

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-155865

(P2011-155865A)

(43) 公開日 平成23年8月18日(2011.8.18)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 M	3/00	(2006.01)	C 1 2 M	3/00	A	4 B 0 2 9	
C 1 2 N	5/07	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2	4 B 0 6 5	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	A		

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2010-18665 (P2010-18665)
 (22) 出願日 平成22年1月29日 (2010.1.29)

(71) 出願人 503359821
 独立行政法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号

最終頁に続く

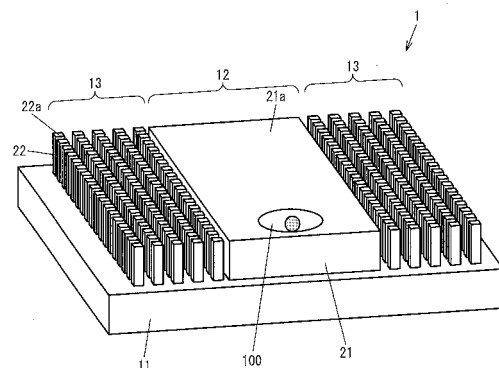
(54) 【発明の名称】 基板、細胞培養装置、細胞チップおよび培養方法

(57) 【要約】

【課題】細胞の移動および接着を高精度に制御することができ、かつ細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させることができる基板、およびこれを備えた種々の装置を提供する。

【解決手段】細胞を接着させるための接着面21aを有する接着領域12と、接着領域12に隣接して設けられる、細胞の接着を阻害するための阻害領域13とを備えており、阻害領域13は、複数の多角柱形状の構造物22を備えている。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を接着させるための接着面を有する接着領域と、
上記接着領域に隣接して設けられる、細胞の接着を阻害するための阻害領域とを備えて
おり、

上記阻害領域は、複数の多角柱形状の構造物を備えていることを特徴とする基板。

【請求項 2】

上記構造物は、上記接着面と略同じ高さの頂上面を有することを特徴とする請求項 1 に
記載の基板。

【請求項 3】

複数の上記構造物は、上記接着領域と上記阻害領域との境界に沿って、複数の列におい
て配置されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の基板。

【請求項 4】

上記構造物は、四角柱形状であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載
の基板。

【請求項 5】

上記構造物の頂上面の一辺の長さは、 $3\ \mu\text{m}$ 以上 $20\ \mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする
請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の基板。

【請求項 6】

隣接する 2 つの上記構造物の間隔は、 $0.5\ \mu\text{m}$ 以上 $1.5\ \mu\text{m}$ 以下であることを特徴
とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の基板。

【請求項 7】

上記接着領域と上記阻害領域との境界に隣接して設けられた上記構造物の頂上面におけ
る少なくとも 1 つの角は、上記接着領域に対向していることを特徴とする請求項 1 ~ 6 の
いずれか 1 項に記載の基板。

【請求項 8】

シリコン、ガラス、シリコーンゴム、プラスチックおよび金属からなる群より選択され
るいずれかにより構成されていることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の
基板。

【請求項 9】

上記構造物は、リソグラフィ法を用いて形成されたものであることを特徴とする請求
項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の基板。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の基板を備えていることを特徴とする細胞培養装置
。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の基板を備えており、

上記基板は、上記接着領域を複数備えており、かつ、複数の上記接着領域の各々に細胞
が固定されていることを特徴とする細胞チップ。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の基板を用いて細胞を培養する培養工程を含むこと
を特徴とする培養方法。

【請求項 13】

上記基板は、上記阻害領域に取り囲まれた上記接着領域を複数備えており、

上記培養工程は、複数の上記接着領域の各々において、それぞれ異なる種類の細胞を培
養するものであることを特徴とする請求項 12 に記載の培養方法。

【請求項 14】

細胞を接着させるための接着面を有する接着領域と、

上記接着領域に沿って、細胞の接着を阻害するための溝が設けられていることを特徴と
する基板。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を接着させる基板、これを備えた細胞培養装置および細胞チップ、ならびに培養方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞の移動を制御し、かつ細胞を接着させる技術は、医学的、工学的な応用に有用であり、再生医療、組織工学、臨床診断、生物医学実験、抗生物汚染材料の開発などの基盤をなす。また、当該技術は、細胞の移動/接着のメカニズムに対する解明に有用である。

10

【0003】

特許文献1には、ナノファイバーを利用した細胞接着基材について記載されている。

【0004】

非特許文献1には、2次元平面を化学修飾することによって、細胞の接着・非接着領域を作製し、細胞をパターンニングする技術が記載されている。非接着領域を形成する物質として、poly-L-lysine-g-poly(ethylene glycol)が記載されている。

【0005】

非特許文献2には、2次元平面を化学修飾することによって、細胞の接着・非接着領域を作製し、細胞の移動運動を制御する技術が記載されている。

【0006】

20

非特許文献3には、側面が疎水性である数十マイクロメートルオーダーのサイズの構造物を利用して、この構造物と構造物との間に空気をトラップして構造物間への細胞の進入を阻むことによって、当該構造物上に細胞をパターンニングする技術が記載されている。

【0007】

非特許文献4には、ファイブロネクチンでコートされたPDMS製であり、かつマイクロメートルオーダーのサイズである柱状構造体が集合した領域に対して、繊維芽細胞の進入が抑制されることが記載されている。

【0008】

非特許文献5には、表面の格子形マイクロテクスチャーの密度勾配および異方性を利用して、細胞の移動運動を制御することによって、標的の領域に細胞を捕集する技術が記載されている。

30

【0009】

また、非特許文献6～8には、溝が設けられた基板が記載されている。これらの溝は、この溝に沿って細胞を並べるためのものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2007-44149号公報(2007年2月22日公開)

【非特許文献】

【0011】

40

【非特許文献1】Csucs G, Michel R, Lussi JW, Textor M, and Danuser G. (2003) *Bio materials*, Vol. 24, pp. 1713-1720.

【非特許文献2】Kumar G, Ho C-C, and Carlos C. C. (2007) *Adv. Mater.*, Vol. 19, p. 1084-1090.

【非特許文献3】Wang Y, Sims C. E., Marc P., Bechman M. Li G. P., and Allbritton N. L. (2006) *Langmuir*, Vol. 22, pp. 8257-8262.

【非特許文献4】Lea M. G., Digabel J. L., Richert A. Hersen P. and Ladoux B. (2009) *Biophys. J.*, Vol. 97, pp. 357-368.

【非特許文献5】D.-H. Kim, C.-H. Seo, K Han, K.-W. Kwon, A. Levchenko, and K.-& Suh, (2009) *Adv. Funct. Mater.*, Vol. 19, pp. 1579-1586.

50

【非特許文献6】P. CLARK, P. CONNOLLY, A. S. G. CURTIS, J. A. T. DOW and C. D. WILKINSON (1990) Development 108, 635-644.

【非特許文献7】Peter M. Stevenson and Athene M. Donald (2009) Langmuir, 25, 367-376.

【非特許文献8】Wen-Ta Su, Yung-Feng Liao, I.-Ming Chu (2007) Micron 38, 278-285

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

細胞の移動を制御し、かつ細胞を接着させる技術は、上述したように様々な分野に有用な技術であるため、幅広く応用可能な技術が必要である。そのために、当該技術は、「細胞の移動を高精度に制御する」ことができ、かつ「細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させる」ことができる必要がある。

10

【0013】

「細胞の移動を高精度に制御する」ためには、細胞を接着させない（排除する）領域（以下、「細胞非接着領域」ともいう。）からの細胞の排除と、細胞を接着（適合）させる領域（以下、「細胞接着領域」ともいう。）への細胞の接着とを、高精度に行なうことが重要である。そのために、細胞非接着領域からの排除、および細胞接着領域への接着については、多種類の細胞に対して有効性があるものが求められる。また、細胞非接着領域は、細胞の非特異的な接着を十分に排除できるものが求められる。

20

【0014】

また、「細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させる」ためには、細胞接着領域の形、サイズ、配置などを自由に設計できることが重要である。

【0015】

しかし、従来技術では、これらの両方を達成できる、有効な手段を確立することが困難である。

【0016】

例えば、非特許文献1に記載された技術では、長時間の培養によって、細かいパターンが崩れてしまい、細胞非接着領域に細胞が非特異的に接着してしまうという問題が生じる。

30

【0017】

また、非特許文献2に記載された技術では、表面の化学的性質に対する接着の選択性が低い細胞、移動性が高い細胞などに対しては、細胞接着領域への接着と、細胞非接着領域からの排除とが精度よく行なわれないおそれが高く、多種類の細胞に対する有効性が低いという問題がある。

【0018】

また、非特許文献3に記載された技術では、細胞よりも大きなサイズの構造物を用いるため、細かい設計ができず、目的、用途等に応じたフレキシビリティがないという問題がある。

【0019】

また、非特許文献4に記載された柱状構造体が集合した領域は、細胞の進入を完全に排除することができない。また、非特許文献4では、比較的移動性が低い繊維芽細胞を用いているため、より移動性が高い細胞を用いた場合には、その進入を阻む確率がさらに低くなる可能性がある。そのため、これを細胞非接着領域として用いた場合には、細胞の非特異的な接着を十分に排除できない。また、多種類の細胞に対する有効性が低いという問題がある。

40

【0020】

また、非特許文献5に記載された技術では、細胞を捕集するための標的の領域（細胞接着領域）以外の領域（細胞非接着領域）から細胞を完全に除去することができないので、細胞の細胞非接着領域への非特異的な接着を十分に排除できない。

50

【0021】

また、非特許文献6～8に記載された基板に設けられた溝によっては、移動性が高い細胞の進入を十分に阻害することはできない。また、これらの技術では、細胞接着領域を自由に設計することができないという問題がある。

【0022】

本発明は、上記の従来技術が有する問題に鑑みてなされたものであり、その主な目的は、細胞の移動および接着を高精度に制御することができ、かつ細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させることができる基板、およびこれを備えた種々の装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0023】

上記の課題を解決するために、本発明に係る基板は、細胞を接着させるための接着面を有する接着領域と、上記接着領域に隣接して設けられる、細胞の接着を阻害するための阻害領域とを備えており、上記阻害領域は、複数の多角柱形状の構造物を備えていることを特徴とする。

【0024】

また、本発明に係る基板では、上記構造物は、上記接着面と略同じ高さの頂上面を有することが好ましい。

【0025】

また、本発明に係る基板では、上記構造物は、四角柱形状であることが好ましい。

【0026】

また、本発明に係る基板では、複数の上記構造物は、上記接着領域と上記阻害領域との境界に沿って、複数の列において配置されていることが好ましい。

【0027】

また、本発明に係る基板では、上記構造物の頂上面の一辺の長さは、 $3\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

【0028】

また、本発明に係る基板では、隣接する2つの上記構造物の間隔は、 $0.5\mu\text{m}$ 以上 $1.5\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

【0029】

また、本発明に係る基板では、上記接着領域と上記阻害領域との境界に隣接して設けられた上記構造物の頂上面における少なくとも1つの角は、上記接着領域に対向していることが好ましい。

【0030】

また、本発明に係る基板では、シリコン、ガラス、シリコンゴム、プラスチックおよび金属からなる群より選択されるいずれかにより構成されていることが好ましい。

【0031】

また、本発明に係る基板では、上記構造物は、リソグラフィー法を用いて形成されたものであることが好ましい。

【0032】

本発明に係る細胞培養装置は、上述したいずれかの基板を備えていることを特徴とする。

【0033】

本発明に係る細胞チップは、上述したいずれかの基板を備えており、上記基板は、上記接着領域を複数備えており、かつ、複数の上記接着領域の各々に細胞が固定されていることを特徴とする。

【0034】

本発明に係る培養方法は、上述したいずれかの基板を用いて細胞を培養する培養工程を含むことを特徴とする。

【0035】

10

20

30

40

50

また、本発明に係る培養方法では、上記基板は、上記阻害領域に取り囲まれた上記接着領域を複数備えており、上記培養工程は、複数の上記接着領域の各々において、それぞれ異なる種類の細胞を培養するものであることが好ましい。

【0036】

本発明に係る基板は、細胞を接着させるための接着面を有する接着領域と、上記接着領域に沿って、細胞の接着を阻害するための溝が設けられていることを特徴とする。

【発明の効果】

【0037】

本発明によれば、細胞の移動および接着を高精度に制御することができ、かつ細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させることができる。したがって、細胞のガイディング、捕集、ソーティング、パターンニング等を行なうためのデバイス（バイオメディカルデバイス）を提供できるとともに、当該デバイスの精度および設計についての自由度を大幅に向上させることができるので、高性能のバイオメディカルデバイスを提供することが可能になる。このようなデバイスは、再生医療、組織工学、臨床診断、生物医学実験、抗生物汚染材料など、広い範囲に応用して利用することが可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】本発明に係る基板の一実施形態を示す図である。

【図2】図1に示す基板における阻害領域の構造を示す図である。

【図3】本発明に係る基板の一実施形態における阻害領域の構成の一変形例を示す図である。

20

【図4】本発明に係る細胞チップの一実施形態を示す図である。

【図5】本発明の一実施形態における細胞チップの一変形例を示す図である。

【図6】本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。

【図7】本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。

【図8】本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。

【図9】(a)～(b)は、本発明の一実施形態における細胞チップを製造する方法について説明するための図である。

【図10】(a)～(f)は、本発明の一実施形態における基板を製造する方法について説明するための図である。

30

【図11】(a)～(c)は、本発明の一実施形態における基板を製造する方法について説明するための図である。

【図12】本発明に係る細胞培養装置の一実施形態の構成を示す図である。

【図13】本発明に係る基板の他の実施形態を示す図である。

【図14】本発明の一実施例における基板の構造物の配置間隔 b と辺長 a との関係を表すグラフである。

【図15】(a)～(f)は、本発明の一実施例における基板上的ケラトサイトについての、それぞれ観察開始から0分後、1分30秒後、2分30秒後、3分30秒後、4分30秒後、6分後における顕微鏡画像を表す図である。

【図16】(a)～(f)は、本発明の他の実施例における基板上的ケラトサイトについての、それぞれ観察開始から0分後、2分後、4分後、6分後、8分後、9分30秒後における顕微鏡画像を表す図である。

40

【図17】(a)～(f)は、本発明の他の実施例における基板上的ケラトサイトについての、それぞれ観察開始から0分後、1分30秒後、3分後、4分30秒後、6分後、7分30秒後における顕微鏡画像を表す図である。

【図18】(a)～(c)は、細胞の進入角を測定する方法を説明するための図である。

【図19】本発明の他の実施例における基板について、構造物の配置間隔が $3\mu\text{m}$ である場合の、細胞の進入角と阻害領域による阻害効果との関係を示す図である。

【図20】(a)～(h)は、本発明の実施例5における基板上的ケラトサイトについての、それぞれ観察開始から0分後、2分後、4分後、6分後、8分後、10分後、12分

50

後、14分後における顕微鏡画像を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

以下に、本発明に係る実施形態について説明する。

【0040】

<第1実施形態>

〔基板1〕

まず、本発明に係る基板の一実施形態における基本的な構成について説明する。図1は、本発明に係る基板の一実施形態を示す図である。

【0041】

図1に示す基板1は、基材11上に接着領域12と阻害領域13とを備えた板である。基板1の材料としては、例えばシリコン、ガラス、シリコーンゴム、プラスチック、金属等が挙げられる。シリコーンゴムとしてはPDMS等が挙げられる。また、プラスチックとしてはポリスチレン等が挙げられる。シリコンであれば、微細構造を形成することが容易であるため好ましく、また、電極を設けること、温度制御回路を設けることなどが容易にできるため、培養に用いる基板などに好適である。また、ガラスであれば、透光性であるため好ましい。

【0042】

接着領域12は、細胞100を接着させるための領域であり、接着面21aを有する。すなわち、接着領域12とは、ここでは基材11上に形成された接着部21の上面である接着面21a上の領域をさす。接着部21の材料としては、例えば上述した基板1の材料と同じものを用いることができる。

【0043】

ここで、細胞が接着領域12に「接着する」とは、細胞が1つの接着領域12の接着面21aに接触している状態をさし、必ずしも細胞が静止していなくてもよい。すなわち、細胞は、接着面21aに接触しながら接着領域12内を移動している状態であっても、その接着領域12外に移動しない限り、その接着領域12に接着しているということとする。

【0044】

接着面21aは、細胞100を接着させる面であり、ここでは平面である。接着面21aは、シリカ(SiO₂)膜、金(Au)膜等によって覆われていることが好ましく、ファイブロネクチン(fibronectin)、コラーゲン、poly-L-lysineによってコートされていてもよい。なお、接着面は、特にこれに限らず、細胞が接着し得るものであればよい。

【0045】

阻害領域13は、接着領域12に隣接して設けられ、細胞100の接着を阻害するための領域である。阻害領域13は、複数の構造物22を備えている。構造物22は、接着領域12と阻害領域13との境界に沿って、複数の列を構成するように配置されている。すなわち、構造物22は、接着領域12と阻害領域13との境界に沿って配列された第1の列、当該第1の列に沿って配列された第2の列、当該第2の列に沿って配列された第3の列、というような複数の列を構成している。なお、本実施形態における阻害領域13は、上述した構成に限らず、構造物が接着領域と阻害領域との境界に沿って1列に配置されていてもよく、2列以上に配置されていてもよい。

【0046】

また、阻害領域13は、格子状に設けられた多数の溝を備えた領域と言い換えることもできる。すなわち、複数の構造物22は、当該多数の溝が設けられることによって形成されるものであり、1つの構造物22は4つの溝によって四方を囲まれた部材であると言い換えることができる。このように、阻害領域13は、溝と、複数の構造物22がそれぞれ有する角とを、それぞれ多数備えたものである。

【0047】

ここで、阻害領域13が細胞の接着を「阻害する」とは、阻害領域13への細胞の進入

10

20

30

40

50

を抑制し、または阻害領域 1 3 内に存在する細胞を一定時間内に一定以上の確率で阻害領域 1 3 外に移動させることをいう。すなわち、阻害領域 1 3 は、一定時間以上において細胞が留まることが抑制される領域である。

【0048】

構造物 2 2 は、接着面 2 1 a と平行な面であって接着面 2 1 a よりも低い面である基材 1 1 の面上に、垂直方向に形成された、四角柱である。また、構造物 2 2 は、接着面 2 1 a と略同じ高さの頂上面 2 2 a を有する。

【0049】

構造物 2 2 の材料としては、例えば上述した基板 1 の材料と同じものを用いることができる。また、構造物 2 2 は、SiO₂ 膜、Au 膜等によって覆われていてもよいし、構造物 2 2 を構成するシリコン、ガラス、PDMS 等が剥き出しになっているものであってもよい。

10

【0050】

また、構造物 2 2 の表面には、生体分子（タンパク質、核酸、糖質、脂質等、一般に生体に含まれる分子）、化学物質（例えばアルキルチオール、ポリ L リジン（poly-L-lysine）、ポリ D リジン（poly-D-Lysine）等）、マイクロ・ナノビーズ等が付着されていてもよい。タンパク質としては、ファイブロネクチン（fibronectin）、コラーゲン（collagen）、ラミニン（laminin）等が挙げられる。マイクロ・ナノビーズ等を付着させる方法としては、例えばエレクトロスプレーを用いるデポジション法などが挙げられる。合成高分子、生体高分子（タンパク質等）などをエレクトロスプレーデポジション法によりスプレーすると、スプレー条件に応じて、ナノ粒子、ナノファイバー等を形成させることができる。後述する実施例にて示すように、本実施形態に係る基板 1 における阻害領域 1 3 は、その表面に、例えば細胞接着を促進する化学物質などがコートされていても、細胞の接着を阻害することができる。

20

【0051】

阻害領域 1 3 は、細胞の接着を阻害する阻害率が 90% 以上であることが好ましく、100% であることがより好ましい。阻害領域 1 3 が接着領域 1 2 に隣接して備えられることによって、接着領域 1 2 に存在する細胞が阻害領域 1 3 に進入することを阻害するとともに、阻害領域 1 3 に存在する細胞を速やかに接着領域 1 2 に移動させることができる。したがって、阻害領域 1 3 は、接着領域 1 2 に対する壁（仮想壁）として働き、細胞 1 0 0 を接着領域 1 2 内に留めておくことができる。

30

【0052】

ここで、本明細書において「阻害率」とは、細胞の接着を阻害する割合であり、換言すれば細胞が排除される割合である。阻害領域 1 3 の阻害率は、細胞が阻害領域 1 3 から排除される割合を計測することによって求めることができる。細胞が阻害領域 1 3 から排除されるか否かは、例えば顕微鏡などを用いて細胞を観察し、接着領域 1 2 側から接着領域 1 2 と阻害領域 1 3 との境界に到達した細胞が、所定時間内に向きを変えて接着領域 1 2 内に戻った場合には、細胞は排除されたと判断し、所定時間経過後も阻害領域 1 3 内に留まっていた場合には、細胞は排除されなかったと判断することができる。

40

【0053】

上述した構成によれば、基板 1 は、細胞 1 0 0 を接着領域 1 2 内に留めておくことができる。したがって、接着領域 1 2 は、例えば細胞 1 0 0 を培養するための領域、細胞 1 0 0 を固定するための領域、細胞の移動性等を顕微鏡観察するための領域に用いることができる。

【0054】

また、接着領域 1 2 は、隣接する阻害領域 1 3 の配置によって、任意のサイズ、形状、配置などに設計することが可能である。例えば接着領域 1 2 は、2 つの細胞培養用の接着領域をつなぐゲート、細胞 1 0 0 が移動するための通路（パス）などの機能を有するものとすることもできる。

【0055】

50

なお、本実施形態に係る基板 1 は、上述した構成に限らず、複数の接着領域を備えていてもよい。これによって、本実施形態は、複数の細胞を複数の接着領域にそれぞれ固定した細胞チップ、複数の接着領域の各々にそれぞれ異なる種類の細胞を培養する共培養用の培養基板などを提供することができる。

【0056】

障害領域 13 の構造についてさらに詳細に説明する。図 2 は、図 1 に示す基板における障害領域の構造を示す図である。

【0057】

障害領域 13 における構造物 22 の頂上面 22a は、四角形である場合には、例えば一辺の長さ（辺長） a が $3\ \mu\text{m}$ 以上 $20\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。また、隣接する 2 つの構造物 22 の間隔（配置間隔） b は、接着を障害したい細胞の大きさ（例えば直径等）より小さいことが好ましく、 $0.5\ \mu\text{m}$ 以上 $1.5\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。このような構成であることによって、後述する実施例にて示すように、本実施形態に係る基板 1 は、障害領域 13 への細胞の接着を効率よく障害することができる。

10

【0058】

また、構造物 22 の高さ h は、数 μm 以上、数十 μm 以下であることが好ましい。より好ましくは、略 $20\ \mu\text{m}$ である。

【0059】

なお、障害領域 13 に備えられる構造物は、上述した四角柱形状に限らず、四角柱形状以外の多角柱形状であってもよい。また、接着領域 12 と障害領域 13 との境界に隣接して設けられた構造物の頂上面における少なくとも 1 つの角は、接着領域 12 に対向していてもよい。これによって、障害領域 13 に対する細胞の接着をより強く障害できる効果が期待できる。

20

【0060】

また、本実施形態においては、構造物 22 の頂上面 22a は、接着面 21a と略同じ高さであるが、特にこれに限定されない。しかし、構造物 22 の頂上面 22a が接着面 21a と略同じ高さであれば、障害領域 13 に接着面 21a よりも高い構造物などが形成されないので、接着領域 12 の周囲に接着面 21a よりも高い障害物がないこととなる。また、接着面 21a と頂上面 22a とが略同一平面上に存在する。したがって、接着領域 12 への培地の供給、接着領域 12 からの培地の排出などを容易に行なうことができるとともに、培地を接着領域 12 上の培養細胞に均一に供給することができる。

30

【0061】

（障害領域 13 の変形例）

本実施形態における障害領域 13 の変形例について、図 3 を参照して説明する。図 3 は、本発明に係る基板の一実施形態における障害領域の構成の一変形例を示す図である。

【0062】

図 3 に示すように、障害領域 13a、13b は、それぞれ接着領域 12 と障害領域 13a との境界線に平行に伸びる、幅 $15\ \mu\text{m}$ の帯状の領域であり、接着領域 12 に隣接して並列に設けられる。すなわち、障害領域 13a は接着領域 12 に隣接して設けられており、障害領域 13b は、接着領域 12 に対して障害領域 13a よりも外側に設けられる。なお、障害領域 13a と障害領域 13b との間は接着領域であってもよく、障害領域 13a と障害領域 13b との間の距離は、接着領域 12 に接着させる細胞のサイズ以上であることが好ましく、例えば一般の培養細胞であれば数十 μm 以上であることが好ましい。また、当該距離は、略 $100\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

40

【0063】

このような構成であれば、接着領域 12 から障害領域 13a、13b への細胞 100 の進入をより強く障害できる。例えば、多くの細胞 100 は障害領域 13a によって進入を障害されるが、一部の細胞 100 が障害領域 13a を通過してしまった場合でも、さらに外側に設けられた障害領域 13b によって、その進入が障害される。したがって、高効率障害領域 13' を形成させることができる。

50

【0064】

本変形例においては、阻害領域13aおよび13bは、それぞれ細胞の接着の阻害率が90%以上100%以下であることが好ましいが、90%以上99%未満であってもよい。阻害領域13aおよび13bの阻害率が90%以上99%未満である場合でも、上述した構成であれば、高効率阻害領域13'においては細胞の接着の阻害率を99%以上にすることが可能になる。

【0065】

なお、本変形例においては、阻害領域13aおよび13bは、幅15 μ mの帯状の領域であるが、特にこの形状、幅には限定されない。阻害領域13aおよび13bは、接着領域12と阻害領域13aとの境界線に垂直な方向の幅が、それぞれ排除しようとする細胞の大きさ(例えば直径など)の最大値よりも大きいものであることが好ましい。

10

【0066】

〔基板の製造方法〕

次に、本発明に係る基板を製造する方法の一例について説明する。図10(a)~(f)および図11(a)~(c)は、本発明の一実施形態における基板を製造する方法について説明するための図である。なお、ここでは、基板の製造方法において、阻害領域13を形成させる工程について説明するが、当該工程によって同時に接着領域12をも形成させることが可能である。

【0067】

阻害領域13は、以下に説明するように、リソグラフィー法を用いて形成させることができる。ここでは、シリコンを用いて、SiO₂膜によって覆われている阻害領域13を形成する場合について説明する。リソグラフィー法を用いることによって、精度よく、シャープなエッジを備えた阻害領域13を形成させることができる。なお、基板がシリコンゴム(例えばPDMS)などからなる場合には、阻害領域13は、型を用いた転写によっても形成させることができる。

20

【0068】

(阻害領域13の形成方法1)

阻害領域13の形成方法1では、図10(a)~(f)を参照して、10~20 μ mの高さの構造物22を備えた阻害領域13を形成する場合について説明する。

【0069】

まず、シリコンウエハ31にフォトレジスト41をコーティングする(図10(a))。シリコンウエハ31としては、例えば6インチなどのものを用いることができ、フォトレジスト41としては、例えばAZ5214E(Clariant社製)などを用いることができる。

30

【0070】

次に、フォトレジスト41上にフォトマスク42をのせてバキュームによってコンタクトさせ、その上からUVを照射してフォトリソグラフィーを行なう(図10(b))。その結果、フォトレジスト41がパターン化される(図10(c))。

【0071】

次に、深掘り反応性イオンエッチング(DRIE: Deep Reactive Ion Etching)によってドライエッチングを行なう(図10(d))。その後、フォトレジスト41を取り除き(図10(e))、SiO₂膜32を成膜する(図10(f))。なお、SiO₂膜32によって覆う代わりに、例えばAuを析出させてAu膜によって覆ってもよい。

40

【0072】

以上の方法によって、複数の構造物22を備えた阻害領域13を形成することができる。

【0073】

(阻害領域13の形成方法2)

阻害領域13の形成方法2では、図11(a)~(c)を参照して、5 μ m以下の高さの構造物22を備えた阻害領域13を形成する場合について説明する。

50

【0074】

まず、シリコンウエハ33上にSiO₂膜34を成膜し、その上にフォトレジスト43をコーティングする(図11(a))。シリコンウエハ33およびフォトレジスト43としては、上述したシリコンウエハ31およびフォトレジスト41と同じものを用いることができる。

【0075】

次に、フォトレジスト43上にフォトマスク44をのせてバキュームによってコンタクトさせ、その上からUVを照射してフォトリソグラフィを行なう(図11(b))。その結果、フォトレジスト43がパターン化される。

【0076】

次に、反応性イオンエッチングを行なう(図10(c))。その後、図示しないが、フォトレジスト43およびSiO₂膜34を取り除き、SiO₂膜を成膜する。

【0077】

以上の方法によって、複数の構造物22を備えた阻害領域13を形成することができる。

【0078】

〔細胞チップ〕

次に、本発明に係る細胞チップの一実施形態について説明する。図4は、本発明に係る細胞チップの一実施形態を示す図である。なお、本実施形態における細胞チップは、上述した基板1の基本的な構成を備えている。したがって、基板1における構成要素と同様の機能を有する構成要素には同一の番号を付して、その詳細な説明を省略する。

【0079】

図4に示す細胞チップ2aは、基材11上に、複数の接着領域12a、12b、12cと、阻害領域13とを備えたチップである。細胞チップ2aの材料としては、上述した基板1の材料と同じものを用いることができる。また、細胞チップ2aとしては、ガラスなどの透明な材料、偏光子としての特性等を有さない材料、などを用いることがより好ましい。これによって、顕微鏡観察を容易にすることができる。

【0080】

接着領域12a、12b、12cは、細胞を接着させるための領域であり、接着面21aを有する。接着領域12aには多細胞がパターンング(固定)されており、接着領域12bには1細胞がパターンングされている。接着領域12a、12bの各々に固定されている細胞は、それぞれ同じであってもよいし、異なってもよい。また、接着領域12cは、細胞の運動性等を観察するための領域である。

【0081】

なお、本明細書において「多細胞」とは、2個以上の細胞をさし、例えば複数の単一種類の細胞が高密度に凝集した細胞塊などが挙げられる。

【0082】

阻害領域13は、複数の接着領域12a、12b、12cの間を隔てるように形成されている。したがって、本実施形態における細胞チップ2aでは、接着領域12a、12b、12cの各々に接着し、あるいは固定された細胞が、互いに混じることがない。

【0083】

以上の構成のように、本実施形態に係る細胞チップは、複数の接着領域を備えており、当該複数の接着領域の一部または全てに細胞が固定されている。当該複数の接着領域の各々は、多細胞が固定されたものであってもよいし、1細胞が固定されたものであってもよい。また、当該複数の接着領域のいずれかは、細胞を観察するための領域であってもよい。

【0084】

次に、本実施形態の変形例について説明する。本実施形態は、以下の各変形例に示すように、市販の生物顕微鏡、プレートリーダー等による各種の検査・測定に用いるためのチップとして利用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

(変形例 1)

図 5 は、本発明の一実施形態における細胞チップの一変形例を示す図である。図 5 に示す細胞チップ 2 b は、それぞれ異なる形状の複数の接着領域 1 2 d、1 2 e、1 2 f と、当該接着領域 1 2 d、1 2 e、1 2 f が形成されていない領域全体に形成された阻害領域 1 3 とを備えている。細胞チップ 2 b の材料としては、細胞チップ 2 a と同じものを用いることができる。

【 0 0 8 6 】

複数の接着領域 1 2 d、1 2 e、1 2 f は、例えば、多細胞がパターンニングされた領域、1 細胞がパターンニングされた領域、細胞を観察するための領域等であってもよい。

10

【 0 0 8 7 】

なお、本変形例においては、細胞チップ 2 b の表面は 2 6 m m × 7 6 m m の長方形であるが、特にこの大きさ、形状等に限定されない。

【 0 0 8 8 】

本変形例であれば、本実施形態は、市販の生物顕微鏡等による観察などに用いるためのスライドグラス等としても利用可能である。

【 0 0 8 9 】

(変形例 2)

図 6 は、本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。図 6 に示す細胞チップ 2 c は、細胞チップ 2 c に形成された複数の凹み部分のそれぞれに、パターン形成領域 1 4 a、1 4 b、1 4 c、1 4 d を備えている。細胞チップ 2 c の材料としては、細胞チップ 2 a と同じものを用いることができる。

20

【 0 0 9 0 】

パターン形成領域 1 4 a、1 4 b、1 4 c、1 4 d は、それぞれ複数の接着領域と阻害領域とのパターンが形成された領域である。パターン形成領域 1 4 a、1 4 b、1 4 c、1 4 d の各々におけるパターンは、それぞれ異なってもよいし、同じであってもよい。また、パターン形成領域 1 4 a、1 4 b、1 4 c、1 4 d に形成された接着領域は、例えば、多細胞をパターンニングするための領域、1 細胞をパターンニングするための領域、細胞の運動性等を観察するための領域等に用いられることができ、細胞が固定されていてもよい。

30

【 0 0 9 1 】

なお、本変形例においては、細胞チップ 2 c は、2 6 m m × 7 6 m m の大きさ、および 0 . 1 7 m m の高さを有する直方体であるが、特にこの大きさ、形状等に限定されない。

【 0 0 9 2 】

本変形例であれば、本実施形態は、市販の生物顕微鏡等による観察などに用いるためのスライドグラス等としても利用可能である。また、底面の厚さがカバーグラスと同程度に薄いため、生物顕微鏡によって底面側から細胞を観察することが可能である。

【 0 0 9 3 】

(変形例 3)

図 7 は、本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。図 7 に示す細胞チップ 2 d は、丸形状の複数の接着領域 1 2 と、当該接着領域 1 2 が形成されていない領域全体に形成された阻害領域 1 3 とを備えている。細胞チップ 2 d の材料としては、細胞チップ 2 a と同じものを用いることができる。

40

【 0 0 9 4 】

複数の接着領域 1 2 は、それぞれ例えば、多細胞をパターンニングするための領域、1 細胞をパターンニングするための領域、細胞を観察するための領域等であってもよい。また、複数の接着領域 1 2 の各々には、細胞が固定されていてもよい。

【 0 0 9 5 】

なお、本変形例においては、細胞チップ 2 d の表面は直径 9 0 m m の丸形状であるが、特にこの大きさ、形状等には限定されない。たとえば直径 3 5 m m、6 0 m m 等であって

50

もよい。

【0096】

本変形例であれば、本実施形態は、培養用シャーレ、ガラスボトムディッシュ等としても利用可能である。

【0097】

(変形例4)

図8は、本発明の一実施形態における細胞チップの他の変形例を示す図である。図8に示す細胞チップ2eは、丸形状の複数の接着領域12と、当該接着領域12が形成されていない領域全体に形成された阻害領域13とを備えている。細胞チップ2eの材料としては、細胞チップ2aと同じものを用いることができる。

10

【0098】

複数の接着領域12は、細胞チップ2eにマトリクス状に配置されている。複数の接着領域12は、それぞれ例えば、多細胞をパターンニングするための領域、1細胞をパターンニングするための領域、細胞を観察するための領域等であってもよい。また、複数の接着領域12の各々には、細胞が固定されていてもよい。

【0099】

なお、本変形例においては、細胞チップ2eの表面は、86mm×128mmの長方形であるが、特にこの大きさ、形状等には限定されない。また、複数の接着領域12の数および配置は、特に限定されないが、例えば1つの細胞チップ2eに、2×3(6個)、3×4(12個)、4×6(24個)、6×8(48個)、8×12(96個)などであってもよい。

20

【0100】

本変形例であれば、本実施形態は、市販のプレートリーダー等による各種の検査・測定に用いるためのウェルプレート等としても利用可能である。

【0101】

〔細胞チップの製造方法〕

次に、本実施形態における細胞チップの製造方法について説明する。図9(a)~(b)は、本発明の一実施形態における細胞チップを製造する方法について説明するための図である。

【0102】

細胞チップ2は、例えば、図9(a)~(b)に示すような漏斗23を用いて製造することができる。漏斗23は、細胞チップ2における複数の接着領域12の各々に対応する、複数の孔が形成されているものである。これらの孔は、対応する接着領域に播種される細胞を通すための孔である。また、漏斗23は、細胞チップ2と組み合わせられることによって、細胞チップ2における阻害領域13を覆うものである。

30

【0103】

漏斗23と細胞チップ2とを組み合わせ、漏斗23の孔を通して、各細胞100a、100b、100cをそれぞれ目的の接着領域12に播種する。この方法によれば、細胞が阻害領域13に広がることを防止することができるので、多数の種類を、1つの細胞チップ2における複数の接着領域12の各々に、互いに混ざることなく播種および固定することができる。

40

【0104】

〔細胞培養装置〕

次に、本発明に係る細胞培養装置の一実施形態について説明する。図12は、本発明に係る細胞培養装置の一実施形態の構成を示す図である。

【0105】

図12に示す細胞培養装置50は、基板1上において細胞を培養するための装置であり、チャンパー51と、容器52、53と、制御部54とを備えている。各容器52、53は、それぞれ配管55、56を介してチャンパー51に接続されている。配管55、56には、それぞれ開閉弁57、58が設けられている。また、制御部54は、少なくとも開

50

閉弁 57、58 に信号線 59 によって接続されている。

【0106】

チャンパー 51 は、基板 1 を備えている容器である。なお、ここでは、基板 1 は、接着領域 12 に接着した細胞を培養するものである。

【0107】

チャンパー 51 内では、基板 1 上において細胞を培養することができる。チャンパー 51 には、図示しないが、例えばチャンパー 51 内にガスを導入するためのガス導入口、チャンパー 51 から外部にガスを排出するためのガス排出口、チャンパー 51 内の温度を調節するための温度調節器などが設けられていてもよい。

【0108】

容器 52 は、チャンパー 51 に供給するための培地を貯める容器である。容器 53 は、チャンパー 51 から排出された培地を貯めるための容器である。開閉弁 57、58 は、その開閉によって、それぞれ配管 55、56 を流れる液体の流量を調節する弁である。制御部 54 は、開閉弁 57、58 の開閉を制御する。

【0109】

制御部 54 は、開閉弁 57 を開けることによって、容器 52 内の培地をチャンパー 51 内に供給する。また、開閉弁 58 を開けることによって、チャンパー 51 内の培地を容器 53 に排出させる。これによって、チャンパー 51 内の培地を、別の培地に交換することができる。また、チャンパー 51 内に常に新鮮な培地を供給し続けることもできる。

【0110】

また、制御部 54 は、開閉弁 57、58 を閉じることによって、チャンパー 51 を密閉することができる。

【0111】

細胞培養装置 50 における基板 1 は、上述したように、接着領域 12 の周囲に接着面 21a よりも高い障害物がなく、また、接着領域 12 の接着面 21a と阻害領域 13 の構造物 22 の頂上面 22a とが略同一平面上に存在する。したがって、細胞培養装置 50 では、チャンパー 51 内の培地を交換することによって、接着領域 12 上に接触する培地を容易に交換することができる。

【0112】

〔培養方法〕

本発明に係る培養方法について、上述した基板 1 を用いる場合を例にして説明する。

【0113】

本実施形態における培養方法は、基板 1 を用いて細胞を培養する培養工程を含む。

【0114】

培養工程では、基板 1 の接着領域 12 に細胞を接着させて培養する。基板 1 を用いることによって、接着領域 12 内に細胞を留めたまま培養することができる。

【0115】

なお、阻害領域 13 に取り囲まれた接着領域 12 を複数備えている基板を用いてもよい。この場合には、それぞれの接着領域 12 に、それぞれ異なる種類の細胞を接着させて培養することによって、共培養してもよい。本実施形態であれば、阻害領域 13 によって、それぞれの接着領域 12 における細胞が互いに混じることを防ぐことができる。

【0116】

〔本実施形態の効果〕

以上の構成によって、本実施形態は、以下の効果を有するものである。また、本実施形態が以下の結果を有することは、後述する各実施例の結果からも強く示唆される。

(1) 本実施形態に係る基板は、多種類の細胞に対して有効であり、かつ、細胞の接着を十分に排除できる阻害領域を備えている。

(2) 本実施形態に係る基板は、阻害領域を備えることによって、接着領域の形、サイズ、および配置を自由に設計することが可能である。

【0117】

10

20

30

40

50

これによって、本実施形態は、細胞の移動および接着を高精度に制御することができ、かつ細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させることができるので、優れた精度と高いフレキシビリティとを両立させた手段を提供できるものである。

【0118】

本実施形態の障害領域は、上述した構成によって、マイクロメートルオーダーの微細単位構造を繰り返し配置した微細凹凸表面となっているものであり、細胞の接着を非常に強力に排除する細胞非接着（排除）表面として機能する。本実施形態は、障害領域の構成によって細胞の接着を障害するものであるため、表面の化学的性質に対する接着の選択性が低い細胞にも適用することができる。このような障害領域は、接着領域と自由に組み合わせ使用することが可能である。したがって、任意のサイズ、形状、および配置の接着領域を設計することが可能になる。

10

【0119】

また、本実施形態の障害領域は、接着領域と組み合わせ配置することによって、細胞の移動および接着を制御するためのデバイスの構成単位となり得る。当該構成単位としては、（１）仮想壁、（２）ゲート、（３）パス、などが挙げられる。これらの構成単位を適切に配置することによって、細胞のガイディング、パターンニング、ソーティング、捕集等を行なうためのデバイス（バイオメディカルデバイス）を構築することが可能である。このようなデバイスは、再生医療、組織工学、臨床診断、生物医学実験、抗生物汚染材料など、広い範囲に応用して利用することが可能である。

20

【0120】

< 第2実施形態 >

〔基板60〕

次に、本発明に係る基板の他の実施形態について説明する。図13は、本発明に係る基板の他の実施形態を示す図である。

【0121】

図13に示す基板60は、接着領域62と溝63とを備えた板である。

【0122】

接着領域62は、接着面61aを有しており、第1実施形態における接着領域12と同様の機能を有する。接着領域62の詳細な説明についてはここでは省略する。

【0123】

溝63は、接着領域62の周囲に沿って設けられており、細胞の接着を障害するためのものである。溝63は、接着面61aと、溝63を挟んで接着領域62に隣接する領域64との間に1本のみ設けられている。溝63は、その上への細胞の接着を障害することによって、溝63の上を通過するような細胞の移動、例えば接着領域62と領域64との間の移動をも障害するものである。領域64は、接着面61aと略同じ高さの頂上面64aを有する領域である。

30

【0124】

溝63は、直線であってもよいし、曲線であってもよい。また、溝63は、分岐していてもよい。溝63の幅は、数 μm であることが好ましく、略1.5 μm であることがより好ましい。また、溝63の深さは、数 μm 以上、数十 μm 以下であることが好ましく、略20 μm であることがより好ましい。

40

【0125】

溝63が接着領域62に沿って備えられることによって、接着領域62に存在する細胞は、溝63上に接着すること、および溝63上を通過して領域64に進入することを阻害される。したがって、溝63は、接着領域62に対する壁（仮想壁）として働き、細胞を接着領域62内に留めておくことができる。

【0126】

なお、本実施形態に係る基板は、上述した構成に限らず、上記溝63以外の他の溝をさらに備えていてもよい。他の溝は、溝63よりも領域64側に設けられることが好ましい。また、他の溝は、その幅および深さが溝63と同じであってもよい。また、溝63に平

50

行に設けられた溝であってもよいし、溝 6 3 とは異なる方向に伸びるように設けられた溝であってもよい。また、溝 6 3 と接していてもよいし、離れていてもよい。他の溝は複数設けられていてもよく、溝 6 3 とともに格子状に設けられていてもよい。

【0127】

また、溝 6 3 および複数の他の溝が設けられることによって、領域 6 4 における溝 6 3 および複数の他の溝に囲まれた部分が、1 つまたは複数の多角柱形状の構造物となってもよい。例えば溝 6 3 および複数の他の溝が格子状に設けられた場合には、領域 6 4 における溝 6 3 および複数の他の溝に囲まれた部分は、格子状に並んだ複数の四角柱形状の構造物となる。すなわち、この場合には、領域 6 4 は、接着面 6 1 a と略同じ高さの頂上面 6 4 a を有し、接着領域 6 2 と領域 6 4 との境界に沿って複数の列において配置されている、複数の四角柱形状の構造物を備えることとなる。つまり、溝 6 3 および領域 6 4 は、第 1 実施形態における基板 1 の阻害領域 1 3 と同様に構成されることができ、細胞の接着を阻害することが可能な阻害領域とされることができ、なお、このときの領域 6 4 における複数の四角柱形状の構造物における配置間隔とは、上述した溝の幅と等しく、当該構造物の高さとは、溝の深さと等しい。

10

【0128】

このように、溝 6 3 を挟んで接着領域 6 2 に隣接している領域 6 4 は、溝 6 3 とともに、上述した阻害領域 1 3 のような、細胞の接着を阻害するための阻害領域を構成してもよい。これにより、接着領域 6 2 内の細胞が溝 6 3 を超えて領域 6 4 に進入することをより強く阻害することができ、細胞を接着領域 6 2 内により確実に留めておくことができる。

20

【0129】

すなわち、本実施形態における基板 6 0 は、接着領域 6 2 に沿って設けられる、細胞の接着を阻害するための第 1 の溝 6 3 が設けられている。第 1 の溝 6 3 は、接着領域 6 2 に隣接して設けられる、細胞の接着を阻害するための阻害領域に含まれていてもよい。当該阻害領域には、複数の第 2 の溝が設けられており、第 1 の溝 6 3 と当該第 2 の溝とに囲まれた部分が、1 つまたは複数の多角柱形状の構造物となってもよい。当該構造物は、接着面 6 1 a と略同じ高さの頂上面 6 4 a を有していてもよい。また、複数の当該構造物が、接着領域 6 2 と当該阻害領域との境界に沿って、複数の列において配置されていてもよい。当該構造物は、上述した構造物 2 2 のような四角柱形状であってもよい。

30

【0130】

本実施形態における基板 6 0 に対しては、第 1 実施形態において説明した基板の製造方法を好適に適用できる。また、基板 6 0 は、上述した細胞チップ、細胞チップの製造方法、細胞培養装置、培養方法などに好適に利用でき、第 1 実施形態における基板 1 と同様の効果を得ることができる。

【0131】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

40

【0132】

後述する各実施例においては、以下に示すように基板を作製し、その基板における阻害領域の機能について評価した。

【0133】

(基板の作製)

上述した基板 1 および基板 6 0 と同様の構成の基板を作製した。以下、実施形態において説明した部材と同じ機能を有する部材には、同じ部材番号を付すこととし、ここではその詳細な説明を省略する。

【0134】

基板 1、6 0 にはシリコンを用いた。まず、シリコンウエハを、パターン化されたフォ

50

トレジストにてコートし、深堀り反応性イオンエッチングによってエッチングした。このとき、基板1における構造物22の高さ、および基板60における溝63の深さは20 μ mとした。その後フォトレジストを酸素プラズマアッシング法によって除去した。そして、熱酸化法によって基板1、60の表面にSiO₂膜を成膜し、または基板1の表面をAu膜によってコートした。

【0135】

(細胞、培地および培養方法)

各実施例においては、細胞として、ブラックテトラ (*Gymnocorymbus ternetzi*) の鱗上に存在する移動性細胞であるケラトサイト (fish epidermal keratocyte) を用いた。なお、ケラトサイトは移動性の強い細胞であり、非常に速い速度において直線的に運動することが知られている。また、ケラトサイトは、足場の化学的性質に対して接着選択性が低い細胞であることが知られている。

10

【0136】

培地としては、15%ウシ血清およびペニシリン-ストレプトマイシン (100 units/ml のペニシリンおよび100 μ g/ml のストレプトマイシンを添加した70% Dulbecco's Modified Eagle Medium (30%の純水、Hepes入り、Invitrogen) を用いた。

【0137】

培養方法としては、まず、魚の鱗をピンセットにて抜き取り、体表側を上にして、鱗がほぼ乾燥するまで基板1、60の接着領域12、62に置き、鱗を基板1、60上に接着させた。その後、培養液を加えて、室温 (22~25) において6~12時間培養した。その結果、ケラトサイトが、鱗から接着領域12、62上にシート状に広がった。次に、シート状のケラトサイトを、0.25%トリプシン/EDTA (Sigma Aldrich) により処理して細胞間接着を壊し、単一細胞を得た。培養液を交換した後、基板1を観察用のチャンバーに移した。

20

【0138】

(阻害率の計測)

基板1上のケラトサイトを、反射型顕微鏡 (MEIJI) を用いて20倍の対物レンズによって観察した。また、デジタルカメラ (Olympus) を用いて、一定時間間隔にて顕微鏡画像を観察した。そして、ケラトサイトが、接着領域12から阻害領域13との境界に達した後、3分以内に向きを変えて接着領域12内に戻ってきたときには、阻害領域13から排除されたと判断した。また、ケラトサイトが、接着領域12から阻害領域13との境界に達した後、3分以上阻害領域13内に留まっていたときには、阻害領域13から排除されなかったと判断した。その後、阻害領域13の阻害率を算出した。

30

【0139】

[実施例1]

実施例1においては、表面にSiO₂膜を成膜した基板1を用いた。また、本実施例では、構造物22の頂上面22aの辺長aおよび配置間隔bが異なる複数の基板1を作製した。なお、構造物22の高さhは、20 μ mとした。

【0140】

それぞれの辺長aおよび配置間隔bにおける基板1において、上述したように阻害率を計測した。その結果を以下の表1~表3に示す。また、図14は、本発明の一実施例における基板の構造物の配置間隔bと辺長aとの関係を表すグラフである。

40

【0141】

【表 1】

構造物 2 2 のサイズ (μm)	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0.5	1	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
実験数 (n)		13	31	16	23	9	14	10	17	12
排除された細胞数		13	31	15	19	5	10	6	7	2
阻害率 (%)		100	100	93	83	56	71	60	41	17

【 0 1 4 2 】

【表 2】

構造物 2 2 のサイズ (μm)	a	3	3.5	7	10	15	20
	b	1	1	1	1	1	1
実験数 (n)		14	9	17	13	21	17
排除された細胞数		14	9	17	12	20	16
阻害率 (%)		100	100	100	92	95	94

10

【 0 1 4 3 】

【表 3】

構造物 2 2 のサイズ (μm)	a	3	7	10	15	20
	b	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
実験数 (n)		14	14	13	20	16
排除された細胞数		13	13	12	19	15
阻害率 (%)		93	93	92	95	94

20

【 0 1 4 4 】

上記表 2 および図 1 4 に示すように、辺長 a が $3\ \mu\text{m}$ ~ $7\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 b が $1\ \mu\text{m}$ であるときには、ケラトサイトは 100% 阻害された。また、上記表 1 および図 1 4 に示すように、辺長 a が $5\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 b が $0.5\ \mu\text{m}$ であるときにも、ケラトサイトは 100% 阻害された。

【 0 1 4 5 】

これらの結果から、辺長 a が $3\ \mu\text{m}$ ~ $7\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 $0.5\ \mu\text{m}$ であるときにも、ケラトサイトが 100% 阻害されることが強く示唆される。

30

【 0 1 4 6 】

また、辺長 a が $10\ \mu\text{m}$ ~ $20\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 b が $1\ \mu\text{m}$ であるとき (表 2)、および辺長 a が $3\ \mu\text{m}$ ~ $20\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 b が $1.5\ \mu\text{m}$ であるとき (表 3) には、ケラトサイトは 90% 阻害された。

【 0 1 4 7 】

したがって、以上の結果から、構造物 2 2 の辺長 a が $3\ \mu\text{m}$ 以上 $20\ \mu\text{m}$ 以下、および配置間隔 b が $0.5\ \mu\text{m}$ 以上 $1.5\ \mu\text{m}$ 以下であれば、阻害領域 1 3 への細胞の接着を効率よく阻害できることが示された。

【 0 1 4 8 】

(顕微鏡観察)

また、構造物 2 2 の辺長 a が $5\ \mu\text{m}$ 、配置間隔 b が $1\ \mu\text{m}$ である阻害領域 1 3 を備えた基板 1 上のケラトサイトについて、一定時間間隔における顕微鏡画像の一部を図 1 5 (a) ~ (f) に示す。図 1 5 (a) ~ (f) は、本発明の一実施例における基板 1 上のケラトサイトについての、それぞれ観察開始から 0 分後、1 分 30 秒後、2 分 30 秒後、3 分 30 秒後、4 分 30 秒後、6 分後における顕微鏡画像を表す図である。

【 0 1 4 9 】

観察後 0 分 ~ 1 分 30 秒において、ケラトサイトは、接着領域 1 2 から阻害領域 1 3 に向かって移動した (図 1 5 (a) ~ (b))。次に、観察後 2 分 30 秒 ~ 3 分 30 秒において、ケラトサイトは、その細胞体の一部を接着領域 1 2 内に残して移動を一時的に停止

40

50

するとともに、その細胞体の形を紡錘形から球形に変化させた（図 15（c）～（d））。次に、観察後 4 分 30 秒においては、ケラトサイトは、その細胞体を紡錘形に戻すとともに、その仮足とよばれる部位を接着領域 1 2 側に大きく伸展させた（図 15（e））。その後、方向転換し、観察後 6 分においては、ケラトサイトは、接着領域 1 2 内に戻るように移動した（図 15（f））。

【0150】

このような、ケラトサイトの方向転換における、細胞体の変形および接着領域 1 2 側への仮足の伸展は、いずれの観察においても再現性よく見られた。

【0151】

以上の結果から、本実施例に係る基板における阻害領域は、細胞の接着を十分に阻害できることが強く示唆された。

10

【0152】

〔実施例 2〕

実施例 2 においては、表面に Au 膜をコートした基板 1 を用いた。また、本実施例では、構造物 2 2 の頂上面 2 2 a の辺長を $5 \mu\text{m}$ 、配置間隔 b を $2.5 \mu\text{m}$ 、および高さ h を $20 \mu\text{m}$ とした。

【0153】

（阻害率の計測）

この基板 1 を用いて、上述した方法によって阻害率を計測した。その結果、実験数 6 において、阻害率は 100% であった。

20

【0154】

（顕微鏡観察）

また、この基板 1 上のケラトサイトについて、一定時間間隔における顕微鏡画像の一部を図 16（a）～（f）に示す。図 16（a）～（f）は、本発明の他の実施例における基板 1 上のケラトサイトについての、それぞれ観察開始から 0 分後、2 分後、4 分後、6 分後、8 分後、9 分 30 秒後における顕微鏡画像を表す図である。

【0155】

観察後 0 分～2 分において、ケラトサイトは、接着領域 1 2 から阻害領域 1 3 に向かってまっすぐ移動した（図 16（a）～（b））。次に、観察後 4 分～6 分において、ケラトサイトは、その細胞体の一部を接着領域 1 2 内に残して移動を一時的に停止し、細胞体の形を紡錘形から球形に変化させた（図 16（c）～（d））。次に、観察後 8 分において、ケラトサイトは、接着領域 1 2 側に仮足を大きく伸展させ始め（図 16（e））、方向転換した後に、観察後 9 分 30 秒において、接着領域 1 2 内に戻るように移動した（図 16（f））。

30

【0156】

以上の結果から、Au 膜をコートした基板においても、阻害領域が細胞の接着を十分に阻害できることが示された。

【0157】

〔実施例 3〕

実施例 3 においては、表面に SiO_2 膜を成膜した基板 1 を用いた。また、本実施例では、構造物 2 2 の頂上面 2 2 a の辺長 a を $5 \mu\text{m}$ 、配置間隔 b を $1 \mu\text{m}$ 、および高さ h を $20 \mu\text{m}$ とした。

40

【0158】

この基板 1 の表面に、以下の方法で、細胞接着を促進する化学物質であるファイブロネクチンをコートした。

【0159】

（ファイブロネクチンコート）

Fibronectin (BD Bioscience) を PBS (-) (Lonza) に溶解し、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のファイブロネクチン溶液を作製した。35 mm ペトリディッシュに基板 1 を置いて、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のファイブロネクチン溶液を 1 ml 加え、室温にて 1 時間静置した。その後基

50

板 1 を超純水にて 3 回洗浄し、風乾した。

【 0 1 6 0 】

(阻害率の計測)

次に、この基板 1 を用いて、上述した方法によって阻害率を計測した。その結果、実験数 1 3 において、阻害率は 1 0 0 % であった。

【 0 1 6 1 】

(顕微鏡観察)

また、この基板 1 上のケラトサイトについて、一定時間間隔における顕微鏡画像の一部を図 1 7 (a) ~ (f) に示す。図 1 7 (a) ~ (f) は、本発明の他の実施例における基板上のケラトサイトについての、それぞれ観察開始から 0 分後、1 分 3 0 秒後、3 分後、4 分 3 0 秒後、6 分後、7 分 3 0 秒後における顕微鏡画像を表す図である。

10

【 0 1 6 2 】

観察後 0 分 ~ 1 分 3 0 秒において、ケラトサイトは、接着領域 1 2 から阻害領域 1 3 に向かって移動した (図 1 7 (a) ~ (b))。次に、観察後 3 分 ~ 4 分 3 0 秒において、ケラトサイトは、その細胞体の一部を接着領域 1 2 内に残して移動を一時的に停止し、細胞体の形を紡錘形から球形に変化させた (図 1 7 (c) ~ (d))。次に、観察後 6 分 ~ 7 分 3 0 秒において、ケラトサイトは、その細胞体を紡錘形に戻すとともに、接着領域 1 2 側に仮足を大きく伸展させて方向転換し、接着領域 1 2 内に戻るように移動した (図 1 7 (e) ~ (f))。

20

【 0 1 6 3 】

本実施例において観察されたケラトサイトの細胞体の変形、接着領域 1 2 側への仮足の伸展などは、実施例 1 において、ファイブロネクチンコートしていない基板上にて観察されたものと同様であった。

【 0 1 6 4 】

以上の結果から、本実施例に係る基板における阻害領域は、細胞接着を促進する化学物質であるファイブロネクチンをコートした場合においても、移動性の高いケラトサイトの接着を完全に阻害できる構造であることが示された。したがって、本実施例は、表面の化学的性質に対して接着選択性が低い細胞、移動性の強い細胞などに対しても、好適に利用できるものであることが示された。

30

【 0 1 6 5 】

[実施例 4]

実施例 4 においては、表面に $S i O_2$ 膜を成膜した基板 1 を用いた。本実施例では、構造物 2 2 の頂上面 2 2 a の辺長 a を $5 \mu m$ 、および高さ h を $20 \mu m$ とした。また、本実施例では、構造物 2 2 の配置間隔 b を $1 \mu m$ または $3 \mu m$ とした 2 種類の基板 1 を用いた。

【 0 1 6 6 】

これらの基板 1 の接着面 2 1 a 上に接着させた細胞の阻害領域 1 3 に対する進入角 ($d e g r e e s$) と、阻害領域 1 3 による阻害効果との関係を調べた。

【 0 1 6 7 】

図 1 8 (a) ~ (c) は、細胞の進入角を測定する方法を説明するための図である。進入角は、以下の方法により測定した。

40

(1) 細胞 1 0 0 の顕微鏡写真を 3 0 秒毎に撮影した。

(2) 接着領域 1 2 と阻害領域 1 3 との境界に細胞 1 0 0 が接触する直前の顕微鏡写真の 2 コマまたは 3 コマを、2 値化した。

(3) 2 値化した画像から、細胞 1 0 0 の重心を求めた (図 1 8 (a))。

(4) 最小二乗近似直線を用いて、重心の軌跡をフィットさせた (図 1 8 (b))。

(5) 最小二乗近似直線と、接着領域 1 2 および阻害領域 1 3 の境界線とのなす角 ($0^\circ \sim 90^\circ$) を計算し、進入角とした (図 1 8 (c))。

【 0 1 6 8 】

なお、上記 (2) および (3) の処理には、画像処理ソフトウェア $I m a g e J$ ($U S N$

50

ational Institute of Health (NIH)) を用いた。また、上記 (4) および (5) の処理には、データ解析ソフトウェア K a l e i d a G r a p h (Synergy Software) を用いた。

【 0 1 6 9 】

その結果、構造物 2 2 の配置間隔が 1 μ m である基板では、全ての進入角においてケラトサイトが阻害された。

【 0 1 7 0 】

一方、構造物 2 2 の配置間隔が 3 μ m である基板における、細胞の進入角と阻害領域による阻害効果との関係を図 1 9 に示す。図 1 9 に示すように、ケラトサイトは、阻害領域 1 3 に対して進入角 0 ° ~ 約 5 6 ° にて進入する場合には阻害され、進入角約 5 9 ° ~ 9 0 ° にて進入する場合には阻害されなかった。

10

【 0 1 7 1 】

これらの結果から、阻害領域 1 3 における構造物 2 2 の配置間隔が 1 μ m である場合には、細胞は、いずれの進入角にて進入した場合にも阻害されるが、構造物 2 2 の配置間隔が 1 μ m より 3 倍広い 3 μ m である場合には、進入角が大きいと阻害されにくくなることがわかった。

【 0 1 7 2 】

〔実施例 5〕

実施例 5 においては、基板 6 0 を用いた。本実施例では、溝 6 3 の幅が 1 . 5 μ m、4 μ m または 2 0 μ m である基板 6 0 を用いた。

20

【 0 1 7 3 】

それぞれの基板 6 0 において、実施例 1 と同じ方法を用いて、溝 6 3 による阻害率を計測した。その結果を以下の表 4 に示す。

【 0 1 7 4 】

【表 4】

溝 6 3 のサイズ (μ m)	幅	1.5	4	20
	深さ	20	20	20
実験数 (n)		8	22	17
排除された細胞数		7	11	3
阻害率 (%)		88	50	18

30

【 0 1 7 5 】

上記表 4 に示すように、溝 6 3 の幅が 1 . 5 μ m であるときには、ケラトサイトは 8 8 % 阻害されたが、溝 6 3 の幅が 4 μ m であるときには 5 0 %、2 0 μ m であるときには 1 8 % しか阻害されなかった。

【 0 1 7 6 】

(顕微鏡観察)

また、溝 6 3 の幅が 1 . 5 μ m である基板 6 0 上のケラトサイトについて、一定時間間隔における顕微鏡画像の一部を図 2 0 (a) ~ (h) に示す。図 2 0 (a) ~ (h) は、本発明の実施例 5 における基板上のケラトサイトについての、それぞれ観察開始から 0 分後、2 分後、4 分後、6 分後、8 分後、1 0 分後、1 2 分後、1 4 分後における顕微鏡画像を表す図である。

40

【 0 1 7 7 】

観察後 0 分 ~ 2 分において、ケラトサイトは、接着領域 6 2 から溝 6 3 に向かってまっすぐ移動した (図 2 0 (a) ~ (b))。次に、観察後 4 分 ~ 1 0 分において、ケラトサイトは、その細胞体の一部を接着領域 6 2 内に残して移動を一時的に停止した (図 2 0 (c) ~ (f))。次に、観察後 1 2 ~ 1 4 分において、ケラトサイトは、接着領域 6 2 側に方向転換した後に、接着領域 6 2 内に戻るように移動した (図 2 0 (g) ~ (h))。

【 0 1 7 8 】

以上の結果から、1 本の溝のみでも細胞の接着を十分に阻害できることが示された。

50

【 0 1 7 9 】

以上の各実施例により、本発明に係る基板は、細胞の移動を高精度に制御できるものであり、移動性の高い細胞の運動性制御にも好適に利用できることが示された。また、実施例 5 に示すように 1 本の溝のみでも細胞の接着を十分に阻害できるが、実施例 1 ~ 4 のように多数の溝と多数の角とを有する阻害領域を備えていれば、細胞の接着を阻害する効果がより高くなることが示された。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 8 0 】

本発明は、細胞の移動および接着を高精度に制御することができ、かつ細胞接着領域を、目的、用途等に柔軟に対応させることができるので、バイオメディカルデバイスなどの構築に有用であり、再生医療、組織工学、臨床診断、生物医学実験、抗生物汚染材料など、広い範囲に利用することが可能である。

10

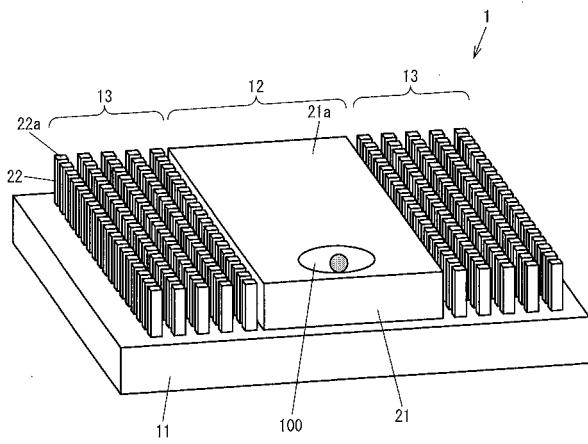
【 符号の説明 】

【 0 1 8 1 】

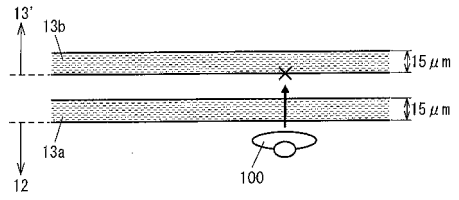
- 1 基板
- 2、2 a、2 b、2 c、2 d、2 e 細胞チップ
- 1 2、1 2 a、1 2 b、1 2 c、1 2 d、1 2 e、1 2 f 接着領域
- 1 3、1 3 a、1 3 b 阻害領域
- 2 1 a 接着面
- 2 2 構造物
- 2 2 a 頂上面
- 5 0 細胞培養装置
- 6 0 基板
- 6 1 a 接着面
- 6 2 接着領域
- 6 3 溝

20

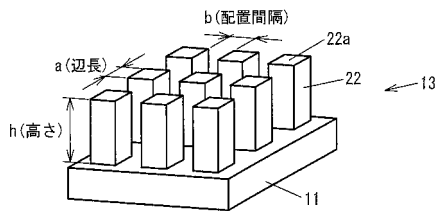
【 図 1 】



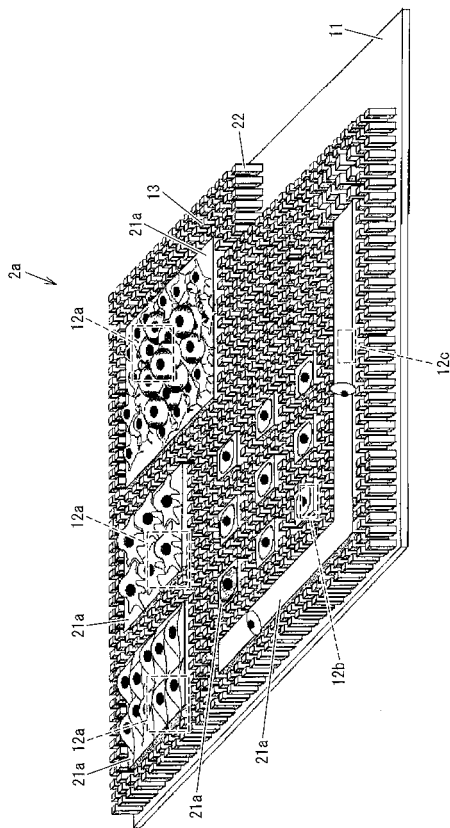
【 図 3 】



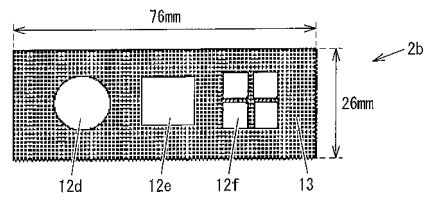
【 図 2 】



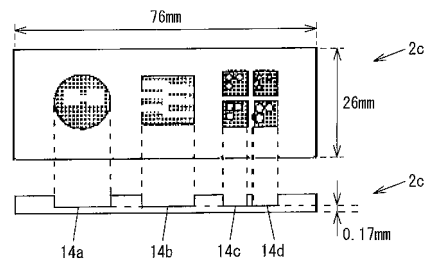
【 図 4 】



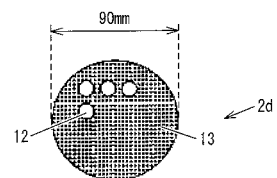
【 図 5 】



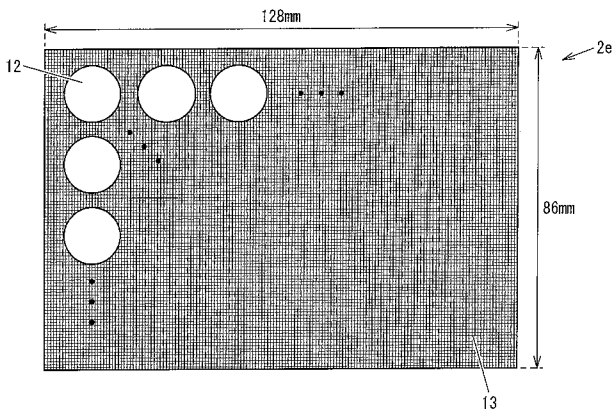
【 図 6 】



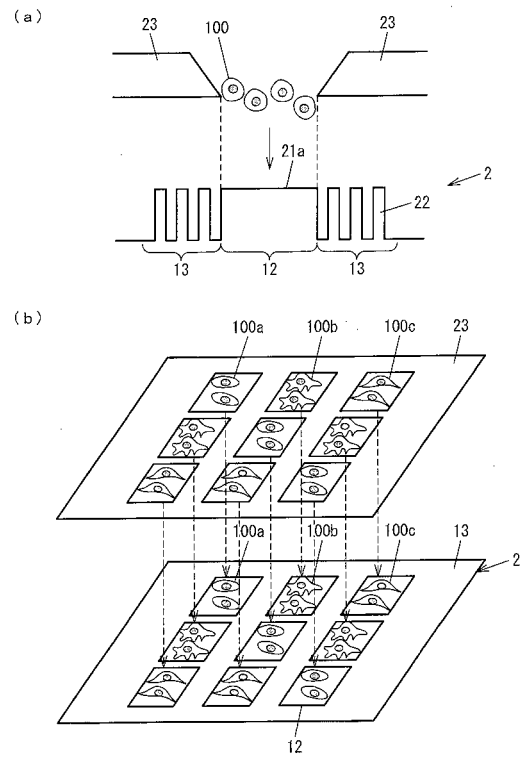
【 図 7 】



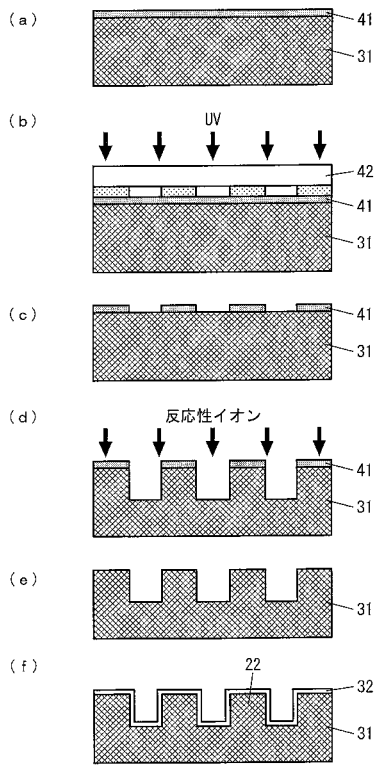
【 図 8 】



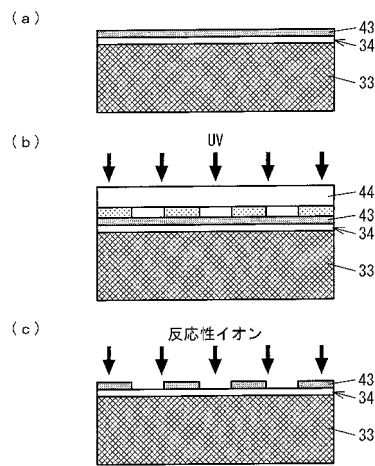
【 図 9 】



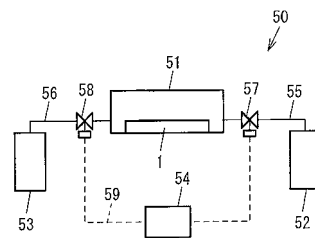
【 図 10 】



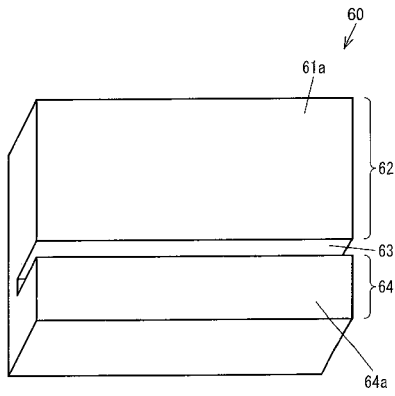
【 図 11 】



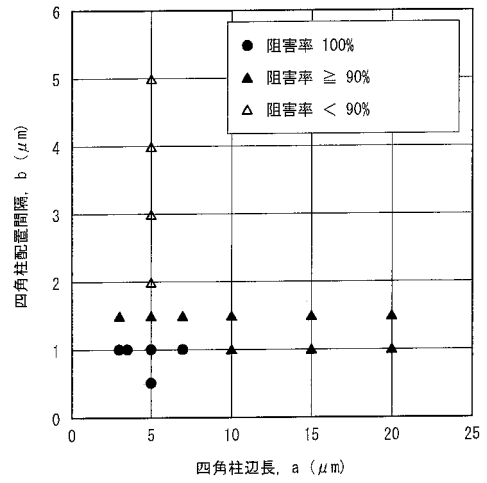
【 図 12 】



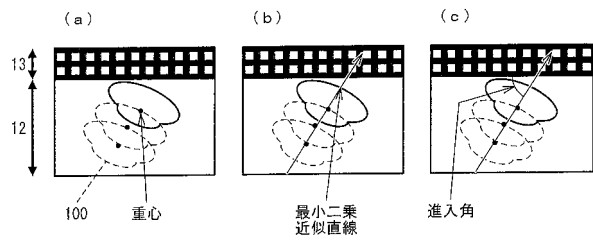
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



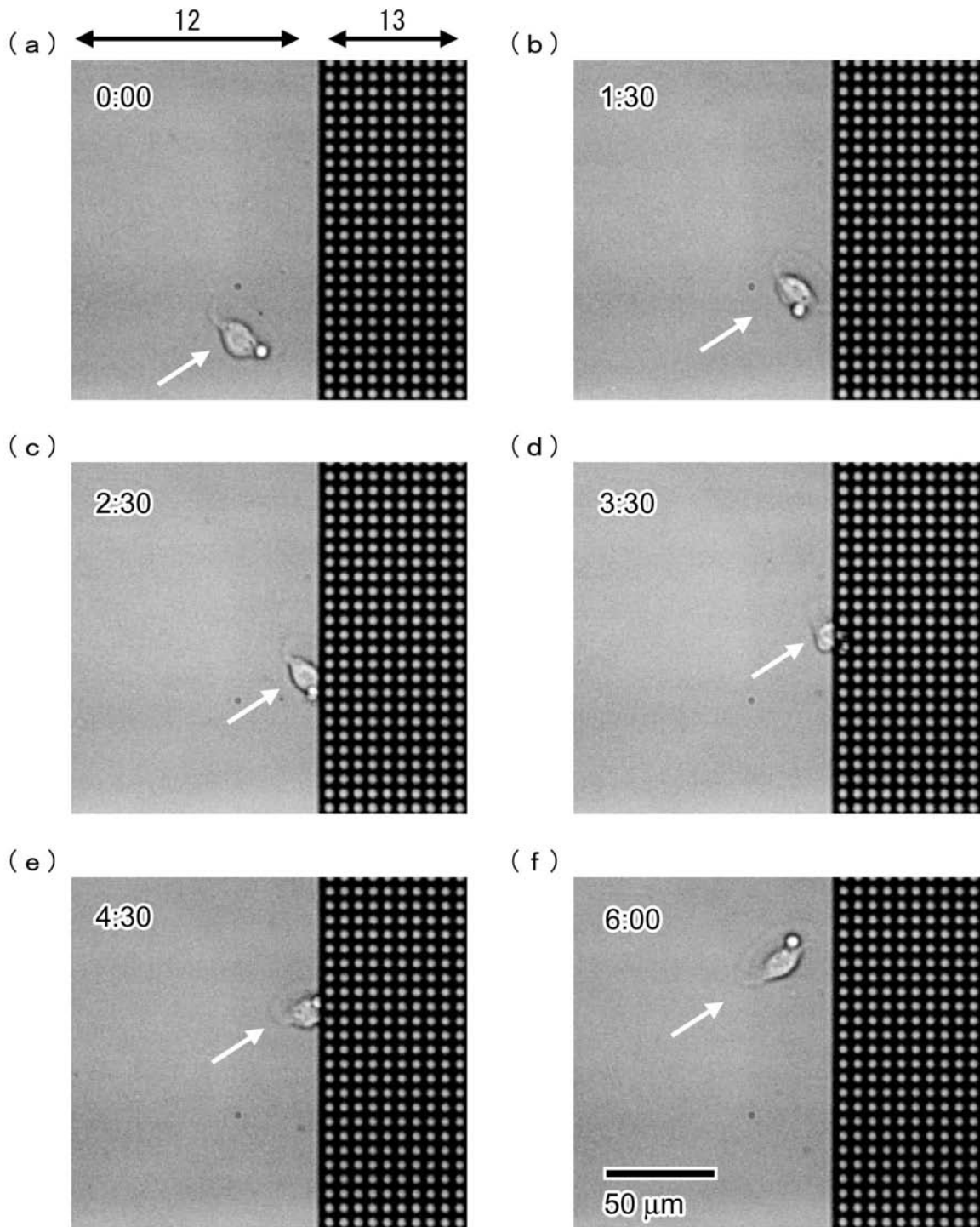
【 図 1 8 】



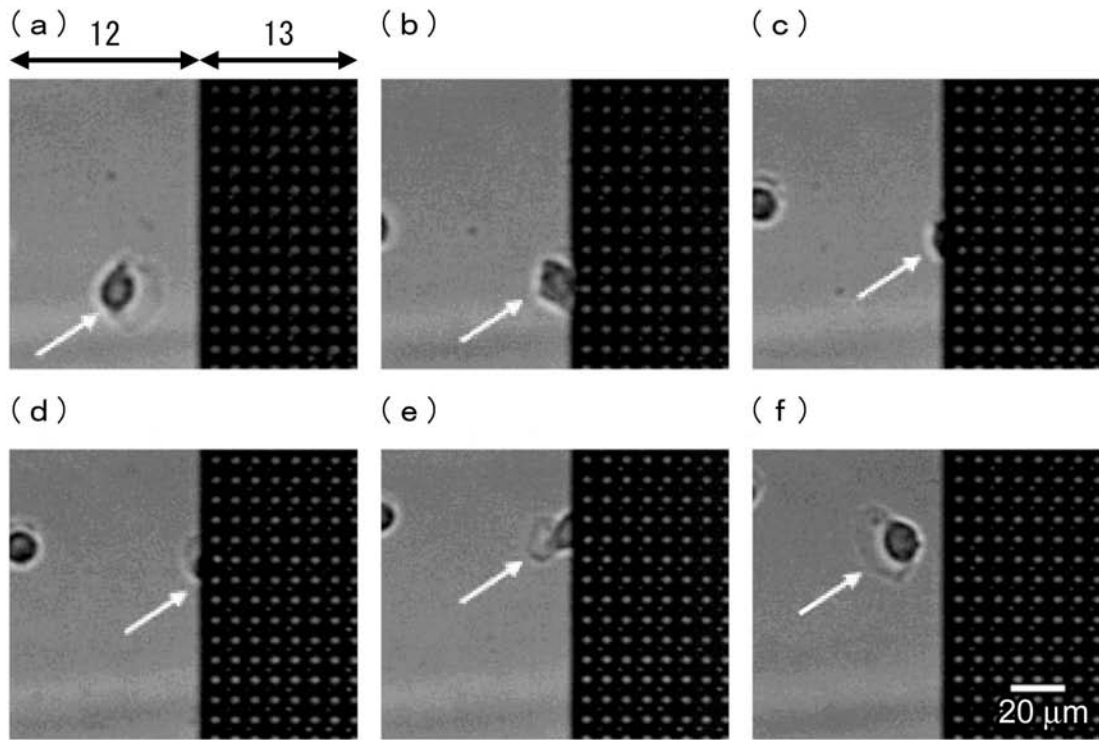
【 図 1 9 】

進入角 (degrees)	配置間隔3 μm
11	阻害
25	阻害
38	阻害
41	阻害
42	阻害
43	阻害
45	阻害
53	阻害
55	阻害
56	阻害
59	進入
62	進入
66	進入
75	進入

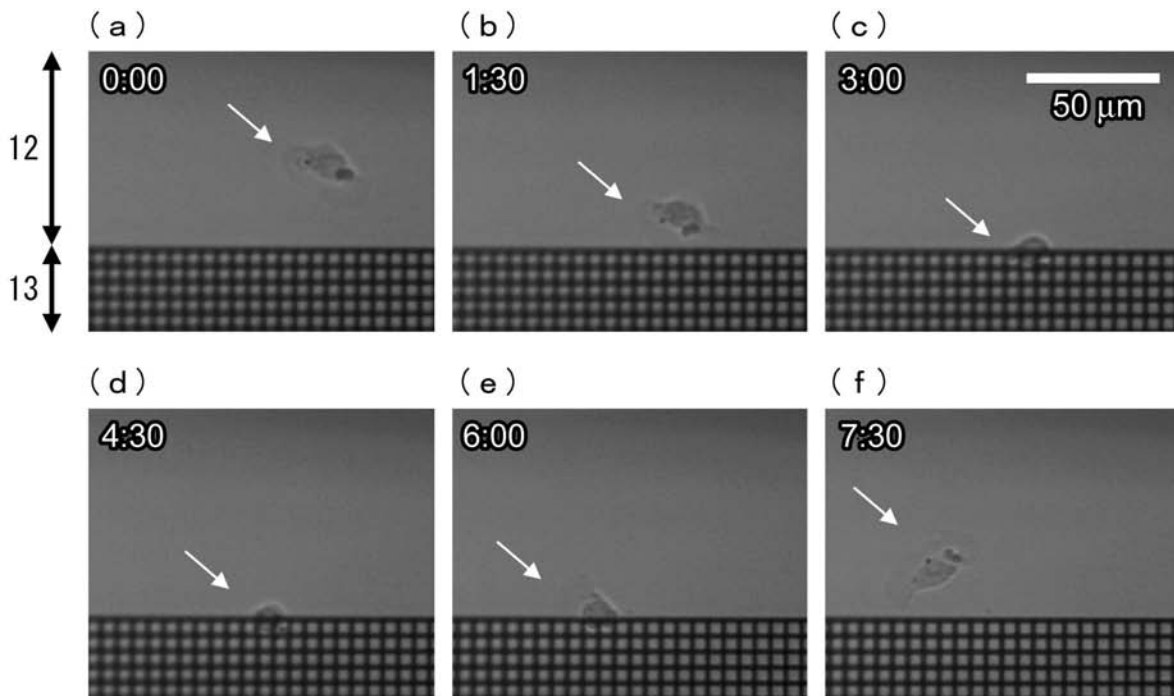
【 図 1 5 】



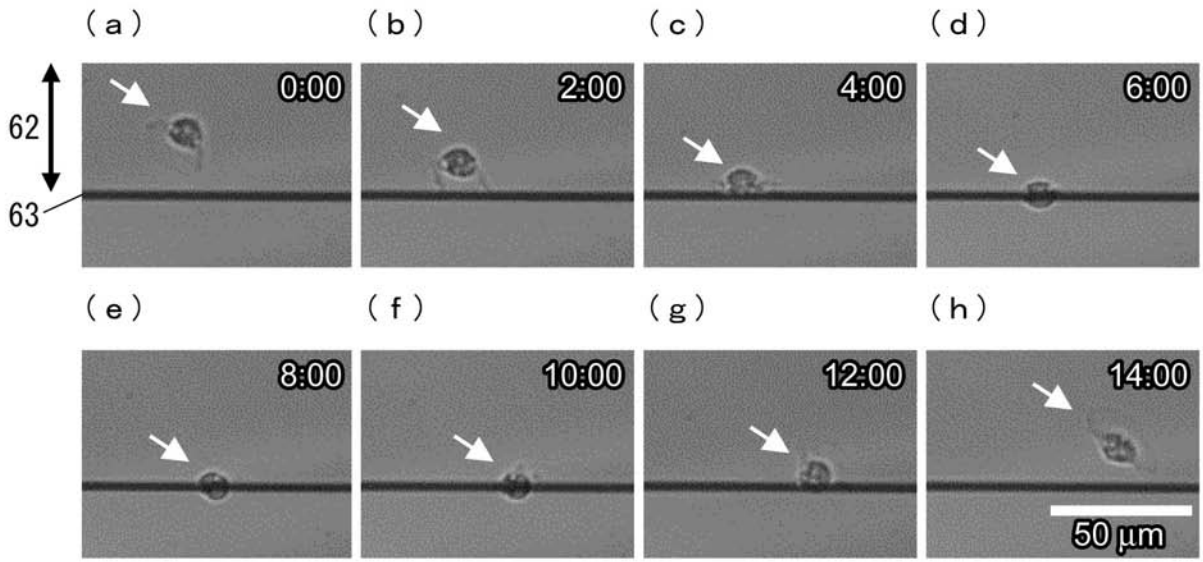
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 20 】



フロントページの続き

(71)出願人 510028121

インスティテュート フォー リサーチアンドインダストリー コーポレーション, プサン ナショナル ユニバーシティー

Institute for Research&Industry Cooperation,
Pusan National University

大韓民国, 609-735, プサン, クムジョン-グ, チャンジョン-ドン, サン30

San30, Jangjeon-Dong, Geumjeong-Gu, Busan, 609-735, Republic of Korea

(74)代理人 110000338

特許業務法人原謙三国際特許事務所

(72)発明者 三好 洋美

埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 山形 豊

埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 安達 泰治

埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 朱 正明

埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 コ ジョンス

大韓民国, 609-735, プサン, クムジョン-グ, チャンジョン-ドン, サン30 インスティテュート フォー リサーチアンドインダストリー コーポレーション, プサン ナショナル ユニバーシティー内

(72)発明者 イ サンミン

大韓民国, 609-735, プサン, クムジョン-グ, チャンジョン-ドン, サン30 インスティテュート フォー リサーチアンドインダストリー コーポレーション, プサン ナショナル ユニバーシティー内

(72)発明者 チョ ドンジン

大韓民国, 609-735, プサン, クムジョン-グ, チャンジョン-ドン, サン30 インスティテュート フォー リサーチアンドインダストリー コーポレーション, プサン ナショナル ユニバーシティー内

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08 FA01

4B065 AA90X BC41 CA46