明　細　書

発明の名称 ： 培養部材およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、培養部材およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 生体の器官および組織は、それらを構成する細胞同士が三次元的にネットワークを形成し機能を発現している。そのため、細胞が本来有する機能を十分に発揮させることを目的として、従来の平面的な細胞培養とは異なり、細胞を三次元に培養して得られるスフェロイドが作製され、注目を集めている。スフェロイドは、細胞の機能評価および薬剤のスクリーニング等において、平面的に培養された細胞に比べて生体に近い結果が得られることが報告されており、創薬においてｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験とｉｎ　ｖｉｖｏ試験の間の溝を埋める重要なツールとして期待されている。また、ｉＰＳ細胞を始めとした幹細胞は、再生医療や細胞治療の重要な細胞ソースとして期待され、高品質な細胞を大量に調製する事が求められている。幹細胞を３次元培養し、スフェロイドを形成させると、細胞の本来の多能性（未分化状態）を維持したまま高密度培養が可能となるので、スフェロイドは再生医療においてもその有用性が注目されている。それに伴い、均一な形状やサイズの細胞スフェロイドを、大量に、安定的に、かつ簡便に入手するための新たな細胞培養技術への要求も高まっている。

[0003] 上記のような事情から、スフェロイドを形成させる種々の方法が開発されている。例えば、細胞の接着が阻害されるように表面が加工または処理された培養容器を用いる方法（特許文献１）、細胞接着性が低い樹脂層を形成した容器内にて浮遊状態で培養を行う方法（特許文献２）、培養容器のプロテオグリカンの吸着量を特定の数値以上にすることで、スフェロイドを培養容器表面上に付着した状態で形成させる方法（特許文献３）等である。特に、非接着性の細胞を培養しスフェロイドを形成させる場合は、培養容器の表面

に細胞が接着しない処理（例えば、培養容器の表面を超親水化処理する、疎水性とする、または接着しにくい構造にする等）が通常行われている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０２０／０１３３４５号公報

特許文献2：特開２００８－０６１６０９号公報

特許文献3：特開２０１７－７７２４１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、細胞等を培養してスフェロイドを形成させることができる、培養部材および培養器具を提供することを課題とする。また、形状安定性に優れ、かつ、細胞、組織、または器官の培養に適した酸素環境を実現でき、自家蛍光を発せず細胞観察性を損なわず、薬剤を収着しにくい培養部材および培養器具を提供することを課題とする。さらに、特に幹細胞由来の分化細胞を分化細胞純度が高い状態で培養可能な培養部材および培養器具を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した。その結果、以下の構成を有する培養部材など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。本発明は、例えば以下の〔１〕～〔１２〕である。

〔１〕 細胞、組織、または器官をその培養面上で培養する培養部材であり、前記培養部材は４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含み、前記培養面の水接触角が１００°より大きく１６０°以下であり、温度２３℃、湿度０％の時の酸素透過度が４５００～９００００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）である培養部材。

〔２〕 前記４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）が、４－メチル－１－ペンテンとエチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－

１－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも１種の共重合体（ｘ１）である、〔１〕に記載の培養部材。

〔３〕　前記培養面が、凹凸構造の形成加工を施されていない、〔１〕または〔２〕に記載の培養部材。

〔４〕　スフェロイド形成用である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の培養部材。

〔５〕　前記細胞、組織、または器官が、ｉＰＳ細胞由来の分化細胞を含む、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の培養部材。

〔６〕　前記細胞、組織、または器官が、心筋細胞を含む、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養部材。

〔７〕　前記培養部材の形状がフィルム状またはシート状である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の培養部材。

〔８〕　少なくとも培養面が、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の培養部材で形成された、培養器具。

〔９〕　〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の培養部材または〔８〕に記載の培養器具の培養面に、細胞、組織または器官を接触させる工程（Ａ）；および

前記培養面に接触した細胞、組織または器官を培養してスフェロイドを形成させる工程（Ｂ）；を含む細胞、組織または器官の培養方法。

〔１０〕　さらに、前記細胞等の分化を誘導する工程（Ｃ）を含み、工程（Ｃ）が、プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により、ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する工程である、〔９〕に記載の細胞、組織または器官の培養方法。

〔１１〕　心筋純度を増加させる、〔９〕または〔１０〕に記載の細胞、組織または器官の培養方法。

〔１２〕　〔９〕～〔１１〕のいずれかに記載の培養方法により形成されたスフェロイド。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、細胞等を培養してスフェロイドを形成させることができる、培養部材および培養器具を提供することができる。また、本発明によれば、形状安定性に優れ、かつ、細胞、組織、または器官の培養に適した酸素環境を実現でき、自家蛍光を発せず細胞観察性を損なわず、薬剤を収着しにくい培養部材および培養器具を提供することができる。さらに、本発明によれば、特に幹細胞由来の分化細胞を分化細胞純度が高い状態で培養可能な培養部材および培養器具を提供することができる。また、本発明の培養部材および培養器具は、ｉＰＳ細胞を心筋細胞へと分化させやすい。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、ｉＰＳ細胞から心筋細胞を分化誘導する実験のスケジュールを示す図である。

[図2]図２は、心筋分化誘導１２日目の細胞の形態を観察した写真である。

[図3]図３は、心筋分化誘導１９日目の細胞の形態を観察した写真である。

[図4]図４は、実施例３のヒト骨肉腫由来がん細胞（ＨＯＦ－１４３Ｂ）がスフェロイドを形成している様子を観察した写真である。

発明を実施するための形態

[0009] 数値範囲に関する「Ａ～Ｂ」との記載は、特に断りがなければ、Ａ以上Ｂ以下であることを表す。例えば、「１～５％」との記載は、１％以上５％以下を意味する。

[0010] ［培養部材］

本発明に係る培養部材は、その培養面で細胞、組織または器官（以下、細胞等ともいう）を培養する部材であり、前記培養部材は４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含み、前記培養面の水接触角が１００°より大きく１６０°以下であり、温度２３℃、湿度０％の時の酸素透過度が４５００～９００００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）であることに特徴がある。

ここで、培養部材とは、細胞等を培養するために用いられる培養器具の少なくとも一部を構成する部材を意味する。培養部材が前記培養器具の一部である場合、少なくとも細胞等を培養する培養面が、本発明の培養部材により

構成される。ここで培養面とは、細胞等を培養する際に、培地が形成される面、細胞等が播種される面、または培地が形成されかつ細胞等が播種される面を意味する。すなわち、培養面とは、培地形成予定面および細胞等播種予定面を包含する概念である。

[0011] 本明細書において、培養とは、細胞等を増殖、維持させることだけでなく、細胞等の播種、継代、分化誘導、自己組織化誘導等のプロセスも含む広い意味で用いる。

[0012] 本発明の培養部材の形態は特に制限はなく、例えば、フィルム状、シート状であってもよい。前記培養部材が、フィルム状やシート状である場合には、フィルム状またはシート状の培養部材の少なくとも一面を培養面とした、培養器具として好適に用いることができる。

[0013] 本発明の培養部材は、培養面に、細胞等の足場となるための天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料がコーティングされていないものを意味する。

[0014] 本発明の培養部材の厚さは、特に制限されない。また、本発明の培養部材の厚さは、特に制限されないが、２０～５００μｍが好ましく、２５～４００μｍがより好ましく、５０～２００μｍが特に好ましい。培養部材の厚さが前記範囲内であると、細胞が増殖する上で必要な適度な培地中の酸素濃度が得られ、培養部材、特に培養容器底面が撓むことなく好適な培養器具を作製しやすくなる。

[0015] 本発明の培養部材を容器底面に配置してディッシュ（シャーレとも称す）、フラスコ、インサートまたはプレート等の培養器具を作製する際の培養部材の厚さは特に限定されないが、好ましくは２０μｍ～４００μｍ、より好ましくは２０μｍ～３００μｍ、さらに好ましくは２０μｍ～２００μｍの厚さである。培養部材の厚さは、培養器具の形態に応じて適宜選ばれるが、前記範囲に調整することで細胞が増殖する上で必要な適度な培地中の酸素濃度が得られやすく、充分な強度を持つ、好適な培養器具を作製しやすくなる。

[0016] 本発明の培養部材は、本発明の効果を損なわなければ、その表面を加工してもよい。表面の加工としては、例えば、凹凸構造の形成加工、親水化処理、疎水化処理等の表面改質処理が挙げられる。

本発明の培養部材は、その表面を加工しなくても、細胞が接着しにくいため、スフェロイドを形成させることができる。したがって、本発明の培養部材は、その表面を加工されていないことが好ましく、凹凸構造の形成加工を施されていないことがより好ましい。

[0017] 表面改質処理に用いる方法は特に限定されないが、例えばコロナ処理、プラズマ処理、オゾン処理、紫外線処理等の親水化処理、エステル化、シリル化、フッ化等の疎水化処理、表面グラフト重合、化学蒸着、エッチング、または、ヒドロキシル基、アミノ基、スルホン基、チオール基、カルボキシル基等の特定の官能基付加、シランカップリング、チタンカップリング、ジルコニウムカップリング等の特定の官能基による処理、酸化剤等による表面粗化、ラビングやサンドブラスト等の物理的処理等が挙げられる。これらの表面改質処理は、単独で行ってもよいし、２種以上を組み合わせて行ってもよい。なお、表面改質処理を行う場合には、少なくとも培養面に行うことが好ましい。

[0018] 本発明の培養部材の製造方法は、特に制限されず、製造に用いる機器も制限されない。例えば、４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含むフィルムまたはシートを形成し、必要に応じてそのフィルムまたはシートを成形して所望の形状とした成形品として培養部材を作製することができる。培養部材となるフィルム、シートまたはその他の成形品は、押出成形、溶液キャスト成形、射出成形、ブロー成形等の方法により、直接成形することによっても得られる。

[0019] 前記フィルムまたはシートを形成する方法としては、具体的には、例えば、通常のインフレーション法、Ｔ－ダイ押出法などが採用される。製造は通常加温して行う。Ｔ－ダイ押出法を採用する場合、押出温度は１００℃～４００℃が好ましく、２００℃～３００℃が特に好ましい。また、ロール温度

は４５℃～７５℃が好ましく、５５℃～６５℃が特に好ましい。

[0020] また、前記フィルムまたはシートは４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を溶剤に溶解し、樹脂や金属上に流し、レベリングしながらゆっくりと乾かしフィルム化（シート化）する溶液キャスト法で製造してもよい。用いられる溶剤は特に制限ないが、シクロヘキサン、ヘキサン、デカン、トルエンなどの炭化水素溶剤を用いてもよい。また、溶剤は、４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）の溶解性や乾燥効率を考慮して２種類以上を混合してもよい。テーブルコート、スピンコート、ディップコート、ダイコート、スプレーコート、バーコート、ロールコート、カーテンフローコートなどの方法でポリマー溶液を塗布し、乾燥、剥離することでフィルムまたはシートに加工することができる。

[0021] 本発明の培養部材は、好ましくはスフェロイド形成用培養部材であり、より好ましくはスフェロイド形成用細胞培養部材である。

[0022] ［４－メチル－１－ペンテン重合体］

本発明においては、４－メチル－１－ペンテン単独重合体、および４－メチル－１－ペンテンと他のモノマーとの共重合体を総称して「４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）」と称する。

４－メチル－１－ペンテン重合体の一例である、４－メチル－１－ペンテンと、他のモノマーとの共重合体としては、ランダム共重合体、交互共重合体、ブロック共重合体、グラフト共重合体のいずれであってもよい。４－メチル－１－ペンテンと、他のモノマーとの共重合体としては、４－メチル－１－ペンテンと、エチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも１種のオレフィンとの共重合体が、強度が高く、部材として用いても破れにくく割れにくく、撓みも少ないため好ましい。

[0023] ４－メチル－１－ペンテン重合体としては、４－メチル－１－ペンテン単独重合体ならびに、４－メチル－１－ペンテンと、エチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペンテンを除く）から選ばれる

少なくとも１種のオレフィンとの共重合体から選択される少なくとも１種の重合体であることが好ましく、４－メチル－１－ペンテンと、エチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも１種のオレフィンとの共重合体であることがより好ましい。

[0024] 前記オレフィンとしては、例えば、エチレン、プロピレン、１－ブテン、１－ヘキセン、１－ヘプテン、１－オクテン、１－デセン、１－テトラデセン、１－ヘキサデセン、１－ヘプタデセン、１－オクタデセン、１－エイコセンが挙げられる。前記オレフィンは、培養部材に必要な物性に応じて適宜選択することができる。例えば、前記オレフィンとしては、適度な酸素透過度と、優れた剛性という観点からは、炭素数８～１８のα－オレフィンが好ましく、１－オクテン、１－デセン、１－ドデセン、１－テトラデセン、１－ヘキサデセン、１－ヘプタデセンおよび１－オクタデセンから選ばれる少なくとも１種がより好ましい。オレフィンの炭素数が上記範囲にあると、重合体の加工性がより良好になり、クラックや端部の割れによる培養部材の外観不良が生じにくくなる傾向にある。また、培養部材の不良品発生率が低くなる。

[0025] 前記オレフィンは、１種または２種以上を用いることができる。材料の強度の観点から、炭素数は２以上が好ましく、更に好ましくは炭素数１０以上が更に好ましい。異なる２種以上のα－オレフィンを組み合わせる場合には、１－テトラデセンおよび１－ヘキサデセンから選ばれる少なくとも１種と、１－ヘプタデセンおよび１－オクタデセンから選ばれる少なくとも１種とを組み合わせることが特に好ましい。

[0026] 前記４－メチル－１－ペンテン重合体における４－メチル－１－ペンテンから導かれる構成単位の含有量は、好ましくは６０～１００モル％、より好ましくは８０～９８モル％である。

また、４－メチル－１－ペンテン重合体が、４－メチル－１－ペンテンと、エチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペン

テンを除く）から選ばれる少なくとも１種のオレフィンとの共重合体である場合は、その共重合体におけるエチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも１種のオレフィンから導かれる構成単位の含有量は、好ましくは０～４０モル％、より好ましくは２～２０モル％である。なお、これら構成単位の含有量は、４－メチル－１－ペンテン重合体中の全繰返し構成単位量を１００モル％とする。構成単位の含有量が上記範囲内にあると、加工性に優れ均質な培養面が得られ、またフィルムの靭性と強度のバランスが良いため、撓みも少なくなる。

[0027] 前記４－メチル－１－ペンテン重合体は、本発明の効果を損なわない範囲で、４－メチル－１－ペンテンから導かれる構成単位および前記エチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィンから導かれる構成単位以外の構成単位（以下「その他の構成単位」ともいう）を有してもよい。その他の構成単位の含有量は、例えば０～１０．０モル％である。前記４－メチル－１－ペンテン重合体がその他の構成単位を有する場合、その他の構成単位は、１種でも２種以上であってもよい。

[0028] その他の構成単位を導くモノマーとしては、例えば、環状オレフィン、芳香族ビニル化合物、共役ジエン、非共役ポリエン、官能ビニル化合物、水酸基含有オレフィン、ハロゲン化オレフィンが挙げられる。環状オレフィン、芳香族ビニル化合物、共役ジエン、非共役ポリエン、官能ビニル化合物、水酸基含有オレフィンおよびハロゲン化オレフィンとしては、例えば、特開２０１３－１６９６８５号公報の段落［００３５］～［００４１］に記載の化合物を用いることができる。

[0029] 前記４－メチル－１－ペンテン重合体は、１種単独で用いてもよく、２種以上を組み合わせて用いてもよい。

[0030] ４－メチル－１－ペンテン重合体としては市販品を使用することもできる。具体的には、三井化学（株）製のＴＰＸ　ＭＸ００１、ＭＸ００２、ＭＸ００４、ＭＸ００２０、ＭＸ０２１、ＭＸ３２１、ＲＴ１８、ＲＴ３１また

はＤＸ８４５いずれも商標）などが挙げられる。また、その他のメーカー製でも上記の要件を満たす４－メチル－１－ペンテン重合体であれば、好ましく使用できる。これらの市販品は１種単独で使用してもよく、２種以上を組み合せて使用することもできる。

[0031] ４－メチル－１－ペンテン重合体は、通常、融点２００℃～２４０℃であり耐熱性が高い。また加水分解を起こさず、耐水性、耐沸水性、耐スチーム性が優れているため、４－メチル－１－ペンテン重合体を含む培養器具等の培養部材は高圧蒸気滅菌処理が可能である。４－メチル－１－ペンテン重合体は、また可視光線透過率が高く（通常９０％以上）、自家蛍光を発しない特徴を有するので、４－メチル－１－ペンテン重合体を含む培養器具は培養細胞の観察がしやすい。さらに、ほとんどの薬品に優れた耐薬品性を示し、薬剤を収着しにくいため、創薬スクリーニング用途や診断用途にも好適に用いられる。４－メチル－１－ペンテン重合体は、ヒートシールが可能であり、自材同士の熱融着のみならず他の材料との熱接着も容易である。また、熱成形が可能であるため、任意の形状の培養器具に成形することが容易であり、例えばインプリント法やインサート法を用いた成形も容易である。

[0032] ４－メチル－１－ペンテン重合体の、標準ポリスチレンを基準物質としたゲルパーミュエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により測定される、重量平均分子量（Ｍｗ）は、好ましくは１００００～２０００００、より好ましくは２００００～１０００００、さらに好ましくは３００００～５００００である。ここで、ＧＰＣ測定の際の試料濃度は、例えば１．０～５．０ｍｇ／ｍｌとすることができる。また、４－メチル－１－ペンテン重合体の分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）は、好ましくは１．０～３０、より好ましくは１．１～２５、さらに好ましくは１．１～２０である。ＧＰＣで用いられる溶剤は、オルトジクロロベンゼンが好ましく用いられる。また、測定条件の一例としては、後述する実施例に示した条件が挙げられるが、該測定条件に限定されるものではない。

[0033] 重量平均分子量（Ｍｗ）を上記上限以下とすることにより、後述する４－

メチル－１－ペンテン重合体の成形法において、溶融成形で作製したフィルムは、ゲル等の不具合の発生を抑制しやすく、表面が均一な製膜をしやすくなる。また、溶液キャスト法で作製する際は溶剤への溶解性をより良好にし、フィルムのゲル等の不具合を抑制しやすく、表面均一な製膜がしやすくなる。

[0034] また、重量平均分子量（Ｍｗ）を上記下限以上とすることにより、培養部材は強度が十分となる傾向にある。さらに、分子量分布を上記の範囲内とすることで、作製した培養部材表面のベタツキを抑えやすく、培養部材の靭性も充分となる傾向にあり、成形時の曲げや裁断時のクラックの発生などを抑制しやすくなる。

[0035] 前記４－メチル－１－ペンテン重合体の重量平均分子量（Ｍｗ）および分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）は、４－メチル－１－ペンテン重合体として、２種以上を用いた場合には、それぞれの、ＭｗおよびＭｗ／Ｍｎが、上記範囲にあればよい。

[0036] ４－メチル－１－ペンテン重合体は以上のような優れた特性を有しているので、少なくとも培養面が本発明の培養部材で形成された培養器具は、培養に悪い影響を与えることも無く、また安定性、光透過性、成形加工性が良好で、滅菌処理を行うことができるので、培養部材の材料として非常に優れている。

[0037] ［４－メチル－１－ペンテン重合体の製造方法］

前記４－メチル－１－ペンテン重合体を製造する方法は、４－メチル－１－ペンテン、オレフィン、その他のモノマーを重合させられれば、いずれの方法であってもよい。また、分子量や分子量分布を制御するために連鎖移動剤、例えば水素を共存させてもよい。製造に用いる機器も制限されない。重合法は公知の方法でもよく、気相法、スラリー法、溶液法、バルク法であってもよい。好ましくはスラリー法、溶液法である。また、重合法は単段重合法、または二段等の多段重合法で、分子量の異なる複数の重合体を重合系中にブレンドする方法であってもよい。単段、多段重合法の何れであっても、

連鎖移動剤として水素を用いる場合には、一括投入しても、分割投入、例えば重合初期、中期、終期に投入してもよい。重合は常温で行ってもよく、必要に応じて加温してもよいが、重合の効率の観点から、２０℃～８０℃で行うことが好ましく、４０℃～６０℃で行うことが特に好ましい。製造に用いる触媒も制限されないが、重合の効率の観点から、例えば国際公開公報２００６／０５４６１３に記載される固体状チタン触媒成分（Ｉ）や、国際公開公報２０１４／０５０８１７に記載される遷移金属化合物（Ａ）を含有するオレフィン重合用触媒（メタロセン触媒）を用いることが好ましい。

[0038] なお、培養部材が４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含む組成物から形成される場合には、培養部材１００質量％中に、４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）が、好ましくは９０質量％以上１００質量％未満であり、より好ましくは９５質量％以上１００質量％未満であり、特に好ましくは９９質量％以上１００質量％未満である。４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）以外の成分を多量に含むと、酸素透過度の低下のみならず、透明性の低下や強度の低下を招く。

[0039] 本発明の培養部材を形成する材料は、４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）以外の成分が含まれていてもよい。４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）以外の成分としては、耐熱安定化剤、耐光安定化剤、加工助剤、可塑剤、酸化防止剤、滑剤、消泡剤、アンチブロック剤、着色剤、改質剤、抗菌剤、抗黴剤、防曇剤などの添加剤が挙げられる。

[0040] ［水接触角］

本発明の培養部材は、その培養面の水接触角が１００°より大きく１６０°以下である。前記水接触角は、好ましくは１００°より大きく１５０°以下であり、より好ましくは１００°より大きく１３０°以下であり、さらに好ましくは１０５°より大きく１３０°以下である。培養部材の培養面の水接触角が１００°以下であると、細胞等が培養部材と接着してしまい、スフェロイドを形成しにくい。また、培養部材の培養面の水接触角が１６０°より大きいと、培養面と培地の接触が不十分となり、培地内への酸素供給効率

が低下してしまう。

[0041] 水接触角の測定方法は特に制限されず、公知の方法を用いることができるが、好ましくは静滴法である。水接触角は、例えば、日本工業規格ＪＩＳ－Ｒ３２５７（基板ガラス表面のぬれ性試験方法）に準じて、２５±５℃、５０±１０％の恒温恒湿条件下で水滴の形状を球形とみなせる４μＬ以下の容量の水滴を、培養部材あるいは培養部材と同一の材料を用いて作製された測定サンプルの表面に滴下し、静滴法により、測定サンプル表面に水滴が接触した直後から１分以内の測定サンプルと水滴の接触界面の角度を計測する方法で測定することができる。

[0042] ［酸素透過度］

本発明の培養部材の温度２３℃、湿度０％の時の酸素透過度は、４５００～９００００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）であり、好ましくは４５００～６７５００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）であり、より好ましくは４５００～４７０００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）であり、さらに好ましくは４５００～４５０００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）である。

[0043] 培養部材の酸素透過度が低すぎると培地中の酸素濃度が低くなり、細胞は充分に増殖しない。一方で、酸素透過度が高すぎると培地中の酸素濃度が高くなりすぎ、酸素ストレスにより細胞機能が低下する。酸素透過度が上記上下限の範囲である場合、細胞は良好な形態を保ち培養期間に応じて効率良く増殖することができる。

[0044] 培養部材あるいは培養部材と同一の材料を用いて作製された測定サンプルについて、差圧式ガス透過率測定法により、温度２３℃、湿度０％での酸素透過係数［ｃｍ^3×ｍｍ／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）］を測定し、酸素透過係数を培養部材の厚さ（μｍ）で除した値を酸素透過度［ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）］とする。測定に用いる機器は差圧式ガス透過率測定法を用いたものであれば特に制限されないが、例えば東洋精機製作所製の差圧式ガス透過率測定装置ＭＴ－Ｃ３が挙げられる。測定サンプルは、例えば厚さ５０μｍのフィルムから９０×９０ｍｍの試験片を切り出して作製し、測定部径は７

０ｍｍ（透過面積は３８．４６ｃｍ^2）とすると好ましい。酸素透過度が大きいため、予めサンプルにアルミニウムマスクを施し、実透過面積を５．０ｃｍ^{2}とすることがより好ましい。酸素透過度の測定に用いる培養部材また培養部材と同一の材料を用いて作製された測定サンプルは、微細加工、表面改質処理を行ったものでもよいし、行っていないものでもよいが、何も処理を行っていないものが好ましい。

[0045] ［細胞、組織、または器官］

本明細書において、細胞、組織、または器官は、単に「細胞等」とも称する。細胞等の由来は、特に限定されず、動物、植物、昆虫、菌、原生生物、細菌などあらゆる生物であってよいが、動物、または植物が好ましく、動物がさらに好ましく、特に哺乳動物が好ましい。本発明の培養部材は、細胞等の接着を避けて培養することができ、酸素透過性にも優れるので、細胞等は非接着性のものであることが好ましい。

[0046] 本発明における細胞は、特に制限されず、例えば植物細胞、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられるが、動物細胞であることが好ましく、哺乳動物細胞であることがより好ましい。哺乳動物細胞としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ヒツジ、ネコ、ヤギ由来の細胞が好ましく、ヒト由来の細胞がより好ましい。細胞は、２次元で培養される細胞であってもよいし、３次元で培養される細胞であってもよく、細胞を培養して得られるスフェロイドを含む。本発明における細胞は、凍結や再凍結したものを用いても良い。また、本発明における細胞は、継代したものを用いてもよく、継代回数は特に制限されない。

動物細胞としては、正常細胞、がん細胞、およびハイブリドーマ等の融合細胞等が使用でき、遺伝子導入等の人工的処理がされた細胞であってもよい。動物細胞は、初代培養細胞あるいは株化継代された細胞のいずれであってもよい。動物細胞は、浮遊性細胞であってもよく、接着性細胞であってもよい。動物細胞としては、例えば、未分化の多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の分化細胞（分化誘導を開始し、既に分化の過程にある多能性幹細胞を含む

）、未分化の体性幹細胞、体性幹細胞由来の分化細胞（分化誘導を開始し、既に分化の過程にある体性幹細胞を含む）、および動物の組織に由来する分化細胞が挙げられる。

[0047] 本発明において、分化細胞は、分化の最終ステージまで成熟させた細胞（最終分化した成熟細胞）に限定されるものではない。前記分化細胞としては、外胚葉から分化成熟する細胞であってもよく、中胚葉から分化成熟する細胞であってもよく、内胚葉から分化成熟する細胞であってもよい。

[0048] 多能性幹細胞とは、生体を構成する全ての細胞に分化することができる多分化能（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ）と、細胞分裂を経てもその多分化能を維持することができる自己複製能とを有する細胞を意味する。多能性幹細胞には、胚性幹細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ：ＥＳ細胞）、胚性生殖幹細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｇｅｒｍ ｃｅｌｌｓ：ＥＧ細胞）、人工多能性幹細胞（Ｉｎｄｕｃｅｄ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ：ｉＰＳ細胞）、ミューズ細胞（Ｍｕｌｔｉ－ｌｉｎｅａｇｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｎｇ Ｓｔｒｅｓｓ Ｅｎｄｕｒｉｎｇ ｃｅｌｌ）、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）が含まれる。多能性幹細胞は、好ましくは、ＥＳ細胞またはｉＰＳ細胞、より好ましくはｉＰＳ細胞である。

[0049] ＥＳ細胞は、哺乳動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのＥＳ細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848 ; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147 ; H. Suemori et

al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932； M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559； H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279;H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585；Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。

また、ヒトＥＳ細胞株は、例えばＷＡ０１（Ｈ１）およびＷＡ０９（Ｈ９）は、ＷｉＣｅｌｌ　Ｒｅｓｅｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅから、ＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２およびＫｈＥＳ－３は、京都大学再生医科学研究所（京都、日本）から入手可能である。

[0050] ｉＰＳ細胞は、特定の初期化因子を、ＤＮＡまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008)；国際公開WO 2007/069666）。

[0051] 前記体細胞は、卵子、卵母細胞、ＥＳ細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）を意味し、胎児（仔）の体細胞、新生児（仔）の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含し、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含する。前記体細胞としては、例えば、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）；組織前駆細胞；リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが挙げられる。

[0052] 前記初期化因子は、ＥＳ細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはｎｏｎ－ｃｏｄｉｎｇ　ＲＮＡまたはＥＳ細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはｎｏｎ－ｃｏｄｉｎｇ　ＲＮＡ、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ１、Ｓｏ

ｘ３、Ｓｏｘ１５、Ｓｏｘ１７、ＫＩｆ４、ＫＩｆ２、ｃ－Ｍｙｃ、Ｎ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ、Ｎａｎｏｇ、Ｌｉｎ２８、Ｆｂｘ１５、ＥＲａｓ、ＥＣＡＴ１５－２、ＴｃＩ１、ｂｅｔａ－ｃａｔｅｎｉｎ、Ｌｉｎ２８ｂ、ＳａＩＩ１、ＳａＩＩ４、Ｅｓｒｒｂ、Ｎｒ５ａ２、Ｔｂｘ３またはＧＩｉｓ１等が挙げられ、これらの初期化因子は、１種単独で用いても良く、２種以上を組み合わせて用いても良い。

[0053] 体性幹細胞は、特定の細胞に分化することができる限定された分化能と、細胞分裂を経てもその限定された分化能を維持することができる自己複製能とを有する細胞を意味する。体性幹細胞には、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞等が含まれる。

[0054] 動物の組織に由来する分化細胞としては、例えば、各種前駆細胞を含む、脂肪細胞、肝細胞、腎細胞、膵臓細胞、乳腺細胞、内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、筋芽細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、樹状細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、線維芽細胞、各種血液系細胞、網膜細胞、角膜由来細胞、生殖腺由来細胞、各種線細胞等が挙げられる。

[0055] 前記細胞は１種単独で用いてもよく、２種以上を組み合わせて用いてもよい。

[0056] 動物細胞は、スフェロイド形成に好適であることから、好ましくは多能性幹細胞および多能性幹細胞由来の分化細胞、より好ましくはｉＰＳ細胞およびｉＰＳ細胞由来の分化細胞、さらに好ましくはｉＰＳ細胞由来の心筋細胞、特に好ましくはｉＰＳ細胞由来のヒト心筋細胞である。あるいは、動物細胞は、スフェロイド形成に好適であることから、好ましくは体性幹細胞、より好ましくは間葉系幹細胞である。あるいは、スフェロイド形成に好適であることから、動物細胞は、好ましくはがん細胞である。あるいは、細胞の状態を、立体構造を持つ生体内での状態により近づけられることから、動物細胞は、好ましくは一般的に三次元培養を行うことが求められている細胞であり、より好ましくはスフェロイドを形成する細胞であり、例えば、肝細胞、神経細胞、心筋細胞、膵β細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、脂肪由来幹細胞

、軟骨細胞、間葉系幹細胞、毛包上皮幹細胞、毛乳頭細胞、皮膚繊維芽細胞、皮膚角化細胞、骨芽細胞である。

[0057] 動物細胞が、多能性幹細胞由来の分化細胞である場合、該細胞は、多能性幹細胞から公知の分化誘導法により作製することができる。あるいは、多能性幹細胞由来の分化細胞は、商業的に入手可能なものを用いてもよい。動物細胞が体性幹細胞である場合、動物から採取されたものを用いてもよいし、商業的に入手可能なものを用いてもよい。

[0058] 多能性幹細胞由来の分化細胞は、ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞であることが好ましい。

[0059] ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞は、例えば公知のプロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により作製することができる（国際公開第２０１５／１８２７６５号を参照）。プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法は、高い心筋分化効率を達成することができるため、該方法により作製されたｉＰＳ細胞由来の心筋細胞は、高い心筋細胞純度を達成することができる。

[0060] 本発明において、スフェロイドとは、細胞同士が集まって塊になったもののことを言い、細胞凝集体または細胞塊などと言い換えることができる。スフェロイドは心筋細胞のような単一な細胞を含むスフェロイドでも、各種線維芽細胞や血管内皮細胞等と心筋細胞のような２種以上の異なる細胞種を含むスフェロイドでもよい。使用できる細胞としては、上記の各種細胞が挙げられる。本発明の培養部材または培養器具を用いて形成されるスフェロイドは、好ましくは多能性幹細胞を含むスフェロイドおよび多能性幹細胞由来の分化細胞を含むスフェロイドであり、より好ましくはｉＰＳ細胞を含むスフェロイドまたはｉＰＳ細胞由来の分化細胞を含むスフェロイドであり、さらに好ましくはｉＰＳ細胞由来の心筋細胞を含むスフェロイドである。

[0061] スフェロイドは、好ましくは１０％以上、より好ましくは１３％以上、さらに好ましくは１５％以上、さらに好ましくは２０％以上、特に好ましくは３０％以上の分化細胞純度（分化細胞数／スフェロイドを構成する細胞数×１００）を有する。心筋細胞を目的細胞として、ｉＰＳ細胞を分化誘導し、

スフェロイドを形成する場合、前記スフェロイドは、ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞を、好ましくは１０％以上、より好ましくは２０％以上、さらに好ましくは３０％以上の心筋細胞純度で含む。前記分化細胞数は、公知の方法により求めることができ、例えば、心筋マーカーである心筋トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）、Ｔｒｏｐｏｎｉｎ、ＭＹＬ２（Ｍｙｏｓｉｎ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ２）、ＭＹＬ７（Ｍｙｏｓｉｎ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ７）などに対する抗体を用いてフローサイトメトリーで解析することにより求めることができる。前記スフェロイドを構成する細胞数は、公知の方法により求めることができ、例えば、スフェロイドをＴｒｙｐｓｉｎ処理してシングルセル化し、シングルセルの細胞数を計測することにより求めることができる。

[0062] 多能性幹細胞を分化させ、分化細胞を得る場合には、最終的に得られたスフェロイドには、目的の分化細胞以外にも、未分化の細胞や、目的の分化以外の分化をした細胞が少なからず含まれてしまう。そのため、分化細胞純度が前記範囲内にあると、分化細胞のスフェロイドを各種検査に用いた場合のデータの信頼性が高くなり、また、再現性も高くなりやすい。

[0063] スフェロイドの大きさは特に制限されない。スフェロイドを形成する細胞種、細胞数、培地、培養日数等によって異なるが、スフェロイドの大きさは平均直径が例えば１０～１００００μｍであることが好ましく、１０～８０００μｍであることがより好ましく、１０～５０００μｍであることがさらに好ましい。スフェロイドの直径は、例えば、顕微鏡下で観察し、撮影した写真上で直径を計測する方法、または、粒度分布計を用いる方法により、求めることができる。

[0064] スフェロイドを構成する細胞数は特に制限されない。スフェロイドを形成する細胞種、培地、培養日数等によって異なるが、スフェロイド１個あたり、例えば1×10^{1}個以上、1×10^{2}個以上、1×10^{3}個以上、1×10^{4}個以上、1×10^{5}個以上、1×10^{6}個以上、1×10^{7}個以上、1×10^{8}個以上、1×10^{9}個以上含んでいても良い。またその上限は特に設定されない。

スフェロイドを構成する細胞数は、例えば、蛍光試薬による細胞染色後の蛍光強度と、細胞数と蛍光強度の検量線から算出することができる。

[0065] 細胞培養に用いる培地は、細胞に合わせて適宜選択すればよい。培地の種類は特に限定されないが、例えば、任意の細胞培養基本培地や分化培地、初代培養専用培地等を用いることができる。具体的には、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ８、イーグル細小必須培地（ＥＭＥＭ）、ダルベッコ改イーグル培地（ＤＭＥＭ）、α－ＭＥＭ、グラスゴーＭＥＭ（ＧＭＥＭ）、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ハムＦ－１２、ＭＣＤＢ培地、ウィリアムス培地Ｅ、Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｔｈａｗ ｍｅｄｉｕｍ、およびこれらの混合培地等が挙げられるが、これらには限定されず、細胞の増殖や分化に必要な成分が含まれる培地であれば用いることができる。さらに、血清、各種成長因子、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類等を添加した培地を使用してもよい。培養温度も特に制限されないが、通常は２５～４０℃程度で行う。

培地の量は特に制限されないが、培地の高さは好ましくは３～３０ｍｍ、より好ましくは３～２５ｍｍ、さらに好ましくは４～２０ｍｍである。

[0066] 本発明における組織とは、類似の細胞が集って同じような働きをするものの意味であり、スフェロイドとは異なる概念である。前記組織は、特に限定されず、例えば、上皮組織、結合組織、筋組織、神経組織等があげられる。前記組織は、スフェロイドを形成する細胞を含む組織が好ましく、そのような組織としては、例えば、神経細胞を含む神経組織、心筋細胞を含む心筋組織、脂肪細胞または脂肪由来幹細胞を含む脂肪組織、軟骨細胞を含む軟骨組織、骨芽細胞を含む骨組織等が挙げられる。これらの中でも、酸素要求性が高いことから、前記組織は、神経組織、心筋組織であることが好ましく、心筋組織がさらに好ましい。また、前記組織は、スフェロイド形成に好適であることから、体性幹細胞を含む組織であることが好ましい。

[0067] 本発明における器官とは、前記組織が集って目的をもった共同の仕事をするものの意味である。前記器官は、特に限定されず、例えば肺、心臓、肝臓

、腎臓、脾臓、膵臓、胆嚢、食道、胃、皮膚、脳などである。前記器官は、スフェロイドを形成する細胞を含む器官が好ましく、そのような器官としては、例えば、肝細胞を含む肝臓、膵β細胞を含む膵臓、血管内皮細胞を含む血管、間葉系幹細胞を含む骨髄、毛包上皮幹細胞または毛乳頭細胞を含む毛包、腎臓、皮膚繊維芽細胞または皮膚角化細胞を含む皮膚等が挙げられる。これらの中でも、酸素要求性が高いことから、前記器官は、皮膚、腎臓、肝臓、膵臓、心臓、毛包であることが好ましく、心臓がさらに好ましい。また、前記器官は、スフェロイド形成に好適であることから、体性幹細胞を含む器官であることが好ましい。

[0068] ［培養器具］

本発明において、培養器具とは、細胞等の培養に用いる器具全てを意味する。前記培養器具は、少なくともその一部が前記培養部材から構成される。前記培養器具は、その全部が前記培養部材から構成されてもよいし、その一部のみが前記培養部材から構成されてもよい。前記培養器具の一部のみが前記培養部材から構成される場合、少なくも細胞等を培養する培養面が、本発明の培養部材により構成される。

[0069] 前記培養器具は通常、インキュベーター、大量培養装置、または灌流培養装置などの装置内で用いる。

[0070] 前記培養器具としては、公知の各種の培養器具を用いることができ、形状や大きさは特に制限されない。前記培養器具としては、例えば、ディッシュ、フラスコ、プレート、ボトル、バッグ、チューブ等の培養容器の他、インサート、カップ、中敷き、スライド等が挙げられ、好ましくは培養容器である。

[0071] 前記培養器具は、少なくとも１つのウェルを有する培養器具または少なくとも１つのウェルを有する培養容器であってもよい。少なくとも１つのウェルを有する培養容器とは、例えば、少なくとも１つのウェルを有するプレートであり、より具体的には、６ウェル、１２ウェル、２４ウェル、４８ウェル、９６ウェル、３８４ウェル、１５３６ウェル等のウェルを有するプレー

トである。一般にウェルのようなくぼみ形状を底面に有する培養器具は、底面の複雑な形状を安定させるために底面を厚くする必要があり、細胞等への酸素供給が充分に行われ難い。本発明の培養部材を用いると、１ウェル、６ウェル、１２ウェル、２４ウェル、４８ウェル、９６ウェル、３８４ウェル、１５３６ウェル等のウェルを有するプレートであっても、形状が安定しており、細胞等への酸素供給も充分である。

[0072] 前記培養器具は、培地を保持あるいは貯留するため、底面を培養面とする器具であることが好ましい。前記培養器具が、ディッシュ、フラスコ、インサート、またはプレートの場合、底面が培養面であるので、本発明の培養部材は、これらの底面、側面、上面のうち、少なくとも底面の一部または全部を構成することが好ましい。少なくとも底面（培養面）が本発明の培養部材で構成されていると、前記培養部材を介して培地中に酸素をより効率的に供給でき、培地中にある細胞等をより効率的に増殖させることができる。また、細胞の機能を保持したまま、より高密度で培養することができる。

[0073] 前記培養器具の底面の形状は特に制限されず、平底、丸底（Ｕ底）、平底（Ｆ底）、円錐底（Ｖ底）、平底＋カーブエッジ等が挙げられる。丸底（Ｕ底）、平底（Ｆ底）、円錐底（Ｖ底）、平底＋カーブエッジ等に加工する場合には、一般の射出成形やプレス成形で一度に加工してもよいし、フィルムまたはシートを作製しておき、真空成形や圧空成形などで２次加工を行い作製することも可能である。底面の形状は培養の目的に応じて選択されるが、細胞等を２次元培養する際には、平底であることが通常は望ましく、３次元培養する際には丸底（Ｕ底）または円錐底（Ｖ底）であることが通常は望ましい。

[0074] 培養器具の前記培養部材以外の部分は、前記培養部材以外の材料で構成してもよい。前記培養部材以外の材料は特に制限されず、公知の材料を用いることができる。かかる材料としては、例えば、ポリスチレン、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、環状オレフィンポリマー、環状オレフィンコポリマー、ガラス、等が挙げられる。

[0075] 前記培養器具は、その培養面および／または培養面以外の部分を天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料でコーティングしてから用いてもよい。

培養器具の培養面を天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料でコーティングすると、細胞等の増殖性がより優れるが、細胞等が培養面に接着しやすくなる。

培養面へのコーティングの有無は、細胞等の種類に応じて決定することができるが、通常、コーティングしない方が好ましい。

[0076] 本発明の培養器具は、コンタミネーション防止のために、消毒または滅菌処理を施してもよい。消毒または滅菌処理の方法としては、特に制限されず、流通蒸気法、煮沸法、間歇法、紫外線法等の物理的消毒法、オゾン等の気体、エタノール等の消毒薬を用いる化学的消毒法；高圧蒸気法、乾熱法等の加熱滅菌法；ガンマ線法、電子線法、高周波法等の照射滅菌法；酸化エチレンガス法、過酸化水素ガスプラズマ法等のガス滅菌法等が挙げられる。中でも操作が簡便で、充分に滅菌が行えることから、エタノール消毒法、高圧蒸気滅菌法、ガンマ線滅菌法、電子線滅菌法、または酸化エチレンガス滅菌法が好ましい。これらの消毒または滅菌処理は、１種単独で行ってもよいし、２種以上を組み合わせて行ってもよい。

[0077] 本発明の培養器具の製造方法は、特に制限されず、培養器具の全部が前記培養部材から構成される場合には、培養部材の製造方法と同様の方法で製造することができる。培養器具の一部が前記培養部材で形成される場合には、培養部材と、その他の部材とを、適宜接合することにより培養器具を得ることができる。接合する方法としては特に制限はなく、培養部材と、その他の部材とを一体で形成してもよく、接着剤や粘着剤を介して密着させてもよい。

[0078] 本発明の培養器具は、好ましくはスフェロイド形成用培養器具であり、より好ましくはスフェロイド形成用細胞培養器具である。

[0079] ［培養方法］

本発明の細胞等の培養方法は、細胞、組織、または器官をその培養面上で培養する培養部材であり、前記培養部材は４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含み、前記培養面の水接触角が１００°より大きく１６０°以下であり、温度２３℃、湿度０％の時の酸素透過度が４５００～９００００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）である培養部材、または少なくとも培養面が、前記培養部材で形成された培養器具の培養面に、細胞、組織または器官を接触させる工程（Ａ）；および前記培養面に接触した細胞、組織または器官を培養してスフェロイドを形成させる工程（Ｂ）；を含む細胞、組織または器官の培養方法である。

[0080] 本発明の培養方法は、前記培養部材または前記培養器具の培養面で細胞等を培養すると、細胞等が効率よくスフェロイドを形成することができるというものである。また、本発明によれば、多能性幹細胞が分化細胞へと効率よく分化しやすい。

[0081] ［工程（Ａ）］

培養部材または培養器具の培養面に、細胞等を接触させる方法は、培養部材または培養器具の培養面に細胞等を接触させることができれば特に制限されず、例えば、培養部材または培養器具の培養面に細胞等を播種することが挙げられる。より具体的には、例えば、培地に懸濁した細胞等をピペット等で培養容器内に添加し、必要に応じて該培養容器を揺動させて培養容器内に細胞を均等に散らした後、インキュベーター内で静置する。

[0082] 細胞等を播種する密度は、細胞等が増殖および分化できれば特に制限されない。細胞等が未分化の多能性幹細胞、または多能性幹細胞由来の分化細胞である場合、播種する密度は、好ましくは０．１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2～１０．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}であり、より好ましくは０．３×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2～５．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}であり、さらに好ましくは０．５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2～３．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}である。

細胞播種密度が上記の範囲であると、上記範囲外の場合と比べて、細胞の増殖および分化がより効率よく行えるため好ましい。

[0083] 播種に用いる培地は、細胞等が生存できる培地であれば特に制限されず、使用する細胞等に合わせて適宜選択すればよい。播種に用いる培地は、後述する工程（Ｂ）で用いる培地であってもよい。

細胞等が未分化の多能性幹細胞、または多能性幹細胞由来の分化細胞である場合、播種に用いる培地は、例えば、任意の細胞培養基本培地や分化培地、初代培養専用培地等、具体的には、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ８、ＳｔｅｍＦｉｔ培地、ＲｅｐｒｏＦＦ２培地、Ｓｔｅｍ-ＰａｒｔｎｅｒＳＦ、イーグル細小必須培地（ＥＭＥＭ）、ダルベッコ改イーグル培地（ＤＭＥＭ）、α－ＭＥＭ、グラスゴーＭＥＭ（ＧＭＥＭ）、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ１６４０、ハムＦ－１２、ＭＣＤＢ培地、ウィリアムス培地Ｅおよびこれらの混合培地等が挙げられる。さらに、血清、各種成長因子、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類、ミネラル、金属、ビタミン等を添加した培地を使用してもよい。

[0084] 播種に用いる培地の量は特に制限されないが、培養容器に添加した状態で、培地の高さは好ましくは３～３０ｍｍ、より好ましくは３～２５ｍｍ、さらに好ましくは４～２０ｍｍである。

培養温度も特に制限されないが、通常は２５～４０℃程度で行う。

[0085] ［工程（Ｂ）］

培養面に接触した細胞等を培養してスフェロイドを形成させる方法は、培養面に接触した細胞等に酸素、栄養等を供給して、細胞等を培養してスフェロイドを形成できれば特に制限されず、例えば、培地を添加した培養器具を入れた培養インキュベーターに酸素を供給し、培養部材を介して細胞等に酸素を供給して、一定期間３７℃に保つことが挙げられる。

[0086] 細胞培養に用いる培地は、細胞に合わせて適宜選択すればよい。培地の種類は特に限定されないが、例えば、任意の細胞培養基本培地や分化培地、初代培養専用培地等を用いることができる。具体的には、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ８、イーグル細小必須培地（ＥＭＥＭ）、ダルベッコ改イーグル培地（ＤＭＥＭ）、α－ＭＥＭ、グラスゴーＭＥＭ（ＧＭＥＭ）、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ

１６４０、ハムＦ－１２、ＭＣＤＢ培地、ウィリアムス培地Ｅ、Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ　ｔｈａｗ　ｍｅｄｉｕｍ、およびこれらの混合培地等が挙げられるが、これらには限定されず、細胞の増殖や分化に必要な成分が含まれる培地であれば用いることができる。さらに、血清、各種成長因子、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類等を添加した培地を使用してもよい。培養温度も特に制限されないが、通常は２５～４０℃程度で行う。

培地の量は特に制限されないが、培地の高さは好ましくは３～３０ｍｍ、より好ましくは３～２５ｍｍ、さらに好ましくは４～２０ｍｍである。

[0087] 培養期間は、細胞および形成させたいスフェロイドの種類、大きさ、分化の度合い等に合わせて適宜選択すればよい。ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞を含むスフェロイドを形成させる場合、培養期間は好ましくは７～３０日、より好ましくは１０～２５日、好ましくは１１～２０日である。

[0088] ［工程（Ｃ）］

本発明の細胞等の培養方法は、さらに、前記細胞等の分化を誘導する工程（Ｃ）を含んでもよい。

前記細胞等の分化を誘導する方法は特に制限されず、公知のプロトコルに従って所望の目的とする分化細胞への分化誘導を行えばよく、市販の分化誘導培地や分化キットを用いてもよい。

[0089] 分化誘導の条件は、特に制限されず、使用細胞種および目的とする分化細胞種等に応じて適宜設定できる。通常、所定のサイトカイン、増殖因子またはその他の化合物を培養液中に所定濃度添加して培養を行うことにより分化を誘導しうる。

[0090] 本発明の細胞等の培養方法が工程（Ｃ）を含む場合、前記細胞等は、好ましくは未分化の多能性幹細胞、多能性幹細胞由来の分化細胞（分化誘導を開始し、既に分化の過程にある多能性幹細胞を含む）、未分化の体性幹細胞、体性幹細胞由来の分化細胞（分化誘導を開始し、既に分化の過程にある体性幹細胞を含む）であり、より好ましくは、未分化の多能性幹細胞、または多

能性幹細胞由来の分化細胞、さらに好ましくは、未分化のｉＰＳ細胞、またはｉＰＳ細胞由来の分化細胞である。

[0091] 前記目的とする分化細胞は、特に制限されず、あらゆる分化細胞であってもよい。前記目的とする分化細胞は、各種前駆細胞を含み、例えば、脂肪細胞、肝細胞、腎細胞、膵臓細胞、乳腺細胞、内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、筋芽細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、樹状細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、線維芽細胞、各種血液系細胞、網膜細胞、角膜由来細胞、生殖腺由来細胞、各種線細胞等である。

[0092] 前記目的とする分化細胞は、好ましくはスフェロイドを形成する細胞であり、より好ましくは酸素要求性の高い細胞である。前記目的とする分化細胞は、好ましくは肝細胞、神経細胞、心筋細胞、膵β細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、脂肪由来幹細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞、毛包上皮幹細胞、毛乳頭細胞、皮膚繊維芽細胞、皮膚角化細胞、骨芽細胞、および造血前駆細胞等であり、より好ましくは心筋細胞、神経細胞、肝細胞であり、さらに好ましくは心筋細胞である。

[0093] 工程（Ｃ）は、好ましくは、多能性幹細胞の心筋細胞への分化を誘導する工程であり、より好ましくは、ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する工程である。

[0094] 多能性幹細胞の心筋細胞への分化を誘導する方法は特に制限されない。多能性幹細胞から心筋細胞への分化を誘導する方法としては、様々な手法が知られており（例えば、Burridge et al., Cell Stem Cell. 2012 Jan 6;10(1):16-28; Kattman et al., Cell Stem Cell 2011; 8: 228-240; Zhang et al., Circ Res 2012; 111: 1125-1136; Lian et al., Nat Protoc 2013; 8: 162-175; WO 2016/076368; WO 2013/111875; Minami et al., Cell Rep. 2012, 2(5): 1448-1460等）、例えば、胚様体形成による方法、単層分化培養による方法、強制凝集による方法などが挙げられる。いずれの方法においても、中胚葉誘導因子（例えば、アクチビンＡ、ＢＭＰ４、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦなど）、心臓決定因子（例えば、ＶＥＧＦ、ＤＫＫ１、Ｗｎｔシグナル

阻害剤（例えば、ＩＷＲ－１、ＩＷＰ－２、ＩＷＰ－４等）、ＢＭＰシグナル阻害剤（例えば、ＮＯＧＧＩＮ等）、ＴＧＦβ／アクチビン／ＮＯＤＡＬシグナル阻害剤（例えば、ＳＢ４３１５４２等）、レチノイン酸シグナル阻害剤など）、心臓分化因子（例えば、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＤＫＫ１など）等を、順次作用させることにより誘導効率を高めることができる。

[0095] ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する方法は特に制限されないが、例えば公知のプロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法を用いることができる（国際公開第２０１５／１８２７６５号を参照）。プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法は、高い心筋分化効率を達成することができるため、工程（Ｃ）は、プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により、ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する工程であることが好ましい。

[0096] 工程（Ｃ）は、工程（Ａ）の後、工程（Ｂ）の前に行ってもよいし、工程（Ｂ）と同時に行ってもよいし、工程（Ｂ）を行う期間の一部の期間のみに行ってもよい。多能性幹細胞の分化誘導がより効率よく行えることから、工程（Ｃ）は工程（Ｂ）と同時に行うことが好ましい。

[0097] 工程（Ｃ）における分化誘導期間は、使用細胞種および目的とする分化細胞種、分化の度合い、分化誘導方法等に応じて適宜設定できる。ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する場合、分化誘導期間は好ましくは７～３０日、より好ましくは１０～２５日、さらに好ましくは１１～２０日である。

[0098] ［培養方法の特性］

本発明の細胞等の培養方法は、好ましくはｉＰＳ細胞またはｉＰＳ細胞由来の分化細胞の培養方法であり、さらに好ましくはｉＰＳ細胞由来の心筋細胞の培養方法である。

[0099] 本発明の細胞等の培養方法は、心筋純度を増加させるものであることが好ましい。

前記増加とは、前記培養部材または前記培養器具の代わりに、ポリスチレン製の培養部材または培養器具を用い、それ以外の条件は本発明の細胞等の培養方法と同じである実験条件下において多能性幹細胞を心筋細胞へ分化さ

せた際の心筋純度を比較対照として、該比較対象よりも心筋純度が高いことを言う。前記比較対象よりも１．３倍以上心筋純度が高いことが好ましく、２倍以上心筋純度が高いことがより好ましく、３倍以上心筋純度が高いことがさらに好ましい。

[0100] 前記心筋純度は、多能性幹細胞に由来する分化細胞総数に占める、多能性幹細胞から分化した心筋細胞数の割合（％）である。前記心筋純度を測定する方法は特に制限されないが、例えば、分化誘導の所定の期間経過後に、細胞総数と、心筋細胞マーカーを発現する細胞数を測定し、割合を算出することができる。細胞がスフェロイドを形成している場合は、スフェロイドを公知の方法によりシングルセル化して、スフェロイドを構成する全細胞数を細胞総数とすることができる。

細胞数の計測には、例えば、血球計算板、ＦＡＣＳ等を用いることができる。

[0101] 前記心筋細胞マーカーは特に制限されず、例えば心筋トロポニンＣ（ｃＴｎＣ）、心筋トロポニンＩ（ｃＴｎＩ）、心筋トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）、ミオシン軽鎖、αＡｃｔｉｎｉｎ、ＮＫＸ２．５、ＫＣＮＱ１、ＨＥＲＧ１ｂ、Ｃａｖ１．２、Ｎａｖ１．５等が挙げられる。前記心筋細胞マーカーは、好ましくは心筋トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）である。

心筋細胞マーカーを発現する細胞数の測定は、例えば、心筋細胞マーカーに対する抗体を用いてＦＡＣＳで行うことができる。

前記心筋純度は、好ましくは、ｃＴｎＴ陽性細胞数／スフェロイドを構成する全細胞数×１００で算出することができる。

[0102] 本発明の細胞等の培養方法は、心筋細胞のＭＹＬ２（Ｍｙｏｓｉｎ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ２）遺伝子の発現を増加させるものであることが好ましい。

前記増加とは、前記培養部材または前記培養器具の代わりに、ポリスチレン製の培養部材または培養器具を用い、それ以外の条件は本発明の細胞等の培養方法と同じである実験条件下において多能性幹細胞の心筋細胞へ分化さ

せた際の心筋細胞のＭＹＬ２遺伝子の発現量を比較対照として、該比較対象よりもＭＹＬ２遺伝子の発現量が高いことを言う。前記比較対象よりも２倍以上ＭＹＬ２遺伝子の発現量が高いことが好ましく、３倍以上ＭＹＬ２遺伝子の発現量が高いことがより好ましい。

ＭＹＬ２遺伝子の発現量は、公知の方法で測定することができ、例えば定量ＲＴ－ＰＣＲ法が挙げられる。

[0103] 本発明の細胞等の培養方法は、心筋細胞の拍動数を増加させるものであることが好ましい。

前記増加とは、前記培養部材または前記培養器具の代わりに、ポリスチレン製の培養部材または培養器具を用い、それ以外の条件は本発明の細胞等の培養方法と同じである実験条件下において多能性幹細胞の心筋細胞へ分化させた際の心筋細胞の拍動数を比較対照として、該比較対象よりも拍動数が高いことを言う。前記比較対象よりも２倍以上心筋細胞の拍動数が高いことが好ましく、３倍以上心筋細胞の拍動数が高いことがより好ましい。

心筋細胞の拍動数は、公知の方法で測定することができ、例えば、心筋細胞の動画を撮影し、任意の心筋細胞のＢＰＭ（１分間における拍動数）を測定することができる。

[0104] ［スフェロイド］

上記培養方法によって、本発明のスフェロイドが形成される。

本発明のスフェロイドは、培養時に細胞内部にまで酸素供給が行われるため、大きさおよび形状の均一性が高い傾向にあることが特徴である。また、本発明のスフェロイドに含まれる細胞は、正常な機能を保有しており、その細胞純度も高いので、スフェロイドを各種検査に用いた場合のデータの信頼性が高くなり、また、再現性も高くなりやすい。

本発明のスフェロイドは、細胞の機能評価および薬剤のスクリーニング、さらに、再生医療や細胞治療の細胞ソースとして好適に用いることができる。

実施例

[0105] 次に本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0106] ［重量平均分子量（Ｍｗ）および分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）の測定］

実施例に用いた４－メチル－１－ペンテン重合体の重量平均分子量Ｍｗ、および、分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）をゲルパーミュエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により測定した。

具体的には、下記の条件で、オルトジクロロベンゼンに溶解したポリマーの重量平均分子量（Ｍｗ）および数平均分子量（Ｍｎ）を、標準ポリスチレンによって分子量を較正して測定した。

・装置：ゲル浸透クロマトグラフ ＨＬＣ－８３２１ ＧＰＣ／ＨＴ型(東ソー社製)

・データ解析ソフト：Ｅｍｐｏｗｅｒ３（Ｗａｔｅｒｓ社製）

・検出器：示差屈折計

・直列連結カラム：ＴＳＫｇｅｌ ＧＭＨ６－ＨＴ（２本）、および、ＴＳＫｇｅｌ ＧＭＨ６－ＨＴＬ（２本）

・カラム温度：１４０℃

・流量：１．０ｍｌ／分

・試料濃度：１．５ｍｇ／ｍｌ

[0107] ［垂れ下がり距離の測定］

製造例のフィルムまたは比較例の培養容器から、縦×横が１００ｍｍ×１０ｍｍのサイズで試験片を切り出して、該試験片の縦寸法に対して５０ｍｍだけ試験台の水平な上面から水平方向へはみ出した状態で試験台に固定し、固定から３分後に、試験台からはみ出した試験片の先端が試験台の上面を含む水平面から鉛直下方へ垂れ下がった距離を測定した。前記固定から測定までは室温２３℃であった。結果を表１に示す。

[0108] ［撓みの有無］

分化誘導１９日目にインキュベーターから培養容器を取り出して、容器底面を横方向から覗き込み、培養環境におけるフィルムの垂れ下がりの有無を

観察した。容器作製時と比べて変化が無く、フィルムの垂れ下がりが見られない場合を「撓みなし」とし、培養容器作製時と比べて変化があり、フィルムの垂れ下がりが見られる場合を「撓みあり」と評価した。

[0109] ［水接触角の測定］

水接触角の測定は、日本工業規格ＪＩＳ－Ｒ３２５７（基板ガラス表面のぬれ性試験方法）に準じて行った。２５±５℃、５０±１０％の恒温恒湿条件下で水滴の形状を球形とみなせる４μＬ以下の容量の水滴を、測定サンプルの表面に滴下し、静滴法により、測定サンプル表面に水滴が接触した直後から１分以内の測定サンプルと水滴の接触界面の角度を測定した。

[0110] ［酸素透過度の測定］

測定サンプルについて、東洋精機製作所製差圧式ガス透過率測定装置ＭＴ－Ｃ３を用いて温度２３℃、湿度０％の環境下にて酸素透過係数を測定した。測定部径は７０ｍｍ（透過面積は３８．４６ｃｍ^2）とした。酸素透過係数が大きいことが予想されたため、予めサンプルにアルミニウムマスクを施し、実透過面積を５．０ｃｍ^{2}とした。

測定した酸素透過係数［ｃｍ^3×ｍｍ／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）］の値をフィルム（培養部材）の厚さ（μｍ）で除して、酸素透過度［ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）］を算出した。

[0111] ［製造例１］培養部材の製造

４－メチル－１－ペンテン重合体であるＴＰＸ（登録商標）（三井化学株式会社製：分子量（Ｍｗ）＝４２８０００、分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）＝４．１）を使用し、基材層を押し出すフルフライト型のスクリューを備えたＴダイ付き押出機へ投入し、押出し温度を２７０℃、ロール温度を６０℃に設定し、ロール回転速度の条件を変えて押出し成形することで、厚さ５０μｍのフィルムを得た。得られた前記フィルムについて、水接触角および酸素透過度を測定した。結果を表１に示す。

[0112] ［製造例２］培養容器の作製

前記フィルムを８ｃｍ×１２ｃｍサイズにカットし、ポリスチレン（ＰＳ

とも称す）製２４ウェル容器枠の底面に、医療用粘着剤（スリーエム製）を介して密着させて２４ウェルの培養プレートを作製した。その後、耐ガンマ線袋に梱包して１０ｋＧｙのガンマ線を照射し滅菌した。

[0113] ［実施例１］ｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導

製造例２で作製した培養容器を用い、後述する方法によりｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化を誘導し、スフェロイドを形成させた。培地は培地高さが５ｍｍとなるように用いた（培地量：１ｍＬ）。

[0114] ［実施例２］

実施例１よりも培地の量を増やして、培地高さを１０ｍｍとした以外は、実施例１と同様にして培養を行った（培地量：１．８ｍＬ）。

[0115] ［比較例１］

培養面の厚さが１０００μｍである超低接着面ＰＳ製培養容器（コーニング社製、Ｃｏｓｔａｒ™３４７３、１ウェルの培養面の内径が１５ｍｍ、２４ウェルプレート）を使用した以外は、実施例１と同様な方法で培養した。該超低接着面ＰＳ製培養容器は、市販のＰＳ製培養容器（水接触角６１°）を親水化処理したものである。水接触角を測定した結果を表１に示す。

[0116] ［比較例２］

比較例１よりも培地の量を増やして、培地高さを１０ｍｍとした以外は、比較例１と同様にして培養を行った。

[0117] ［ｉＰＳ細胞培養］

＜培地および試薬の調製＞

液体窒素中で凍結保存したヒト由来ｉＰＳ細胞（ｉＰＳ細胞研究所提供）を用いた。

使用試薬は以下の通りである。

・Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８（製品番号Ａ１５１７００１、Ｇｉｂｃｏ）

・ｉＭａｔｒｉｘ－５１１　ｓｉｌｋ（製品番号３８７－１０１３１、Ｎｉｐｐｉ）

・ＣｕｌｔｕｒｅＳｕｒｅ™Ｙ－２７６３２（製品番号　０３４－２４０２４

、富士フィルム和光純薬）

・０．５ｍｏｌ／Ｌ－ＥＤＴＡ溶液（ｐＨ８．０）（製品番号０６８９４－８５、ナカライテスク）

・ＰＢＳ（－）（製品番号１６６－２３５５５、富士フィルム和光純薬）

・２．５％Ｔｒｙｐｓｉｎ（製品番号１５０９０－０４６、Ｇｉｂｃｏ）

・Ｔｒｙｐａｎ　ｂｌｕｅ（製品番号１４５－００２２、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）

・ホルムアルデヒド溶液（製品番号０６４－００４０６、富士フィルム和光純薬）

・ａｎｔｉ－Ｔｒｏｐｏｎｉｎ　Ｔ－Ｃ（ＣＴ３）（製品番号ＳＣ－２００２５、Ｓａｎｔａｃｒｕｚ）

・ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７（製品番号Ａ－２１２３６、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）

・Ｓａｐｏｎｉｎ　ｆｒｏｍ　Ｓｏｙｂｅａｎｓ（製品番号１９２－０８８５１、富士フィルム和光純薬）

・心筋分化誘導培地（低分子化合物群Ａ、低分子化合物群Ｂ）：国際公開公報２０１５／１８２７６５号公報段落［００６４］および［００６５］の記載に従う。

[0118] 培地および試薬の調製は以下の通りに行った。

・ｉＰＳ細胞培地：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８は使用時に室温にしてから使用した。解凍時と継代時に使用する培地はＣｕｌｔｕｒｅＳｕｒｅ™Ｙ－２７６３２を３μＭになるように添加し使用した。

・心筋分化誘導培地：使用時に心筋分化誘導培地に低分子化合物群Ａまたは低分子化合物群Ｂを混合し、３７℃に加温してから使用した。

・剥離液：０．５ｍｏｌ／Ｌ－ＥＤＴＡ溶液（ｐＨ８．０）をＰＢＳ（－）で０．５ｍＭに調整した。使用時には３７℃に加温してから使用した。

・Ｙ－２７６３２溶液：ＰＢＳ（－）で１０ｍＭに調整した。

・シングル化溶液：２．５％ＴｒｙｐｓｉｎをＰＢＳ（－）で０．２５％に調整した。使用時には３７℃に加温してから使用した。

・サポニン溶液：Ｓａｐｏｎｉｎ　ｆｒｏｍ　ＳｏｙｂｅａｎｓをＰＢＳ（－）で０．１％溶液に調整した。

・保存条件：Ｙ－２７６３２溶液、シングル化溶液、その他心筋細胞培養に必要な試薬は冷凍保存し、培地および剥離液は冷蔵保存した。

[0119] ＜培養スケジュール＞

細胞培養は下記のスケジュールで行った。ｉＰＳ細胞は起眠から５継代した細胞を分化誘導に供した。サンプリングは心筋細胞の拍動が全体的に確認される１２日目と、より成熟化させた１９日目で行った。

Ｄａｙ－１：試薬調製および準備

Ｄａｙ０：ｉＰＳ細胞起眠

Ｄａｙ３～：ｉＰＳ細胞の継代（ｄａｙ３、６、１０、１５、１９　合計５継代）

Ｄａｙ２３：ｉＰＳ細胞の心筋分化誘導開始（０日目）

Ｄａｙ４５：心筋分化誘導１２日目のサンプリングおよびシングルセル化（ＦＡＣＳ、遺伝子発現解析）

Ｄａｙ３９：心筋分化誘導１９日目のサンプリングおよびシングルセル化（ＦＡＣＳ、遺伝子発現解析）

[0120] ＜ｉＰＳ細胞培養方法＞

ｉＰＳ細胞の解凍

１）ｉＰＳ細胞の解凍前に、チューブに培地を１０ｍＬ入れて３７℃ウォーターバスで加温した。

２）凍結ｉＰＳ細胞チューブは３７℃ウォーターバスで半溶解状態にし、クリーンベンチ内で加温しておいた培地１０ｍＬの入ったチューブにゆっくり移した。

３）１００×ｇで室温、３分間の遠心後、上清を除去した。

４）新しい培地１０ｍＬを加えて軽く混和し、０．１３μｇ／ｃｍ^{2}のｉＭａｔｒｉｘ－５１１　ｓｉｌｋを細胞懸濁液に添加後、１０ｃｍ　ｄｉｓｈに播種し、３７℃、５％CO_2インキュベーターで培養した。

[0121] ｉＰＳ細胞の継代

１）位相差顕微鏡で細胞の状態を観察し、１：１２－１：２０の間で継代のスプリット比を決めた。

２）培地上清をチューブに回収した。ＰＢＳ（－）で洗浄後、剥離液を添加し、３７℃、５％CO_2インキュベーターで約５分間反応させた。

３）反応後、ディッシュを傾けて細胞を剥がし、回収しておいた上清を使って細胞をチューブに回収した。

４）１００×ｇで室温、３分間の遠心後、上清を除去した。

５）新しい培地１０ｍＬを加えて軽く混和し、０．１３μｇ／ｃｍ^{2}のｉＭａｔｒｉｘ－５１１　ｓｉｌｋを細胞懸濁液に添加後、１０ｃｍ　ｄｉｓｈに播種し、３７℃、５％CO_2インキュベーターで培養した。

[0122] ＜心筋分化誘導方法＞

実験スケジュールの概略を図１に示す。プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により、ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導した。

０日目：約５０％コンフルエントのｉＰＳ細胞を剥離液で剥がした後、１００×ｇで室温、３分間遠心した。上清除去後に新しい培地で懸濁し、未処理の５５ｃｍ^{2}ｄｉｓｈに播種して３７℃、５％CO_2インキュベーターで４時間静置した。その後、細胞をチューブに回収し、低分子化合物群Ａを添加した心筋分化誘導培地に置換した。実施例または比較例の２４ウェルプレートに２×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ウェルで細胞を播種し、３７℃、５％CO_2インキュベーターで培養した。実験はｔｒｉｐｌｉｃａｔｅで行った。

３日目：培地を低分子化合物群Ｂの入った心筋分化誘導培地に交換した。

５日目：培地を低分子化合物群Ｂの入った心筋分化誘導培地に交換した。

７日目以降：３～４日ごとに心筋分化誘導培地で培地交換を行った。なお、分化誘導３日目、７日目の培地交換時にウェルを交換した。

[0123] ＜細胞塊のシングルセル化（分化誘導１２日目と１９日目のサンプリング）＞

１）細胞塊（心筋塊であると考えられる）をチューブに回収し、細胞塊が自

然沈降したら上清を除去した。

２）シングル化溶液を１ｍＬ添加し、３７℃ウォーターバスで３０分前後加温し、細胞塊がシングルセルになるまで撹拌した。

３）３倍量のＰＢＳ（－）３ｍＬで希釈し反応を停止した。

４）細胞懸濁液のセルカウントを行い、後述のＦＡＣＳ、またはＲＮＡ抽出に用いた。

[0124] ＜ＦＡＣＳサンプルの調製＞

シングル化した細胞１×１０^{6}ｃｅｌｌｓをチューブに移し、３００×ｇで室温にて５分間の遠心後に上清を除去してＰＢＳ（－）１ｍＬで再懸濁した。細胞懸濁液にホルムアルデヒド（富士フイルム和光純薬）を終濃度４％となるように加え、室温で５分間静置した。３００×ｇで室温にて３分間遠心し、上清を除去後、サポニン溶液を１ｍＬ加えて懸濁し、２本のチューブにそれぞれ０．７ｍＬ（サンプル）と０．３ｍＬ（ネガティブコントロール）ずつ分注した。再度遠心して上清を除去した後、サンプルには一次抗体としてａｎｔｉ－Ｔｒｏｐｏｎｉｎ　Ｔ－Ｃ（ＣＴ３）抗体を１：１０００で添加したサポニン溶液０．５ｍＬを添加した。ネガティブコントロールには抗体を添加していないサポニン溶液０．５ｍＬを加えて細胞を懸濁し、４℃で一晩抗体を反応させた。翌日、一次抗体を除去し、二次抗体ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７を１：５００で添加したサポニン溶液０．５ｍＬを加えて遮光し、室温で１時間反応させた。１時間後、二次抗体を添加したサポニン溶液を、ＰＢＳ（－）０．５ｍＬに置換し、ＦＡＣＳ（Ａｃｃｕｒｉ™ ＣＳ６ Ｐｌｕｓ（ＢＤ社製））で解析を行った。

[0125] ＜ＲＮＡ抽出とＲＴ－ｑＰＣＲ＞

Ｔｒｏｐｏｎｉｎ（心筋細胞特異的遺伝子）、ＭＹＬ２（心筋細胞の一つである心室筋特異的遺伝子）、ＭＹＬ７（心筋細胞の一つである心房筋特異的遺伝子）を解析対象とした。

[0126] （１）試薬および機器ＲＮＡ抽出：ｍｉＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（

品番号２１７００４、キアゲン社製）

ｃＤＮＡ合成：ＲｅｖｅｒＴｒａ　Ａｃｅ（Ｒ）　ｑＰＣＲ　ＲＴ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　ｗｉｔｈ　ｇＤＮＡ　Ｒｅｍｏｖｅｒ（製品番号ＦＳＱ－３０１、ＴＯＹＯＢＯ社製）

ｑＰＣＲ反応：ＰｏｗｅｒＵｐ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（製品番号Ａ２５７７６、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）

ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）

Ｎａｎｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ 分光光度計 Ｃ４０（ワケンビーテック株式会社製）

[0127]（２）ＲＮＡ抽出

心筋細胞への分化誘導１２日目と１９日目の培養上清を除去した後、ＱＩＡＺＯＬ（キアゲン社製）０．５ｍＬを添加し、懸濁して細胞を溶解し、溶解物を１．５ｍｌチューブに回収した。以降はｍｉＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔに添付のプロトコルに従ってＲＮＡを抽出し、ＮａｎｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒＣ４０でＲＮＡ濃度を測定した。

[0128]（３）ＲＴ－ｑＰＣＲ

上記で抽出したＲＮＡ　１μｇを用いて、ＰｏｗｅｒＵｐ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘに添付のプロトコルに従って逆転写反応を行いｃＤＮＡの合成を行った。その後、６ｎｇのｃＤＮＡを用いてスタンダード法にてｑＰＣＲ反応を行った。検量線は１０ｎｇ／μＬの各ｃＤＮＡサンプルを１０μＬずつ集め、そこから１／１０希釈して５点作製した。

[0129]＜心筋特異的遺伝子発現の評価＞

分化誘導１２日目と１９日目の細胞から抽出したＲＮＡを用い、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍにて遺伝子発現量の解析を行った。使用したプライマーの配列を表２、ＰＣＲ条件を表３に示す。遺伝子発現量は、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）の遺伝子発現量を１とした場合の相対値で示す。

結果を表４に示す。

[0130] ＜細胞数の評価＞

分化誘導１２日目と１９日目の細胞塊をシングルセル化したあと、トリパンブルー染色（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）による生細胞の計測（ＴＣ２０全自動セルカウンター、Ｂｉｏ－Ｒａｄを使用）を行った。

上記で得られた測定値から、細胞生存率（％）（測定時の生細胞数／測定時の全細胞数×１００）および、細胞増殖率（％）（測定時の生細胞数／細胞播種（細胞培養開始）時の細胞数×１００）を算出した。結果を表４に示す。

[0131] ＜心筋純度の評価＞

分化誘導１２日目と１９日目の細胞塊をシングルセル化したあと、ＦＡＣＳにより、ｃＴｎＴ陽性率（ｃＴｎＴ陽性細胞数／細胞塊を構成する全細胞数×１００）を算出し、心筋純度（％）とした。結果を表４に示す。

[0132] ＜拍動数の評価＞

分化誘導１９日目の細胞の動画を撮影し、任意のスフェロイドのＢＰＭ（１分間における拍動数、拍／分）を算出した。結果を表４に示す。

[0133]

[表1]

	実施例1	実施例2	比較例1	比較例2
容器底面材質	TPX	TPX	TCPS	TCPS
Mw×１００００（Mw／Mn）	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	—	—
垂れ下がり距離（ｍｍ）	0	0	0	0
撓みの有無	なし	なし	なし	なし
水接触角（°）	110	110	40	40
容器底面の厚み(mm)	0.05	0.05	1	1
容器底面の酸素透過係数 (cm^3*mm/m^2*24h*atm)	1912	1912	203	203
容器底面の酸素透過度(cm^3/m^2*24h*atm)	38240	38240	203	203
培地高さ（mm）	5	10	5	10

[0134] [表2]

遺伝子名	方向	配列 (5'-3')	配列番号
GAPDH	Fw	ATTGCCCTCAACGACCACTTTG	1
	Rv	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG	2
MYL2	Fw	AGGCTCCGGGTCCAATTAAC	3
	Rv	TTGCCTTCAGGGTCAAACAC	4
MYL7	Fw	TCAGCTGTATCGACCAGAATCG	5
	Rv	AGGAAGACGGTGAAGTTGATGG	6

[0135] [表3]

ステップ	温度	持続時間	サイクル数
ＵＤＧ活性化	５０℃	２分	ホールド
Ｄｕａｌ　Ｌｏｃｋ　ＤＮＡ　ポリメラーゼ	９５℃	２分	ホールド
変性	９５℃	１５秒	４０
アニーリング／伸長	６０℃	１分	

[0136]

[表4]

	実施例1	実施例2	比較例1	比較例2
分化誘導12日の細胞生存率（%）	69.0	63.5	80.3	74.1
分化誘導12日の細胞増殖率（%）	1000	1250	270	650
分化誘導12日の心筋純度（%）	15.3	53.2	1.4	29.9
分化誘導12日のTroponin遺伝子発現量	2.7	5.5	0.3	2.2
分化誘導12日のMYL2遺伝子発現量	0.15	0.48	0.02	0.12
分化誘導12日のMYL7遺伝子発現量	9.4	18.1	0.73	6.5
分化誘導19日の細胞生存率（%）	73.5	69.1	78.8	67.8
分化誘導19日の細胞増殖率（%）	1430	2790	540	820
分化誘導19日の心筋純度（%）	13.2	42.6	2.4	16.5
分化誘導19日のTroponin遺伝子発現量	1.5	4.0	0.6	1.1
分化誘導19日のMYL2遺伝子発現量	0.72	8.50	0.15	0.34
分化誘導19日のMYL7遺伝子発現量	1.50	3.90	0.26	0.80
心筋拍動数BPM（拍／分）	59.8	61.6	18	43.6

[0137] ＜形態観察＞

位相差顕微鏡を使用して、それぞれの細胞がスフェロイドを形成している様子を観察した。結果を図２、３に示す。

[0138] ＜結果＞

分化誘導１２日目においては、実施例１、２は、比較例１、２に比べて、培養底面の酸素透過度が高いため、細胞増殖率が高く、特に培地高さ１０ｍｍの場合に高かった。１９日目でも同様の傾向が見られた。また、実施例１、２は、分化誘導１２日目、１９日目において、比較例１、２よりも心筋純度が高かった。さらに、心筋特異的遺伝子Ｔｒｏｐｏｎｉｎ、ＭＹＬ２、ＭＹＬ７の発現を比較したところ、どの遺伝子も比較例１、２に比べて実施例１、２の方が発現量が多く、特に培地高さ１０ｍｍの場合に多かった。実施例１、２は、分化誘導１９日目において、比較例１、２よりも拍動数が高く、液深さは５ｍｍよりも１０ｍｍの方が拍動数が高かった。また、形態観察の結果、実施例１、２では、比較例１、２に比べて、大きさおよび形状が均一である複数のスフェロイドが形成されることが明らかになった。また、実施例１、２では、比較例１、２に比べて、ｉＰＳ細胞が心筋細胞へと効率よく分化することが明らかになった。

[0139] ［実施例３］ヒト骨肉腫由来がん細胞（ＨＯＦ－１４３Ｂ）の培養

製造例２で作製した培養容器を用い、後述する方法によりヒト骨肉腫由来がん細胞（ＨＯＦ－１４３Ｂ）を培養し、スフェロイドを形成させた。

[0140] ［比較例３］

培養面の厚さが１０００μｍである市販のＴＣＰＳ培養容器（培養面の内径が１６ｍｍ、２４ウェルプレート、コーニング社製、ポリスチレン（ＰＳ）製）を使用した以外は、実施例３と同様な方法で培養した。

[0141] ［比較例４］

高酸素透過容器として培養部材の厚さが３５０μｍである市販のＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）製培養容器（培養面の内径が１５ｍｍ、２４ウェルプレート、製品名Ｇ－ｐｌａｔｅ、ＶＥＣＥＬＬ社製、型番Ｖ２４ＷＧ

ＰＢ）を使用した以外は、実施例３と同様な方法で培養した。

[0142] ［ヒト骨肉腫由来がん細胞（ＨＯＦ－１４３Ｂ）の培養］

＜細胞の播種＞

ヒト骨肉腫由来がん細胞を含む細胞懸濁液を入れた遠沈管（５０ｍｌ）に培地を加えた。培地は、ウシ胎児血清（Ｆｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ、ＦＢＳ、富士フイルム和光純薬）を５ｍＬ、２００ｍＭのＬ－グルタミン溶液（富士フィルム和光純薬）を０．５ｍＬ、１．５ｍｇ／ｍＬのＢｒｏｍｏ－ｄｅｏｘｙ　Ｕｒｉｄｉｎｅ（ＢＵｄＲ）を０．０５ｍＬ、Ｎｏｎ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ａｍｉｎｏ　Ａｃｉｄ（富士フィルム和光純薬）を０．５ｍＬ、Ｅ－ＭＥＭ培地（１０ｍｇ／ｍＬフェノールレッド、２２００ｍｇ／ｍＬ炭酸水素ナトリウム含有、培養用、富士フイルム和光純薬）を４３．９５ｍＬ加えて調製した。細胞密度の調整は、ヒト骨肉腫由来がん細胞を含む細胞懸濁液の細胞数を調整する方法で実施し、細胞懸濁液０．５ｍＬ／ウェルで播種すると細胞密度が１．０×10^4ｃｅｌｌｓ／ｃm^2となるように細胞懸濁液を調製した。

[0143] ＜細胞の培養＞

ヒト骨肉腫由来がん細胞を含む細胞懸濁液を培養面にマイクロピペットで播種し、インキュベーターに持ち込み、３７℃、５％CO_2下で培養を開始した。培養は７日間行った。細胞播種から３日目と６日目に、培地の交換を行った。培地の交換は、培養容器を静置し、スフェロイドが十分に沈降した状態で上清を除去し、除去した分量の培地を追加することにより実施した。

[0144] ＜形態観察および評価＞

培養７日目に位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、以下の基準で評価した。

Ａ：スフェロイドを形成している

Ｂ：細胞が接着し、スフェロイドを形成しない

実施例３を観察した結果を図４に示す。また、評価結果を表５に示す。

[0145]

[表5]

	実施例３	比較例３	比較例４
容器底面の材質	TPX	TCPS	PDMS
容器底面の厚み(mm)	0.05	1	0.35
形態評価	A	B	B

[0146] ＜結果＞

比較例３、４では、細胞は培養容器に接着し、スフェロイドを形成しなかったが、実施例３では、細胞がスフェロイドを形成していた。

産業上の利用の可能性

[0147] 以上の結果から、本発明の培養部材を用いると、正常な機能を保持した細胞のスフェロイドが形成されることが明らかになった。さらに、本発明の培養部材を用いると、ｉＰＳ細胞が心筋細胞へと効率よく分化することが明らかになった。すなわち、本発明の培養部材は、スフェロイドを形成させやすく、また、多能性幹細胞を分化させやすい。したがって、本発明の培養部材は創薬スクリーニング用途や診断用途、再生医療用途にも好適に用いることができる。

請求の範囲

[請求項1] 細胞、組織、または器官をその培養面上で培養する培養部材であり、前記培養部材は４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）を含み、前記培養面の水接触角が１００°より大きく１６０°以下であり、温度２３℃、湿度０％の時の酸素透過度が４５００～９００００ｃｍ^3／（ｍ^2×２４ｈ×ａｔｍ）である培養部材。

[請求項2] 前記４－メチル－１－ペンテン重合体（Ｘ）が、４－メチル－１－ペンテンとエチレンおよび炭素数３～２０のα－オレフィン（４－メチル－１－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも１種の共重合体（ｘ１）である、請求項１に記載の培養部材。

[請求項3] 前記培養面が、凹凸構造の形成加工を施されていない、請求項１または２に記載の培養部材。

[請求項4] スフェロイド形成用である、請求項１～３のいずれか１項に記載の培養部材。

[請求項5] 前記細胞、組織、または器官が、ｉＰＳ細胞由来の分化細胞を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の培養部材。

[請求項6] 前記細胞、組織、または器官が、心筋細胞を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の培養部材。

[請求項7] 前記培養部材の形状がフィルム状またはシート状である、請求項１～６のいずれか１項に記載の培養部材。

[請求項8] 少なくとも培養面が、請求項１～７のいずれか１項に記載の培養部材で形成された、培養器具。

[請求項9] 請求項１～７のいずれか１項に記載の培養部材または請求項８に記載の培養器具の培養面に、細胞、組織または器官を接触させる工程（Ａ）；および

前記培養面に接触した細胞、組織または器官を培養してスフェロイドを形成させる工程（Ｂ）；を含む細胞、組織または器官の培養方法。

[請求項10] さらに、前記細胞等の分化を誘導する工程（Ｃ）を含み、工程（Ｃ）が、プロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により、ｉＰＳ細胞の心筋細胞への分化を誘導する工程である、請求項９に記載の細胞、組織または器官の培養方法。

[請求項11] 心筋純度を増加させる、請求項９または１０に記載の細胞、組織または器官の培養方法。

[請求項12] 請求項９～１１のいずれか１項に記載の培養方法により形成されたスフェロイド。