

明 細 書

発明の名称：培養材およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、培養材およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 細胞、組織、器官は、生育に適した条件下でなければ培養できないため、適切な栄養を含む培地と共にディッシュやプレート、フラスコ等の培養容器に入れ、さらに培養容器は温度・湿度・ガス濃度を所定の水準に保つことができるインキュベーター内に静置することが必要である。

[0003] さらに、上記の培養を効率的に実現するためには、充分かつ適正な酸素供給が行われなければならない。

細胞への酸素供給および培地のpH調整用の二酸化炭素供給のためには、培養容器内への酸素および二酸化炭素等のガスの供給が必要であるので、ガス透過性が低いガラスやポリスチレン等の素材からなる培養容器は、キャップや蓋等、培養容器上部に開口部を設けて、インキュベーター内から容器内部へのガス供給を確保している。しかし、培養細胞は通常、培養容器底面に接着している場合、若しくは、底面近傍に浮遊している場合が多く、上面は培地で覆われているので、培地中の酸素拡散速度が律速になり、特に底部の培養細胞への酸素供給は充分でなく、細胞の増殖が妨げられるという問題が古くから知られている。またポリスチレンは自家蛍光を持つため、顕微鏡で観察しにくい等の問題もあることが知られている（非特許文献1）。

[0004] 細胞への酸素供給を促進するために、培養装置内の酸素分圧を高める等の手段があるが、酸素分圧をコントロールするための専用の培養装置が必要であり、一般的に大気下で培養するための培養装置と比較してコストが高い。また、酸素分圧をコントロールするために使用する酸素ポンペは可燃性ガスであるため、酸化発熱、燃焼、爆発の危険性があり、不燃性ガスである窒素ポンペや炭酸ガスポンペと比較して、酸素ポンペの取り扱いには充分注意す

る必要がある。簡便かつ実用的な酸素供給改善方法として、高酸素透過性のフィルムを培養面とした培養プレートを使うと、静置培養における培養液層中の酸素拡散律速の問題を簡便に解決できる事が知られている（非特許文献2）。

[0005] 例えば、東大の酒井らは、高酸素透過性のポリジメチルシロキサン（PDMS）を培養容器底面に用いて、酸素消費速度の大きい肝細胞の培養を行っている。その結果、市販のポリスチレン製プレートにおいてみられる酸素欠乏状態（嫌気的な環境）が解消され、肝細胞の高度な自己組織化現象が観察されたことを報告している（非特許文献3）。

[0006] 高酸素透過性の材料として、前述のPDMSの他にポリブタジエン（特許文献1）などのゴム材料が検討されている。しかし、ゴム材料から構成されるガス透過性フィルムは、強度が弱くて破けやすいことに加え、培地を入れた際に撓みを生じやすく、形状が不安定である。培養容器に撓みが生じると、容器の変形や、変形に伴う衝撃によって、培養容器内壁に付着していた細胞が剥離する、撓んだ場所に培養中の細胞が集まるなど、効率的に細胞を培養できない。また、ゴム材料は一般に、薬剤物質の吸着や吸収が起こりやすいため、創薬スクリーニング用途や診断用途での使用が限定される。

[0007] 酸素透過性の観点から、非極性のポリエチレン樹脂やポリプロピレン樹脂等を培養容器に適用する検討がなされているが、十分な強度を保つために膜厚を調整すると、酸素透過性が不充分になってしまう点や、不透明であるため顕微鏡で観察しにくい等の問題があり、袋状の培養容器等、一部の培養容器にしか使用されていない。フィルムを薄く保ち、破れや撓みを防止するために、培養容器の底面に支持層を設ける技術も知られるが（特許文献5）、細胞を観察する際に支持層が邪魔になるという問題がある。

[0008] 一方、優れた高酸素透過性の樹脂材料として、ポリ4-メチルー1-ペンテン樹脂が挙げられる。特許文献1～4には、ポリ4-メチルー1-ペンテン樹脂を用いたフィルムでの培養容器の技術が開示されている。フィルムのヒートシール性や柔軟性を高める工夫により、角状、袋状等の植物の生育や

浮遊性細胞の培養容器には好適に用いられるものの、静置培養用に適用した場合、培養底面の撓みが発生するため、培養容器として適さない。また、ポリ４－メチルー１－ペンテン樹脂は、そのままでは培養表面の疎水性が高く、培養基材に使うと細胞が付着できずに剥がれて死滅するなどの問題がある。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：実開平１－１１２６９７号公報
特許文献2：特開平８－１４９９７３号公報
特許文献3：特開平１１－１３７２４１号公報
特許文献4：特開２００１－１９０２６７号公報
特許文献5：特開２０１６－０７７１６４号公報

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Stevens, K. M., Oxygen requirements for liver cells in vitro., Nature, 206, 199 (1965)
非特許文献2：Xiao W, Shinohara M, Komori K, Sakai Y, Matsui H, Osada T, A (2014): The importance of physiological oxygen concentrations in the sandwich cultures of rat hepatocytes on gas-permeable membranes, Biotechnol. Prog., 30(6), 1401-1410
非特許文献3：酒井康行、“肝培養における酸素供給の改善”、[online]、肝細胞研究会、[平成31年4月9日検索]、インターネット<<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu28.html>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明の発明者らは、in vitroにて、細胞、組織、または器官（以下、細胞等という）の培養を、in vivoにより近い状態で行うには、優れた酸素供給能を有し、たわみ等の変形の少ない培養材を開発すること

が重要であると考えた。すなわち、インキュベーターによる酸素濃度コントロールのみに頼らずとも、厳密に酸素供給環境がコントロールされ、形状も安定している培養容器が必要であると考えた。そこで、形状安定性に優れ、とりわけ酸素の供給が必要とされる、細胞、組織、または器官の培養に適し、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材および培養容器を提供することを本発明の課題とした。また、付着性の細胞、組織、または器官の培養には、形状安定性、酸素供給性に加え、細胞等の接着性が保持できることが重要である。そこで、付着性の細胞、組織、または器官の培養に適した培養器具を提供することを本発明の第二の課題とした。

課題を解決するための手段

[0012] 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材は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〕～〔14〕である。

〔1〕4-メチルー1-ペンテン重合体(X)を含む、細胞、組織、または器官の培養材であって、培養面の水接触角が $50^{\circ} \sim 100^{\circ}$ であり、かつ下記試験方法(A)による垂れ下がり距離が $0 \sim 5 \text{ mm}$ であり、温度 23°C 、湿度 0% の時の酸素透過度が $4500 \sim 90000 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ である培養材。試験方法(A)：前記培養材と同一の材料であり、かつ前記培養材の培養面と同一の厚さであり、縦×横が $100 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ の平板状の試験片を作成する。前記試験片を、試験片の縦寸法に対して 50 mm が、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する。固定から3分後、試験台からはみ出した前記試験片の先端が前記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する。(但し、前記固定から測定は室温で行う。)

〔2〕前記4-メチルー1-ペンテン重合体(X)が、4-メチルー1-ペンテン単独重合体(x1)並びに、4-メチルー1-ペンテンと、エチレンおよび炭素数 $3 \sim 20$ の α -オレフィン(4-メチルー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(x2)から選択

される少なくとも1種の重合体である、〔1〕に記載の培養材。

〔3〕下記試験方法(B)を、播種されるラット初代培養肝細胞の細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ で行った際に、前記細胞密度の範囲の少なくとも一点において、1時間後の培養液中の溶存酸素濃度が、培養液中の飽和酸素濃度の2～20%である、〔1〕または〔2〕に記載の培養材。試験方法(B)：ポリエチレンで構成される円筒部と、前記培養材と同一の材料であり、前記培養材の培養面と同一の厚さで構成された平板状の底面部とからなる、培養面積が 2 cm^2 である、コラーゲンコートされた培養容器に、ラット初代培養肝細胞をラット初代肝細胞用培養液0.5 mLで播種し、温度37℃、二酸化炭素濃度5.0%、酸素濃度20%下で培養し、播種24時間後に培養容器内の培養液を除去した後、新たに培養液を0.5 mL添加し、培養容器底面から80 μmの高さで酸素濃度を1時間測定する。

〔4〕前記試験方法(B)を、播種されるラット初代培養肝細胞の細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ で行った際に、前記細胞密度の範囲の少なくとも一点において、酸素消費速度が $40 \sim 150 \text{ pmol/s/} 10^5 \text{ cells}$ である、〔3〕に記載の培養材。

〔5〕フィルム、シート、または培養容器である、〔1〕～〔4〕にいずれかに記載の培養材。

〔6〕培養容器が、シャーレ、フラスコ、インサート、プレート、ボトルまたはバッグである、〔5〕に記載の培養材。

〔7〕培養面に、微細加工がなされた〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の培養材。

〔8〕〔7〕に記載の培養材を含むマイクロ流路デバイス。

〔9〕少なくとも培養面が、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の培養材で形成された、培養容器。

〔10〕少なくとも一つのウェルを有する、〔9〕に記載の培養容器。

〔11〕〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の培養材、または〔9〕若し

くは〔10〕に記載の培養容器から構成される、培養器具。

〔12〕培養面に、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た、〔11〕に記載の培養器具。

〔13〕〔11〕または〔12〕に記載の培養器具内で細胞、組織、または器官をインキュベートする工程を有する、細胞、組織、または器官の培養方法。

〔14〕細胞、組織、または器官が、肝細胞である、〔13〕に記載の、細胞、組織、または器官の培養方法。

発明の効果

[0013] 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材および培養容器を提供することができる。また、付着性の細胞、組織、または器官の培養に適した細胞付着性を保持した培養器具を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1の細胞を位相差顕微鏡で観察した写真である。(上図：1日後、下図：7日後を示す。)

[図2]比較例4の細胞を位相差顕微鏡で観察した写真である。(上図：1日後、下図：7日後を示す。)

[図3]比較例5の細胞を位相差顕微鏡で観察した写真である。(上図：1日後、下図：7日後を示す。)

[図4]実施例8の蛍光顕微鏡で観察した培養材の写真である。(左図：DAPIフィルタ、中図：GFPフィルタ、右図：Texas Redフィルタ)

[図5]比較例6の蛍光顕微鏡で観察した培養材の写真である。(左図：DAPIフィルタ、中図：GFPフィルタ、右図：Texas Redフィルタ)

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、大きく分けて四つの態様がある。

本発明の第一の態様である培養材は、4-メチルー1-ペンテン重合体（

X)を含む、細胞、組織、または器官の培養材であって、培養面の水接触角が $50^{\circ} \sim 100^{\circ}$ であり、かつ下記試験方法(A)による垂れ下がり距離が $0 \sim 5 \text{ mm}$ であり、温度 23°C 、湿度 0% の時の酸素透過度が $4500 \sim 90000 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ である培養材。試験方法(A)：前記培養材と同一の材料であり、かつ培養材の培養面と同一の厚さであり、縦×横が $100 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ の平板状の試験片を作成する。前記試験片を、試験片の縦寸法に対して 50 mm が、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する。固定から3分後、試験台からはみ出した前記試験片の先端が前記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する。但し、前記固定から測定は室温で行う。

[0016] 本発明の第二の態様である培養容器は、少なくとも培養面が、第一の態様である培養材で形成されている。

本発明の第三の態様である培養器具は、第一の態様である培養材、または第二の態様である培養容器から構成される培養器具である。

[0017] 本発明の第四の態様である細胞、組織、または器官の培養方法は、第三の態様である培養器具内で細胞、組織または器官をインキュベートする工程を有する培養方法である。

以下、本発明の具体的な実施形態について詳細に説明するが、本発明は、以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。

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、「 $1 \sim 5\%$ 」との記載は、 1% 以上 5% 以下を意味する。

[0018] 〈4-メチルー1-ペンテン重合体(X)〉

本発明において、「重合体」という語は単独重合体および共重合体を包含する意味で用いる。同様に本発明において、「重合」という語は単独重合および共重合を包含する意味で用いる。したがって、「4-メチルー1-ペンテン重合体(X)」とは、4-メチルー1-ペンテンの単独重合体および、

4-メチル-1-ペンテンと、他のモノマーとの共重合体を包含する概念である。なお、4-メチル-1-ペンテンの単独重合体を、以下4-メチル-1-ペンテン単独重合体（×1）とも記す。

[0019] 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（×2）が、基材の強度が高く（破れにくく割れにくい）撓みも少ないため好ましい。

[0020] 4-メチル-1-ペンテン重合体（X）としては、4-メチル-1-ペンテン単独重合体（×1）並びに、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（×2）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（×2）であることがより好ましい。

[0021] 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、適度な酸素透過性と、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、重合体の成膜加工性がより良好になり、その結果、成形時にロールや金型からの

離型の際にクラックや端部の割れによる外観不良が生じにくくなる傾向にある。そのため、培養材の不良品発生率が低くなる。

[0022] 前記オレフィンは、1種のみ含まれていてもよく、また、2種以上を組み合わせてもよい。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のが特に好ましい。

[0023] 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、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、前記構成単位の含有量は、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の範囲内にあると、加工性に優れ均質な培養面が得られ、またフィルムの韌性と強度のバランスが良いため、撓みも少なくなる。

[0024] 前記4-メチル-1-ペンテン重合体（X）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。

[0025] 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2

013-169685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。

[0026] 前記4-メチル-1-ペンテン重合体(X)は、1種単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

本発明の培養材は、4-メチル-1-ペンテン重合体(X)を含んでいればよく、4-メチル-1-ペンテン重合体(X)のみから形成されていてもよく、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ていてもよい。

[0027] 4-メチル-1-ペンテン系重合体(X)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又は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-ペンテン系重合体であれば、好ましく使用できる。4-メチル-1-ペンテン系重合体(X)は1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用することもできる。

[0028] 本発明の培養材が、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、前記組成物は、4-メチル-1-ペンテン重合体(X)以外の成分を含んでいてもよく、例えば、後述の(添加剤)の項に記載した成分を含んでいてもよい。なお、培養材が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90～100質量%であり、より好ましくは95～100質量%であり、特に好ましくは99～100質量%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、酸素透過性の低下のみならず、透明性の低下や強度の低下を招く。本範囲に規定される、4-メチル-1-ペンテン重合体(X)の組成物比率は、培養材の培養面におけるものであり、培養容器の枠部分や蓋部分などの直接細胞が接触しない部分は前記範囲と異なってもよい。

[0029] 4-メチル-1-ペンテン重合体(X)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（ M_w ）は、好ましくは10000～2000000、より好ましくは20000～1000000、さらに好ましくは30000～500000である。ここで、GPC測定の際の試料濃度は、例えば1.0～5.0 mg/mlとすることができる。また、4-メチル-1-ペンテン重合体（X）の、分子量分布（ M_w/M_n ）は、好ましくは1.0～3.0、より好ましくは1.1～2.5、さらに好ましくは1.1～2.0である。GPCで用いられる溶剤は、4-メチル-1-ペンテン重合体（X）を溶解するものであれば特に限定されないが、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。

[0030] 重量平均分子量（ M_w ）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（X）の成型法において、熔融成型で作製したフィルムは、ゲル等の不具合の発生を抑制でき、表面が均一な製膜の実現が可能となる。また、溶液キャスト法で作製する際は溶剤への溶解性が良好で、フィルムのゲル等の不具合を抑制でき、表面均一な製膜の実現が可能となる。

[0031] また、重量平均分子量（ M_w ）を上記下限以上とすることにより、本発明の容器製造、および細胞培養において、培養材である4-メチル-1-ペンテン重合体（X）からなるフィルムは十分な強度を有する。さらに、分子量分布を上記の範囲内とすることで、作製したフィルム表面のベタツキを抑えることが可能となり、かつ、十分な靱性を有し、フィルム成型時の曲げや裁断時のクラックの発生などを抑制することが可能となる。

[0032] 前記4-メチル-1-ペンテン重合体（X）重量平均分子量（ M_w ）および分子量分布（ M_w/M_n ）は、4-メチル-1-ペンテン重合体（X）として、2種以上の重合体を用いた場合には、各重合体それぞれの、 M_w および M_w/M_n が、上記範囲にあればよい。

[0033] 〈4-メチル-1-ペンテン重合体（X）の製造方法〉

前記4-メチル-1-ペンテン重合体(X)を製造する方法は、4-メチル-1-ペンテン、オレフィン、その他の構成単位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、気層法、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。さらに、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。製造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、国際公開公報2006/054613に記載される固体状チタン触媒成分(1)を用いることが好ましい。

[0034] 〈添加剤〉

本発明の培養材が、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、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く、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。

[0035] 4-メチル-1-ペンテン重合体(X)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ないため耐水性、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(X)を含む培養容器等の培養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(X)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

(X)を含む培養容器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、薬剤を吸収しにくいため、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(X)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素材との熱接着も容易である。また、熱成形が可能であるため、任意の形状の容器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。

[0036] 4-メチルペンテン-1重合体(X)は以上のような優れた特性を有しているので、本発明の培養材からなる培養容器や、本発明の培養材で培養面が形成された細胞容器は、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、培養容器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(X)のフィルム製造方法〉

本発明の培養材の製造方法は、特に制限されず、製造に用いる機器も制限されない。4-メチル-1-ペンテン重合体(X)および必要に応じて4-メチル-1-ペンテン重合体(X)以外の成分を含むフィルムを形成し、そのフィルムを成形して所望の形状を有する培養材にしてもよい。射出成形、ブロー成形等の方法により、所望の形状を有する培養材を直接成形してもよい。

[0038] フィルム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。製造は通常加温で行う。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。

[0039] また、本発明のフィルムは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、樹脂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に加工する。

[0040] 何れの場合であっても、量産性の観点より、4-メチル-1-ペンテン重合体(X)および必要に応じて4-メチル-1-ペンテン重合体(X)以外の成分を含むフィルムを形成し、そのフィルムを成形して所望の形状を有する培養材にするのが好ましい。

[0041] <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。

本発明における細胞は、特に限定されず、動物細胞の場合には浮遊性細胞であってもよく、接着性細胞であってもよく、例えば、線維芽細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、神経細胞、角膜上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、歯根膜幹細胞、筋繊維芽細胞、心筋細胞、肝細胞、脾内分泌細胞、皮膚角化細胞、皮膚繊維芽細胞、皮下脂肪由来前駆細胞、腎臓細胞、底部毛根鞘細胞、鼻粘膜上皮細胞、血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、不死化細胞、がん細胞、角化細胞、胚性幹細胞(ES細胞)、EBV形質転換B細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)などが例示される。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。皮膚、腎臓、肝臓、脳、神経組織、心筋組織、骨格筋組織、がん幹細胞などは酸素要求性が高く、それらを構成する細胞もまた、酸素要求性の高い細胞であることから、本発明における細胞は皮膚、腎臓、肝臓、脳、神経組織、心筋組織、または骨格筋組織を構成する細胞、もしくはがん幹細胞であることが好ましい。細胞、組織、または器官としては、肝細胞、腎細胞、心筋細胞、神経細胞、またはがん幹細胞であることが好ましく、肝細胞であることがより好ましい。

[0042] 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。酸素要求性が高いことから、前記組織は、肝小葉、心筋組織、神経組織、または骨格筋組織であることが好ましく、肝小葉がさらに好ましい。

[0043] 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。酸素要求性が高いことから、前記器官は、皮膚、腎臓、肝臓、脳であることが好ましく、肝臓がさらに好ましい。

[0044] 培養器具内での培養に適することから、細胞等は細胞であることが好ましい。本発明において、細胞等は、好気性であると好ましく、嫌気性のものを含まないことがより好ましい。細胞等の由来は、特に限定されず、動物、植物、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。本発明における培養器具は、酸素透過性が好適であり、細胞接着性も保持しているので、細胞等は付着性のものであることが好ましく、付着性細胞であるとさらに好ましい。

[0045] <肝細胞>

本発明における肝細胞は、肝実質細胞 (H e p a t o c y t e) を始め、肝臓中の細胞であればいかなる細胞であってもよく、具体的には血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、脂肪細胞、血球細胞、肝単核細胞、肝マクロファージ (クッパー細胞を含む)、肝星状細胞、肝内胆管上皮細胞、胚嚢線維芽細胞等を含む。前記肝細胞は、例えば20%以上、30%以上、40%以上または50%以上の肝実質細胞が含まれる細胞集団である。

[0046] 前記肝細胞は、初代培養細胞でも、株化継代細胞でもよいが、肝細胞としては初代培養細胞を用いるのが好ましい。株化継代細胞の種類は特に制限されないが、例えば、SSP-25, RBE, HepG2, TGBC50TK

B, HuH-6, HuH-7, ETK-1, Het-1A, PLC/PRF/5, Hep3B, SK-HEP-1, C3A, THLE-2, THLE-3, HepG2/2.2.1, SNU-398, SNU-449, SNU-182, SNU-475, SNU-387, SNU-423, FL62891, DMS153等が挙げられる。

[0047] 前記肝細胞の由来は、いずれの哺乳動物であってもよいが、特に、ヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ブタ、ミニブタ、ウサギ、ハムスター、ラット、又はマウスの細胞が好ましく、ヒト、ラット、マウス、又はウシの細胞がより好ましい。

[0048] 前記肝細胞は、肝細胞以外の他の細胞種が含まれる細胞集団であってもよく、例えば20%以上、30%以上、40%以上または50%以上の肝細胞が含まれる細胞集団である。

[0049] 〈培養〉

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。培養に用いる培地等は制限されず、細胞等の特性に応じた培地を選択すればよい。

[0050] 〈細胞の培養〉

細胞の培養は、2次元（細胞が自発的に重層化する場合を含む）培養でも、3次元培養でもよい。本発明の培養材は、酸素透過度が培養に好適であるため、2次元培養だけでなく、立体的に細胞が積み重なっている3次元培養においても、細胞に十分に酸素を供給することができ、細胞が増殖、分化し、さらに細胞の高度な自己組織化現象も起きやすい。

[0051] 3次元培養とは、意図的に細胞を立体的に培養することであり、足場材の中で細胞を培養するScaffold型と、塊（スフェロイド）として浮遊状態で細胞を培養するScaffold-free型のどちらであってもよいが、Scaffold型が好ましい。Scaffold型の場合、細胞を効率よく培養できることから足場材としては、Matrigel™、コラーゲ

ンゲル、ラミニン、アルギン酸ヒドロゲル、ビトリゲルが好ましい。

培養に用いる培地等は制限されないが、細胞を効率的に培養するため、細胞は、血清（例えば、ウシ胎児血清）の存在下で培養するのが好ましい。

[0052] 本発明の培養材を培養に用いる際、言い換えると、後述の本発明の培養器具を用いて、本発明の培養方法を行う際の、細胞培養密度としては、好ましくは $0.1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 10.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であり、より好ましくは $0.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 5.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であり、さらに好ましくは $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であり、特に好ましくは $1.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 3.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ である。

[0053] 上記の範囲であると、細胞培養密度が上記範囲外の場合と比べて、薬物代謝活性がより亢進されるため好ましい。

本発明の培養材は、酸素透過度が高いため、細胞培養密度が高い場合であっても、好適に培養することができる。一般に、生体の細胞密度は、 $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 程度だといわれているが、本発明の培養材は、生体と同程度の細胞培養密度で、培養を行うことが可能であるため、*in vitro* にて、*in vivo* により近い状態で培養を行うことができるため好ましい。

[0054] 〈培養材〉

本発明の培養材は、4-メチルー1-ペンテン重合体（X）を含む、細胞、組織、または器官の培養材であって、培養面の水接触角が $50^\circ \sim 100^\circ$ であり、かつ下記試験方法（A）による垂れ下がり距離が $0 \sim 5 \text{ mm}$ であり、温度 23°C 、湿度 0% の時の酸素透過度が $4500 \sim 90000 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ である。

[0055] 培養材とは、細胞を培養するために用いる材料を指し、培養容器そのものまたは培養容器の一部を構成する。なお、本発明の培養材が培養容器の一部を構成する場合には、少なくとも培養面が、本発明の培養材により構成される。本発明の培養材は、例えば、フィルム、シート、または培養容器である。

。前記培養材が、フィルムやシートである場合には、該フィルムやシートを、培養面を含む培養容器の一部として用いることができる。培養容器としては、公知の各種の培養容器を用いることができ、形状や大きさは特に制限されないが、例えば、シャーレ（ディッシュとも称す）、フラスコ、インサート、プレート、ボトル、バッグ等が挙げられる。前記培養容器は通常、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。前記培養容器は、培地を保持あるいは貯留するため、底面を培養面とする容器であることが好ましい。一般にウェルのようにくぼみ形状を底面に有する培養容器は、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、形状は安定しており、細胞等への酸素供給も充分である。

[0056] 本発明の培養材は、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。

なお、本発明における培養面とは、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。

[0057] 本発明の培養材の温度 23°C 、湿度 0% の時の酸素透過度は、 $4500 \sim 90000 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ であり、好ましくは $4500 \sim 67500 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ であり、より好ましくは $4500 \sim 47000 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ であり、さらに好ましくは $4500 \sim 45000 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ である。

[0058] 培養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、細胞は十分に増殖しない。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、細胞は密着性良く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。

[0059] 本発明の培養材を容器底面に配置してシャーレ、フラスコ、インサートまたはプレート等の培養容器を作製する際の培養材の厚みは特に限定されないが、好ましくは $20\mu\text{m}$ ～ $400\mu\text{m}$ 、より好ましくは $20\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $20\mu\text{m}$ ～ $200\mu\text{m}$ の厚みである。培養容器の形態に応じて適時選ばれるが、上記上下限の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、培養容器底面が撓む（垂れ下がり距離として規定）ことなく好適な培養容器を作製することができる。

[0060] 培養容器の一例として、多穴プレートについて説明する。通常、穴（ウェルとも称す）の数が1、6、12、24、48、96、128、384、および1536個の細胞培養ウェルプレートが市販されている。これらの容器は容器全体（短辺、長辺の長さ）のサイズは等しく、穴の径によりウェル数が規定されている。つまり、多穴の容器では穴径は小さく、穴数が少ない容器は穴径が大きい。径の大小はそのまま培養材を容器底面に配置し、培地を入れた状態での培地の重量に起因する応力によって培養材の撓みが左右され、通常、多穴（穴径が小さい）の容器では比較的厚みが小さい培養材を用いてよく、穴数が少ない（穴径が大きい）容器では比較的厚みが大きい培養材を用いる必要がある。

[0061] 本発明の培養材の厚さは、特に制限されない。また、本発明の培養材の培養面の厚さは、特に制限されないが、 $20\sim 500\mu\text{m}$ が好ましく、 $25\sim 500\mu\text{m}$ がより好ましく、 $50\sim 200\mu\text{m}$ が特に好ましい。

[0062] 培養材の厚さが前記範囲内であると、強度に優れるため好ましい。特に培養面の厚さが前記範囲内にあると、ウェル数が少なく穴径が大きい容器に用いた際にも撓みが生じにくい。また、培養材にコロナ処理等を施す際に破けにくい。また、培養面の厚さが前記範囲内にあると、酸素透過度は酸素要求性の細胞等を培養するために特に適した範囲になる。

[0063] 本発明の培養材は、スフェロイドの作成や細胞の足場機能向上のため、表

面に微細加工を行ってもよい。4-メチルー1-ペンテン重合体(X)は熱可塑性樹脂の1種であることから、微細加工を施す方法として、切削加工、光リソグラフィ法、電子線直接描画法、粒子線ビーム加工法、走査プローブ加工法等、微粒子の自己組織化、またはこれらの手法によって形成されたマスクからのナノインプリント法、キャスト法、射出成形法に代表される成形加工法、めっき法等から適切に選択することができる。微細加工の形状は特に限定されるものではないが、溝の部分から山の部分までの高さが20nmから500 μ mであると好ましい。また、十分な強度を保つために、表面に微細加工がなされていない場合に比べ最薄部の膜厚を20 μ m迄薄くすることが可能である。

[0064] 微細加工を行った培養材は、マイクロ流路デバイス(マイクロ流路チップとも言う)として用いてもよい。マイクロ流路デバイスは、培養材表面に微細加工を施して微小流路や反応容器を作成し、バイオ研究や化学工学へ応用するためのデバイスの総称である。例えば、microTAS(micro Total Analysis Systems)やLab on a Chipなどと呼ばれる装置が挙げられ、次世代の培養装置としての適用が進められている。本発明の一態様として、本発明の培養材を含むマイクロ流路デバイスが挙げられる。

[0065] 本発明の培養材は、細胞を好適に培養材表面に密着させ、また、目的に応じて、細胞を培養する際の足場材であるコラーゲン等を培養材表面に積載し、密着させるために培養材表面を親水化処理することが好ましい。培養材表面の表面自由エネルギーは後述する水接触角で定義することができ、培養材の培養面の水接触角は、好ましくは50°~100°であり、より好ましくは55°~100°、さらに好ましくは60°~100°である。また、水接触角の好ましい別の態様としては、84°以下が挙げられ、50°~84°がより好ましい。

[0066] 上記範囲に本発明の培養材の培養面(表面)の水接触角を調整することで、例えば、肝細胞が培養材との密着性が良く、培養材表面で均一に増殖でき

る。また、コラーゲンを積載する際のコラーゲン処理後の形態で、培養材表面に均一にコラーゲンを積載でき、生理食塩水による洗浄や、細胞培養の環境においてコラーゲンは剥がれず安定な初期状態を保って細胞培養に用いることができる。

[0067] 本発明の培養材表面の親水化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、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等の特定の官能基による処理、酸化剤等による表面粗化等が挙げられる。中でも前記培養材表面の濡れ性を上げ、効率的に細胞を培養できるようにするため、紫外線処理、コロナ処理、プラズマ処理、またはオゾン処理等の表面親水化処理を行うことが好ましい。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。プラズマ処理を行う場合には、同伴させるガスとして、窒素、水素、ヘリウム、酸素、アルゴンなどが用いられ、好ましくは、窒素、ヘリウム、アルゴンから選択される少なくとも一種のガスが選ばれる。

本発明の培養材は、細胞培養材であることが好ましく、肝細胞培養材であるとより好ましい。

[0068] 〈試験方法（A）による垂れ下がり距離の測定〉

本発明の培養材は、試験方法（A）による垂れ下がり距離が0～5 mmであり、好ましくは0～3 mmである。試験方法（A）は以下の通りである。試験方法（A）：前記培養材と同一の材料であり、かつ培養材の培養面と同一の厚さであり、縦×横が100 mm×10 mmの平板状の試験片を作成する。

[0069] 前記試験片を、試験片の縦寸法に対して50 mmが、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する。

固定から3分後、試験台からはみ出した前記試験片の先端が前記試験台の

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する。但し、前記固定から測定は室温で行う。なお、本明細書において室温とは20～25℃を意味する。

[0070] この垂れ下がった距離（mm）を、垂れ下がり距離（mm）と呼称し、垂れ下がり距離は、曲げ剛性の指標となる。すなわち、垂れ下がり距離が小さいほど、本発明の培養材の培養面は、曲げ剛性に優れる。

[0071] 試験片の作成方法は特に制限されず、例えば培養材と同一の材料に対して、押出成形等の熱成形を行い、平板状の試験片を作成し、そのシートから前記寸法の試験片を切り出してもよいし、試験片を直接成形してもよい。また、培養材が、フィルムやシートである場合には、そこから試験片を切り出してもよい。また、試験片を作成する際の熱成形は、培養材を製造する際と、同一の温度条件（温度、時間）で成形されることが好ましい。試験片は、培養材に微細加工、表面改質処理を行っていてもよいし、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。

[0072] 垂れ下がり距離が、5 mmより大きいと形状安定性が不充分である。具体的には、培養材に撓みが生じ、変形や、変形に伴う衝撃によって、培養容器内壁に付着していた細胞が剥離するだけでなく、撓んだ場所に培養中の細胞が集まってしまい、効率的に細胞を培養できない。

[0073] 〈酸素透過度〉

本発明の培養材は、温度23℃、湿度0%の時の酸素透過度が $4500 \sim 90000 \text{ cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ である。培養材あるいは培養材と同一の材料を用いて作成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%での酸素透過度 $[\text{cm}^3 \times \text{mm} / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})]$ を測定し、酸素透過度を培養材の厚み（ μm ）で除した値を酸素透過係数とする。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50 μm のフィルムから90×90 mmの試験片を切り出して作成し、測定部径

は70mm（透過面積は38.46cm²）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5.0cm²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材また培養材と同一の材料を用いて作成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。

[0074] 〈試験方法（B）による培養液中の溶存酸素濃度〉

本発明の培養材は、培養液中の飽和酸素濃度を100%とした場合に、下記試験方法（B）を、播種されるラット初代培養肝細胞の細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ で行った際に、前記細胞密度の範囲の少なくとも一点において、1時間後の培養液中の溶存酸素濃度が、培養液中の飽和酸素濃度の2～20%であると好ましく、5～18%であるとより好ましく、5～16%であるとさらに好ましく、9～16%であることが最も好ましい。培養液中の飽和酸素濃度の測定方法は特に制限されず、例えば、蛍光式の酸素センサー（FireSting酸素モニター、株式会社ビー・エー・エス社製）を用いる測定方法が挙げられる。試験方法（B）は、以下の通りである。

試験方法（B）：ポリエチレンで構成される円筒部と、前記培養材と同一の材料であり、培養材の培養面と同一の厚さで構成された平板状の底面部とからなる、培養面積が2cm²である、コラーゲンコートされた培養容器にラット初代培養肝細胞をラット初代肝細胞用培養液0.5mLで播種し、温度37℃、二酸化炭素濃度5.0%、酸素濃度20%下で培養し、播種24時間後に、培養容器内の培養液を除去した後、新たに培養液を0.5mL添加し、培養容器底面から80μmの高さで酸素濃度を1時間測定する。溶存酸素濃度が前記範囲内にあると、酸素環境は肝細胞に最適な状態であるため好ましい。

[0075] なお、酸素濃度の測定は、FireSting酸素モニター（株式会社ビー・エー・エス社製）等を用いて行うことができ、FireSting酸素

モニター（株式会社ビー・エー・エス社製）を用いる場合には、培養容器底面から $80\mu\text{m}$ の高さにセンサーを設置して測定する。

[0076] なお、試験方法（B）を行う際には、播種されるラット初代培養肝細胞の細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ で行えばよく、少なくともその範囲の一点において、溶存酸素濃度が前記範囲となればよい。すなわち、細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の全範囲において、溶存酸素濃度が前記範囲となることまでは要求されない。

[0077] 試験方法（B）に用いるラット初代肝細胞用培養液とは、特に限定されないが、例えば、10%ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum、FBS、富士フイルム和光純薬）、 30mg/mL レープロリン（培養用、富士フイルム和光純薬）、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ デキサメタゾン（生化学用、富士フイルム和光純薬）、 $50\mu\text{g/mL}$ ハイドロコルチゾン（培養用、富士フイルム和光純薬）、 20ng/mL 上皮成長因子（Epidermal growth factor、EGF、細胞生物学用、富士フイルム和光純薬）、 $5.0 \times 10^{-7}\text{M}$ インスリン（SIGMA）、 5000units/mL ペニシリン、 $5000\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン（培養用、富士フイルム和光純薬）、D-MEM培地（高グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム含有、培養用、富士フイルム和光純薬）を含む溶液である。

[0078] 〈酸素消費速度〉

酸素消費速度は、Fickの法則を用いて、外気の酸素濃度（20%）と培養液中の溶存酸素濃度の差と、フィルムの酸素透過度の積を細胞密度で除し、細胞当たりの消費量として算出することができる。培地中の酸素を細胞が消費した分、外気から酸素が供給されるという考えに基づく。

[0079] 適切な酸素消費速度は各臓器およびそれらを構成する細胞によって異なり、例えば肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胆嚢、食道、胃、皮膚、脳などで異なる。また、動物種によっても異なり、例えばヒト、ウシ、イヌ、ネ

コ、ブタ、ミニブタ、ウサギ、ハムスター、ラット、又はマウスによっても異なる。さらに、初代培養細胞および株化継代細胞で異なる。

- [0080] ラット初代肝細胞の場合、細胞培養容器に細胞を $1.0 \times 10^5 \text{ cells} / \text{cm}^2$ で播種したときの酸素消費速度は非特許文献2および3より、細胞が培養容器に付着した直後で $90 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ 、その後は $40 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ とされ、細胞の容器への付着や凝集の程度等により、その数値は変動し得る。
- [0081] 本発明の培養材を用いることにより、細胞等に適した酸素環境で培養することが可能であり、細胞密度が例えば $1.0 \times 10^5 \text{ cells} / \text{cm}^2$ の場合の酸素消費速度は、好ましくは $40 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ 以上であり、より好ましくは $40 \sim 150 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ である。なお、酸素消費速度を評価する際の培養は、前記試験方法（B）に従って行われることが好ましい。すなわち、前記試験方法（B）を、播種されるラット初代培養肝細胞の細胞密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells} / \text{cm}^2 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ cells} / \text{cm}^2$ で行った際に、前記細胞密度の範囲の少なくとも一点において、酸素消費速度が $40 \sim 150 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ であることが好ましい。
- [0082] 〈培養容器〉
- 本発明の第二の態様の培養容器は、少なくとも培養面が、前記培養材で形成された、培養容器である。
- [0083] 本発明の培養容器は、前記培養材そのものであってもよく、前記培養材で一部が構成されたものであってもよい。前記培養材で一部が構成される場合には、少なくとも、細胞やコラーゲン等の足場材が直接接する面が前記培養材により構成される。
- [0084] 本発明の培養容器は、形状安定性に優れ、細胞等への酸素供給も充分である。培養容器としては、形状や大きさは特に制限されないが、例えば、シャーレ、フラスコ、インサート、プレート、ボトル、バッグ等が挙げられる。培養容器は、少なくとも一つのウェルを有することが好ましい。すなわち、

培養容器はウェルを有するプレートであることが好ましく、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るとさらに好ましい。

[0085] 本発明の培養容器は、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。

培養容器が、シャーレ、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、培養容器は、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）が本発明の培養材で構成されていると、前記培養材を介して培地中に酸素を効率的に供給できることから、培地中にある細胞等を効率的に増殖させることができる。さらに、底面の形状安定性が優れていることから、細胞等を均一に培養することができる。また、透明性に優れているため、細胞等の観察もしやすい。

[0086] 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作業する場合には、一般の射出成形やプレス成型で一度に加工してもよいし、フィルムまたはシートを作成しておき、真空成型や圧空成形などで2次加工を行い作成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、平底であることが好ましく、3次元培養する際には丸底（U底）または円錐底（V底）であると好ましい。

[0087] 培養容器の前記培養材以外の部分は、前記培養材以外の素材で構成してもよい。前記培養材以外の素材は特に制限されず、公知の素材を用いることができる。例えば、ポリエチレン（PE）、ポリスチレン（PS）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ガラス等が挙げられる。

[0088] 本発明の培養容器は、コンタミネーション防止のために、消毒・滅菌処理を施してもよい。消毒・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、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、十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、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・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もよい。

[0089] 本発明の培養容器の製造方法は、特に制限されず、培養材が培養容器そのものである場合には、前述の方法で製造することができる。培養容器の一部が前記培養材で形成される場合には、培養材と、その他の部材とを、適宜接合することにより培養容器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。

本発明の培養容器は、細胞培養容器であることが好ましく、肝細胞培養容器であるとより好ましい。

[0090] 〈培養器具〉

本発明の第三の態様である培養器具は、第一の態様である培養材または第二の態様である培養容器から構成される。本発明の培養器具は、第一の態様である培養材または第二の態様である培養容器そのものでもよいし、第一の態様である培養材または第二の態様である培養容器の培養面上に天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料がコーティングされた培養器具であってもよい。

[0091] 前記コーティングされた培養器具は、例えば、培養材に天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料を公知の方法によりコーティングすることにより得ることができる。また、前記培養器具は、例えば、培養容器を天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料で公知の方法によりコーティングすることにより得てもよいし、既にコーティングされた前記培養材を培養容器の少なくとも培養面に用いることにより得てもよい。

[0092] 前記コーティングされた培養器具は、細胞等の接着性、増殖性に優れる。これは、培養面にコーティングされている天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料が、細胞等の足場となるためと考えられる。したがって、付着性の細胞等を培養する際には、通常、培養材、または培養容器に天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料をコーティングし、培養器具として用いる。

[0093] 前記天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料は特に制限されないが、天然高分子材料として、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン、オステオポンチン、テネイシン、ビトロネクチン、トロンボスボジン、アガロース、エラスチン、ケラチン、キトサン、フィブリン、フィブロイン、糖類、合成高分子材料として、ポリグルコース酸、ポリ乳酸、ポリエチレングリコール、ポリカプロラクトン、合成ペプチド類、合成タンパク質類、合成高分子材料としてポリエチレングリコール、ポリヒドロキシエチルメタクリラート、ポリエリレンイミン、無機材料として、 β -リン酸三カルシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。

[0094] また、前記天然高分子材料、合成高分子材料、または無機材料としては、従来の細胞外マトリックス成分等のハイドロゲルをガラス化した後に再水合して得られるビトリゲルなども挙げられる。例えば、細胞外マトリックス成分の一つであるコラーゲンから作製された高密度のコラーゲン繊維網で構成されるコラーゲンビトリゲルも挙げられる。

[0095] 細胞の接着性や細胞の増殖性を向上させ、細胞の機能をより長期に維持させるために、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ポリリジン等のタンパク質、またはペプチドによるコーティングが好ましく、コラーゲンまたはポリリジンによるコーティング処理がより好ましい。これらのコーティングは、1種単独でもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。

本発明の培養器具は、細胞培養器具であることが好ましく、肝細胞培養器具であるとより好ましい。

[0096] 〈培養方法〉

本発明の第四の態様である細胞、組織、または器官の培養方法は、第三の態様である培養器具内で細胞、組織または器官をインキュベートする工程を有する培養方法である。

前記細胞等の培養方法は、前記培養器具内で細胞等をインキュベートする工程を有すればよく、その他の培養条件は細胞等の特性に応じて適宜選択すればよい。前記細胞等の培養方法は、細胞の培養方法であることが好ましく、肝細胞の培養方法であるとさらに好ましい。

実施例

[0097] 以下、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

なお、実施例におけるポリマー分析値測定方法、垂れ下がり距離の測定方法、水接触角の測定方法、コラーゲンコート溶液の調整方法、細胞種と培養液の調製方法、培地中の溶存酸素濃度の測定方法、酸素消費速度の算出方法、代謝活性値の測定方法、細胞接着性の評価方法、培養した細胞の自家蛍光の観察方法、および薬剤収着性の評価を以下に記載した。

[0098] [重量平均分子量 (Mw) および分子量分布 (Mw/Mn)]

本発明の培養材として用いた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、ポリスチレンスタンダードによって分子量を校正して測定した。

- ・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：Empower 3 (Waters社製)
- ・検出器：示差屈折計
- ・直列連結カラム：TSK gel GMH6-HT (2本)、および、TSK

g e l G M H 6 - H T L (2 本)

- ・ カラム温度 : 1 4 0 ° C
- ・ 流量 : 1 . 0 m l / 分
- ・ 試料濃度 : 1 . 5 m g / m l

[0099] [垂れ下がり距離の測定]

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。

[0100] [水接触角の測定]

培養材の表面親水化処理後の水接触角の測定は、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、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基材表面に滴下し、静滴法により、基材表面に水滴が接触した直後から1分以内の基材と水滴の接触界面の角度を計測する方法で行うことができる。本実施形態においては、上記方法により水滴が接触した直後から1分以内の数値を物性値として取り扱った。

[0101] [コラーゲンコート溶液の調製]

0.1Mの塩酸溶液（容量分析用、富士フイルム和光純薬）を注射用水（日本薬局方、大塚製薬）で100倍希釈し、0.001Mの塩酸溶液を調製してろ過滅菌をした。3mg/mLのコラーゲン溶液（セルマトリックスTypeI-P、ブタ腱由来、新田ゼラチン）を0.001Mの塩酸溶液で2倍希釈し、1.5mg/mLのコラーゲンコート溶液を調製した。

[0102] [細胞種と培養液の調製]

ラット初代凍結肝細胞を含む細胞懸濁液を入れた遠沈管（50mL）に培養液を加えた。培養液は、ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum、FBS、富士フイルム和光純薬）を1.5mL、注射用水（扶桑薬

品工業)で 3.0 g/mL に希釈したレトロリン(培養用、富士フィルム和光純薬)溶液を 0.15 mL 、エタノール(分子生物学用、富士フィルム和光純薬)で $1 \times 10^{-3}\text{ M}$ に希釈したデキサメタゾン(生化学用、富士フィルム和光純薬)溶液を $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、エタノールで 36 mM に希釈したハイドロコルチゾン(培養用、富士フィルム和光純薬)溶液を $21\text{ }\mu\text{L}$ 、注射用水で 1.0 mg/mL に希釈したBSA溶液を用いて、さらに $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈した上皮成長因子(Epidermal growth factor、EGF、細胞生物学用、富士フィルム和光純薬)溶液を $15\text{ }\mu\text{L}$ 、インスリン溶液(10 mg/mL in HEPES、SIGMA)を $8.7\text{ }\mu\text{L}$ 、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(5000 units/mL ペニシリン、 $5000\text{ }\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン含有、培養用、富士フィルム和光純薬)を 0.3 mL 、D-MEM培地(4500 mg/mL D-グルコース、 584 mg/mL L-グルタミン、 15 mg/mL フェノールレッド、 110 mg/mL ビルビン酸ナトリウム、 3700 mg/mL 炭酸水素ナトリウム含有、培養用、富士フィルム和光純薬)を 13 mL 加えて調整した。細胞密度の調整は、ラット初代凍結肝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、特に断りのない限りは $1.0 \times 10^5\text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で、実施例8および比較例6の高密度培養では $4.0 \times 10^5\text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で実施した。

[0103] [酸素透過係数の測定、および酸素透過度の算出]

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°C 、湿度 $0\%\text{ RH}$ の環境下にて酸素透過係数を測定した。測定部径は 70 mm (透過面積は 38.46 cm^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 5.0 cm^2 とした。

測定した酸素透過係数 $[\text{cm}^3 \times \text{mm} / (\text{m}^2 \times 24\text{ h} \times \text{atm})]$ の値をフィルム(培養材)の厚み(μm)で除して、酸素透過度 $[\text{cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24\text{ h} \times \text{atm})]$ を算出した。

[0104] [培地中の溶存酸素濃度の測定]

細胞播種の1日後、培養容器の培養液を除去した後、新たに培養液を0.5 mL添加し、FireSting酸素モニター（株式会社ビー・エー・エス）を用いて培養液中の溶存酸素濃度を測定した。測定は、加湿インキュベーター中で実施した。センサーをジャッキで培養容器底面から80 μ mの高さに設置し、1時間測定した。1時間後の溶存酸素濃度を、培養液中の飽和酸素濃度で除して100をかけた値（%）を表1に示す。培養液中の飽和酸素濃度は蛍光式の酸素センサー（FireSting酸素モニター、株式会社ビー・エー・エス社製）を用いて測定した。

[0105] [酸素消費速度の算出]

外気（加湿インキュベーター中）の酸素濃度（20%）と上記の培養液中の溶存酸素濃度の差と酸素透過度の積を細胞密度で除して、細胞当たりの消費量として算出した。

[0106] [代謝活性値の測定]

細胞播種24時間後の培養容器中の培養液を除去した後、培養液で希釈したLuciferin-CEEを添加して、さらに3時間培養した。培養後の細胞をLuciferin-CEEを含む培養液を同伴して96ウェルプレートに移した後、Luciferin Detection ReagentとReconstitution Bufferの混合液を添加して、室温で遮光して1時間反応させた。1時間後、ルミノメーターで発光量（Relative Light Unit、RLU）を測定した。

[0107] 蛋白量は、培養液で希釈したLuciferin-CEE溶液を除去後、PBS（-）を培地200 μ L添加した後、セルスクレーパーを用いてエッペンチューブに細胞を回収し、遠心した（4℃、22000×g、10分間）。その後、上澄みを除去し、0.1 M水酸化ナトリウム溶液を100 μ L添加した後、Pierce™ BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を使用して蛋白量を測定した。波長450 nmの吸光度をプレートリーダー（SPECTRA

max PLUS 384、Molecular Devices 社製) で測定した。

[0108] ルミノメーターで得られた Luciferin-CEE 溶液の代謝活性量 (pmol/L) を P450-Glo™ CYP1A1 Assay kit (Promega) を使用して測定し、吸光度から得られたタンパク量および Luciferin-CEE 溶液の反応時間で除することにより、代謝活性値 (pmol/min/mg protein) を算出した。結果を表 1 に示す。

[0109] [細胞接着性の評価]

細胞接着性評価は、容器にラット凍結肝細胞の細胞懸濁液を 0.5 mL 播種し、37℃、5%CO₂下でインキュベートし、培養 1 日および 7 日後に顕微鏡観察した。肝細胞が接着し、伸展している状態を AA、肝細胞は接着し、わずかに伸展している状態を BB、肝細胞が接着しているが丸くなり伸展していないか、もしくは剥離した状態を CC として表 1 に示した。

[0110] [培養容器の自家蛍光の観察]

オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス製) を使用し、顕微鏡に付帯した、青色呈色: BZ-X フィルタ DAPI、緑色呈色: BZ-X フィルタ GFP、および赤色呈色: BZ-X フィルタ Texas Red との名称のフィルタを介して、培養容器底面の培養材を観察し、青、緑および赤の蛍光色が生じるかを観察した。

[0111] [薬剤収着性の評価]

24 ウェル容器の任意の 3 つのウェルに対して、各種薬剤溶液を 1 ウェルあたり 0.5 mL 加え、23℃ 下にて 2 日間静置後に薬剤溶液を回収した。回収した薬剤溶液の濃度を蛍光分析法または LC/MS にて測定し、容器に添加する前の薬剤溶液濃度に対する薬剤残存率を算出し、3 つのウェル内の薬剤残存率の平均値を求めた。

評価用薬剤

1. ローダミン B のリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBS という) 溶液 (濃

度 $10 \mu\text{mol/L}$)

2. ローダミン123のPBS溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

3. ローダミン6GのPBS溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

4. シクロスポリンAのジメチルスルホキシド (以下、DMSOという) 溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

5. チクロピジン塩酸塩のDMSO溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

6. レフルノマイドのDMSO溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

7. トログリタゾンのDMSO溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

8. イソプロテレノール塩酸塩のDMSO溶液 (濃度 $10 \mu\text{mol/L}$)

上述の評価用薬剤1～3は、蛍光分析法にて濃度分析を実施し、評価用薬剤

4～8はLC/MSによる濃度分析を実施した。

<蛍光分析条件>

・評価装置：FP-6600 (日本分光製 分光蛍光光度計)

・使用セル：石英製マイクロセル

・バンド幅：励起側：5 nm、蛍光側：6 nm

・感度 (PMT電圧)：400 V

・励起波長：ローダミンB 555 nm

ローダミン123 505 nm

ローダミン6G 525 nm

・蛍光測定波長：ローダミンB 580 nm

ローダミン123 530 nm

ローダミン6G 555 nm

・スキンスピード：2000 nm/min

<LC/MS条件>

・装置：Acquity UPLC 1-class system /
TQ-S micro (water)

・イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、正負イオン検出
検出：選択反応モニタリング (SRM)

1. 極性：

P o s i t i v e：シクロスポリンA、チクロピジン塩酸塩、イソプロテレノール塩酸塩

N e g a t i v e：レフルノマイド、トログリタゾン

2. プリカーサーイオン：

シクロスポリンA： m/z 1203

チクロピジン塩酸： m/z 264

レフルノマイド： m/z 269

トログリタゾン： m/z 440

イソプロテレノール塩酸塩： m/z 212

3. プロダクトイオン：

シクロスポリンA： m/z 156

チクロピジン塩酸塩： m/z 89

レフルノマイド： m/z 82

トログリタゾン： m/z 42

イソプロテレノール塩酸塩： m/z 152

[0112] [製造例1] 培養材の製造方法

4-メチルー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ーンを備えた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、厚みの異なる6種のフィルムを得た。厚み50μm、100μm、200μm、280μm、400μmのフィルムをそれぞれフィルム1、フィルム2、フィルム3、フィルム4、フィルム5とした。

[0113] [製造例2] 培養材の表面処理法と簡易培養容器の作製法

フィルム1～5は、テーブル型コロナ処理装置（春日電機製）を用いて、コロナ処理を行った（処理速度3m/min、出力0.5kW、2往復）。

その際の培養材表面を測定した水接触角を表 1 に示す。

その後、直径 23 mm のポンチでカットし、消毒用エタノール（日本薬局方、富士フィルム和光純薬）に 1 時間浸漬させた。1 時間後、表面に付着したエタノールを除去するためにダルベッコ PBS（－）（培養用、富士フィルム和光純薬）に 1 時間浸漬させた後、1 晩、室温で乾燥させて滅菌し、滅菌済みのポリエチレン製枠でフィルムの上下面を挟み、培養面の内径が 15 mm である培養容器 1 ～ 5 を作製した。

[0114] [製造例 3] 培養材の表面処理法と 24 ウェル培養プレートの作製法

フィルム 1 は常圧プラズマ表面処理装置（積水化学工業製）を用いて、チャンバー内を窒素の気流で満たしプラズマ処理した（処理速度 2 m/min、出力 4.5 kW、2 往復）。その際の培養材表面を測定した水接触角を表 1 に示す。

その後、ポリスチレン（PS とも称す）製 24 ウェル容器枠の底面に、プラズマ処理したフィルム 1 を医療用粘着剤を介して密着させて 24 ウェルの培養プレート（培養容器 6）を作製し、耐ガンマ線袋に梱包して 10 kGy のガンマ線を照射し滅菌した。

[0115] [実施例 1]

厚み 50 μ m のフィルム 1 から作製した培養容器 1 の培養面に、1.5 mg/mL のコラーゲンコート溶液を 0.5 mL 添加した後、余分なコラーゲンコート溶液を除去した。室温で 30 ～ 60 分間静置した後、ダルベッコ PBS（－）で洗浄して、一晩、室温で乾燥させた。同法でコラーゲンコート済みの培養容器 1 を 5 個準備した。

[0116] 次いで、ラット初代凍結肝細胞を含む培養液（0.5 mL）を 5 個の培養容器 1 の培養面それぞれにマイクロピペットで播種しポリスチレン製の蓋を被せインキュベーターに持ち込み、37℃、5% CO₂ 下培養を開始した。1 日後、インキュベーターから 4 個の培養容器 1 を取り出して、容器底面を横方向から覗き込み、培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、何れの容器も容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。次いで、

4 個の培養容器 1 のそれぞれを顕微鏡観察し、細胞が接着しながら伸展している様子を観察した。その後、4 個のうち 1 個で培地中の溶存酸素濃度を測定し、酸素消費速度を算出した。残り 3 個で代謝活性を測定した結果を表 1 に示す。（代謝活性値は、3 個の容器の結果を平均値として表 1 に示した。）さらに、残り 1 個の容器で 7 日間培養後、インキュベーターから取り出し、細胞が接着しながら伸展している様子を観察した結果を表 1 に示す。図 1 に 1 日後、7 日後の細胞を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。

[0117] [実施例 2]

厚み 100 μm のフィルム 2 から作製した培養容器 2 を用いた以外は実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0118] [実施例 3]

厚み 200 μm のフィルム 3 から作製した培養容器 3 を用いた以外は実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0119] [実施例 4]

厚み 280 μm のフィルム 4 から作製した培養容器 4 を用いた以外は実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0120] [実施例 5]

厚み 400 μm のフィルム 5 から作製した培養容器 5 を用いた以外は実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0121] [実施例 6]

製造例 3 で作製した 24 ウェルの培養プレートである培養容器 6 を使用した以外は実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。この際、24 個のウェルのうち 4 個を使用した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0122] [実施例 7]

製造例 3 で作製した 24 ウェルの培養プレートである培養容器 6 を使用し、コラーゲンコートを実施せずに、直接、ラット初代凍結肝細胞を含む培養液 (0.5 mL) を培養容器 6 の 4 個のウェルそれぞれに播種し、実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1 日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および 7 日後の細胞の接着性を評価した結果を表 1 に示す。

[0123] [実施例 8]

培養液中の細胞密度を $4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ に変更したこと以外は、実施例 1 と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1 日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察

した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。

[0124] [実施例9]

重量平均分子量 (M_w) が95000であり、分子量分布 (M_w/M_n) が3.5の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) を使用したこと以外は、製造例1と同様な方法で厚み50 μm のフィルム6を得た。

フィルム1をフィルム6に変更した以外は、実施例1と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がり有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。

[0125] [実施例10]

培養材が4-メチル-1-ペンテン重合体である実施例5の培養容器底面を蛍光顕微鏡で観察し培養材由来の自家蛍光を生じるか確認した結果、BZ-XフィルタDAPI、BZ-XフィルタGFPおよびBZ-XフィルタTexas Redの何れの波長フィルタで観察しても材料由来の蛍光は見られず、細胞を直接当該容器の培養面で観察できることが解った。図4に蛍光顕微鏡で観察した培養面の写真を示す。

[0126] [比較例1]

厚み600 μm であるフィルム6を製造例1と同様な方法で作製し、製造例2と同様な方法でフィルム6の表面処理と滅菌を実施し培養容器c1を作製した。次いで、実施例1と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。24時間後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がり有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなか

った。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。

[0127] [比較例2]

厚み50 μm であるフィルム1を用いて製造例2の表面処理を実施せずに滅菌し、培養容器c2を作製した。次いで、実施例1に従いコラーゲンコートを実施したが、コラーゲンを含む溶液を培養面で弾いてしまいコラーゲンコートができず、ラット初代凍結肝細胞の培養まで至らなかった。

[0128] [比較例3]

比較例2で作成した培養容器c2を用いて、コラーゲンコートを実施せずに直接ラット初代凍結肝細胞の培養液(0.5 mL)を播種し、ポリスチレン製の蓋を被せインキュベーターに持ち込み、37℃、5% CO_2 下培養を開始した。1日後、インキュベーターから取り出して、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。次いで、溶存酸素濃度や代謝活性評価のために培地を除去したところ、細胞は培養面に定着せず培地とともに容器から除去されてしまい培養面には僅かな細胞しか残っておらず、溶存酸素濃度や代謝活性の評価ができなかった。7日後の評価は中止した。

[0129] [比較例4]

培養面の厚みが1000 μm である市販の24ウェルTCPS培養容器(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1と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がり有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。図2に1日後、7日後の細胞を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。

[0130] [比較例5]

高酸素透過容器として培養材の厚みが $350\mu\text{m}$ である市販の24ウェルPDMS（ポリジメチルシロキサン）製培養容器（製品名G－plate、VECELL社製型番V24WGPB－10）を使用した以外は実施例1と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1日後、インキュベーターから取り出して、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がりの有無を観察した結果、フィルムは下方に撓み垂れ下がった状態に変化していた。溶存酸素濃度や代謝活性を評価するために培地を除去したところ、細胞は培養面の中心に群生した状態で増殖していた。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。図3に1日後、7日後の細胞を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。

[0131] [比較例6]

比較例4に記載の24ウェルTCPS培養容器（コーニング社製）（ポリスチレン（PS）製）を使用し、培養液中の細胞密度を $4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ に変更したこと以外は、実施例1と同様な方法でラット初代凍結肝細胞を培養した。1日後、容器底面を横方向から覗き込み培養環境でフィルムの垂れ下がり有無を観察した結果、容器作製時と変化無く垂れ下がりは見られなかった。1日後の培養の結果として、細胞の接着性、溶存酸素濃度から酸素消費速度を算出した結果、代謝活性の測定値、および7日後の細胞の接着性を評価した結果を表1に示す。

[0132] [比較例7]

培養材がポリスチレンである比較例4の培養容器底面を蛍光顕微鏡で観察した結果、BZ-XフィルタGFPOおよびBZ-XフィルタTexasRedの波長フィルタで観察すると材料由来の蛍光は観察されなかったが、BZ-XフィルタDAPIの波長フィルタで観察すると材料由来の青色の発光が見られた。当該培養容器では直接細胞を蛍光観察できないことが解った。図5に蛍光顕微鏡で観察した培養面の写真を示す。

[0133]

[表1-1]

表1

物性項目	材料	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9
		4-メチル-1-ベンゼン系液体								
Mw×10000 (Mw/Mn)		42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	9.5 (3.5)
表面処理		あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)	あり (エポキシ)
コーティング		あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
厚み	μm	50	100	200	280	400	50	50	50	50
組れ下がり距離	mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0
接合の有無		なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
水接触角	度	72.9	67.7	80.2	65.1	60.7	52.3	52.3	72.9	72.9
細胞密度	cells/cm ²	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	4.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵
酸素透過係数	cm ³ ・mm/ m ² ・24h・atm	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1975
酸素透過量	cm ³ /m ² ・24h・atm	38240	19120	9560	6829	4790	38240	38240	38240	39500
培養1日の細胞増殖性		AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
培養7日の細胞増殖性		AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
培地中溶存酸素濃度	%	13.9	12.7	12.9	8.8	5.8	13.5	14.6	12.2	13.9
酸素消費速度	pmol/s/10 ⁵ cells	125.9	77.2	40.1	47.8	45.2	128.3	110.5	40.2	125.9
代謝活性値	pmol/min/ mg protein	0.95	0.92	0.91	0.94	0.83	0.97	0.85	1.02	0.95

[0134]

[表1-2]

表1 (続き)	物性項目	比較例1 4-メチル-1-ペンテン重合体	比較例2 42.8 (4.1)	比較例3 42.8 (4.1)	比較例4 PS	比較例5 PDMS	比較例6 PS
材料	Mw×10000 (Mw/8n)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	42.8 (4.1)	...	...	...
	密度	あり (20℃)	なし	なし	あり	あり	あり
コーティング	コーティングコート	あり	なし	なし	あり	あり	あり
	厚み	600	50	50	1000	350	1000
膜	膜下の細胞	0	0	0	0	48	0
	膜上の細胞	なし	なし	なし	なし	あり	なし
水	水透過率	38.8	110	110	60.6	76.6	60.6
	細胞密度	1.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	4.0×10^5
酸素消費速度	酸素消費速度	1912	1912	1912	203	19121	203
	酸素消費速度	3187	38240	38240	203	54631	203
培養1日の細胞増殖率	培養1日の細胞増殖率	AA	CC	CC	AA	CC	AA
	培養7日の細胞増殖率	AA	...	...	AA	CC	AA
培養中酸素消費速度	培養中酸素消費速度	8.2	...	...	0.2	17.2	9.4
	酸素消費速度	27.9	...	...	16.4	133.3	2.2
代謝活性	代謝活性	0.70	...	...	0.64	0.13	0.13
	代謝活性	0.70	...	...	0.64	0.13	0.13

1) コーティングコートができたため、細胞が接着せず、培養ができなかった。

2) 細胞を除去したところ、培養後も細胞が容器から除去されてしまったため、評価できなかった。

[0135] 表1より、本発明の培養材を培養容器底部に配置した培養容器を用いたラット初代凍結肝細胞の培養では、最長7日間の長期培養が可能であった。容器底面の撓みは無く、細胞は培養面全体に均一に接着、増殖し、形態を維持していた。容器底面は、分子量(Mw)が95000であり、膜厚50μmであるフィルム6を培養材に用いた場合でも撓み無く十分な強度を維持しており、本発明の4-メチル-1-ペンテン重合体(X)を含む培養材は優れた形状安定性を有していた。

[0136] 本発明の培養材を用いたラット初代凍結肝細胞の培養の効果をより詳細に見ると、培養1日後の培地中酸素濃度を測定して算出した細胞の酸素消費速度は40pmol/s/10⁵cells以上であり、細胞密度を4倍に高めた結果でも十分な酸素消費速度を維持しており、培養材を介して効果的に酸素が供給されていた。これにより、肝細胞の機能として薬剤の代謝活性を評

価した代謝活性値は高く、細胞の機能は正常に維持されていた。一方、比較例 1、4 の酸素消費量は $30 \text{ pmol} / \text{s} / 10^5 \text{ cells}$ 未満であり、少なくともラット初代凍結肝細胞が増殖し、機能を発現するのに必要な酸素が供給されていなかった。これにより、特に比較例 4、6 の PS 容器で培養した細胞は代謝活性値も低く、細胞は増殖していても正常な機能を発現できていなかった。

[0137] さらに、高酸素透過性の容器として広く知られている PDMS を容器底面に配置した培養容器を用いた結果では（比較例 5）、1 つの穴の内径が 16 mm とそれ程大きく無いにも関わらず、1 日後の形態で容器底部の PDMS が大きく撓んでしまった。これは、PDMS フィルムの垂れ下がり距離が 48 mm であり撓みやすいためと推測される。このとき細胞は容器底面の中心部に群生した状態で集まっており、代謝活性値を確認すると非常に低かった。群生した細胞間で細胞密度の疎密差が生じ、密な状態では酸素が欠乏しているなどの不具合が予測される。加えて、PDMS の残モノマーによる被毒の影響など材料由来の不具合も考えられる。

[0138] さらに、本発明の培養材の表面性状について、培養材表面に直接細胞を播種して培養する場合、あるいはコラーゲンコートをして培養する場合、何れにおいても、細胞やコラーゲンは良好な状態で培養材表面に密着していた。一方、比較例 2、3 に示した結果から、少なくとも本実施形態のコラーゲン、もしくは細胞を用いる培養では培養材表面が親水性であること（一定の水接触角であること）の必要性が示された。多種多様な細胞が知られ、培養方法についても細胞やその目的に応じて様々な培養方法が知られている現在では、培養材表面の親水化処理は、本発明の酸素透過性容器を用いる際の 1 つの手段として有用な方法と位置付けられる。

[0139] [実施例 11]

実施例 6 で用いた 4-メチル-1-ペンテン重合体容器に対して、薬剤収着試験を行った。結果を表 2 に示す。

[0140] [比較例 7、8]

比較例 4 で用いた 24 ウェル TCP S 培養容器（コーニング社製）（ポリスチレン（PS）製）と、比較例 5 で用いた 24 ウェル PDMS 製培養容器（製品名 G-plate、VECELL™ 型番 V24WGPB-10）に対して、薬剤収着試験を行い、それぞれ比較例 7、8 とした。結果を表 2 に示す。

[0141] [表2]

表 2	4-メチル-1-ペンテン重合体容器 (実施例 11)	PS 製容器 (比較例 7)	PDMS 製容器 (比較例 8)
ローガン 8	98%	90%	2%
ローガン 123	99%	79%	58%
ローガン 6G	96%	86%	21%
シグマポリン A	59%	56%	2%
チロニジン塩酸塩	64%	67%	1%
レボノマイド	68%	70%	2%
トログタゾン	64%	65%	1%
インプロニール塩酸塩	63%	65%	1%

[0142] 表 2 より、本発明の培養材を培養容器底部に配置した培養容器を用いた場合（実施例 11）、PS 製容器、PDMS 容器より薬剤が収着しにくいことがわかった。すなわち、本発明の 4-メチル-1-ペンテン重合体（X）を含む培養材は優れた薬剤低収着性を有していた。

[0143] 以上の結果から、本発明の培養材は、優れた形状安定性、酸素供給性に加

え、細胞等の接着性にも優れ、樹脂容器であるにも関わらず自家蛍光を生じず、培養した細胞をそのまま蛍光観察できる利便性にも優れることが解った。また、薬剤収着性が低いため、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。

産業上の利用可能性

[0144] 本発明の培養材は、前述のように、多種多様な細胞を培養可能であり、また、細胞やその目的に応じた様々な培養方法にも対応可能である、さらに、本発明の培養材表面の親水化処理を施した場合、更に多くの用途に応用可能であり、産業上の利用可能性を有する。