(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7317330号
(P7317330)

(45)発行日　令和5年7月31日(2023.7.31)

(24)登録日　令和5年7月21日(2023.7.21)

(51)国際特許分類

		FI		
Ｃ１２Ｎ	*5/071(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071	
Ｃ１２Ｍ	*3/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	3/00	Ｚ

請求項の数　26　（全39頁）

(21)出願番号　特願2022-506008(P2022-506008)
(86)(22)出願日　令和3年3月4日(2021.3.4)
(86)国際出願番号　PCT/JP2021/008512
(87)国際公開番号　WO2021/182306
(87)国際公開日　令和3年9月16日(2021.9.16)
審査請求日　令和4年2月14日(2022.2.14)
(31)優先権主張番号　特願2020-39861(P2020-39861)
(32)優先日　令和2年3月9日(2020.3.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000005049
シャープ株式会社
大阪府堺市堺区匠町１番地
(73)特許権者　307016180
地方独立行政法人鳥取県産業技術センター
鳥取県鳥取市若葉台南七丁目１番１号
(74)代理人　100101683
弁理士　奥田 誠司
(74)代理人　100155000
弁理士　喜多 修市
(74)代理人　100139930
弁理士　山下 亮司
(74)代理人　100125922
弁理士　三宅 章子

最終頁に続く

(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)【特許請求の範囲】

【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、

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

を包含し、

前記固体表面は、硬化性樹脂から形成された合成高分子膜から形成されており、

前記硬化性樹脂は、パーフルオロアルキル基を有するパーフルオロアルキル系オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するパーフルオロアルキル系モノマーの少なくともいずれか一方を含み、

前記硬化性樹脂は、パーフルオロポリエーテル基を有するパーフルオロポリエーテル系オリゴマーを含まない、三次元培養法。

【請求項２】

前記硬化性樹脂は、少なくとも前記パーフルオロアルキル系オリゴマーを含む、請求項１に記載の三次元培養法。

【請求項３】

前記硬化性樹脂は、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーと、前記パーフルオロアルキル系モノマーとを含む、請求項１または２に記載の三次元培養法。

【請求項４】
前記硬化性樹脂は、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーまたは前記パーフルオロアルキル系モノマーのいずれか一方のみを含む、請求項１に記載の三次元培養法。
【請求項５】
前記硬化性樹脂は、少なくとも前記パーフルオロアルキル系モノマーを含み、前記パーフルオロアルキル系モノマー全体に対するフッ素元素の割合は、５０質量％以上６０質量％以下である、請求項１から４のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項６】
前記硬化性樹脂は、フッ素セグメントと非フッ素セグメントとからなるブロックコポリマーをさらに含む、請求項１から５のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項７】
前記フッ素セグメントは、パーフルオロアルキル基を有する、請求項６に記載の三次元培養法。
【請求項８】
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記ブロックコポリマーを１質量％以上５質量％以下含む、請求項６または７に記載の三次元培養法。
【請求項９】
前記硬化性樹脂に含まれる前記ブロックコポリマーの合計質量は、前記硬化性樹脂に含まれる前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーの合計質量を１とすると、０．２５以上２．０以下である、請求項６から８のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１０】
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを０．５質量％以上１０質量％以下含む、請求項１から９のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１１】
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを１質量％以上８質量％以下含む、請求項１から１０のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１２】
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを２質量％以上５質量％以下含む、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】
前記硬化性樹脂は、光重合開始剤を含む光硬化性樹脂であり、
前記光重合開始剤は、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)を含む、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】
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１１０°以上である、請求項１から１３のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１５】
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１２０°以上である、請求項１から１４のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１６】
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する滑落角は９０°以上である、請求項１から１５のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項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、請求項１から１６のいずれかに記載の三次元培養法。

【請求項１８】
前記複数の凸部の高さは、１０ｎｍ以上５００ｎｍ以下である、請求項１から１７のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項１９】
前記複数の凸部の隣接間距離は、１０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下である、請求項１から１８のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項２０】
前記複数の凸部は略円錐形の先端部分を有する、請求項１から１９のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項２１】
前記液滴の高さは１ｍｍ以上である、請求項１から２０のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項２２】
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、請求項１から２１のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項２３】
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、請求項２２に記載の三次元培養法。
【請求項２４】
前記細胞を前記液滴中で培養している間、前記細胞は、前記固体表面に接着されている、請求項１から２３のいずれかに記載の三次元培養法。
【請求項２５】
請求項１から２４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２６】
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２４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。
【発明の詳細な説明】
【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１～５、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１～４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１～４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５、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】

【文献】特開２００５－１６８４９４号公報
国際公開第２００７／０９７１２０号
国際公開第２０１７／１２６５８９号
特開２０１０－６３４２９号公報
国際公開第２００７／１１４３５１号
特許第４２６５７２９号公報
特開２００９－１６６５０２号公報
国際公開第２０１１／１２５４８６号
国際公開第２０１３／１８３５７６号
国際公開第２０１５／１６３０１８号

【非特許文献】

【０００７】

【文献】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.
Singla DK and Sobel BE, Biochem Biophys Res Commun. 2005 335(3):637-42
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。

【００１４】

［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、

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

を包含し、

前記固体表面は、硬化性樹脂から形成された合成高分子膜から形成されており、

前記硬化性樹脂は、パーフルオロアルキル基を有するパーフルオロアルキル系オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するパーフルオロアルキル系モノマーの少なくともいずれか一方を含む、三次元培養法。

［項目２］

前記硬化性樹脂は、パーフルオロポリエーテル基を有するパーフルオロポリエーテル系オリゴマーを含まない、項目１に記載の三次元培養法。

［項目３］

前記硬化性樹脂は、少なくとも前記パーフルオロアルキル系オリゴマーを含む、項目１または２に記載の三次元培養法。

［項目４］

前記硬化性樹脂は、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーと、前記パーフルオロアルキル系モノマーとを含む、項目１から３のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目５］

前記硬化性樹脂は、少なくとも前記パーフルオロアルキル系モノマーを含み、前記パーフルオロアルキル系モノマー全体に対するフッ素元素の割合は、５０質量％以上６０質量％以下である、項目１から４のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目６］

前記硬化性樹脂は、フッ素セグメントと非フッ素セグメントとからなるブロックコポリマーをさらに含む、項目１から５のいずれかに記載の三次元培養法。

［項目７］

前記フッ素セグメントは、パーフルオロアルキル基を有する、項目６に記載の三次元培養法。

［項目８］

前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記ブロックコポリマーを１質量％以上５質量％以下含む、項目６または７に記載の三次元培養法。

［項目９］

前記硬化性樹脂に含まれる前記ブロックコポリマーの合計質量は、前記硬化性樹脂に含まれる前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーの合計質量を１とすると、０．２５以上２．０以下である、項目６から８のい

ずれかに記載の三次元培養法。
［項目１０］
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを０．５質量％以上１０質量％以下含む、項目１から９のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目１１］
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを１質量％以上８質量％以下含む、項目１から１０のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目１２］
前記硬化性樹脂は、前記硬化性樹脂全体に対して、前記パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／または前記パーフルオロアルキル系モノマーを２質量％以上５質量％以下含む、項目１から１１のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目１３］
前記硬化性樹脂は、光重合開始剤を含む光硬化性樹脂であり、
前記光重合開始剤は、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)を含む、項目１から１２のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目１４］
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１１０°以上である、項目１から１３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１１０°以上であればよい。
［項目１５］
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角が１２０°以上である、項目１から１４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１２０°以上であればよい。
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する接触角（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）は、例えば１７°以上であってもよく、または９０°以上であってもよい。
［項目１６］
前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する滑落角は９０°以上である、項目１から１５のいずれかに記載の三次元培養法。前記固体表面の前記細胞懸濁液に対する滑落角は４５°以上であってもよい。滑落角は着滴から２０秒後の値で評価すればよい。
［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１から１６のいずれか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１から１７のいずれか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１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１から１９のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目２１］
前記液滴の高さは１ｍｍ以上である、項目１から２０のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目２２］
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１から２１のいずれかに記載の三次元培養法。
［項目２３］
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２２に記載の三次元培養法。
項目１から２３のいずれかに記載の三次元培養法において、前記液滴の体積は例えば１０μＬ以上５０μＬ以下である。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１から２３のいずれかに記載の三次元培養法において、前記液滴に含まれる前記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。
［項目２４］
項目１から２３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２５］
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２３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１から２３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】
【００１５】
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】
【００１６】
【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６】ドロップ培養法で得られたスフェロイド（左上：比較例２３、右上：比較例２４、左下：実施例２６、右下：実施例２２）の光学顕微鏡像である。
【図７】比較例２３、比較例２４、実施例２６および実施例２２において、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。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

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。

【００１８】

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。

【００１９】

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。

【００２０】

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。

【００２１】

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。

【００２２】

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６～９（反射防止膜）、特許文献１０（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。

【００２３】

特許文献６～１０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。

【００２４】

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。

【００２５】

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。

【００２６】

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。

【００２７】

図２Ａに示した合成高分子膜３４Ａは、特許文献６～９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。

【００２８】

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。

【００２９】

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。

【００３０】

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。

【００３１】

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。

【００３２】

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。

【００３３】

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６～９に記載されている方法で製造することができる。

【００３４】

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。

【００３５】

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。

【００３６】

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。

【００３７】

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。

【００３８】

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。

【００３９】

ドロップ培養は、以下の方法で行った。

【００４０】

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。

【００４１】

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。

【００４２】

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。

【００４３】

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。

【００４４】

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。

【００４５】

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。

【００４６】

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。

【００４７】

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。

【００４８】

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。

【００４９】

ドロップ培養法で得られたスフェロイドを用いて、Ｐ４５０－ＧｌｏTMＬｕｃｉｆｅｒｉｎ－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。

【００５０】

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。

【００５１】
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。
【００５２】
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。
【００５３】
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。
【００５４】
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。
【００５５】
［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。ここでは、フッ素系の撥水撥油剤として、フッ素含有オリゴマーおよび／またはフッ素含有モノマーを用いた。フッ素含有オリゴマーおよびフッ素含有モノマーは、いずれも反応性を有する。なお、表１には、実験例２で用いた原材料もあわせて示している。
【００５６】
また、モスアイ構造を表面に形成する型は、上記特許文献６～９、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。
【００５７】
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。
【００５８】
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。
【００５９】
接触角（静的接触角）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。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。

【００６０】

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。

【００６１】

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。

【００６２】

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。

【００６３】

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。

【００６４】

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。

【００６５】

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。

【００６６】

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。

【００６７】
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。
【００６８】
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。
【００６９】
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―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。
【００７０】
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○（良）、１０°以上４５°未満を△（可）、１０°未満を×（不可）とした。
【００７１】
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。

【００７２】
　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。
【００７３】
　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）。
【００７４】
　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。
【００７５】
　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。
【００７６】

【表１】

原材料種	略号	製品名	メーカー名	一般名称／構造式	成分構成	MW	官能基数	フッ素数	フッ素濃度%
モノマー（フッ素を含まない）	M280	MIRAMER M280	MIWON 社	ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙ(400)ｼﾞｱｸﾘﾚｰﾄ		523	2		
	M282	MIRAMER M282	MIWON 社	ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙ(200)ｼﾞｱｸﾘﾚｰﾄ		308	2		
	M300	MIRAMER M300	MIWON 社	ﾄﾘﾒﾁﾛｰﾙﾌﾟﾛﾊﾟﾝﾄﾘｱｸﾘﾚｰﾄ		296	3		
	ACMO	ACMO®	KJ ｹﾐｶﾙｽﾞ（株）	N,N-ｱｸﾘﾛｲﾙﾓﾙﾎﾘﾝ		141	1		
フッ素含有オリゴマー（PFPE 系）	MT70	FOMBLIN® MT70	SOLVAY 社	ﾊﾟｰﾌﾙｵﾛﾎﾟﾘｴｰﾃﾙ 4 官能ｱｸﾘﾚｰﾄ（式(1)）	ﾊﾟｰﾌﾙｵﾛﾎﾟﾘｴｰﾃﾙ誘導体 80% ﾒﾁﾙｴﾁﾙｹﾄﾝ(溶剤) 20%	2750	4		
	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%				
	DAC-MO	DAC-MO	ﾀﾞｲｷﾝ工業（株）	（式(2)）	ﾌｯ素含有ｵﾘｺﾏｰ 10% 溶剤 90%				
フッ素含有モノマー（Rf 系）	FAAC4	CHEMINOX FAAC-4	ユニマテック(株)	2-(ﾊﾟｰﾌﾙｵﾛﾌﾞﾁﾙ)ｴﾁﾙｱｸﾘﾚｰﾄ（式(3)）	ﾌｯ素含有ﾓﾉﾏｰ 100%	318	1	9	53.7
	FAAC6	CHEMINOX FAAC-6	ユニマテック(株)	2-(ﾊﾟｰﾌﾙｵﾛﾍｷｼﾙ)ｴﾁﾙｱｸﾘﾚｰﾄ（式(4)）	ﾌｯ素含有ﾓﾉﾏｰ 100%	418	1	13	59.1
フッ素含有オリゴマー（Rf 系）	RS76NS	ﾒｶﾞﾌｧｯｸ RS-76-NS	DIC(株)	$F(CF_2)_6$-基を有するｵﾘｺﾏｰ	ﾌｯ素含有ｵﾘｺﾏｰ 20% 希釈ﾓﾉﾏｰ 80%				
	EB8110	EBECRYL® 8110	ﾀﾞｲｾﾙ・ｵﾙﾈｸｽ（株）		ﾌｯ素含有ｵﾘｺﾏｰ 50% 希釈ﾓﾉﾏｰ 50%				
フッ素含有ﾌﾟﾛｯｸｺﾎﾟﾘﾏｰ（Rf 系）	F606	ﾓﾃﾞｨﾊﾟｰ®F606	日油（株）	フッ素セグメントと非フッ素セグメントとからなるﾌﾟﾛｯｸｺﾎﾟﾘﾏｰ	フッ素含有ﾌﾟﾛｯｸｺﾎﾟﾘﾏｰ 100%				
重合開始剤	OXE02	IRGACURE OXE02	BASF 社	ｴﾀﾉﾝ,1-[9-ｴﾁﾙ-6-(2-ﾒﾁﾙﾍﾞﾝｿﾞｲﾙ)-9H-ｶﾙﾊﾞｿﾞｰﾙ-3-ｲﾙ]-,1-(O-ｱｾﾁﾙｵｷｼﾑ)					

【００７７】

【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%	–

【００７８】
【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

【００７９】

【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

【００８０】

【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	ETA711	A	着滴せず(>140)			5°以下	137.0	137.9	0.9	90.0
実施例 2-1	ETA711	B	着滴せず(>140)			5°以下	137.1	136.9	-0.2	90.0
実施例 3-1	ETA711	C	着滴せず(>140)			5°以下	137.5	137.9	0.4	90.0
実施例 4-1	ETA712	A	138.6	138.4	-0.2	90.0	120.1	116.6	-3.5	90.0
実施例 5-1	ETA712	B	136.5	136.5	0.0	90.0	131.1	128.1	-3.0	90.0
実施例 6-1	ETA712	C	135.8	134.6	-1.2	90.0	132.7	128.6	-4.1	90.0
実施例 7-1	ETA713	A	117.2	117.5	0.3	90.0	103.2	94.1	-9.1	90.0
実施例 8-1	ETA713	B	129.0	128.6	-0.4	90.0	127.8	121.8	-6.0	90.0
実施例 9-1	ETA713	C	133.3	132.5	-0.8	90.0	123.7	122.3	-1.4	90.0
実施例 10-1	ETA714	A	114.1	112.1	-2.0	90.0	91.0	68.0	-23.0	90.0
実施例 11-1	ETA714	B	121.9	121.8	-0.1	90.0	115.4	112.7	-2.7	90.0
実施例 12-1	ETA714	C	131.4	131.0	-0.4	90.0	131.5	128.2	-3.3	90.0

【００８１】

【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	○	◎	◎

【００８２】

【表７】

液滴量 30μL	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 1-2	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

【００８３】

【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	x	△	○
比較例 2-2	x	△	△
比較例 3-2	x	△	○
比較例 4-2	x	△	○
比較例 5-2	x	△	○
比較例 6-2	x	△	△
比較例 7-2	x	△	○
比較例 8-2	x	△	○
比較例 9-2	x	△	○
比較例 10-2	x	△	○
比較例 11-2	x	△	○
比較例 12-2	x	△	○
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	○	◎	◎

【００８４】

【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

【００８５】

【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	○	○	○

【００８６】

【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

【００８７】

【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	x	△	△
比較例 2-4	x	△	△
比較例 3-4	x	△	△
比較例 4-4	x	△	△
比較例 5-4	x	△	△
比較例 6-4	x	△	△
比較例 7-4	x	△	△
比較例 8-4	x	△	△
比較例 9-4	x	△	△
比較例 10-4	x	△	○
比較例 11-4	x	△	△
比較例 12-4	x	△	△
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	○	○	△

【００８８】

［細胞の固体表面への接着の強さ］

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（下記実験例２）、本発明者は、固体表面を形成する合成高分子膜が、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマー（「Ｒｆ系オリゴマー」または「パーフルオロアルキル系オリゴマー」ということがある。）およびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマー（「Ｒｆ系モノマー」または「パーフルオロアルキル系モノマー」ということがある。）の少なくとも一方を含み、パーフルオロポリエーテル基を有するフッ素含有オリゴマー（「ＰＦＰＥ系オリゴマー」または「パーフルオロポリエーテル系オリゴマー」ということがある。）を含まない硬化性樹脂から形成されていると、細胞（細

胞の仮足）が固体表面に対して適度な強さで接着されることにより、高い組織再現性を有するスフェロイドが得られることを見出した。

【００８９】

（実験例２）

細胞に対して適度な接着性を有する固体表面を検討した。実験例１と同様の条件でドロップ培養を行った。以下では、実験例１と異なる点を主に説明する。

【００９０】

組成の異なる紫外線硬化性樹脂を用いて、実験例１と同様の方法で、実施例２１～３１および比較例２１～２５の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、各紫外線硬化性樹脂の組成を表１３に示す。実施例２１～３１および比較例２１～２５は、いずれも反転されたモスアイ構造を表面に有する型を用いて形成した。型の表面には、濃度０．００１質量％のフッ素系離型剤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）を用いて離型処理を施した。ベースフィルム４２Ａとして、ＰＥＴフィルム（東洋紡株式会社製、製品名：コスモシャインＡ４３００（コスモシャインは登録商標）、厚さ：１００μｍ）を用い、各紫外線硬化性樹脂を硬化させるために照射した紫外線の露光量は、１Ｊ／ｃｍ^{2}であった。

【００９１】

表１に示したフッ素含有オリゴマーおよびフッ素含有モノマー（ＭＴ７０、ＫＹ１２０３Ｅ、ＤＡＣ－ＭＯ、ＦＡＡＣ４、ＦＡＡＣ６、ＲＳ７６ＮＳおよびＥＢ８１１０）は、いずれも反応性を有する。ＭＴ７０、ＤＡＣ－ＭＯ、ＦＡＡＣ４およびＦＡＡＣ６の化学構造式を［化１］～［化４］（式（１）～（４））にそれぞれ示す。

【００９２】

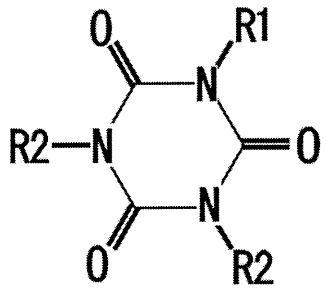
【化１】

$$X\text{-}CF_2O\text{-}(CF_2CF_2O)_m\text{-}(CF_2O)_n\text{-}CF_2\text{-}X \qquad (1)$$

式（１）中、Ｘはメタクリレート基、ｍは１～１４の整数、ｎは１～２４の整数である。式（１）に示した化学式は推定による。

【００９３】

【化２】

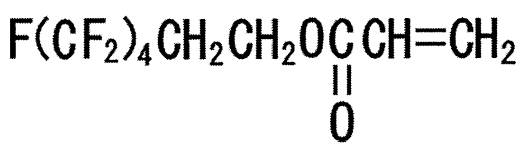


(2)

式（２）中、Ｒ１はパーフルオロポリエーテル基、Ｒ２はアクリレート基である。

【００９４】

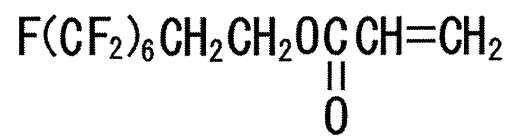
【化３】



(3)

【００９５】

【化４】



(4)

【００９６】

なお、表１に示したフッ素を含まないモノマーのうち、Ｍ２８０およびＭ２８２は、エチレンオキサイド単位（ＥＯ単位）（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－）を含む。

・Ｍ２８０

１分子中に含まれるＥＯ単位の数：９、ＥＯ単位の割合：７６質量％

・Ｍ２８２

１分子中に含まれるＥＯ単位の数：４、ＥＯ単位の割合：５７質量％

【００９７】

実施例２１～３１および比較例２１～２５について、合成高分子膜の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。ここでは、純水を用いた接触角および滑落角の測定には、１０μＬの液滴を用い、培地を用いた接触角および滑落角の測定には、１０μＬの液滴を用いた。また、培地交換の作業性、ハンドリング性およびスフェロイド化の評価を、実験例１と同様に行った。実施例２１～３１および比較例２１～２５は、比較例２５以外はいずれも、培地の接触角が１１０°以上であり、培地交換の作業性に優れている。また、実施例２１～３１および比較例２１～２５は、いずれも培地の滑落角が９０°以上であり、ハンドリング性に優れている。さらに、実施例２１～３１および比較例２１～２５は、いずれにおいてもスフェロイドの形成が認められ、実験例１の結果と同様に、接触角が大きいほど、良い状態（高密度集積）のスフェロイドが得られる傾向が認められる。光学顕微鏡による形態観察結果の例を図６（左上：比較例２３、右上：比較例２４、左下：実施例２６、右下：実施例２２）に示す。

【００９８】

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。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。なお、このような評価方法は、培地交換の作業時に生じる振動を考慮したうえで細胞の固体表面への接着の程度を評価するためのものであり、培地交換の作業時に固体表面に生じる振動によって、細胞が固体表面から離れて移動することがあるという発明者が得た知見に基づいている。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。細胞の接着の強さがある程度以上大きい固体表面の接着性は実用上使用可（○、◎）で、細胞の接着の強さがある程度よりも小さい、あるいは接着しない固体表面の接着性は実使用不可（△、×）と判断した。具体的には以下のように評価した。

×：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。

〇：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。

【００９９】

表１４に、実施例２１～３１および比較例２１～２５の評価結果を示す。表１４から分

かるように、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーの少なくとも一方を含み、パーフルオロポリエーテル基を有するフッ素含有オリゴマーを含まない硬化性樹脂から形成された合成高分子膜を有する実施例２１～３１では、パーフルオロポリエーテル基を有するフッ素含有オリゴマーを含む硬化性樹脂から形成された合成高分子膜を有する比較例２１～２４に比べて、固体表面が有する細胞に対する接着性が優れている。

【０１００】

図７および表１５に、実施例２２、実施例２６、比較例２３および比較例２４について、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求めた結果を示す。図３Ｄの評価結果と同様の方法で評価した。表１５には、比較例２３を１としたときの、実施例２２、実施例２６および比較例２４の値も併記している。図７および表１５から、実施例２２および実施例２６においては、比較例２３および比較例２４に比べて高いＣＹＰ活性を有するので、スフェロイドの組織再現性が向上されていることが分かる。実施例２２および実施例２６の結果から、スフェロイド化の状態が適度に良く（集積密度が適度に高く）、かつ、細胞（細胞の仮足）が固体表面に対して適度な強さで接着していると、高いＣＹＰ活性が得られ、組織再現性の高いスフェロイドが得られることが認められる。比較例２３および比較例２４は、スフェロイド化の評価では実施例２２および実施例２６と同程度であったにもかかわらず、スフェロイドの組織再現性においては劣っていた。これは、比較例２３および比較例２４が、実施例２２および実施例２６に比べて、固体表面が有する細胞に対する接着性に劣ることに起因していると考えられる。実験例で用いたＨｅｐＧ２細胞は足場依存性を有する（すなわち、正常な細胞の増殖には足場に接着することが必要である）ので、固体表面への接着が弱いと、スフェロイドは形成されるものの、得られたスフェロイドの組織再現性が低かったと考えられる。

【０１０１】

硬化性樹脂は、硬化性樹脂全体に対して、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよび／またはパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーを、例えば０．５質量％以上１０質量％以下含み、１質量％以上８質量％以下含むことが好ましく、２質量％以上５質量％以下含むことがより好ましい。パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよび／またはモノマーの割合が０．５質量％未満であると、固体表面が十分な撥水性を有しない場合があり、１０質量％超であると、均一な硬化性樹脂が得られないことがあり、硬化物（硬化性樹脂が硬化されることによって得られる合成高分子膜）の物性を低下させる恐れがある。

【０１０２】

パーフルオロアルキル基（Ｆ（ＣＦ$_2$）$_p$－基、ｐは整数）を有するフッ素含有モノマーとしては、例えばｐが４以上６以下であるものが好ましい。ｐが４未満であると、撥水性を向上させる観点等から十分な効果が得られない場合があり、ｐが６超であると、均一な硬化性樹脂が得られないことがある。例えば、モノマー全体に対するフッ素元素の割合が５０質量％以上６０質量％以下である、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーを用いればよい。

【０１０３】

硬化性樹脂は、フッ素セグメントと非フッ素セグメントとからなるブロックコポリマー（「フッ素含有ブロックコポリマー」ということがある。）をさらに含んでもよい。本明細書中、「フッ素セグメント」は、フッ素含有モノマー同士が重合して形成されたブロックを意味する。「非フッ素セグメント」は、フッ素非含有モノマー同士が重合して形成されたブロックを意味する。硬化性樹脂がフッ素含有ブロックコポリマーをさらに含むと、固体表面の培地に対する接触角が増大されることにより、得られたスフェロイドの組織再現性が向上され得ることが分かった。硬化性樹脂にフッ素含有ブロックコポリマーが含まれると、非フッ素セグメントが、硬化性樹脂中の他の成分との相溶性を有する相溶性セグメントとして機能する一方で、フッ素セグメントが、合成高分子膜３４Ａの表面（凸部３４ｐを有する表面）に偏在する。その結果、合成高分子膜３４Ａの表面自由エネルギーが

低くなると考えられる。特に、硬化性樹脂がパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーまたはパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーのいずれか一方のみを含む場合、硬化性樹脂がフッ素含有ブロックコポリマーをさらに含むことが好ましい。

【０１０４】

特願２０１８－１６６０８４号（特開２０２０－３８３２４号公報）に記載されているように、本出願人の内の一方は、（メタ）アクリロイル基を有するパーフルオロポリエーテル系オリゴマーおよび／またはパーフルオロアルキル系オリゴマーに加えてフッ素含有ブロックコポリマーを含む硬化性樹脂（硬化性樹脂組成物）を用いると、フッ素元素が合成高分子膜の表面（凸部を有する表面）により多く偏在することにより、型の転写回数が増えても合成高分子膜の表面の防汚性（例えば撥水性、撥油性）の低下が抑制されることを見出した。参考のために特願２０１８－１６６０８４号の開示内容のすべてを本明細書に援用する。

【０１０５】

フッ素含有ブロックコポリマーのフッ素セグメントは、パーフルオロアルキル基を有することが好ましい。フッ素セグメントがパーフルオロアルキル基を有すると、フッ素セグメントが合成高分子膜３４Ａの表面（凸部３４ｐを有する表面）に偏在しやすく（剛直な分子鎖が立つように配列しやすく）、フッ素元素が合成高分子膜３４Ａの表面（凸部３４ｐを有する表面）に密に分布しやすくなると考えられる。結果的に、合成高分子膜３４Ａの表面の、固体表面の培地に対する接触角が増大されやすいと考えられる。

【０１０６】

硬化性樹脂は、硬化性樹脂全体に対して、フッ素含有ブロックコポリマーを合計で例えば１質量％以上５質量％以下含むことが好ましい。フッ素含有ブロックコポリマーの割合が１質量％未満であると、固体表面が十分な撥水性を有しない場合があり、５質量％超であると、硬化性樹脂中の他の成分との相溶性が低下し、硬化物（硬化性樹脂が硬化されることによって得られる合成高分子膜）の物性（例えば透明性）が低下することがある。硬化性樹脂に含まれるフッ素含有ブロックコポリマーの合計質量は、硬化性樹脂に含まれるパーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／またはパーフルオロアルキル系モノマーの合計質量を１とすると、例えば０．２５以上２．０以下である。

【０１０７】

フッ素含有ブロックコポリマー中のフッ素セグメントの割合は、好ましくは１０質量％以上９０質量％以下、より好ましくは３５質量％以上６５質量％以下である。フッ素含有ブロックコポリマー中のフッ素セグメントの割合が１０質量％よりも低い場合、フッ素セグメントとしての性能、例えば、撥水性、撥油性が充分に得られないことがある。フッ素含有ブロックコポリマー中のフッ素セグメントの割合が９０質量％よりも高い場合、硬化性樹脂中の他の成分との相溶性が低下し、結果的に、合成高分子膜３４Ａの透明性が低下する（白化する）ことがある。

【０１０８】

フッ素含有ブロックコポリマーの数平均分子量は、好ましくは５０００以上１０００００以下、より好ましくは１００００以上３００００以下、さらに好ましくは１００００以上１００００以下である。フッ素含有ブロックコポリマーの数平均分子量が５０００よりも小さい場合、フッ素セグメントが短く、その性能（例えば、撥水性、撥油性）が充分に得られないことがある。フッ素含有ブロックコポリマーの数平均分子量が１０００００よりも大きい場合、硬化性樹脂中の他の成分との相溶性が低下し、結果的に、合成高分子膜３４Ａの透明性が低下する（白化する）ことがある。

【０１０９】

上述したように、実施例２１～３１はいずれも、固体表面が有する細胞に対する接着性に優れている。なかでも、実施例２１～２３は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーの両方を含む。実施例２１～２３の結果から、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーの両方を含む硬化性樹脂から

形成された固体表面は、優れた撥水性を有する傾向にあることが分かる。実施例２１～２３においては、固体表面の培地に対する接触角が特に高い（１２０°以上）のでスフェロイド化の状態が良く、かつ、細胞が固体表面に適度な強さで接着される。スフェロイド化の状態および細胞の固体表面への接着の強さの両方を考慮すると、硬化性樹脂は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーの両方を含むことが好ましいことが分かる。

【０１１０】

実施例２７～２９は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーを含まずパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーを含む。実施例２１～２３と比べると、実施例２７～２９では、固体表面の培地に対する接触角が低い（１１０°以上１２０°未満）ので、スフェロイドの形成が認められるもののスフェロイドの状態においてやや劣る（集積密度が低い）傾向にある。また、実施例２７～２９では、実施例２１～２３と比べて、接触角の時間変化が大きい（撥水性が時間とともに低下する程度が大きい）傾向にある。パーフルオロアルキル基（Ｆ（ＣＦ$_2$）$_p$－基、ｐは４以上６以下の整数）を有するフッ素含有モノマーを含むと、パーフルオロアルキル基が比較的短いので、フッ素元素が外向き（光硬化樹脂の表面を向く）か内向きかの配向の変化が比較的起こり易いと考えられる。実施例２１～２３のように、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーをさらに含むと、このような配向の変化が抑制される結果、撥水性は向上し、撥水性の時間変化が抑制されると考えられる。

【０１１１】

実施例２４～２６は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーを含まずパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーを含む。実施例２４～２６においても、実施例２１～２３と比べて固体表面の培地に対する接触角が低い傾向にある。実施例２４～２６では、分子量の小さいフッ素含有モノマーを含まないので、フッ素元素が光硬化樹脂の表面付近に移動し難く、実施例２１～２３と比べて撥水性に劣ると考えられる。

【０１１２】

比較例２１～２４は、パーフルオロポリエーテル基を有するフッ素含有オリゴマーを含む。フッ素含有モノマーおよび／またはフッ素含有オリゴマーを含む硬化性樹脂から形成された固体表面は、表面張力が低いので細胞との相互作用が弱い傾向があるが、フッ素含有基の中でもパーフルオロポリエーテル基は、パーフルオロアルキル基に比べて長くフレキシブルな構造をしているので、表面のパーフルオロポリエーテル基が動きやすいと考えられる。そのため、比較例２１～２４では実施例２１～３１に比べて固体表面から細胞が離脱し易かったと推測される。

【０１１３】

実施例３０は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーに加えて、フッ素含有ブロックコポリマーをさらに含む。実施例３０は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーを実施例２４と同じ程度含み、フッ素含有ブロックコポリマーＦ６０６をさらに有する。実施例３０は、実施例２４に比べて固体表面の培地に対する接触角が高く、スフェロイドの状態（集積密度）においても優れている。

【０１１４】

実施例３１は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーに加えて、フッ素含有ブロックコポリマーをさらに含む。実施例３１は、フッ素含有ブロックコポリマーＦ６０６をさらに有する点において、実施例２７の組成と異なる。実施例３１は、実施例２７に比べて固体表面の培地に対する接触角が高く、スフェロイドの状態（集積密度）においても優れている。

【０１１５】

実施例３０および３１では、（フッ素含有ブロックコポリマーの合計質量）：（パーフルオロアルキル系オリゴマーおよび／またはパーフルオロアルキル系モノマーの合計質量）＝１：１である。本発明者によると、これらの比が１：４から２：１の間である場合において、実施例３０および３１と同程度に、スフェロイドの状態（集積密度）に優れ、か

つ、細胞が固体表面に適度な強さで接着されることが認められている。

【０１１６】

比較例２５は、パーフルオロアルキル基を有するフッ素含有オリゴマーおよびパーフルオロアルキル基を有するフッ素含有モノマーのいずれをも含まず、フッ素含有ブロックコポリマーを含む。比較例２５では、固体表面の培地に対する接触角が低い（９０°未満）ので、培地交換の作業性が低い。さらに、スフェロイドの形成が認められるもののスフェロイドの状態においてやや劣る（集積密度が低い）。また、比較例２５では実施例２１～３１に比べて、細胞の固体表面に対する接着性が弱かった。

【０１１７】

【表１３】

	モノマー（フッ素を含まない）			開始剤	フッ素含有オリゴマー（Rf系）				フッ素含有モノマー（Rf系）		フッ素含有ブロックコポリマー（Rf系）	フッ素含有モノマーおよびフッ素含有オリゴマーの合計
					RS76NS		EB8110					
	M282	M300	ACMO	OXE02	希釈モノマーも含む	（内フッ素含有オリゴマー）	希釈モノマーも含む	（内フッ素含有オリゴマー）	FAAC6	FAAC4	F606	
実施例21	59.3%	26.5%	2.7%	0.9%	8.8%	(1.8%)			1.8%			3.5%
実施例22	54.5%	24.4%	2.4%	0.8%	16.3%	(3.3%)			1.6%			4.9%
実施例23	59.3%	26.5%	2.7%	0.9%			7.1%	(3.5%)	3.5%			7.1%
実施例24	60.4%	27.0%	2.7%	0.9%	9.0%	(1.8%)						1.8%
実施例25	55.4%	24.8%	2.5%	0.8%	16.5%	(3.3%)						3.3%
実施例26	51.1%	22.9%	2.3%	0.8%	22.9%	(4.6%)						4.6%
実施例27	65.0%	29.1%	2.9%	1.0%					1.9%			1.9%
実施例28	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%					3.8%			3.8%
実施例29	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%						3.8%		3.8%
実施例30	62.6%	28.0%	2.8%	0.9%			3.7%	(1.9%)			1.9%	1.9%
実施例31	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%					1.9%		1.9%	1.9%
比較例21	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%								3.8%
比較例22	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%					1.9%			1.9%
比較例23	62.6%	28.0%	2.8%	0.9%								3.8%
比較例24	62.6%	28.0%	2.8%	0.9%					1.9%			5.6%
比較例25	63.8%	28.6%	2.9%	1.0%							3.8%	0%

	フッ素含有オリゴマー（PFPE系）		
	KY1203E	DAC-MO	
	溶剤を除く	溶剤を除く	
実施例21			
実施例22			
実施例23			
実施例24			
実施例25			
実施例26			
実施例27			
実施例28			
実施例29			
実施例30			
実施例31			
比較例21		3.8%	
比較例22		1.9%	
比較例23	5.6%		
比較例24	3.7%		
比較例25			

【０１１８】
【表１４】

			実施例										比較例				
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	21	22	23	24	25
型	離型剤(UD509)濃度		0.001%															
水 10μL	接触角（°）	1秒後	140	144	143	132	136	139	130	133	129	136	137	139	141	140	142	86
		10秒後	139	144	143	126	134	138	122	128	120	134	135	138	141	139	141	76
		⊿	-1	0	0	-6	-2	-1	-8	-5	-9	-2	-2	-1	0	-1	-1	-10
	滑落角（°）		90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
培地 10μL	接触角（°）	1秒後	129	131	130	122	124	129	120	122	119	129	128	126	128	127	130	82
		10秒後	126	129	128	117	120	126	114	118	112	127	125	122	125	122	127	74
		⊿	-3	-2	-2	-5	-4	-3	-6	-4	-7	-2	-3	-4	-3	-4	-3	-8
	滑落角（°）		90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
培地交換の作業性			×/△/○/◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	△
ﾊﾝﾄﾞﾘﾝｸﾞ性			×/△/○/◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
ｽﾌｪﾛｲﾄﾞ化			×/△/○	○	○	△	△	○	△	△	△	○	○	○	○	○	○	△
固体表面の細胞に対する接着性			×/△/○/◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	×	△	×	△	△

【０１１９】

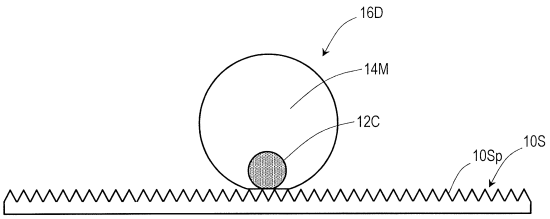
【表１５】

	固体表面の細胞に対する接着性	CYP3A4 [RLU]	CYP3A4 [RLU] (対比較例 23)
比較例 23	×	160	1
比較例 24	△	195	1.22
実施例 26	○	502	3.14
実施例 22	◎	766	4.79

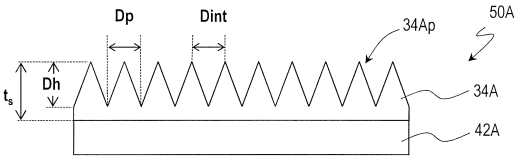
【０１２０】
上述したように、本発明の実施形態によると、従来の三次元培養法よりも、作業性または量産性に優れた、および／または、組織再現性の高いスフェロイドを得ることができる三次元培養法が提供される。
【０１２１】
実施例で例示したモスアイ構造を有する表面を備える合成高分子膜の様に、高さが１０ｎｍ以上１ｍｍ以下の複数の凸部を有する固体表面を備える三次元培養構造体は、ドロップ培養法に好適に用いられる。そのような三次元培養構造体は、例えば、シャーレの内側底面に、上記の合成高分子膜を貼り付けることによって得られる。すなわち、三次元培養構造体は、例えばシャーレ等の容器として提供され得る。
【０１２２】
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】
【０１２３】
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】
【０１２４】
１０Ｓ　固体表面
１０Ｓｐ　凸部
１２Ｃ　細胞
１４Ｍ　培地
１６Ｄ　液滴

【図面】

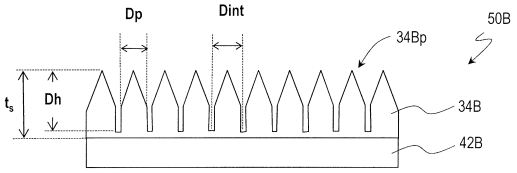
【図１】



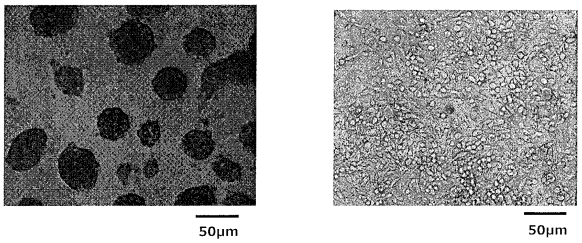
【図２Ａ】



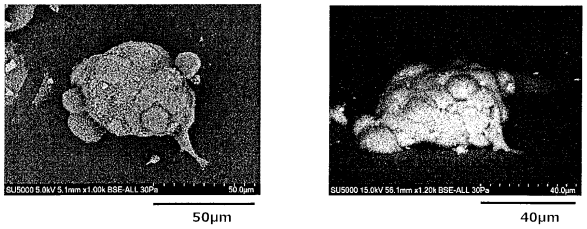
【図２Ｂ】



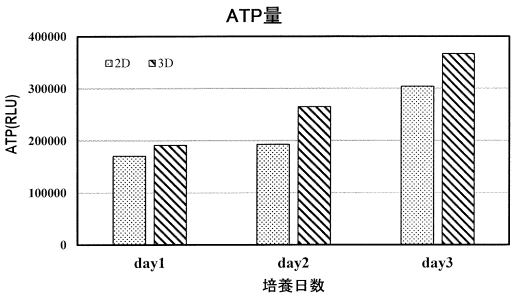
【図３Ａ】



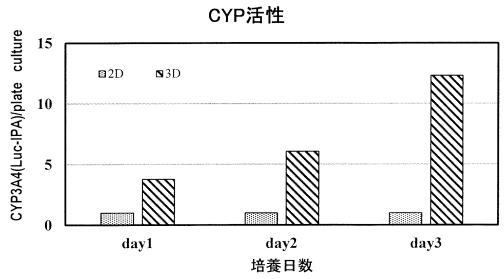
【図３Ｂ】



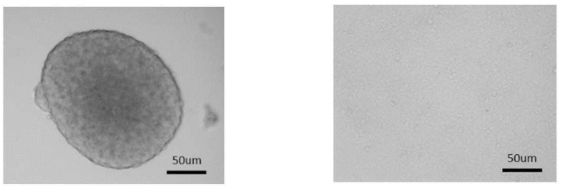
【図３Ｃ】



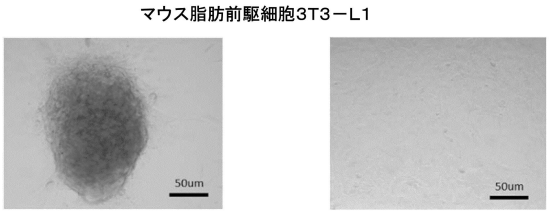
【図３Ｄ】



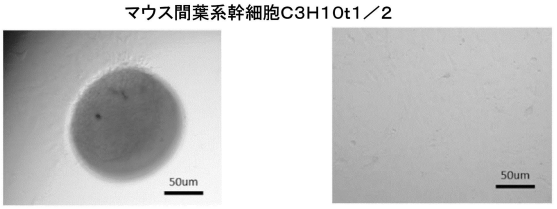
【図４Ａ】



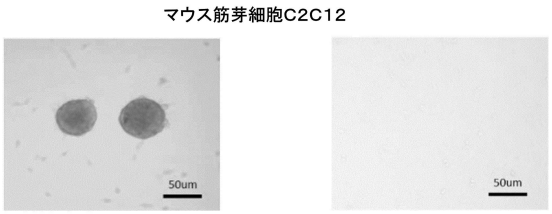
【図４Ｂ】



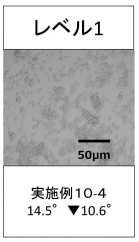
【図４Ｃ】



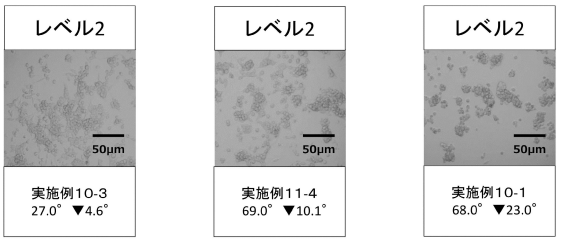
【図４Ｄ】



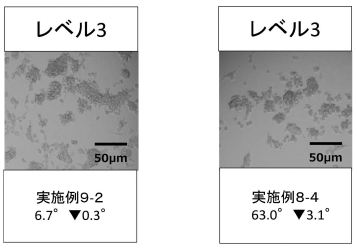
【図５Ａ】



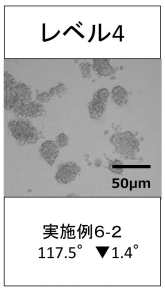
【図５Ｂ】



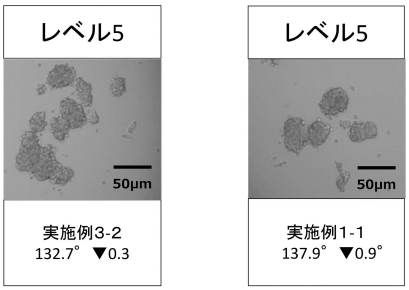
【図５Ｃ】



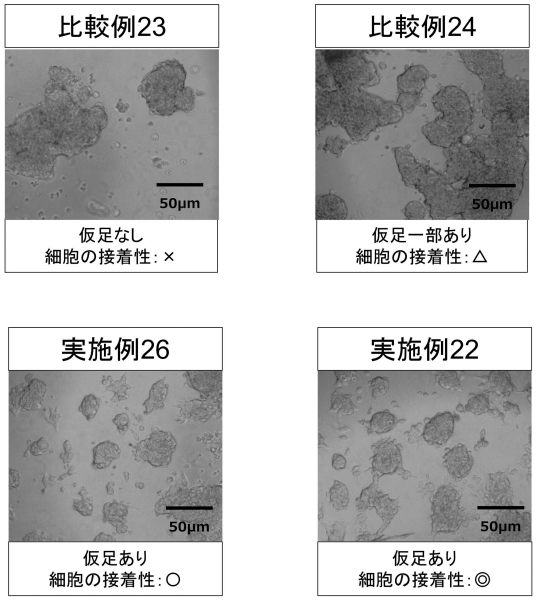
【図５Ｄ】


レベル4
50μm
実施例6-2
117.5° ▼1.4°

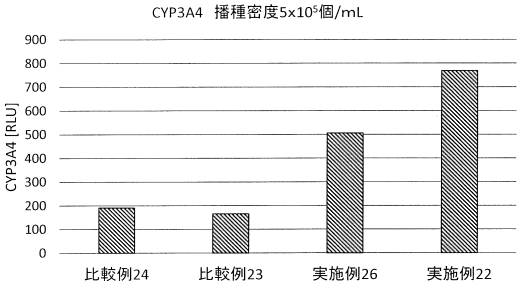
【図５Ｅ】


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６】


比較例23
50μm
仮足なし
細胞の接着性：×
比較例24
50μm
仮足一部あり
細胞の接着性：△
実施例26
50μm
仮足あり
細胞の接着性：○
実施例22
50μm
仮足あり
細胞の接着性：◎

【図７】


CYP3A4 播種密度5x10⁵個/mL
CYP3A4 [RLU]
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
比較例24
比較例23
実施例26
実施例22

フロントページの続き

(74)代理人　100184985
弁理士　田中 悠
(74)代理人　100202197
弁理士　村瀬 成康
(74)代理人　100202142
弁理士　北 倫子
(72)発明者　田口 登喜生
大阪府堺市堺区匠町１番地 シャープ株式会社内
(72)発明者　芝井 康博
大阪府堺市堺区匠町１番地 シャープ株式会社内
(72)発明者　竹林 勲
鳥取県米子市石州府字大塚ノ弐６５０番 シャープ米子株式会社内
(72)発明者　杉根 光晃
鳥取県米子市石州府字大塚ノ弐６５０番 シャープ米子株式会社内
(72)発明者　杉本 優子
鳥取県境港市中野町２０３２－３ 地方独立行政法人鳥取県産業技術センター 食品開発研究所内
審査官　小金井 悟

(56)参考文献　国際公開第２００６／１０６７４８（WO，Ａ１）
特開２０１９－１５６８７９（ＪＰ，Ａ）
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年02月22日，Vol.18，p.744

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１／００－ ７／０８
Ｃ１２Ｍ　１／００－ ３／１０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）