明　細　書

発明の名称 ：

細胞培養キット、スクリーニング方法、及び細胞培養キットの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、生細胞を培養した細胞培養キット、スクリーニング方法、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 組織から単離した細胞を試験、検査に用いる手法は、バイオテクノロジー関連分野では欠かせない方法となっている。疾病、病態の診断、新薬の探索及び薬効の判定、あるいは動物検査、植物検査、環境汚染物質の試験などに幅広く用いられている。そのため、バイオテクノロジー分野で使用される細胞類は、極めて多様化してきている。

[0003] 単離した細胞は、直ちに試験に用いられる場合もあるが、多くの場合、培養皿や試験管のなかで細胞培養が行われる。この培養細胞を用いて、種々の検査が行われる。細胞培養試験に用いられる細胞培養株には、生体内での試験いわゆるin vivo試験と同様の薬剤感受性、毒性反応を示すことが要求される。すなわち、細胞培養容器の表面で規則性を有して配列された細胞間のネットワークを構築できることが必要とされる。また、細胞培養試験に用いられる細胞培養株は極めて高額であるため、細胞の生存率及び増殖速度の向上が望まれている。すなわち、細胞培養容器上で生体内類似の細胞機能が必要とされている。また、初代細胞を得るための単離操作が煩雑であること、細胞培養試験に用いられる細胞培養株は高額であることから、少ない細胞数での試験方法が望まれている。

[0004] 近年、創薬開発では、臨床試験段階での開発中断が問題となっている。これは、薬物動態試験段階での動物種差に起因する。これまで、前臨床段階における薬物動態試験では、ラット、イヌ、サル等の動物を用い、薬物の体内動態を予測してきた。しかし、ヒトを用いる臨床試験では、その予測が事実

上成立しないことが分かってきている。従って、薬物動態等のヒトへの予測は、ヒト試料を用いることが最も有効かつ簡便な方法であり、効率的な医薬品開発や安全な臨床試験の実施のために重要である。

[0005] 例えば、薬物の体内動態を調べる薬物動態試験では、主に肝臓での吸収、代謝、排泄であり、用いられるヒト試料は、肝臓スライス、肝細胞、肝ミクロソーム等である。この中で肝臓スライスは、入手が困難であり、肝ミクロソームは限られた代謝酵素のみでの代謝試験しか行えない。そのため、肝細胞の使用が最も効果的であると考えられている。

[0006] スクリーニングにおいて、使用される培養皿は樹脂製シャーレや、６ウェル、１２ウェル、４８ウェル、９６ウェルの各プレートである。これらは、一般に、プレート全体の大きさはほぼ同じであり、ウェル数が大きくなるほど、１ウェルのサイズが小さくなる。この１ウェルが１培養皿に相当する。また、最近の微量化への流れから、更に小口径で多数の培養皿からなる３８４ウェルプレートも使用され始めており、目的のスクリーニング方法に適応したものが使用されている。これらの培養皿の底部は平坦な平板状であり、この底面を培養面として用いている。

[0007] しかしながら、組織細胞の培養に従来の培養容器を用いると、本来の機能を消失させ脱分化してしまう場合や、未分化細胞が分化しない場合があり、目的の細胞機能を発現しないことが問題となっている。例えば、ヒト新鮮肝細胞は通常の平板プレート上で培養すると単離された際の代謝酵素の機能を１日程度で著しく低下させてしまうため、プレートへ細胞播種後４時間以内に薬物の代謝試験を行うことがある。すなわち、長時間の培養を行いながら試験に用いることができない問題、長時間の代謝安定性が検討できない問題があった。

[0008] 上記問題を解決するため、ヒトあるいは動物由来の生体物質（糖タンパク質、タンパク質等）を培養容器表面へコーティングする試み（特許文献１参照）や、高分子ゲル中で培養する試み（特許文献２参照）がなされている。

[0009] しかしながら、特許文献１に開示された方法では、コーティングする生体

物質が特殊であるため高コストとなること、培養容器内において均一な細胞集合体の形成が困難であること、生体内機能を長期間維持できないことなどの問題があった。特許文献２に開示された方法でも、細胞集合体の大きさが制御できないこと、顕微鏡観察が容易にできないこと、スクリーニング基板として操作性が煩雑であることなどの問題があった。更に、いずれの方法も、市販のディッシュやプレートを支持容器として用いるため、必要最小細胞数での効率的なスクリーニングが困難であった。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開平８－３１９３１７号公報

特許文献2：特開平８－３０８５６２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上述したように、効率的な医薬品開発や安全な臨床試験の実施のため、薬物の毒性・代謝・薬効ではヒト肝細胞を用いた試験や、神経系、腸管上皮系がなどの細胞が多く実施されている。これらの試験には、細胞株や、初代培養細胞が用いられることが多い。細胞株の場合は、生体内での機能を反映できないという問題点があった。一方初代培養細胞は生体内の機能を反映するが、個体差が問題となっていた。個体差の問題を解決するために、例えば、肝細胞について複数のドナーの肝細胞を含む浮遊細胞を含む生細胞を利用し、平均化したデータの取得が検討されている。しかし、浮遊細胞の寿命は短く、長期の試験に使用できないという問題があった。

[0012] 本発明は、このような問題を解決するためになされたものであり、複数のドナーの生細胞を培養した細胞培養キット、スクリーニング方法、及びそ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] 本発明にかかる細胞培養キットの一態様は、細胞培養プレートとその上で

培養された生細胞とを有する細胞培養キットであって、前記細胞培養プレートは、複数のマイクロ空間を有し、前記複数のマイクロ空間に複数の異なるドナーに由来する生細胞が表面に接着されている。これにより、一つの細胞培養プレートに複数の異なるドナーに由来する生細胞が接着されたスクリーニング用のキットを提供することができる。

[0014] また、前記複数の異なるドナーに由来する生細胞が、２種類以上の細胞であってもよい。これにより、複数の種類の生細胞からなる組織類似構造がチップ上に再現される。

[0015] 具体的には、各マイクロ空間は、異なるドナーに由来する複数の生細胞と、一つのドナーに由来する生細胞とのいずれかが接着されている。例えば、少なくとも二つの隣接するマイクロ空間は、異なるドナーに由来する生細胞が接着されている。あるいは、少なくとも二つの隣接するマイクロ空間は、同じドナーに由来する生細胞が接着されている。

[0016] また、前記複数のマイクロ空間は、所望の細胞数に培養された三次元構造体の細胞集団が隔離される大きさを有することが好ましく、前記複数のマイクロ空間は、底部面積が０．０１～０．１mm^2であり、深さが２５～１５０μmであることが好ましい。

[0017] 前記複数のマイクロ空間は、細胞播種密度が１×１０^2～１×１０^{6}細胞／cm^2で生細胞が播種されたことが好まく、細胞播種密度が１×１０^4～１×１０^{6}細胞／cm^2であるのがより好ましい。前記複数のマイクロ空間は、生細胞が集積し、細胞塊が形成されていることが好ましく、より具体的には、前記細胞塊の直径は、３０～２００μmであることが好ましい。

[0018] 前記生細胞は、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞またはｉＰＳ細胞から分化させた細胞であることが好ましい。

また、前記生細胞は肝細胞を含む生細胞であることが好ましく、前記肝細胞が、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞またはｉＰＳ細胞から分化させた細胞であること、あるいは、前記肝細胞を含む生細胞が、複数のドナーの肝組織内から分離されたものであることがより好ましい

。

[0019] また、本発明にかかるスクリーニング方法の一態様は、上述した細胞培養キットを用いて薬剤の評価を行う。

[0020] さらに、本発明にかかる細胞培養キットの製造方法の一態様は、複数のマイクロ空間を有する細胞培養プレートとその上で培養された生細胞とを有する細胞培養キットの製造方法であって、前記複数のマイクロ空間へ、複数の異なるドナーに由来する生細胞を播種し、播種した生細胞を培養する。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、複数のドナーの生細胞を培養した細胞培養キット、スクリーニング方法、及び細胞培養キットの製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]実施の形態に係る細胞培養容器の構成を示す平面図である。

[図2]実施の形態に係る細胞培養容器の構成を示すＩＩ－ＩＩ断面図である。

[図3]実施の形態に係る細胞培養容器の他の構成を示す平面図である。

[図4]実施の形態に係る細胞培養容器の他の構成を示すＩＶ－ＩＶ断面図である。

[図5]実施の形態に係る細胞培養容器のさらに他の構成を示す平面図である。

[図6]実施の形態に係る細胞培養容器のさらに他の構成を示すＶＩ－ＶＩ断面図である。

[図7]複数の細胞培養容器が配置された細胞培養キットの一例を示す図である。

[図8]複数のマイクロ容器に生細胞が培養された状態の一例を示す図である。

[図9]複数のマイクロ容器に生細胞が培養された状態の他の例を示す図である。

[図10]複数のマイクロ容器に生細胞が培養された状態のさらに他の例を示す図である。

[図11A]実施例の培養１日目の形態観察結果を示す写真である。

[図11B]実施例の培養４日目の形態観察結果を示す写真である。

[図11C]実施例の培養７日目の形態観察結果を示す写真である。

[図11D]実施例の培養１４日目の形態観察結果を示す写真である。

[図11E]実施例の培養２１日目の形態観察結果を示す写真である。

[図11F]実施例の培養３５日目の形態観察結果を示す写真である。

[図12]比較例の培養１４日目の形態観察結果を示す写真である。

[図13]実施例の主要な薬物代謝酵素とアルブミン分泌能との測定結果を示す写真である。

[図14]実施例の免疫染色結果（培養２８日）を示す写真である。

[図15]比較例の免疫染色結果（培養３０日）を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明に係る細胞培養キットは、細胞培養プレートとその上で培養された生細胞とを有し、細胞培養プレートが有する複数のマイクロ容器を用いる。複数のマイクロ容器の表面には、複数の異なるドナーに由来する生細胞が接着されている。細胞機能を維持するように生細胞を培養させるため、生細胞を培養する単位となるマイクロ容器は、細胞培養に適切なものを用いる必要がある。本発明に係る細胞培養キットに用いる細胞培養容器は、例えば、次のような容器を用いる。

[0024] 細胞培養容器には凹凸パターンすなわち複数のマイクロ容器が形成されている。これにより、生体内と同様な立体的な細胞生育が可能であることに加え、各マイクロ容器内において、ばらつき無く細胞が凝集した形態で培養できる。また、マイクロ容器は、例えば、マイクロ容器を仕切る側壁（凸部）の高さを最適化することで、凝集した生細胞（例えば、肝細胞塊）をマイクロ容器内のみで培養することができる。ここで、マイクロ空間は、マイクロ容器よって形成される空間であり、より具体的には、平面上に形成された凹凸パターンによって形成される空間を指す。以降の説明では、マイクロ容器とマイクロ空間とを特に区別しない。

[0025] 側壁により囲まれたマイクロ容器の寸法は、細胞を培養するために最適な範囲とする必要である。マイクロ容器の底部面積が大きすぎると、平板上で

の培養と同様、細胞は薄く伸び、立体構造とならない。一方、マイクロ容器の底部面積が小さすぎると、細胞を収容できなくなる。従って、空間の寸法は、培養する細胞種に応じて、一又は複数個が収容できる範囲とすることが好ましい。例えば、細胞が複数個集積した肝細胞塊を形成させる場合、その肝細胞塊が収納できる範囲とすることが好ましい。

[0026] 側壁の高さは、マイクロ容器で培養する細胞を隣接するマイクロ容器へ移動させないために最適な範囲とする必要である。側壁の高さが低すぎると、細胞が側壁を乗り越えてしまい、培養に適さない。側壁の高さが高すぎると、作製が困難な上、物質拡散がしにくくなり培養環境が悪化してしまう。従って、側壁の高さは、細胞種に応じて、マイクロ容器内に配置された培養細胞を、そのマイクロ容器内において安定的に培養し続けられる範囲とすることが好ましい。

[0027] また、側壁に開口部を設け、複数のマイクロ容器を連通した構造とするにより、細胞への酸素や栄養分の供給及び細胞からの老廃物の除去を効率良く行うことができる。なお、培養する細胞種に応じ、側壁の高さ、マイクロ容器寸法、開口部の幅を適宜設定することにより、多様な培養系に適用することもできる。

[0028] また、本明細書でいう生細胞は、生体組織から分離した細胞（初代培養細胞）の継代していない細胞が含まれる。また生細胞には、新鮮細胞と凍結細胞が含まれる。また、株化細胞、その他のＥＳ細胞（Enbryonic Stem Cells）等全てが含まれる。

[0029] 生細胞は、肝細胞（肝実質細胞）、肝星細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、神経細胞、グリア細胞、シュワン細胞、膵ベータ細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞、間葉系細胞から選ばれる、１種類もしくは２種類以上の細胞を用いることが好ましい。これら細胞種は、初代培養細胞であってもよく、または、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞、及びｉＰＳ細胞から分化させた細胞であってもよい。

[0030] 実施の形態

以下に、本発明の実施の形態について説明する。ただし、本発明が以下の実施の形態に限定される訳ではない。また、説明を明確にするため、以下の記載及び図面は、適宜、簡略化されている。

[0031] はじめに実施の形態に係る細胞培養キットに用いる細胞培養容器について説明し、続いて、細胞培養キットの構成例について説明する。まず、細胞培養容器の構成例を、図１、２を用いて説明する。図１は、本実施の形態に係る細胞培養容器の構成を示す平面図であり、図２は図１のＩＩ－ＩＩ断面図である。図１に示すように、細胞培養容器１０はマイクロ容器１１、側壁１２、開口部１３を備える。細胞培養容器１０の培養面には、複数の側壁１２が網目状に形成されており、この側壁１２に四方を囲われた空間がマイクロ容器１１となる。また、各マイクロ容器１１の四辺に形成された側壁１２の各辺の中央部に、開口部１３が形成されている。

[0032] 図１において、マイクロ容器１１の底部の幅ａ、マイクロ容器１１を区画するための側壁１２の幅ｂ、高さｃ、隣接するマイクロ容器１１が互いに連通するための開口部１３の幅ｄを示した。本発明における底部面積とは、マイクロ容器開口水平面（側壁１２上面と同一面）に垂直方向に上方から容器底へ平行光を照射した際の投影面積のことをいう。例えば、マイクロ容器の底がＵ字形状である場合、その開口面に垂直方向な上方より底に入射した平行光が投影する形状が底部面積となる。投影底部の長径及び短径とは、円及び楕円の場合、その重心を通る長軸及び短軸と円周との交点の各軸上の距離を長径及び短径といい、多角形の場合、その多角形の面積との差が最小となり各頂点を通る外挿円又は外挿楕円の長径および短径をいい、各頂点を通る外挿円又は外挿楕円を描けない場合は、最も多くの頂点を通る近似円又は楕円の長径および短径をいう。

[0033] マイクロ容器１１の底部形状は特に制限されるものではなく、正方形、円、多角形以外にも種々の形状を採用することができる。生体内での肝機能を再現する細胞培養には、この底部面積は０．０１ｍｍ^2～０．１ｍｍ^{2}が好ま

しい。また、底部の長径が短径の１～１．５倍であることが好ましい。さらに、等方的形状が好ましく、正方形であれば、例えば、相当直径１００μｍの肝細胞塊を形成させる場合、一辺の長さが１００μｍ～３００μｍが好ましい。

[0034] マイクロ容器１１の水平面と側壁１２とがなす角度は、細胞が乗り上げない角度でなければならないため、側面の上部から５０%以上の部分は８０～９０°が好ましく、特に、８５°～９０°であることが好ましい。

[0035] 側壁１２の高さｃは、マイクロ容器１１で培養する細胞が乗り上げ隣接するマイクロ容器１１へ移動しなければよく、例えば、相当直径１００μｍの肝細胞塊を形成させる場合、５０μｍ～１５０μｍが好ましい。

[0036] 隣接するマイクロ容器１１を互いに連通するための開口部１３の幅ｄは、培養細胞が最初に播種されたマイクロ容器１１から隣接するマイクロ容器１１に移動できない程度であればよい。例えば、培養細胞の相当直径が２０μｍであれば、５～１５μｍであることが好ましい。なお、開口部１３は必須ではなく、図３及び図４に示すように、マイクロ容器１１の四辺が側壁１２により完全に囲まれていてもよい。ここで、図３は、本実施の形態に係る他の細胞培養容器の構成を示す平面図であり、図４は図３のＩＶ－ＩＶ断面図である。

[0037] 図３において、マイクロ容器１１の底面の幅ａ、マイクロ容器１１を区画するための側壁１２の幅ｂ、高さｃを示した。ここで、３μｍ≦ｂ≦１５μｍ、かつ、ｃ／ｂ≧２とする必要がある。側壁１２の幅ｂが１５μｍを越えると、側壁の上面へ細胞が接着してしまい、培養に適さない。一方、側壁１２の幅ｂが３μｍ未満では、作製が困難となる。側壁の高さは低すぎると、細胞が側壁を乗り越えてしまい、培養に適さない。側壁１２の高さｃが側壁１２の幅ｂの２倍未満であると、マイクロ容器１１で培養する細胞が乗り上げ隣接するマイクロ容器１１へ移動してしまうことがある。また、具体的には、１辺１００μｍの四角形のマイクロ容器内でヒト胎児肝細胞を重層化させる場合、側壁１２の高さｃは１５μｍ～３００μｍが好ましく、５０μｍ

～１５０μｍがさらに好ましい。ここで、側壁の高さｃが高すぎると、作製が困難な上、物質拡散がしにくくなり培養環境が悪化してしまう。側壁１２は多段階形状であってもよい。

[0038] また、細胞培養部は、必要な細胞数を最小にするために、図５及び図６に示すように、１つのスクリーニングに必要なだけの複数のマイクロ容器からなる区画されたスポットを有していても良い。例えば、分化効率が高い１辺２００μｍの正方形で高さ５０μｍのマイクロ容器を用い、スクリーニングに必要な最小細胞数が約１０００個であった場合、９個のマイクロ容器が必要となるため、９個のマイクロ容器を区画化するスポットを設け、更に複数のスポットを設けることで同時に複数の試薬や医薬品を検査できるハイスループットスクリーニングが可能となる。

[0039] ここで、図５は、本実施の形態に係る他の細胞培養部の構成を示す平面図であり、図６は図５のＶＩ－ＶＩ断面図である。図５には、複数のマイクロ容器を区画化する側壁２４とその区画化されたスポット２３を示した。側壁２４の高さｄは、培養液や反応液等の上清液が乾燥せず保持できる容量であればよく、便宜設定すればよい。

[0040] 細胞培養容器上の凹凸パターンを作製する方法としては、特に限定されないが、例えば、モールドを用いた転写成形、３次元光造形、精密機械切削、ウェットエッチング、ドライエッチング、レーザー加工、放電加工等の方法が挙げられる。細胞培養容器の用途、要求される加工精度、コスト等を考慮してこれらの製造方法を適宜選択することが好ましい。

[0041] モールドを用いて転写成形方法の具体例としては、金属構造体を型として樹脂成形で凹凸パターンを形成する方法が挙げられる。この方法は金属構造体の形状を高い転写率で樹脂へ凹凸パターンに再現することが可能であり、また汎用の樹脂材料を使用することにより材料コストを低くできるので好ましい。このような金属構造体の型を用いる方法は、低コストであり、高い寸法精度を満足できる点で優れている。

[0042] 上記金属構造体の製造方法としては、例えば、フォトリソグラフィによっ

て作製されたレジストパターンや３次元光造形によって作製された樹脂パターンへのメッキ処理、精密機械切削、ウェットエッチング、ドライエッチング、レーザー加工、放電加工等が挙げられる。用途、要求される加工精度、コスト等を考慮して適宜選択すればよい。

[0043] 上記で得られた金属構造体を型として用いて樹脂へ凹凸パターンを成形する方法としては、例えば、射出成形、プレス成形、モノマーキャスト成形、溶剤キャスト成形、ホットエンボス成形、押出成形によるロール転写等の方法を挙げることができる。生産性及び型転写性の観点から射出成形を採用することが好ましい。

[0044] 細胞培養容器を構成する材料としては、自己支持性を有するものであれば特に制限されず、例えば、合成樹脂、シリコン、ガラス等が挙げられる。コスト面や顕微鏡観察による細胞視認性の観点から、透明な合成樹脂を材料とすることが好ましい。透明な合成樹脂としては、例えば、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸メチルースチレン共重合体等のアクリル系樹脂、ポリスチレン等のスチレン系樹脂、シクロオレフィン等のオレフィン系樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリ乳酸等のエステル系樹脂、ポリジメチルシロキサン等のシリコーン系樹脂、ポリカーボネート樹脂等が挙げられる。このような樹脂には、透明性を損なわない範囲で着色剤、拡散剤、増粘剤等の各種添加剤を含んでいてもよい。

[0045] 細胞培養容器は、容器表面の親水性、生体適合性、細胞親和性等を向上させることを目的として、凹凸パターン表面側に表面処理を行い、改質層及び／又はコーティング層が配されていてもよい。上記改質層を設ける方法としては、自己支持性を失う方法や１００μｍ以上の極端な表面荒れを起こす方法でなければ特に制限はないが、例えば、薬品処理、溶剤処理、表面グラフト重合によるグラフトポリマーの導入等の化学的処理、コロナ放電、オゾン処理、プラズマ処理等の物理的処理等の方法が挙げられる。またコーティング層を設ける方法としては、特に制限されるものではないが、例えば、スパッタ、蒸着等のドライコーティング、無機材料コーティング、ポリマーコー

ティング等のウェットコーティング等の方法が挙げられる。凹凸パターン上には、気泡の混入することなく培養液を注入するために親水性を付与することが望ましく、均一な親水性膜を形成させる方法として、無機蒸着が好ましい。

[0046] また、細胞親和性を考慮した場合には、例えば、コラーゲン、フィブロネクチン等の細胞親和性タンパク質をコーティングすることがより好ましい。コラーゲン水溶液等を均一にコートするために、上述の親水性膜を形成させた後、コートすることが好ましい。通常、肝細胞培養においては、生体内環境を模倣して細胞外マトリックス表面での培養が望ましいため、上記のように均一な親水性無機膜を配した後に、培養細胞に適した細胞外マトリックスからなる有機膜を配することが特に好ましい。

[0047] また、上述した細胞培養容器を用いる細胞培養方法は、細胞を培養するマイクロ容器のみに細胞を配置させ、その空間内で生体内に類似した形態や機能を発現させるため、適切な細胞数を播種する必要があり、細胞播種密度１．０×１０^{2}～１．０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}が好ましく、細胞播種密度１．０×１０^{4}～１．０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}がより好ましい。例えば、マイクロ容器が正方形で、１辺が２００μｍの場合、５．０×１０^{4}～５．０×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}が好ましい。このような条件のもと、直径が３０～２００μｍに及ぶ肝細胞塊を得ることができる。

[0048] 続いて、本実施の形態に係る細胞培養キットの構成例について、図７から図１０を用いて説明する。図７は、細胞培養キットの構成例を示す図である。細胞培養キット３０は、平板の細胞培養プレート３２を有し、細胞培養プレート３２は、複数の培養皿３４を備える。培養皿３４それぞれには、細胞培養容器３１が配置される。一つの細胞培養プレート３２に設定される培養皿３４の数は、スクリーニングの方法、培養する細胞の種類や試験に用いる細胞の数に応じて決定される。細胞培養プレート３２は、少なくとも一つの細胞培養容器３１を有する。細胞培養容器３１は、例えば、図１から図６に示した３種類の構成のいずれであってもよい。また、上記で説明した凹凸パ

ターンの条件を満たす場合にはその他の構成を有していてもよい。培養皿３４の底部は平坦な平板状であり、細胞培養容器３１は、この底面を培養面として用いている。

[0049] 図８～図１０は、複数のマイクロ容器に生細胞が培養された状態の一例であり、播種される細胞のドナーの違いを示している。図８から図１０において、矩形の一つ一つがマイクロ容器３３であり、図８及び図９は、細胞培養容器３１に、９個のマイクロ容器３３を有する場合を示している。また、図１０は、細胞培養容器３１に、１８個のマイクロ容器３３を有する場合を示している。また、Ｄ１からＤ３は、培養された細胞であり、図中ではＤ１、Ｄ２、Ｄ３それぞれが異なるドナーであることを示すため模様を変えて示している。

[0050] 図８は、各マイクロ容器３３に一つのドナーに由来する細胞が接着され、隣接するマイクロ容器３３では、異なるドナーの生細胞が接着されている場合を示している。図９は、複数のマイクロ容器３３のうち、一部は複数のドナーに由来する生細胞が混ざった状態で接着され、他は一つのドナーに由来する生細胞が接着された場合を示している。ここでは、一つのマイクロ容器３３に二つのドナーの生細胞が接着されている場合を一例として示している。図１０は、細胞培養容器３１が有する複数のマイクロ容器３３を二つに区分し、一方に１種類目のドナーの細胞を接着し、他方に２種類目のドナーの細胞を接着した例を示している。なお、複数のマイクロ容器３３を３以上の区分に分割してもよい。各区分に所望のドナーの細胞を接着することによって、異なるドナー間の試験結果の相違を容易に確認することができる。

[0051] なお、図８から図１０は、複数のドナーに由来する生細胞の配置例を示したが、これらの配置に限られるわけではない。細胞培養キット３０が有する複数のマイクロ容器３３に複数のドナーに由来する生細胞が表面に接着され、培養されていればこれら以外の配置であってもよい。具体的には、各マイクロ容器３３は、異なるドナーに由来する複数の生細胞が接着された場合であってもよい。一つのマイクロ容器３３に接着される異なるドナーの生細胞

の種類は、３種類以上であってもかまわない。または、マイクロ容器３３は、一つのドナーに由来する生細胞が接着され、細胞培養キット３０全体として（あるいは一つの細胞培養容器３１として）複数のドナーの生細胞を有する場合であってもよい。あるいは、一つの細胞培養容器３１それぞれは一つのドナーに由来する生細胞が接着され、複数の細胞培養容器３１全体では異なるドナーに由来する生細胞が接着されている場合であってもよい。すなわち、細胞培養キット３０として、複数の異なるドナーに由来する生細胞が接着されていればよい。

[0052] 細胞培養キット３０の各マイクロ容器３３の表面には、複数のドナーに由来する生細胞が接着された状態で培養される。マイクロ容器内では、生細胞が集積し、細胞塊が形成される。細胞塊は所望の大きさになるまで培養され、例えば、細胞凝集塊の直径が３０～２００μｍになるまで培養される。また、細胞塊の大きさに応じてマイクロ容器の大きさも決定されることになる。

[0053] マイクロ容器内で培養される生細胞としては、異なるドナーに由来する実質細胞が用いられる。かかる実質細胞は、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞、または、ｉＰＳ細胞（induced pluripotent stem cells）から分化させた実質細胞、もしくは、生体から分離された実質細胞が用いられる。

[0054] 複数種類の細胞種を用いる場合は、１種類の実質細胞と他の細胞種を混合し培養する。この場合の細胞の由来は、例えば、複数ドナーの実質細胞と、単一のドナーに由来する他の細胞種であってもよく、または、１ドナーに由来する実質細胞と実質細胞のドナーと異なるドナーに由来する他の細胞種であってもよい。他の細胞種としては、肝星細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞、間葉系細胞から選択される１種類以上の細胞種が用いられる。実質細胞、肝星細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞、間葉系細胞は、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞、または、ｉＰＳ細胞（induced pluripotent stem cells）から分化させた細胞、もしくは、生体内から分離した細

胞が用いられる。

[0055] 培地としては、栄養因子、血清、細胞からの分泌溶液などの栄養分を含む培地が用いられる。もしくは、細胞からの分泌溶液については、セルカルチャーインサートなどの膜上に細胞を培養した容器を設置する方法などを用いても良い。

[0056] 以上説明したように、本発明に係る実施の形態の一態様によれば、複数のドナーの生細胞を、1つの容器内（細胞培養キット内）で接着させた状態で培養させた細胞培養キットを提供することができる。細胞培養キットは、複数のマイクロ容器を有する。複数のマイクロ容器は、上述したように生細胞の生体内機能を長期間維持できる構造を有する。従って、生体内類似の細胞機能を有する生細胞を提供することができる。加えて、複数のドナーの試験結果を一つのチップ上で取得することが可能となる。これにより、複数の異なるドナーに由来する細胞を用いる試験を長期にわたり、効率よく実施することが可能になる。

実施例

[0057] ＜複数のドナーに由来する複数種類の細胞（例えば、実質肝細胞と非実質肝細胞）をマイクロ空間プレートで培養した結果＞

１．細胞の準備

１－１．肝細胞の培養（細胞増殖）

ヒト肝幹細胞（委託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１１０８、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）にＢＭＩ１遺伝子を導入した形質転換細胞（以下、「形質転換肝細胞」と表記）を、ＩＶ型コラーゲンコートディッシュ（ベクトンデッキン社製）に播種し培養した。

培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒトγーインスリン（１．０μｇ／ｍｌ）、ニコチンアミド（１０ｍｍｏｌ／Ｌ）、デキサメタゾン（１ｘ１０$^{-7}$ｍｏｌ／Ｌ）、Ｌーグルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を加えたＤＭＥＭ栄養混合Ｆ－１２Ｈａｍ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１：１　ｍｉｘｔｕｒｅ）を用いた。培養は、３７℃、５％CO_2インキュベータで行い、培地交換を

５日毎に行った。

[0058] １－２．血管内皮細胞の培養（細胞増殖）

前記形質転換肝細胞とは異なるドナーに由来するヒト血管内皮細胞株を、何もコートされていない細胞培養ディッシュ（ベクトンデッキンソン社製）に播種し培養した。

培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒトγーインスリン（１．０μｇ／ｍｌ）、ニコチンアミド（１０ｍｍｏｌ／Ｌ）、デキサメタゾン（１ｘ１０$^{-7}$ｍｏｌ／Ｌ）、Ｌーグルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を加えたＤＭＥＭ栄養混合Ｆ－１２Ｈａｍ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１：１　ｍｉｘｔｕｒｅ）を用いた。培養は、３７℃、５％CO_2インキュベータで行い、培地交換を５日毎に行った。

[0059] １－３．細胞懸濁液の作製

上記１－１、１－２で培養した細胞それぞれについて、０．２５％トリプシン溶液を用いて剥離し細胞を回収した後、培地に分散させた。培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒトγーインスリン（１．０μｇ／ｍｌ）、ニコチンアミド（１０ｍｍｏｌ／Ｌ）、デキサメタゾン（１ｘ１０$^{-7}$ｍｏｌ／Ｌ）、Ｌーグルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を加えたＤＭＥＭ栄養混合Ｆ－１２Ｈａｍ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１：１　ｍｉｘｔｕｒｅ）を用いた。それぞれ、トリパンブルーで細胞を染色し生細胞数をカウントした。

[0060] ２．培養試験（実施例・比較例）

２－１　＜実施例０１＞

１－３で得た形質転換肝細胞と血管内皮細胞の混合比が１：３になるように混合し、細胞密度が３．７５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるように、培養容器に播種した。培養容器は、図３および図４に示す凹凸パターンであって、ａ＝１００μｍ、ｃ＝５０μｍのマイクロ空間を有する２４ウェルタイプの培養容器を用いた。

[0061] ２－２　＜比較例０１＞

１－３で得た形質転換肝細胞を、細胞密度が３．７５×１０^{4}細胞／ｃｍ^2

になるように、培養容器に播種した。培養容器は、図３および図４に示す凹凸パターンであって、ａ＝１００μｍ、ｃ＝５０μｍのマイクロ空間を有する２４ウェルタイプの培養容器を用いた。

２－３　＜比較例０２＞

１－３で得た形質転換肝細胞を、細胞密度が３．７５×10^4細胞／cm^2になるように、２４ウェル細胞培養プレート（ベクトンデッキン社製）に播種した。

[0062] ２―４　培養方法

上記２－１から２－３に記載したように細胞を播種した後、３７℃の５％CO_2インキュベータで培養した。培養２４時間後、１回／１～２日の頻度で培地交換を行った。培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒトγーインスリン（１．０μｇ／ｍｌ）、ニコチンアミド（１０ｍｍｏｌ／Ｌ）、デキサメタゾン（１ｘ10^{-7}ｍｏｌ／Ｌ）、Ｌーグルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を加えたＤＭＥＭ栄養混合Ｆ－１２Ｈａｍ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１：１　ｍｉｘｔｕｒｅ）にヒト組換えＨＧＦ（５０ｎｇ／ｍＬ）及び、上皮増殖因子（ＥＧＦ）（１０ｎｇ／ｍＬ）を添加した培地を用いた。

[0063] ３．遺伝子発現解析

肝臓の代表的な薬物代謝酵素であるチトクロームＰ４５０（ＣＹＰ）及びアルブミンの遺伝子発現は、所定日数培養した細胞からＲＮＡを回収し、ｃＤＮＡ合成後、リアルタイムＰＣＲを行うことで評価した。

[0064] ４．実験結果（遺伝子発現解析結果）

表１に、実施例０１及び比較例０１、０２における培養期間２１日後のアルブミン、ＣＹＰ３Ａ４、及びＣＹＰ２Ｃ９の遺伝子発現量を示す。表中、遺伝子発現量は、比較例０２の値を１とした場合の相対値を示している。また、ＣＹＰ３Ａ４、ＣＹＰ２Ｃ９は、肝臓に存在する代謝酵素の一つであり、チトクロームＰ４５０酵素の分子種の名前である。ＣＹＰは種々の化学物質（医薬品を含む）、環境汚染物質、有機溶媒などの異質・異物から生体を守る重要な役目を担っている。

実施例０１では、アルブミン、ＣＹＰ３Ａ４、及びＣＹＰ２Ｃ９のいずれにおいても比較例０１、０２よりも有意に高い発現量を示した。

なお、実験方法の条件は、異なる２種の細胞を混合して培養する以外の、細胞数、細胞の混合比は上述したものに限定されない。表面コートについても細胞が接着すればよく、上述したものに限定されるものではない。

[0065] [表1]

	アルブミン	CYP3A4	CYP2C9
実施例 01	105.1	458.0	51.8
比較例 01	80.9	183.2	41.4
比較例 02	1	1	1

[0066] ＜複数のドナーに由来する肝細胞をマイクロ空間プレートで培養した結果＞

１．細胞播種

実施例では、６ドナー肝から採取したヒト胎児肝細胞、すなわち、肝幹細胞と肝前駆細胞と成熟肝細胞の３種類の細胞を含んだ、６ドナー由来の細胞を用いた。比較例では単一ドナーから採取したヒト胎児肝細胞を用いた。いずれも、タイプＩＶコラーゲンをコートした、図３および図４に示すａ＝１００μｍ、ｃ＝５０μｍのマイクロ空間を有する２４ウェルタイプの培養容器に、細胞密度が３．７５×10^4細胞／cm^2になるように播種した。

[0067] ２．培養

培養は、３７℃の５％CO_2インキュベータ内で行った。培養２４時間後、１回／１～２日の頻度で培地交換を行った。培地は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ヒトγーインスリン（１．０μｇ／ｍｌ）、ニコチンアミド（１０ｍｍｏｌ／Ｌ）、デキサメタゾン（１ｘ10^{-7}ｍｏｌ／Ｌ）、Ｌーグルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を加えたＤＭＥＭ栄養混合Ｆ－１２Ｈａｍ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１：１　ｍｉｘｔｕｒｅ）にヒト組換えＨＧＦ（５０ｎｇ／ｍＬ）及び、上皮増殖因子（ＥＧＦ）（１０ｎｇ／ｍＬ）を添加した培地を用いた。

[0068] ３．分析

３－１．形態観察

倒立顕微鏡を用いて、培養１日、４日、７日、１４日、２１日、３５日に観察した。

３－２．チトクロームＰ４５０（ＣＹＰ）及びアルブミンの遺伝子発現と、ＣＹＰ３Ａ４のタンパク発現

肝臓の代表的表的な薬物代謝酵素であるチトクロームＰ４５０（ＣＹＰ）及びアルブミンの遺伝子発現は、所定日数培養した細胞からＲＮＡを回収し、ｃＤＮＡ合成後、リアルタイムＰＣＲを行うことで評価した。タンパク発現は、免疫染色法を用いて分析した。

３－３．グリコーゲン貯蔵能

ＰＡＳ染色法より、ヒト胎児肝臓細胞における分化能（グリコーゲン貯蔵能）を評価した。

[0069] ４．結果

４－１．形態観察結果

細胞は最初にフィルム底面に接着し、培養日数を追うごとに、徐々に他のマイクロ空間内（micro cavity）へと伸展してゆき、マイクロ空間内に細胞集合体を形成した。これは、以下に示した＜比較例＞と同様の形態であったことから、複数ドナーの細胞も単一ドナーと同じように凝集体形成が可能であることが示された。図１１Ａ～１１Ｆは、実施例の形態観察結果を示す写真である。また、図１２は、比較例の培養１４日目の形態観察結果を示す写真である。

[0070] ４－２．チトクロームＰ４５０（ＣＹＰ）及びアルブミンの遺伝子発現と、ＣＹＰ３Ａ４のタンパク発現の結果

主要な薬物代謝酵素ＣＹＰ３Ａ４、２Ｃ１９、２Ｃ９、１Ａ２、２Ｄ６とアルブミン分泌能を測定した。その結果、培養７日目でこれらＣＹＰ遺伝子が発現し、培養２１日目で、アルブミンとこれらＣＹＰ遺伝子が発現した。日数が経過した場合も、この機能は維持されていた。図１３は測定結果を示

す写真である。図１３において、左側に培養７日目、中央に培養２１日目、右側に培養３５日目の結果を示している。

免疫染色で、ほぼすべてのマイクロ空間内で、ＣＹＰ３Ａ４（赤）の発現が確認され（図１４）、これは、以下に示した＜比較例＞に示したＣＹＰ３Ａ４の染色像（図１５）と類似していたことから、複数ドナーの細胞も単一ドナーと同じように、肝機能を保持した状態で培養できることが示された。

[0071] ４－３．グリコーゲン貯蔵能の結果

ヒト胎児肝臓細胞における分化能（グリコーゲン貯蔵能）を検討した。その結果、ヒト胎児肝臓細胞においてグリコーゲン貯蔵能が認められた。さらに、この細胞においては培養２１日目で半数以上の細胞が強いＰＡＳ陽性を呈した。

[0072] 上記結果４－１～４－３から、マイクロ空間に異なるドナーの肝細胞を生着させた状態で、肝機能をもつ、複数ドナーの肝細胞の培養が可能であることが示された。

[0073] なお、本発明は上記に示す実施の形態に限定されるものではない。本発明の範囲において、上記実施形態の各要素を、当業者であれば容易に考えうる内容に変更、追加、変換することが可能である。

符号の説明

[0074] １０、２０　細胞培養容器

１１　マイクロ容器

１２　側壁

１３　開口部

２３　スポット

２４　スポットの側壁

３０　細胞培養キット

３１　細胞培養容器

３２　細胞培養プレート

３３　マイクロ容器

３４　培養皿

Ｄ１、Ｄ２、Ｄ３　細胞

請求の範囲

[請求項1] 細胞培養プレートとその上で培養された生細胞とを有する細胞培養キットであって、

前記細胞培養プレートは、複数のマイクロ空間を有し、前記複数のマイクロ空間に複数の異なるドナーに由来する生細胞が表面に接着された細胞培養キット。

[請求項2] 前記複数の異なるドナーに由来する生細胞が、２種類以上の細胞であることを特徴とする請求項１記載の細胞培養キット。

[請求項3] 各マイクロ空間は、複数の異なるドナーに由来する生細胞と、一つのドナーに由来する生細胞とのいずれかが接着されていることを特徴とする請求項１または２記載の細胞培養キット。

[請求項4] 少なくとも二つの隣接するマイクロ空間は、異なるドナーに由来する生細胞が接着されていることを特徴とする請求項１または２記載の細胞培養キット。

[請求項5] 少なくとも二つの隣接するマイクロ空間は、同じドナーに由来する生細胞が接着されていることを特徴とする請求項１または２記載の細胞培養キット。

[請求項6] 前記複数のマイクロ空間は、所望の細胞数に培養された三次元構造体の細胞集団が隔離される大きさを有すること特徴とする請求項１乃至５のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項7] 前記複数のマイクロ空間は、底部面積が０．０１～０．１mm^2であり、深さが２５～１５０μmであることを特徴とする請求項１乃至６のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項8] 前記複数のマイクロ空間は、細胞播種密度が1×10^2～1×10^6細胞／cm^2で生細胞が播種されたことを特徴とする請求項１乃至７のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項9] 前記複数のマイクロ空間は、生細胞が集積し、細胞塊が形成されていることを特徴とする請求項１乃至８のいずれか一項に記載の細胞培

養キット。

[請求項10] 前記細胞塊の直径は、３０～２００μｍであることを特徴とする請求項１乃至９のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項11] 前記生細胞は、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞またはｉＰＳ細胞から分化させた細胞であることを特徴とする請求項１乃至１０のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項12] 前記生細胞が、肝細胞を含む生細胞であることを特徴とする請求項１乃至１０のいずれか一項に記載の細胞培養キット。

[請求項13] 前記肝細胞が、組織前駆細胞、組織幹細胞、ＥＳ細胞から分化させた細胞、またはｉＰＳ細胞から分化させた細胞であることを特徴とする請求項１２記載の細胞培養キット。

[請求項14] 前記肝細胞を含む生細胞が、複数のドナーの肝組織内から分離されたものであることを特徴とする請求項１２記載の細胞培養キット。

[請求項15] 請求項１乃至１４のいずれか一項に記載の細胞培養キットを用いて薬剤の評価を行うスクリーニング方法。

[請求項16] 複数のマイクロ空間を有する細胞培養プレートとその上で培養された生細胞とを有する細胞培養キットの製造方法であって、

前記複数のマイクロ空間へ、複数の異なるドナーに由来する生細胞を播種し、

播種した生細胞を培養する細胞培養キットの製造方法。