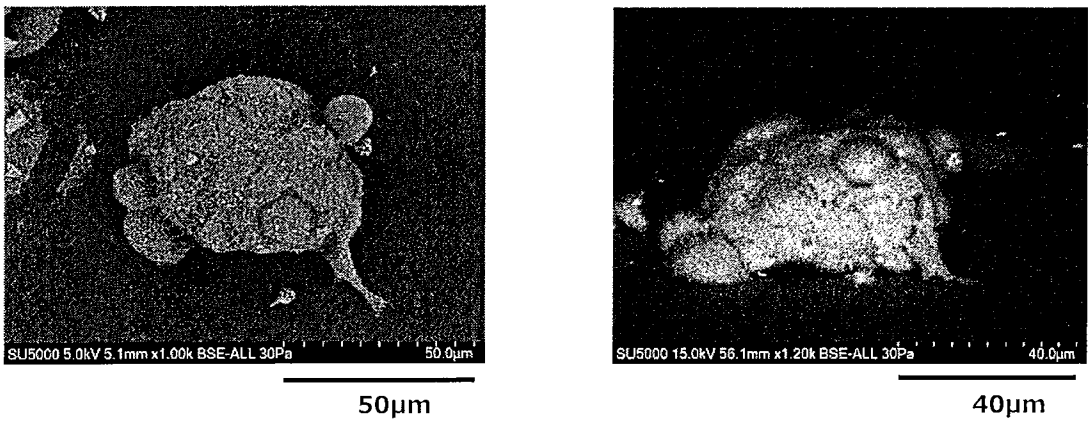


[図3A]

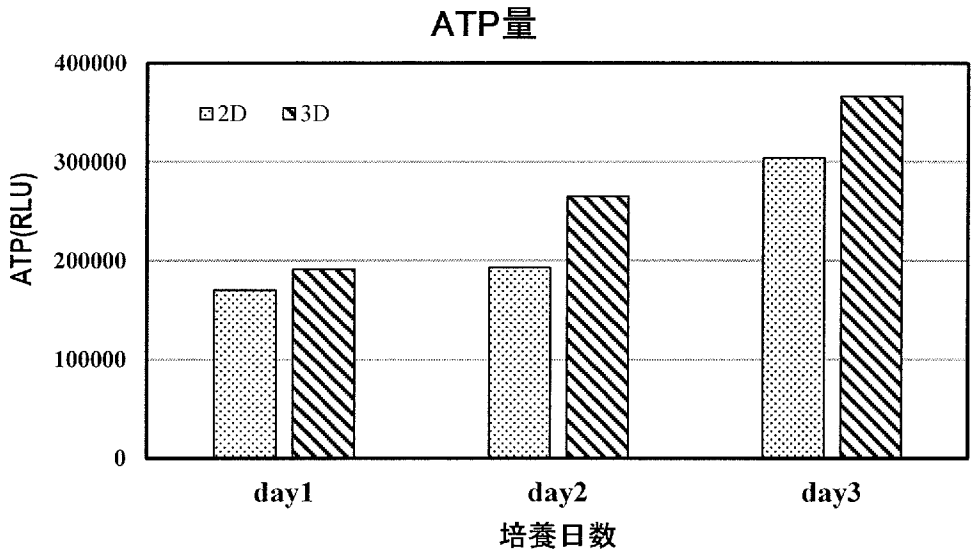




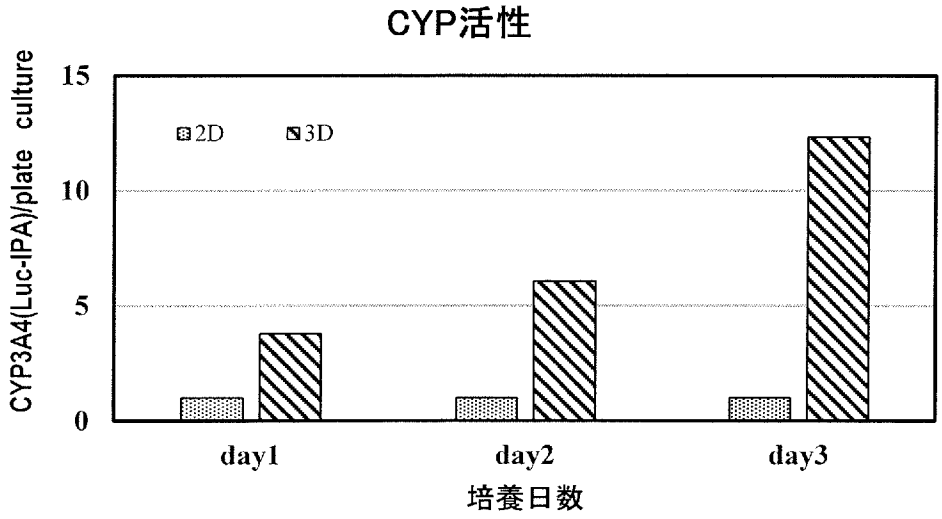
[図3B]


SU5000 5.0kV 5.1mm x1.00k BSE-ALL 30Pa
50.0µm
50µm
SU5000 15.0kV 56.1mm x1.20k BSE-ALL 30Pa
40.0µm
40µm

[図3C]

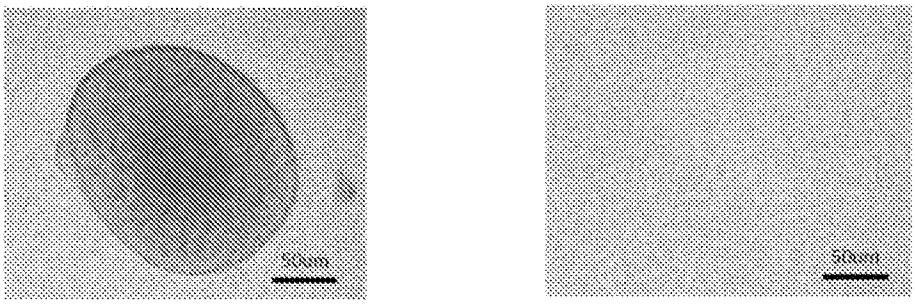

ATP量
400000
300000
200000
100000
0
2D
3D
ATP(RLU)
day1
day2
day3
培養日数

[図3D]


CYP活性
15
10
5
0
2D
3D
CYP3A4(Luc-IPA)/plate culture
day1
day2
day3
培養日数

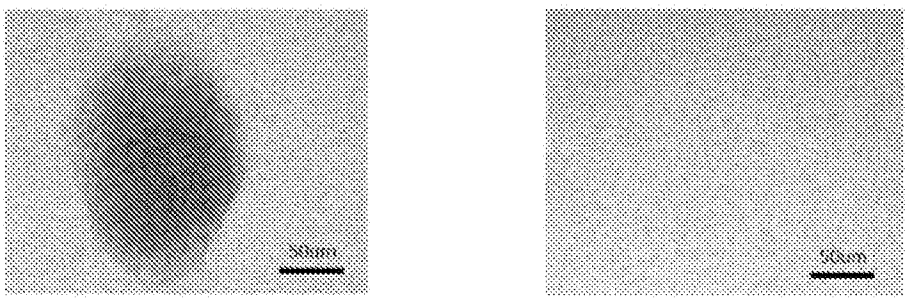
[図4A]

ヒト胎児腎臓上皮細胞HEK293



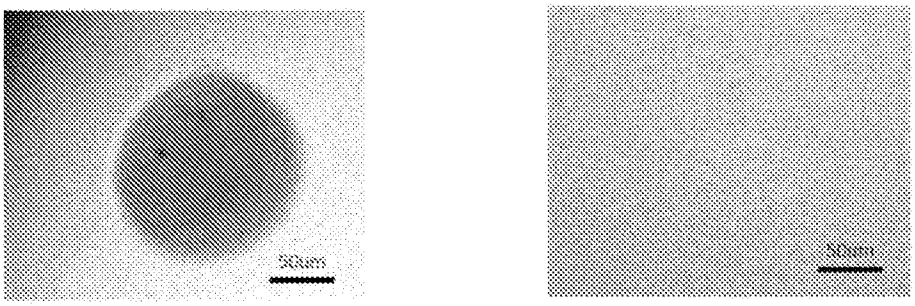
[図4B]

マウス脂肪前駆細胞3T3－L1



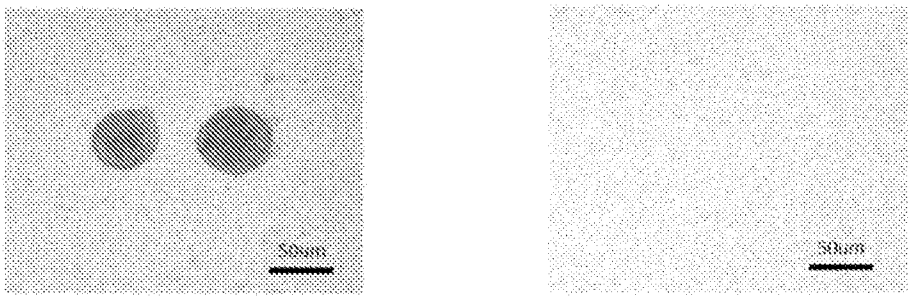
[図4C]

マウス間葉系幹細胞C3H10t1／2

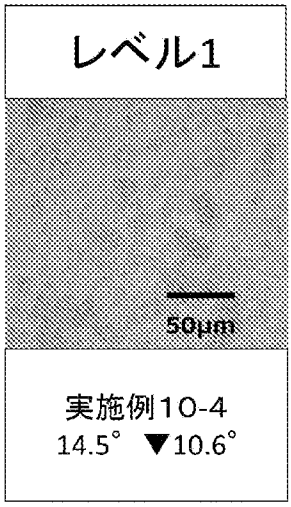


[図4D]

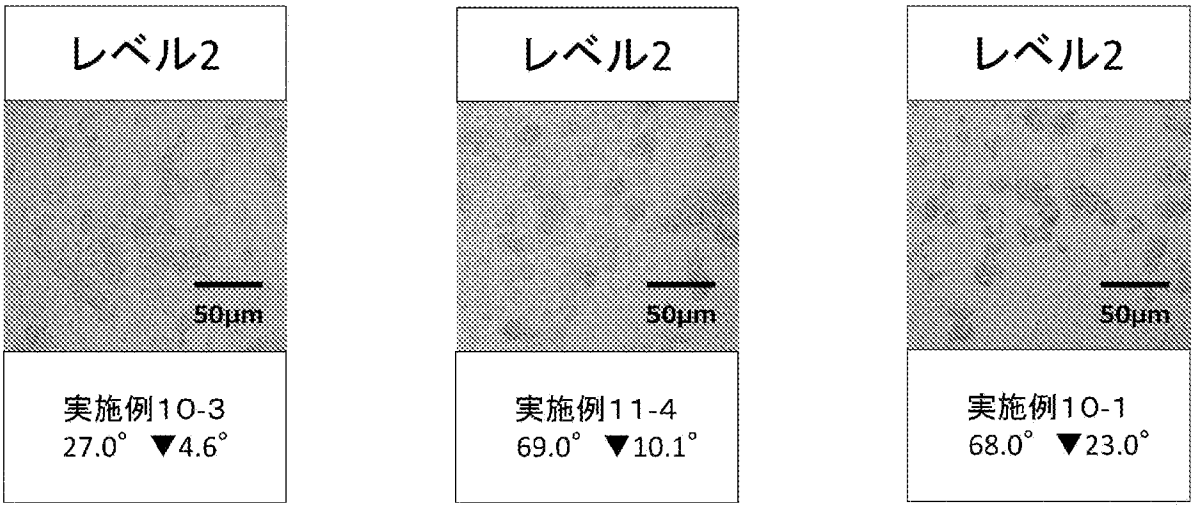
マウス筋芽細胞C2C12



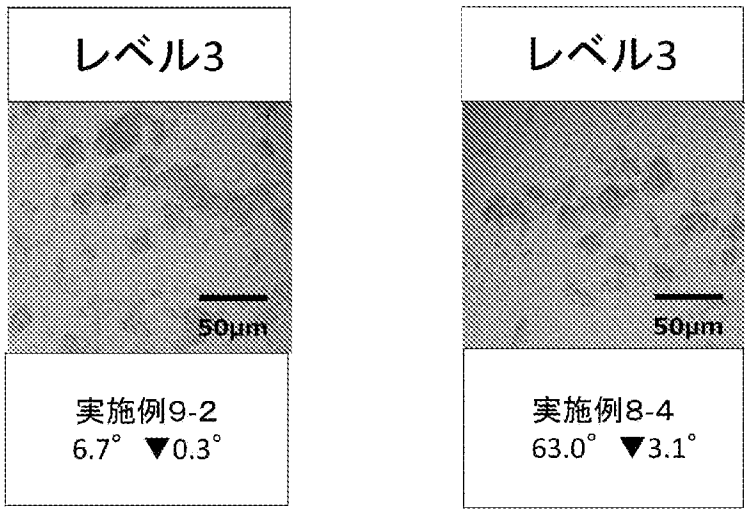
[図5A]


レベル1
50μm
実施例10-4
14.5° ▼10.6°

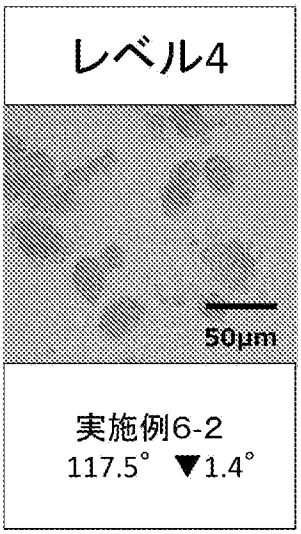
[図5B]


レベル2
50μm
実施例10-3
27.0° ▼4.6°
レベル2
50μm
実施例11-4
69.0° ▼10.1°
レベル2
50μm
実施例10-1
68.0° ▼23.0°

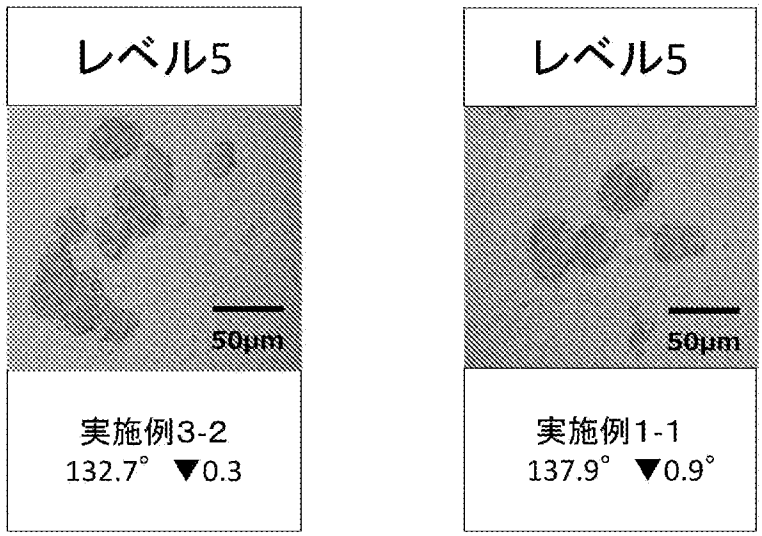
[図5C]


レベル3
50μm
実施例9-2
6.7° ▼0.3°
レベル3
50μm
実施例8-4
63.0° ▼3.1°

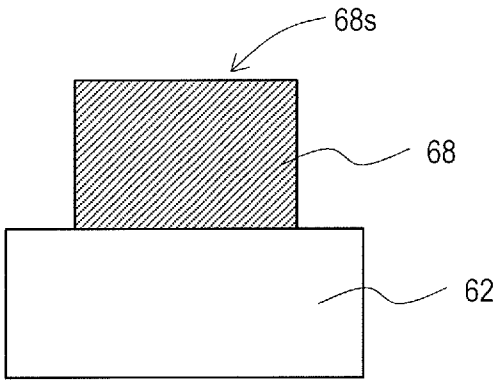
[図5D]


レベル4
50μm
実施例6-2
117.5° ▼1.4°

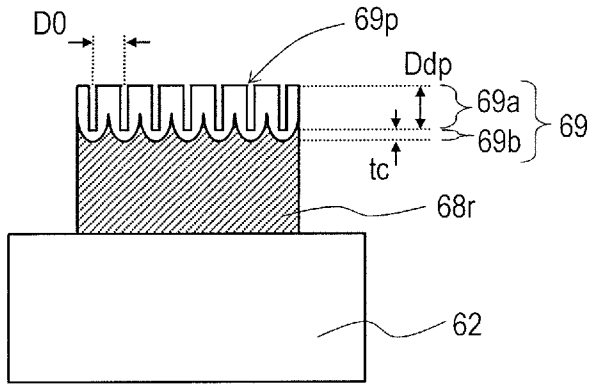
[図5E]


レベル5
50μm
実施例3-2
132.7° ▼0.3
レベル5
50μm
実施例1-1
137.9° ▼0.9°

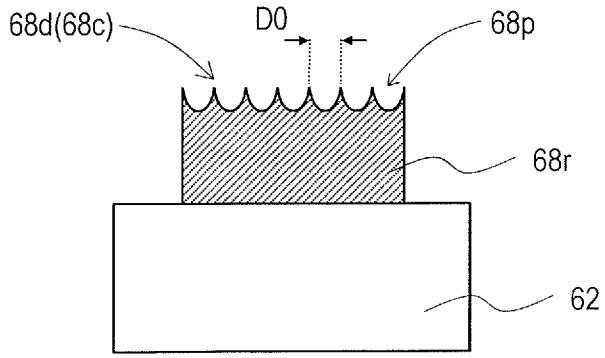
[図6A]


68s
68
62

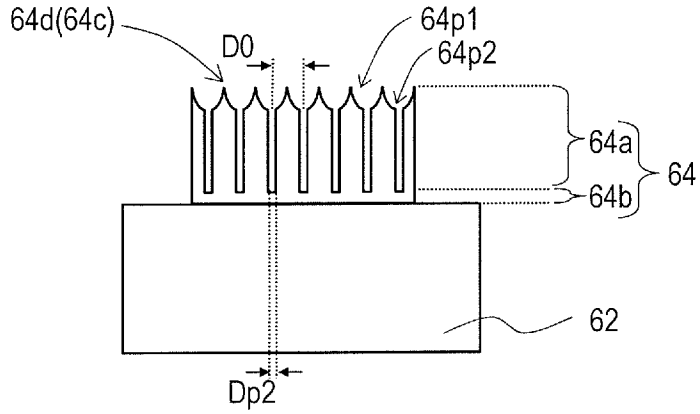
[図6B]



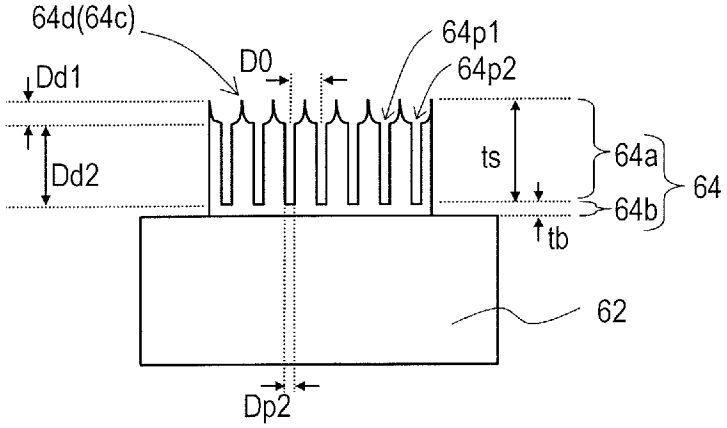
[図6C]



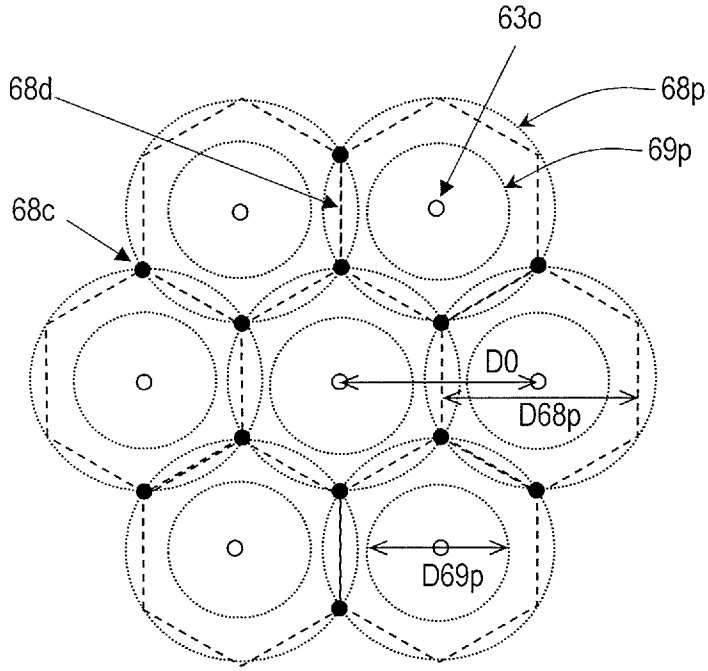
[図6D]



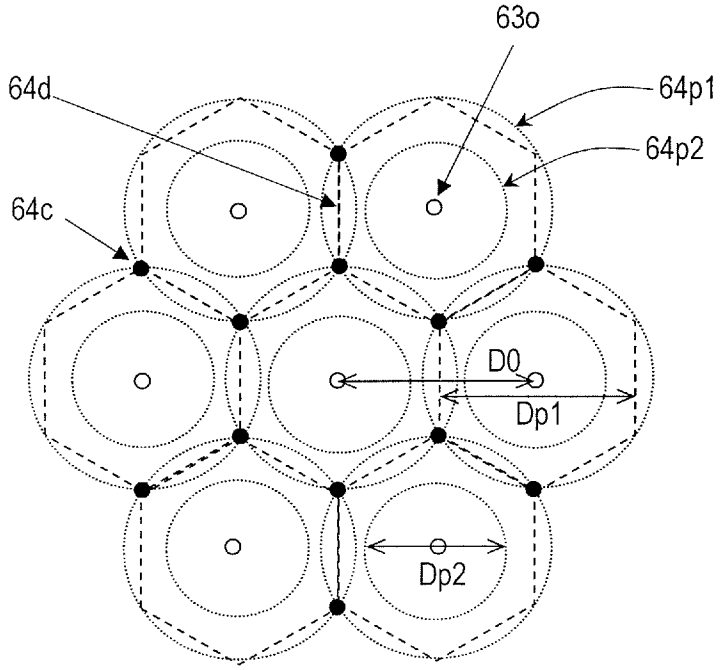
[図6E]



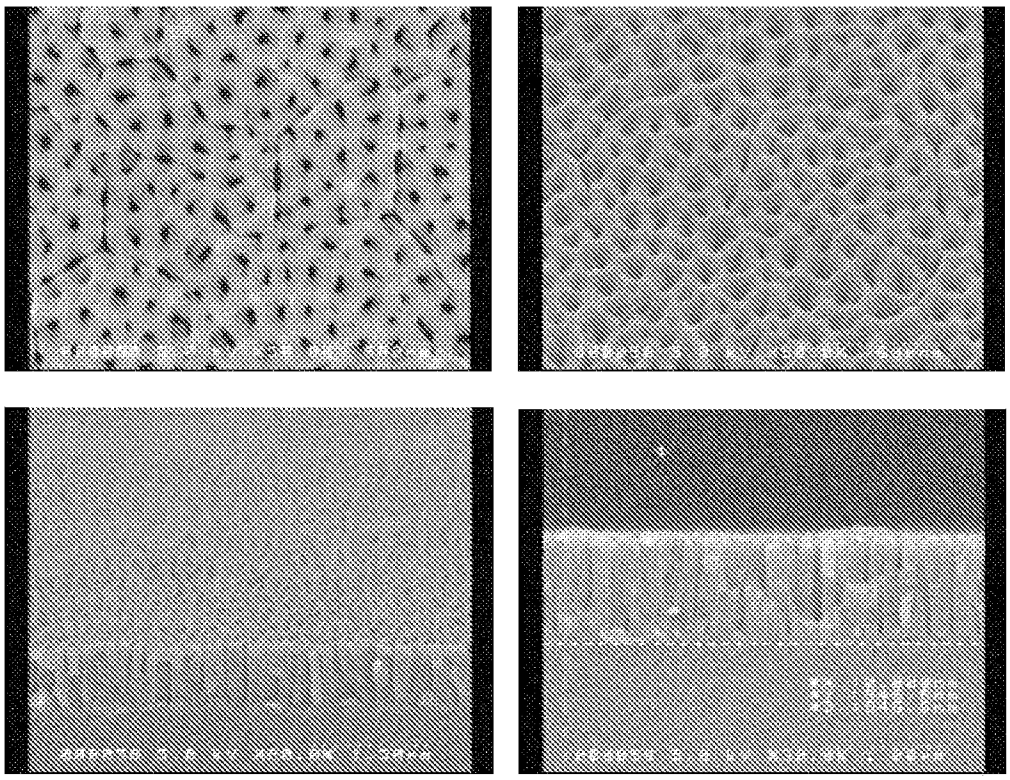
[図7A]


63o
68d
68p
69p
68c
D0
D68p
D69p

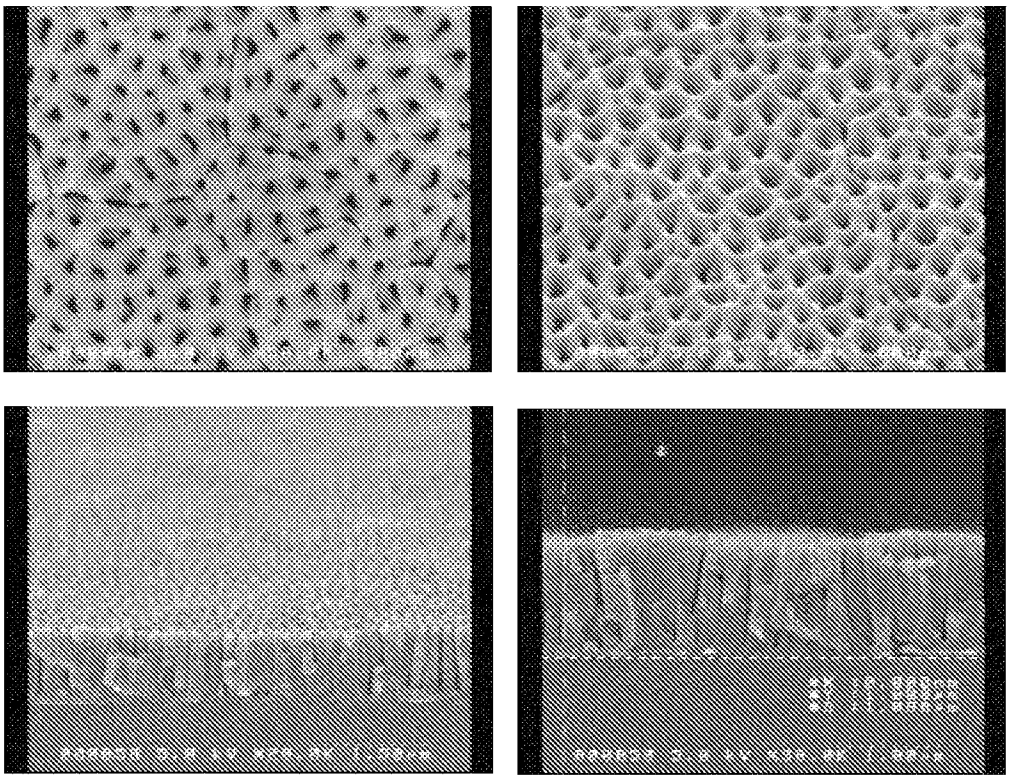
[図7B]


63o
64d
64p1
64p2
64c
D0
Dp1
Dp2

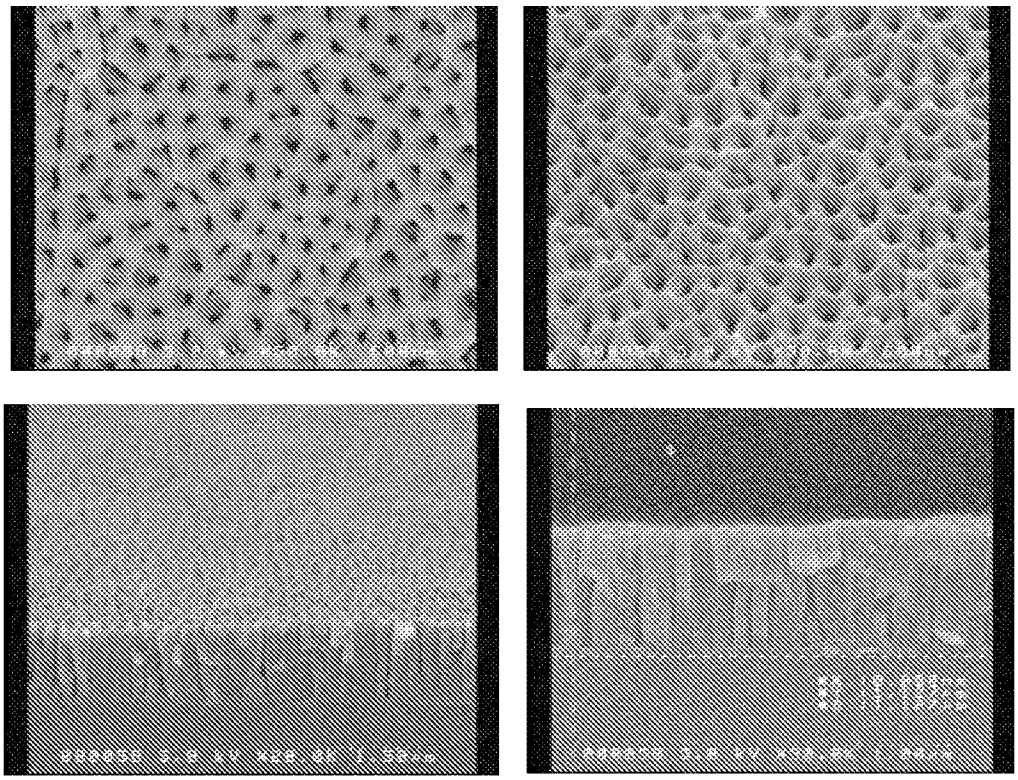
[図8A]



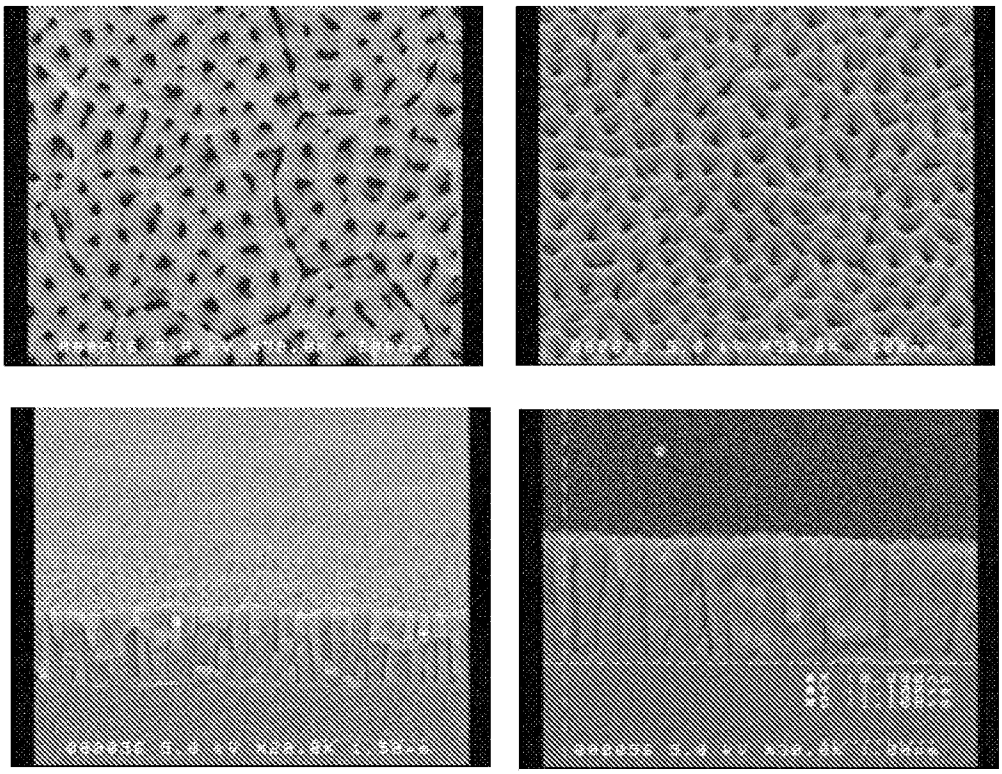
[図8B]



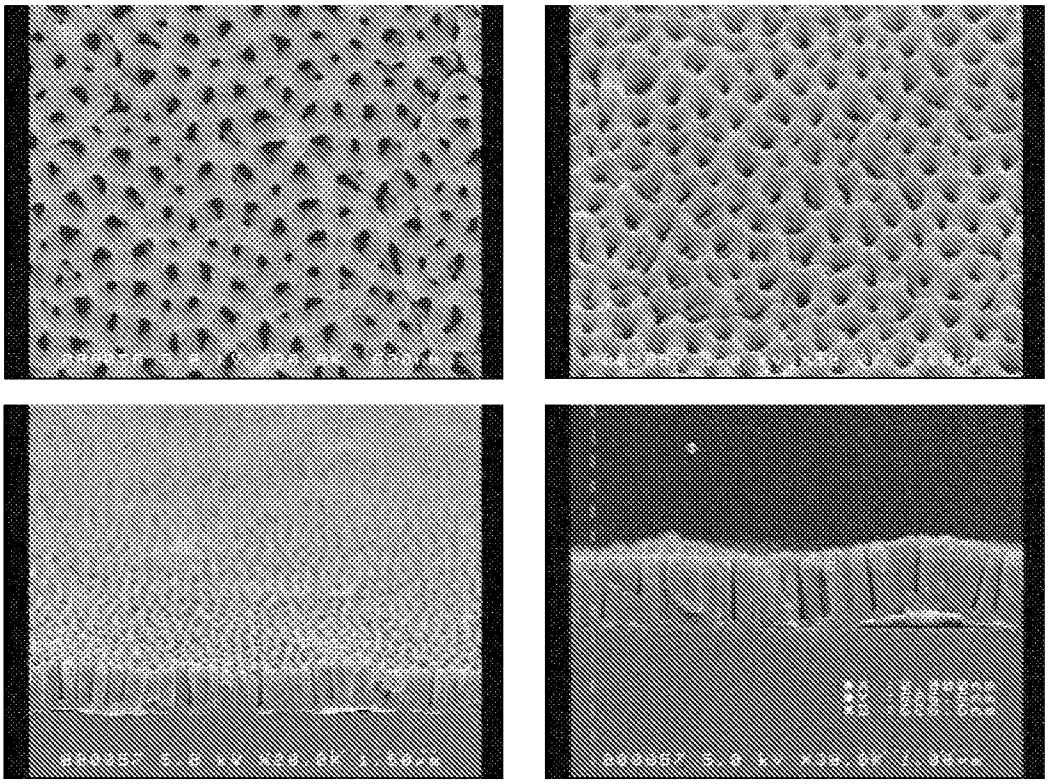
[図8C]



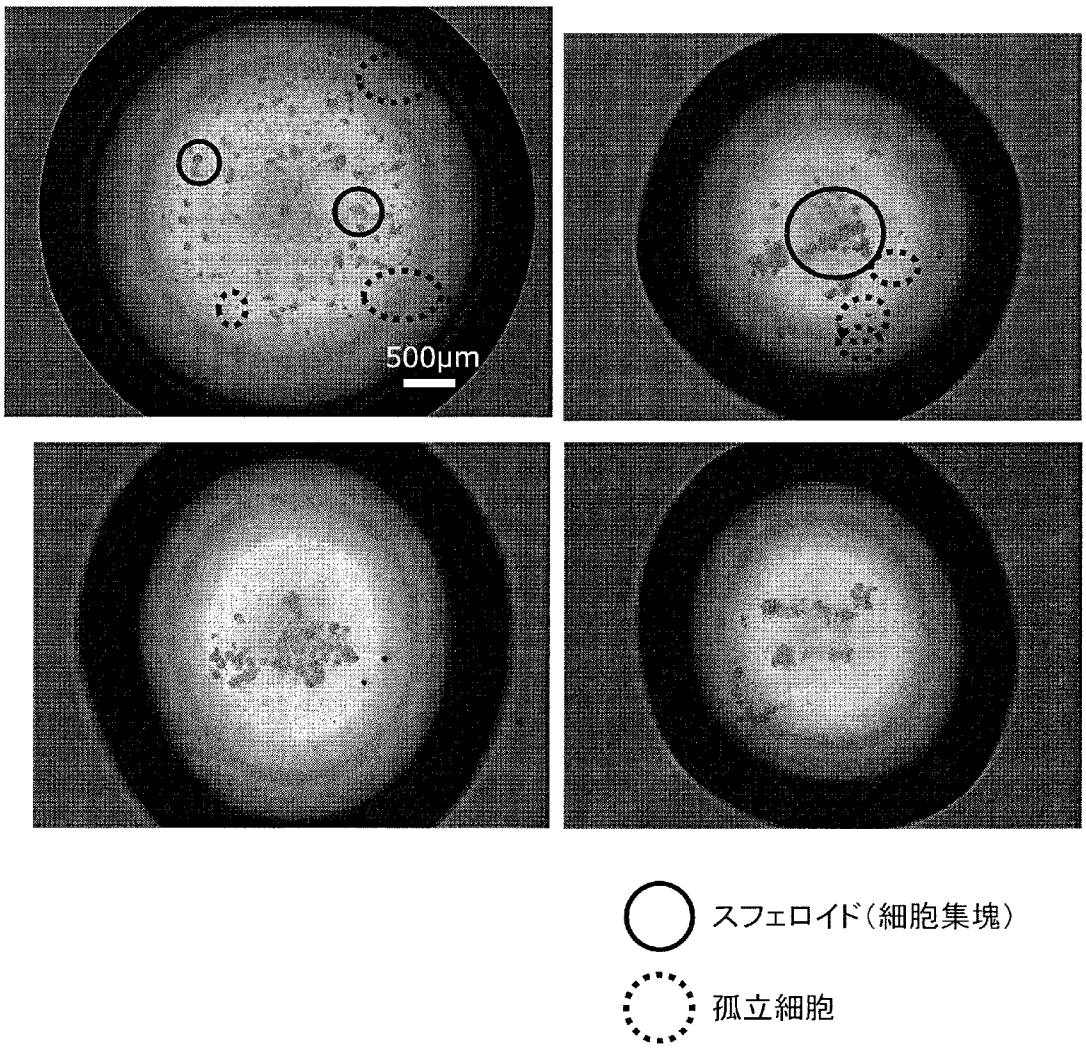
[図8D]



[図8E]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/008513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 5/071(2010.01)i; C12M 3/00(2006.01)i
FI: C12N5/071; C12M3/00 Z

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)
C12N5/071; C12M3/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	杉本優子，外，ナノ構造表面を利用した足場材料上でのドロップ培養法の開発，日本再生医療学会総会プログラム抄録，22 February 2019, vol. 18, p. 744, summary, non-official translation (SUGIMOTO, Yuko et al., "Development of drop culture method on scaffold material using nanostructured surface", Programs and abstracts of the general conference of the Japanese Society for Regenerative Medicine)	1-15
Y	WO 2006/106748 A1 (NAGOYA UNIVERSITY) 12 October 2006 (2006-10-12) claims, paragraphs [0027], [0036], [0042]-[0043], example 10	1-15
Y	JP 2019-156879 A (SHARP CORP.) 19 September 2019 (2019-09-19) claims, paragraph [0022], examples, table 1, etc.	1-15

☐ 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
07 May 2021 (07.05.2021)	18 May 2021 (18.05.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/008513

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2006/106748 A1	12 Oct. 2006	US 2009/0197333 A1 claims, paragraphs [0061], [0084], [0094]-[0095], example 10 GB 2438565 A	
JP 2019-156879 A	19 Sep. 2019	US 2019/0276577 A1 claims, paragraph [0021], examples, table 1 CN 110240776 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/008513

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/071(2010.01)i; C12M 3/00(2006.01)i
FI: C12N5/071; C12M3/00 Z

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））

C12N5/071; C12M3/00

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

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	杉本優子，外，ナノ構造表面を利用した足場材料上でのドロップ培養法の開発，日本再生医療学会総会プログラム抄録，2019.02.22，Vol.18，p.744 要旨	1-15
Y	WO 2006/106748 A1（国立大学法人名古屋大学）12.10.2006（2006-10-12） 請求の範囲，［００２７］，［００３６］，［００４２］－［００４３］，実施例１０	1-15
Y	JP 2019-156879 A（シャープ株式会社）19.09.2019（2019-09-19） 特許請求の範囲，［００２２］，実施例，表１等	1-15

☐ 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抵触するものではなく、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
07.05.2021	18.05.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
小金井　悟 4N 3961
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/008513

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2006/106748 A1	12.10.2006	US 2009/0197333 A1 Claims, [0061], [0084], [0094]-[0095], Example 10 GB 2438565 A	
JP 2019-156879 A	19.09.2019	US 2019/0276577 A1 Claims, [0021], Examples, Table 1 CN 110240776 A	