

明 細 書

発明の名称：細胞保持材、センサー、枠部材および細胞保持方法 技術分野

[0001] 本発明は、細胞保持材に関する。本発明は、さらに、細胞保持材を含むセンサーにも関する。

背景技術

[0002] 細胞は、外的環境の変化に伴い、特異的且つ高感度に応答する。この応答反応を、当該細胞の形態や、当該細胞に発現させた蛍光タンパク質の局在又は発現量等の変化により検出することで、今までにない高性能な分析が実現できると期待されている。非特許文献1には、生細胞内のグルコース動態を光学顕微鏡で検出できる蛍光タンパク質型センサーが開示されている。また、非特許文献2には、細胞外に存在する上皮成長因子等の液性因子を検出する細胞内タンパク質型センサーが開示されている。また、その他にも細胞の応答機構を利用した、B細胞を用いた病原体及び生体毒素の検出システム（非特許文献3）や、藻類細胞を用いた水質汚染物質の早期検出センサー（非特許文献4）等が開発されている。これらの細胞を利用したセンサーは、従来の半導体素子や酵素反応を利用した化学センサーで問題となる、信号ドリフト等の長時間計測時の不安定さを解消できる。

[0003] さらに、上述した細胞を利用したセンサーは、細胞培養技術と組み合わせることで、従来の化学センサーではなし得ない効果が期待されている。例えば、特許文献1には、低コスト細胞培養技術が開示されている。このような細胞培養技術と組み合わせることで、従来の化学センサーよりも低コストなセンサーを実現できると考えられる。

[0004] このような細胞を利用したセンサー等においては、細胞を所望の位置に安定的に保持する方法が必要となる。非特許文献5には、3Dプリンターで作製した、内径が約1mmの複数のチャンバー内に、ゲルに懸濁された生細胞を配置する細胞センサーが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6111510号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Mita, et al., "Green Fluorescent Protein-Based Glucose Indicators Report Glucose Dynamics in Living cells", Anal. Chem., 2019, vol. 91, No. 7, p4821-4830

非特許文献2：Kim, et al., "Intensiometric biosensors visualize the activity of multiple small GTPases in vitro", Nat. Commun., 10, Article number: 211 (2019)

非特許文献3：Banerjee, et al., "A novel and simple cell-based detection system with a collagen-encapsulated B-lymphocyte cell line as a biosensor for rapid detection of pathogens and toxins", Lab. Invest., 2008, Feb, 88 (2), 196-206

非特許文献4：Ferro, et al., "Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels", Sensors (Basel), 2012, Dec 6, 12 (12), 16879-16891

非特許文献5：Oda, et al., "Cell-based Bioh

ybrid Sensor Device for Chemical Source Direction Estimation", Cyborg and Bionic Systems, Volume 2021, Article ID 8907148

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 従来の細胞保持技術では、細胞が接着する足場を必要とするため、細胞が接着する足場が細胞観察時に障害となるという問題がある。本発明は、上述の事情を鑑みたものであり、細胞が接着する足場が細胞観察の障害とならずに細胞を保持できる細胞保持材、及びその細胞保持方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、鋭意研究した結果、スフェロイドを形成し得る複数の細胞が集合した細胞集団又は当該細胞集団が形成したスフェロイドを含む培地に、当該細胞集団の保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材を浸漬することで、前記課題を解決できることを見出した。さらに、本発明者らは、上記方法によれば、長期間にわたって当該細胞保持材に細胞を保持できることを見出し、本発明を完成させた。
- [0009] すなわち、本発明の第一の態様によれば、
複数の細胞が集合した細胞集団が保持され得る保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材と、
前記保持予定領域の少なくとも一部を占有し、前記枠部材により保持された、膜状の前記細胞集団と、
を備え、
前記細胞集団の周縁部の少なくとも一部が前記枠部材に接触し、且つ、前記細胞集団のうち前記保持予定領域を占有する部分が宙に浮いた状態である細胞保持材が提供される。
- [0010] 本発明の第二の態様によれば、

複数の細胞が集合した細胞集団の一部を宙に浮いた状態で保持するための
枠部材であって、

前記細胞集団が保持され得る保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲
う枠部材が提供される。

[0011] 本発明の第三の態様によれば、

複数の細胞が集合した細胞集団の一部を宙に浮いた状態で保持する方法で
あって、

前記細胞集団又は前記細胞集団が形成したスフェロイドを含む培地に、前
記細胞集団の保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材を浸漬す
る工程を含む、細胞保持方法が提供される。

[0012] 前記第一の態様において、前記保持予定領域面と直交する一断面における
前記枠部材の外周は、前記細胞集団により少なくとも部分的に覆われていて
もよい。

[0013] 前記第一の態様において、前記細胞集団は、前記保持予定領域の面積の5
0%以上を占有していてもよい。

[0014] 前記第一の態様において、前記保持予定領域は、略円形又は略楕円形であ
ってもよい。

[0015] 前記第一の態様において、前記枠部材は、前記保持予定領域の全部を囲っ
てもよい。

[0016] 前記第一の態様において、前記細胞集団の細胞は、初代細胞であってもよ
い。

[0017] 前記第一の態様において、前記細胞集団の細胞は、肝臓、胃、肺、心臓、
又は脳から選択される臓器を由来とする細胞であってもよい。

[0018] 前記第一の態様において、前記保持予定領域の面積が1000～6000
00 μm^2 であってもよい。

[0019] 前記第一の態様、第二の態様、及び第三の態様において、前記保持予定領
域の面積は、1000～6000 μm^2 であってもよい。

[0020] 前記第一の態様及び第三の態様において、前記細胞集団は、スフェロイド

を形成したときのスフェロイドサイズが $0.2 \sim 1.0 \text{ mm}^2$ であってもよい。

[0021] 前記第一の態様において、前記細胞保持材は、センサーに含まれてもよい。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、細胞が接着する足場が細胞観察の障害とならずに細胞を保持できる細胞保持材、及びその細胞保持方法を提供できる。さらに、本発明によれば、長期間にわたって細胞が接着する足場が細胞観察の障害とならずに細胞を保持できる細胞保持材、及びその細胞保持方法を提供できる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1 (a) 及び (b) は、それぞれ、実施形態1に係る細胞保持材の概略を示す平面図、及び図1 (a) に示した細胞保持材のA-A' 線に沿った断面図である。

[図2]図2 は、実施形態2に係る細胞保持材の概略を示す平面図である。

[図3]図3 は、HEK293T細胞における播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフに表した図である。

[図4]図4 (a) ～ (f) は、HEK293T細胞の、それぞれ、枠部材の保持予定領域の面積が $1256 \mu\text{m}^2$ 、 $5024 \mu\text{m}^2$ 、 $31400 \mu\text{m}^2$ 、 $125600 \mu\text{m}^2$ 、 $282600 \mu\text{m}^2$ 、及び $502400 \mu\text{m}^2$ のときの、培養1日間経過後における光学顕微鏡画像である。

[図5]図5 (a) 及び (b) は、それぞれ、HEK293T細胞の、培養開始から28日間経過後における枠部材の保持予定領域の面積が $5024 \mu\text{m}^2$ のときの明視野画像及び蛍光画像である。

[図6]図6 は、HEK293T細胞の、各培養期間経過後、保持予定領域の各面積、及び各スフェロイドサイズのときの、保持予定領域の面積における細胞集団の占有率を表した図である。

[図7]図7 は、鶏胎児 (E12) の肝臓由来細胞における播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフに表した図である。

[図8]図8は、各培養期間経過後における鶏胎児（E 1 2）の肝臓由来細胞の光学顕微鏡画像である。

[図9]図9は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、保持予定領域の各面積における、培養1日間経過後における光学顕微鏡画像である。

[図10]図10は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $1256\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図11]図11は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $5024\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図12]図12は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $31400\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図13]図13は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $125600\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図14]図14は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $282600\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図15]図15は鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、及び各培養期間経過後における、保持予定領域の面積が $502400\mu\text{m}^2$ のときの光学顕微鏡画像である。

[図16]図16は、鶏胎児（E 1 2）の各臓器由来細胞、各培養期間経過後、及び保持予定領域の各面積のときの、保持予定領域の面積における細胞集団の占有率を表した図である。

[図17]図17は、HEK293T細胞の、枠部材として海绵質スポンジを使用したときの、明視野画像、蛍光画像、及びこれらの結合画像である。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明について図面を参照しながら詳述する。以下で参照する図面において、実質的に同じ機能を有する構成要素を共通の参照符号で示し、その説明を省略することがある。なお、以下の実施形態で引用する図面の寸法比率は、説明の都合上誇張されており、実際の比率とは異なる場合がある。また、以下の実施形態で引用する図面は、説明の都合上、構成の簡略化又は模式化して示したり、一部の構成要素を省略したりしている。

[0025] (実施形態 1)

図 1 は、実施形態 1 に係る細胞保持材を示す。図 1 (a) は細胞保持材の概略を示す平面図である。図 1 (b) は図 1 (a) に示した細胞保持材の A-A' 線に沿った断面図である。図 1 (a) に示すように、細胞保持材 10 は、枠部材 20 および細胞集団 30 を備える。

[0026] 枠部材 20 は、複数の細胞が集合した細胞集団が保持され得る保持予定領域 22 の全部を囲う。枠部材 20 で保持される細胞及び細胞集団については、後述する。

[0027] 枠部材 20 の材料は、細胞毒性を有するものでなければ、特に限定されない。本実施形態においては、枠部材 20 が細胞集団 30 により少なくとも部分的に覆われることによって細胞集団 30 が枠部材 20 に保持される。そのため、枠部材 20 の材料は、細胞接着性を有する基材であっても、細胞接着性を有さない基材であってもよい。保持力を高める観点から、細胞接着性を有する基材が好ましい。使用できる基材としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリペプチド等の高分子材料又は合成樹脂材料、ステンレス、アパタイト、リン酸カルシウム等の無機化合物、もしくは海綿、セルロース、ソイプロテイン、多糖類、ゼラチン、卵白、菌糸体、脱細胞化組織等の天然材料が挙げられる。基材は、細胞接着性の観点から、ポリイミド、海綿が好ましい。

[0028] 枠部材 20 の断面形状は、図 1 (b) では円形であるが、特に限定されない。枠部材 20 の断面形状は、多角形、略円形、又は略楕円形等が挙げられ

る。枠部材20の断面径（保持予定領域面と直交する枠部材断面長の最大幅）は、特に限定されない。枠部材20の断面径の下限値は、例えば、0.1 μm 以上、1 μm 以上、3 μm 以上、10 μm 以上である。枠部材20の断面径の上限値は、例えば、10 mm以下、1 mm以下、100 μm 以下である。一実施形態における枠部材20の断面径は、例えば、25 μm 、又は60 μm であり得る。

[0029] 保持予定領域22は、培地中に枠部材20の内側部分が形成する面であって、平面であっても、曲面であってもよい。また、図1（a）では、保持予定領域22の形状は、枠部材20を平面視したとき、円形であるが、特に限定されない。保持予定領域22の形状は、枠部材20を平面視したとき、多角形、略円形、又は略楕円形等が挙げられ、好適には略円形、又は略楕円形である。

[0030] 保持予定領域22の面積は、培地中に枠部材20を浸漬することができる大きさであれば特に限定されないが、具体的には例えば、1000000 μm^2 以下であり、好適には500～600000 μm^2 であり、さらに好適には1000～600000 μm^2 であり、特に好適には1000～6000 μm^2 である。保持予定領域22がこのような範囲であることにより、保持予定領域内に高い占有率で細胞集団を保持できる。

[0031] 枠部材20には、棒状の棒部材24が取り付けられている。棒部材24の基材は、特に限定されない。棒部材24は、枠部材20と同一の基材で形成され、枠部材20と一体成型されていてもよい。棒部材24の形状は、把持できれば特に限定されない。棒部材24を把持することにより、枠部材20を簡便にハンドリングすることができる。換言すると、棒部材24を把持することにより、枠部材20で保持された細胞集団30を簡便に移動等することができる。これにより、細胞集団30を顕微鏡観察又はアッセイ等に供しやすい。

[0032] 細胞集団30は、保持予定領域22の少なくとも一部を占有し、枠部材20により保持された、膜状の細胞の集合体である。図1（a）では、細胞集

図30が保持予定領域22の全体を占有しているが、細胞集団30は保持予定領域22の一部を占有していてもよい。細胞集団30が保持予定領域22の面積の50%以上を占有していることが好ましく、80%以上がより好ましく、90%以上がさらに好ましく、保持予定領域22すべてを占有していることが最も好ましい。

[0033] 細胞集団30の周縁部の少なくとも一部が枠部材20に接触している。細胞集団30の周縁部と枠部材20との間の化学的結合は必ずしも要しない。図1(b)に示すように、所定の断面において、細胞集団30の一部によって枠部材20の外周すべてが覆われていてもよく(図1(b)左側参照)、細胞集団30の一部によって枠部材20の外周の一部が覆われていてもよい(図1(b)右側参照)。保持力を高める観点から、所定の断面において、細胞集団30の一部によって枠部材20の外周すべてが覆われていることが好ましい。

[0034] 図1(b)に示すように、細胞集団30のうち保持予定領域22を占有する部分が宙に浮いた状態である。なお、「宙に浮いた」とは、細胞集団30のうち保持予定領域22を占有する部分の一方及び他方の面が露出していることを指し、当該細胞集団30の一方の面側および他方の面側に干渉物のない空間が存在しているような状態である。これにより、例えば、細胞を観察する場合に足場等の障害物がない。

[0035] 細胞集団30を構成する細胞は、スフェロイドを形成し得る複数の細胞であれば、特に限定されない。「スフェロイド」は、数個以上の細胞の略球状の集合体を指し、凝集体、凝集塊ともいう。形成し得るスフェロイド1個あたりの細胞数の下限値は、例えば、10個以上、100個以上、1000個以上、3000個以上である。形成し得るスフェロイド1個あたりの細胞数の上限値は、例えば、1000000個以下、500000個以下、100000個以下、20000個以下である。スフェロイドの大きさは、スフェロイドサイズで表される。スフェロイドサイズは、顕微鏡等を使用して撮影したスフェロイドの外縁内の面積(水平投影面積)を指す。スフェロイドの

撮影には、例えば、位相差顕微鏡を使用でき、面積の計測には解析ソフトウェアを使用できる。位相差顕微鏡としては、例えば、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X810（キーエンス社）が使用でき、解析ソフトウェアとしては、例えば、Leafareacounter Plusが使用できる。スフェロイドサイズは、具体的には例えば、 $0.01 \sim 10.0 \text{ mm}^2$ であり、好適には $0.1 \sim 3.0 \text{ mm}^2$ であり、さらに好適には $0.2 \sim 1.0 \text{ mm}^2$ である。スフェロイドサイズがこのような範囲であると、細胞を細胞保持材に長期間にわたって保持することができる。なお、細胞種が異なる場合は、細胞1個あたりのサイズが異なるため、同サイズのスフェロイドであっても、スフェロイド1個あたりの細胞数は異なることがある。そのため、細胞種ごとに最適な細胞数を設定する必要がある。

[0036] また、本実施形態に係る細胞の細胞種は、特に限定されないが、精子や卵子等の生殖細胞、生体を構成する体細胞、正常細胞株、がん細胞株、初代細胞、前駆細胞、幹細胞、生体から分離され人為的に分化誘導された細胞、生体から分離され人為的に遺伝子改変がなされた細胞等が挙げられる。細胞の細胞種としては、例えば、HEK293T細胞を使用できる。これら細胞の由来も特に限定されないが、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等の哺乳動物由来が好ましく、ニワトリ、アヒル等の家禽動物由来の細胞がより好ましく、ニワトリ由来の細胞がさらに好ましい。また、細胞の由来臓器は、特に限定されず、肝臓由来、胃由来、肺由来、心臓由来、脳由来等が挙げられる。なお、本実施形態に係る細胞の細胞種は、スフェロイドを形成し得る限り、必ずしも単一の種類の細胞である必要はなく、細胞集団30は複数種類の細胞から構成されてもよい。なお、細胞の結合特異性によって、保持予定領域22における細胞集団30の占有率は異なり、占有率が高くなるため結合特異性が揃った細胞が好ましい。結合特異性が揃った細胞としては、例えば、同じ臓器を構成する細胞群であった初代細胞が挙げられ、特に肝臓、胃、肺、心臓、及び脳由来の初代細胞が好ましい。

[0037] （細胞培養）

細胞の培養は、培養しようとする細胞に適した培地及び培養容器を用いて、公知の方法により、例えば37℃、5%CO₂条件下で、行うことができる。なお、以下で説明する培養方法は、細胞保持材作製前の細胞の準備段階における培養及び細胞保持材作製中の細胞の培養のいずれの培養方法も含む。培養は、静置培養、振盪培養又は攪拌培養などのいずれであってもよい。培養には、所望の温度に調整したインキュベータや、恒温槽等を使用することができる。培養は、接着培養であってもよいが、少なくとも一部の期間は非接着の状態で行うこと（例えば浮遊培養）が好ましい。「非接着の状態」とは、すべて又は大部分の細胞が培養容器表面に接着していない状態を指し、すべて又は大部分の細胞が培養容器表面から離れて存在する状態、及び培養容器表面に接触している場合でも、器具もしくは酵素などを用いずに培養容器のコーティングや培地の対流などにより培養容器表面から容易に離れ得る状態を含む。

[0038] 培地は、細胞の培養が可能な培地であればよく、使用する細胞種に合わせて適宜選択して使用することができる。例えば、イーグル最小必須培地（EMEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI-1640培地、Ham's F-12培地等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに、これらの培地に細胞培養に有用な公知の材料及び添加剤を適宜使用することができる。具体的には例えば、これらの培地に、血清や各種増殖因子、分化誘導因子を添加してもよい。血清としては、例えば、ウシ胎児血清（FBS）を使用できる。培地は、培養期間中、定期的に交換してもよい。

[0039] 培養容器は、任意のものを使用することができるが、スフェロイド及び／又は細胞集団の形成を促進するためには、細胞接着性を向上させる処理がされていないことが好ましく、細胞非（低）接着処理がされている、又は細胞非（低）接着材料で構成されていることがさらに好ましい。細胞接着性を向上させる処理としては、例えば、容器表面への細胞外マトリクス等によるコーティング処理が挙げられる。一方、細胞非（低）接着処理としては、例え

ば、容器表面への細胞非接着ハイドロゲルコーティング処理、MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) ポリマーコーティング処理等が挙げられる。

[0040] (細胞保持方法)

細胞保持材の作製方法について説明する。

[0041] まず、培地、細胞、及び枠部材20 (図1参照) を用意する。なお、用意する細胞は、スフェロイドを形成する前の個々の細胞が分散した状態であっても、スフェロイドを形成した後の状態であってもよい。いずれの状態の細胞であっても、細胞集団30が枠部材20に保持される。

[0042] 次に、細胞 (又はスフェロイド) を含む培地に、枠部材20を浸漬する。枠部材20の浸漬時間は、特に限定されないが、例えば、1時間以上、2時間以上、5時間以上、10時間以上、又は24時間以上にすることができる。なお、枠部材20に棒部材24が取り付けられていると、本工程での浸漬や、後述する工程での取り出しが容易になる。

[0043] 枠部材20を浸漬すると、保持予定領域内に膜状の細胞集団30が形成された細胞保持材10が得られる。以上説明した細胞保持方法によれば、細胞保持材を簡便に作製にすることができる。

[0044] 上記方法により作製された細胞保持材により、細胞が接着する足場が細胞観察の障害とならずに細胞を保持できるため、マイクロ単位での細胞集団の操作が容易になる。細胞保持材は、作製された培養容器内で使用してもよく、取り出して使用してもよい。なお、使用の際に、細胞集団を構成する個々の細胞が生存していることは必須ではなく、細胞集団を構成する一部又は全部の細胞が死細胞であり得る。

[0045] 本実施形態に係る細胞保持材に保持された細胞集団は、長期間にわたって保持される。保持される期間は、例えば、一の実施形態においては保持開始後14日間以上であり、また別の実施形態においては保持開始後21日間以上、又は28日間以上であり得る。

[0046] (実施形態2)

図2は、実施形態2に係る細胞保持材の概略を示す平面図である。本実施形態に係る細胞保持材10の基本的な構成は実施形態1と同様である。以下では、実施形態1と異なる構成について説明する。

[0047] 本実施形態に係る枠部材20は、保持予定領域22の一部を囲う。このように、枠部材20が開構造の場合は、その開構造部分の端点同士を最短距離で結んだ線を含めて枠部材の内側部分とみなし、保持予定領域22が規定される。

[0048] 本実施形態の細胞保持材10によれば、枠部材20の切れ目部分において、細胞集団30の膜厚の測定や、保持予定領域22と平行な方向からの観察が可能となる。

[0049] (細胞保持材の用途)

本実施形態に係る細胞保持材は、マイクロ単位での細胞集団の操作が簡便であるため、細胞の生理活性を利用した細胞センサー等として利用できる。換言すると、細胞センサーなどのセンサーは本実施形態に係る細胞保持材を含む。細胞センサーとしては、例えば、培地成分の有無及び／又は含有量の推定を行うことができる。また、細胞外環境の情報を電気信号や光信号、細胞外ベシクルを含む細胞放出物質等に変換する中間デバイスとして利用することもできる。一方、細胞保持材に保持された細胞から培地中に成長因子等を供給することもできる。さらに、本実施形態に係る細胞保持材は、細胞の脂質二重膜に内在するトランスポーター等の膜タンパク質の活性を利用した細胞センサーとして利用できる。また、保持した死細胞の細胞膜上に形成した脂質ラフトを利用し、ウイルスや菌等の分子認識素子として利用することができる。

[0050] 本実施形態に係る細胞保持材は、異なる細胞種が保持された細胞保持材を互いに接触させることで、多細胞組織を作製することができる。このような多細胞組織は、再生医療や薬物動態評価のツールとして利用することができる。

[0051] 本発明は、上述した実施の形態に限定されるものではなく、当業者の知識

に基づいて各種の設計変更などの変形を加えることも可能であり、そのような変形が加えられた実施形態も本発明の範囲に含まれる。

- [0052] 本実施形態に係る細胞保持材は、複数の上記枠部材を含んでもよい。複数の枠部材を含む場合は、２次元的な枠材の整列状態であっても、３次元的な編目構造であってもよい。

実施例

- [0053] ≪HEK293T細胞のポリイミド製枠部材による保持≫

＜細胞数とスフェロイドサイズの関係評価＞

播種細胞数とスフェロイドサイズの評価するため、細胞非（低）接着処理が施された培養容器を用いて、蛍光タンパク質を発現させたHEK293T細胞（番号JCRB9068、独立行政法人医薬基盤研究所JCRB細胞バンク）のスフェロイド形成を誘導した。具体的には、所定細胞数の細胞を、10%FBS（製品番号S1580-500、biowest社）を含むDMEM（製品番号043-30085、富士フィルム和光純薬株式会社）に懸濁して播種し、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。

- [0054] 培養開始から1日間経過後に、いずれの細胞数においてもスフェロイドが形成されていることを確認した。このときのスフェロイドサイズを、光学顕微鏡（オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X810、キーエンス社）を用いて撮影した写真から、解析ソフトウェア（Leafareacounter Plus）を用いて測定した。このときの播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフに表した結果を図3に示す。

- [0055] 図3に示された結果より、播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフにプロットしたとき、線形的な関係があることが分かった。

- [0056] ＜細胞保持評価＞

蛍光タンパク質発現HEK293T細胞を、10%FBSを含むDMEMに懸濁し、所定スフェロイドサイズになるようにそれぞれ細胞非（低）接着処理が施された培養容器に播種した。同時に、楕円状の保持予定領域全体を囲む枠部材として、保持予定領域の面積が所定サイズのLitholoop

s Round (ワケンビーテック株式会社；ポリイミド樹脂製、枠構造部の断面径： $25\mu\text{m}$)を、細胞が播種されたウェル内にそれぞれ浸漬した（各条件 $n=3$ ）。このプレートを、インキュベータ内に静置し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で培養を開始した。

[0057] 培養開始から1日間経過後に、ウェル内の様子を光学顕微鏡により観察し、細胞がL i t h o L o o p s Roundに保持されているかを評価した。図4に、このときのウェル内の様子 {枠部材の保持予定領域の面積が (a) $1256\mu\text{m}^2$; (b) $5024\mu\text{m}^2$; (c) $31400\mu\text{m}^2$; (d) $125600\mu\text{m}^2$; (e) $282600\mu\text{m}^2$; (f) $502400\mu\text{m}^2$ } をそれぞれ示す。

[0058] 枠部材の保持予定領域の面積が $1256\mu\text{m}^2$ のとき、すべてのスフェロイドサイズにおいて細胞が枠部材に保持されていた。同様に、保持予定領域の面積が $5024\mu\text{m}^2$ のとき、スフェロイドサイズ 0.20mm^2 以上すべて；保持予定領域の面積が $31400\mu\text{m}^2$ 、 $125600\mu\text{m}^2$ 、及び $282600\mu\text{m}^2$ のとき、スフェロイドサイズ 0.36mm^2 以上すべて；保持予定領域の面積が $502400\mu\text{m}^2$ のとき、スフェロイドサイズ 0.64mm^2 以上すべて；の条件において細胞が枠部材に保持されていた。表1に、各条件における細胞保持の有無を示す。

[0059] [表1]

スフェロイドサイズ [mm^2]	枠部材の保持予定領域の面積 [μm^2]					
	1256	5024	31400	125600	282600	502400
0.02	○	×	×	×	×	×
0.05	○	×	×	×	×	×
0.06	○	×	×	×	×	×
0.12	○	×	×	×	×	×
0.20	○	○	×	×	×	×
0.36	○	○	○	○	○	×
0.64	○	○	○	○	○	○
1.26	○	○	○	○	○	○
2.70	○	○	○	○	○	○
4.36	○	○	○	○	○	○
7.05	○	○	○	○	○	○

[0060] <細胞の保持予定領域占有率及び保持期間の評価>

上記細胞保持評価にて観察した各L i t h o L o o p s Roundを取り出し、1ウェルあたり2 mLの上記培地が添加された24ウェルプレート（製品番号MS-80120、住友ベークライト株式会社）の培地中に、それぞれ静置したこのプレートを、インキュベータ内に静置し、37℃、5% CO₂の条件下で培養を継続した。

[0061] 各L i t h o L o o p s Roundについて、培養開始から所定期間経過ごとに、光学顕微鏡を用いて明視野画像及び蛍光画像を取得した。取得画像の一例として、図5に、培養開始から28日間経過後における枠部材の保持予定領域の面積が5024 μm^2 のときの（a）明視野画像（b）蛍光画像をそれぞれ示す。なお、図5（b）に示されている「Loop area」が当該枠部材の保持予定領域である。この結果から、細胞集団は、蛍光活性を保ったまま枠部材に保持されていることが確認された。さらに、このとき、枠部材のすべてが細胞集団により覆われている；換言すると、保持予定領域面と直交する枠部材の全断面において、外周が細胞集団により覆われている；ことを確認した。

[0062] 続いて、これらの画像から、解析ソフトウェアを用いて、保持予定領域の面積における細胞集団の占有率を算出した。図6に、各条件における細胞集団の保持予定領域占有率を示す。各グラフにおける横軸はスフェロイドサイズを、縦軸は細胞集団の保持予定領域占有率を、それぞれ表す。

[0063] 図6に示された結果から、枠部材の保持予定領域の面積が1256 μm^2 及び5024 μm^2 、且つスフェロイドサイズ0.20 mm²、0.36 mm²、及び0.64 mm²の条件においては、培養開始から28日間経過後迄、細胞の保持予定領域占有率は50%以上であった。特に、枠部材の保持予定領域の面積が1256 μm^2 、且つスフェロイドサイズ0.36 mm²の条件、及び枠部材の保持予定領域の面積が5024 μm^2 、且つスフェロイドサイズ0.36 mm²及び0.64 mm²の条件においては、培養開始から28日間経過後迄、細胞の保持予定領域占有率は80%以上であった。また、枠部材の保持予定領域の面積が1256 μm^2 、スフェロイドサイズ0.36 mm²、

且つ培養開始から14日間経過後迄、及び枠部材の保持予定領域の面積が5024 μm^2 、スフェロイドサイズ0.36 mm^2 、且つ培養開始から21日間経過後迄においては、細胞の保持予定領域占有率は90%以上であった。以上から、培養開始後14日間以上の長期間にわたって細胞保持材の保持予定領域内に細胞集団が保持されることが確認された。

[0064] 《初代細胞のポリイミド製枠部材による保持》

＜細胞数とスフェロイドサイズの関係評価＞

他の細胞種においても、細胞保持材の保持予定領域内に細胞集団が保持されるかを評価するため、肝臓由来細胞を使用して、以下の試験を行った。まず、播種細胞数とスフェロイドサイズの評価するため、細胞非（低）接着処理が施された培養容器を用いて、鶏胎児（E12）から摘出した肝臓由来細胞のスフェロイド形成を誘導した。具体的には、まず、肝臓由来細胞は、孵卵12日目の鶏卵から鶏胎児を取り出し、肝臓を摘出した。次に、摘出した肝臓をメッシュサイズ100 μm のセルストレーナー（製品番号93100、SPL Life Science社）により分散して肝臓由来細胞を得た。所定細胞数の細胞を、10% FBSを含むDMEMに懸濁して播種し、37℃、5% CO_2 の条件下で培養した。

[0065] 培養開始から1日間経過後に、いずれの細胞数においてもスフェロイドが形成されていることを確認した。このときのスフェロイドサイズを、光学顕微鏡を用いて撮影した写真から、解析ソフトウェアを用いて測定した。このときの播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフに表した結果を図7に示す。

[0066] 図7に示された結果より、鶏胎児（E12）の肝臓由来細胞においても、蛍光タンパク質発現HEK293T細胞と同様に、播種細胞数とスフェロイドサイズを両対数グラフにプロットしたとき、線形的な関係があることが分かった。

[0067] ＜細胞保持評価＞

鶏胎児（E12）の肝臓由来細胞を、10% FBSを含むDMEMに懸濁

し、スフェロイドサイズが 0.20 mm^2 となるように細胞非（低）接着処理が施された培養容器2ウェルにそれぞれ播種した。同時に、枠部材として、保持予定領域の面積が $1256\text{ }\mu\text{m}^2$ 及び $5024\text{ }\mu\text{m}^2$ のL i t h o L o o p s R o u n dを、細胞が播種されたウェル内にそれぞれ浸漬した。このプレートを、インキュベータ内に静置し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で培養を開始した。

[0068] 培養開始から1日間経過後に、各L i t h o L o o p s R o u n dを取り出し、1ウェルあたり2 mLの上記培地が添加された24ウェルプレートの培地中に、それぞれ静置した。このプレートを、インキュベータ内に静置し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で培養を継続した。

[0069] 培養開始から所定期間経過ごとに、ウェル内の様子を光学顕微鏡により観察し、細胞が枠部材に保持されているかを評価した。図8に、このときのウェル内の様子を示す。

[0070] 図8に示された結果から、鶏胎児（E12）の肝臓由来細胞のスフェロイドサイズ 0.20 mm^2 、且つ枠部材の保持予定領域の面積が $1256\text{ }\mu\text{m}^2$ 及び $5024\text{ }\mu\text{m}^2$ のとき、細胞が枠部材に保持されていた。さらに、いずれの条件においても、培養開始から14日間経過後迄、枠部材の保持予定領域内に細胞集団が保持されることが確認された。

[0071] <多種臓器由来細胞の評価>

さらに他の細胞種についても、細胞保持材の保持予定領域内に細胞集団が保持されるかを評価した。具体的には、まず、上述した肝臓由来細胞と同様の方法で、肝臓、胃、肺、心臓、及び脳由来細胞を取得した。図6において、培養開始から28日間経過後に最も細胞保持率が高かったスフェロイドサイズとなる細胞数を各臓器由来細胞の細胞播種数として設定した。表2に、各臓器由来細胞における設定細胞数を示す。ここで、表2に示されるように、脳由来細胞は、他の臓器由来細胞と異なる設定細胞数となった。このことから、脳由来細胞が占有可能な保持予定領域の面積が、他の細胞が占有可能な保持予定領域の面積と異なる可能性が示された。

[0072] [表2]

枠部材の保持予定領域 の面積 [μm^2]	設定細胞数	
	肝臓、胃、肺、心臓	脳
1256	3.29×10^4	5.59×10^4
5024	3.29×10^4	5.59×10^4
31400	26.82×10^4	49.18×10^4
125600	6.10×10^4	10.80×10^4
282600	12.39×10^4	22.44×10^4
502400	12.39×10^4	22.44×10^4

[0073] 上記で設定した細胞数の各臓器由来細胞を、10% FBSを含むDMEMに懸濁し、細胞非（低）接着処理が施された培養容器2ウェルにそれぞれ播種した。同時に、枠部材として、所定の保持予定領域の面積を有するLithoLoops Roundを、細胞が播種されたウェル内にそれぞれ浸漬した。このプレートを、インキュベータ内に静置し、37℃、5%CO₂の条件下で培養を開始した。

[0074] 培養開始から1日間経過後の各ウェル内の様子を図9に示す。いずれの臓器由来細胞も、枠部材保持予定領域のすべての面積、且つすべてのスフェロイドサイズにおいて細胞が枠部材に保持されていた。続いて、各LithoLoops Roundを取り出し、1ウェルあたり2mLの上記培地が添加された24ウェルプレートの培地中に、それぞれ静置した。このプレートを、インキュベータ内に静置し、37℃、5%CO₂の条件下で培養を続けた。

[0075] 各LithoLoops Roundについて、培養開始から所定期間経過ごとに、光学顕微鏡を用いて明視野画像を取得した。枠部材保持予定領域の面積がそれぞれ、1256 μm^2 （図10）、5024 μm^2 （図11）、31400 μm^2 （図12）、125600 μm^2 （図13）、282600 μm^2 （図14）、及び502400 μm^2 （図15）における、培養開始から1、7、及び14日間経過後の明視野画像を示す。

[0076] 続いて、これらの画像から、解析ソフトウェアを用いて、保持予定領域の

面積における細胞集団の占有率を算出した。このとき、各画像において、保持予定領域に気泡が重なっている部分を除いて算出した。図16に、各条件における細胞集団の保持予定領域占有率を示す。各グラフにおける縦軸は細胞集団の保持予定領域占有率を表す。また、表3に、各細胞における、培養開始から14日間経過後における保持予定領域占有率を示す。なお、HEK293T細胞は、図6において、培養開始から28日間経過後に最も細胞保持率が高かったスフェロイドサイズとなる細胞数における保持予定領域占有率を示した。

[0077] [表3]

材料の保持予定領域の面積 [μm^2]	1256	5024	31400	125600	282600	502400
HEK293T細胞	94.3%	92.9%	61.8%	59.2%	4.3%	45.4%
肝臓由来細胞	100%	66.7%	100%	100%	92.9%	75.4%
心臓由来細胞	100%	100%	100%	100%	100%	54.5%
胃由来細胞	100%	100%	100%	33.3%	100%	100%
脳由来細胞	9.2%	68.1%	100%	58.5%	100%	100%
肺由来細胞	66.7%	100%	100%	100%	100%	100%

[0078] 表3に示された結果から、HEK293T細胞では保持予定領域占有率が50%未満であった、材料保持予定領域の面積が282600 μm^2 及び502400 μm^2 のときにおいても、培養開始から14日間経過後における保持予定領域占有率が、いずれの臓器由来細胞においても50%以上であった。特に、材料保持予定領域の面積が282600 μm^2 のときは心臓、胃、脳、及び肺由来細胞の条件で、502400 μm^2 のときは胃、脳、及び肺由来細胞の条件で、培養開始から14日間経過後において、保持予定領域の全てを細胞集団が占有していた。

[0079] ≪HEK293T細胞の海綿製材料による保持≫

ポリイミド製材料以外においても、材料の保持予定領域内に細胞集団が保持されるかを評価するため、海綿質スポンジ（海綿製材料；材料構造の断面径：約30～60 μm ）を使用して、以下の試験を行った。蛍光タンパク質発現HEK293T細胞を、10%FBSを含むDMEMに懸濁し、

スフェロイドサイズが 0.36 mm^2 となるようにそれぞれ細胞非（低）接着処理が施された培養容器に播種した。同時に、枠部材として、海綿質スポンジ（ロージーローザ社）を、細胞が播種されたウェル内に浸漬した。このプレートを用いて、インキュベータ内に静置し、 37°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ の条件下で培養を開始した。

[0080] 培養開始から1日間経過後に、ウェル内の様子を光学顕微鏡により観察し、細胞が枠部材に保持されていることを確認した。続いて、観察した各細胞保持材を取り出し、1ウェルあたり 2 mL の上記培地が添加された24ウェルプレートの培地中に静置した。このときの海綿質スポンジの様子について、光学顕微鏡を用いて明視野画像及び蛍光画像を取得した。図17に、このときの明視野画像（左上）、蛍光画像（右上）、及びこれらの結合画像（下）を示す。

[0081] 図17に示された結果より、海綿質スポンジの枠構造部の一部に、細胞集団が保持されていることが確認された。さらに、この枠構造部について、解析ソフトウェアを用いて、当該枠構造部が形成する保持予定領域の面積、及び当該保持予定領域の面積における細胞集団の占有率を算出した。その結果、当該枠構造部が形成する保持予定領域の面積は $4717\text{ }\mu\text{m}^2$ であり、当該保持予定領域の面積における細胞集団の占有率は 100% であった。以上から、海綿製枠部材によっても、細胞が保持されることが示された。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明は、細胞の生理活性を利用した細胞センサー、再生医療や薬物動態評価のツール等として使用し得る細胞保持材の製造に利用することができる。

符号の説明

[0083] 10 細胞保持材、20 枠部材、22 保持予定領域、24 棒部材、30 細胞集団

請求の範囲

- [請求項1] 複数の細胞が集合した細胞集団が保持され得る保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材と、
前記保持予定領域の少なくとも一部を占有し、前記枠部材により保持された、膜状の前記細胞集団と、
を備え、
前記細胞集団の周縁部の少なくとも一部が前記枠部材に接触し、且つ、前記細胞集団のうち前記保持予定領域を占有する部分が宙に浮いた状態である細胞保持材。
- [請求項2] 前記保持予定領域面と直交する一断面における前記枠部材の外周が前記細胞集団により少なくとも部分的に覆われている、請求項1に記載の細胞保持材。
- [請求項3] 前記細胞集団が、前記保持予定領域の面積の50%以上を占有している、請求項1又は2に記載の細胞保持材。
- [請求項4] 前記保持予定領域が略円形又は略楕円形である、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞保持材。
- [請求項5] 前記枠部材が、前記保持予定領域の全部を囲う、請求項1～4のいずれか1項に記載の細胞保持材。
- [請求項6] 前記細胞集団の細胞が初代細胞である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞保持材。
- [請求項7] 前記細胞集団の細胞が、肝臓、胃、肺、心臓、又は脳から選択される臓器を由来とする細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の細胞保持材。
- [請求項8] 前記保持予定領域の面積が $1000 \sim 60000 \mu\text{m}^2$ である、請求項6又は7に記載の細胞保持材。
- [請求項9] 前記保持予定領域の面積が $1000 \sim 6000 \mu\text{m}^2$ である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細胞保持材。
- [請求項10] 前記細胞集団がスフェロイドを形成したときのスフェロイドサイズ

が $0.2 \sim 1.0 \text{ mm}^2$ である、請求項1～9のいずれか1項に記載の細胞保持材。

[請求項11] 請求項1～10のいずれか1項に記載の細胞保持材を含むセンサー。

[請求項12] 複数の細胞が集合した細胞集団の一部を宙に浮いた状態で保持するための枠部材であって、
前記細胞集団が保持され得る保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材。

[請求項13] 前記保持予定領域の面積が $1000 \sim 6000 \mu\text{m}^2$ である、請求項12に記載の枠部材。

[請求項14] 複数の細胞が集合した細胞集団の一部を宙に浮いた状態で保持する方法であって、
前記細胞集団又は前記細胞集団が形成したスフェロイドを含む培地に、前記細胞集団の保持予定領域の少なくとも一部又は全部を囲う枠部材を浸漬する工程を含む、細胞保持方法。

[請求項15] 前記保持予定領域の面積が $1000 \sim 6000 \mu\text{m}^2$ である、請求項14に記載の細胞保持方法。

[請求項16] 前記細胞集団がスフェロイドを形成したときのスフェロイドサイズが $0.2 \sim 1.0 \text{ mm}^2$ である、請求項14又は15に記載の細胞保持方法。