

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23106007

研究課題名（和文）フルイディクスを駆使する高速細胞アセンブリ

研究課題名（英文）High speed cell assembly using microfluidics

研究代表者

関 実 (Seki, Minoru)

千葉大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80206622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,500,000 円

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体工学技術を駆使することで、複数種の細胞の位置を正確に制御しつつ、異方的なハイドロゲル材料に導入する技術開発を目指した。主に肝組織をターゲットとし、個別の単位材料を複合化することで、灌流培養可能な機能的組織を作製した。また同時に、細胞選抜技術、細胞外基質の加工技術などの周辺技術の開発を行い、3次元生体組織構築における基盤技術の確立を目指して研究開発を行った。

研究成果の概要（英文）：We have developed new technologies to produce anisotropic, complex hydrogel materials that encapsulate multiple types of cells with micrometer-scale precision, using microfluidics. We tried to build up relatively large-sized perfusable tissue models, especially liver tissues, by using unit hydrogel structures as building blocks. In addition, relating technologies such as cell sorting and transformation of ECM components into micrometer-sized particles/fibers have been developed, in order to establish versatile strategies useful for 3D tissue engineering.

研究分野：生物化学工学

キーワード：マイクロシステムクス 肝細胞工学  
マイクロ流体デバイス 細胞分離  
生体組織工学 ハイドロゲル 細胞培養 生体外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生体外において3次元的に細胞を培養するための手法が着目されている。しかし、生体組織において観察されるような、「複数種の細胞が適切な位置に規則的に配列した」組織を再現することは困難である。複数種類の細胞が規則正しくパターン化された複雑な3次元組織を生体外で高速に作製するためには、高密度・正確・高速・立体的に複数種の細胞を配置した上で、細胞の3次元的な微細環境(物理・化学的な環境)を $\mu\text{m}$ の精度で制御する必要がある。また、3次元細胞培養系において、生体内の細胞外マトリックス(ECM)環境を再現することも重要である。加えて、3次元組織体内への酸素や栄養分供給のための血管網の導入、管腔構造の形成も通常困難であった。

一方で、マイクロ流体工学技術を利用することで、 $\mu\text{m}$ サイズの微小材料を合成する、あるいは $\mu\text{m}$ サイズの細胞を正確に計測・操作・評価する研究例が多数報告されていた。先行研究から、マイクロ流路を用いて内部に複数種の細胞が正確に配列した複合的・異方的なハイドロゲル材料を作製し、それらをアセンブリすることで、サイズの大きな3次元組織体を高速に作製することを想定した。さらに、細胞アセンブリに対する上流操作である細胞の選抜や、作製した組織体の機能評価を行うことによって、それらを統合したより機能的な組織構築プロセスが実現するものと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体外で3次元かつ機能的な細胞組織を構築するための基盤技術として、マイクロフルイデクスを駆使した高速細胞アセンブリ手法を開発することを目的とした。具体的には、(1)平面型、多層型、アレイ状の新型マイクロ流体デバイスを設計・作製し、 $\mu\text{m}$ スケールの異方的なパターンを有する、微粒子状やシート状などの、複合型ハイドロゲル素材の作製を行い、その内部に細胞を包埋し培養する手法を開発しつつ、周辺技術として、アセンブリ前の細胞選抜手法と、組織形成後の細胞機能評価手法についても統合的に開発することで、ユニットとなる微小組織の形成と評価を迅速に行うシステムの開発を目的とした。特に、作製対象とする3次元生体組織として、肝小葉模倣組織体、血管構造モデル、神経ネットワーク、筋肉組織・心筋組織などの構築を目指した。(2)各ユニットを複合化するための手法

として、機械工学系の研究者と連携を行い、細胞ファイバーのマニピュレーション技術の開発を行い、また個別組織を単純に複合化するのみならず、血管内皮細胞を用いて複合化・機能化し、灌流培養を行うことにより、3次元組織における細胞機能の向上や生存率の上昇を目指した。

一方で、上流操作である細胞選抜手法や、下流操作としての細胞機能評価とのスムーズな連携を行うことで、より機能性の高いシステムが実現されるものと考えられる。そのため、(3)これまでに我々の研究グループにおいて開発を行ってきた細胞選抜手法を機能化・高処理量化し、細胞アセンブリにおいて有用な手法となりうることを実証するほか、(4)肝細胞組織や骨芽細胞組織をターゲットとして、その機能評価を行うとともに、さらなる機能向上を可能とするための新規手法の開発も目指した。

## 3. 研究の方法

(1)マイクロ流体デバイスを用いた異方的・複合型ハイドロゲル材料の作製

PMMAあるいはPDMS製の微細加工基板を積層化することで作製したマイクロ流体デバイスを利用して、ハイドロゲルを材料とする種々の断面異方性を有する複合ファイバーや複合シートを作製する新規手法を開発した。マイクロ流路層流系を駆使することによって、任意の断面形状を有する微小ゲル材料の形成を行った。これらのハイドロゲル構造に対し、各種培養細胞や初代細胞を導入し、神経モデルの作製、肝細胞+繊維芽細胞共培養系の構築、筋肉様線形組織の作製などを行った。また、特に癌細胞への薬物投与効果の評価を目指し、複合ハイドロゲルファイバーにおける癌細胞の浸潤評価系の構築を行った。なお、筑波大・池田Gより提供を受けた活性酸素種除去機能を有するアルギン酸誘導体を用いたハイドロゲルファイバーの作製についても検討した。

さらに、糸玉状ゲル粒子、細胞と同サイズの極微小粒子、微細加工ハイドロゲル流路構造などの複合材料の作製も試みた。糸玉状微粒子については、油水2相フルイデクスを利用した新規製造手法を提案した。極微小粒子については、極性有機溶媒中でゾル水溶液の非平衡液滴を形成し、溶媒中に水を抽出し滴径を縮小した後にゲル化を行う新規手法を開発し、細胞培養時に添加することでマトリックス制御型の細胞集塊の形成を目指した。

(2) 単位組織ユニットを複合化しアセンブリする手法の開発

機械工学の研究者(阪大・新井 G および名大・福田 G)と連携し、ファイバーの複合化・アセンブリのための磁気操作可能なファイバーの作製や、格子状にハイドロゲルを加工する手法の開発を行った。また、細胞を内包したハイドロゲルファイバーの周囲に対し血管内皮細胞を接着させ、それらを束にすることによって自動的にアセンブルする手法を提案し、束ねたファイバーを灌流培養用チャンバー構造に導入し灌流培養を行うことによって、個別のファイバーを複合化したミリメートルスケールの組織体を形成する手法を提案した。さらに、産総研・杉浦 G より提供を受けた、分解性かつ細胞接着性を有するハイドロゲル材料によって形成された構造を用いることで、内部に管腔構造を有する集塊の作製を試みたほか、サイズの大きい 3 次元組織構築において不可欠な、血管組織を作製する手法についても開発を行った。

(3) 細胞選抜手法の高機能化

主に、マイクロ流体デバイスを利用したサイズに基づく細胞選抜手法である「水力学的濾過法(HDF)」について、その選抜精度や処理量向上を目指した応用展開を行った。まず、細胞をサイズおよび表面マーカーの 2 因子によって分離・選抜するために、水力学的濾過法と磁気泳動を直列に接続した流路システムを作製し、その評価を行った。また、マイクロ流路構造を複数個(50~100 個程度)並列化することによって、細胞選抜の処理量を大幅に向上させたシステムの開発を目指した。さらに、流路を格子状に配置した新規デバイスを開発し、高処理量で高精度な細胞選抜を目指した。

(4) 細胞機能の評価

マイクロ流路を用いて肝細胞および線維芽細胞を内包する微小オルガノイドを作製し、東京女子医大・大和 G との連携によって、長期培養後の肝細胞機能の評価を行った。特に、最大 90 日の長期間培養を行い、アルブミン産生・尿素合成能・薬物代謝遺伝子の発現を評価した。また東北大・鈴木 G との連携によって、アルギン酸ハイドロゲル内に骨芽細胞を導入し、培養中の細胞機能の評価と分化制御を行った。

(5) ECM 成分によって構成される微粒子・繊維状材料の作製と細胞機能の評価

当初の目的に加え、マイクロ流路を利用して微小な ECM 材料(粒子およびファイバー)を作製する手法の開発を行った。マイクロ流

路内に ECM 水溶液およびある種の水溶性有機溶媒を導入し、形成した ECM 水溶液の液滴が収縮していく現象を利用することで、ECM 分子が濃縮された、細胞サイズの微粒子を作製した。さらに、アルギン酸ハイドロゲルファイバーの作製手法を応用し、アルギン酸を犠牲層として用いる ECM ファイバーの作製を行ったほか、コラーゲン酸性水溶液を流路内で中和することによって非架橋性のコラーゲンマイクロファイバーを作製する手法を開発した(北大・古澤 G との共同研究)。これらの ECM 粒子・繊維については、それぞれ肝細胞集塊・ハイドロゲル培養系に導入することによって、細胞機能の向上や細胞増殖の促進に寄与するかどうか検討を行った。

4. 研究成果

#### (1) マイクロ流体デバイスを用いた異方的・複合型ハイドロゲル材料の作製

異方的ハイドロゲルファイバーの作製と応用

微細加工基板の積層化によってマイクロ流体デバイスを作製し、断面異方性を有するハイドロゲルマイクロファイバーを作製した。組成や細胞種の異なる数種の溶液とゲル化剤水溶液を導入することによって、断面異方性を有する直径数 10 $\mu$ m 程度のハイドロゲルファイバーを作製することが可能であった。さらに、アルギン酸誘導体の添加によって、ファイバーの物理強度を部分的に低下させた柔軟部を形成し、柔軟部に沿って線形かつ立体的なコロニーを形成できた。また複数種の細胞を高密度かつ  $\mu$ m オーダーの正確性で包埋することもできた。さらに、活性酸素種の除去能を有するアルギン酸誘導体を用いた場合にも、同様にマイクロファイバーの作製が可能であった。

より複雑な任意の断面形状を有するファイバーを作製するために、微細加工によって形成したマイクロノズルアレイ構造を有するマイクロ流体デバイスを作製した。たとえば、周縁部に 8 本の柔軟部を並行に有するファイバーの作製ができ、その柔軟部に神経様細胞(PC12 細胞)を包埋し、神経増殖因子の添加のもと培養を行ったところ、細胞同士が一行に配置した線形の細胞ネットワーク構造体が形成されることを明らかにした。また C2C12 細胞を用いた筋肉様組織の形成についても検討を行った。このような構造は、神経細胞のような線形の組織を 3 次元空間において形成するための新規手法として有用

であると考えられる。

また応用として、がん細胞の浸潤挙動を簡便かつ正確に定量化できるシステムの開発を行った。中心部に癌細胞、周縁部に正常細胞（線維芽細胞）を導入し、周縁部の一部のみを柔軟性の高いハイドロゲルによって作製したところ、癌細胞は柔軟部に沿って外部へと浸潤し、最終的にはファイバーの外部にコロニーを形成する様子が確認できた。このシステムを用いると、外部に浸潤したコロニー数をカウントするだけで、癌細胞の浸潤挙動を定量評価することができることを見出した。

異方的ハイドロゲルシートの作製と応用

複合型ハイドロゲルシートを作製し、肝細胞の共培養を行った。複数に分岐し合流する2つあるいは3つの入口流路に対し、それぞれ異なる種類・組成のアルギン酸Na水溶液を導入し、互い違いに合流させ、扁平なノズル出口を介して外部のゲル化剤水溶液中に押し出すことによって、異方的（ストライプ状・積層状）なゲルシートの作製が可能であった。肝細胞モデルとしてHepG2細胞、正常細胞として3T3細胞を高密度（ $1\sim 3\times 10^7$  cells/mL）で導入し共培養したところ、これら2種類の細胞組織からなる組織体の配列を構築することが可能であった。このような組織体は、肝臓組織中に観察される線形組織を模倣した構造であると言える。また共培養系において、HepG2単独培養と比較して肝細胞機能が向上することも確認された。

非球形ハイドロゲル粒子・極微小ハイドロゲル粒子の作製

まず、内部に対して栄養や酸素を効率的に供給可能な、毛糸球状ハイドロゲル粒子の作製を行った。ファイバーが完全にゲル化する直前に液滴に断片化されることで毛糸玉状の粒子を作製することが可能となった。均一な球形あるいはサイズの大きい直線状のファイバーと比較して、毛糸球状粒子の場合に細胞の増殖速度が増加することが確認された。また、非平衡状態の液滴が脱溶媒によって収縮する現象を利用し、アルギン酸やキトサンなどの多糖類を材料として用いた粒子形成プロセスの構築を行ったほか、コラーゲンなどのECM成分からなる微粒子を得ることもでき、その直径を数 $\sim 20\mu\text{m}$ 程度の範囲で制御できることを実証した。このような微小材料は、マイクロ流路構造を利用して初めて形成可能であり、3次元組織構築の際に利用可能な材料として期待される。

## (2) 各ユニットを複合化する手法の開発

ハイドロゲルによって形成された微細流路構造の形成と血管組織作製への応用

マイクロ流路構造を用いて作製した個別のハイドロゲル材料を複合化し、サイズの大きい組織体を作る上で、その内部に灌流培養可能な血管構造を導入することは不可欠である。まず、ハイドロゲル材料を用いた微細流路構造を作製する新規手法を開発した。特に、酵素架橋ゼラチンや細胞接着性RGDアルギン酸を用いて作製した流路構造については、灌流培養を行うことで、内部に血管内皮細胞が接着し、流量に応じて内皮細胞の配向が揃うこと、などの知見を得ることができた。

また、流路構造の内面に血管平滑筋細胞および内皮細胞を段階的に積層化する手法を開発し、血管組織モデルの作製を行った。本手法は、流路形状および送液時間を制御することで様々な形状の血管組織構築を可能とするため、血管組織工学における一つのアプローチとして有用であると言える。

さらに、複数種類の細胞接着性あるいは非接着性ハイドロゲルを用い、それらの一方を犠牲層として用い溶解させることで、管腔構造を有する組織体を形成する新規手法を開発した。また、細胞非接着性のハイドロゲル製マイクロウェル構造と、細胞接着性マイクロファイバーを利用することで、管腔構造を内包するスフェロイドの形成を行うことができた。

ファイバー状材料の組織化によるミリメートルサイズの肝臓組織構築

ファイバー状のゲル材料の周囲に血管内皮細胞を播種し、それらを束ねて灌流培養を行うことで、よりサイズの大きい組織構造を構築する新規手法の構築を試みた。具体的には、肝細胞を内包し、血管内皮細胞を表面に接着させたハイドロゲルファイバーを集積化するプロセスを提案した。3日間の灌流培養を行った細胞内包ファイバーの束を灌流用チャンバーから回収したところ、ファイバー束が血管内皮細胞によって一体化した、ミリメートルサイズの組織体を形成していることが確認された。細胞の生存率および肝特異的機能の評価を行ったところ、低流速条件（ $1\mu\text{L}/\text{min}$ ）と比較して、高流速条件（ $15\mu\text{L}/\text{min}$ ）では、肝細胞の生存率および肝特異的機能が上昇する傾向が確認された。以上の結果から、本プロセスは肝組織の微小環境を生体外において再構築できる手法として有用であると考えられる。この手法によって作

製した肝細胞組織は、ミリメートルスケールの肝小葉を形態的に模倣しているとも言え、革新的であると考えられる。さらに、磁場を用いたハイドロゲルファイバーの操作やファイバー複合化格子状構造の作製についても、連携研究によって開発した。

### (3) 細胞選抜手法の高機能化

#### 2 因子細胞分離システムの開発

水力学的濾過法 (HDF) と磁気泳動を組み合わせた 2 因子 (大きさ + 表面マーカー) 細胞分離システムを開発し、その分離性能の詳細な評価および血液等の実サンプルの分離を行った。

本手法は、複雑な装置や操作を必要とせず、シンプルかつ高効率に 2 因子による細胞分離を実現するため、FACS による細胞分離のための前処理システムや、組織構築におけるツールとして有用であると考えられる。

大量処理のための並列化マイクロ流体デバイス・格子状流路構造

格子状に配置したマイクロ流路構造、あるいは HDF による分離構造を並列化したシステムの開発を行い、処理量の向上を目指した。各種パラメータ (流路傾斜、格子状流路の密度比など) を変更した流路を作製し実験を行ったところ、これらの要因が分離に大きな影響を与えることが実証された。また、単一の流路を複数個 (8~24 個) 並列化した流路を用いた場合、毎分ミリリットルの比較的高い処理量を実現することが可能であった。また、細胞分離への応用として血球の分離を行ったところ、高効率な白血球の選抜・クラス分けなどを実証することができた。

また、最大 128 の HDF 分離ユニットを並列化することで、希釈血液を毎分 10 ミリリットル程度処理することができた。これらの細胞選抜手法を、流路を用いた細胞アセンブリ手法と組み合わせることによって、より効率的かつ高速な組織形成が可能となると期待される。

### (4) 細胞機能の評価

ラット由来初代肝細胞と繊維芽細胞を包埋したマイクロファイバーを作製し、微小オルガノイドの形成を行い、大和 G との連携によって、得られた組織体の詳細な機能評価を行った。その結果、複合型組織体の内部では 2~3 個の肝細胞が列をなし、その周囲を 3T3 細胞が取り囲んでいる様子が観察された。また、培養上清をサンプリングし、尿素およびアルブミン産生量の測定を行ったところ、ハイドロゲルファイバー

内で 3T3 細胞と共培養を行った系では、これらの産生能および生存率が 60 日以上に渡り高く維持されることが確認された。本研究で作製した複合型組織体は、in vitro において肝細胞機能の長期維持を可能とする新たな培養手法として有用であることが示唆された。さらに、ハイドロゲル培養による骨芽細胞の分化誘導について検討を行い、3 次元培養の有効性を実証することができた。

### (5) ECM 成分によって構成される微粒子・繊維状材料の作製と細胞機能の評価

#### ECM 微粒子の作製と応用

マイクロ流路構造を用いて作製した細胞サイズの ECM 微粒子は、3 次元細胞培養系の内部に均一に導入することが可能であり、適切な細胞-ECM 間の相互作用を形成することで、細胞の機能発現を補助する役割を担うと期待されるほか、3 次元組織の形態維持という役割を果たすものと考えられる。そこで、 $\mu\text{m}$  サイズのコラーゲン微粒子を作製し、肝細胞スフェロイド形成などにおける細胞接着性粒子の役割について、初代肝細胞を用いた詳細な機能評価を行うことで、肝細胞機能維持において適切な粒子・細胞比率が存在するかどうか確認した。

マイクロ流路、あるいは多孔質膜を用いて作製した細胞サイズのコラーゲン微粒子と、ラット初代肝細胞を一定の割合で混合し、アガロースゲルを材料とした細胞非接着性ウェル内に播種し数日間培養したところ、コラーゲン粒子を含むヘテロ細胞集塊が得られた。細胞集塊を回収し、遺伝子発現の定量分析を行ったところ、コラーゲン粒子を含む細胞集塊では、肝機能特有の遺伝子の発現量が増加すること、また、細胞とコラーゲン粒子の混合割合を変化させることにより、肝機能特有の遺伝子の発現量が変化することが確認され、 $\mu\text{m}$  サイズの ECM 微粒子の有用性を実証できた。

また、これらの粒子作製における基盤技術として、タンパク質からなる粒子の形状制御およびそのメカニズム解明を行うとともに、応用としてリン脂質など多様な素材からなる微粒子の形成を行った。このように、コラーゲン等のタンパク質材料を用いて微小な粒子を作製し培養に用いる、という新規基盤技術を開発したこと、また、当技術を他の機能性粒子状材料の作製へと応用したことは、当初想定していた以上の成果であったと言える。

#### ECM ファイバーの作製と応用

繊維状 ECM 材料を作製する手法として、アルギン酸を犠牲層として用いる手法と、pH 調節によるコラーゲンの組織化を利用する手法の 2 つを提案し、3 次元細胞培養における有用性を検証した。

アルギン酸を犠牲層とする手法では、ECM タンパク質を含むアルギン酸ゲルファイバーを作製した後に分解酵素を用いてアルギン酸を選択的に除去することによって、ECM 繊維を作製した。ECM タンパク質としてゼラチン、エラスチンを使用したところ、共に直径 10~20 μm 程度の繊維状足場材料の作製が可能であった。次に、作製した足場材料を高密度に含むアルギン酸ハイドロゲル内で NIH-3T3 細胞を培養したところ、細胞が足場材料に接着し効率的に増殖する様子が確認された。

また、リン酸緩衝液によりコラーゲンをゲル化させる手法を利用することで、架橋剤を用いずにマイクロ流路内でコラーゲンマイクロファイバーを簡便かつ正確に作製する新規手法も開発した。回収されたコラーゲンファイバーに HepG2 細胞を播種した結果、細胞がファイバー表面に接着し、増殖する様子が観察され、細胞培養のための足場材料としての応用可能性を確認した。これらの手法で得られた ECM マイクロファイバーは、ECM 微粒子と同様に、種々の 3 次元生体組織構築手法における広い応用が期待される。

## (6) まとめ

マイクロ流体工学技術を駆使することで、「複数種の細胞が適切な位置に規則的に配列した」微小ハイドロゲルを作製する手法のみならず、細胞選別手法や灌流培養による個別の材料の複合化技術、あるいは微小な ECM 材料を作製する手法を開発することができた。これらの手法を組み合わせることによって、生体外において迅速に 3 次元組織体を構築する、という課題に対して有効性のあるアプローチが可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 36 件)

- (1) M. Yamada, A. Hori, S. Sugaya, Y. Yajima, R. Utoh, M. Yamato, and M. Seki, Cell-sized Condensed Collagen Microparticles for Preparing Microengineered Composite Spheroids of Primary Hepatocytes, Lab Chip, 15 (19), 3941–3951 (2015). 査読有
- (2) Y. Kitagawa, Y. Naganuma, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, Patterned Hydrogel Microfibers Prepared by Using Multilayered Microfluidic Devices for Guiding Network Formation of Neural Cells, Biofabrication, 6 (3), 035011 (2014). 査読有
- (3) Y. Yajima, M. Yamada, E. Yamada, M. Iwase, and M. Seki, Facile Fabrication Processes for

Hydrogel-based Microfluidic Devices Made of Natural Biopolymers, Biomicrofluidics, 8 (2), 024115 (2014). 査読有

- (4) M. Mizuno, M. Yamada, R. Mitamura, K. Ike, K. Toyama, and M. Seki, Magnetophoresis-integrated Hydrodynamic Filtration System for Size- and Surface marker-based Two-dimensional Cell Sorting, Anal. Chem., 85 (16), 7666–7673 (2013). 査読有
- (5) M. Yamada, R. Utoh, K. Ohashi, K. Tatsumi, M. Yamato, T. Okano, and M. Seki, Controlled Formation of Heterotypic Hepatic Micro-Organoids in Anisotropic Hydrogel Microfibers for Long-Term Preservation of Liver-Specific Functions, Biomaterials, 33 (33), 8304–8315 (2012). 査読有 (ほか 31 件)

〔学会発表〕(計 142 件)

- (1) Development of Microfluidic Lattices for High-Performance Cell/Particle Separations, M. Yamada and M. Seki, PITTCON Conference and Expo, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, Mar. 6-10, 2016.
- (2) Construction of Hepatic Lobule-like 3D Tissues Utilizing Cell-Embedding Hydrogel Microfibers, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), San Antonio, Texas, USA, Oct. 26-30, 2014.
- (3) Microengineered Hydrogel Fibers for Evaluating Cancer Cell Invasion under 3D Coculture Conditions, Y. Kitagawa, M. Yamada, and M. Seki, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013. (ほか 139 件)

〔図書〕(計 3 件)

- (1) High-throughput Cell Assembly Featuring Heterogeneous Hydrogels Produced by Using Microfluidic Devices, M. Yamada and M. Seki, in Hyper Bio Assembler for 3D cellular Systems, Springer, pp. 129-150, 2015. (全 349 頁) (ほか 2 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

- (1) 名称: 細胞培養方法  
発明者: 山田, 関, 堀, 矢嶋  
権利者: 国立大学法人 千葉大学  
種類: 特許出願  
番号: 2014-184700  
出願年月日: 平成 26 年 9 月 10 日  
国内外の別: 国内  
(ほか 3 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

## 6. 研究組織

- (1) 関 実 (SEKI MINORU)  
千葉大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 80206622
- (2) 研究分担者  
山田 真澄 (YAMADA MASUMI)  
千葉大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 30546784