



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월29일
 (11) 등록번호 10-1269368
 (24) 등록일자 2013년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
 C12M 3/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7031979
 (22) 출원일자(국제) 2007년06월22일
 심사청구일자 2008년12월30일
 (85) 번역문제출일자 2008년12월30일
 (65) 공개번호 10-2009-0016005
 (43) 공개일자 2009년02월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2007/062587
 (87) 국제공개번호 WO 2008/007527
 국제공개일자 2008년01월17일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2006-189732 2006년07월10일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP10155475 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 브리검 앤드 우먼즈 হাস피털, 인크.
 미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
파파스 가부시기가이사
 일본국 시즈오카켄 후지시 니시카시와바라신텁 201반지
 (72) 발명자
와타나베 세츠오
 일본국 시즈오카켄 후지시 니시카시와바라신텁 201반지, 다카기 산교 가부시기가이사 내
미즈노 슈이치
 미국 02446 메사추세츠주 브루클라인 3, 하버드 애비뉴 55
 (74) 대리인
서장찬, 최재철

전체 청구항 수 : 총 11 항

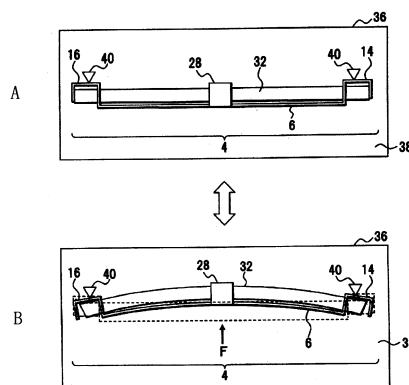
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **세포 또는 조직의 배양 방법**

(57) 요약

세포나 조직 등의 배양물의 배양 방법에 관하여, 세포나 조직을 포함하는 배양물(세포 구성체(2))의 배양 방법으로서, 그 배양물에 곁힘 운동을 부여한다. 세포나 조직 등의 배양물(세포 구성체(2))에 곁힘력을 작용시켜서 배양물을 만족시킴으로써, 그 오목 부분으로부터 볼록 부분의 두께 방향에 연속적인 압축과 신장을 생기게 하여, 종전의 가압, 전단, 인장에서는 얻을 수 없는 물리적인 자극이나 변형을 배양물에 부하하여, 곁힘을 수반하는 부위의 조직 수복에 적합하는 배양물을 실현한다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

세포 또는 조직 중의 어느 한쪽 혹은 양쪽을 포함하는 배양물의 배양 방법으로서,

상기 세포 또는 상기 조직 중 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는 상기 배양물을, 배양액의 통과가 가능한 반투막(半透膜)으로 된 튜브에 넣어서, 상기 튜브를 밀봉하는 단계와,

상기 배양액을 모아두고 또한 상기 배양액을 순환시키는 챔버에 배양 베드를 설치하고, 부하를 받아 만곡하고 상기 부하의 해제로 원래 형상으로 복귀하는 탄성을 갖는 배양 베드의 탑재부에 상기 튜브를 설치하고, 상기 탑재부를 사이에 두고 대향하는 입벽부(立壁部)의 투공부(透孔部)에 상기 튜브를 삽입 통과시켜서 상기 튜브를 상기 배양 베드의 상기 탑재부에 유지하는 단계와,

상기 배양 베드의 배면 측에 액추에이터에 의해 부하를 가해서 상기 탑재부를 만곡시켜, 상기 튜브 내의 상기 배양물에 곁힘 운동을 부여하는 단계와,

상기 배양 베드의 배면 측으로부터 상기 부하를 해제해서 상기 탑재부를 원래 형상으로 복귀시킴으로써, 상기 탑재부의 복귀 방향으로 상기 튜브 내의 상기 배양물에 곁힘 운동을 부여하는 단계를 포함하고,

상기 액추에이터에 의한 상기 배양 베드에 대한 상기 부하와, 상기 부하의 해제에 의한 상기 배양 베드의 복귀 동작에 의해, 주기적인 곁힘 운동을 상기 튜브 내의 상기 배양물에 부여함과 더불어, 상기 튜브 내의 상기 배양물에 상기 배양액을 공급하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 곁힘 운동은, 상기 배양물을 만곡 상태로 하는 처리를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 베드는 양단에서 지지되어, 상기 탑재부에서 만곡되는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 곁힘 운동은, 주기적 또는 단속적으로 실행하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배양물에는, 세포, 세포 담체(擔體), 상기 세포가 산출하는 세포외(細胞外) 매트릭스, 배양액 중의 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배양물은, 세포가 과중된 3차원 배양 담체인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 배양물은, 겔 상태 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,
상기 3차원 배양 담체는, 생체 흡수성 재료인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,
상기 겔 상태 물질은, 생체 흡수성 재료인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,
상기 배양물에 단속적인 장력을 주기적으로 부여하는 처리를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,
상기 배양물을 가압하는 처리를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 재생 의료 분야, 티슈 엔지니어링(Tissue Engineering) 분야에 있어서의 세포 또는 조직의 배양에 관한 것으로, 3차원 조직 또는 기관(器官) 재생을 위한 3차원 조직 배양 방법, 구체적으로는, 세포 구성체(Cell construct)로서, 세포, 세포 담체(Scaffold), 세포가 산출(産出)하는 세포외 매트릭스(Extracellular Matrix: ECM) 중의 어느 하나를 포함하고, 경우에 따라서, 배양액이나, 그 밖의 첨가물이나, 그로스 팩터(gross factor) 혹은 약품 등을 첨가해서 실행하는 배양 방법에 관한 것이다.

[0002] 요컨대, 본 발명의 배양 방법은, 종래에 있어서의 정지(靜置) 배양과 상이하며, 물리 작용 병용의 3차원 배양에 관한 방법이며, 세포 구성체의 세포에 적극적으로 자극을 부여하고, 세포 구성체에 변위를 부여하여, 증식, 세포 이동, 물질 이동을 촉진시켜서 세포의 생존력을 높이는 동시에, 분화(分化)의 유도 혹은 탈(脫)분화의 억제(抑止)에 의해, 목적으로 하는 재생 조직의 실현을 기도하는 것이다.

배경기술

[0003] 세포나 조직의 배양에는, 배양하려고 하는 세포나 조직에 압력이나 장력(張力) 등의 물리 자극을 부여하는 방법이 검토되어, 각종 생물 반응기(bioreactor) 등이 제안되어 있다. 2차원 배양(평면 배양)은, 평저(平底) 배양 기계를 이용하는 배양 방법이며, 일반적으로는, 인큐베이터 내에서의 정지 배양법이다. 부유(浮遊) 배양은, 비 접촉성의 세포를 부유 배양하는 방법이다. 이것도 인큐베이터 내에서의 정지 배양법이다. 3차원 배양은, 세포를 과중한 세포 담체(擔體)를 인큐베이터 내에서 정지하여, 배양하는 것이 일반적인 방법이다. 3차원 배양(생물 반응기 사용)은, 세포 담체에 세포를 접촉 또는 포함시켜, 배양액의 교반(攪拌) 등의 처리를 실행하는 것이 일반적이지만, 세포 담체의 3차원 배양으로 세포에 가압, 압축, 장력, 전단(剪斷) 등의 물리적 작용을 부가하는 배양 방법도 고려되고 있다. 물리적 작용을 부여하기 위한 배양 장치는, 「생물 반응기」, 「티슈 엔지니어링 프로세서」 등으로 호칭되며, 티슈 엔지니어링의 배양 실험이나 재생 의료를 위한 체외(in vitro)에 있어서의 세포·조직 배양 장치로서 실용화되고 있다.

[0004] 이러한 세포나 조직의 배양, 그 배양에 이용되는 물리적인 변위나 응력, 자극을 부여하는 기능을 갖는 생물 반응기에 관하여, 압력, 진동(초음파)을 이용하는 예로서, 특허 문헌 1에는, 세포 또는 조직의 배양 방법 및 그

장치가 개시되고, 압력을 이용하는 예로서, 특허 문헌 2에는, 생체내, 생체의 및 시험관 내에서의 연골(軟骨) 및 콜라겐의 수복(修復) 및 재생 및 뼈 재형성 방법이 개시되고, 전단력을 이용하는 예로서, 특허 문헌 3에는, 세포·조직 배양 장치가 개시되고, 인장력(引張力)을 이용하는 예로서, 특허 문헌 4에는, 세포·조직 배양 장치가 개시되고, 압축력을 이용하는 예로서, 특허 문헌 5에는, 압축력을 이용하는 예로서 세포·조직 배양 장치가 개시되고, 전단력을 이용하는 예로서, 특허 문헌 6에는, 세포 배양 장치가 개시되고, 인장력을 이용하는 예로서, 특허 문헌 7에는, 실리콘 벨트를 사용한 배양 세포용 신축(伸縮) 자극 부하(負荷) 장치가 개시되고, 인장과 전단을 병용하는 예로서, 특허 문헌 8에는, 조직, 합성 또는 천연 혈관 이식편(移植片)의 멸균, 접종, 배양, 보존, 수송, 및 검사를 실행하는 장치 및 방법이 개시되어 있다. 또한, 특허 문헌 9에는, 막체(膜體) 상태로 유지된 세포에 막체에 의해 왜곡을 생기게 하는 배양 방법 등이 개시되어 있다. 또한, 특허 문헌 10 및 특허 문헌 11에는, 배양에 반투막(半透膜)을 이용하는 것이 개시되어 있다. 여러 가지 물리적 작용 및 자극의 부여나, 반투막의 이용에 의한 세포 등의 배양에 관한 시도가 이루어져 있다.

- [0005] (특허 문헌 1)
- [0006] 일본국 특개2001-238663호 공보(요약 등)
- [0007] (특허 문헌 2)
- [0008] 일본국 특표2004-512031호 공보(요약 등)
- [0009] (특허 문헌 3)
- [0010] 일본국 특개2002-315566호 공보(요약 등)
- [0011] (특허 문헌 4)
- [0012] 일본국 특개2003-061642호 공보(요약 등)
- [0013] (특허 문헌 5)
- [0014] 일본국 특개2003-180331호 공보(요약 등)
- [0015] (특허 문헌 6)
- [0016] 일본국 특개평09-313166호 공보(요약 등)
- [0017] (특허 문헌 7)
- [0018] 일본국 특개평10-155475호 공보(요약 등)
- [0019] (특허 문헌 8)
- [0020] 일본국 특표평11-504216호 공보(요약 등)
- [0021] (특허 문헌 9)
- [0022] 일본국 특개2005-143343호 공보(요약 등)
- [0023] (특허 문헌 10)
- [0024] 국제 특허 W02006/015304A2(요약 등)
- [0025] (특허 문헌 11)
- [0026] 일본국 특표2000-513214호 공보(요약 등)

발명의 상세한 설명

- [0027] (발명이 해결하려고 하는 과제)
- [0028] 그런데, 인체에는, 여러 가지의 응력을 받고 있는 부위(部位)가 존재하고, 이들 부위의 수복(修復)에 이용하는 조직은 그 부위마다 상이한 것이다. 예를 들면, 추간판(椎間板), 반월판(半月板), 뼈, 섬유 연골, 심장 판막에서는 체내에서 굽힘력(bending force)을 받고 있다. 이 굽힘 응력은, 단순한 압력, 압축, 인장, 전단 등과는 상이한 것이다. 이와 같은 굽힘력을 받고 있는 부위에 대하여, 단순한 압력, 압축, 인장, 전단 등의 자극 인자를, 비슷하게 배양된 조직을 적용시키는 것은 불충분하다.

- [0029] 본 발명자는, 배양하는 세포나 조직에 부여하는 자극 또는 부하로서, 굽힘이 세포나 조직의 증식 등에 지극히 유익한 것을 알아차렸다. 본 발명은, 이와 같은 지견(知見)에 근거하는 것이며, 이러한 굽힘에 관한 것으로, 특허 문헌 1 내지 특허 문헌 11에는 개시되어 있지 않고, 그 시사(示唆)도 없다.
- [0030] 그래서, 본 발명의 목적은, 세포 및/또는 조직을 포함하는 배양물(培養物)의 배양 방법에 관하여, 사람 등의 몸의 부위에 적절한 세포 및/또는 조직의 배양 방법을 제공하는 것에 있다.
- [0031] (과제를 해결하기 위한 수단)
- [0032] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은, 세포 및/또는 조직을 포함하는 배양물의 배양 방법에 관하여, 세포 및/또는 조직을 포함하는 배양물에 굽힘력을 작용시켜서 배양물을 굽힘으로써, 구체적으로는, 만곡시킴으로써, 그 오펝 부분으로부터 볼록 부분의 두께 방향에 연속적인 압축과 신장을 생기게 하여, 종전의 가압, 전단, 인장에서는 얻을 수 없는 물리적인 자극이나 변형을 배양물에 부하함으로써, 굽힘을 수반하는 부위의 조직 수복에 적합한 배양물을 실현하는 것이다.
- [0033] 그래서, 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 제1의 측면은, 세포 및/또는 조직을 포함하는 배양물의 배양 방법으로서, 상기 배양물에 굽힘 운동을 부하(負荷)하는 단계를 포함하는 구성이다.
- [0034] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 굽힘 운동은, 상기 배양물을 만곡 상태로 하는 처리를 포함하는 구성으로 해도 좋다.
- [0035] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 만곡 가능한 베드(bed)에 상기 배양물을 설치하는 단계를 포함하고, 상기 굽힘 운동은, 상기 베드를 매개로 해서 실행하는 구성으로 해도 좋다.
- [0036] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 베드는, 그 양단(兩端)을 이동 가능하게 지지하고, 중앙부에 하중(荷重)을 부하함으로써, 만곡시키는 구성으로 해도 좋다.
- [0037] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물은, 반투막(半透膜)으로 밀봉되어 있는 구성으로 해도 좋다.
- [0038] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 굽힘 운동은, 주기적 또는 단속적으로 실행하는 구성으로 해도 좋다.
- [0039] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물에는, 세포, 세포 담체, 상기 세포가 산출하는 세포외 매트릭스, 배양액 중 어느 하나를 포함하는 구성으로 해도 좋다.
- [0040] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물은, 세포가 파종된 3차원 배양 담체인 구성으로 해도 좋다.
- [0041] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물은, 겔 상태 물질을 포함하는 구성으로 해도 좋다.
- [0042] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 3차원 배양 담체는, 생체 흡수성 재료인 구성으로 해도 좋다.
- [0043] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 겔 상태 물질은, 생체 흡수성 재료인 구성으로 해도 좋다.
- [0044] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물에 연속적인 장력을 부여하는 처리, 상기 배양물에 단속(斷續)적인 장력을 부여하는 처리, 또는, 상기 배양물에 연속 또는 단속적인 장력을 주기적으로 부여하는 처리 중 어느 하나를 포함하는 구성으로 해도 좋다.
- [0045] 상기 목적을 달성하기 위해서는, 상기 배양 방법에 있어서, 바람직하게는, 상기 배양물을 가압하는 처리를 포함하고, 그 가압은, 연속, 또는 단속, 또는 주기적으로 변화되어, 불규칙하게 변화하는 구성으로 해도 좋다.
- [0046] (발명의 효과)
- [0047] 본 발명에 의하면, 다음의 효과를 얻을 수 있다.
- [0048] (1) 배양 중에 배양물을 굽히는 등의 변위(응력)를 가하므로, 배양물의 배양을 촉진할 수 있고, 예를 들면, 중간관 등의 체내에서 굽힘력을 받는 조직의 재생에 사용할 수 있다.

- [0049] 삭제
- [0050] (2) 조직 구조 등에 방향성이 있을 경우, 그 배열 방향을 한결같이 할 수 있어, 체내의 조직과 동등한 것을 얻을 수 있다.
- [0051] 삭제
- [0052] (3) 세포 이동을 용이하게 할 수 있다.
- [0053] (4) 영양물, 산소를 3차원 세포 구성체의 내부까지 침투시킬 수 있다.
- [0054] (5) 노폐물의 배출이 쉬워지게 된다.
- [0055] 삭제
- [0056] 삭제
- [0057] 그리고, 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은, 첨부 도면 및 각각의 실시형태를 참조함으로써, 한층 명확해질 것이다.

실시예

- [0091] (제1실시형태)
- [0092] 본 발명의 제1실시형태에 따른 세포 또는 조직의 배양 방법에 대해서 설명한다.
- [0093] 이 세포 또는 조직의 배양 방법에는, 배양물의 일례로서 세포 구성체(2)(도 3)가 이용된다. 이 세포 구성체(2)는, 세포, 세포 담체(scaffold), 상기 세포가 산출하는 세포외 매트릭스(extracellular matrix) 중의 어느 하나를 포함하고, 경우에 따라, 배양액이나, 그 밖의 첨가물이나, 그로스 팩터(gross factor) 혹은 약품 등을 첨가해도 좋다. 예를 들면, 세포를 부유(浮遊)시킨 배양액, 세포가 파종된 3차원 세포 담체와 겔(gel) 상태 물질이나 다른 담체를 복합시킨 것, 또한, 이것들을 반투막(semi-permeable membrane)제의 자루나 튜브에 봉입한 구성이어도 좋다. 3차원 세포 담체 및 겔 상태 물질은, 예를 들면, 생체 흡수성 재료 등으로 구성된다.
- [0094] 상기의 세포 구성체(2)를 봉입하는 반투막은, 통과할 수 있는 분자의 크기에 따라 만들어져 있다. 예를 들면, 투과 분자량이 100 [Da] (달톤)으로부터 1000 [kDa] 의 반투막 중에서 선택해 사용한다. 즉, 배양액 중의 영양분, 필요한 산소 등의 가스(gas)나 세포가 배출한 노폐물 등의 저분자 물질 등은 통과시키고, 세포나 고분자의 세포외(細胞外) 매트릭스를 통과시키지 않는 반투막을 선택하여, 세포를 가두면, 세포나 세포외 매트릭스의 유실을 방지하면서, 영양분과 산소의 공급이 가능하게 되어, 효율적인 배양이 실현된다.
- [0095] 이 세포 구성체(2)의 배양에는, 배양 베드(4)가 이용된다. 도 1은, 이 배양 베드의 구성 예를 나타내는 도면이다.
- [0096] 이 배양 베드(4)는, 세포 구성체(2)를 지지하는 동시에, 세포 구성체(2)에 대한 운동의 부여를 위한 수단으로서, 유지한 세포 구성체(2)에 변위 동작을 전달하여, 배양 베드(4)가 갖는 탄성에 의해, 세포 구성체(2)를 변위 동작 전의 상태로 되돌리는 기능부를 구성한다.
- [0097] 그래서, 이 배양 베드(4)에는, 2개의 세포 구성체(2)가 평행하게 탑재 가능한 탑재부(6)가 구비되어 있으며, 이 탑재부(6)는, 각각의 세포 구성체(2)를 평행하게 탑재하는 면적 및 형상을 가지고, 각각의 세포 구성체(2)에 굽힘 운동을 부여하기 위해서 탄성 재료로 형성되어 있는 판상부(板狀部)이다. 탄성 재료로서, 예를 들면, 스프링용 스테인리스(stainless) 강판이나 그 밖의 스프링성이 높은 재료가 이용된다. 이 경우, 배양 베드(4)의 전체를 탄성 재료로 형성해도 좋고, 굽힘 운동을 가능하게 하는 탑재부(6) 또는 그 일부를 탄성 재료로 형성해도 좋다. 탑재부(6)는, 평면인 판상부에 한정되는 것은 아니고, 네트(net) 형상이어도 좋다. 또한, 탑재부(6)는, 단일 세포 구성체(2)를 탑재하는 구성이어도 좋고, 3 이상의 세포 구성체(2)를 탑재 가능한 구성으로 해도 좋다.

- [0098] 이 탑재부(6)는 직사각형 형상이며, 그 길이 방향의 단부에는 직사각형 형상의 입벽부(立壁部)(8, 10)가 형성되고, 각각의 입벽부(8, 10)는 탑재부(6)에 대하여 직각을 이루는 동시에, 각각의 세포 구성체(2)에 대응하는 타원형의 투공부(透孔部)(12)가 형성되어 있다. 이들 투공부(12)는, 세포 구성체(2)의 양단(兩端)을 고정한다. 또한, 각각의 입벽부(8, 10)는, 각각의 세포 구성체(2)의 크기에 따라 소정의 높이(h)로 설정되어 있다.
- [0099] 각각의 입벽부(8, 10)의 정상부에는, 탑재부(6)와 평행 면으로서 일정 폭을 갖는 지지면부(14, 16)가 형성되고, 각각의 지지면부(14, 16)에는, 그 일부를 뒤집어 접어서 각각의 입벽부(8, 10)와 평행하도록 접어 져힘부(turnover)(18)가 형성되어 있다. 각각의 접어 져힘부(18)에 의해, 각각의 지지면부(14, 16) 및 각각의 입벽부(8, 10)가 보강되어 있다. 즉, 얇은 판상부로서 이루어지는 탑재부(6)와 동일한 판재로 각각의 지지면부(14, 16) 및 각각의 입벽부(8, 10)를 형성해도 충분한 강도를 얻을 수 있는 동시에, 배양 베드(4)의 경량화가 도모된다. 이 실시형태의 배양 베드(4)에서는, 지지면부(14) 측을 고정하기 위해서, 도시하지 않는 고정 핀(pin)에 대응하는 U자형의 노치(notch)부(20)가 형성되어 있다.
- [0100] 또한, 탑재부(6)의 중간 가장자리부에는, 탑재되는 세포 구성체(2)의 측면부를 떠받치는 지지벽부(22, 24)가 형성되고, 각각의 지지벽부(22, 24)의 정상부에는, 세포 구성체(2)의 상면부를 덮는 누름부(26, 28)가 형성되어 있다. 각각의 지지벽부(22, 24)는 탑재부(6)와 직교하는 벽부로서, 그 높이는 이미 설명한 입벽부(8, 10)와 마찬가지로이다. 또한, 각각의 누름부(26, 28)는 탑재부(6)와 평행 면을 구성하고 있다. 세포 구성체(2)는 탑재부(6)와 각각의 누름부(26, 28)와의 간격 내에 배치된다. 각각의 누름부(26, 28)의 종단부(終端部)는 곡면부를 구성하고, 양자 간에는 세포 구성체(2)의 착탈(着脫)을 위한 간격(30)이 설정되어 있다.
- [0101] 이어서, 세포 구성체(2)의 배양 방법에 대해서, 도 2, 도 3, 도 4A, 도 4B, 도 5A 및 도 5B를 참조해서 설명한다. 도 2는, 배양의 처리 순서를 나타내는 흐름도, 도 3은, 배양 처리되는 세포 구성체의 형태를 나타내는 도면, 도 4A 및 도 4B는, 세포 구성체의 배양 베드에의 설치를 나타내는 도면, 도 5A 및 도 5B는, 세포 구성체에 대한 굽힘 운동의 부여 및 그 해제를 나타내는 도면이다.
- [0102] 도 2에 나타난 바와 같이, 세포 구성체(2)의 배양 처리는, 전(前)처리(단계 S1), 배양 처리(단계 S2) 및 후처리(단계 S3)를 포함하고 있다. 전처리에는, 세포 구성체(2)의 형성, 반투막에의 봉입 처리 등이 포함된다. 배양 처리에는, 굽힘 운동 처리를 포함하며, 만곡 처리(단계 S21), 만곡 해제(단계 S22), 만곡 처리(단계 S23)… 만곡 해제(단계 S2N)의 반복이 실행된다. 그리고, 후처리에서는, 배양을 종료한 세포 구성체(2)의 배양 베드(4)로부터의 취출(取出) 등이 포함된다.
- [0103] (1) 전(前)처리(단계 S1)
- [0104] 세포 구성체(2)의 형성에서는, 체내에서 조직이나 세포를 꺼내고, 또한, 꺼낸 조직을 효소 등으로 분해하여, 필요로 하는 세포의 선별을 실행한다. 또한, 선별한 세포 수(數)를 늘릴 필요가 있을 경우에는, 전처리의 단계에서 단층 배양 등에 의해, 세포의 수를 늘리는 처리를 실행해도 좋다. 그리고, 얻은 세포에 대해서, 배양액, 하이드로(hydro) 겔, 겔 상태 담체를 조합해서 세포 구성체(2)를 작성한다. 그 외, 부정형 구성체로서, 배양액이나 하이드로 겔에 세포를 부유시키거나, 겔 상태 담체에 세포를 섞도록 해도 좋다. 또한, 정형 구성체로서, 배양액에 세포를 부유시켜, 이것을 콜라겐 스폰지(sponge), 키토산 스폰지 등의 세포 담체에 넣어, 세포를 부착되게 하거나, 졸(sol) 상태에서 담체에 세포를 혼입시켜, 이것을 콜라겐 스폰지, 키토산 스폰지 등의 세포 담체에 넣어, 세포를 부착시키는 동시에, 겔화시키도록 해도 좋다. 또한, 필요에 따라서 성장 인자나 약제 등을 첨가해도 좋다.
- [0105] 그리고, 도 3에 나타난 바와 같이, 배양물인 세포 구성체(2)를 통(筒) 형상의 반투막제의 튜브(32)에 봉입해서 배양을 실행한다. 반투막제의 튜브(32)의 일단(一端)에, 예를 들면 반투막으로서 이루어지는 밀봉 마개(34)를 설치하고, 타단(他端)으로부터 상기의 세포 구성체(2)를 넣고, 마찬가지로 밀봉 마개(34)로 밀봉함으로써, 세포 구성체(2)를 밀봉한다. 또한, 세포 구성체(2)를 봉입하는 튜브(32)의 크기에 대해서는, 배양하는 것의 목적, 및 세포 구성체(2)의 종류 등에 따라서 변경하도록 해도 좋다.
- [0106] 그리고, 도 4A 및 도 4B에 나타난 바와 같이, 튜브(32)에 밀봉된 세포 구성체(2)를, 배양 베드(4)의 탑재부(6)에 탑재시킨다. 배양 베드(4)에의 탑재 처리는, 세포 구성체(2)를 봉입한 튜브(32)를 누름부(26, 28)의 사이에 설치한 간격(30)을 통과시키고, 각각의 입벽부(8, 10)에 설치한 투공부(12)에 튜브(32)의 양단을 통과시키는 동시에, 튜브(32)의 중간부가 탑재부(6)와 누름부(26 또는 28)의 사이에 위치하도록 배치시킨다. 이 실시형태에 있어서는, 튜브(32)를 2개 나란히 탑재하도록 하고 있지만, 개수에 대해서는, 이것에 한정되는 것은 아니다. 또한, 이 실시형태에서는, 투공부(12)에 튜브(32)의 양단을 삽입해 통과시켜서 고정하고 있지만, 튜브의 크기에

따라서, 예를 들면, 전용 클립(clip) 등으로 배양 베드(4)에 지지시키도록 해도 좋다.

[0107] 이와 같이 탑재함으로써, 후술하는 배양 처리에 있어서, 예를 들면, 배양 베드(4)의 저부(底部) 측에 가하는 힘에 의한 배양 베드(4)의 만곡 및 그 해제에 대하여, 각각의 투공부(12) 및 누름부(26, 28)에 의해 튜브(32)가 지지되어서, 배양 베드(4)와 함께 만곡 및 복귀 동작을 시킬 수 있어, 굽힘 운동이 가능하게 된다.

[0108] (2) 배양 처리(단계 S2)

[0109] 배양 처리에서는, 도 5A에 나타낸 바와 같이, 튜브(32)에 봉입된 세포 구성체(2)를, 배양 베드(4)와 함께 배양 공간인 배양 챔버(36)에 이송하고, 그 배양 챔버(36) 내에 배양액(38) 공급을 한다. 배양 챔버(36)에 세트(set)하면, 배양액(38) 등이 유출되거나, 외부에서의 잡균 혼입을 방지하기 위해서, 예를 들면, 커버 등에 의해 배양 챔버(36)를 밀봉 상태로 한다. 또한, 배양 챔버(36)에 설치된 배양 베드(4)는, 그 지지면(14, 16)이 지지 부재(40)에 의해 지지되어 있다. 이것에 의해, 후술하는 배면 측에서의 힘 F의 부가에 의해서도, 배양 베드(4)에 상하의 변위를 생기게 하지 않고, 배양 베드(4) 및 튜브(32)를 만곡시킬 수 있다. 또한, 배양 챔버(36)에 대해서, 밀봉 상태를 유지하면서, 배양 처리 중에 배양액(38)을 순환 공급시키는 구성으로 해도 좋다. 이 경우, 배양액(38)은, 배양 챔버(36)에 연속적으로 순환시켜도 좋고, 정기적으로 교환하는 구성이어도 좋다.

[0110] 배양 베드(4)의 배면 측에서, 예를 들면, 도시하지 않는 레버(lever) 등에 의해, 힘 F를 부하시키면, 도 5B에 나타낸 바와 같이, 배양 베드(4)의 탑재부(6)가 힘 F에 의해 위쪽으로 만곡되고, 이 만곡에 의해, 탑재부(6) 상의 튜브(32)도 만곡된다. 즉, 세포 구성체(2)에는 굽힘이 생긴다. 이 굽힘 상태에서부터 힘 F를 해제하면, 배양 베드(4)의 탑재부(6)는 탄성에 의해, 원래 형상으로 복귀하여, 평탄하게 되기 때문에, 탑재부(6) 상의 세포 구성체(2)도 평탄 상태로 이행하여, 다시 도 5A에 나타내는 상태가 된다. 이 경우, 튜브(32)의 상면부(上面部)에는, 배양 베드(4)의 누름부(26, 28)가 존재하고 있어, 위쪽으로 볼록하게 변형한 튜브(32)는, 탑재부(6)의 복귀에 따라, 튜브(32)의 양단을 통과시키고 있는 투공부(12)나 누름부(26, 28)에 짝 눌러서, 탑재부(6)의 원상 복귀에 따라서 평탄화된다. 이상과 같이, 투공부(12) 및 누름부(26, 28)에 의해, 튜브(32)에 봉입된 세포 구성체(2)에는, 배양 베드(4)의 만곡 및 평탄화의 변위량과 동등한 정도의 변위량이 주어지기 때문에, 부가하는 힘 F에 의한 이동량을 제어함으로써, 세포 구성체(2)에 부여하는 굽힘 운동량도 제어하는 것이 가능하게 된다.

[0111] 그리고, 이러한 굽힘 운동이 반복되어(단계 S21~단계 S2N), 필요한 배양 시간의 경과에 따라, 튜브(32) 내에 세포가 증식하는 동시에, 세포의 매트릭스 등이 산출되어, 부정형한, 혹은 정형한 신생 조직이 재생된다. 또한, 굽힘 동작의 주기나 크기, 동작 스케줄, 배양 챔버(36) 내의 온도 설정 등은, 배양 처리 개시 전에 최적인 패턴 등에 의해 미리 설정하는 것 이외에, 세포 또는 조직의 배양 상태에 따라, 임의로 설정하도록 해도 좋다. 또한, 필요에 따라서 배양 챔버(36) 내에 압력을 가해서 배양하는 구성으로 해도 좋다.

[0112] 이와 같이, 배양에 반투막제의 튜브(32)를 이용하였을 경우, 배양액과 배양물과의 사이에 생기는 전단력의 발생을 방지하는 동시에, 세포나 세포의 매트릭스의 유실을 방지하면서, 영양분과 산소의 공급이 가능하게 되어, 효율적인 배양이 실현되지만, 영양물의 통과 저항으로 되기 때문에, 영양물 공급에 장애가 생길 우려가 있다. 그러나, 상기한 바와 같이, 굽힘 동작을 부가함으로써, 내부의 변위가 능동적으로 상승하고, 압력 차(差)가 생겨, 영양분의 이동이 쉬워지는 동시에, 세포에 물리적 자극이 주어진다. 이것에 의해, 혈관이 없는 단계의 세포 구성체(2)나, 혈관이 없는 조직에 있어서는, 굽힘 동작이 혈관이나 심장의 운동을 대행해서 배양을 실행할 수 있다.

[0113] (3) 후처리(단계 S3)

[0114] 배양을 완료한 세포 구성체(2)는, 배양 베드(4)와 함께 배양 챔버(36)(도 5A)로부터 꺼내진다. 그리고, 배양 베드(4)로부터, 세포 구성체(2)를 봉입한 튜브(32)를 떼어내, 그 내부에서 증식한 세포나, 산출한 세포의 매트릭스 등의 신생 조직을 꺼낸다. 꺼낸 신생 조직은 품질 검사 등을 실행하고, 인체 등의 치료에 이용될 때까지 보존된다.

[0115] 배양된 신생 조직은, 예를 들면, 정형 조직이라면, 봉합 등의 수단에 의해, 그대로 인체에 이식되고, 또한, 부정형 조직이라면, 결손부에 주입하거나, 조직의 형상에 맞춰서 도포, 또는 성형해서 고정시키는 등의 처리를 함으로써, 체내에서 주위의 조직과 융합하여, 조직화시키는 것이 가능하게 된다.

[0116] 이어서, 세포 구성체(2)의 배양 방법에 있어서의, 굽힘 운동과 배양에 대해서, 도 6A 및 도 6B를 참조해서 설명한다. 도 6A 및 도 6B는, 굽힘 상태에 있어서 원주 형상의 세포 구성체가 받는 힘 및 변위에 관한 해석에 이용하는 도면이다.

- [0117] 배양 베드(4)는, 상기한 바와 같이, 배양 챔버(36) 내에서 상하 등으로 어긋나지 않도록 소정의 위치에서 지지되어 있고, 또한, 세포 구성체(2)도 배양 베드(4)에 고정되어 있는 것이기 때문에, 도 5B에 나타난 바와 같이, 배양 베드(4)의 배면 측에서 힘 F가 부가되면, 배양 베드(4)의 탑재부(6)가 위쪽으로 만곡하고, 세포 구성체(2)도 배양 베드(4)를 따라 함께 변형한다.
- [0118] 물체를 구부리려고 하면, 굽힘 응력(bending stress)이 발생한다. 그리고, 물체가 굽혀짐으로써, 굽힘 변형(bending strain)이 생긴다. 구부러진 물체의 내부에서는 여러 가지 전단 변형이 생긴다. 즉, 도 6B에 나타난 바와 같이, 굽힘의 외주 측(도 6B의 위쪽)에서는 인장력이 작용해서 신장되고, 내주 측(도 6B의 아래쪽)에서는 반대로 압축력이 작용해서 축소된다. 물체 내부의 미소(微小) 부분을 생각해 보면, 미소 부분끼리가 이웃한 위치에서는, 신장이나 축소의 변위에 있어서 차이가 생기고, 거기에는, 전단 응력(shearing stress)이 발생하고 있으며, 그것에 의하여, 전단 변형(shearing strain)이 생긴다. 또한, 도 6A에 굽은 선으로 나타내는 바와 같이, 물체의 일부분에 신축의 변위가 없는(0) 면으로서, 소위 중립 면이 있지만, 그 중립 면도 포함하여, 모든 위치에서 전단 변형이 생긴다. 그리고, 그것은 일정한 방향에 생긴다.
- [0119] 또한, 굽힘에 의해 단면적이 변화되어, 내부의 압력이 변화된다. 단면 형상이 변화됨으로써, 물체 내부에는, 압력이 상승하는 부분과 저하하는 부분이 생긴다. 또한, 외주(外周)가 인장(引張), 내주(內周)가 압축되므로, 내주 부분에서는, 압력이 높고, 외주 부근에서는 압력이 낮아져 있다.
- [0120] 즉, 굽힘에는, 내부에서 인장, 압축, 전단, 압력이 다양하게 작용하고 있게 된다. 세포 구성체(2)에 굽힘 운동을 작용시키면, 인장, 압축, 전단, 압력에 의해, 세포 구성체(2)의 내부는 미묘하게 변형한다. 여기서, 압력에 의한 액체의 수축률은 무시할 수 있을 만큼 미량이기 때문에, 굽힘 운동에 의한 변형은, 세포 구성체(2)에 반복해 압력을 가하는 방법에 비하여, 훨씬 큰 변형을 생기게 할 수 있다. 이것에 의해, 굽힘의 작용은, 세포나 영양, 산소, 노폐물 등의 이동, 공급이라고 하는 효과를 더욱 크게 하는 것이 가능하게 되는 동시에, 구부리는 방향에 대하여, 어떤 특정한 방향에서 인장이나 압축의 전단력이 발생하므로, 형성되는 조직 배열을 한결같이 할 수 있다.
- [0121] 따라서, 굽힘 운동에 적합한 세포라면, 증식이 촉진되는 동시에, 조직 배열까지 생체 내의 조직을 모방한 것을 배양할 수 있다. 또한, 굽힘과 병행해서, 압력의 부가를 병용함으로써, 효과를 확대시킬 수 있다.
- [0122] 그래서, 세포 구성체(2)의 모델(model)로서, 겔 원주(圓柱)를 구부렸을 경우에 생기는 신장 등을, 도 6A 및 도 6B를 참조하여, 해석한다.
- [0123] 도 6A에 사선으로 나타내는 바와 같이, 구부리기 전의 지름이 d인 겔 원주의 길이 방향의 단면을 나타낸 도 6B에 대해서 고찰한다. 변형 전의 가로 길이를 L로 하고, 또한, 겔 원주의 중심선에 대해서, 곡률 반경이 r이 되도록 구부렸다고 한다. 구부리기 전의 겔 원주의 높이는 d(=지름)이며, 그 d를 굽힘의 내측으로부터 외측까지, m개로 구획해 나눈다. 겔 원주의 중심선을 0으로 하고, 내측을 향해서 -n번, 외측을 향해서 +n번의 섹션(section)으로 한다. 또한, 도 6B에서는, 일례로서, 겔 원주를 10의 섹션으로 분할하고, 이 겔 원주를 분할하고 있는 각각의 선과 겔 원주의 측면과의 접점을 변위의 산정 위치로 해서, 굽힘의 내측으로부터 외측을 향해서 1로부터 11까지의 섹션 위치를 나타내고 있다.
- [0124] 길이 방향에의 신장을 ΔLn, 두께 방향의 변위를 ΔRn, 총 변위를 Dn이라고 한다. 굽힘에 의한 길이 방향(원주 방향)의 변위에 대해서 해석을 실행한다. 길이 L의 겔이 굽힘의 내주에서는 수축하고, 외주에서는 신장한다. 구부리기 전의 원주의 중심선을 중립 면으로 하면, 압축 응력과 인장 응력이 동등하다. n번째의 섹션에서의 곡률 반경 r_n는,

$$r_n = r + \frac{n}{m}d \quad \dots\dots\dots (1)$$

[0125]

[0126] 이 되고, n번째의 섹션의 현(弦) 길이는,

$$\widehat{Ln} = L \times \frac{r_n}{r} \quad \dots\dots\dots (2)$$

[0127]

[0128] 이다. 그래서, 길이 방향에의 신장 ΔLn은,

$$\Delta Ln = \widehat{Ln} - L = L \times \frac{r_n}{r} - L = L \left(\frac{r_n}{r} - 1 \right) \quad \dots\dots\dots (3)$$

[0129]

[0130] 이 된다. 식 (1)을 식 (3)에 대입하면,

$$\Delta Ln = L \left(\frac{r + \frac{n \cdot d}{m}}{r} - 1 \right) = L \cdot \frac{n \cdot d}{m \cdot r} \quad \dots\dots\dots (4)$$

[0131]

[0132] 이 된다.

[0133] 이어서, 두께 방향(곡률 반경 방향)의 변위 ΔRn에 대해서 해석을 실행한다. 구부렸을 때에 가장 내측이 되는 부분으로부터 n개분의 섹션을 구부리면, 변형 전은 직사각형이었던 그 부분이, 면적을 유지하면서 부채형으로 된다. 겔 원주를 구부리면, 상기한 바와 같이, 길이 방향이 변화되므로, 그것만큼 두께가 변화된다. 이 고찰 방식으로부터 두께 방향의 변위를 산출한다. 구부렸을 때, 가장 내측이 되는 면까지의 중심에서의 거리 r₀은,

$$r_0 = r - \frac{1}{2}d \quad \dots\dots\dots (5)$$

[0134]

[0135] 이다. 최내측으로부터 n번째 섹션까지의 직사각형의 면적 S_{ns}는,

$$S_{ns} = \frac{n + \frac{m}{2}}{m} d \cdot L \quad \dots\dots\dots (6)$$

[0136]

[0137] 이며, 최내측으로부터 n번째 섹션까지의 부채형의 면적 S_n은,

$$S_n = \frac{L}{2\pi r} (\pi R_n^2 - \pi r_0^2) \quad \dots\dots\dots (7)$$

[0138]

[0139] 이 된다. S_n 와 S_n 은 동등한 면적($S_n=S_n$)을 유지하면, 식 (6), 식 (7)에 의해,

$$\left(\frac{n+\frac{m}{2}}{m}\right) \cdot d \cdot L = \frac{L}{2\pi r} (\pi R_n^2 - \pi r_0^2)$$

$$\pi R_n^2 - \pi r_0^2 = \frac{2\pi r \cdot d \cdot L \left(n + \frac{m}{2}\right)}{Lm}$$

$$\pi R_n^2 = \frac{2\pi r \cdot d \cdot L \left(n + \frac{m}{2}\right)}{Lm} + \pi r_0^2$$

$$R_n^2 = \frac{2r \cdot d \left(n + \frac{m}{2}\right)}{m} + r_0^2 \quad \dots\dots\dots (8)$$

[0140]

[0141] 이 된다. 여기서, 식 (8)에 식 (5)를 대입하면,

$$R_n^2 = \frac{2r \cdot d \left(n + \frac{m}{2}\right)}{m} + r^2 - rd + \frac{d^2}{4} = \frac{2rd \cdot n}{m} + r^2 + \frac{d^2}{4}$$

$$R_n = \sqrt{\frac{2rd \cdot n}{m} + r^2 + \frac{d^2}{4}} \quad \dots\dots\dots (9)$$

[0142]

[0143] 이 된다.

[0144] 구부리기 전의 n 번째의 섹션에 대해서, 곡률 중심으로부터의 거리 r_n 은,

$$r_n = r + \frac{n}{m}d \quad \dots\dots\dots (10)$$

[0145]

[0146] 이며, 이것으로부터 구부려졌을 때의 변위 ΔR_n 은,

$$\Delta R_n = R_n - r_n$$

$$\Delta R_n = \sqrt{\frac{2r \cdot d \cdot n}{m} + r^2 + \frac{d^2}{4}} - \left(r + \frac{n}{m}d\right) \quad \dots\dots\dots (11)$$

[0147]

[0148] 이 된다. 따라서, 종합 변위 D_n 은,

$$D_n = \sqrt{\Delta L n^2 + \Delta R n^2} \dots\dots\dots (12)$$

[0149]

[0150] 으로부터 구할 수 있다.

[0151] 이상의 해석을 이용하여, 겔 원주 내부의 변위를 도 7A, 도 7B, 도 7C, 도 8A, 도 8B, 도 8C, 도 9A, 도 9B 및 도 9C에 나타낸다. 도 7A, 도 7B 및 도 7C는, 높이가 10(=지름 d, 섹션 수=10)의 위치 중앙부에 있어서의 겔 원주 내부의 변위에 관한 해석도이고, 도 8A, 도 8B 및 도 8C는, 높이가 8(섹션 수=8)의 위치(중앙에서 어긋난 위치)에 있어서의 겔 원주 내부의 변위에 관한 해석도이고, 도 9A, 도 9B 및 도 9C는, 높이가 4(섹션 수=4)의 위치(중앙에서 더욱 어긋난 위치)에 있어서의 겔 원주 내부의 변위에 관한 해석도이다.

[0152] 상세하게는, 지름 10(d=10)의 겔 원주를 곡률 반경 50(r=50)으로 구부렸을 경우의 변화를 해석하고 있으며, 원주를 세로, 가로 10의 섹션으로 구획해 나누어, 길이의 변위는 10(L=10)에 대한 값으로 한다. 이것을 원주의 원형 면 측에서 보아서, 높이가 10(원의 중심을 구획해 나누는 섹션, 도 7A)의 경우와, 높이가 8(도 8A)의 경우와, 높이가 4(도 9A)의 경우로 나누어서 그래프(graph)화하고 있다. 각각의 도면은, 동시에 가로 축에 변위의 산출 위치를 나타내는 섹션 위치를 취하고, 세로 축에 총 변위(D_n), 두께 방향에의 변위(ΔR_n), 길이 방향에의 신장(ΔL_n)을 취하여, 높이로 변위량을 취하고 있다.

[0153] 상기의 해석 결과로부터, 원주를 구부리면, 그 원형 단면 상의 어떤 점과, 인접하는 점과의 사이에는, 반드시 변위의 크기나 방향에 차이가 생기는 것을 알았다. 이 차이에 의해, 원주의 모든 부분에 전단 응력이 생긴다. 단, 어떤 점의 길이 방향의 선상에서는, 동등한 변위와 응력이 생기고 있다.

[0154] (제2실시형태)

[0155] 이어서, 본 발명의 제2실시형태에 따른 세포 또는 조직의 배양 방법에 대해서, 도 10 및 도 11을 참조해서 설명한다. 도 10은, 제2실시형태에 있어서의 세포 구성체(2)의 형태를 나타내는 도면이고, 도 11은, 그 세포 구성체(2)를 배양 베드(4)에 탑재한 상태를 나타내는 도면이다. 도 10, 도 11에 있어서, 제1실시형태와 동일한 부분 및 동일한 구성에는 동일한 부호를 첨부하고 있다.

[0156] 이 실시형태에서는, 제1실시형태에 따른 배양 방법에 있어서, 부정형한 세포 구성체(2)를 반투막제의 튜브(42)에 봉입해서 배양을 실행한다. 예를 들면, 배양액이나 하이드로 겔에 세포를 부유시키거나, 혹은, 겔 상태 담체에 세포를 섞은 부정형한 세포 구성체(2)에 대하여, 반투막제의 튜브(42)가 형틀로 되지 않음으로써, 배양 후에 있어서도 부정형 조직이 되어, 생체 조직 간에 주입하는 등의 용도에 상응한 조직을 배양하는 것이 가능하게 된다. 또한, 상기의 겔 상태의 물질은, 예를 들면, 생체 흡수 재료로 구성된다.

[0157] 이러한 세포 구성체(2)(도 10)에 있어서도, 이미 설명한 배양 방법(도 2)을 이용해서 마찬가지로 배양할 수 있지만, 이 경우, 전(前)처리에서는, 유연성이 높은 튜브(42)를 이용하기 때문에, 그 개구 단면 형상이 부정형이며, 튜브(42)의 양단 개구의 밀봉에는 밀봉 마개(34)(도 3) 대신에, 튜브(42)가 갖는 유연성을 이용하는 동시에, 전용 클립(clip)(44)으로 밀봉한다. 즉, 튜브(42)로부터 세포 구성체(2)가 유출되는 것을 방지하기 위해서, 튜브(42)의 양단을 뒤집어 접고, 중첩 부분을 클립(44)으로 밀봉하는 등의 처리를 실시한다. 또한, 굽힘 운동에 의한 튜브(42)의 파열 방지나 튜브(42) 내에서의 세포 구성체(2)의 이동 공간을 만드는 등에 의해, 튜브(42)에의 세포 구성체(2)의 봉입은, 가득 찬 상태가 안 되도록 적당한 양을 봉입할 필요가 있다. 배양하는 목적의 양에도 따르지만, 예를 들면, 반투막제의 튜브(42)의 단면(斷面)이 타원 형상이 되도록 봉입한다.

[0158] 이상과 같이 튜브(42)에 봉입된 세포 구성체(2)는, 도 11에 나타낸 바와 같이, 배양 베드(4)에 부착된다. 배양 베드(4)에의 탑재 처리에 대해서는, 제1실시형태와 마찬가지로, 세포 구성체(2)를 봉입한 튜브(42)를 누름부(26, 28)의 사이에 설치한 간격(30)을 통과시켜, 각각의 입벽부(8, 10)에 설치한 투공부(12)에 튜브(42)의 양단을 통과시키는 동시에, 튜브(42)의 중간부가 탑재부(6)와 누름부(26 또는 28)의 사이에 위치하도록 배치시킨다. 이렇게 탑재시킴으로써, 이미 설명한 배양 처리에 있어서의 굽힘 운동에 의해, 배양 베드(4)의 탑재부(6)의 만곡 및 그 해제에 따라, 세포 구성체(2)에의 굽힘 운동이 가능하게 된다.

[0159] 이러한 구성에 있어서, 제1실시형태와 마찬가지로 배양 처리를 실시함으로써, 상기한 바와 같이, 부정형한 세포

구성체(2)의 배양이 가능하게 된다.

[0160] 또한, 세포 구성체(2)와 배양 베드(4)의 고정에 대해서는, 상기의 것 이외에, 예를 들면, 클립(44)으로 튜브(42)와 배양 베드(4)를 함께 끼우도록 하는 구성이나, 클립(44)에 배양 베드(4)와의 고정용 클립을 병설한 구성이어도 좋다.

[0161] (제3실시형태)

[0162] 이어서, 본 발명의 제3실시형태에 따른 세포 또는 조직의 배양 방법에 대해서, 도 12를 참조해서 설명한다. 도 12는, 제3실시형태에 따른 세포 구성체(2)의 형태를 나타내는 도면이다. 도 12에 있어서, 제1실시형태와 동일한 부분 및 동일한 구성에는 동일한 부호를 첨부하고 있다.

[0163] 이 실시형태에서는, 제1실시형태에 따른 배양 방법에 대하여, 세포를 정형의 세포 담체(3차원 세포 담체)(48)에 과중하여, 정형의 세포 구성체(2)를 작성하고, 반투막체의 튜브(32)에 봉입해서 배양을 실행하는 구성이다. 구체적으로는, 배양액이나 하이드로 겔에 세포를 부유시키거나, 겔 상태 담체에 세포를 섞도록 해도 좋다. 또한, 정형 구성체로서, 배양액에 세포를 부유시켜, 이것을 콜라겐 스폰지, 키토산 스폰지 등의 세포 담체에 넣어, 세포를 부착시키거나, 졸(sol)의 상태로 담체에 세포를 혼입시키고, 이것을 콜라겐 스폰지, 키토산 스폰지 등의 세포 담체에 넣어, 세포를 부착시키는 동시에, 겔화시키도록 해도 좋다. 또한, 3차원 세포 담체 및 겔 상태 물질은, 예를 들면, 생체 흡수 재료 등으로 구성된다. 배양 방법에 관해서는, 상기 제1실시형태와 마찬가지로이므로, 설명을 생략한다.

[0164] 상기 구성에 의해, 미리 정형된 세포 구성체(2)를 이용함으로써, 원하는 형상, 또는 크기의 신생 조직을 배양하는 것이 가능하게 된다.

[0165] (제4실시형태)

[0166] 이어서, 본 발명의 제4실시형태에 따른 세포 또는 조직의 배양 시스템에 대해서, 도 13을 참조해서 설명한다. 도 13은, 세포 또는 조직의 배양 시스템을 나타내는 도면이다. 도 13에 있어서, 제1실시형태와 동일한 부분 및 동일한 구성에는 동일한 부호를 첨부하고 설명을 생략한다.

[0167] 이 실시형태에서는, 제1실시형태로부터 제3실시형태에 따른 세포 또는 조직의 배양 방법에 있어서, 배양액의 순환이나, 수시(隨時), 신선한 배양액을 공급시키는 동시에, 배양실(培養室)의 온도나 압력, 공급하는 혼합 가스 G의 농도 등을 제어해서 배양하는 배양 시스템(50)을 구성하고 있다.

[0168] 배양 시스템(50)에는, 배양 장치인 인큐베이터(52)가 이용된다. 이 인큐베이터(52)의 배양실(53)에는, 배양 유닛(54), 배양 회로(56), 액추에이터(58), 온도 조절기(60), 가스 농도 조절기(62), 가압 장치(64)가 설치되고, 이것들은 인큐베이터(52)의 외부에 있는 제어 장치(66)로 제어된다.

[0169] 배양 유닛(54)은 세포 구성체(2)에 압력이나 상기와 같이 힘 F 등을 부여해서 배양하는 배양 수단으로서, 그 내부에는 이미 설명한 배양 공간인 배양 챔버(36)가 형성되어 있다. 가압 장치(64)는, 제어 장치(66)로 제어되어, 배양 챔버(36) 내의 배양 베드(4)의 하면(下面) 측에 압력 P를 작용시킨다.

[0170] 배양 회로(56)는, 배양 수단에의 배양액(38) 등의 공급 및 순환시키는 수단으로서, 배양액(38)을 모아두는 배양액 저류조(70)와, 배양액(38)이나 배양실(53)에 혼합 가스 G(질소, 산소, 이산화탄소 등)를 공급하는 가스 교환부(72)와, 펌프(74)와, 체크 밸브(76)와, 배양 유닛(54)과, 배양실(53)이나 배양 챔버(36) 내의 압력을 조절하는 압력 조절 밸브(78)를 연결하는 순환 튜브(80)에 의해 구성되어 있다.

[0171] 펌프(74)는, 예를 들면, 피스톤식 펌프, 시린지 펌프(syringe pump), 페리스탈틱 펌프(peristaltic pump)를 사용할 수 있다. 펌프(74)의 구동, 압력 조절 밸브(78)의 개폐, 그 개도(開度) 등이 제어 장치(66)에 의해 조정된다. 액추에이터(58)는, 배양 유닛(54)이 세포 구성체(2)에 힘 F를 부가하기 위한 구동원(驅動源)이다. 온도 조절기(60)는, 배양실(53) 및 배양 챔버(36) 내의 온도를 조절한다. 가스 농도 조절기(62)는, 배양액 저류조(70)나 배양액(38)에 공급하는 혼합 가스 G(질소, 산소, 이산화탄소 등)의 농도 조절을 실행한다. 그리고, 제어 장치(66)는, 이들 각각의 기능부의 제어를 실행하며, 구체적으로는, 온도 조절이나 가스 농도의 조절 등을 모아서 제어하는 것 이외에, 배양액 저류조(70)의 순환이나 펌프(74)의 동작, 액추에이터(58)의 동작 등의 제어를 실행한다.

[0172] 이러한 배양 시스템(50)에 의해 이미 설명한 배양 처리를 실행하면, 급힘 운동을 부하한 배양 처리를 실행할 수 있는 동시에, 배양 회로(56)에 의한, 배양 챔버(36)에의 배양액(38)의 공급 및 노폐물 등의 배제가 가능하게 된

다. 또한, 가압 장치(64)에 의해, 배양 유닛(54)에의 가압을 연속적, 단속적, 또는, 주기적 등으로 제어할 수 있어, 온도나 압력을 원하는 상태로 유지하면서 배양을 실행할 수 있다. 이 결과, 효율적이고 또한 신뢰성이 높은 배양을 실행할 수 있다.

[0173] 이 배양 시스템(50)에서는, 배양액 저류조(70), 액추에이터(58), 펌프(74)를 인큐베이터(52)의 내부에 설치하고 있지만, 이것에 한정되는 것은 아니고, 이것들의 전부 또는 일부를 인큐베이터(52)의 외부에 구성하도록 해도 좋다. 또한, 액추에이터(58)의 동작은, 가압 장치(64)로 배양 챔버(36)에의 가압과, 배양액(38)을 공급하는 펌프(74) 등의 동작을 연동시키도록 해도 좋으며, 또한, 배양 처리의 도중에 중단하도록 해서, 곱힘 운동을 주기적 또는 단속적으로 부하하면, 세포에 효과적인 자극을 부여할 수 있다.

[0174] (기타의 실시형태)

[0175] 상기 실시형태에서는, 배양물인 세포 구성체(2)에 대하여, 배양 베드(4)의 배면 측에서 힘 F를 부가하고, 배양 베드(4)를 위쪽으로 만곡시킴으로써 세포 구성체(2)를 구부리고 있지만, 배양 베드(4), 혹은, 세포 구성체(2) 자체에 소정의 곱힘 변위를 부여하도록 해도 좋다. 또한, 이 처리에서는, 연속적 또는 단속적으로 부여하거나, 연속 또는 단속하는 장력을 주기적으로 부여하도록 해도 좋다. 이러한 구성에 있어서도, 세포 구성체(2)에 소정의 곱힘을 시행할 수 있다.

[0176] (실험 결과)

[0177] 이어서, 본 발명의 배양 방법을 이용한 실험 결과에 대해서, 도 14 내지 도 18을 참조해서 설명한다.

[0178] 도 14는, 세포 구성체를 나타내고, 이 세포 구성체는, 배양액 중에 부유시킨 세포를 반투막의 튜브에 넣어서 구성하고 있다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 세포 구성체는 배양 베드에 고정되어, 배양 챔버에 수용된다. 이 경우, 구동부는 배양 챔버로부터 분리되어 있다.

[0179] 배양 유닛에는 액추에이터로부터의 가압이 작용하여, 세포 구성체에 곱힘 동작이 부가된다. 액추에이터는, 배양실의 외부에 장치되고, 케이블은 배양실 도어(door)를 관통해서, 구동부에 접속되어 있다. 액추에이터의 동작 상태는 표시 장치에 의해 확인할 수 있다.

[0180] 액추에이터는, 모터의 회전 운동을 크랭크(crank)로써 직선 운동으로 변환하고 있으며, 크랭크 암(crank arm)의 길이 선택에 의해, 와이어(wire)의 진퇴 폭을 조절할 수 있고, 이것에 따라서 세포 구성체에 부여되는 곱힘의 크기가 조절된다.

[0181] 이 실험에서는, 가압 동작에 관하여, 대기압을 유지하고, 곱힘 동작에만 한정하여, 배양액 순환을 실행하였다. 압력과, 액추에이터에 의한 곱힘 동작은 각각에 무관계로 단독으로 부가하였다. 이 실험에서는, 예를 들면, 0.5 [MPa] 이상의 가압을 부여하는 것도 생각된다.

[0182] 또한, 도 16 내지 도 18은, 척추 기관의 배양 실험(vertebrae organ culture of 2 days old mouse)을 나타내고 있다. 실험은, 생후 2일의 마우스로부터 꺼낸 척추를 배양 베드에 설치해(도 16), 0.1 [Hz]의 주파수로 곱힘 동작을 부가하여, 10일 간의 배양을 실시하였다. 이 실험에서는, 가압은 하지 않고 있다.

[0183] 비교 예로서, 정지 배양을 실행하였다. 도 17 및 도 18은, 10일 간의 정지 배양(static 10 days)을 나타내고 있다. 10일 후에, 기관의 단면(斷面)을 톨루이디엔 블루(toluidine blue) 염색하여, 세포의 생존 상황을 관측하였다. 도면 중, 착색 부분은 명시할 수 없지만, 밝기가 저하하고 있는 부분(염색 부분)이 생존 세포의 존재를 나타내고 있다. 정지 배양에서는, 추간판(椎間板) 내부의 세포 밀도가 상승하지 않고, 매트릭스의 변성이 보였다(도 17의 a).

[0184] 이것에 대하여, 곱힘 동작, Displacement(변위)를 부가한 척추에는, 추간판 내부의 세포의 증생(增生) 및 신생 매트릭스의 축적이 인정되었다(도 18의 b).

[0185] 이 실험 결과로부터, 곱힘 동작을 부여한 배양은, 정지 배양과 비교하여, 세포의 증생 및 신생 매트릭스의 퇴적(堆積)이 보이기 때문에, 그 곱힘 동작이 세포 구성체에 자극을 부여하는 동시에, 물질 이동을 촉진시키고 있는 것을 추측할 수 있다.

[0186] 이상과 같이, 본 발명의 가장 바람직한 실시형태 등에 대해서 설명하였지만, 본 발명은, 상기 기재에 한정되는 것은 아니고, 특허청구의 범위에 기재되고, 또는 명세서에 개시된 발명의 요지에 근거하여, 당업자에 있어서 여러 가지 변형이나 변경이 가능한 것은 물론이며, 이와 같은 변형이나 변경이, 본 발명의 범위에 포함되는 것은 말할 필요도 없다.

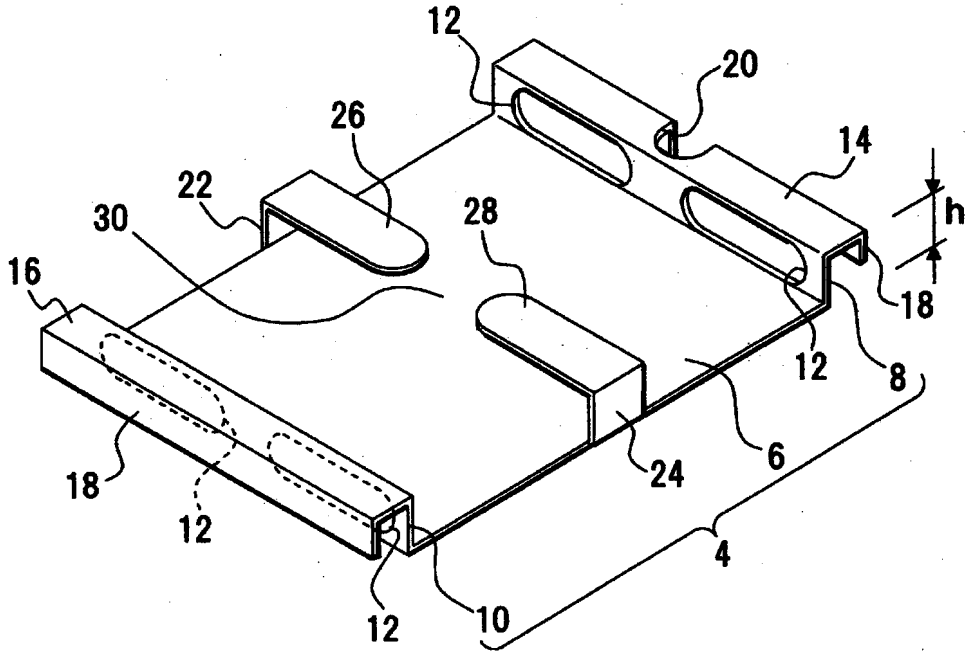
[0089] 36: 배양 챔버

38: 배양액

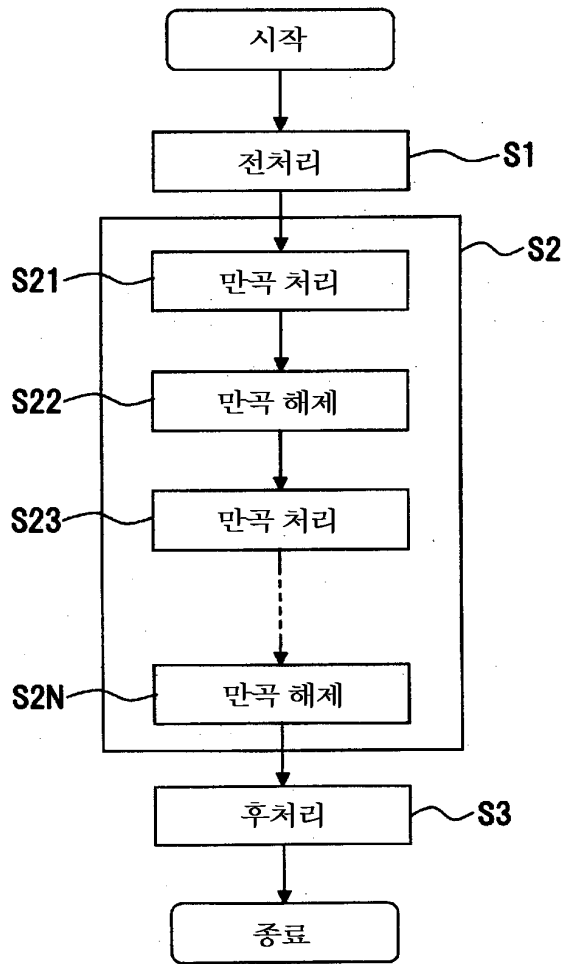
[0090] 40: 지지 부재

도면

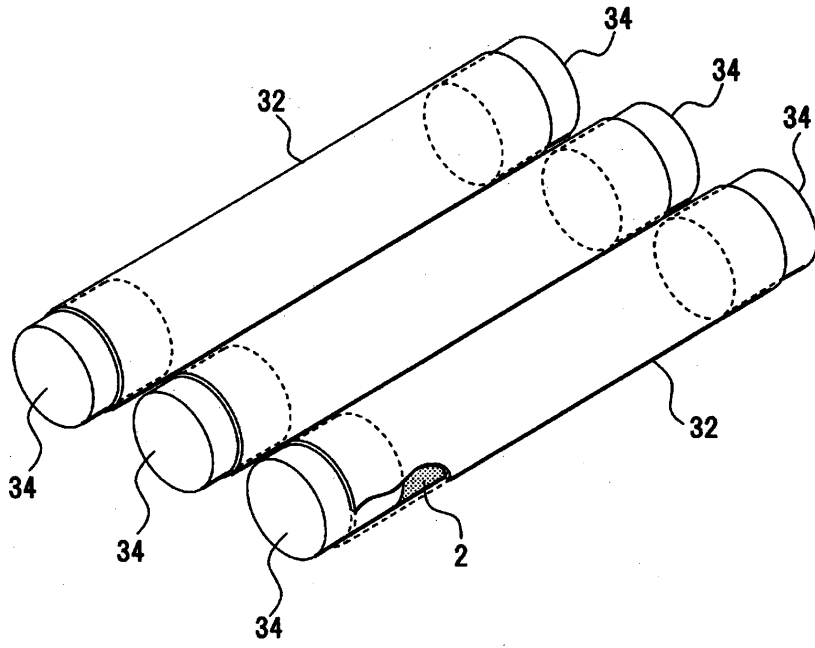
도면1



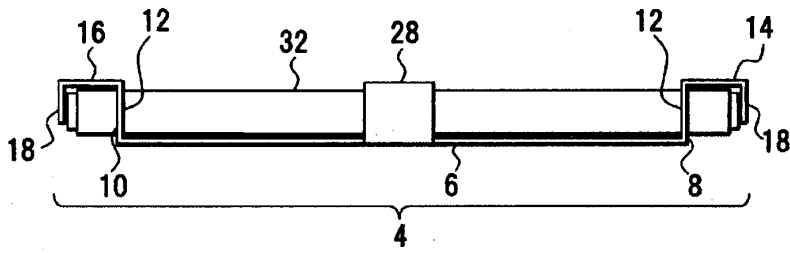
도면2



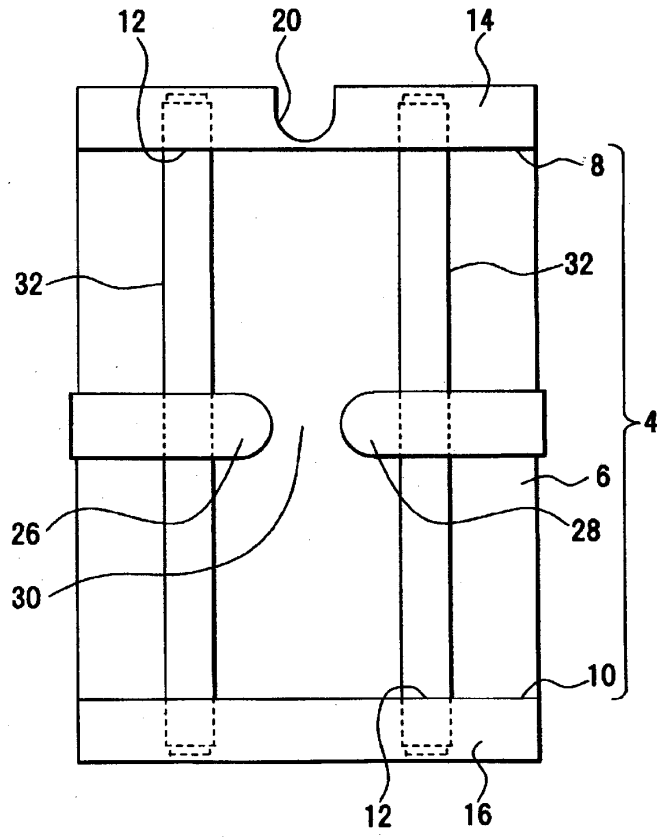
도면3



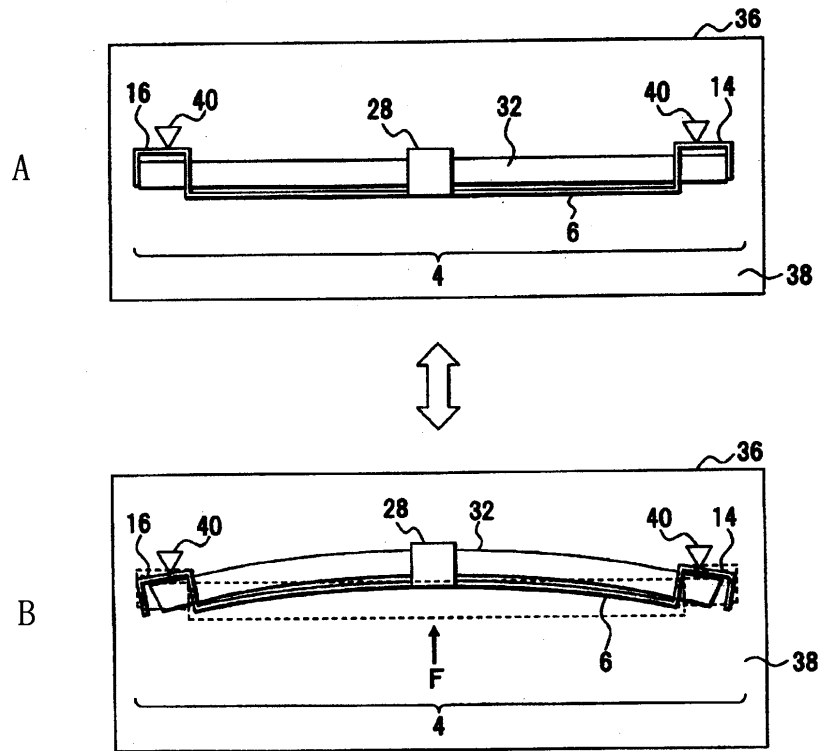
도면4A



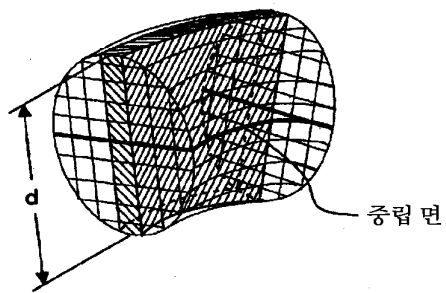
도면4B



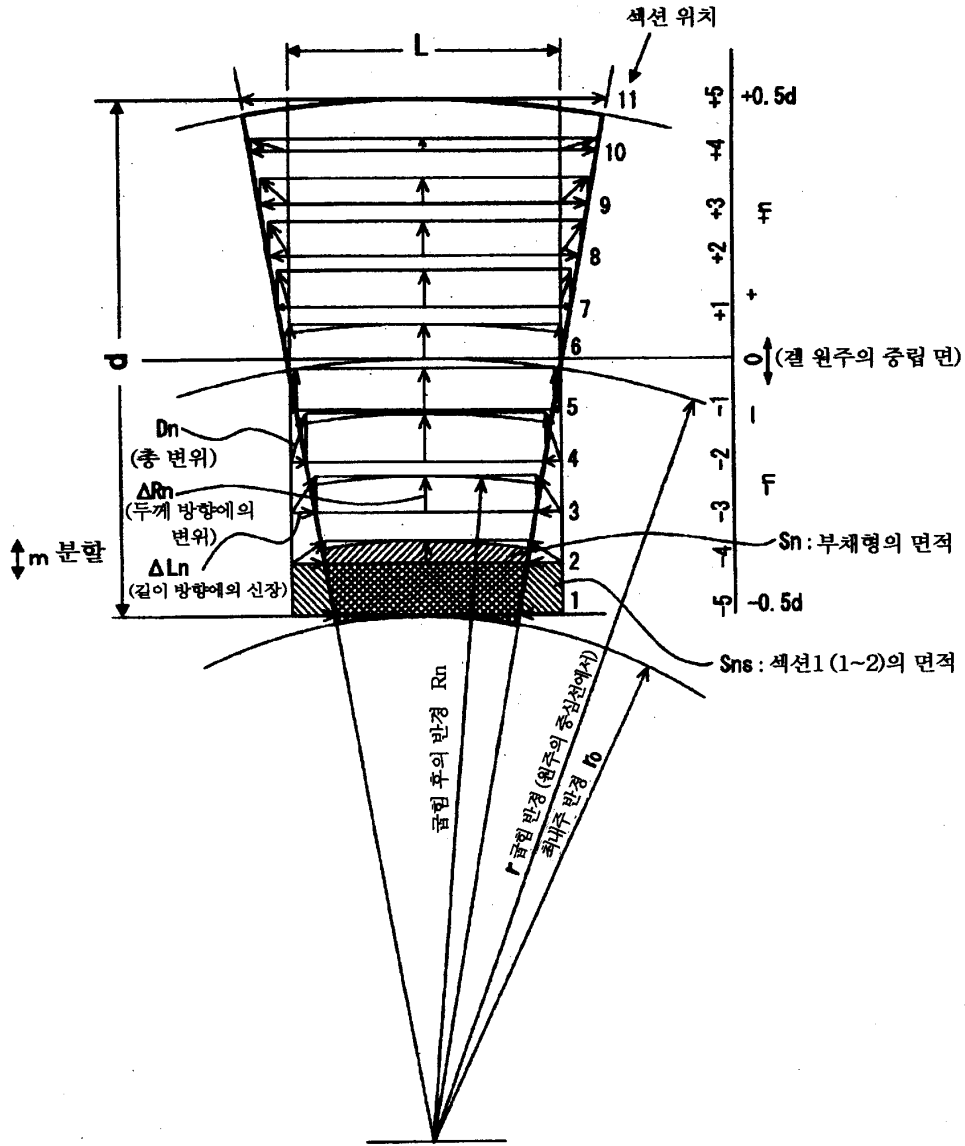
도면5



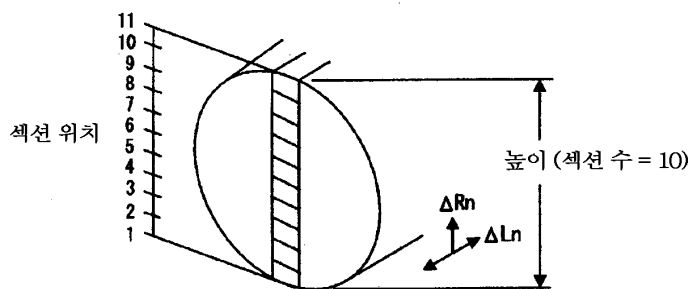
도면6A



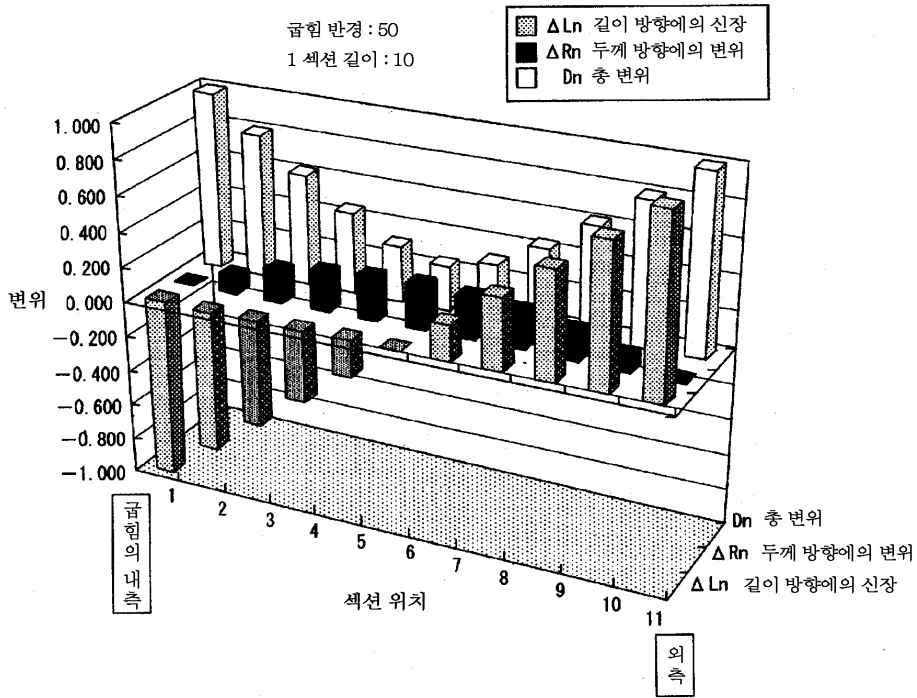
도면6B



도면7A



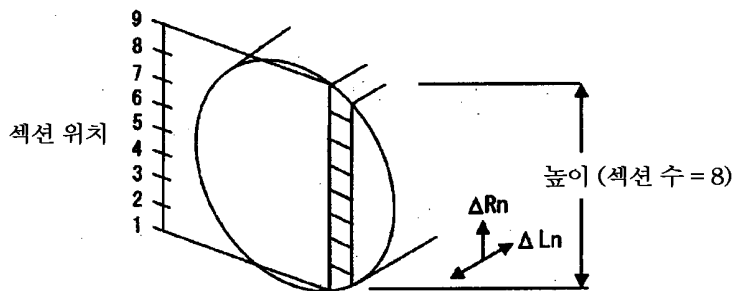
도면7B



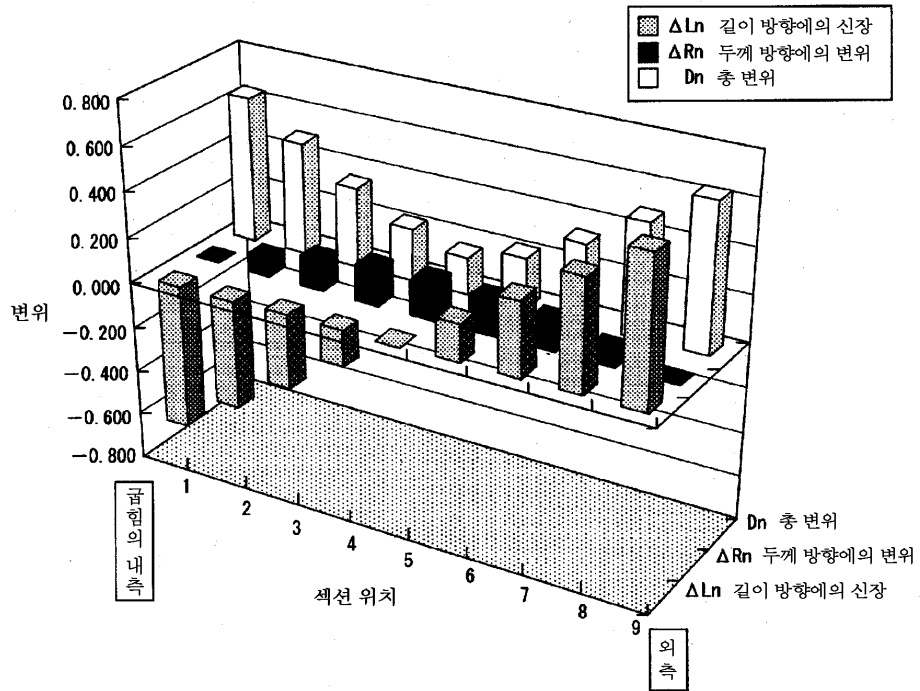
도면7C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ΔLn	-1.000	-0.800	-0.600	-0.400	-0.200	0.000	0.200	0.400	0.600	0.800	1.000
ΔRn	0.000	0.098	0.170	0.218	0.244	0.249	0.235	0.202	0.151	0.083	0.000
Dn	1.000	0.806	0.624	0.456	0.316	0.249	0.308	0.448	0.619	0.804	1.000

도면8A



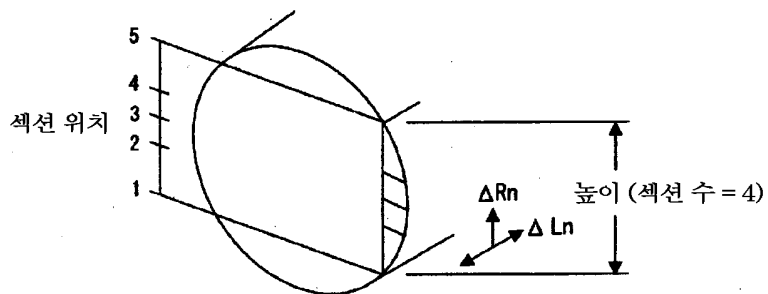
도면8B



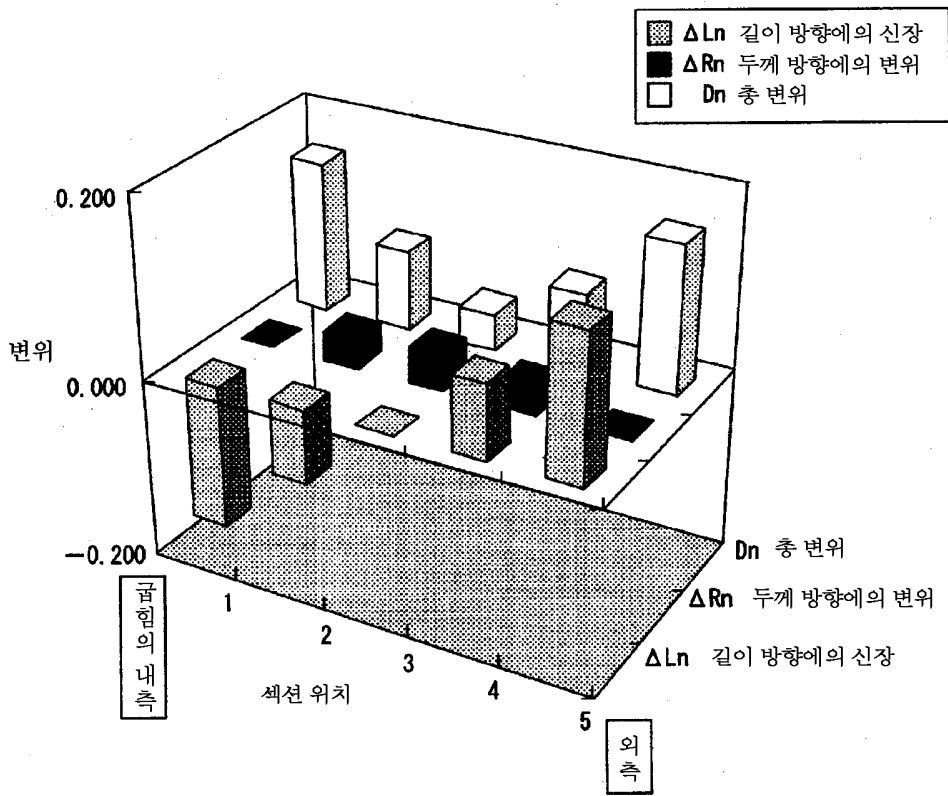
도면8C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ΔLn	-0.640	-0.480	-0.320	-0.160	0.000	0.160	0.320	0.480	0.640
ΔRn	0.000	0.074	0.125	0.153	0.160	0.147	0.115	0.066	0.000
Dn	0.640	0.486	0.343	0.221	0.160	0.217	0.340	0.485	0.640

도면9A



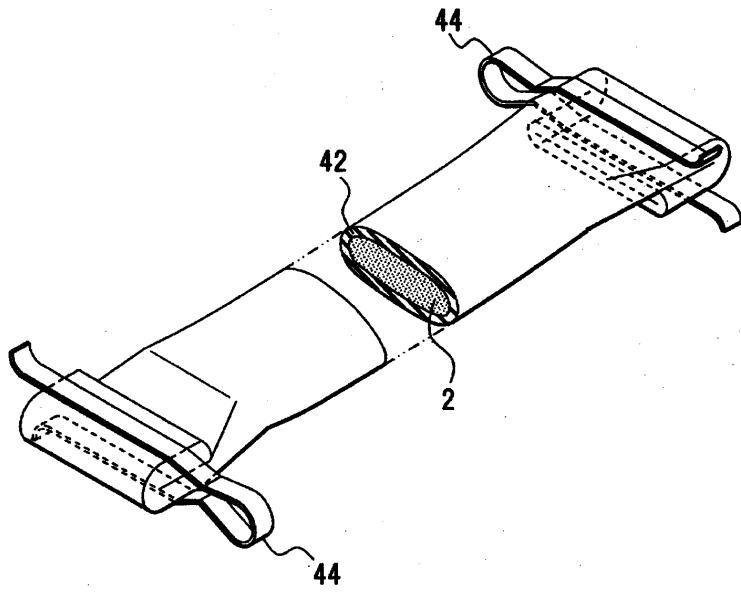
도면9B



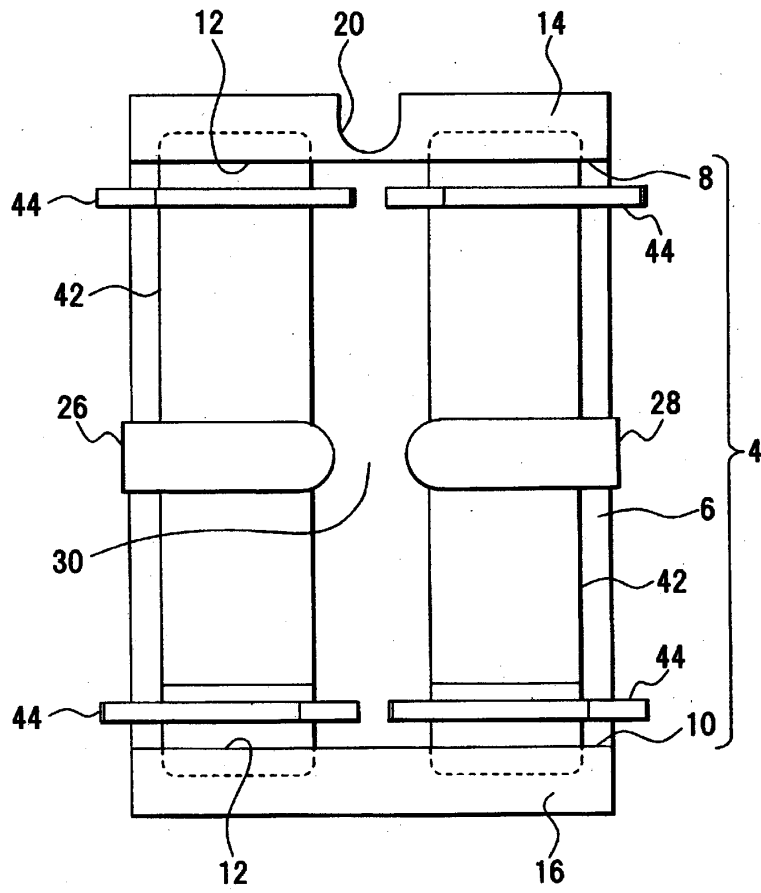
도면9C

	1	2	3	4	5
ΔLn	-0.160	-0.080	0.000	0.080	0.160
ΔRn	0.000	0.031	0.040	0.029	0.000
Dn	0.160	0.086	0.040	0.085	0.160

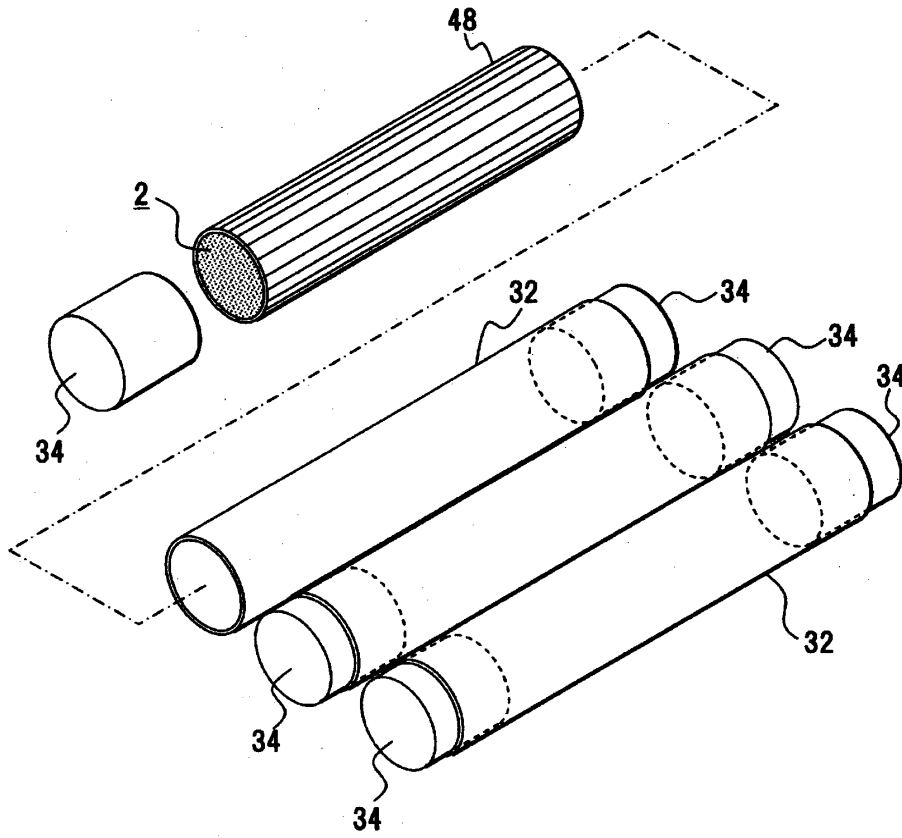
도면10



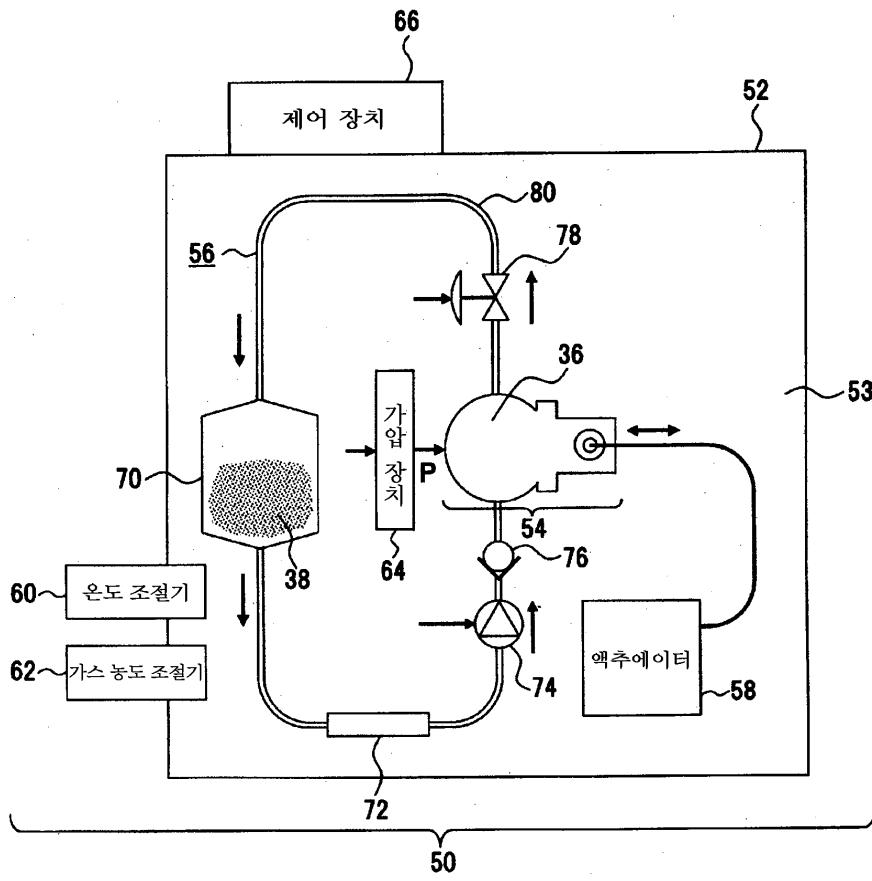
도면11



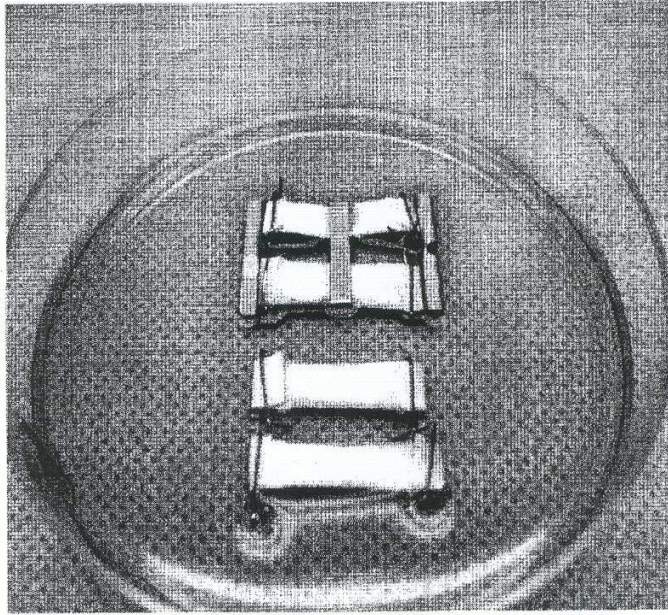
도면12



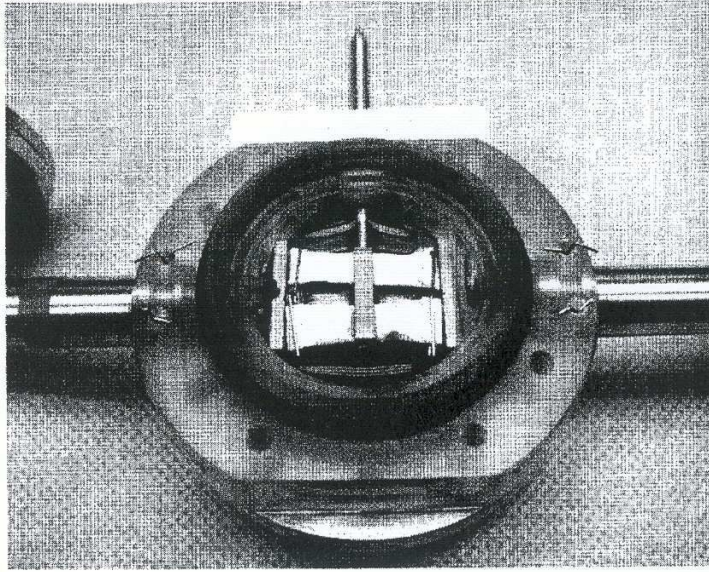
도면13



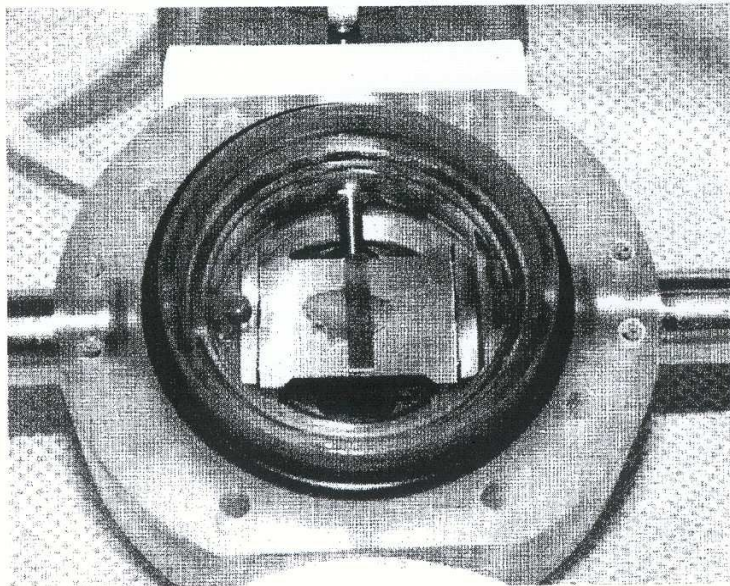
도면14



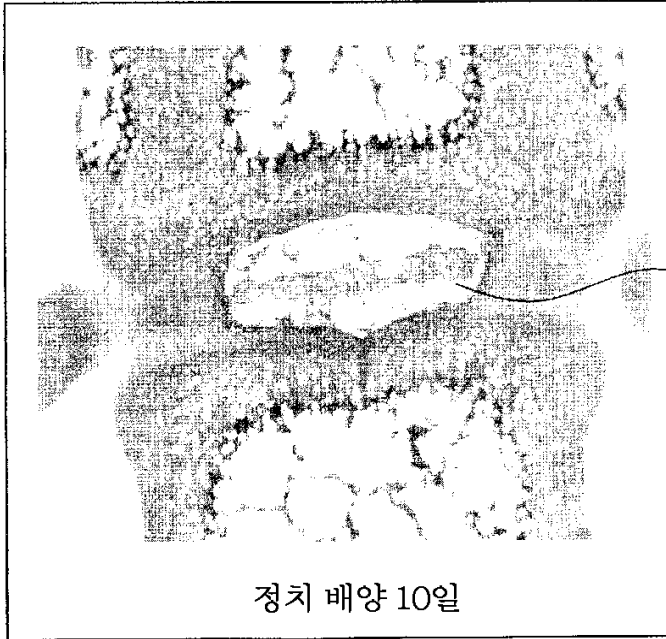
도면15



도면16



도면17



도면18

