(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2022-14367
(P2022-14367A)
(43)公開日　令和4年1月19日(2022.1.19)

(51)国際特許分類　FI　テーマコード（参考）
C12M 3/00 (2006.01)　C１２Ｍ　3/00　Z　４Ｂ０２９

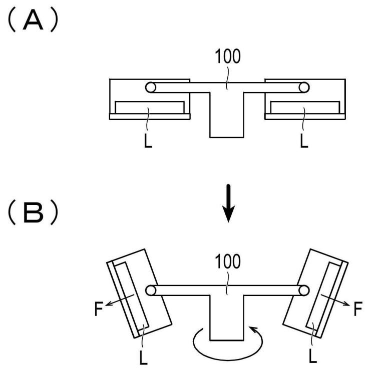
審査請求　未請求　請求項の数　6　ＯＬ　（全13頁）

(21)出願番号　特願2020-116655(P2020-116655)
(22)出願日　令和2年7月6日(2020.7.6)

(71)出願人　000230962
日本光電工業株式会社
東京都新宿区西落合１丁目３１番４号
(71)出願人　591173198
学校法人東京女子医科大学
東京都新宿区河田町８－１
(74)代理人　110000671
八田国際特許業務法人
(72)発明者　久保　寛嗣
埼玉県所沢市くすのき台１丁目１番６号
日本光電工業株式会社内
(72)発明者　塩山　高広
埼玉県所沢市くすのき台１丁目１番６号
日本光電工業株式会社内
(72)発明者　加川　友己
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　転写方法

(57)【要約】　　（修正有）【課題】筋細胞を含む細胞構造体を細胞接着可能な媒体に対して、容易に且つ均一に転写することのできる転写方法の提供。
【解決手段】温度応答性培養皿に配置される細胞構造体上に、ゲル（媒体）を積層した積層体Ｌに対して、積層方向に遠心力Ｆを付与する遠心工程と、温度応答性培養皿の下限臨界溶液温度以下に保って、温度応答性培養皿から筋細胞を含む細胞構造体を剥離させる剥離工程と、を有する転写方法。
【選択図】図８



【特許請求の範囲】
【請求項１】
筋細胞を含む細胞構造体を、細胞接着可能な媒体に転写する転写方法であって、
温度応答性培養皿に配置された前記細胞構造体上に、前記媒体を積層した積層体に対して、積層方向に遠心力を付与する遠心工程と、
前記温度応答性培養皿の下限臨界溶液温度以下に保って、前記温度応答性培養皿から前記細胞構造体を剥離させる剥離工程と、を有する、転写方法。
【請求項２】
前記遠心工程および前記剥離工程の間に、前記温度応答性培養皿の前記下限臨界溶液温度以上に保って、前記細胞構造体を、前記媒体に生物学的に能動的に接着させる接着工程を有する、請求項１に記載の転写方法。
【請求項３】
前記接着工程は、２０℃以上３８℃以下、ＣＯ$_2$環境下で、５分以上行われる、請求項２に記載の転写方法。
【請求項４】
前記接着工程は、前記遠心工程と同時に行われる、請求項２または３に記載の転写方法。
【請求項５】
前記遠心工程は、１分以上実施され、
前記剥離工程は、２０℃、ＣＯ$_2$環境下で、１０分以上行われる、請求項１～４のいずれか１項に記載の転写方法。
【請求項６】
前記媒体は、ハイドロゲルシートである、請求項１～５のいずれか１項に記載の転写方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、筋細胞を含む細胞構造体を、細胞接着可能な媒体に転写する転写方法である。
【背景技術】
【０００２】
温度応答性培養皿上にて培養されている筋細胞を含む細胞構造体を、できる限りそのままの状態、すなわち個々の細胞の位置関係や細胞外マトリクスの形状を変えることなく、細胞接着可能な媒体に転写したいニーズがある。
【０００３】
このような媒体としては、例えば、別の温度応答性培養皿やハイドロゲル（フィブリンゲルやコラーゲンゲル）、細胞の表面電位を計測可能なセンサが露出した媒体（マルチ電極アレイディッシュやフレキシブル電極）、その他の機能性素材（シリコーンなど）を挙げることができる。フレキシブル電極は、測定対象が動いても、動きに追従して剥がれず、測定を継続できるような柔軟性・収縮性を備える。また、シリコーンには、伸縮性、酸素透過性の性質がある。この性質を利用して、例えば伸長させたシリコーン膜上に上皮細胞を播種し培養後、シリコーンを元の大きさに戻すことで、過密状態の細胞単相を実験的に再現し、そこからの細胞の剥離を研究したり、シリコーン上で培養することで、培養底面からの酸素供給を可能にし、酸素要求度の高い細胞の生存を高めたりすることができる。
【０００４】
筋細胞を含む細胞構造体を細胞接着可能な媒体に転写する具体例の一つに、温度応答性培養皿上で培養している、拍動する心筋細胞シートを、フィブリンゲル上に転写したいニーズがある。
【０００５】
これに関連して、非特許文献１や特許文献１には、心筋細胞が拍動によって発生する張力を、張力センサで検出する仕組みを、心毒性スクリーニング試験に利用することが開示されている。

【０００６】
非特許文献１や特許文献１に開示されている手法では、まず、フィブリンゲルシートを、温度応答性培養皿上で培養している（剥離する前の）細胞の上に乗せ、その上部から重りを載せて、細胞上にゲルシートを押し付ける。そして、細胞上にゲルシートを押し付けた状態で、６０分間、２０℃環境下で培養すると、細胞が温度応答性培養皿から剥離されて、細胞をフィブリンゲルシートの表面に転写することができる。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】特開２０１９－７６０４６号公報
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｓａｓａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（2018）ＰＬｏＳＯＮＥ　１３：ｅ０１９８０２６
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明者は、非特許文献１および特許文献１に開示されている転写方法では、フィブリンゲル上に重りを乗せたり、２０℃、６０分間の培養後に降ろしたりする工程で、慎重に操作しないと、細胞がフィブリンゲルシート表面に均一に転写されず、一部が剥がれたり、細胞が死んでしまう課題があることを発見した。
【００１０】
本発明は、上記課題を解決するために発明されたものであり、筋細胞を含む細胞構造体を細胞接着可能な媒体に対して、容易にかつ均一に転写することのできる転写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】
【００１１】
本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、筋細胞を含む細胞構造体を、細胞接着可能な媒体に転写する転写方法であって、温度応答性培養皿に配置された前記細胞構造体上に、前記被転写部材を積層した積層体に対して、積層方向に遠心力を付与する遠心工程と、前記温度応答性培養皿の下限臨界溶液温度以下に保って、前記温度応答性培養皿から前記筋細胞を含む細胞構造体を剥離させる剥離工程と、を有する、転写方法により、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。
【発明の効果】
【００１２】
上述した転写方法によれば、筋細胞を含む細胞構造体を細胞接着可能な媒体に対して、容易にかつ均一に転写することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】本発明の実施形態に係る張力測定デバイスを示す概略斜視図である。
【図２】ゲルアダプタホルダ組立体を示す概略図である。
【図３】第１ゲルアダプタホルダを示す概略図である。
【図４】第２ゲルアダプタホルダを示す概略図である。
【図５】ゲルアダプタホルダ組立体に形成されたゲルに細胞構造体を転写する方法を説明するための図である。
【図６】図６（Ａ）は、ゲルアダプタホルダ組立体にゲルが形成された様子を示す概略図であって、図６（Ｂ）は、図６（Ａ）の６Ｂ－６Ｂ線に沿う断面図であって、温度応答性培養皿に配置された細胞構造体の上に、ゲルを乗せる様子を示す図である。
【図７】温度応答性培養皿に配置された細胞構造体の上に、ゲルを備えたゲルアダプタホルダ組立体を乗せたときの上面図である。

【図８】本実施形態に係る転写方法の遠心工程を示す概略図である。
【図９】変形例に係る張力測定デバイスの図６に対応する図である。
【図１０】変形例に係る張力測定デバイスの図７に対応する図である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
以下、本発明の実施形態を、図１～図８を参照しつつ説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。図面の寸法比率は、説明の都合上誇張されており、実際の比率とは異なる場合がある。
【００１５】
図１は、本発明の実施形態に係る張力測定デバイス１を示す概略斜視図である。図２は、ゲルアダプタホルダ組立体１０を示す概略図である。図３は、第１ゲルアダプタホルダ１１を示す概略図である。図４は、第２ゲルアダプタホルダ１２を示す概略図である。図５は、ゲルアダプタホルダ組立体１０に形成されたゲルＧに細胞構造体ＣＳを転写する方法を説明するための図である。図６は、温度応答性培養皿Ｄ１に配置された細胞構造体ＣＳの上に、ゲルＧを乗せる様子を示す概略図である。図７は、温度応答性培養皿Ｄ１に配置された細胞構造体ＣＳの上に、ゲルＧを備えたゲルアダプタホルダ組立体１０を乗せたときの上面図である。図８は、本実施形態に係る転写方法の遠心工程を示す概略図である。
【００１６】
以下、本実施形態に係る張力測定デバイス１の構成の説明を行う前に、張力測定デバイス１の測定対象である筋細胞を含む細胞構造体ＣＳについて説明する。
【００１７】
＜筋細胞を含む細胞構造体＞
本明細書において、「筋細胞を含む細胞構造体」とは、生体から採取した筋細胞を含む生体組織（例えば、心筋組織、骨格筋組織、平滑筋組織など）や、筋細胞を含む構造体をいう。本発明に適用し得る、筋細胞を含む細胞構造体は、生体から採取した生体組織そのものや、例えば、ヒトｉＰＳ細胞由来心筋細胞を用いた心筋組織等、生体から採取した生体組織を加工した生体組織であってもよい。また、本発明に適用し得る筋細胞を含む細胞構造体は、筋細胞を含む懸濁液とゲル溶液又はゲル化剤とを混合させて形成した細胞構造体であってもよく、細胞シートであってもよい。さらにまた、本発明に適用し得る筋細胞を含む細胞構造体とは、ゲルの上に、筋細胞を含む細胞群を直接播種し、培養することにより形成されるものであってもよい。
【００１８】
一実施態様において、本発明に適用し得る、筋細胞を含む細胞構造体は、シート状、棒状及び紐状からなる群から少なくとも１つ選択されてもよく、好ましくはシート状の細胞構造体である。
【００１９】
本明細書において、「シート状の細胞構造体」とは、例えば、約１０μｍ（例えば、細胞１個分の厚さ）以上～約２ｍｍ以下の平均の厚さを有し、かつ、後述の第１ゲル保持部と第２ゲル保持部との間に適用し得る長さを有する、膜状の細胞構造体をいう。「シート状の細胞構造体」の幅は、第１ゲル保持部及び第２ゲル保持部に適用し得る幅であればよく、限定されない。１枚の「シート状の細胞構造体」が、張力測定デバイスに適用されてもよく、複数枚の「シート状の細胞構造体」が張力測定デバイスに適用されてもよい。複数枚の「シート状の細胞構造体」は、第１ゲル保持部と第２ゲル保持部の間に並列に適用されてもよく、積層されて適用されてもよい。
【００２０】
本明細書において、「棒状の細胞構造体」とは、例えば、約１００μｍ以上～約５ｍｍ以下の平均直径を有し、かつ、後述の第１ゲル保持部と第２ゲル保持部との間に適用し得る長さを有する細胞構造体をいう。１本の「棒状の細胞構造体」が、張力測定デバイスに適用されてもよく、複数本の「シート状の細胞構造体」が張力測定デバイスに適用されてもよい。複数本の「棒状の細胞構造体」は、第１ゲル保持部と第２ゲル保持部の間に並列に

適用されてもよく、束ねられて適用されてもよい。

【００２１】

本明細書において、「紐状の細胞構造体」とは、例えば、約１０μｍ以上～約１００μｍ未満の平均直径を有し、かつ、後述の第１ゲル保持部と第２ゲル保持部との間に適用し得る長さを有する三次元細胞構造体をいう。１本の「紐状の細胞構造体」が、張力測定デバイスに適用されてもよく、複数本の「紐状の細胞構造体」が張力測定デバイスに適用されてもよい。複数本の「紐状の細胞構造体」は、第１ゲル保持部と第２ゲル保持部の間に並列に適用されてもよく、束ねられて適用されてもよい。

【００２２】

なお、「棒状の細胞構造体」と「紐状の細胞構造体」は、その直径によって便宜的に上記のように分けて表現しているが、いずれも細長い形状の細胞構造体を表すものであり、相互に用語を入れ替えて使用されてもよい。

【００２３】

本発明に適用し得る「棒状の細胞構造体」又は「紐状の細胞構造体」は、例えば、シート状の細胞構造体を棒状又は紐状に形成（例えば、巻きとる、よじる、収縮させる、又は切断する等）してもよく、棒状又紐状のモールドに細胞と任意のゲルを含む懸濁液を流し込んで形成したものであってもよい（例えば、Ｚｈａｏ　Ｙ，Ｃｅｌｌ．２０１９　Ｆｅｂ７；１７６（４）：９１３－９２７参照）。

【００２４】

本明細書において、「筋細胞を含む細胞構造体」とは、細胞構造体に含まれる細胞数のうち、少なくとも筋細胞が１％以上含まれるものをいい、例えば、１５％以上、２０％以上、２５％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９９％以上含まれる。本明細書において、「筋細胞」とは、動物体の筋肉組織を形成する収縮性を有する細胞であり、例えば、心筋細胞、骨格筋細胞及び平滑筋細胞が挙げられる。一実施態様において、本発明において用いられる「筋細胞」は、心筋細胞、骨格筋細胞及び平滑筋細胞からなる群から少なくとも１つ選択される。本発明に用いることができる筋細胞は動物由来のものであればよく、例えば、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類の筋細胞を用いることができる。好ましくは、哺乳動物由来の筋細胞であり、例えば、マウス、ラット、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ヒツジ、ネコ、ヤギなどの哺乳動物由来の筋細胞を用いることができる。

【００２５】

本発明に利用可能な筋細胞は、生体組織から採取された初代細胞であってもよく、株化された細胞であってもよく、多能性幹細胞若しくは組織幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。

【００２６】

本明細書において「多能性幹細胞」とは、あらゆる組織の細胞へと分化する能力（分化多能性）を有する幹細胞の総称することを意図する。限定されるわけではないが、多能性幹細胞は胚性幹細胞（ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ＥＳ細胞）、胚性癌腫細胞（ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ　ｃｅｌｌ：ＥＣ細胞）、栄養芽幹細胞（ｔｒｏｐｈｏｂｌａｓｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ＴＳ細胞）、エピブラスト幹細胞（ｅｐｉｂｌａｓｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ＥｐｉＳ細胞）、胚性生殖細胞（ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｇｅｒｍ　ｃｅｌｌ：ＥＧ細胞）、多能性生殖細胞（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ　ｇｅｒｍｌｉｎｅ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ｍＧＳ細胞）、人工多能性幹細胞（ｉｎｄｕｃｅｄ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ｉＰＳ細胞）、Ｍｕｓｅ細胞等を含む。好ましくは、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である。多能性幹細胞としては公知の任意のものを使用可能であるが、例えば、国際公開第２００９／１２３３４９号（ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０５７０４１）に記載の多能性幹細胞を使用することができる。

【００２７】

本発明に用いることができる筋細胞は、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であっても

よい。多能性細胞から筋細胞へ分化させる方法は、公知の方法を用いることができる（例えば、Ｍａｔｓｕｕｒａ　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｒｅａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｃａｒｄｉａｃ　ｃｅｌｌ　ｓｈｅｅｔｓ　ｕｓｉｎｇ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２０１２　Ａｕｇ　２４；４２５（２）：３２１－３２７等を参照のこと）。

【００２８】
筋細胞を含む細胞構造体には、筋細胞以外の細胞が含まれていてもよい。例えば、心筋芽細胞、筋芽細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞等が含まれていてもよい。

【００２９】
以上、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳについて説明した。次に、本実施形態に係る張力測定デバイス１の構成について説明する。

【００３０】
張力測定デバイス１は、図１に示すように、ゲルＧおよび細胞構造体ＣＳが保持されるゲルアダプタホルダ組立体１０と、細胞構造体ＣＳの拍動に起因する張力を検出する張力検出手段２０と、ゲルアダプタホルダ組立体１０および張力検出手段２０を連結する連結部材３０と、細胞構造体ＣＳおよびゲルアダプタホルダ組立体１０が配置される容器４０と、を有する。

【００３１】
ゲルアダプタホルダ組立体１０には、図２～図５に示すように、ゲルＧが形成される。

【００３２】
本発明において適用され得るゲルとは、（１）筋細胞を含む細胞構造体が接着可能であり、（２）シート形状を維持できる強度を有し、（３）細胞の生育、機能発現等に悪影響を与えない、すなわち生体適合性のものであれば利用することができる。本発明に適用され得るゲルは、例えば、ハイドロゲルである。本発明に適応し得るハイドロゲルとしては、例えば、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの水溶性、水親和性、若しくは水吸収性合成高分子、多糖、タンパク質、核酸などを化学架橋したハイドロゲルが挙げられる。多糖としては、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン、デンプン、グリコーゲン、アガロース、ペクチン、セルロース等が挙げられる。また、タンパク質としては、コラーゲン及びその加水分解物であるゼラチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、エンタクチン、テネイシン、トロンボスポンジン、フォンビルブランド因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン（例えば、フィブリノーゲンとトロンビンを反応させたフィブリンゲル）等が挙げられる。これらのハイドロゲルに対し、公知の方法を用いて架橋処理を行い、強度を上げて使用してもよい。本発明に適用され得るゲルとしては、好ましくは、フィブリンゲルである。本発明の一実施形態において、ゲルは、予め細胞と混合させて形成させたものであってもよい。

【００３３】
以下、ゲルアダプタホルダ組立体１０の構成の一例について説明するが、ゲルアダプタホルダ組立体１０の構成は、ゲルＧおよび細胞構造体ＣＳを保持することができる限りにおいて、以下の構成に限定されない。

【００３４】
ゲルアダプタホルダ組立体１０は、特願２０１９－０３６６７７に記載されているものを用いることができる。このため、ここではゲルアダプタホルダ組立体１０の詳細な説明は省略して、概略の構成についてのみ説明する。

【００３５】
ゲルアダプタホルダ組立体１０は、図２～図４に示すように、第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２を有する。

【００３６】
第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２は、図２に示すように、

組み立てられることによって、ゲルアダプタホルダ組立体１０を構成する。

【００３７】

第１ゲルアダプタホルダ１１は、図２、図３に示すように、枠部材１１０と、ゲルＧの一端を固定するための第１ゲル保持部１１１と、容器４０の蓋体４１に固定される一対の爪部１１７と、を有する。

【００３８】

枠部材１１０が設けられることによって、ゲルＧおよび細胞構造体ＣＳの形状を維持したまま、ゲルアダプタホルダ組立体１０を容器４０の蓋体４１（後述）に取り付けることができる。

【００３９】

第１ゲルアダプタホルダ１１を構成する材料は、特に限定されないが、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリウレタン、ポリウレア、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニル、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリ（メタ）アクリル酸誘導体、ポリアクリロニトリル、ポリ（メタ）アクリルアミド、ポリ（メタ）アクリルアミド誘導体、ポリスルホン、セルロース、セルロース誘導体、ポリシリコーン、金属などが挙げられる。

【００４０】

第２ゲルアダプタホルダ１２は、図２、図４に示すように、連結部材３０が接続される接続部１２０と、ゲルＧの他端を固定するための第２ゲル保持部１２１と、接続部１２０および第２ゲル保持部１２１を連結する連結部１２４と、を有する。

【００４１】

接続部１２０には、連結部材３０と接続するための接続口１２６が設けられている。

【００４２】

第２ゲルアダプタホルダ１２を構成する材料は、第１ゲルアダプタホルダ１１を構成する材料と同一のものを用いることができる。

【００４３】

以下、図５～図８を参照して、第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２にゲルＧを形成する方法、およびゲルアダプタホルダ組立体１０に形成されたゲルＧ（細胞接着可能な媒体に相当）に、細胞構造体ＣＳを転写する方法について説明する。

【００４４】

まず、第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２を基板１３にセットし、ピペットＰを用いて、硬化前のゲル化剤（例えば、フィブリノーゲン（ＳＩＧＭＡ　ウシ血漿由来　Ｔｙｐｅ　Ｉ－Ｓ）、トロンビン（ＳＩＧＭＡ　ウシ血漿由来　Ｔ４６４８）、ＣａＣｌ$_2$溶液（８ｍＭ）、およびＦａｃｔｏｒ　ＸＩＩＩ（ＣＳＬ　Ｂｅｈｒｉｎｇ　フィブロガミンＰ静注用）の混合液）を注入する（図５（Ａ））。

【００４５】

次に、ゲル形成蓋体１４で、第１ゲル保持部１１１および第２ゲル保持部１２１に蓋をする（図５（Ｂ））。

【００４６】

次に、ゲルが硬化後、第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２からゲル形成蓋体１４および基板１３を取り外す（図５（Ｃ））。このとき、図６に示すように、ゲルＧは、ゲルＧの底面Ｇ１が第１ゲルアダプタホルダ１１の底面１１Ａと略同一平面となるように形成される。

【００４７】

上記とは別に、温度応答性培養皿Ｄ１（例えば、ＵｐＣｅｌｌ（登録商標）（セルシード社、東京、日本））上に筋細胞を含む細胞群を播種してコンフルエントになるまで３７℃で予め培養しておく（図５（Ｃ））。

【００４８】

そして、温度応答性培養皿Ｄ１の細胞構造体ＣＳの上に、上記で得られたゲルを備えたゲルアダプタホルダ組立体１０を載せる（図５（Ｃ））。このとき、図７に示すように、温

度応答性培養皿Ｄ１の大きさは、ゲルアダプタホルダ組立体１０がちょうど嵌まる大きさであることが好ましい。この構成によれば、後述する遠心工程の際に、ゲルアダプタホルダ組立体１０が意図せず移動してしまうことを好適に抑制することができる。

【００４９】

そして、図８に示すように、温度応答性培養皿Ｄ１に配置された細胞構造体ＣＳ上に、ゲルＧを積層した積層体Ｌに対して、積層方向に遠心力Ｆを付与する（遠心工程）。遠心工程は、公知のプレート遠心機１００によって行われる。遠心工程が行われる時間は特に限定されないが、例えば５分である。

【００５０】

遠心工程では、回転当初は、図８（Ａ）に示すように、積層体Ｌの積層方向が上下方向であり、回転速度を増大させることによって、図８（Ｂ）に示すように、積層体Ｌの積層方向が略左右方向となるように積層体Ｌが立ち上がる。この結果、遠心力Ｆによって、細胞構造体ＣＳに対して、ゲルＧが物理的に押さえつけられる。

【００５１】

そして、積層体Ｌを恒温槽内に配置して、３７℃、５％CO_2環境下で、培養する。この工程によって、細胞構造体ＣＳを、ゲルＧに生物学的に能動的に接着させる（接着工程）。接着工程が行われる時間は特に限定されないが、例えば６０分である。

【００５２】

そして、積層体Ｌを恒温槽内において、２０℃、５％CO_2環境下で、培養する。この工程によって、温度応答性培養皿Ｄ１から細胞構造体ＣＳを剥離させる（剥離工程）。剥離工程が行われる時間は特に限定されないが、例えば９０分である。

【００５３】

以上説明した転写方法によって、細胞構造体ＣＳを、ゲルＧに転写することによって、１００％確実に転写することができた。なお、先行技術文献で説明した重りを用いる方法では、転写の成功率は２１％であった。

【００５４】

以下、張力測定デバイス１の構成の説明に戻る。

【００５５】

張力検出手段２０は、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳが拍動することによって生じる張力を測定する。張力検出手段２０は、図１に示すように、連結部材３０を介してゲルアダプタホルダ組立体１０に接続される。筋細胞を含む細胞構造体ＣＳが収縮すると、第２ゲルアダプタホルダ１２が鉛直方向の下方へ引っ張られ、連結部材３０を介して、張力検出手段２０により加重が検出される。張力検出手段２０は、例えば、公知のロードセルを用いることができる。

【００５６】

連結部材３０は、図１に示すように、ゲルアダプタホルダ組立体１０および張力検出手段２０を連結する。連結部材３０は、フック３１と、接続部３２と、を有する。

【００５７】

フック３１は、第２ゲルアダプタホルダ１２の接続口１２６に挿通される。接続部３２は、張力検出手段２０に接続される。

【００５８】

連結部材３０は、第２ゲルアダプタホルダ１２および張力検出手段２０を連結できる限りにおいて、上記の構成に限定されない。

【００５９】

容器４０には、ゲルＧおよび細胞構造体ＣＳを備えたゲルアダプタホルダ組立体１０が収容される。容器４０には蓋体４１が取り付けられる。

【００６０】

蓋体４１には、第１ゲルアダプタホルダ１１の一対の爪部１１７が嵌合する。

【００６１】

容器４０には、薬剤および培地が注入される。容器４０の下方には、ヒーター（不図示）

が設けられる。

【００６２】

以上説明したように、本実施形態に係る転写方法は、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを、細胞接着可能なゲルＧに転写する転写方法である。転写方法は、温度応答性培養皿Ｄ１に配置された細胞構造体ＣＳ上に、ゲルＧを積層した積層体Ｌに対して、積層方向に遠心力Ｆを付与する遠心工程と、温度応答性培養皿Ｄ１の下限臨界溶液温度以下（本実施形態では、２０℃）に保って、温度応答性培養皿Ｄ１から筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを剥離させる剥離工程と、を有する。この転写方法によれば、遠心工程において、遠心力Ｆによって、細胞構造体ＣＳに対して、ゲルＧが物理的に押さえつけられるため、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳをゲルＧに対して、容易にかつ均一に転写することができる。

【００６３】

また、転写方法は、遠心工程および剥離工程の間に、温度応答性培養皿Ｄ１の下限臨界溶液温度以上に保って、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを、ゲルＧに生物学的に能動的に接着させる接着工程を有する。この転写方法によれば、より好適に、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳをゲルＧに対して、転写することができる。

【００６４】

なお、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、特許請求の範囲内で種々改変することができる。

【００６５】

例えば上述した実施形態では、図６に示すように、第１ゲルアダプタホルダ１１の底面１１ＡおよびゲルＧの底面Ｇ１が略同一平面となるように、ゲルＧが形成された。しかしながら、図９に示すように、第１ゲルアダプタホルダ１１の底面１１Ａに対して、ゲルＧの底面Ｇ１が高くなるように、ゲルＧが形成されてもよい。このとき、温度応答性培養皿Ｄ２には、図９に示すように、第１ゲルアダプタホルダ１１の底面１１ＡおよびゲルＧの底面Ｇ１の高低差と略同一の高さを備える凸部Ｄ３が形成され、凸部Ｄ３上に細胞構造体ＣＳが培養される。このように、第１ゲルアダプタホルダ１１の底面１１Ａに対して、ゲルＧの底面Ｇ１が高くなるように、ゲルＧが形成されることによって、第１ゲルアダプタホルダ１１および第２ゲルアダプタホルダ１２を意図せず水平方向に移動させたとしても、ゲルＧが摺動されることを好適に防止でき、ゲルＧが汚れることを防止できる。

【００６６】

また、上述した実施形態では、図７に示すように、温度応答性培養皿Ｄ１の大きさは、ゲルアダプタホルダ組立体１０がちょうど嵌まる大きさであった。しかしながら、図１０（Ａ）、図１０（Ｂ）、図１０（Ｃ）に示すように、温度応答性培養皿Ｄ１の大きさは、ゲルアダプタホルダ組立体１０に対して大きくなるように構成されていてもよい。このとき、ゲルアダプタホルダ組立体１０が温度応答性培養皿Ｄ１内で意図せず移動してしまうことを抑制するために、ゲルアダプタホルダ組立体１０の周囲に、規制部材８０を設けることが好ましい。なお、規制部材８０は、図１０（Ａ）～図１０（Ｃ）に示すような構成とすることができる。規制部材８０を構成する材料は特に限定されないが、例えば、シリコーンを用いることができる。規制部材８０は、ゲルアダプタホルダ組立体１０の周囲に設けられていればよく、温度応答性培養皿Ｄ１とは別体の部材であってもよいし、温度応答性培養皿Ｄ１に規制部材８０を形成してもよい。

【００６７】

また、上述した実施形態では、転写方法は、遠心工程および剥離工程の間に、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを、ゲルＧに生物学的に能動的に接着させる接着工程を有した。しかしながら、転写方法は、接着工程を有していなくてもよい。

【００６８】

また、上述した実施形態では、接着工程は、３７℃、５％CO_2環境下で、６０分間行われたが、筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを、ゲルＧに生物学的に能動的に接着させることができる限りにおいて、上記の環境および時間に限定されない。

【００６９】

また、上述した実施形態では、接着工程は、遠心工程の後に行われた。しかしながら、恒温槽内において、遠心工程を行うことによって、接着工程は、遠心工程と同時に行われてもよい。この転写方法によれば、転写に費やす時間を短縮することができる。

【００７０】

また、上述した実施形態では、遠心工程は５分間行われた。しかしながら、遠心工程は、本発明の効果を奏する限りにおいて、５分間に限定されない。

【００７１】

また、上述した実施形態では、剥離工程は、２０℃、５％CO_2環境下で、９０分間行われたが、温度応答性培養皿Ｄ１から筋細胞を含む細胞構造体ＣＳを剥離させることができる限りにおいて、上記の環境および時間に限定されない。

【００７２】

また、上述した実施形態では、媒体はハイドロゲルシートであったが、これに限定されず、別の温度応答性培養皿、細胞の表面電位を計測可能なセンサが露出した媒体（マルチ電極アレイディッシュやフレキシブル電極）、その他の機能性素材（シリコーンなど）等であってもよい。

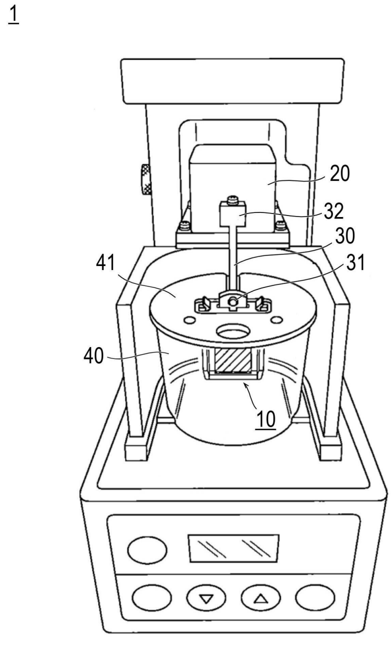
【符号の説明】

【００７３】

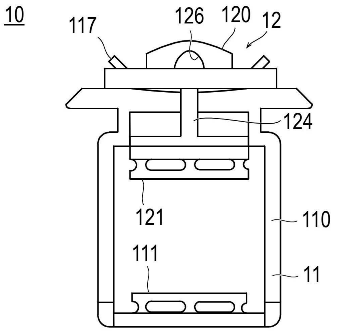
１　張力測定デバイス、
１０　ゲルアダプタホルダ組立体、
１１　第１ゲルアダプタホルダ、
１２　第２ゲルアダプタホルダ、
ＣＳ　細胞構造体、
Ｄ１　温度応答性培養皿、
Ｆ　遠心力、
Ｇ　ゲル（媒体）、
Ｌ　積層体。

【図面】

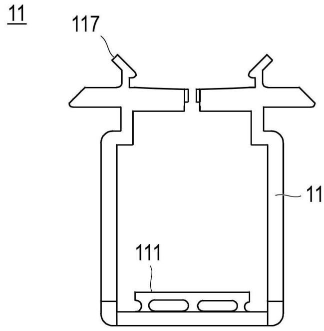
【図１】



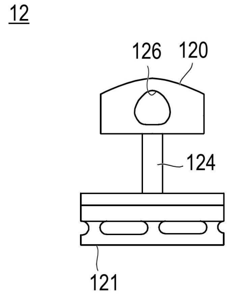
【図２】



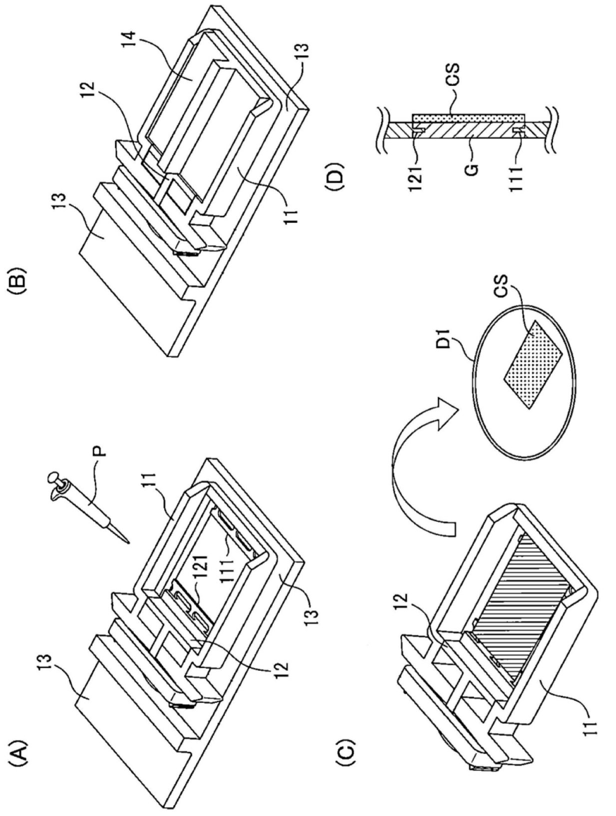
【図３】


11
117
110
111

【図４】

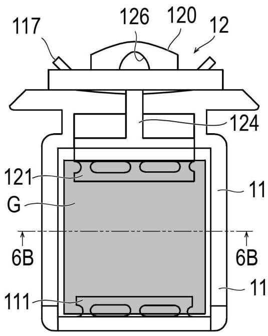

12
126
120
124
121

【図５】

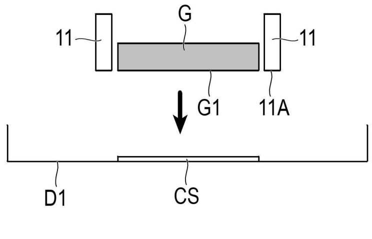

(A)
(B)
(C)
(D)
P
11
12
13
14
111
121
CS
G
D1

【図６】

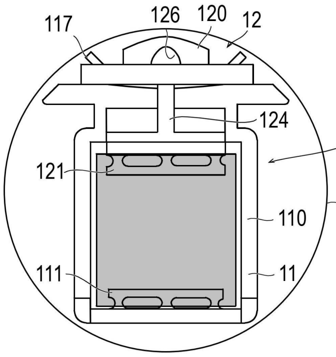
（Ａ）


117
126
120
12
124
121
G
110
6B
6B
111
11

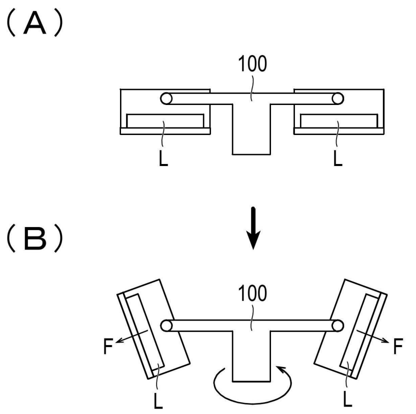
（Ｂ）


G
11
11
G1
11A
D1
CS

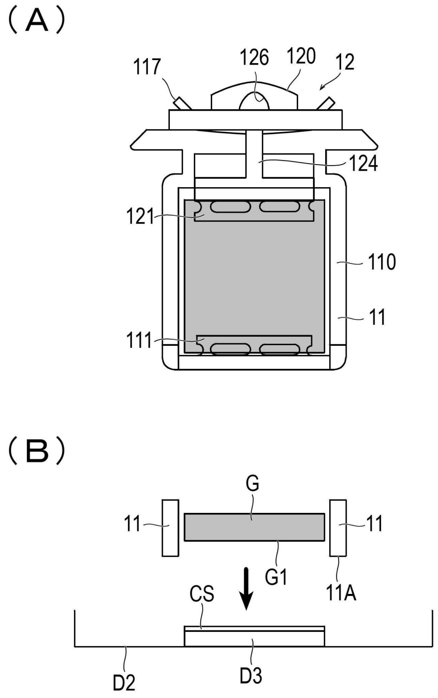
【図７】


117
126
120
12
124
10
121
D1
110
111
11

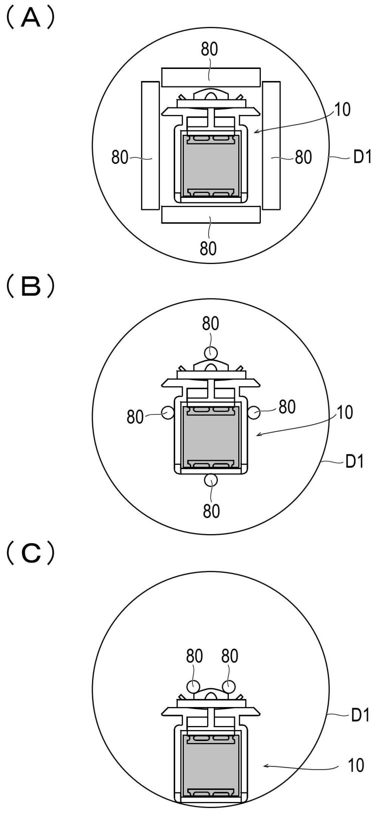
【図８】


（Ａ）
100
L
L
（Ｂ）
100
F
F
L
L

【図９】


（Ａ）
117
126
120
12
124
121
110
11
111
（Ｂ）
G
11
11
G1
11A
CS
D2
D3

【図１０】


（Ａ）
80
10
80
80
D1
80
（Ｂ）
80
80
80
10
D1
80
（Ｃ）
80
80
D1
10

フロントページの続き

埼玉県所沢市くすのき台１丁目１番６号 日本光電工業株式会社内
(72)発明者 日向 裕人
埼玉県所沢市くすのき台１丁目１番６号 日本光電工業株式会社内
(72)発明者 清水 達也
東京都新宿区河田町８番１号 学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者 佐々木 大輔
東京都新宿区河田町８番１号 学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者 原口 裕次
東京都新宿区河田町８番１号 学校法人東京女子医科大学内
Ｆターム（参考） 4B029 AA09 AA11 AA21 BB11 CC02 HA10