

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年1月11日(11.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/010064 A1

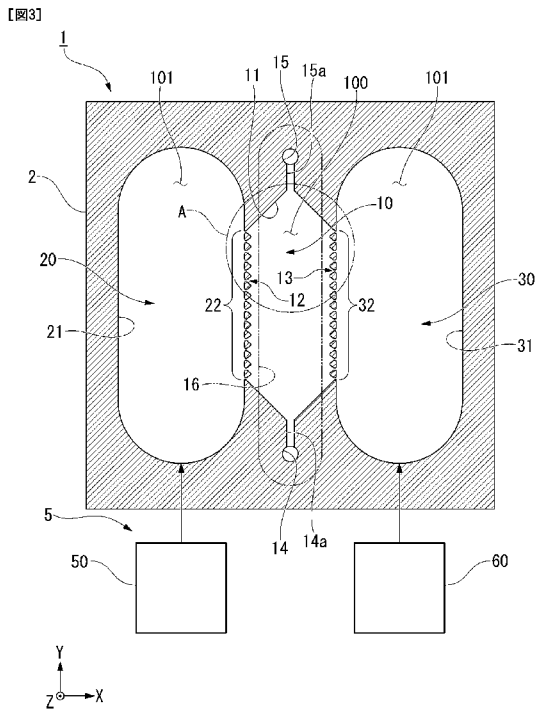
- (51) 国際特許分類:  
C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)  
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/025128
- (22) 国際出願日: 2023年7月6日(06.07.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-110291 2022年7月8日(08.07.2022) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)

[JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関  
1丁目3番1号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者: 杉浦 慎治(SUGIURA Shinji); 〒3058560  
茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究  
開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).  
柿澤 佳子(KAKIZAWA Yoshiko); 〒3058560 茨  
城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究  
開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 金  
森 敏幸(KANAMORI Toshiyuki); 〒3058560 茨  
城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究  
開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).  
進 和美(SHIN Kazumi); 〒3058560 茨城県つく  
ば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発  
法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(54) Title: CELL CULTURE APPARATUS AND CELL CULTURE METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養装置及び細胞培養方法



(57) Abstract: This cell culture apparatus is equipped with a hydrogel chamber, a culture vessel and a pneumatic device. The hydrogel chamber holds a hydrogel for culturing a cell. The culture vessel is equipped with a first culture solution storage unit which is connected to a first surface of the hydrogel chamber, and a second culture solution storage unit which is connected to a second surface of the hydrogel chamber which differs from the first surface. The pneumatic device is connected to the culture vessel, produces a pressure difference based on air pressure between the first culture solution storage unit and the second culture solution storage unit, and causes pressurized osmosis of the culture solution stored in the first culture solution storage unit and/or the second culture solution storage unit into the hydrogel in the hydrogel chamber.

(57) 要約: この細胞培養装置は、ハイドロゲルチャンバ一と、培養容器と、空圧装置と、を備える。ハイドロゲルチャンバ一は、細胞を培養するハイドロゲルを保持する。培養容器は、ハイドロゲルチャンバ一の第1面と連通する第1培養液貯留部と、ハイドロゲルチャンバ一の第1面と異なる第2面と連通する第2培養液貯留部と、を備える。空圧装置は、培養容器に接続され、第1培養液貯留部と第2培養液貯留部との間に空圧に基づく圧力差を生じさせて、第1培養液貯留部及び第2培養液貯留部の少なくとも一方に貯留された培養液を、ハイドロゲルチャンバ一のハイドロゲルに加圧浸透させる。



WO 2024/010064 A1

(74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：細胞培養装置及び細胞培養方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養装置及び細胞培養方法に関するものである。

本願は、2022年7月8日に、日本に出願された特願2022-110291号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

### 背景技術

[0002] 下記特許文献1には、マイクロ流路デバイスが開示されている。このマイクロ流路デバイスは、光学的に透明な材料からなる基材を備え、さらに1つ又はそれ以上の流体チャネル、1つ又はそれ以上の流体チャネル入口、1つ又はそれ以上の流体チャネル出口、1つ又はそれ以上のゲルケージ領域、及び複数の支柱を備えている。各ゲルケージ領域の全部又は一部は、1つ又はそれ以上の流体チャネルの全部又は一部が側面に配置され、それにより1つ又はそれ以上のゲルケージ領域-流体チャネルの界面領域を作り出している。

[0003] 各ゲルケージ領域は、ゲルケージ領域を形成する支柱の列を少なくとも1つ備え、少なくとも1つの支柱の列でそれぞれの支柱が、三角形、90°未満の内角を含む台形、又はそれらの組み合わせで形成されている。また、少なくとも1つの支柱の列でそれぞれの支柱の角の内角と基材表面上のゲルの接触角度との合計が、180°であり、少なくとも1つの支柱の列で隣接する各対の支柱間の距離が、50マイクロメートル~300マイクロメートルとされている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：特許第6967535号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] 従来から、上記のようなマイクロ流路デバイスを使用し、微小血管等を生体外で構築するために、血管内皮細胞をハイドロゲルの内部やその近傍に配置し、自発的に血管組織を構築させる細胞培養方法が知られている。しかしながら、この方法ではハイドロゲル内への酸素や栄養素の供給の制限のため、構築できる血管組織の大きさには制約があった。

[0006] 本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、生体外で効率的に大きな細胞組織を構築できる細胞培養装置及び細胞培養方法の提供を目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一態様に係る細胞培養装置は、細胞を培養するハイドロゲルを保持するハイドロゲルチャンバーと、前記ハイドロゲルチャンバーの第1面と連通する第1培養液貯留部と、前記ハイドロゲルチャンバーの前記第1面と異なる第2面と連通する第2培養液貯留部と、を備える培養容器と、前記培養容器に接続された空圧装置と、を備え、前記空圧装置は、前記第1培養液貯留部と前記第2培養液貯留部との間に空圧に基づく圧力差を生じさせて、前記第1培養液貯留部及び前記第2培養液貯留部の少なくとも一方に貯留された培養液を、前記ハイドロゲルチャンバーのハイドロゲルに加圧浸透させる。

[0008] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記第1培養液貯留部及び前記第2培養液貯留部の少なくとも一方は、培養液を貯留する培養液貯留槽と、前記培養液貯留槽と前記ハイドロゲルチャンバーとを連通させるマイクロ流路と、を備えてもよい。

[0009] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記マイクロ流路には、前記マイクロ流路よりも断面積が小さい抵抗流路が、1つまたは並列に複数設けられていてもよい。

[0010] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記抵抗流路の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は、培養液の粘度 ( $\mu$ )、前記ハイドロゲルチャンバーの前記第1面から前記第2面までの長さ ( $L$ )、前記ハイドロゲルチャンバーの高

さ（d）、前記第1面または前記第2面の幅を前記マイクロゲルチャンバーの高さで割った値を（N）としたとき、 $R_{MC} \geq 8 \mu L / \pi d^4 N$ の関係を満たしてもよい。

[0011] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記マイクロ流路が、一対で設けられていてもよい。

[0012] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記第1培養液貯留部は、前記培養液貯留槽として第1培養液貯留槽と、前記マイクロ流路として第1マイクロ流路と、を備え、前記第2培養液貯留部は、前記培養液貯留槽として第2培養液貯留槽と、前記マイクロ流路として第2マイクロ流路と、を備え、前記第1培養液貯留槽と前記第2培養液貯留槽とを連通させる培養液の返送流路と、前記第1マイクロ流路及び前記第2マイクロ流路の少なくとも一方と、前記返送流路に、培養液の逆流を防止する機構を備えてもよい。

[0013] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記逆流を防止する機構として、気泡の侵入を防ぐ受動バルブを備えてもよい。

[0014] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記受動バルブの耐圧性が、 $0.1 \text{ [kPa]} \sim 10 \text{ [kPa]}$ の範囲内であってもよい。

[0015] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記マイクロゲルチャンバーの直上部には、開口部が形成されていてもよい。

[0016] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記開口部を介して連通する第3培養液貯留部が設けられており、前記第2開口部には、一方の面がマイクロゲルに面し、他方の面が培養液に面する透過性の膜が設けられていてもよい。

[0017] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記空圧装置は、前記第3培養液貯留部と接続されていてもよい。

[0018] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記空圧装置は、前記培養容器に接続される空圧配管を備え、前記空圧配管には、フィルターが設けられていてもよい。

[0019] また、本発明の一態様に係る細胞培養装置において、前記ハイドロゲルチャンバーに、前記空圧に基づく圧力差を生じさせた状態でハイドロゲルを保持させる機構を備えてもよい。

[0020] 本発明の一態様に係る細胞培養方法は、先に記載の細胞培養装置を用いて、前記ハイドロゲルチャンバー内で細胞を培養する。

[0021] また、本発明の一態様に係る細胞培養方法において、前記細胞を培養し、前記ハイドロゲルチャンバー内で血管組織を形成してもよい。

### 発明の効果

[0022] 上記本発明の一態様によれば、生体外で効率的に大きな細胞組織を構築できる。

### 図面の簡単な説明

[0023] [図1]第1実施形態に係る細胞培養装置を示す斜視図である。

[図2]図1に示す矢視I-I断面図である。

[図3]図2に示す矢視I-I-I断面図である。

[図4]図3に示す領域Aの拡大図である。

[図5]第2実施形態に係る細胞培養装置を示す斜視図である。

[図6]図5に示す矢視V-V断面図である。

[図7]図6に示す矢視V-V-I断面図である。

[図8]第3実施形態に係る細胞培養装置を示す斜視図である。

[図9]第3実施形態に係る細胞培養装置の要部を示す平断面図である。

[図10]第4実施形態に係る細胞培養装置の要部を示す平断面図である。

[図11]図10に示す領域Bの拡大図である。

[図12]第5実施形態に係る細胞培養装置を示す斜視図である。

[図13]図12に示す矢視X-X-I-I断面図である。

[図14]図13に示す矢視X-V-X-V断面図である。

[図15]第6実施形態に係る細胞培養装置を示す斜視図である。

[図16]図15に示す矢視X-V-I-I断面図である。

[図17]図16に示す矢視X-V-I-I-I断面図である。

[図18]第7実施形態に係る細胞培養装置を示す平面模式である。

[図19]第8実施形態に係る細胞培養装置を示す平面模式図である。

[図20]第9実施形態に係る細胞培養装置を示す平面模式図である。

[図21]第1実施例に係る血管直径とずり応力および流量の関係を示すグラフである。

[図22]第1実施例に係る「抵抗流路なし」の場合の血管組織の蛍光顕微鏡画像である。

[図23]第1実施例に係る「抵抗流路あり」の場合の血管組織の蛍光顕微鏡画像である。

[図24]第1実施例に係る「抵抗流路なし」の場合の血管組織全体の蛍光顕微鏡画像である。

[図25]第1実施例に係る「抵抗流路あり」の場合の血管組織全体の蛍光顕微鏡画像である。

[図26]第1実施例に係る培養液の順送の流量と培養期間との関係を示すグラフである。

[図27]第2実施例に係る細胞培養装置を示す平面模式図である。

[図28]第2実施例に係る培養容器を2.0 [kPa]で加圧した直後と50秒後のCalceinの蛍光顕微鏡画像である。

[図29]第2実施例に係る培養容器を0.5 [kPa]、1.0 [kPa]、2.0 [kPa]、及び3.0 [kPa]で加圧した際のRhodamine-Dextranの蛍光の界面の移動を時間ごとに測定した結果を示すグラフである。

[図30]第2実施例に係る培養容器を0.5 [kPa]、1.0 [kPa]、2.0 [kPa]、及び3.0 [kPa]で加圧した際のCalceinの蛍光の界面の移動を時間ごとに測定した結果を示すグラフである。

[図31]第2実施例に係る間葉系幹細胞を含む場合と含まない場合の血管の形成挙動を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図32]第2実施例に係る間葉系幹細胞を含む場合と含まない場合の血管の流

量変化を示すグラフである。

[図33]第2実施例の一変形例に係る細胞培養装置を示す平面模式図である。

[図34]第2実施例とその一変形例に係る一方向流れと往復流れの環境下での血管組織の形成挙動を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図35]第2実施例とその一変形例に係る一方向流れと往復流れの環境下での血管組織の流量変化を示すグラフである。

[図36]第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置で形成した血管組織のバリア能を評価するために、蛍光物質の血管壁の透過係数を求める際の画像解析図である。

[図37]第2実施例とその一変形例に係る (i) 間葉系幹細胞なし・一方向流れ、(ii) 間葉系幹細胞あり・一方向流れ、(iii) 間葉系幹細胞あり・往復流れの3つの条件で求めた Calcein の透過係数を示す。

[図38]第2実施例とその一変形例に係る (i) 間葉系幹細胞なし・一方向流れ、(ii) 間葉系幹細胞あり・一方向流れ、(iii) 間葉系幹細胞あり・往復流れの3つの条件で求めた Rhodamine-Dextran の透過係数を示す。

[図39]第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置で形成した血管内皮細胞を、マーカーである CD31 で染色した画像と、間葉系幹細胞のマーカーである NG2 で染色した画像を示す図である。

[図40]第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置で形成した血管内皮細胞を、血管壁のタイトジャンクションを構成する ZO-1 で染色した画像を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明の各実施形態について図面を参照して説明する。

なお、本発明は、創薬における医薬品候補化合物の血管透過性試験、再生医療や細胞アッセイ用途のオルガノイド培養、がんの浸潤評価などへ応用できる。

創薬においては、薬物の体内動態を評価する際に、薬剤の血管壁透過性を

評価する場合があります、本発明の細胞培養装置及び細胞培養方法は、血管透過性を評価する試験装置や試験方法として利用できる。特に血液脳関門の透過性を正確に評価できる装置や試験方法として利用できる。

また、再生医療では近年オルガノイド培養法が着目されているが、本発明の細胞培養装置及び細胞培養方法はオルガノイドをより成熟させるために血管化されたオルガノイドの培養に利用できる。

また、がんの遠隔転移は血管を介したがん細胞の移動が関わっており、本発明の細胞培養装置及び細胞培養方法は、がん細胞の転移を評価するモデルとして創薬や臨床検査に利用できる。

[0025] (第1実施形態)

図1は、第1実施形態に係る細胞培養装置1を示す斜視図である。図2は、図1に示す矢視11-11断面図である。図3は、図2に示す矢視111-111断面図である。図4は、図3に示す領域Aの拡大図である。

図1に示すように、細胞培養装置1は、細胞を培養するハイドロゲル100を保持し、その細胞に酸素や栄養等を供給する培養液101を貯留する培養容器2を備えている。

[0026] なお、図1においては、細胞培養装置1の培養容器2の内部構造の視認性を向上させるため、培養容器2の外形を二点鎖線で示し、その内部構造を透視させている。後述する図5、図8、図12、及び図15においても同様である。培養容器2は、細胞の観察等のために、透光性の高い透明材料等で形成されることが好ましいが、透光性の低い若しくは透光性の無い材料で形成されてもよい。その場合、細胞を視認できる位置にガラス窓等を設けてもよい。

[0027] 培養容器2は、ハイドロゲルチャンバー10と、第1培養液貯留部20と、第2培養液貯留部30と、を備えている。ハイドロゲルチャンバー10は、第1培養液貯留部20と第2培養液貯留部30との間に配置されている。図1に示す例では、ハイドロゲルチャンバー10が、第1培養液貯留部20及び第2培養液貯留部30と水平方向に隣接して配置されている。

- [0028] なお、以下の説明において、XYZ直交座標系を設定し、このXYZ直交座標系を参照しつつ各構成の位置関係について説明することがある。X軸方向は、第1培養液貯留部20、ハイドロゲルチャンバー10、及び第2培養液貯留部30が並ぶ第1の水平方向である。Y軸方向は、X軸方向と直交する第2の水平方向である。Z軸方向は、X軸方向及びY軸方向と直交する鉛直方向である。
- [0029] ハイドロゲルチャンバー10は、図2に示すように、扁平状の内部空間11を有している。ハイドロゲルチャンバー10の内部空間11の高さ（Z軸方向の寸法）は、例えば100[μm]～500[μm]の範囲内である。ハイドロゲルチャンバー10の内部空間11には、ハイドロゲル100が充填されている。ハイドロゲル100は、高分子の三次元網目構造を有して水分を保持すると共に、細胞を包埋もしくは接着し、細胞を培養する。
- [0030] ハイドロゲルチャンバー10は、図3に示すように、平面視で六角形に形成されている。なお、ハイドロゲルチャンバー10の平面視形状は特に限定されないが、第1培養液貯留部20及び第2培養液貯留部30と隣接する長さ（Y軸方向の寸法）は、幅（X軸方向の寸法）よりも大きいとよい。ハイドロゲルチャンバー10のY軸方向の寸法は、例えば1[mm]～20[mm]の範囲内である。ハイドロゲルチャンバー10のX軸方向の寸法は、例えば1[mm]～10[mm]の範囲内である。
- [0031] ハイドロゲルチャンバー10は、第1培養液貯留部20に連通する第1面12と、第2培養液貯留部30に連通する第2面13と、を有している。第1面12及び第2面13は、X軸方向で対向し、Y軸方向に互いに平行に延びている。ハイドロゲルチャンバー10のY軸方向の両端部は、導入路14a, 15aを介して導入孔14, 15と連通している。ハイドロゲルチャンバー10の直上部には、ハイドロゲル100を導入するハイドロゲル貯留槽16が形成されている。
- [0032] 導入孔14は、ハイドロゲルチャンバー10のY軸方向の一端側（-Y側）において、ハイドロゲルチャンバー10の天面と、ハイドロゲル貯留槽1

6の底面とを連通させている。導入孔15は、ハイドロゲルチャンバー10のY軸方向の他端側(+Y側)において、ハイドロゲルチャンバー10の天面と、ハイドロゲル貯留槽16の底面とを連通させている。2つの導入孔14, 15により、ハイドロゲルチャンバー10から空気を抜き、ハイドロゲル貯留槽16からハイドロゲルチャンバー10にハイドロゲル100を充填し易くなる。

[0033] 第1培養液貯留部20は、培養液101を貯留する第1培養液貯留槽21を備えている。第1培養液貯留槽21は、平面視でY軸方向に延びる長孔状ないし楕円状に形成されている。なお、第1培養液貯留槽21の平面視形状は特に限定されない。第1培養液貯留槽21は、ハイドロゲルチャンバー10よりも内部空間(容積)が大きいとよい。第1培養液貯留槽21の底部のハイドロゲルチャンバー10側(+X側)の側面は、ハイドロゲルチャンバー10の第1面12に連通している。

[0034] 第2培養液貯留部30は、培養液101を貯留する第2培養液貯留槽31を備えている。第2培養液貯留槽31は、平面視でY軸方向に延びる長孔状ないし楕円状に形成されている。なお、第2培養液貯留槽31の平面形状は特に限定されない。第2培養液貯留槽31も、ハイドロゲルチャンバー10よりも内部空間(容積)が大きいとよい。第2培養液貯留槽31の底部のハイドロゲルチャンバー10側(-X側)の側面は、ハイドロゲルチャンバー10の第2面13に連通している。

[0035] 上記構成の培養容器2は、図3に示すように、空圧装置5と接続されている。空圧装置5は、第1培養液貯留槽21に接続された空圧ポンプ50と、第2培養液貯留槽31に接続された空圧ポンプ60と、を備えている。空圧ポンプ50, 60は、例えば図示しないモータの駆動中、継続的に培養容器2内を加圧できる。空圧装置5は、第1培養液貯留槽21と第2培養液貯留槽31との間に空圧に基づく圧力差を生じさせて、第1培養液貯留槽21及び第2培養液貯留槽31の少なくとも一方に貯留された培養液101を、ハイドロゲルチャンバー10のハイドロゲル100に加圧浸透させる。

- [0036] なお、ハイドロゲルチャンバー10に対して培養液101を供給する方向が、第1培養液貯留槽21及び第2培養液貯留槽31のいずれか一方から他方へと一方向に限定される場合、空圧ポンプ50、60のいずれか一方は無くても構わない。また、一台の空圧ポンプから空圧配管を分岐させ第1培養液貯留槽21及び第2培養液貯留槽31のそれぞれに接続すると共に、空圧配管の枝管に切替バルブを設けて、空圧をかける培養液貯留槽を切り替えてもよい。空圧装置5は、例えば図示しない調圧器を備えており0.1[kPa]～10[kPa]の範囲内で圧力を調整し、第1培養液貯留槽21及び第2培養液貯留槽31の少なくともいずれか一方を加圧する。
- [0037] 培養容器2は、上記空圧に基づく圧力差を生じさせた状態でも、ハイドロゲルチャンバー10にハイドロゲル100を保持させる機構として、支柱列22、32を備えている。さらにハイドロゲルチャンバー10に、ハイドロゲル100を保持させる表面処理（表面の濡れ性を調整するコーティング処理等）を施してもよい。
- [0038] 支柱列22は、第1培養液貯留槽21と連通するハイドロゲルチャンバー10の第1面12に沿って設けられている。支柱列22の高さは、ハイドロゲルチャンバー10の内部空間11の高さと同じである。また、支柱列22の各支柱間距離は、例えば50[ $\mu\text{m}$ ]～300[ $\mu\text{m}$ ]の範囲内である。以下、支柱列22の詳細な構造について、図4を参照して説明する。
- [0039] 支柱列22は、図4に示すように、ハイドロゲルチャンバー10と第1培養液貯留槽21との界面領域を形成する複数の支柱40を備えている。支柱40は、Y軸方向に隙間をあけて等間隔に形成されている。Y軸方向で隣り合う支柱40の間には、ハイドロゲルチャンバー10と第1培養液貯留槽21と連通させる流体チャネルが形成されている。
- [0040] 支柱40は、平断面視で略五角形に形成されている。支柱40の側面は、ハイドロゲルチャンバー10側に配置された一对の斜面41と、第1培養液貯留槽21側に配置された平面42と、一对の斜面41と平面42との間を接続する一对の曲面43と、を備えている。

- [0041] 一対の斜面41は、ハイドロゲルチャンバー10の内側に向かう端部同士が互いに接続されている。一対の斜面41の接続角度は、鋭角である。また、一対の斜面41のX-Z平面に対する角度は、それぞれ等しくなっている。平面42は、Y-Z平面に平行な面を形成している。一対の曲面43は、平面42の+Y側の端部と+Y側に配置された斜面41の端部とを滑らかに接続すると共に、平面42の-Y側の端部と-Y側に配置された斜面41の端部とを滑らかに接続している。
- [0042] 隣り合う支柱40の隙間（Y軸方向の寸法）は、平面42部分において幅w1となり、曲面43部分において最小の幅w2となり、一対の斜面41の端部接続部分において最大のw3となる。幅w1、幅w2、幅w3は、 $w2 < w1 < w3$ の関係を有している。つまり、隣り合う支柱40の隙間は、第1培養液貯留槽21からハイドロゲルチャンバー10に向かって減少後、増加に転じている。これにより、第1培養液貯留槽21からハイドロゲルチャンバー10に培養液101を供給し易く、且つ、くさび効果によりハイドロゲルチャンバー10からは第1培養液貯留槽21にハイドロゲル100が流出し難くできる。
- [0043] 支柱列32は、第2培養液貯留槽31と連通するハイドロゲルチャンバー10の第2面13に沿って設けられている。支柱列32は、ハイドロゲルチャンバー10と第2培養液貯留槽31との界面領域を形成する複数の支柱40を備えている。なお、支柱列32の支柱40の構成は、ハイドロゲルチャンバー10を挟んで反対側（第1培養液貯留槽21側）に配置された支柱列22の支柱40と対称の構成であるため、その説明は割愛する。なお、支柱40の形状は、上記形状が好ましいが、公知の三角形、台形等で形成されていてもよい。
- [0044] 上記構成の第1実施形態によれば、ハイドロゲルチャンバー10に隣接した第1培養液貯留部20及び第2培養液貯留部30に培養液101を貯留し、貯留された培養液101に対して空圧をかけることで、ハイドロゲル100に培養液101を浸透させて細胞を培養できる。このように、培養容器2

に空圧装置5を接続し、空圧によってハイドロゲル100に培養液101を浸透させながら細胞（例えば血管内皮細胞）を培養することで、ハイドロゲル100中での血管組織の形成を促進させることができる。

[0045] 培養液101に空圧をかけてハイドロゲル100内に培養液101を浸透させることで、より大きな血管組織の形成が可能となる。また、空圧を調整することで、血管組織の成熟に伴って適切な流量で血管組織へ培養液101を灌流することが可能となる。また、空圧を調整し、培養液101を灌流することで、従来の水柱圧で送液する場合のように送液が進むにしたがって送液流量が減少してしまう問題を回避することができる。

[0046] 以上のように、第1実施形態に係る細胞培養装置1は、細胞を培養するハイドロゲル100を保持するハイドロゲルチャンバー10と、ハイドロゲルチャンバー10の第1面12と連通する第1培養液貯留部20と、ハイドロゲルチャンバー10の第1面12と異なる第2面13と連通する第2培養液貯留部30と、を備える培養容器2と、培養容器2に接続された空圧装置5と、を備え、空圧装置5は、第1培養液貯留部20と第2培養液貯留部30との間に空圧に基づく圧力差を生じさせて、第1培養液貯留部20及び第2培養液貯留部30の少なくとも一方に貯留された培養液101を、ハイドロゲルチャンバー10のハイドロゲル100に加圧浸透させる。この構成によれば、生体外で効率的に大きな細胞組織を構築できる。

[0047] また、第1実施形態では、ハイドロゲルチャンバー10に、空圧に基づく圧力差を生じさせた状態でハイドロゲル100を保持させる機構として、支柱列22、32を備える。この構成によれば、第1培養液貯留部20及び第2培養液貯留部30からハイドロゲルチャンバー10に培養液101を供給し易く、且つ、空圧をかけた状態でも、ハイドロゲルチャンバー10からは第1培養液貯留部20または第2培養液貯留部30にハイドロゲル100が流出し難くなる。さらに、ハイドロゲルチャンバー10にハイドロゲル100を保持させる表面処理を施すとよい。

[0048] 第1実施形態に係る細胞培養方法は、上記細胞培養装置1を用いて、ハイ

ドロゲルチャンバー 10 内で細胞を培養する。この構成によれば、この構成によれば、生体外で効率的に大きな細胞組織を構築できる。

[0049] また、第 1 実施形態では、細胞を培養し、ハイドロゲルチャンバー 10 内で血管組織を形成させる。この構成によれば、この構成によれば、生体外で効率的に大きな血管組織を構築できる。

[0050] (第 2 実施形態)

次に、本発明の第 2 実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0051] 図 5 は、第 2 実施形態に係る細胞培養装置 1 を示す斜視図である。図 6 は、図 5 に示す矢視 V1-V1 断面図である。図 7 は、図 6 に示す矢視 V11-V11 断面図である。図 5 に示すように、第 2 実施形態では、培養容器 2 の上部に、空圧配管 51, 61 が接続された蓋部 3 が固定されている点で、上記実施形態と異なる。

[0052] 図 6 に示すように、蓋部 3 の下面には、第 1 培養液貯留槽 21 に連通する上方に向かって凹状の第 1 凹部 23 と、第 2 培養液貯留槽 31 に連通する上方に向かって凹状の第 2 凹部 33 と、が形成されている。なお、ハイドロゲル貯留槽 16 の上部は、蓋部 3 の下面によって閉塞されている。蓋部 3 には、第 1 凹部 23 に連通するように空圧配管 51 が接続されている。また、蓋部 3 には、第 2 凹部 33 に連通するように空圧配管 61 が接続されている。なお、蓋部 3 に対する空圧配管 51, 61 の接続方向は、Y 軸方向に限らず、X 軸方向であっても、Z 軸方向であってもよい。

[0053] 図 7 に示すように、空圧配管 51 は、空圧ポンプ 50 に接続されている。また、空圧配管 61 は、空圧ポンプ 60 に接続されている。これにより、空圧ポンプ 50 から空圧配管 51 を介して第 1 培養液貯留槽 21 を加圧できる。また、空圧ポンプ 60 から空圧配管 61 を介して第 2 培養液貯留槽 31 を加圧できる。空圧配管 51, 61 の一部には、フィルターを設けるとよい、これにより第 1 培養液貯留槽 21 ないし第 2 培養液貯留槽 31 にほこり等の

異物が混入することを抑制できる。フィルターは、例えば細孔径0.22 [ $\mu\text{m}$ ]以下の疎水性の材質のフィルターを用いることが好ましい。

[0054] 培養容器2の第1培養液貯留槽21の開口縁部及び第2培養液貯留槽31の開口縁部にOリングを配し、蓋部3との間に挟み込んでもよい。これにより、蓋部3の隙間からの圧力漏れを抑制できる。また、Oリングを上下方向に潰すように、蓋部3をボルト等で培養容器2に固定してもよい。これにより、培養容器2の容器本体と蓋部3との間のシール性を高めることができる。

[0055] このように、上記第2実施形態によれば、培養容器2が蓋部3を備えている。蓋部3には、空圧配管51, 61が接続されている。この構成によれば、蓋部3から空圧配管51, 61を取り外すことで、培養容器2と空圧装置5との接続を容易に解除できる。これにより、空圧配管51, 61を蓋部3から取り外した状態で、クリーンベンチなどの別の場所に搬送した後に、蓋部3を取り外し、容易に培養容器2にハイドロゲル100や培養液101を供給することができる。また、空圧配管51, 61には、フィルターが設けられている。この構成によれば、空圧をかける際に、第1培養液貯留槽21ないし第2培養液貯留槽31にはこり等の異物が混入することを抑制できる。

[0056] (第3実施形態)

次に、本発明の第3実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0057] 図8は、第3実施形態に係る細胞培養装置1を示す斜視図である。図9は、第3実施形態に係る細胞培養装置1の要部を示す平断面図である。なお、図9は、上述した図3、図7と同様に、ハイドロゲルチャンバー10に沿った平断面図を示している。

図8に示すように、第3実施形態では、第1培養液貯留部20が第1培養液貯留槽21とハイドロゲルチャンバー10とを連通させる第1マイクロ流

路24を備える点で、上記実施形態と異なる。また、第3実施形態では、第2培養液貯留部30が第2培養液貯留槽31とハイドロゲルチャンバー10とを連通させる第2マイクロ流路34を備える点で、上記実施形態と異なる。

[0058] 第1マイクロ流路24は、ハイドロゲルチャンバー10と同様に扁平状の内部空間を備え、X軸方向に帯状に延びている。なお、第1マイクロ流路24の内部空間の高さ（Z軸方向の寸法）は、例えばハイドロゲルチャンバー10と同じである。また、図9に示すように、第1マイクロ流路24の幅（Y軸方向の寸法）は、例えば第1面12の幅（Y軸方向の寸法）と同じである。

[0059] また、第2マイクロ流路34は、ハイドロゲルチャンバー10と同様に扁平状の内部空間を備え、X軸方向に帯状に延びている。なお、第2マイクロ流路34の内部空間の高さ（Z軸方向の寸法）は、例えばハイドロゲルチャンバー10と同じである。また、第2マイクロ流路34の幅（Y軸方向の寸法）は、例えば第2面13の幅（Y軸方向の寸法）と同じである。なお、第1マイクロ流路24及び第2マイクロ流路34の各寸法は、上記寸法に限定されるものではない。

[0060] 上記構成の第3実施形態によれば、第1培養液貯留部20において、第1マイクロ流路24によってハイドロゲルチャンバー10と第1培養液貯留槽21との間を接続することができる。この構成によれば、第1培養液貯留槽21とハイドロゲルチャンバー10との間にスペースを確保することができる。したがって、空圧装置5に接続するための培養容器2の設計スペースや、ハイドロゲルチャンバー10のハイドロゲル貯留槽16にハイドロゲル100を導入する開口部を広げるための培養容器2の設計スペース等を確保することができ、設計の自由度が向上する。

[0061] また、第2培養液貯留部30においても、第2マイクロ流路34によってハイドロゲルチャンバー10と第2培養液貯留槽31との間を接続することで、培養容器2の設計スペースをより確保し易くなる。なお、第1培養液貯

留部 20 及び第 2 培養液貯留部 30 のいずれか一方が、マイクロ流路を備えることで、培養容器 2 の設計スペースを十分に確保できる場合、第 1 培養液貯留部 20 及び第 2 培養液貯留部 30 の他方は、マイクロ流路を備えない場合もある。

[0062] (第 4 実施形態)

次に、本発明の第 4 実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0063] 図 10 は、第 4 実施形態に係る細胞培養装置 1 の要部を示す平断面図である。図 11 は、図 10 に示す領域 B の拡大図である。なお、図 10 は、上述した図 3、図 7、図 9 と同様に、ハイドロゲルチャンバー 10 に沿った平断面図を示している。

図 10 に示すように、第 4 実施形態では、第 1 マイクロ流路 24 が抵抗流路 25 を備える点で、上記実施形態と異なる。なお、抵抗流路 25 は、第 2 マイクロ流路 34 に設けられていてもよい。

[0064] ハイドロゲル 100 内に形成した血管組織に、空圧駆動で培養液 101 を灌流しながら培養する場合、血管組織の成熟に伴って血管組織の断面積が大きくなり、培養液 101 の流量が大きくなるという特徴がある。一方、血管組織の断面積の変化を予測することは、困難であり、培養液 101 の流量を予測することも困難である。したがって、例えば第 1 培養液貯留槽 21 (第 2 培養液貯留槽 31) を加圧して、第 1 培養液貯留部 20 (第 2 培養液貯留部 30) に貯留された培養液 101 を、ハイドロゲルチャンバー 10 のハイドロゲル 100 に加圧浸透させる場合において、第 1 培養液貯留部 20 (第 2 培養液貯留部 30) に培養液 101 を補充すべきタイミングを予測することは難しく、培養液 101 の流量が大きくなってしまった場合に、培養液 101 を頻繁に補充することは煩雑である。このため、第 4 実施形態では、第 1 マイクロ流路 24 の一部に流路の断面積が小さい抵抗流路 25 を設けている。抵抗流路 25 を設けることで、血管組織の成熟に伴って血管が太くな

ってしまった場合においても培養液101の流量の増大を制御することができる。

[0065] 図11に示すように、第1マイクロ流路24には、第1マイクロ流路24よりも断面積が小さい抵抗流路25が並列に複数設けられている。抵抗流路25への気泡やほこりによる目詰まり等を回避するためには、図11に示すように抵抗流路25を並列に複数設けるとよく、好ましくは10本以上の抵抗流路25が並列に設けられているとよい。なお、気泡やほこりによる目詰まり等の懸念がなければ、抵抗流路25は、1つ（1本）であっても構わない。

[0066] 抵抗流路25の流路抵抗は、ハイドロゲル100中に形成される血管の流路抵抗より大きくすることで、血管の成熟に伴って血管径が変化しても培養液101の流量をより正確に制御することが可能となる。ここで、抵抗流路25の流路抵抗（ $R_{MC}$ ）は、培養液101の粘度（ $\mu$ ）、流路の長さ（ $L_{MC}$ ）、流路の断面径（ $d_{MC}$ ）、並列に配置された流路の本数（ $N_{MC}$ ）の関係で、下式（1）のように定義される。

$$R_{MC} = 8 \mu L_{MC} / \pi d_{MC}^4 N_{MC} \quad \dots (1)$$

[0067] ここで、 $d_{MC}$ は、流路断面が円の場合は直径を示すが、流路断面が非円形の場合は相当直径で代用することができる。相当直径（ $d_{eq}$ ）は流路断面積（ $S$ ）、流路断面周囲長（ $L_p$ ）の関係で、下式（2）のように定義される。

$$d_{eq} = 4 S / L_p \quad \dots (2)$$

[0068] ハイドロゲル100中に形成される形成される血管の流路抵抗（ $R_v$ ）は、培養液101の粘度（ $\mu$ ）、血管の長さ（ $L_v$ ）、血管の断面径（ $d_v$ ）、並列に形成される血管の本数（ $N_v$ ）から、下式（3）によって見積もることができる。

$$R_v = 8 \mu L_v / \pi d_v^4 N_v \quad \dots (3)$$

[0069] ハイドロゲル100中に形成される血管の血管径や本数はハイドロゲルチャンバー10の形状によって異なり、成熟に伴って変化するが、血管の長さ（ $L_v$ ）はハイドロゲルチャンバー10の血管伸長方向の長さ（X軸方向の寸

法)、血管の断面径 ( $d_v$ ) はハイドロゲルチャンバー 10 の高さ (Z 軸方向の寸法)、並列に形成される血管の本数 ( $N_v$ ) はハイドロゲルチャンバー 10 の幅 (第 1 面 12 または第 2 面 13 の Y 軸方向の寸法) を血管の断面径 ( $d_v$ ) で割った値を代表値として用いて、ハイドロゲル 100 中に形成される血管の流路抵抗を推算することができる。これにより、後述のように培養液 101 の流量を推算することもできる。例えば、直径 300 [ $\mu\text{m}$ ]、長さ 2000 [ $\mu\text{m}$ ] の血管が 50 本並列に並ぶと、血管の流路抵抗 ( $R_v$ ) は、約  $2 \times 10^{-10}$  [ $\text{Pa} \cdot \text{s} / \mu\text{m}^3$ ] となる。

[0070] この場合、抵抗流路 25 の流路抵抗が  $2 \times 10^{-10}$  [ $\text{Pa} \cdot \text{s} / \mu\text{m}^3$ ] 以上とすることで、培養容器 2 として実用に耐える流路抵抗として機能させることができる。例えば、幅 200 [ $\mu\text{m}$ ]、深さ 200 [ $\mu\text{m}$ ]、長さ 200 [ $\mu\text{m}$ ] の抵抗流路 25 を 18 本並列に並べると、抵抗流路 25 の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は  $2 \times 10^{-10}$  [ $\text{Pa} \cdot \text{s} / \mu\text{m}^3$ ] となる。

[0071] 抵抗流路 25 の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) をこれより大きくするためには、式 (1) より、流路の幅や深さをこれより小さい値としてもよいし、流路の長さをこれより大きな値としてもよいし、図 11 に示すように抵抗流路 25 の隙間  $w_4$  を調整するなどして、抵抗流路 25 の本数をこれより減らしてもよい。

[0072] つまり、抵抗流路の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は、培養液の粘度 ( $\mu$ )、ハイドロゲルチャンバー 10 の第 1 面 12 から第 2 面 13 までの長さ ( $L$ )、ハイドロゲルチャンバー 10 の高さ ( $d$ )、第 1 面 12 または第 2 面 13 の幅をハイドロゲルチャンバー 10 の高さで割った値を ( $N$ ) としたとき、下式 (5) の関係を満足するとよい。なお、 $N$  は自然数であるとよい。

$$R_{MC} \geq 8 \mu L / \pi d^4 N \quad \dots (5)$$

[0073] 培養液 101 の流量 ( $Q$ ) は、第 1 培養液貯留部 20 (第 2 培養液貯留部 30) に印加された圧力 ( $P$ )、抵抗流路 25 の流路抵抗 ( $R_{MC}$ )、ハイドロゲル 100 中に形成されうる血管の流路抵抗 ( $R_v$ ) から、下式 (6) によって推算できる。

$$Q = P / (R_{MC} + R_v) \quad \dots (6)$$

[0074] 上述のように、ハイドロゲル100内に形成した血管組織に空圧駆動で培養液101を灌流しながら培養する場合は、血管組織の成熟に伴って血管組織の断面積が大きくなるに従って培養液101の流量が大きくなってしまいが、血管組織の断面積が非常に大きくなった場合の培養液101の最大流量は、下式(7)によって推算できる。

$$Q = P / R_{MC} \quad \dots (7)$$

[0075] このように培養液101の最大流量を推算することができれば、培養液101の補充頻度の最短期間を見積もることができ、長期にわたって灌流培養を行う作業を効率化することができる。

[0076] 上述した第4実施形態によれば、第1マイクロ流路24には、第1マイクロ流路24よりも断面積が小さい抵抗流路25が設けられている。抵抗流路25の流路抵抗( $R_{MC}$ )は、培養液の粘度( $\mu$ )、ハイドロゲルチャンバー10の第1面12から第2面13までの長さ(L)、ハイドロゲルチャンバー10の高さ(d)、第1面12または第2面13の幅をハイドロゲルチャンバー10の高さで割った値を(N)としたとき、上式(5)の関係を満足する。この構成によれば、血管組織の成熟に伴って血管が太くなってしまった場合においても培養液101の流量の増大を制御して、培養液101の最大流量を推算することができ、長期にわたって灌流培養を行う作業を効率化することができる。

[0077] (第5実施形態)

次に、本発明の第5実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0078] 図12は、第5実施形態に係る細胞培養装置1を示す斜視図である。図13は、図12に示す矢視X111-X111断面図である。図14は、図13に示す矢視X1V-X1V断面図である。

図12に示すように、第5実施形態では、ハイドロゲルチャンバー10の直上部に第3培養液貯留部80が設けられている点で、上記実施形態と異なる

る。

- [0079] 第3培養液貯留部80は、培養液101を貯留する第3培養液貯留槽81を備えている。なお、図に示す例の第3培養液貯留槽81は、ハイドロゲル100をハイドロゲルチャンバー10に導入するためのハイドロゲル貯留槽16を兼ねている。第3培養液貯留槽81は、平面視でY軸方向に延びる長孔状ないし楕円状に形成されている。なお、第3培養液貯留槽81の平面視形状は特に限定されない。第3培養液貯留槽81は、ハイドロゲルチャンバー10よりも内部空間（容積）が大きいとよい。
- [0080] 図13に示すように、第3培養液貯留槽81の底面の中央には、ハイドロゲルチャンバー10の天面に連通する1つの大きな開口部82が形成されている。開口部82には、透過性の膜82aを設けてもよい。透過性の膜82aは、一方の面がハイドロゲル100に面し、他方の面が培養液101に面している。透過性の膜82aは、例えばハイドロゲル100が透過できず、培養液101が透過できるものであるとよい。また、透過性の膜82aは、開口部82に対して着脱可能な構造で取り付けるとよい。
- [0081] 図14に示すように、空圧装置5は、第3培養液貯留槽81に接続された空圧ポンプ90を備えている。図12に戻り、第3培養液貯留槽81の上部は、蓋部3によって閉塞されている。蓋部3の下面には、第3培養液貯留槽81に連通する上方に向かって凹状の第3凹部83が形成されている。蓋部3には、第3凹部83に連通するように空圧配管91が接続されている。空圧配管91は、空圧ポンプ90に接続されている。これにより、空圧ポンプ90から空圧配管91を介して第3培養液貯留槽81を加圧できる。
- [0082] 上述した第5実施形態では、ハイドロゲルチャンバー10の直上部に、開口部82が形成されている。再生医療や創薬開発におけるオルガノイド培養では、細胞集塊であるオルガノイドに微小血管を吻合させ、微小血管を介して培養液101を灌流することが求められている。図13及び図14に示すように、ハイドロゲルチャンバー10の直上部に1つの大きな開口部82を設けることにより、ハイドロゲル100の導入が簡便になる。さらに、開口

部 8 2 を利用してハイドロゲル 1 0 0 の上に細胞集塊を配置することができ、細胞集塊へ微小血管網を介した培養液 1 0 1 の灌流が可能となる。

[0083] また、第 5 実施形態では、開口部 8 2 には、一方の面がハイドロゲル 1 0 0 に面し、他方の面が培養液 1 0 1 に面する透過性の膜 8 2 a が設けることができる。医薬品候補化合物の薬物動態試験では、血液脳関門等の微小血管からの医薬品候補化合物の透過速度を評価することがある。透過速度を評価するためには、微小血管の外側、つまりハイドロゲル 1 0 0 内に漏出してきた化合物を回収して質量分析等の分析機器で評価する必要がある。これを可能とするため、図 1 3 に示すように、ハイドロゲルチャンバー 1 0 の直上部に設けた開口部 8 2 に透過性の膜 8 2 a を設け、透過性の膜 8 2 a の一方の面がハイドロゲル 1 0 0 に面し、もう一方の面が培養液 1 0 1 を保持する第 3 培養液貯留槽 8 1 に面する形とすることで、ハイドロゲル 1 0 0 内に露出した化合物を透過性の膜 8 2 a を介して回収して分析することが可能となる。

[0084] また、第 5 実施形態のように、ハイドロゲルチャンバー 1 0 の直上部に開口部 8 2 を設ける場合、第 1 培養液貯留部 2 0 及び第 2 培養液貯留部 3 0 の少なくとも一方を加圧して培養液 1 0 1 をハイドロゲル 1 0 0 に加圧浸透する際に、培養液 1 0 1 がハイドロゲルチャンバー 1 0 の開口部 8 2 から漏出してしまうことがある。これを防ぐために、空圧装置 5 を第 3 培養液貯留部 8 0 に接続している。第 1 培養液貯留部 2 0 及び第 2 培養液貯留部 3 0 の少なくとも一方を加圧する際に、第 3 培養液貯留部 8 0 に対しても同程度の圧力をかけることで、ハイドロゲルチャンバー 1 0 の直上部の開口部 8 2 からの培養液 1 0 1 の漏出を防ぐことができる。

[0085] (第 6 実施形態)

次に、本発明の第 6 実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0086] 図 1 5 は、第 6 実施形態に係る細胞培養装置 1 を示す斜視図である。図 1

6は、図15に示す矢視XV I - XV I 断面図である。図17は、図16に示す矢視XV I I - XV I I 断面図である。

図15に示すように、第6実施形態では、第3培養液貯留槽81とは別に、ハイドロゲル貯留槽16A、16Bが設けられている点で、上記実施形態と異なる。

[0087] ハイドロゲル貯留槽16A、16Bは、第3培養液貯留槽81をY軸方向で挟んで一対で設けられている。ハイドロゲル貯留槽16A、16Bは、平面視で円形に形成されている。なお、ハイドロゲル貯留槽16A、16Bの平面視形状は特に限定されない。ハイドロゲル貯留槽16A、16Bは、例えば設置スペース等の観点から、第3培養液貯留槽81よりも内部空間（容積）が小さいとよい。

[0088] 図16に示すように、ハイドロゲル貯留槽16Aの底面は、導入孔14を介してハイドロゲルチャンバー10に連通している。また、ハイドロゲル貯留槽16Bの底面は、導入孔15を介してハイドロゲルチャンバー10に連通している。図17に示すように、ハイドロゲル貯留槽16A、16Bは、開口部82よりも十分に小さい導入孔14、15を介してハイドロゲルチャンバー10に連通しており、ハイドロゲルチャンバー10からの培養液101の漏出の問題は少ないため、第3培養液貯留槽81のように空圧装置5に接続していないが、第3培養液貯留槽81と同じように空圧装置5に接続しても構わない。

[0089] 上述した第6実施形態によれば、ハイドロゲルチャンバー10にハイドロゲル100を導入する導入孔14、15が、ハイドロゲルチャンバー10の直上部の開口部82とは別の位置に配置されるため、例えば、上述したハイドロゲル100内に露出した化合物を透過性の膜82aを介して回収して分析する作業等が容易になる。

[0090] （第7実施形態）

次に、本発明の第7実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明

を簡略若しくは省略する。

[0091] 図18は、第7実施形態に係る細胞培養装置1を示す平面模式図である。

図18に示すように、第7実施形態では、第1マイクロ流路24及び第2マイクロ流路34がそれぞれ一対で設けられている点で、上記実施形態と異なる。

[0092] 第1マイクロ流路24は、一対のマイクロ流路24A, 24Bを備えている。つまり、第1培養液貯留槽21と hidroゲルチャンバー10の間は、2本のマイクロ流路24A, 24Bで接続されている。第1マイクロ流路24は、平面視でC字状ないしU字状に形成されている。第1マイクロ流路24は、C字状ないしU字状の両端部で第1培養液貯留槽21と連通し、両端部以外の場所（中間部分）で hidroゲルチャンバー10の第1面12に連通している。

[0093] 第2マイクロ流路34は、一対のマイクロ流路34A, 34Bを備えている。つまり、第2培養液貯留槽31と hidroゲルチャンバー10の間は、2本のマイクロ流路34A, 34Bで接続されている。第2マイクロ流路34は、平面視でC字状ないしU字状に形成されている。第2マイクロ流路34は、C字状ないしU字状の両端部で第2培養液貯留槽31と連通し、両端部以外の場所（中間部分）で hidroゲルチャンバー10の第2面13に連通している。

[0094] 上述した第7実施形態によれば、第1マイクロ流路24及び第2マイクロ流路34がそれぞれ一対で設けられている。例えば、第1マイクロ流路24において、第1培養液貯留槽21からマイクロ流路24A, 24Bのいずれか一方に培養液101を導入することで、第1マイクロ流路24内の気泡を容易に除去できる。また、第2マイクロ流路34においても同様に、第2培養液貯留槽31からマイクロ流路34A, 34Bのいずれか一方に培養液101を導入することで、第2マイクロ流路34内の気泡を容易に除去できる。

[0095] （第8実施形態）

次に、本発明の第8実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0096] 図19は、第8実施形態に係る細胞培養装置1を示す平面模式図である。

図19に示すように、第8実施形態では、第1培養液貯留槽21と第2培養液貯留槽31とを連通させる返送流路110が設けられている点で、上記実施形態と異なる。

[0097] なお、図19における白抜き矢印は、培養液101の流れを示している。つまり、図19に示す例では、培養液101が、第1培養液貯留槽21から第1マイクロ流路24を介してハイドロゲルチャンバー10に供給され、ハイドロゲルチャンバー10から第2マイクロ流路34を介して第2培養液貯留槽31に流出し、第2培養液貯留槽31から返送流路110を介して第1培養液貯留槽21に戻るようになっている。

[0098] 返送流路110には、第1培養液貯留槽21から第2培養液貯留槽31への培養液101の逆流を防止する機構として、受動バルブ111が設けられている、受動バルブ111は、例えば微小な流体チャネルを有し、流体チャネルの断面積、形状、長さや濡れ性等を調整することで、第1培養液貯留槽21からの気泡の侵入を防ぎつつ、培養液101を第2培養液貯留槽31から第1培養液貯留槽21に一方向に流すことができる。

[0099] 受動バルブ111の耐圧性は、0.1 [kPa] ~ 10 [kPa] の範囲内であるとよい。これにより、培養容器2が市販の調圧器で制御できる範囲で、なおかつ生理学的な範囲での培養操作が可能となる。なお、受動バルブ111の耐圧性 ( $\Delta P_{Lap}$ ) は界面張力 ( $\gamma$ ) と流路断面径 ( $d$ ) によって下式 (8) のように推算できる。

$$\Delta P_{Lap} = 4\gamma/d \quad \dots (8)$$

[0100] さらに、第2マイクロ流路34の第2培養液貯留槽31側の両端部には、培養液101の逆流を防止する機構として、逆止弁36が設けられている。これにより、第2培養液貯留槽31を加圧し、第1培養液貯留槽21に培養

液101を返送する際に、ハイドロゲルチャンバー10側に培養液101が逆流することを防止することができる。

[0101] 空圧装置5は、培養液101の供給、及び、培養液101の返送を所定時間毎に切り替える。なお、培養液101の供給時間は、培養液101の返送時間よりも長く設定するとよい。培養液101を供給する場合、空圧装置5は、第1培養液貯留槽21を加圧し、第2培養液貯留槽31との差圧により、ハイドロゲルチャンバー10に培養液101を供給する。

[0102] 培養液101を返送する場合、空圧装置5は、培養液の溜まった第2培養液貯留槽31を加圧し、第1培養液貯留槽21との差圧により、返送流路110を介して第1培養液貯留槽21に培養液101を返送する。なお、返送流路110の第1培養液貯留槽21側の端部は、返送流路110の第2培養液貯留槽31側の端部よりも高くするとよい。これにより、第1培養液貯留槽21から第2培養液貯留槽31への培養液101の逆流を抑制することができる。

[0103] 上述した第8実施形態によれば、第1培養液貯留槽21と第2培養液貯留槽31とを連通させる培養液101の返送流路110と、第2マイクロ流路34及び返送流路110に、培養液101の逆流を防止する機構を備える。この構成によれば、第1培養液貯留槽21における培養液101の枯渇を防ぐことができ、長期に亘って細胞を培養することができる。

[0104] また、第8実施形態では、逆流を防止する機構として、気泡の侵入を防ぐ受動バルブ111を備える。この構成によれば、空圧によって培養液101を返送及び循環する際に返送流路110への空気の導入を受動バルブ111の位置にて防ぐことができ、返送流路110に導入された空気によって第1培養液貯留槽21及び第2培養液貯留槽31にて気泡を生じることを防ぐことができ、培養操作が安定する。

[0105] また、第8実施形態では、受動バルブ111の耐圧性が、0.1[kPa]～10[kPa]の範囲内である。この構成によれば、市販の調圧器で制御できる範囲で、なおかつ生理学的な範囲での培養操作が可能となる。

[0106] (第9実施形態)

次に、本発明の第9実施形態について説明する。以下の説明において、上述の実施形態と同一又は同等の構成については同一の符号を付し、その説明を簡略若しくは省略する。

[0107] 図20は、第9実施形態に係る細胞培養装置1を示す平面模式図である。

図20に示すように、第9実施形態では、第2マイクロ流路34の一对のマイクロ流路34A、34Bのそれぞれに抵抗流路35が設けられている点で、上記実施形態と異なる。

[0108] 第2マイクロ流路34に設けられた抵抗流路35は、上述した図11に示す第1マイクロ流路24に設けられた抵抗流路25と同様の構成を有している。つまり、第2マイクロ流路34には、第2マイクロ流路34よりも断面積が小さい抵抗流路35が1つまたは複並列に複数設けられている。抵抗流路25の流路抵抗は、ハイドロゲル100中に形成される血管の流路抵抗より大きくすることで、血管の成熟に伴って血管径が変化しても培養液101の流量をより正確に制御することが可能となる。

[0109] つまり、抵抗流路35の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は、培養液の粘度 ( $\mu$ )、ハイドロゲルチャンバー10の第1面12から第2面13までの長さ ( $L$ )、ハイドロゲルチャンバー10の高さ ( $d$ )、第1面12または第2面13の幅をハイドロゲルチャンバー10の高さで割った値を ( $N$ ) としたとき、 $R_{MC} \geq 8 \mu L / \pi d^4 N$  の関係を満足するとよい。この構成によれば、血管組織の成熟に伴って血管が太くなってしまった場合においても培養液101の流量の増大を制御して、培養液101の最大流量を推算することができ、長期にわたって灌流培養を行う作業を効率化することができる。

なお、受動バルブ111を構成する流路抵抗を血管の流路抵抗より大きく設計することで抵抗流路35を兼ねることもできる。

[0110] 以下、実施例により本発明の効果をより明らかにする。なお、本発明は、以下の実施例に限定されるものではなく、その要旨を変更しない範囲で適宜変更して実施できる。

## [0111] [第1実施例]

以下に示す第1実施例では、図19及び図20に示す培養容器2の血管形成用の流路（ハイドロゲルチャンバー10等）を、フォトリソグラフィおよびPDMS（ポリジメチルシロキサン）モールドイングにより作製した。ハイドロゲルチャンバー10の大きさは、血管の長さ方向（X軸方向の寸法）が5.6 [mm]、幅（Y軸方向の寸法）が9.7 [mm]、深さ（Z軸方向の寸法）が0.3 [mm]となっている。

[0112] 図21は、第1実施例に係る血管直径とずり応力および流量の関係を示すグラフである。なお、図21においては、血管直径とずり応力および流量の関係を式(6)によって推算した結果を示している。図21において、「抵抗流路なし」とは、図19に示す、抵抗流路35がない培養容器2で血管組織を形成したときの計算結果を示している。また、図21において、「抵抗流路あり」とは、図20に示す、抵抗流路35がある培養容器2で血管組織を形成したときの計算結果を示している。

第1実施例では、1 [kPa]で培養容器2内を加圧し、抵抗流路25の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は  $2 \times 10^{-8}$  [Pa · s /  $\mu\text{m}^3$ ] とし、培養液101の粘度 ( $\mu$ ) は0.001 [Pa · s] とし、形成される血管の長さ ( $L_v$ ) は5600 [ $\mu\text{m}$ ] とし、並列に形成される血管の本数 ( $N_v$ ) は16とした場合の計算結果を示す。

「抵抗流路なし」の培養容器2では、血管直径が大きくなるにつれて、培養液101の流量が上昇していくことが分かる。一方で、「抵抗流路あり」の培養容器2では、血管直径が大きくなっても、培養液の流量が230 [ $\mu\text{L} / \text{min}$ ] 以上には上昇しないことが分かる。

[0113] また、第1実施例では、培養容器2内の流路をコートするため、予め614 [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] に水で調整したポリ-L-リシン臭化水素酸塩（分子量30000~70000：SIGMA-ALDRICH社製）を注入して37 [°C] で1時間静置し、のちにリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した。

[0114] また、ハイドロゲル100を調整するため、フィブリノーゲン、ヒト血漿

由来 (Wako社製) を D-PBS (-) (Wako社製) の培養液 101 で 6 [mg/ml] になるように 37 [°C] で溶解させ、0.22 filter Milliex-GV (Millipore社製) とテルモシリンジ (TERMO社製) を用いてフィルター滅菌を行った。

[0115] また、血管形成の過程を観察するため、培養したヒト血管内皮細胞 HUVEC を、Cell Tracker™ Red CMTPX Dye (Invitrogen社製) で蛍光染色した。その後、トリプシン処理にて剥離させ遠心分離し、resuspension buffer (最終濃度 4 [U/ml] Thrombin を含む細胞懸濁液) で再懸濁して細胞濃度をカウントした。細胞濃度が  $1.2 \times 10^6$  [cells/ml] となるように、resuspension buffer で再度希釈調整した。

[0116] 図 19 および図 20 に示す培養容器 2 は、予め 4 [°C] に冷やしておき、フィブリノーゲン溶液と HUVEC を含む細胞懸濁液を 1 : 1 で混合したプレゲル溶液を調整し、各培養容器 2 のマイクロゲルチャンバー 10 にプレゲル溶液を注入した。そして、37 [°C] , 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、15 分間保温してゲルを固まらせた後に培地用チャネルに専用培地 EGM™ Bullet Kit™ EGM™ Endothelial Cell Growth Medium Bullet Kit™ (Lonza社製) を第 1 マイクロ流路 24 および第 2 マイクロ流路 34 の開口部より導入し、37 [°C] , 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、60 分間保温した。ゲルと培地の境目に生じた泡をピペティングにより取り除いた後、第 2 培養液貯留槽 31 に位置する第 2 マイクロ流路 34 の開口部に逆止弁 36 を取り付けられた。

[0117] そして、第 1 培養液貯留槽 21 に 1 [mL] の培地を入れ、加圧循環培養を開始した。具体的には、第 1 培養液貯留槽 21 を 1 [kPa] で 240 [sec] 加圧して細胞に培地を順送し、第 2 培養液貯留槽 31 を 1 [kPa] で 60 [sec] 加圧して返送するサイクルを 7 日間繰り返した。

[0118] 細胞を導入した日を 0 日目とし、3~7 日目に蛍光顕微鏡観察と順送の流

量測定を行った。培地交換は、3日目と6日目に行った。4～7日目まで毎日、10 [ $\mu$ l] の70 kDa FITC デキストラン (SIGMA社製) を静水圧により5分間流したのち蛍光顕微鏡観察し、血管の形状および導通を解析した。

[0119] 図22は、第1実施例に係る「抵抗流路なし」の場合の血管組織の蛍光顕微鏡画像である。図23は、第1実施例に係る「抵抗流路あり」の場合の血管組織の蛍光顕微鏡画像である。図22及び図23では、上記結果の0日目、3日目、5日目、7日目に観察した蛍光顕微鏡画像を示している。3日目には、「抵抗流路なし」及び「抵抗流路あり」のいずれの培養容器2ともに、血管の伸長と拡大が進んでおり、細胞も培地の流れに沿って配向していた。5日目には、血管の拡大が更に進行しており、3日目よりも細胞の強い配向性が見られた。7日目には血管間のゲル部分が殆ど観察できないほどH U V E Cが増殖し、細胞の配向性も失われた。

[0120] 図24は、第1実施例に係る「抵抗流路なし」の場合の血管組織全体の蛍光顕微鏡画像である。図25は、第1実施例に係る「抵抗流路あり」の場合の血管組織全体の蛍光顕微鏡画像である。

図24及び図25では、血管導通後それぞれ3日間、70 kDa FITC dextranを流して血管全体の様子を観察した結果を示している。図24に示すように「抵抗流路なし」では、5日目、「抵抗流路あり」では4日目に血管が導通した。その後3日間、両流路ともに血管は拡大していき、拡大の進行の速さに違いは見られなかった。「抵抗流路あり」と「抵抗流路なし」のいずれの場合においても、血管の長さ方向に5.6 [mm] の大きさの血管組織をハイドロゲル100内に構築することが可能であることが示された。これにより、本発明の方法を用いることで、従来の報告よりも大きな血管組織を形成できることが示された。

[0121] 図26は、第1実施例に係る培養液101の順送の流量と培養期間との関係を示すグラフである。

図26に示すように、「抵抗流路なし」では4日目に血管がやや導通し、

流量は81.8 [ $\mu$ l/min]となった。その後、血管の拡大と共に流量は急激に増大していき、5日目には流量は330.2 [ $\mu$ l/min]となり、7日目には839.2 [ $\mu$ l/min]となった。「抵抗流路あり」では4日目に血管が導通し、流量は288.5 [ $\mu$ l/min]となった。なお「抵抗流路あり」では、血管が導通してから7日目まで流量は上昇することなく、230 [ $\mu$ l/min]程度に維持された。いずれの培養容器2においても、血管が形成されていない状態では培養液101をハイドロゲル100に加圧浸透させつつ、血管の成熟に伴い培養液101を血管組織に灌流することが可能であることが示された。

[0122] 従来では、2 [mm]以下の長さの血管組織の構築例が報告されているが、これより大きな血管組織の構築例は報告がない。第1実施例では本発明の適用によって長さ5.6 [mm]までの血管組織を構築できることが確認された。血管組織を血管の透過性試験に用いる場合、より大きな血管組織を用いることにより、より大きな表面積を有する血管組織を用いて化合物の透過性試験を実施することができる。また、より大きな表面積を有する血管組織を用いることで、血管壁を透過した化合物の回収量が多くなり、透過性試験の感度が向上するという利点がある。

[0123] このように、本発明によれば、空圧をかけ続けながら微小血管組織を形成させることで、微小血管組織の形成に応じて培養液101を灌流することが可能となった。本発明によれば、培養液101の灌流の流量を経時的に報告でき、微小血管組織を長期間にわたって安定に維持できる。このような微小血管組織の形成に応じた灌流や、長期間にわたって安定な血管組織の構築は、化合物の透過性試験の安定性を高めることができるとともに、血管組織と結合したオルガノイド培養に適用した際に、より成熟したオルガノイドの形成が可能となる。

[0124] [第2実施例]

図27は、第2実施例に係る細胞培養装置1を示す平面模式図である。

第2実施例では、図27に示す細胞培養装置1を使用した。この細胞培養

装置 1 は、第 2 培養液貯留部 30 の第 2 培養液貯留槽 31 が、第 2 培養液貯留槽 31 A、31 B に分かれている点、及び、第 1 マイクロ流路 24 に抵抗流路 25 が設けられている点で、図 20 に示す構成（第 1 実施例）と異なる。

[0125] 空圧ポンプ 60 は、第 2 培養液貯留槽 31 A に接続された空圧ポンプ 60 A と、第 2 培養液貯留槽 31 B に接続された空圧ポンプ 60 B と、を備えている。第 1 培養液貯留槽 21 には、空圧ポンプ 50 が接続されている。第 3 培養液貯留槽 81 には、空圧ポンプ 90 が接続されている。第 2 培養液貯留槽 31 A、31 B は、連絡流路 37 によって互いに連通している。連絡流路 37 は、第 2 培養液貯留槽 31 A、31 B の培養液 101 の液面を均衡化する。

[0126] 返送流路 110 は、第 2 培養液貯留槽 31 A と第 1 培養液貯留槽 21 との間に接続されているが、第 2 培養液貯留槽 31 B と第 1 培養液貯留槽 21 との間に接続されていてもよい。抵抗流路 25 は、第 1 マイクロ流路 24 のマイクロ流路 24 A、24 B のそれぞれに設けられている。

[0127] 第 2 実施例では、培養容器 2 の血管形成用の各流路（ハイドロゲルチャンバー 10 等）を、フォトリソグラフィーおよび PDMS（ポリジメチルシロキサン）モールドイングにより作製した。ハイドロゲルチャンバー 10 の大きさは、血管の長さ方向（X 軸方向の寸法）が 5.6 [mm]、幅（Y 軸方向の寸法）が 9.7 [mm]、深さ（Z 軸方向の寸法）が 0.3 [mm] となっている。

[0128] また、第 1 マイクロ流路 24 の抵抗流路 25 及び第 2 マイクロ流路 34 の抵抗流路 35 は、長さ 1.2 [mm]、幅 0.08 [mm]、高さ 0.06 [mm] となっている。培養液と空気の界面張力を [60 mN/m] としたとき、第 1 マイクロ流路 24 及び第 2 マイクロ流路 34 の耐圧性は、式（8）より 3.5 [kPa] と推算される。抵抗流路 25 は、受動バルブとしても機能する。

[0129] 図 27 に示す培養容器 2 は、図 19 及び図 20 に示す培養容器 2 と比較し

て、第1マイクロ流路24に抵抗流路25が設けられている。また、第2マイクロ流路34の開口部は、第2培養液貯留槽31A、31Bの底面より約1cm高くなっている。第1マイクロ流路24の開口部は、第1培養液貯留槽21の底面に設けられている。この構成により、培養液の流れを第1培養液貯留槽21から第2培養液貯留槽31A、31Bの方向（図中の矢印の方向）のみに制限し、逆流を防止できる。

[0130] つまり、空圧ポンプ50により第1培養液貯留槽21を加圧した際に、第1培養液貯留槽21内の培養液は、第1マイクロ流路24の開口部、第1マイクロ流路24、ハイドロゲルチャンバー10、第2マイクロ流路34を介して第2マイクロ流路34の開口部へと流れる。一方、空圧ポンプ60A、60Bを加圧した際には、第2マイクロ流路34の開口部が、第2培養液貯留槽31A、31B内の培養液の液面より高くなっていることにより、第2マイクロ流路34の開口部より空気が第2マイクロ流路34に流入し、抵抗流路35が受動バルブとして働き、空気の流入が停止され、培養液の流れも停止する。従って、空圧ポンプ50と空圧ポンプ60（60A、60B）を交互に加圧することにより、第1マイクロ流路24の開口部から第2マイクロ流路34の開口部に向かった、一方向流れを生じさせることができる。

[0131] また、返送流路110の受動バルブ111の寸法は、長さ0.24 [mm]、幅0.08 [mm]、高さ0.06 [mm]となっている。培養液と空気の界面張力を [60 mN/m] としたとき、受動バルブの耐圧性は、式(8)より3.5 [kPa] と推算される。返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部は、第1培養液貯留槽21の底面より約1cm高くなっており、返送流路110の第2培養液貯留槽31A側の開口部は、第2培養液貯留槽31Aの底面に設けられている。これにより、培養液101の流れを第2培養液貯留槽31A、31Bから第1培養液貯留槽21の方向（図中の矢印の方向）のみに制限し、逆流を防止できる。

[0132] つまり、空圧ポンプ60A、60Bにより第2培養液貯留槽31A、31Bを加圧した際に、第2培養液貯留槽31A内の培養液101は、返送流路

110の第2培養液貯留槽31A側の開口部、返送流路110を介して返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部へと流れる。一方、空圧ポンプ50を加圧した際には、返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部が第1培養液貯留槽21内の培養液の液面より高くなっていることにより、返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部より空気が返送流路110に流入し、受動バルブ111により空気の流入が停止され、培養液101の流れも停止する。従って、空圧ポンプ50と空圧ポンプ60を交互に加圧することにより、返送流路110の第2培養液貯留槽31A側の開口部から返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部に向かった、一方向流れを生じさせることができる。

[0133] 第2実施例では、培養容器2内の流路をコートするため、予め500 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] に水で調整したポリ-L-リシン臭化水素酸塩（分子量30000~70000：SIGMA-ALDRICH社製）を注入して37 [ $^{\circ}\text{C}$ ] で1時間静置し、後に滅菌した50%エタノール水溶液で3回以上洗浄した後、完全に乾燥させた。

[0134] そして、第2実施例では、図27に示す細胞培養装置1を用いて、加圧灌流によってハイドロゲル100内に培地成分がどのように浸透しているかを確認するため、以下の試験を行った。

ハイドロゲル100を調整するため、フィブリノーゲン、ウシ血漿由来（Wako社製）をD-PBS（-）（Wako社製）の培養液101で5 [ $\text{mg}/\text{ml}$ ] になるように37 [ $^{\circ}\text{C}$ ] で溶解させ、0.22 filter Millieux-GV（Millipore社製）とテルモシリンジ（TERMO社製）を用いてフィルター滅菌を行った。Thrombin（Wako社製）を4 [ $\text{U}/\text{mL}$ ] を含む培養液（EGM-2MV、Lonza社製）を調整した。

[0135] 培養容器2は、予め4 [ $^{\circ}\text{C}$ ] に冷やしておき、フィブリノーゲン溶液とThrombinを含む培養液を1：1で混合したプレゲル溶液を調整し、培養容器2のハイドロゲルチャンバー10にプレゲル溶液を注入した。そして

、37 [°C]、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、35分間保温してゲルを固まらせた後に、培養液EGM-2MVを第2マイクロ流路34及び第1マイクロ流路24の開口部より導入し、37 [°C]、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、60分間保温した。返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部より返送流路110に培養液を導入した。

[0136] 次に、第1培養液貯留槽21に1 [mL]の培地を入れ、空圧ポンプ50、60、90を培養容器2に接続後、以下の条件にて加圧灌流を開始した。加圧灌流は37°C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で行った。加圧は、0.5 kPaにて第1培養液貯留槽21及び第3培養液貯留槽81を1440秒間加圧して培地を順送し、第2培養液貯留槽31A、31Bを360秒間加圧して培養液101を返送するサイクルを繰り返した。

[0137] 一晩、加圧灌流を行った後に、20 [μM]のCalcein (DOJINDO LABORATORIES社製)及び20 [μM]のRhodamine-Dextran (分子量70,000Da:Thermo Fisher Scientific社製)を含む培養液101で第1マイクロ流路24を置換した後、さらに培養液101を第1培養液貯留槽21に500 [μL]添加した。そして、第1培養液貯留槽21を0.5 [kPa]、1.0 [kPa]、2.0 [kPa]、及び3.0 [kPa]で加圧を開始し、所定時間ごとに蛍光顕微鏡画像を撮像した。

[0138] 図28は、第2実施例に係る培養容器2を2.0 [kPa]で加圧した直後と50秒後のCalceinの蛍光顕微鏡画像である。

図28に示すように、加圧直後に対し、50秒間のCalceinの蛍光の界面は、2.0~2.5 [mm]程度、上方に移動している。

[0139] 図29は、第2実施例に係る培養容器2を0.5 [kPa]、1.0 [kPa]、2.0 [kPa]、及び3.0 [kPa]で加圧した際のRhodamine-Dextranの蛍光の界面の移動を時間ごとに測定した結果を示すグラフである。図30は、第2実施例に係る培養容器2を0.5 [kPa]、1.0 [kPa]、2.0 [kPa]、及び3.0 [kPa]で加

圧した際のCalceinの蛍光の界面の移動を時間ごとに測定した結果を示すグラフである。

図29及び図30に示すように、CalceinとRhodamine-Dextranの蛍光の界面の移動速度は類似しており、圧力に比例して蛍光の界面の移動速度が速くなっている結果が観測された。

[0140] なお、一般的にCalceinとRhodamine-Dextranの分子量は、623 [Da] 及び70,000 [Da] と大きく異なるため、拡散の速度は大きく異なることが知られている。このため、図29及び図30に示す結果により、拡散ではなく、加圧による浸透によりCalceinやRhodamine-Dextranがハイドロゲル100内に浸透していることが強く示唆され、本発明の加圧による浸透という方法が、培養液101に含まれる栄養成分をハイドロゲル100内に浸透させるのに有効であることが確認された。

[0141] 次に、図27に示す細胞培養装置1を用い、加圧灌流による血管形成を確認するため、以下の試験を行った。この際に、間葉系幹細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を混合して培養する効果についても検証した。

ハイドロゲル100を調整するため、フィブリノーゲン、ウシ血漿由来(Wako社製)をD-PBS(-)(Wako社製)の培養液101で、5 [mg/ml] になるように37 [°C] で溶解させ、0.22 filter Millieux-GV (Millipore社製)とテルモシリンジ(TERMO社製)を用いてフィルター滅菌を行った。

[0142] また、血管形成の過程を観察するため、培養したHUVECを、Cell Tracker™ Red CMTPX Dye (Invitrogen社製)で蛍光染色した。その後、0.05%または0.25%のTrypsin-EDTAにて剥離したHUVEC及び間葉系幹細胞(UE7T-13、JCRB細胞バンク)はそれぞれ $12 \times 10^6$  [cells/mL]、 $4 \times 10^6$  [cells/mL] になるように4 [U/mL] のThrombin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp

oration社製)を添加したEGM-2MVで懸濁した。

[0143] 図27に示す培養容器2は、予め4 [°C] に冷やしておき、フィブリノーゲン溶液とHUVEC、MSCを含む細胞研懸濁液を1:1で混合したプレゲル溶液を調整し、各培養容器2の hidroゲルチャンバー10にプレゲル溶液を注入した。そして、37 [°C] , 5% CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、35分間保温してゲルを固まらせた後に、培養液EGM-2MVを第1マイクロ流路24及び第2マイクロ流路34の開口部より導入し、37 [°C] , 5% CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、60分間保温した。返送流路110の第1培養液貯留槽21側の開口部より返送流路110に培養液101を導入した。

[0144] 次に、第1培養液貯留槽21に1.2 [mL] の培地を入れ、デバイスを加圧灌流装置に接続後、以下の条件にて加圧灌流を開始した。加圧灌流は、37°C, 5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で行った。加圧は、2.0 [kPa] にて第1培養液貯留槽21及び第3培養液貯留槽81を360秒間加圧して順送り、第2培養液貯留槽31A, 31Bを90秒間加圧して返送するサイクルを、12日間繰り返した。そして、細胞を導入した日を0日目とし、1~12日目に蛍光顕微鏡観察と順送りの流量測定を行った。培地交換は、流量測定の度に行った。

[0145] 図31は、第2実施例に係る間葉系幹細胞を含む場合と含まない場合の血管の形成挙動を示す蛍光顕微鏡画像である。図32は、第2実施例に係る間葉系幹細胞を含む場合と含まない場合の血管の流量変化を示すグラフである。

図31に示すように、間葉系幹細胞の有無にかかわらず、4日目に微小血管系の形成が確認された。この間、血管組織の形成に伴い、培養液101の流量の増大が確認された(図32参照)。

[0146] 図31に示すように、間葉系幹細胞を含まない系においては、6日目から8日目にかけて血管間のゲル部分が殆ど観察できないほどHUVECが増殖した。一方、間葉系幹細胞を含む系においては、8日目においても血管組織

の管腔構造が確認され、図32に示すように、6日目をピークに間葉系幹細胞の増殖に伴い、培養液の流量の低下が確認されたものの、血管を組織への培養液の一定の流量を保持できることが確認された。

以上により、血管組織を形成する際に間葉系幹細胞をH U V E Cと混合して培養することで、12日間にわたって血管組織を安定保持できることが確認された。

[0147] 図27に示す培養容器2では、培養液101の流れの方向を制御する逆流防止機構と返送流路110を有しており、ハイドロゲルチャンバー10に対し、第1培養液貯留槽21から第2培養液貯留槽31A、31Bに向けた方向に一方方向に培養液が流れる構成となっている。逆流防止機構の効果、つまり血管組織形成における一方方向流れの効果を検証するため、図33に示す培養容器を作製した。

[0148] 図33は、第2実施例の一変形例に係る細胞培養装置1を示す平面模式図である。

図33に示す培養容器2は、返送流路110を有していない。また、第2マイクロ流路34の開口部は、第2培養液貯留槽31A、31Bの底面に設けられている。この構成とすることにより、空圧ポンプ50と空圧ポンプ60A、60Bを交互に加圧することにより、培養液101は、第1培養液貯留槽21と第2培養液貯留槽31A、31Bの間を、第1マイクロ流路24、ハイドロゲルチャンバー10、第2マイクロ流路34を介して往復させることができる。

[0149] 血管組織の形成において、図27に示す培養容器2と、図33に示す培養容器2を用いて、一方方向流れと往復流れの環境下での血管組織の形成挙動を比較検討した。上記の実験（図27に示す培養容器2を用いて間葉系幹細胞を含む系で培養した条件）と同様に、ハイドロゲル100にH U V E Cと間葉系細胞を導入し、加圧灌流を開始した。加圧灌流の条件は、一方方向流れを生じさせる場合は、2.0 [kPa]にて第1培養液貯留槽21及び第3培養液貯留槽81を360秒間加圧して順送し、第2培養液貯留槽31A、3

1 Bを90秒間加圧して返送するサイクルを12日間繰り返した。また、往復流れを生じさせる場合は、2.0 [kPa]にて第1培養液貯留槽21及び第3培養液貯留槽81を360秒間加圧し、その後、第2培養液貯留槽31A, 31Bを360秒間加圧するサイクルを12日間繰り返した。

[0150] 図34は、第2実施例とその一変形例に係る一方向流れと往復流れの環境下での血管組織の形成挙動を示す蛍光顕微鏡画像である。

一方向流れ及び往復流れいずれの場合においても細胞導入後4日目頃より血管組織の形成が確認された。図34は、細胞導入後6日目の血管組織の画像を示す。一方向流れ及び往復流れいずれの場合においても血管組織の形成が確認できるが、一方向流れの条件の方が、往復流れの条件と比較して流れの方向に血管組織が配向している様子が観察された。

[0151] 図35は、第2実施例とその一変形例に係る一方向流れと往復流れの環境下での血管組織の流量変化を示すグラフである。

図35に示すように、一方向流れ及び往復流れいずれの場合も、細胞導入後、4日目から6日目にかけて血管組織の形成に伴う流量増大が認められ、12日目まで血管組織を通した培養液101の流れが確認された。

[0152] 次に、細胞培養装置1で形成された血管組織のバリア能や血管の機能に関わるタンパク質の発現に対する、間葉系幹細胞の有無、及び、一方向流れと往復流れの影響を評価した。このため、図27に示す培養容器と、図33に示す培養容器を用いて、(i) 間葉系幹細胞なし・一方向流れ、(ii) 間葉系幹細胞あり・一方向流れ、(iii) 間葉系幹細胞あり・往復流れの3つの条件下で、血管組織を形成した。

[0153] 図36は、第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置1で形成した血管組織のバリア能を評価するために、蛍光物質の血管壁の透過係数を求める際の画像解析図である。

血管組織のバリア能を評価するため、蛍光物質の血管壁の透過係数を画像解析によって求めた。間葉系幹細胞を含まない系は培養4日目に、間葉系幹細胞と共培養したものは培養6日目に、蛍光物質の透過係数を以下の方法で

求めた。

[0154] 20 [μM] の Calcein 及び [20 μM] の Rhodamine-Dextran (分子量 70,000 [Da]) を含む培養液を、第1培養液貯留槽 21 に 500 [μL] 添加した。蛍光顕微鏡は、IX71 (オリンパス社製) を用い、20秒ごとに3分間蛍光顕微鏡画像を撮像した。図36に示す画像は、サンプルごとに2視野ずつ撮像し、1視野毎に25か所の血管に囲まれた領域を解析領域としてランダムに選んだものである。血管組織からの Calcein 及び Rhodamine-Dextran の透過係数は、以下の式 (9) で算出した。

[0155] [数1]

$$P = \frac{J_s}{A_w C_L} = \frac{\Delta I_{ex, mean} A_i / \Delta t}{l_w (I_{i, mean} - I_{b, mean})} \dots (9)$$

[0156] ここで、P [cm/sec] は、透過係数である。J<sub>s</sub> [mol/sec] は、単位時間あたりに透過した物質の量である。A<sub>w</sub> [cm<sup>2</sup>] は、物質が透過する血管壁面の面積である。C<sub>L</sub> [mol/cm<sup>3</sup>] は、血管壁の内外の濃度差である。ΔI<sub>ex, mean</sub> [-] は、血管で囲まれた領域の平均蛍光輝度の時間変化である。A<sub>i</sub> [cm<sup>2</sup>] は、血管で囲まれた領域の面積である。Δt [sec] は、時間変化量である。l<sub>w</sub> [cm] は、血管で囲まれた領域の周囲長である。I<sub>i, mean</sub> [-] は、血管で囲まれた領域近傍の血管側の平均蛍光強度である。I<sub>b, mean</sub> [-] は、血管で囲まれた領域の平均蛍光強度である。画像データの解析には、ImageJ (1.53c, NIH社製) を用いた。

[0157] 図37は、第2実施例とその一変形例に係る (i) 間葉系幹細胞なし・一方向流れ、(ii) 間葉系幹細胞あり・一方向流れ、(iii) 間葉系幹細胞あり・往復流れの3つの条件で求めた Calcein の透過係数を示す。図38は、第2実施例とその一変形例に係る (i) 間葉系幹細胞なし・一方向流れ、(ii) 間葉系幹細胞あり・一方向流れ、(iii) 間葉系幹細胞あり・往復流れの3つの条件で求めた Rhodamine-Dextran

の透過係数を示す。

Calcein及びRhodamine-Dextranのいずれにおいても間葉系幹細胞を含む系の方が、透過係数が小さい。さらに、往復流れに比べて一方向流れの方が、より透過係数が低い傾向が観察された。この結果より、培養液101の流れの方向を制御する逆流防止機構及び返送流路110を有している図27の構成の培養容器2が、バリア能の高い血管組織を形成するのに有用であることが示唆された。

[0158] また、血管の機能に関わるタンパク質の発現を確認するため、以下の方法にて免疫染色を行った。HUVECのみの条件で形成した血管組織は4日目に、間葉系幹細胞と混合して形成した血管組織は6日目に、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。

[0159] そして、リン酸緩衝液で2回洗浄し、0.1%Triton-X水溶液で15分間透過処理を行った。リン酸緩衝液で2回洗浄後、Blocking One Hist（ナカライテスク社製）を用いて、室温で2時間ブロッキングを行った。Tween20を含むリン酸緩衝液（PBST）で3回洗浄後、1次抗体は、以下のものを使用し、4℃で一晩反応させた。その後、PBSTで3回洗浄し、Phalloidin-iFluorまたは4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を添加した2次抗体を室温で2時間反応させた。観察前にPBSTで3回洗浄した。

[0160] CD31を200倍希釈のウサギ・モノクローナル抗体（28364または32457：abcam社製）で標識した。また、NG2を200倍希釈のマウス・モノクローナル抗体（MAB2585：R&D Systems社製）で標識した。また、血管内皮カドヘリン（VE-カドヘリン）、ラミニン、Invitrogen33-9100を100倍希釈のウサギ・ポリクローナル抗体（それぞれCST2158S、abcam11575、Invitrogen33-9100）で標識した。

[0161] 蛍光標識二次抗体（InvitrogenA11011、A11034ま

たは a b c a m 1 5 0 1 1 3 ) は、200倍～400倍希釈で使用した。細胞核は、Cellstain-DAPI溶液(同仁化学研究所社製)で、1:1000希釈で染色した。F-アクチンフィラメントは、1:1000希釈でPhalloidin-iFluor 488(Cayman Chemical Company社製)で染色した。

[0162] 図39は、第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置1で形成した血管内皮細胞を、マーカーであるCD31で染色した画像と、間葉系幹細胞のマーカーであるNG2で染色した画像を示す図である。

図39に示すように、間葉系幹細胞と混合培養した系では、一方向流れ、往復流れのいずれの条件においても、血管内皮細胞によって形成された血管組織の周囲に間葉系幹細胞が存在することが確認された。

[0163] 図40は、第2実施例とその一変形例に係る細胞培養装置1で形成した血管内皮細胞を、血管壁のタイトジャンクションを構成するZO-1で染色した画像を示す図である。

図41に示すように、間葉系幹細胞あり・一方向流れの条件において、他の条件と比較してZO-1が血管壁全体にわたって発現している。これは、図36にて観測された血管のバリア能の高さ、つまり、低い透過係数がタイトジャンクション分子の発現によって実現していることを示唆している。

[0164] 以上のような第2実施例とその一変形例によれば、培養液101の流れの方向を制御する逆流防止機構と返送流路110を有している図27の構成の培養容器2が、バリア能の高い血管組織を形成するのに有用であることが示された。

[0165] 以上、本発明の好ましい実施形態及び実施例を記載し説明してきたが、これらは本発明の例示的なものであり、限定するものとして考慮されるべきではないことを理解すべきである。追加、省略、置換、およびその他の変更は、本発明の範囲から逸脱することなく行うことができる。従って、本発明は、前述の説明によって限定されていると見なされるべきではなく、特許請求の範囲によって制限されている。

## 符号の説明

- [0166] 1 …細胞培養装置
- 2 …培養容器
- 3 …蓋部
- 5 …空圧装置
- 1 0 …ハイドロゲルチャンバー
- 1 1 …内部空間
- 1 2 …第1面
- 1 3 …第2面
- 1 4 …導入孔
- 1 4 a …導入路
- 1 5 …導入孔
- 1 5 a …導入路
- 1 6 …ハイドロゲル貯留槽
- 1 6 A …ハイドロゲル貯留槽
- 1 6 B …ハイドロゲル貯留槽
- 2 0 …第1培養液貯留部
- 2 1 …第1培養液貯留槽
- 2 2 …支柱列
- 2 3 …第1凹部
- 2 4 …第1マイクロ流路
- 2 4 A …マイクロ流路
- 2 4 B …マイクロ流路
- 2 5 …抵抗流路
- 3 0 …第2培養液貯留部
- 3 1 …第2培養液貯留槽
- 3 2 …支柱列
- 3 3 …第2凹部

3 4 …第2マイクロ流路  
3 4 A …マイクロ流路  
3 4 B …マイクロ流路  
3 5 …抵抗流路  
3 6 …逆止弁  
4 0 …支柱  
4 1 …斜面  
4 2 …平面  
4 3 …曲面  
5 0 …空圧ポンプ  
5 1 …空圧配管  
6 0 …空圧ポンプ  
6 0 A …空圧ポンプ  
6 0 B …空圧ポンプ  
6 1 …空圧配管  
8 0 …第3培養液貯留部  
8 1 …第3培養液貯留槽  
8 2 …開口部  
8 2 a …膜  
8 3 …第3凹部  
9 0 …空圧ポンプ  
9 1 …空圧配管  
1 0 0 …ハイドロゲル  
1 0 1 …培養液  
1 1 0 …返送流路  
1 1 1 …受動バルブ

## 請求の範囲

- [請求項1] 細胞を培養するハイドロゲルを保持するハイドロゲルチャンバーと、  
、  
前記ハイドロゲルチャンバーの第1面と連通する第1培養液貯留部と、  
と、  
前記ハイドロゲルチャンバーの前記第1面と異なる第2面と連通する第2培養液貯留部と、を備える培養容器と、  
前記培養容器に接続された空圧装置と、を備え、  
前記空圧装置は、前記第1培養液貯留部と前記第2培養液貯留部との間に空圧に基づく圧力差を生じさせて、前記第1培養液貯留部及び前記第2培養液貯留部の少なくとも一方に貯留された培養液を、前記ハイドロゲルチャンバーのハイドロゲルに加圧浸透させる、  
細胞培養装置。
- [請求項2] 前記第1培養液貯留部及び前記第2培養液貯留部の少なくとも一方は、  
培養液を貯留する培養液貯留槽と、  
前記培養液貯留槽と前記ハイドロゲルチャンバーとを連通させるマイクロ流路と、を備える、  
請求項1に記載の細胞培養装置。
- [請求項3] 前記マイクロ流路には、前記マイクロ流路よりも断面積が小さい抵抗流路が、1つまたは並列に複数設けられている、  
請求項2に記載の細胞培養装置。
- [請求項4] 前記抵抗流路の流路抵抗 ( $R_{MC}$ ) は、培養液の粘度 ( $\mu$ )、前記ハイドロゲルチャンバーの前記第1面から前記第2面までの長さ ( $L$ )、前記ハイドロゲルチャンバーの高さ ( $d$ )、前記第1面または前記第2面の幅を前記ハイドロゲルチャンバーの高さで割った値を ( $N$ ) としたとき、

$$R_{MC} \geq 8 \mu L / \pi d^4 N$$

- の関係を満たす、  
請求項3に記載の細胞培養装置。
- [請求項5] 前記マイクロ流路が、一対で設けられている、  
請求項2～4のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
- [請求項6] 前記第1培養液貯留部は、前記培養液貯留槽として第1培養液貯留槽と、前記マイクロ流路として第1マイクロ流路と、を備え、  
前記第2培養液貯留部は、前記培養液貯留槽として第2培養液貯留槽と、前記マイクロ流路として第2マイクロ流路と、を備え、  
前記第1培養液貯留槽と前記第2培養液貯留槽とを連通させる培養液の返送流路と、  
前記第1マイクロ流路及び前記第2マイクロ流路の少なくとも一方と、前記返送流路に、培養液の逆流を防止する機構を備える、  
請求項2に記載の細胞培養装置。
- [請求項7] 前記逆流を防止する機構として、気泡の侵入を防ぐ受動バルブを備える、  
請求項6に記載の細胞培養装置。
- [請求項8] 前記受動バルブの耐圧性が、 $0.1 \text{ [kPa]} \sim 10 \text{ [kPa]}$ の範囲内である、  
請求項7に記載の細胞培養装置。
- [請求項9] 前記ハイドロゲルチャンバーの直上部には、開口部が形成されている、  
請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
- [請求項10] 前記ハイドロゲルチャンバーの直上部には、前記開口部を介して連通する第3培養液貯留部が設けられており、  
前記開口部には、一方の面がハイドロゲルに面し、他方の面が培養液に面する透過性の膜が設けられている、  
請求項9に記載の細胞培養装置。
- [請求項11] 前記空圧装置は、前記第3培養液貯留部と接続されている、

請求項 10 に記載の細胞培養装置。

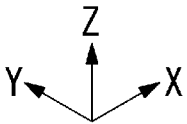
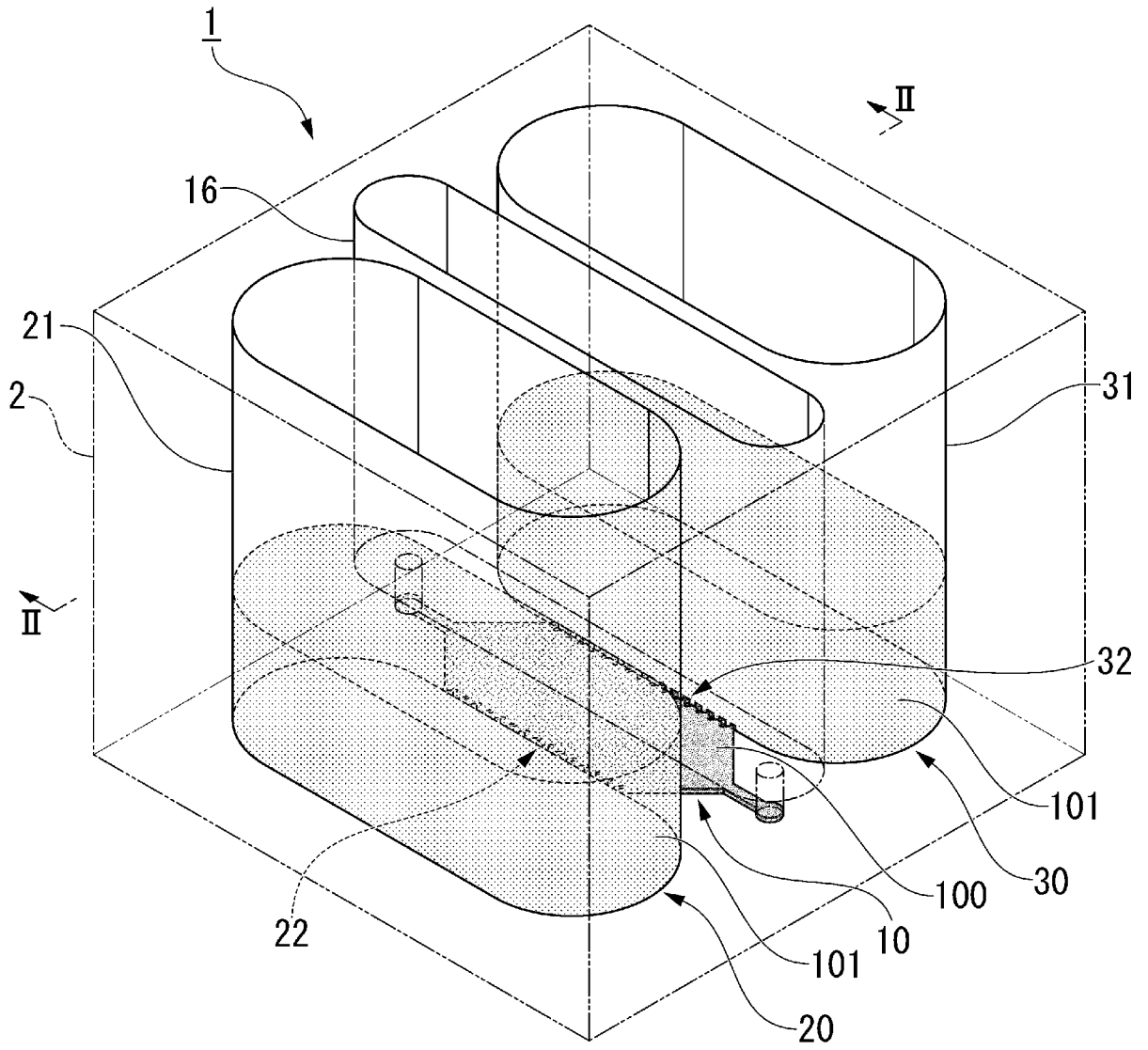
[請求項12] 前記空圧装置は、前記培養容器に接続される空圧配管を備え、  
前記空圧配管には、フィルターが設けられている、  
請求項 1～4 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

[請求項13] 前記ハイドロゲルチャンバーに、前記空圧に基づく圧力差を生じさせた状態でハイドロゲルを保持させる機構を備える、  
請求項 1～4 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

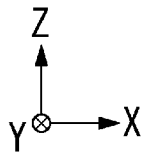
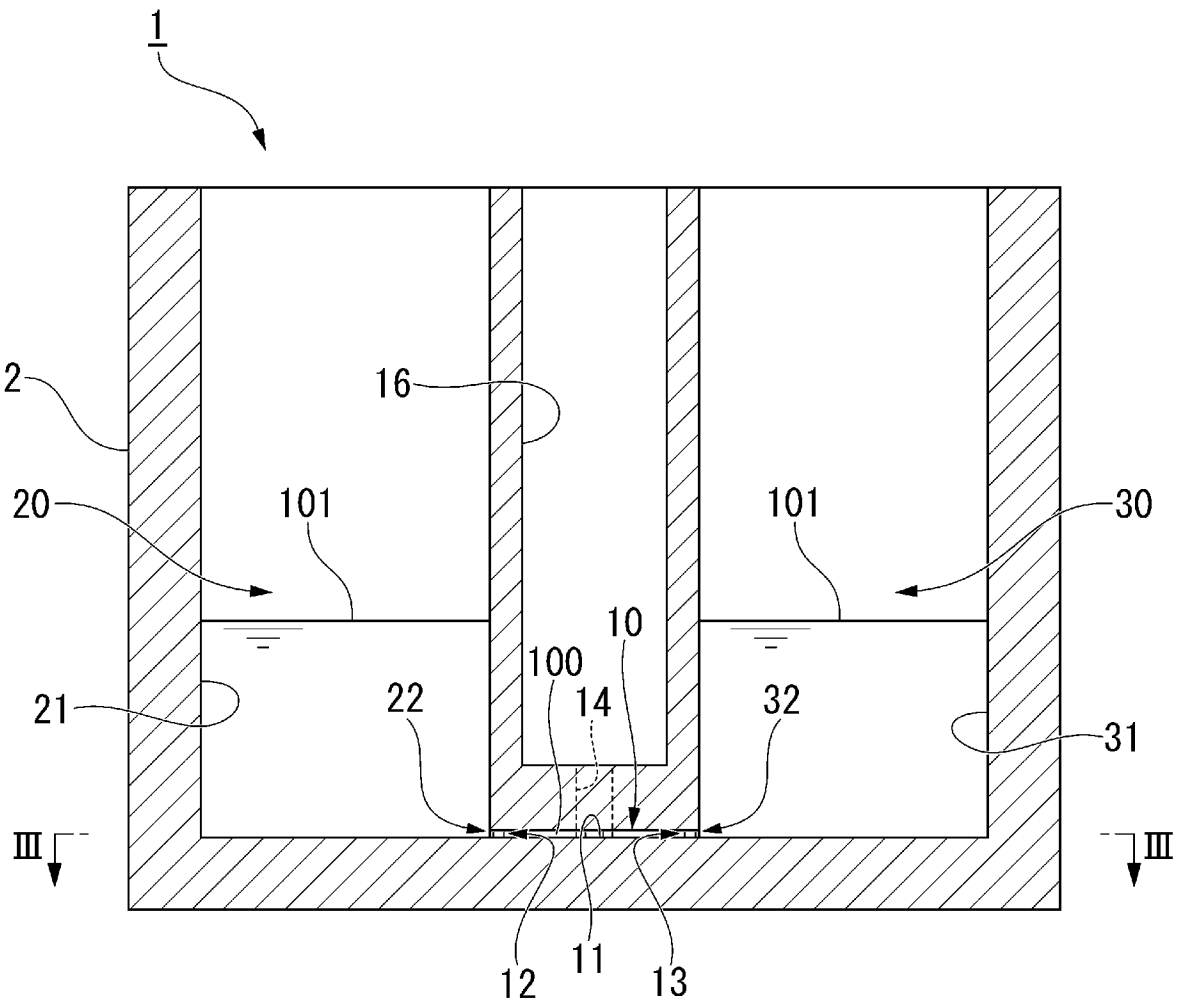
[請求項14] 請求項 1～4 のいずれか一項に記載の細胞培養装置を用いて、前記ハイドロゲルチャンバー内で細胞を培養する、  
細胞培養方法。

[請求項15] 前記細胞を培養し、前記ハイドロゲルチャンバー内で血管組織を形成する、  
請求項 14 に記載の細胞培養方法。

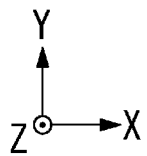
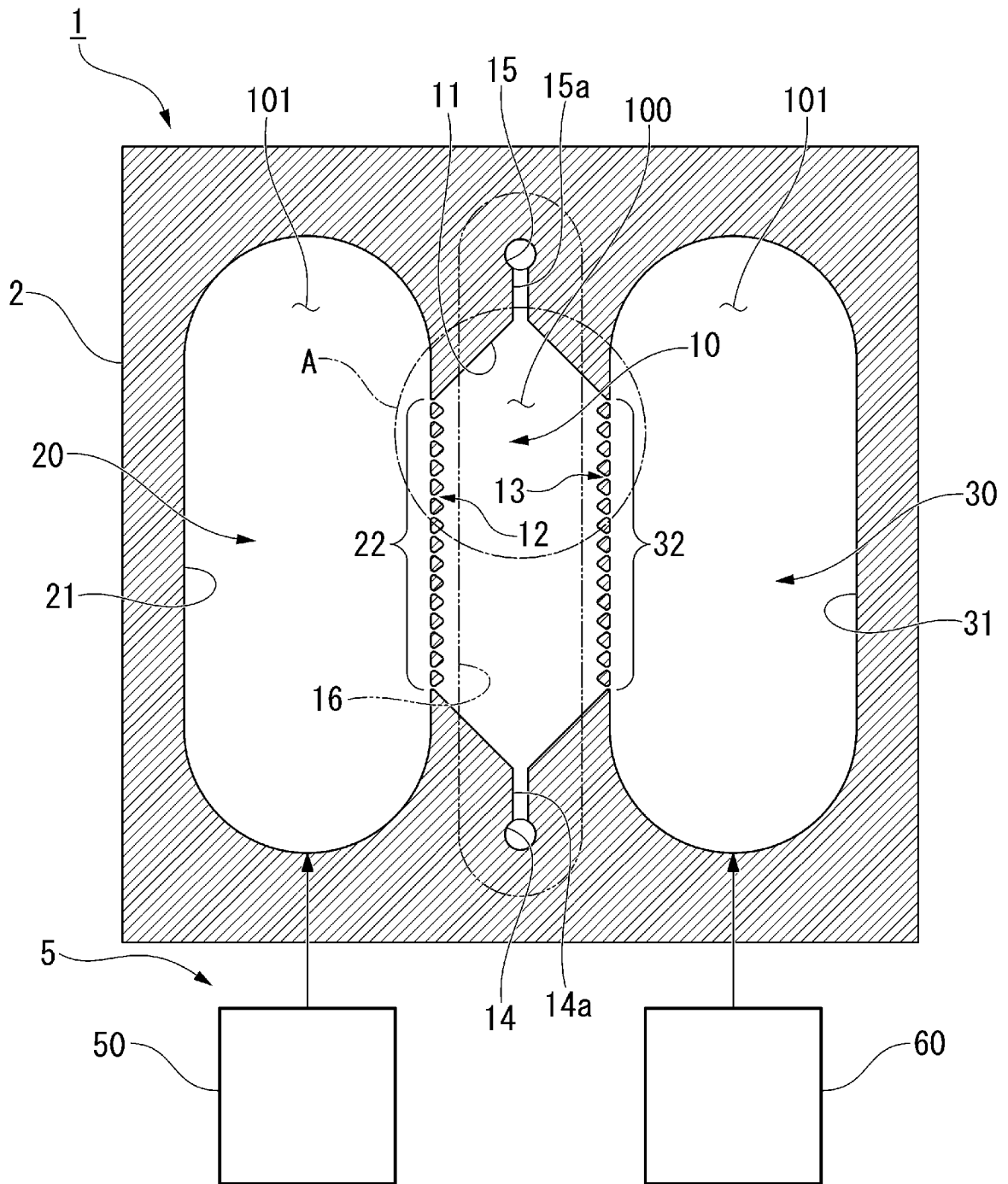
[図1]



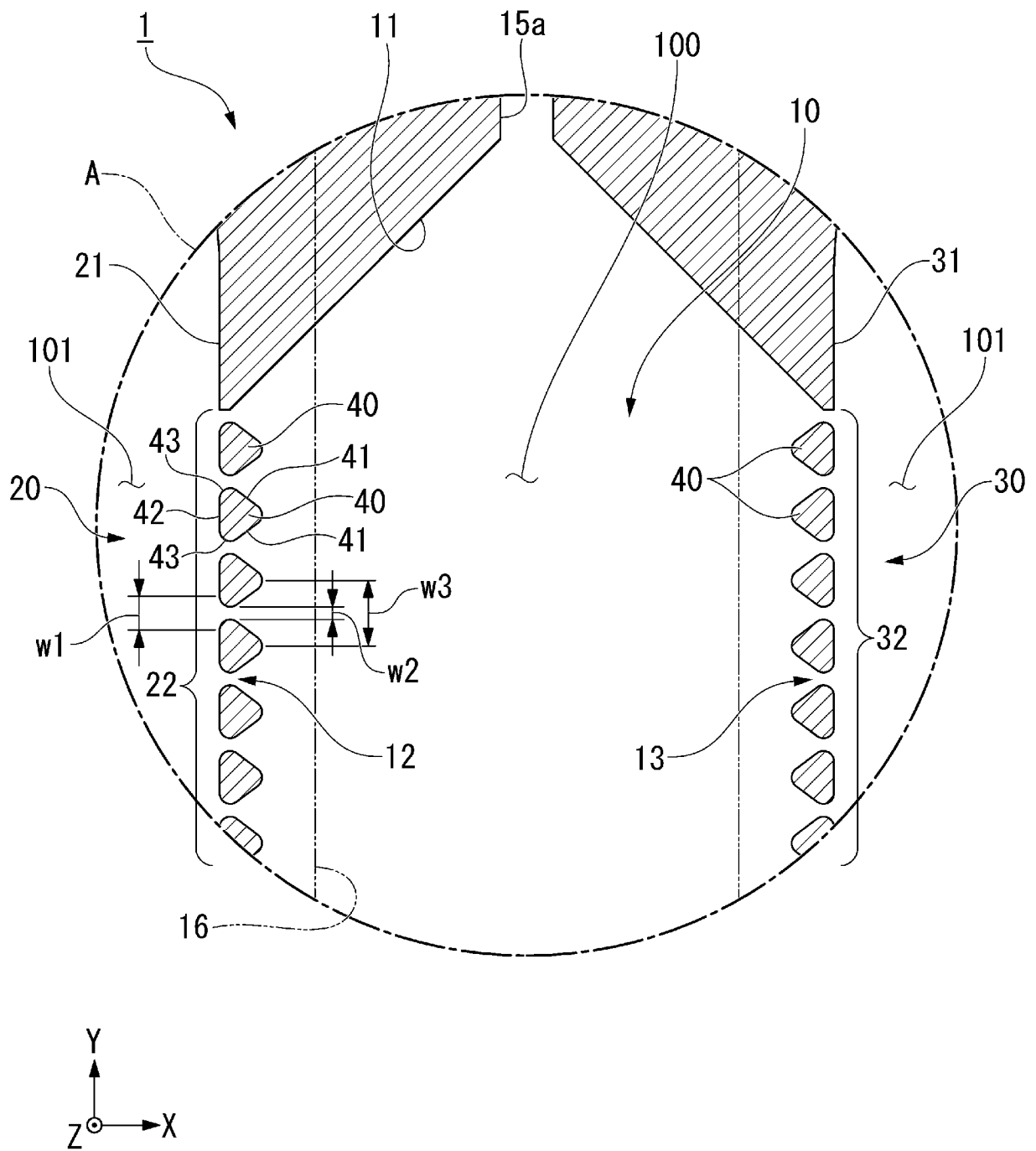
[図2]



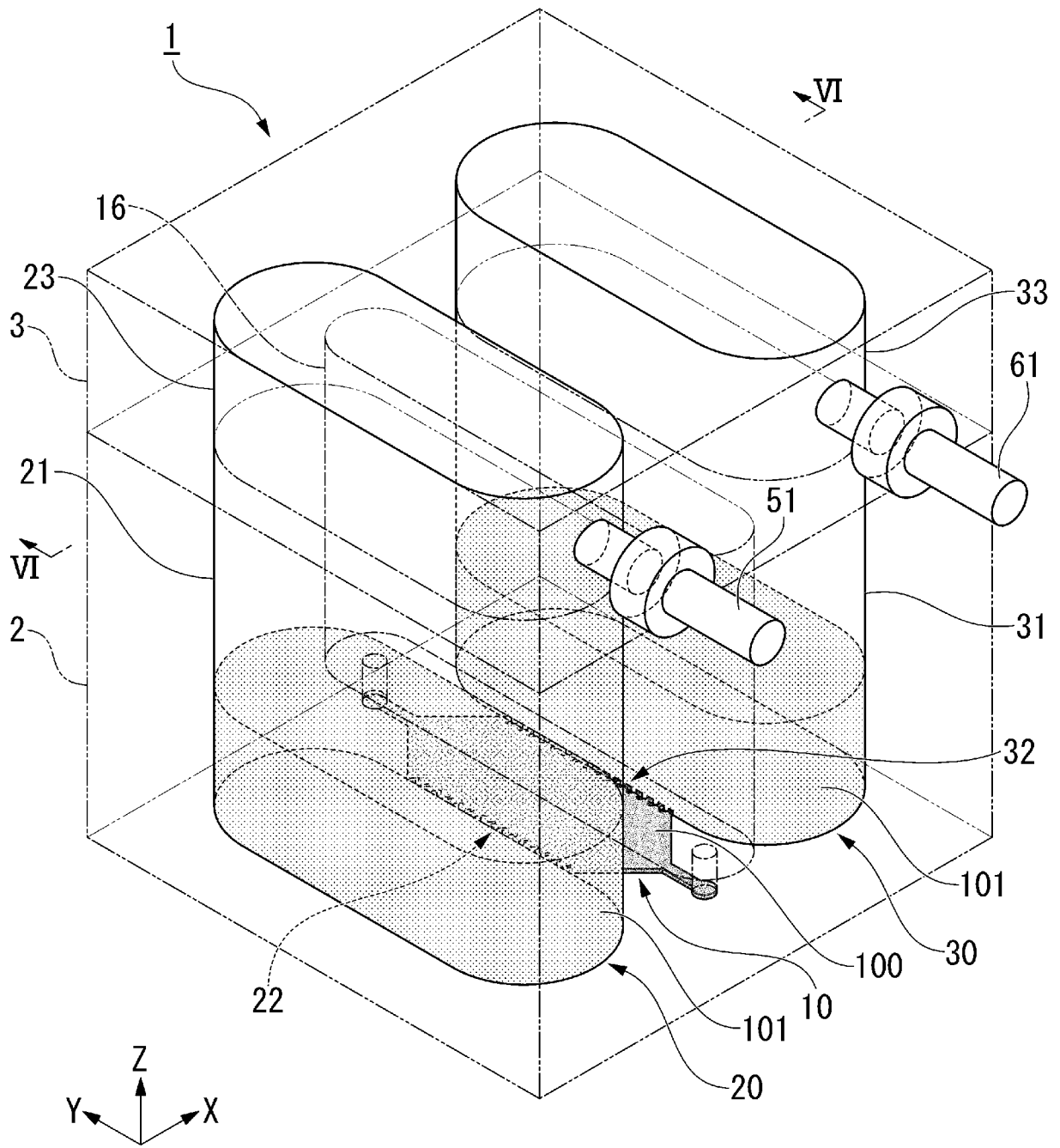
[図3]



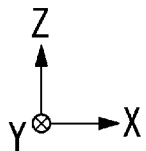
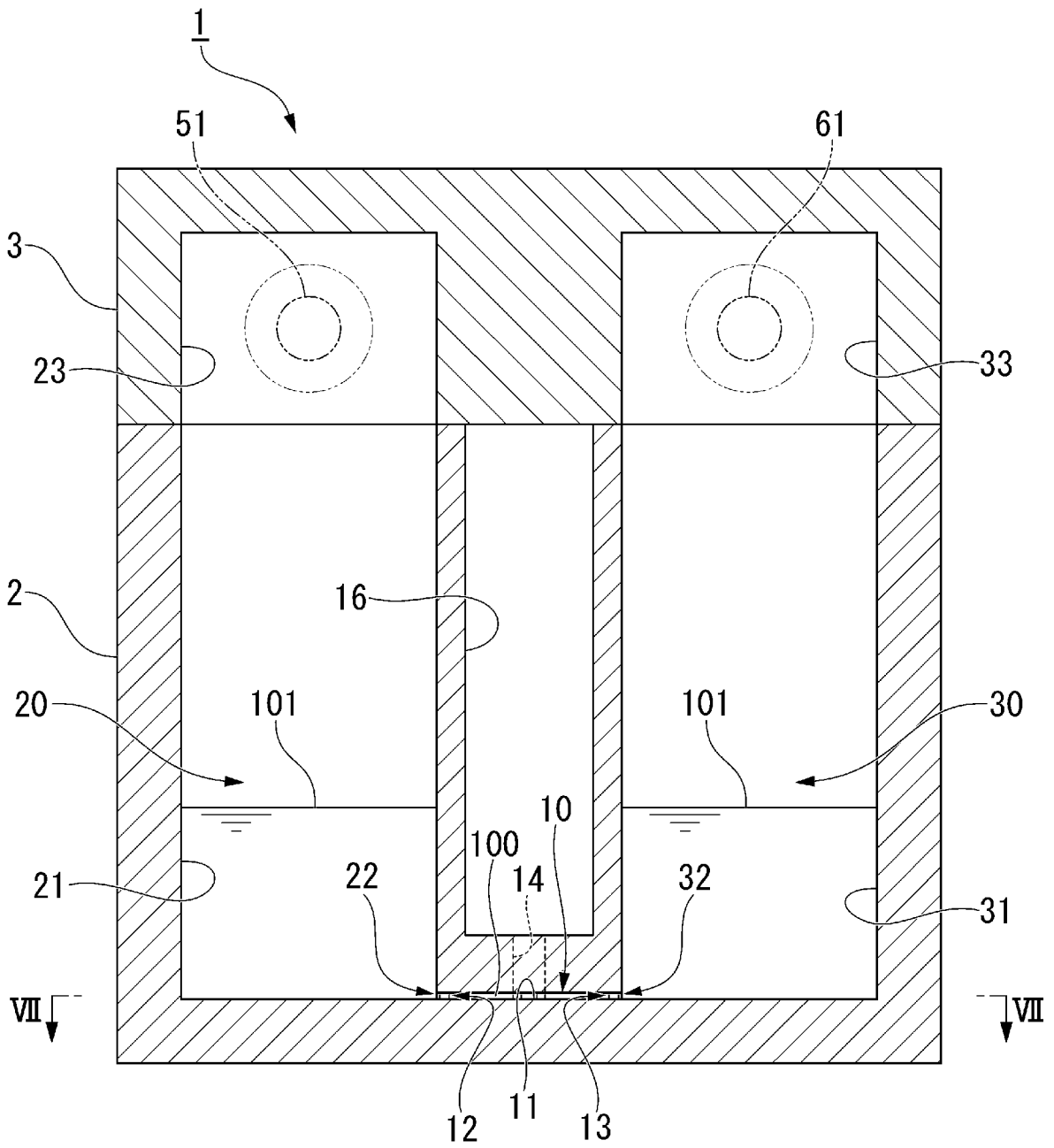
[図4]



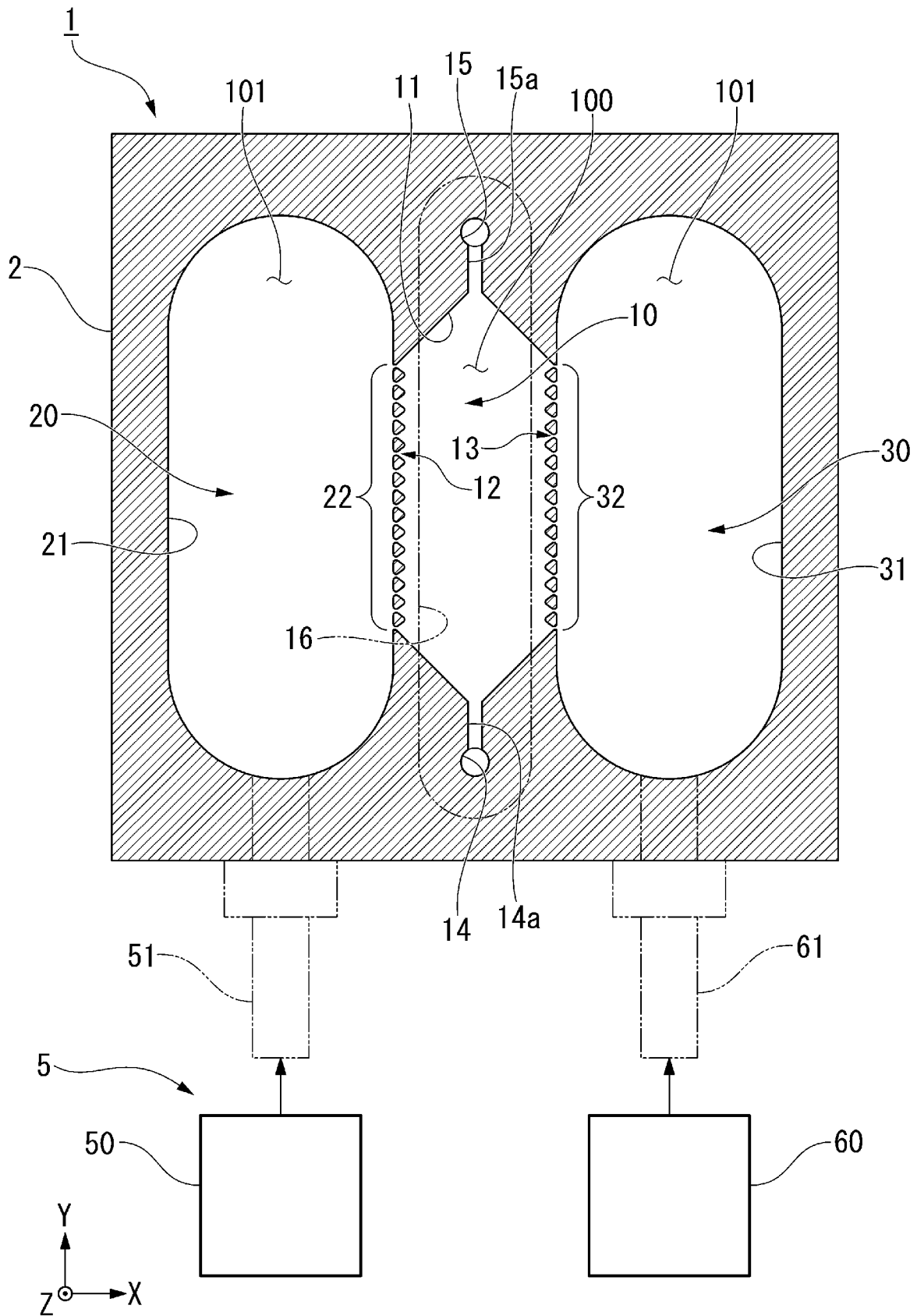
[図5]



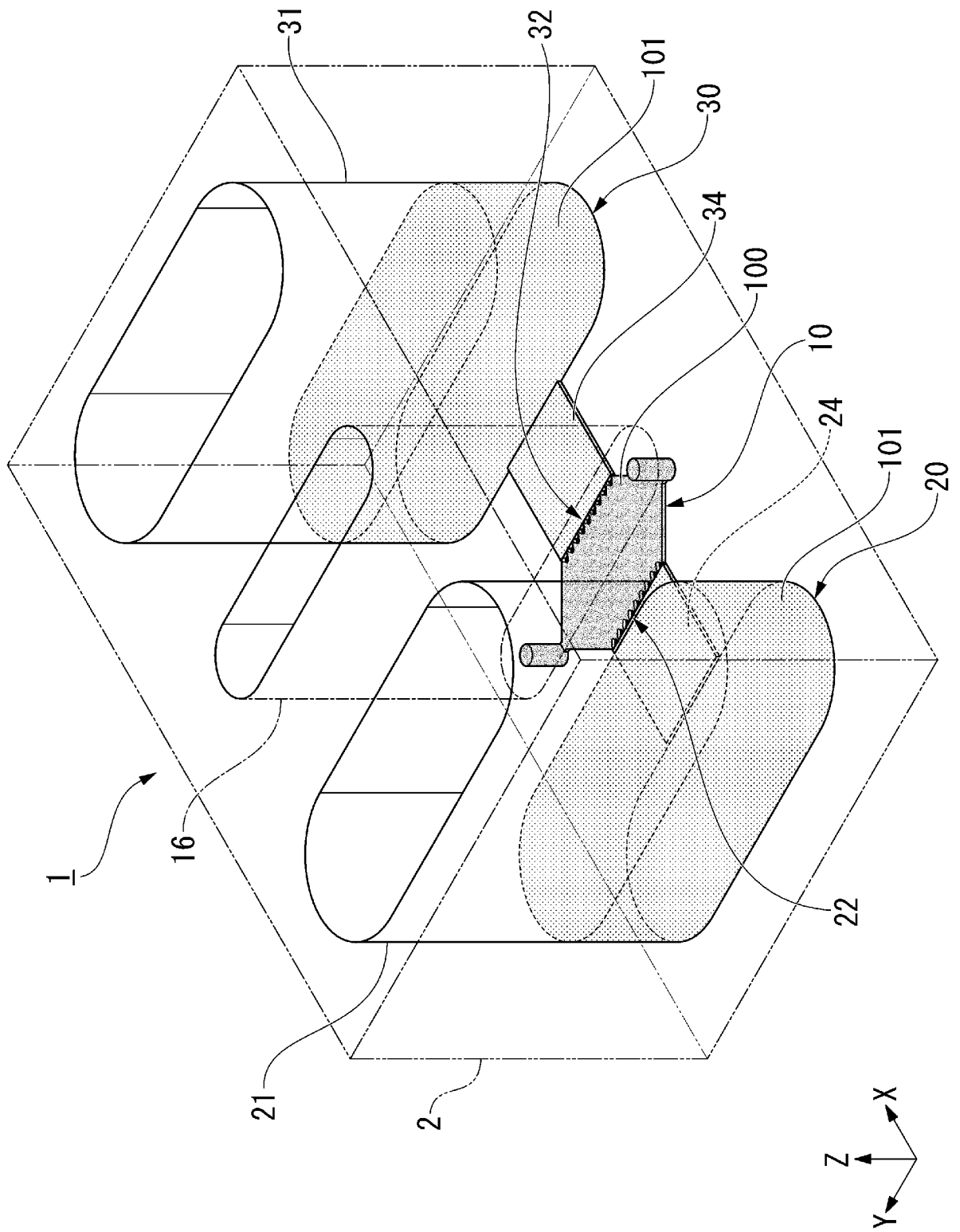
[図6]



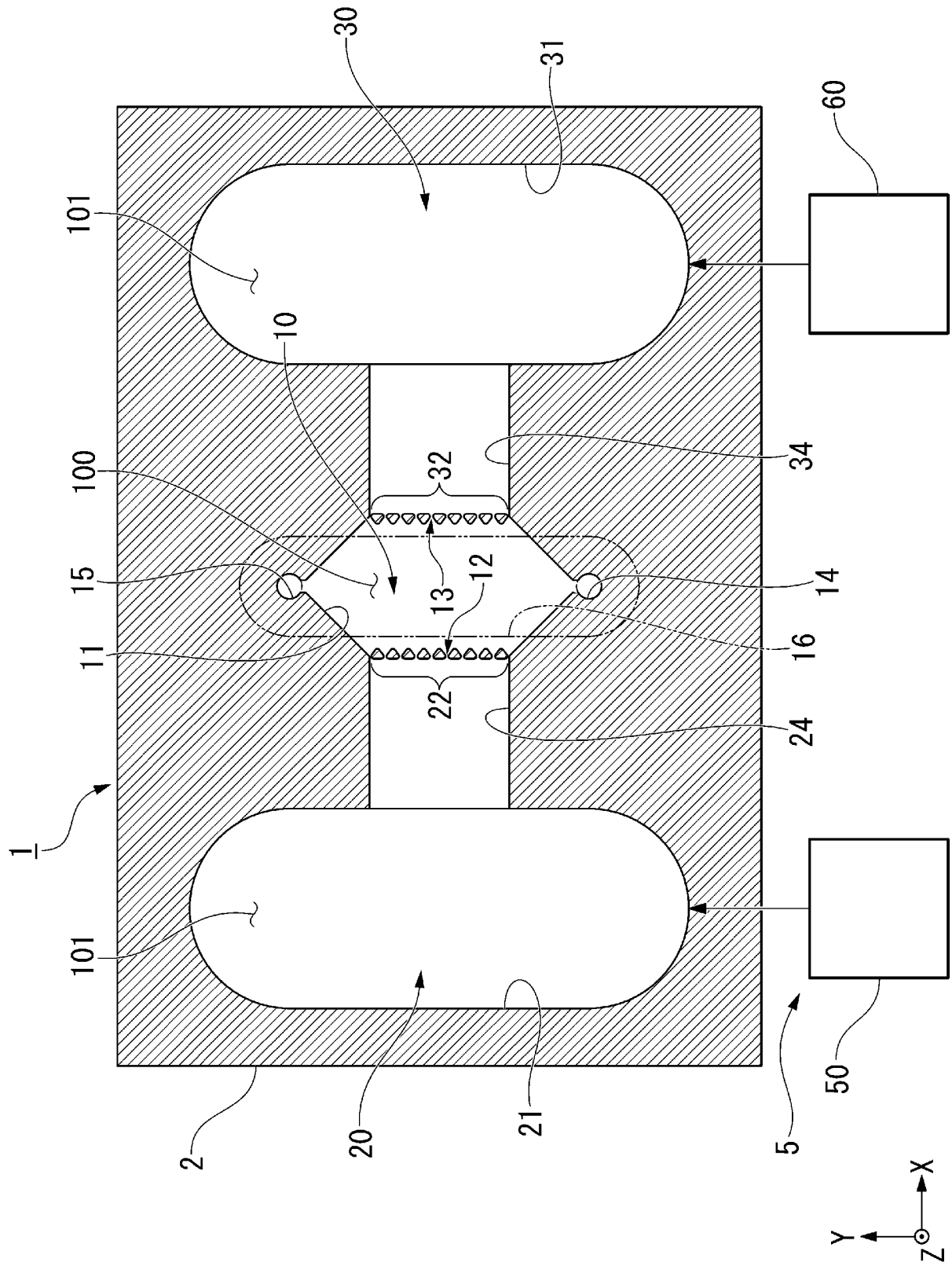
[図7]



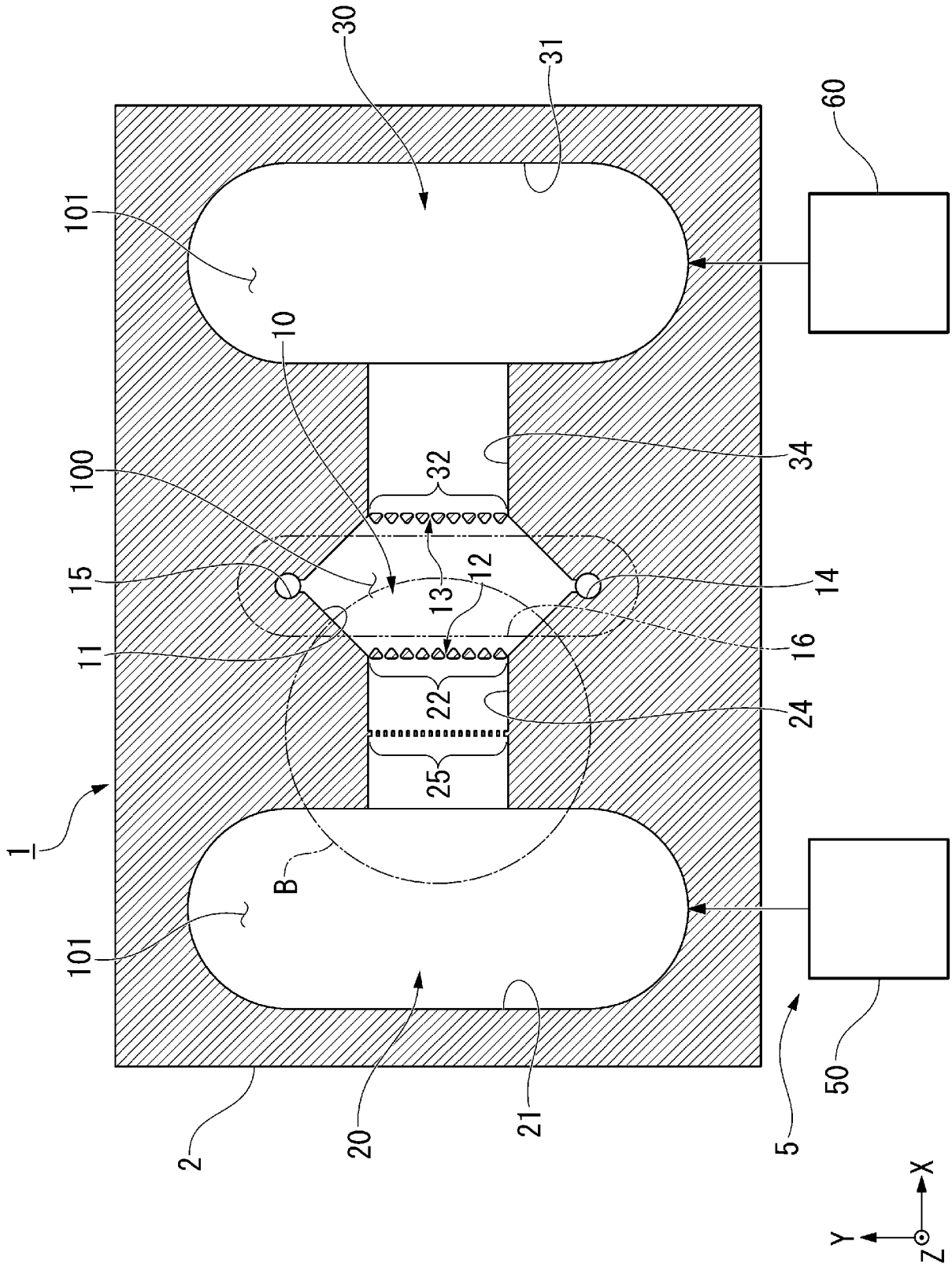
[図8]



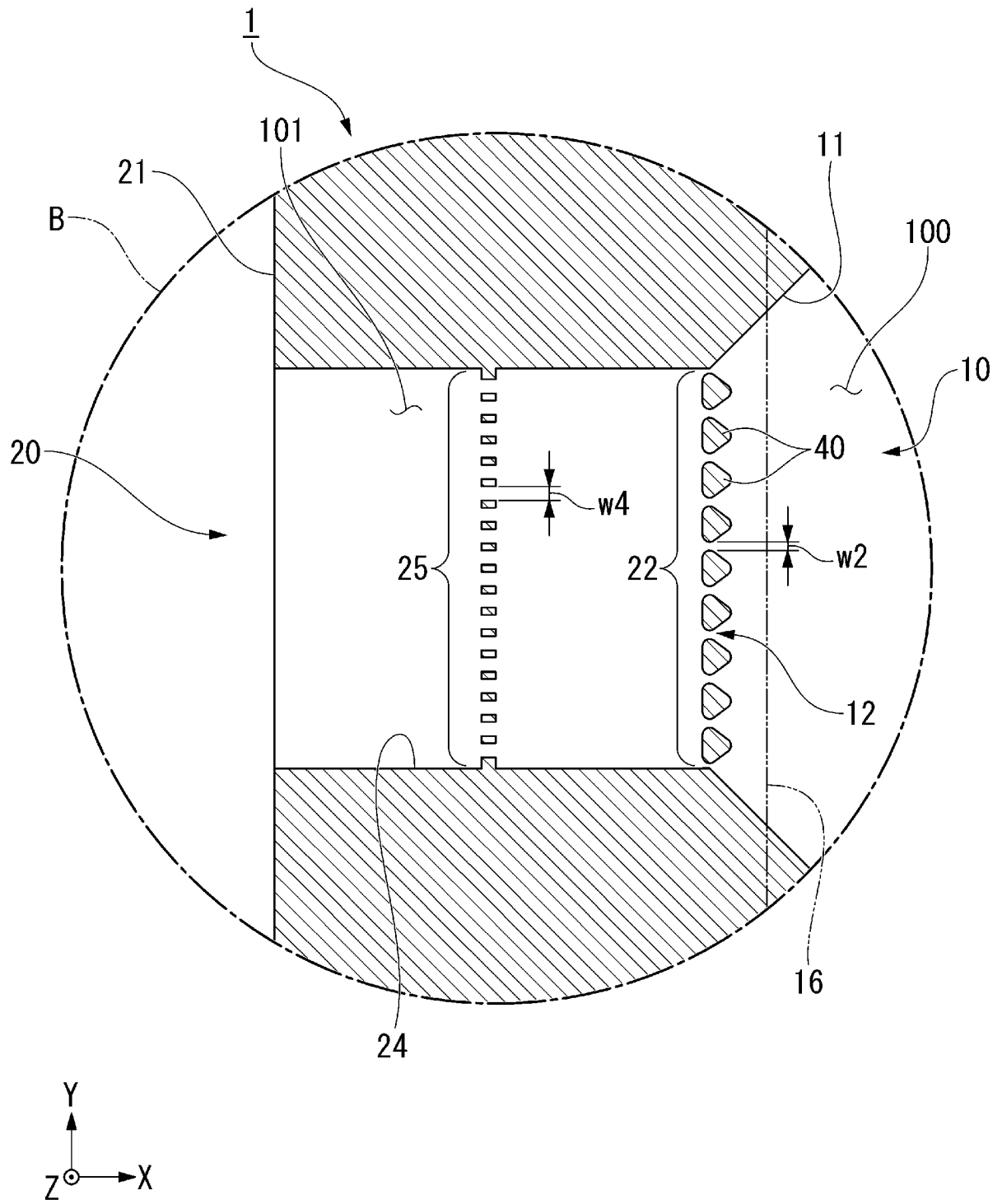
[図9]



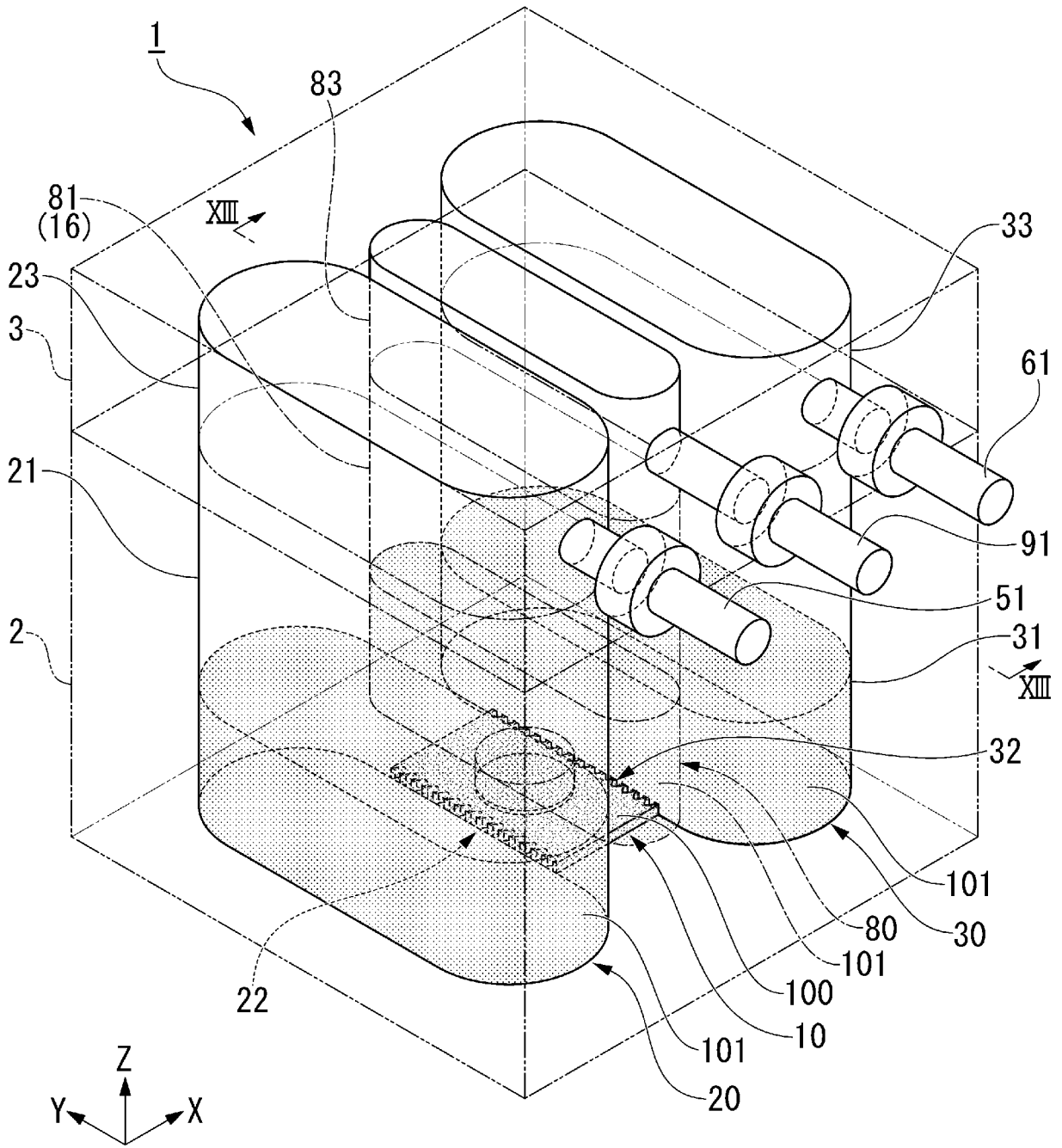
[図10]



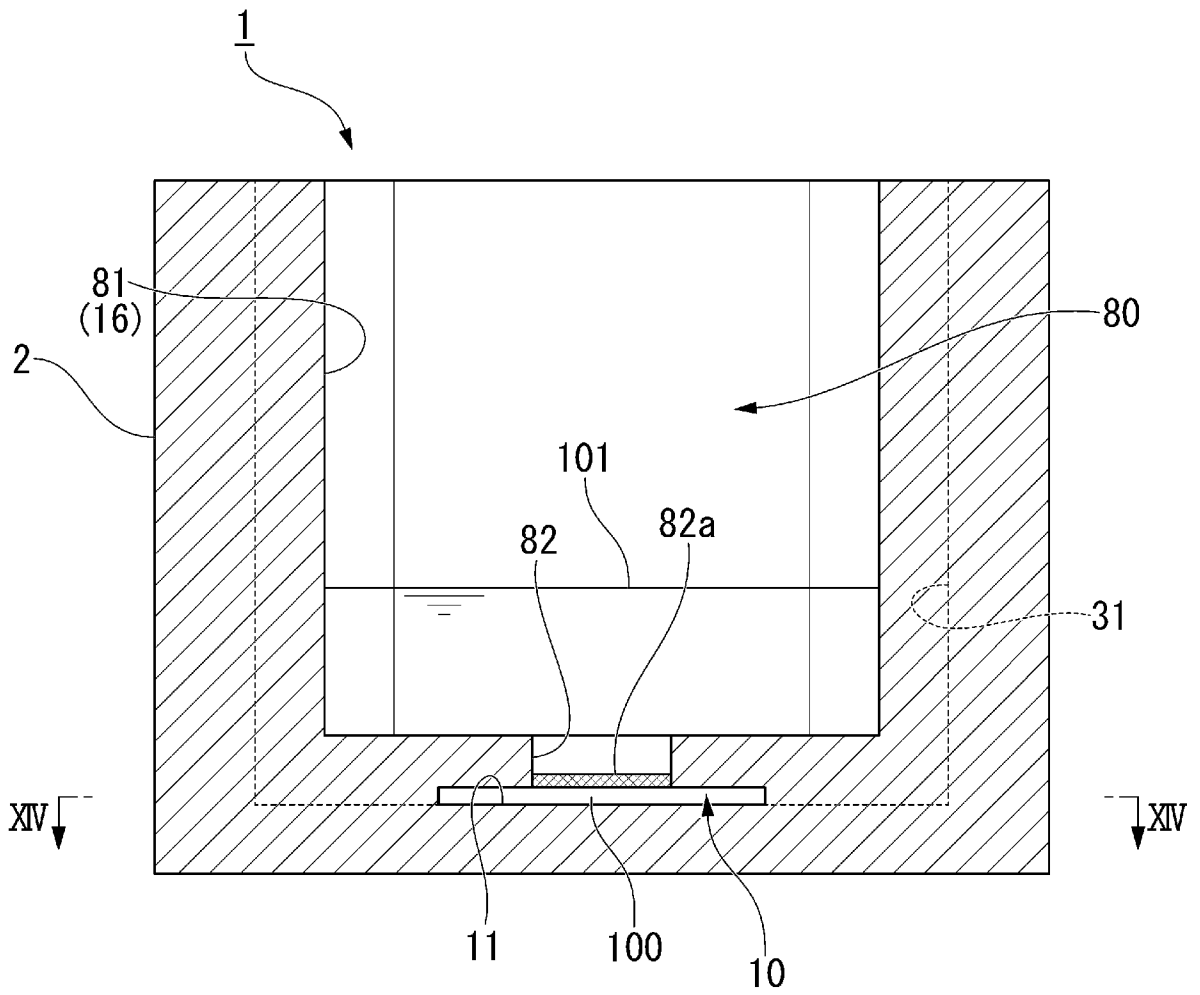
[図11]



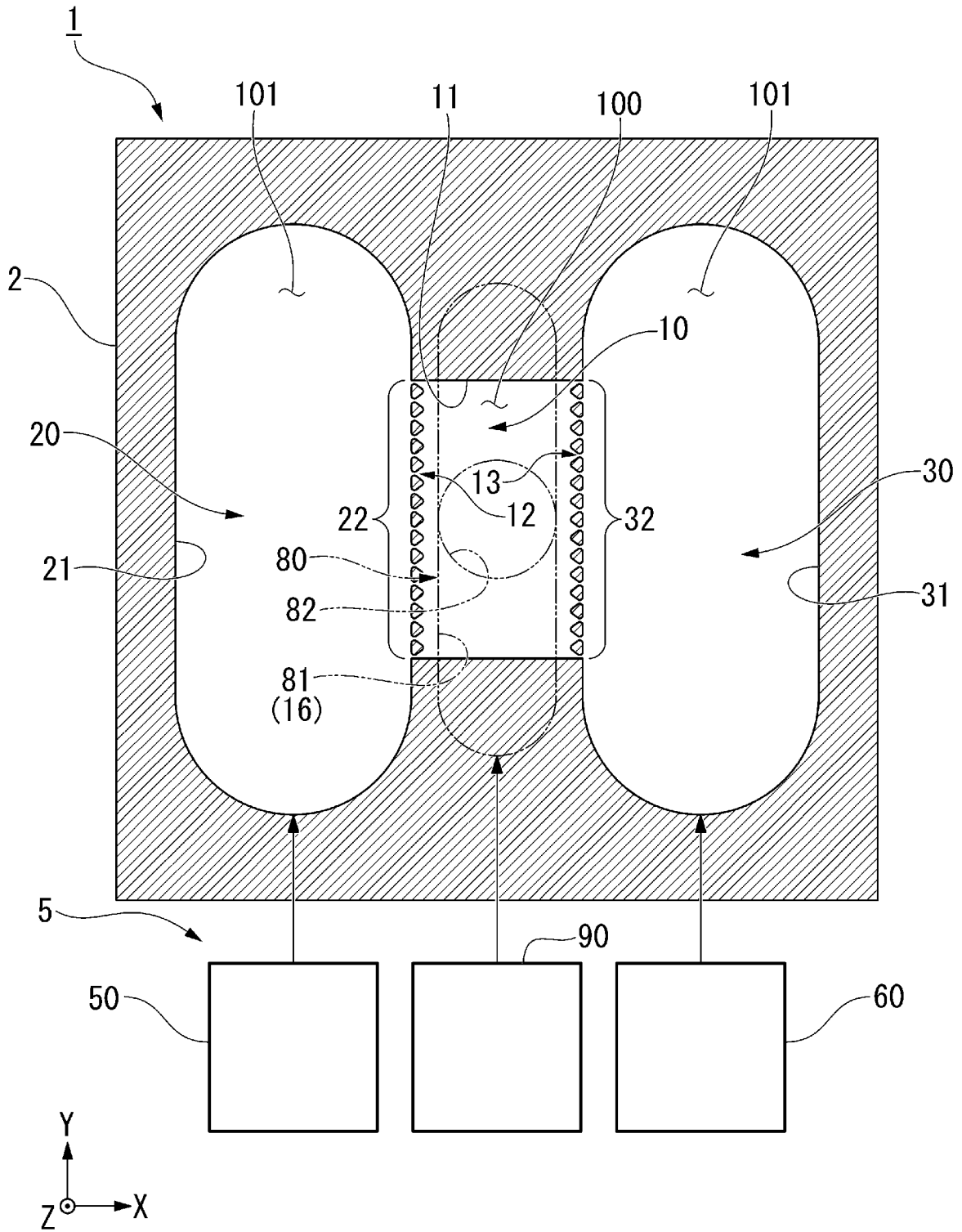
[図12]



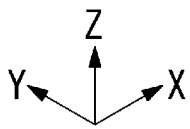
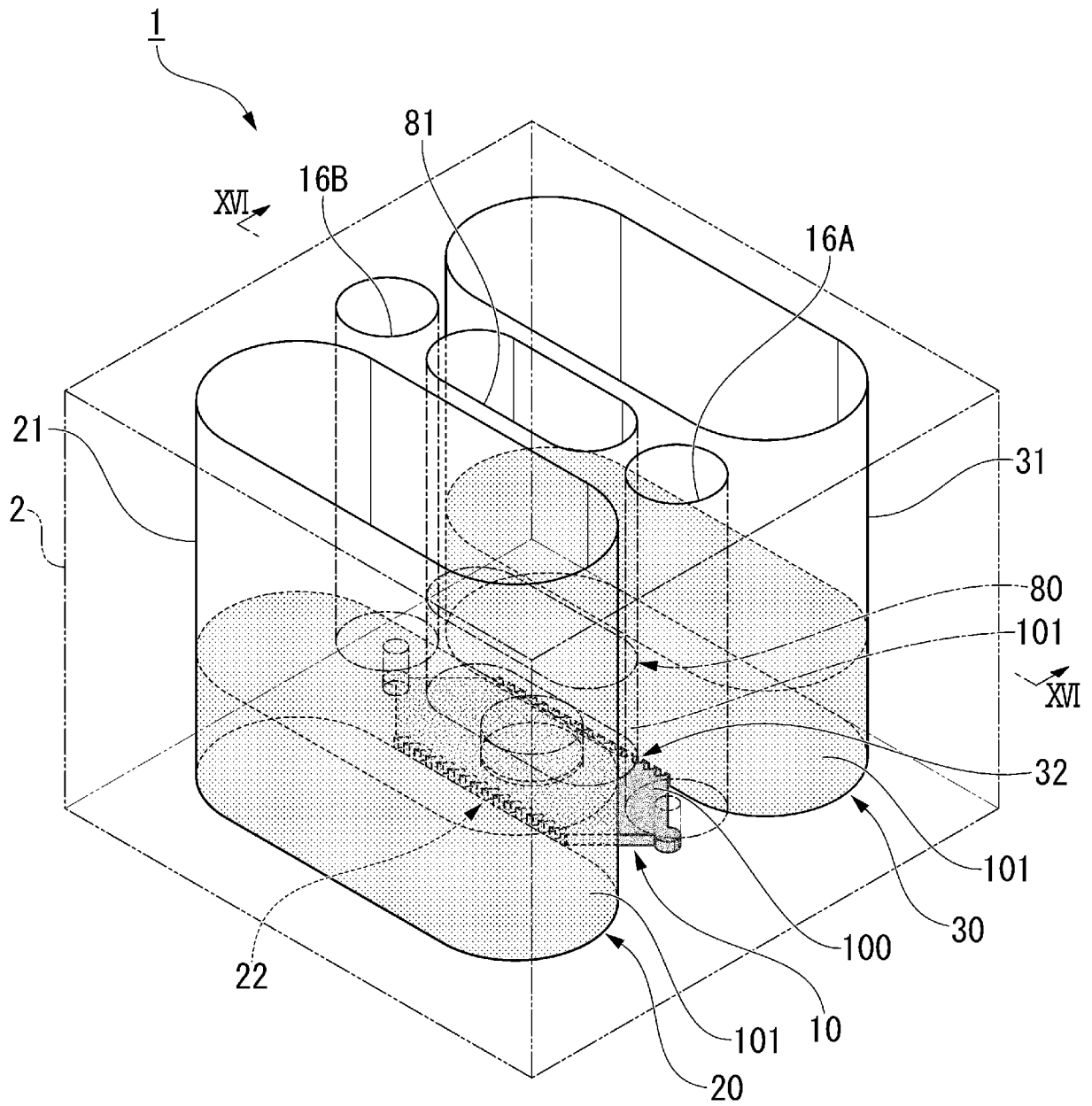
[図13]



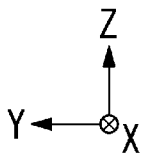
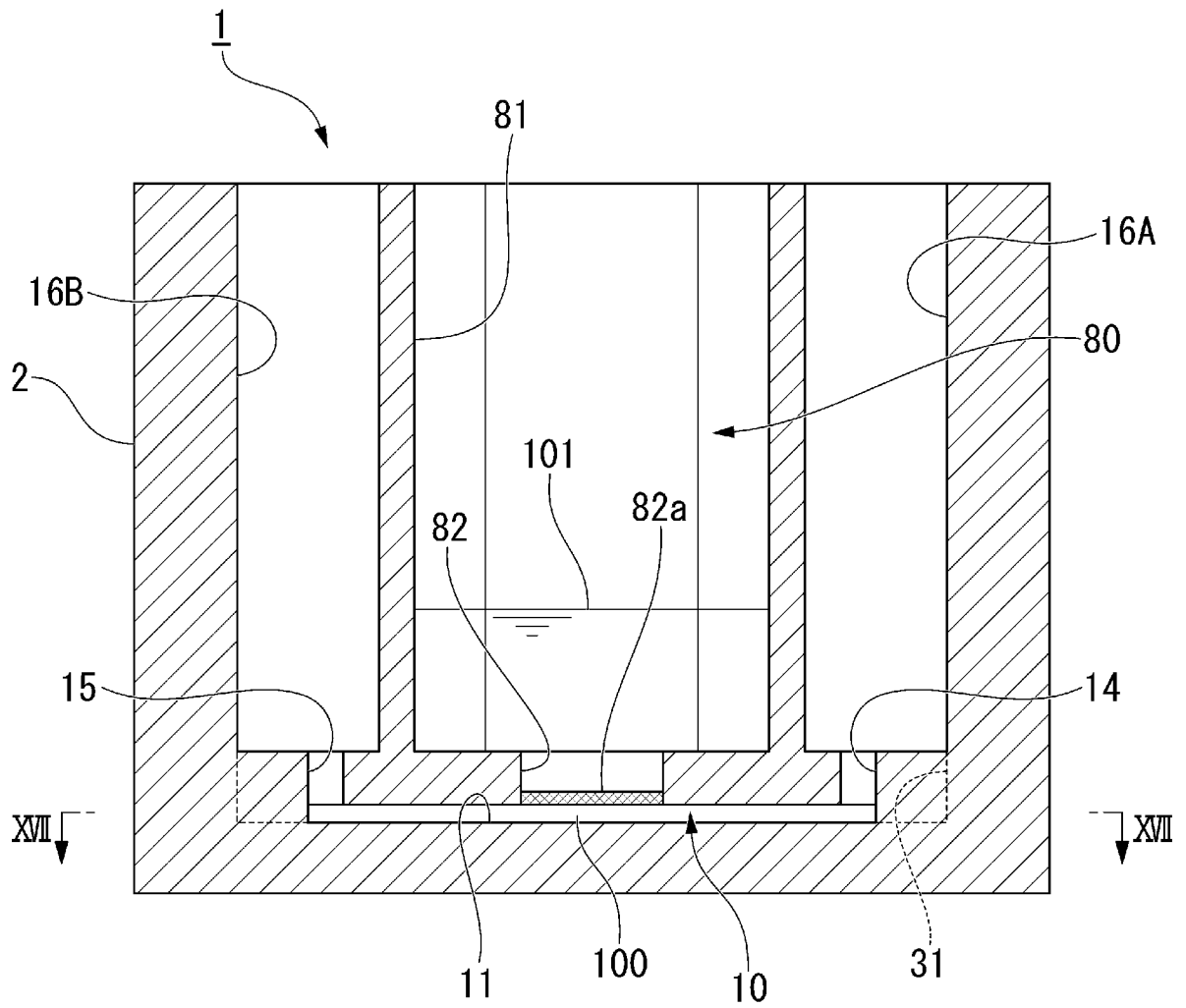
[図14]



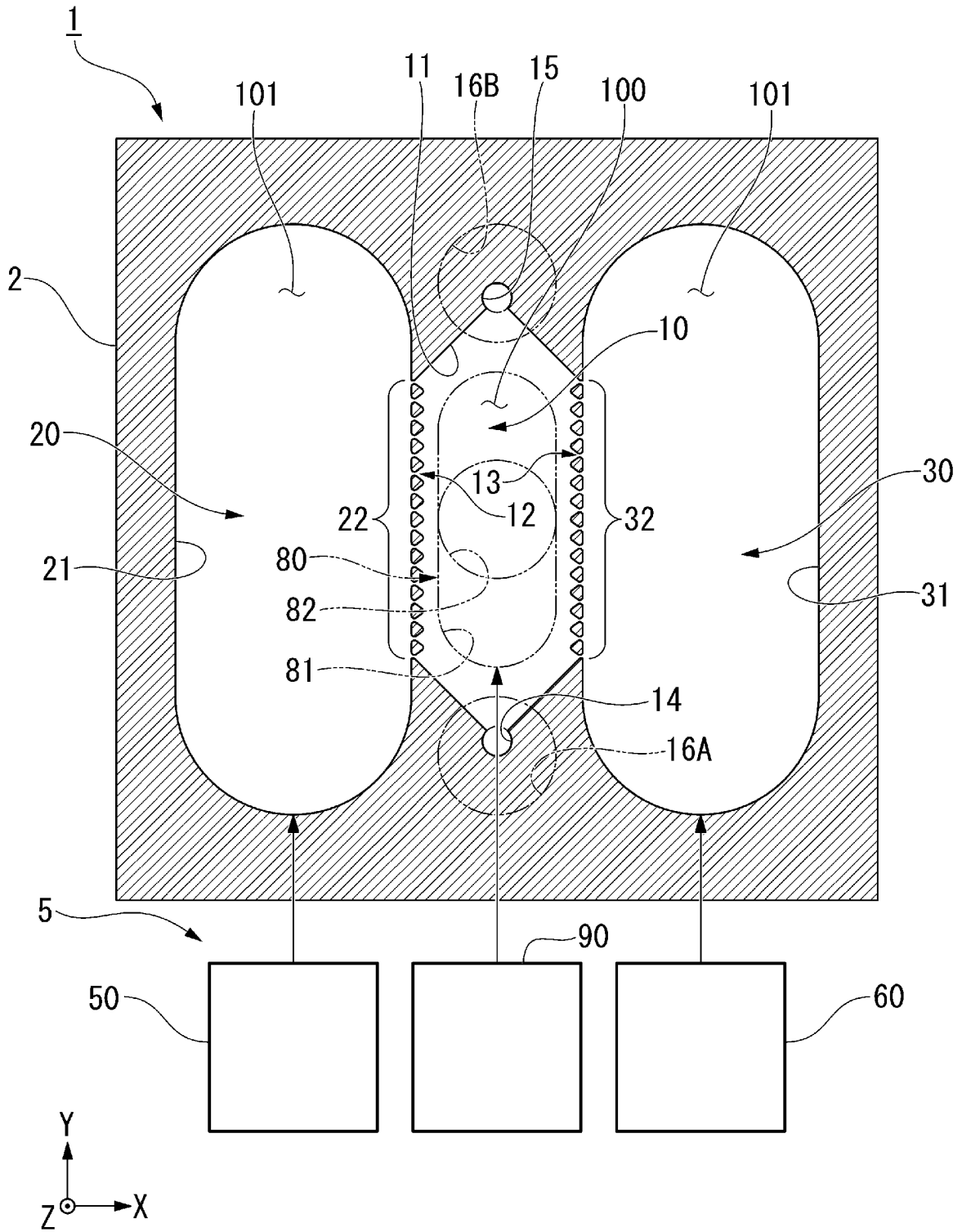
[図15]



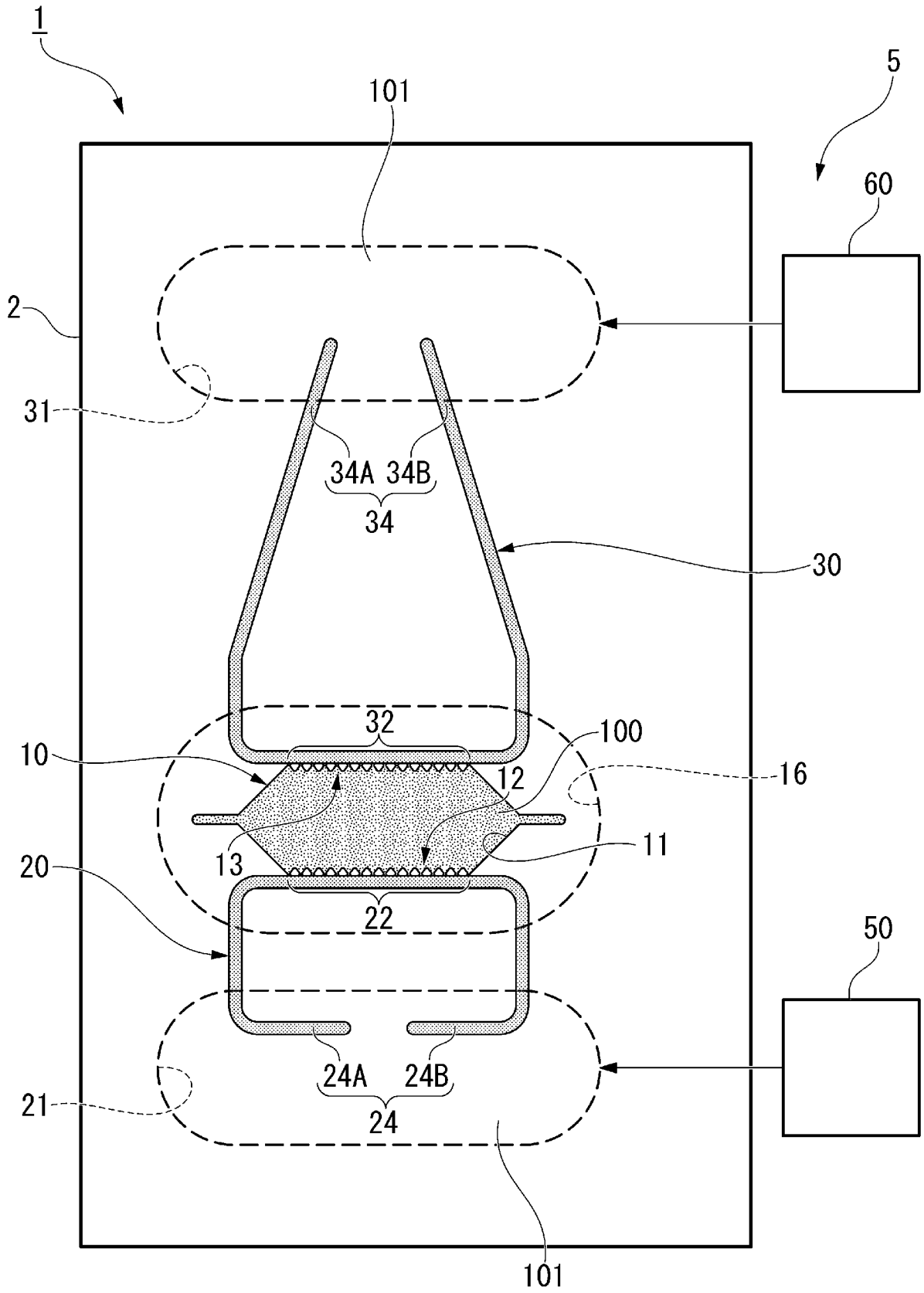
[図16]



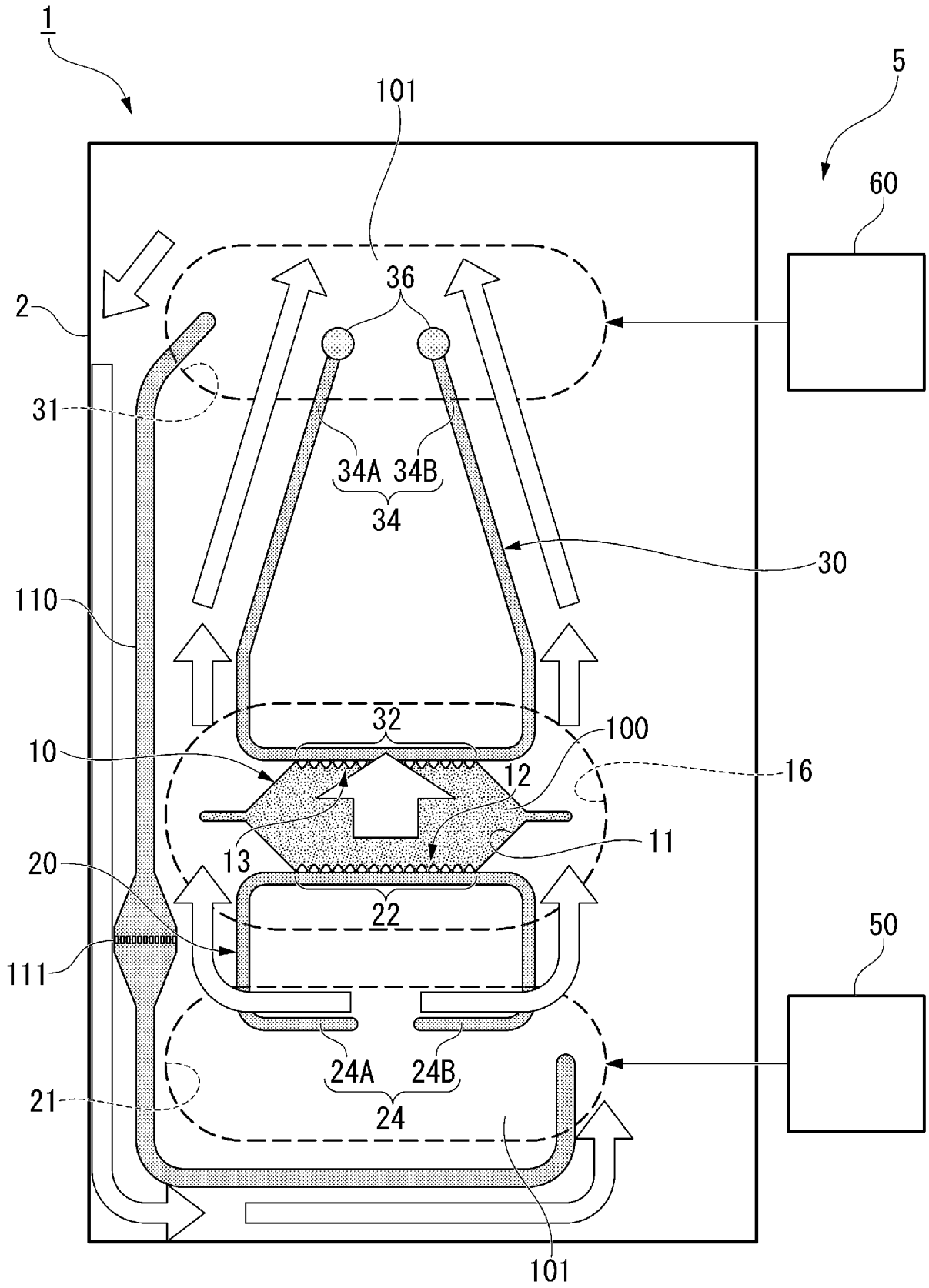
[図17]



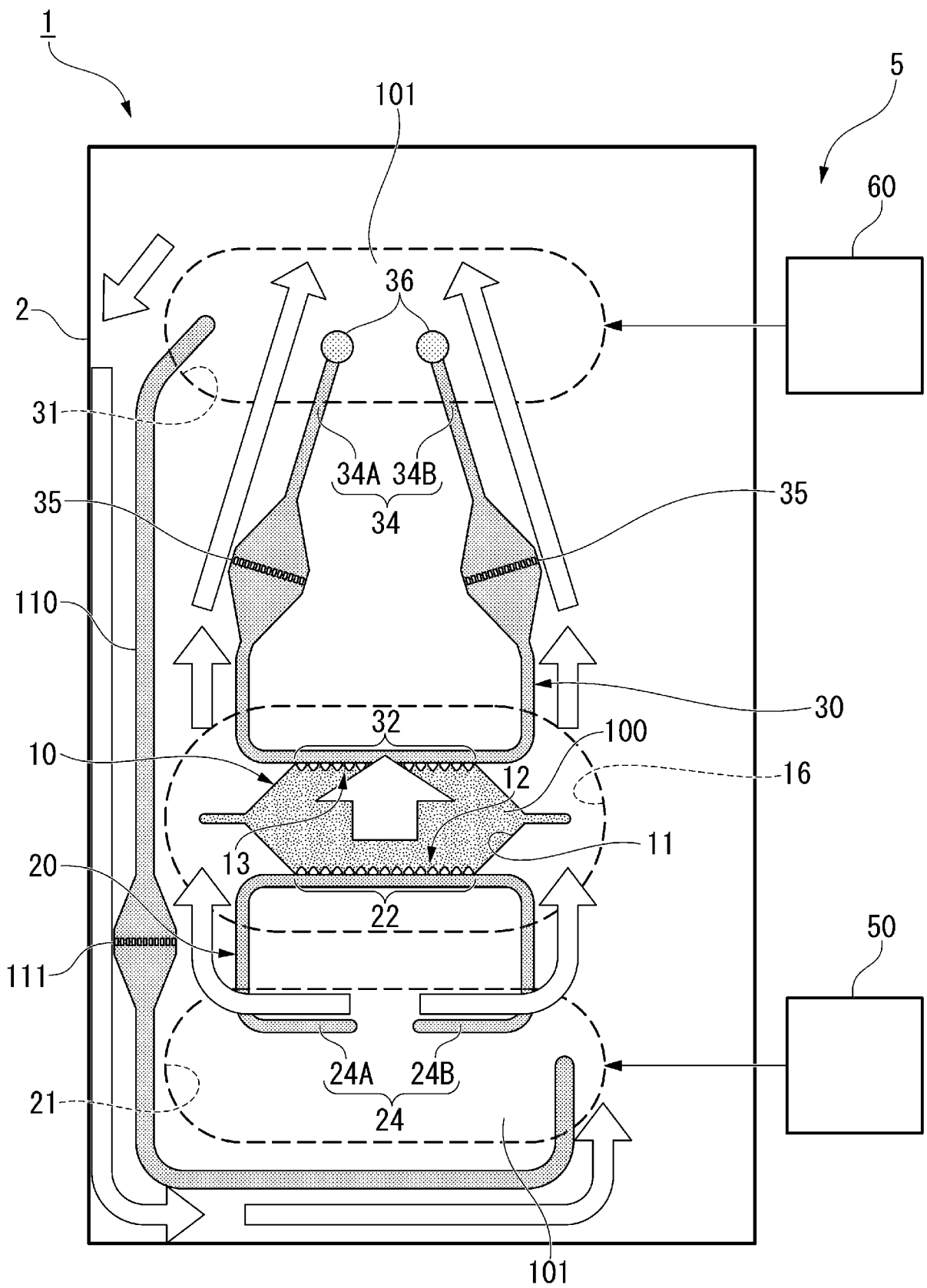
[図18]



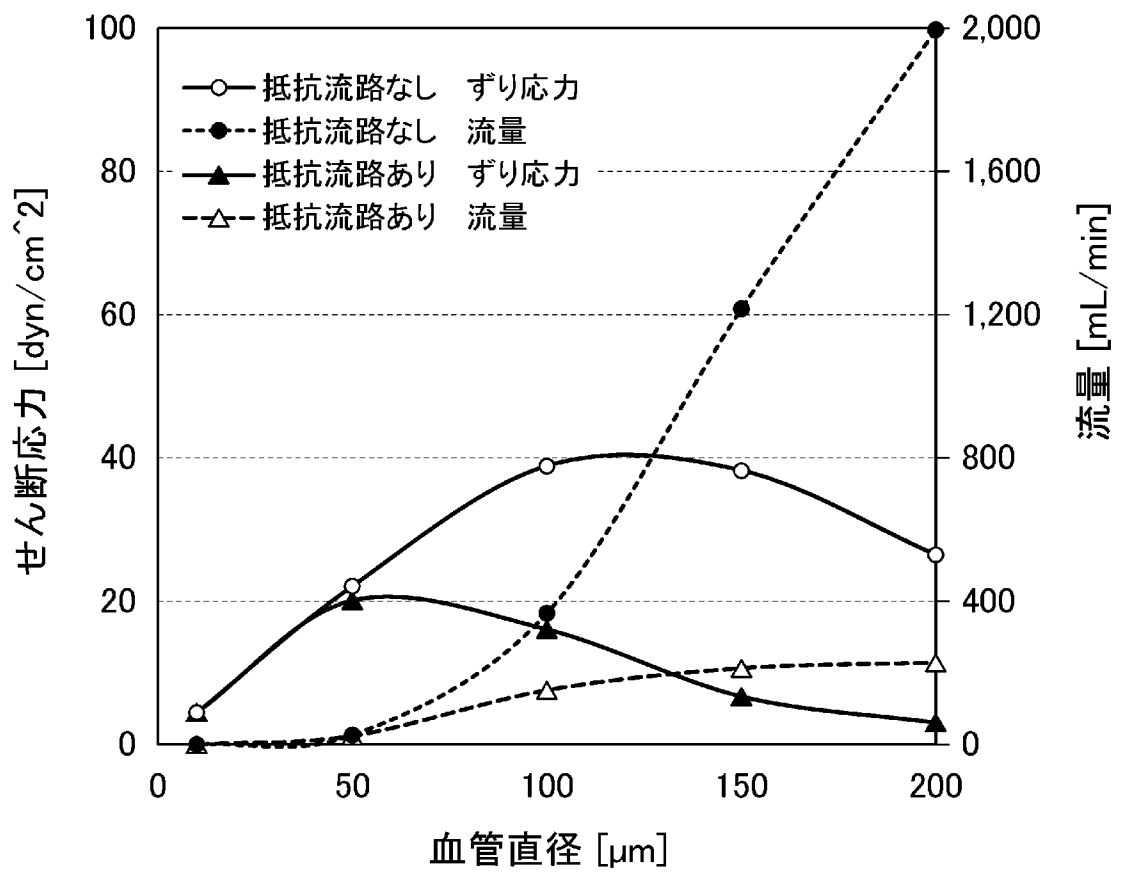
[図19]



[図20]

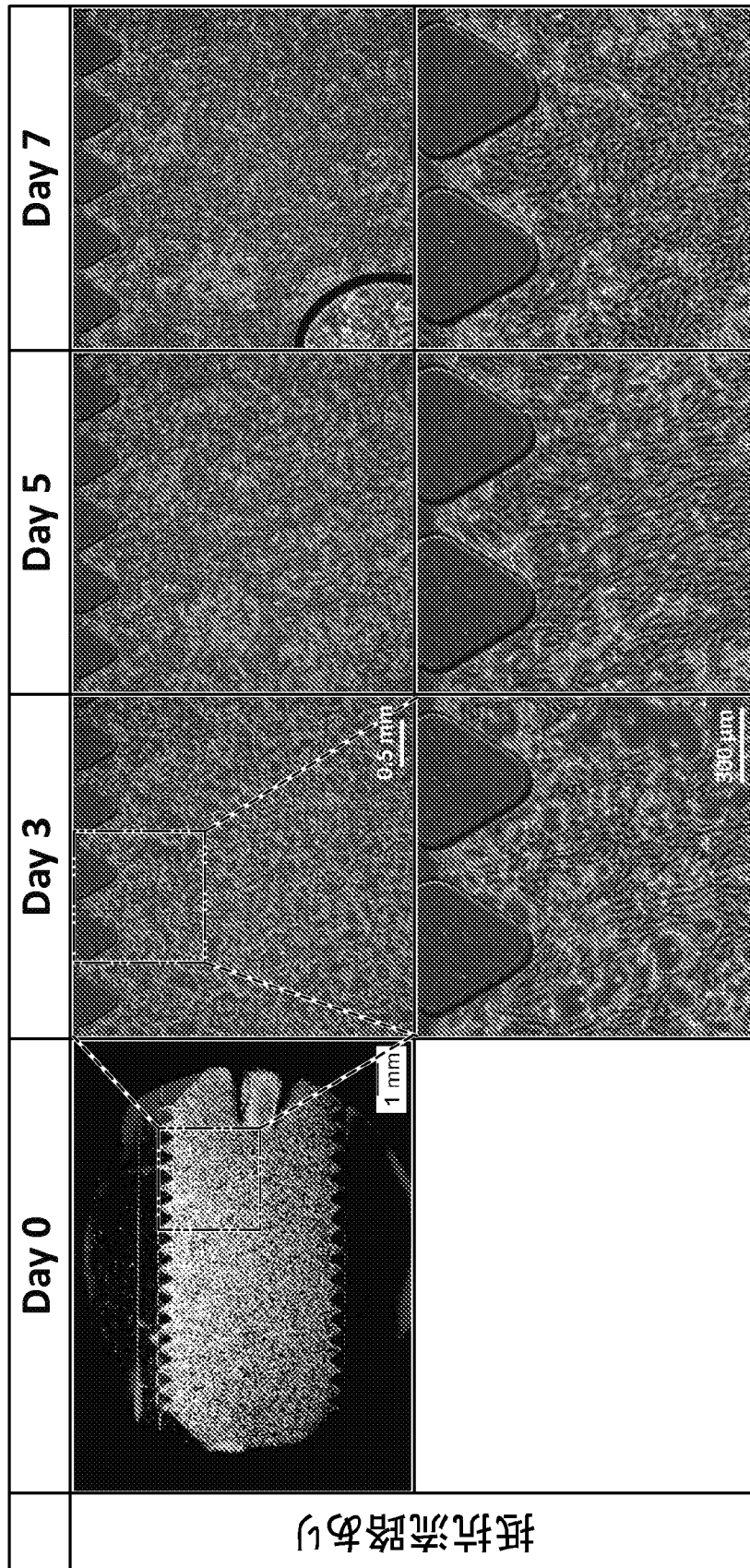


[図21]



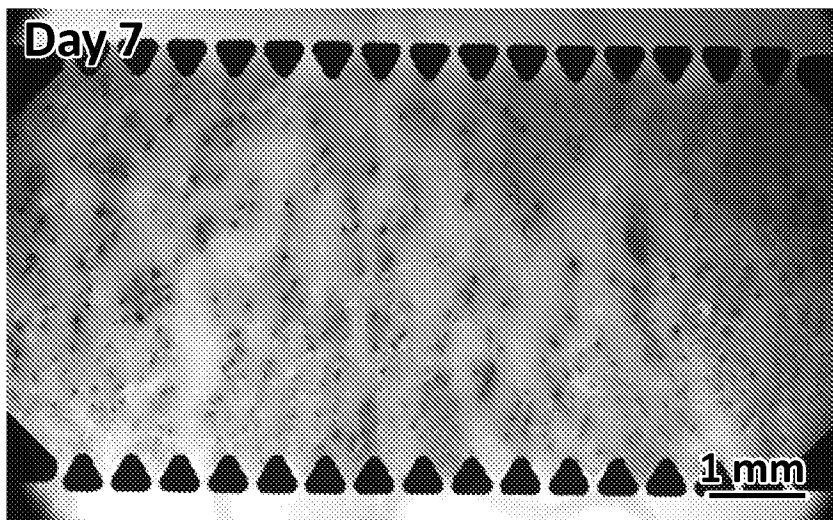
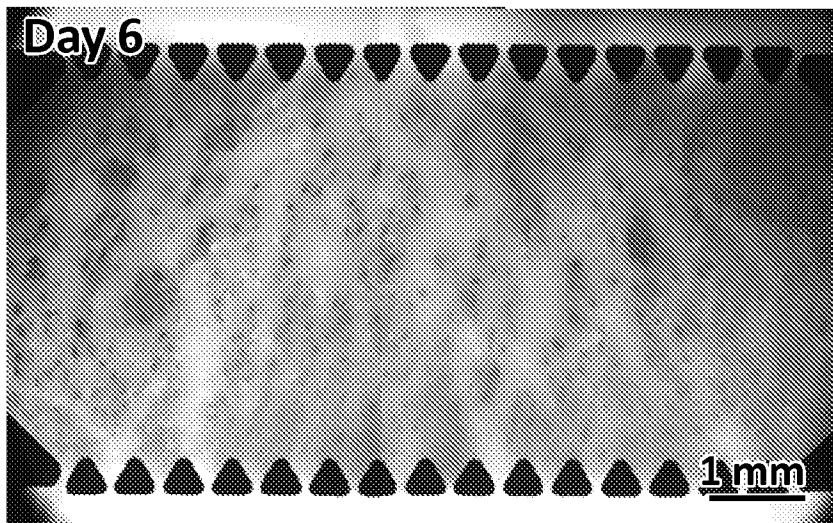
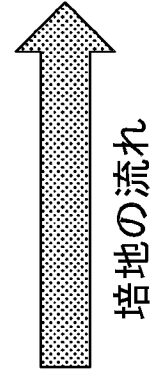
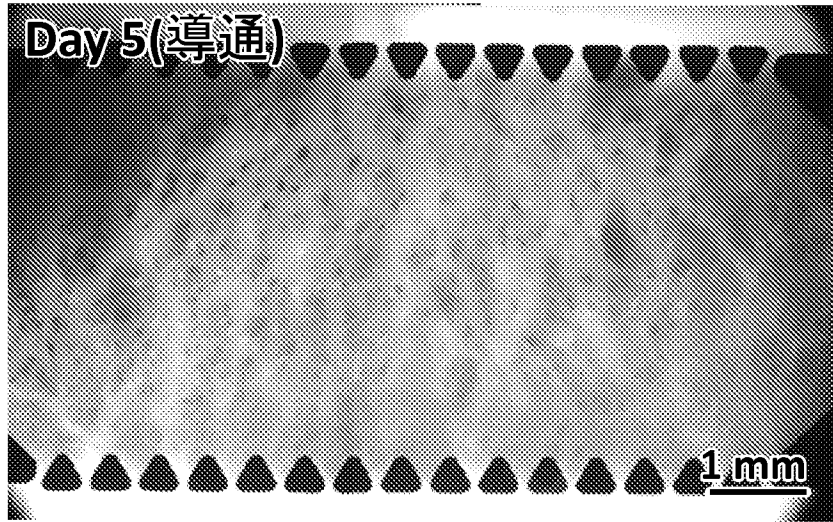


[図23]



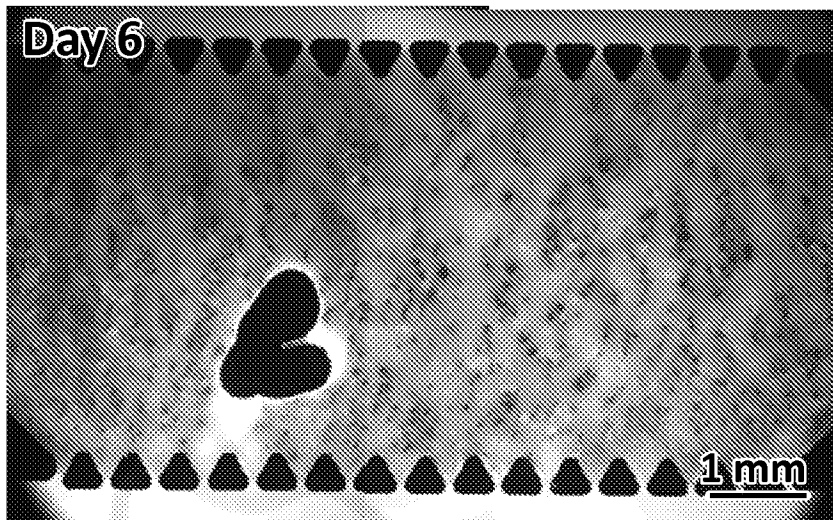
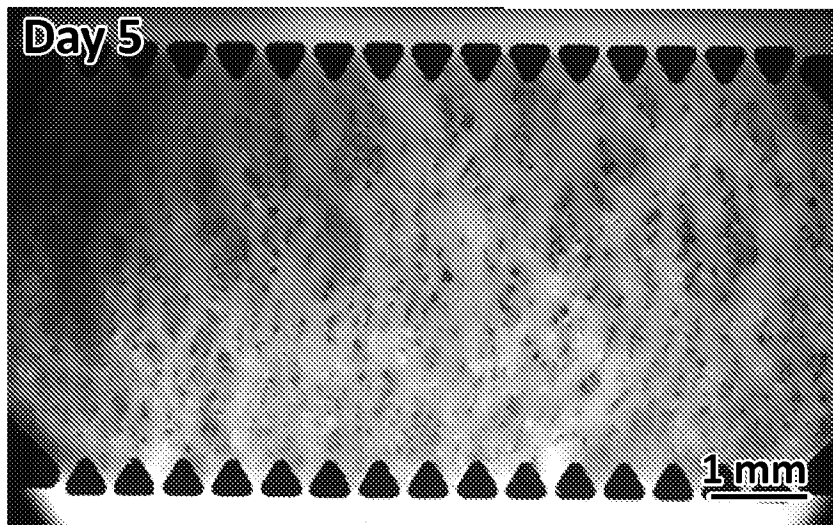
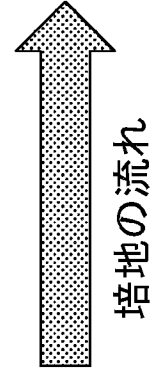
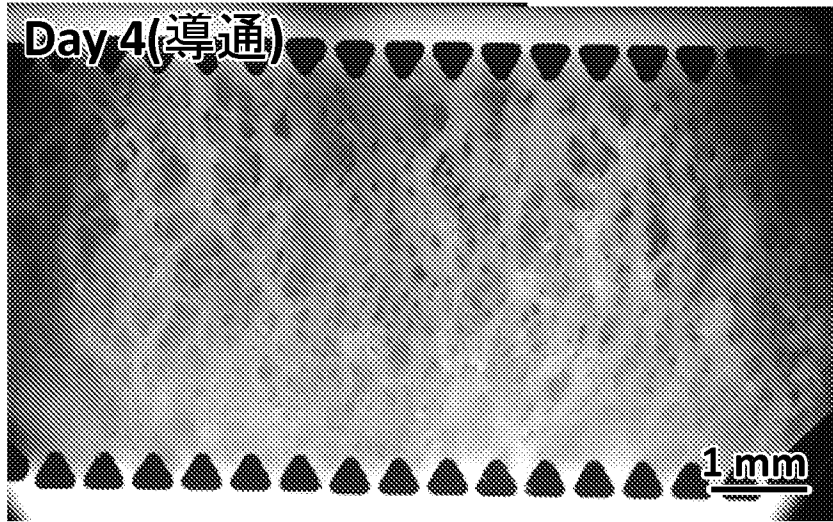
[図24]

抵抗流路なし

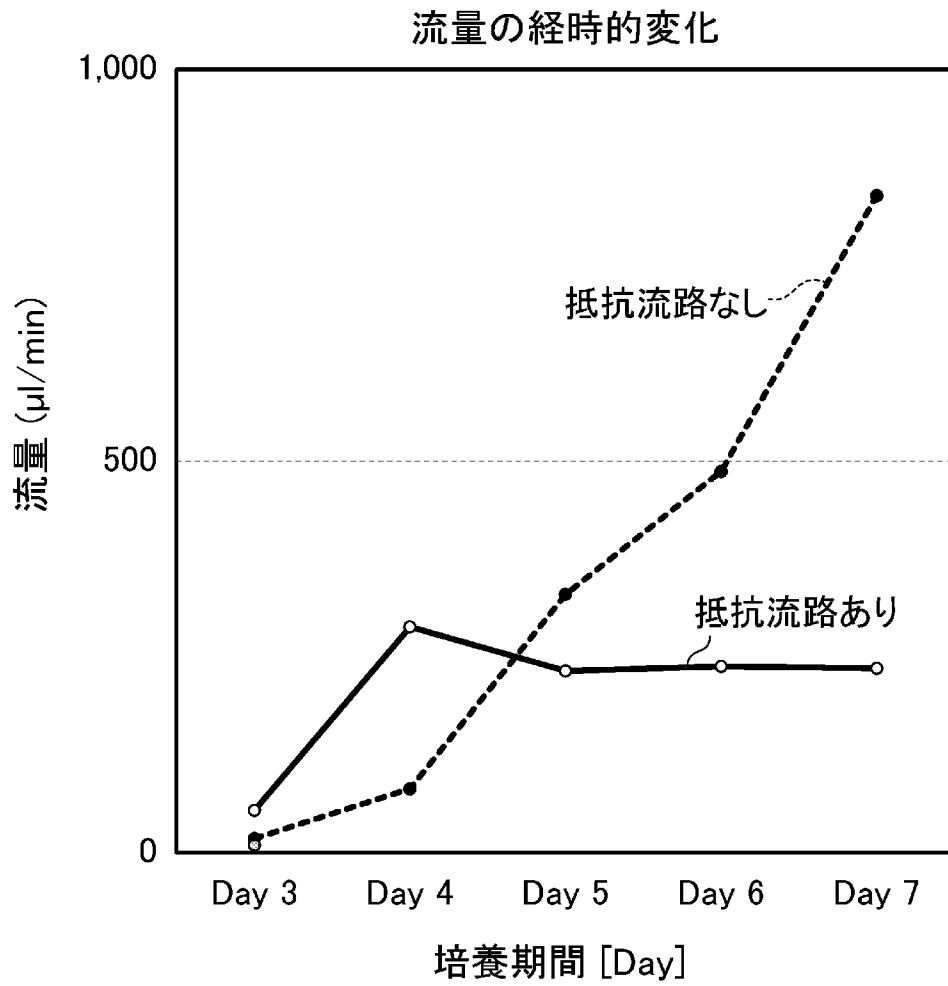


[図25]

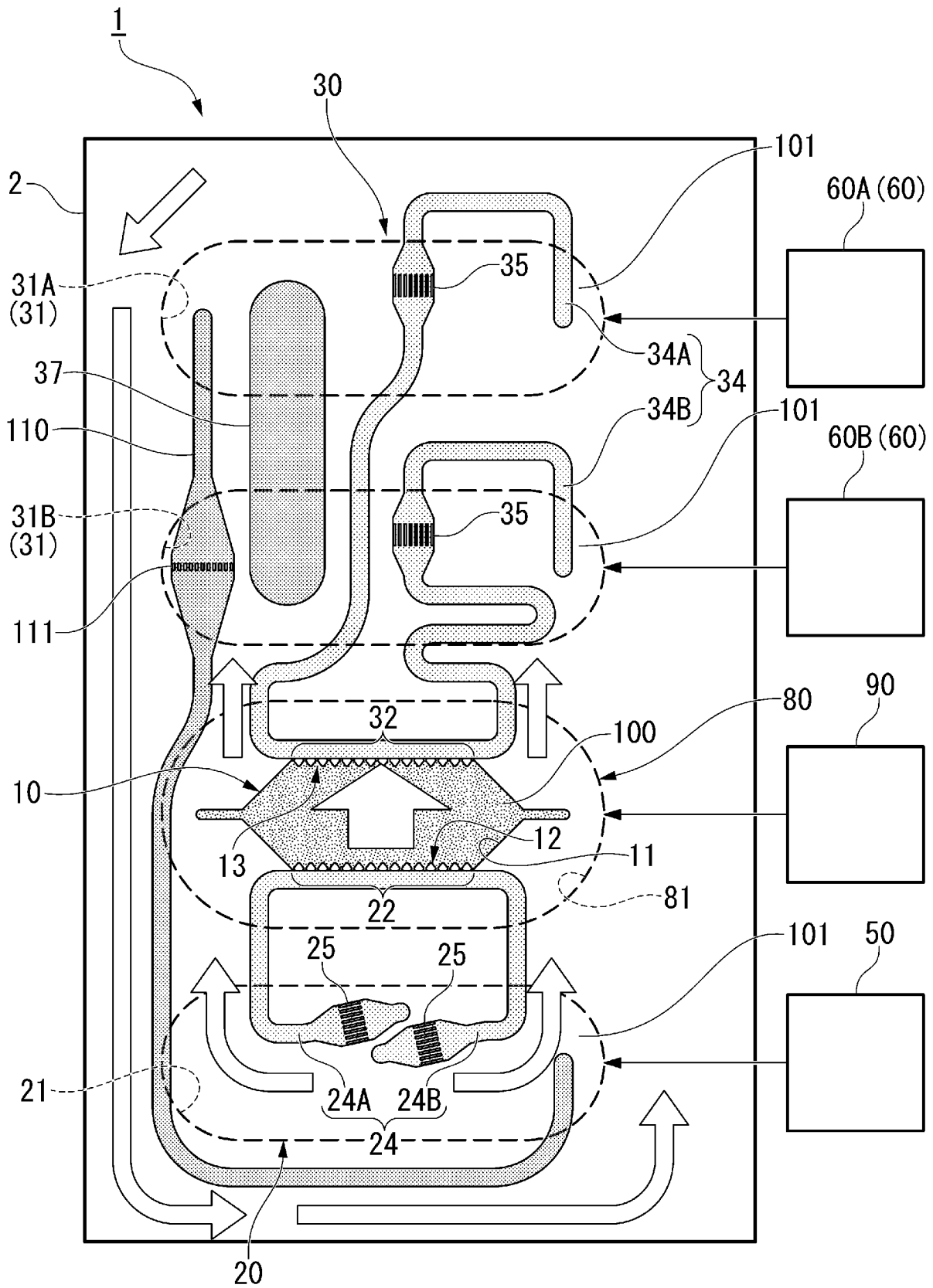
抵抗流路あり



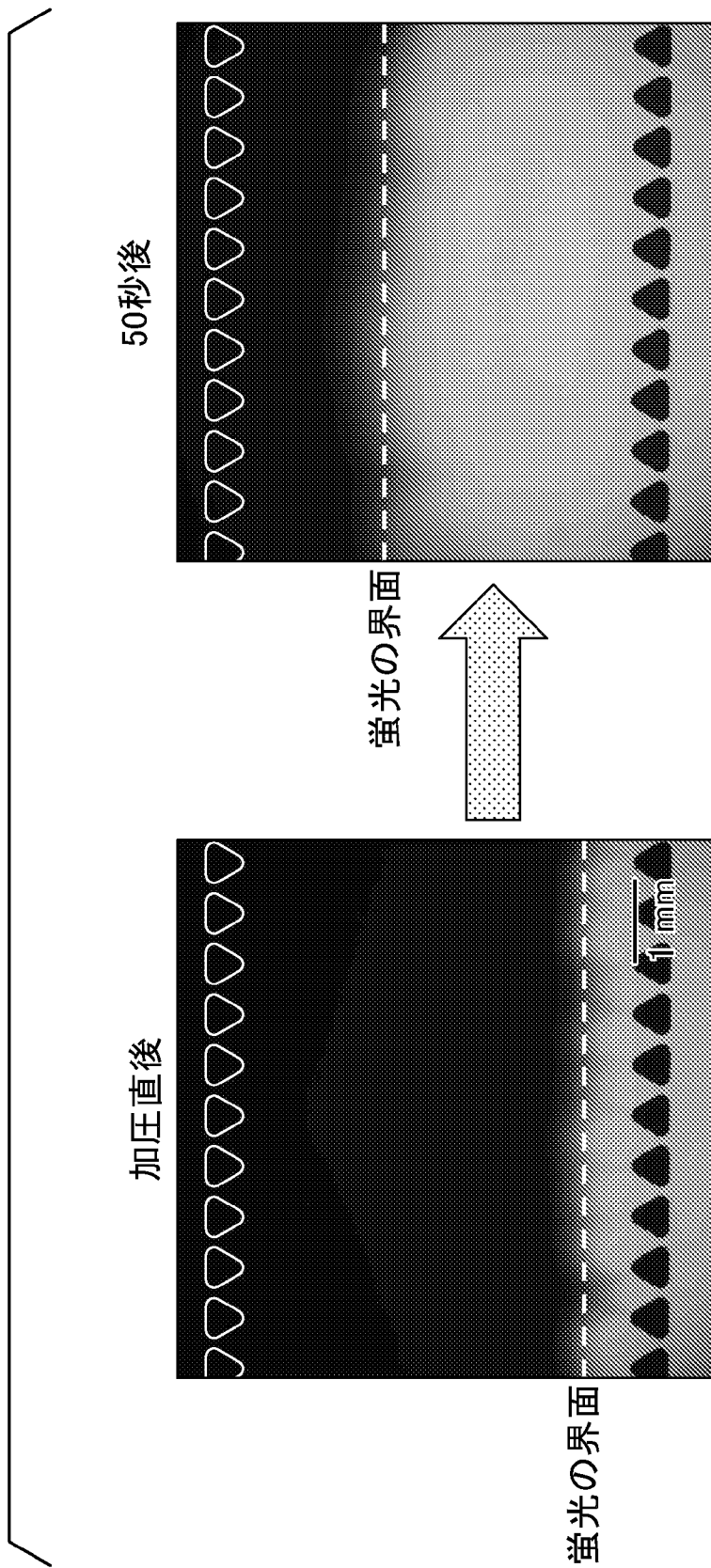
[図26]



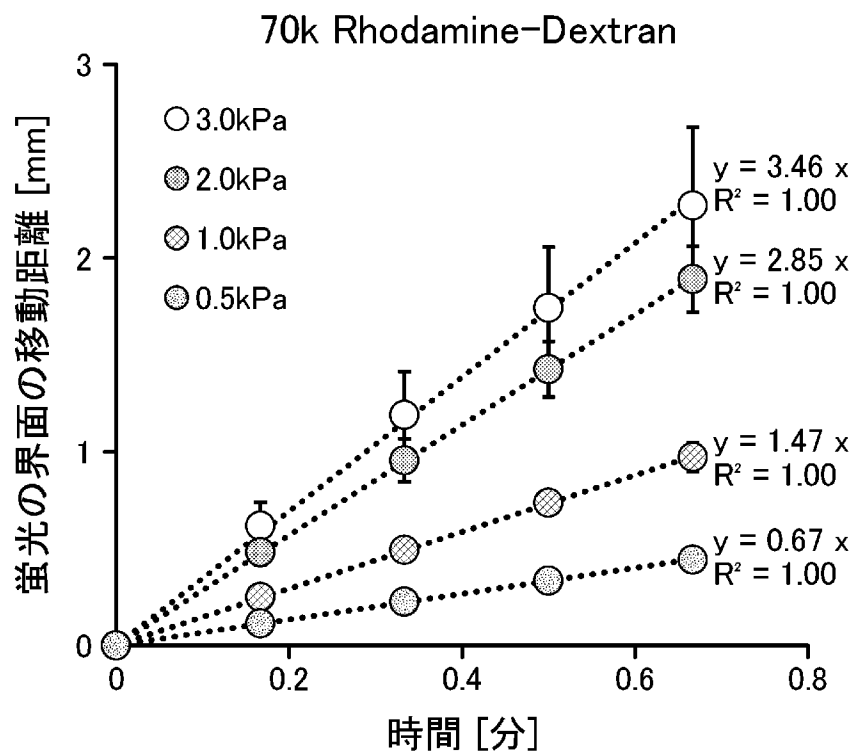
[図27]



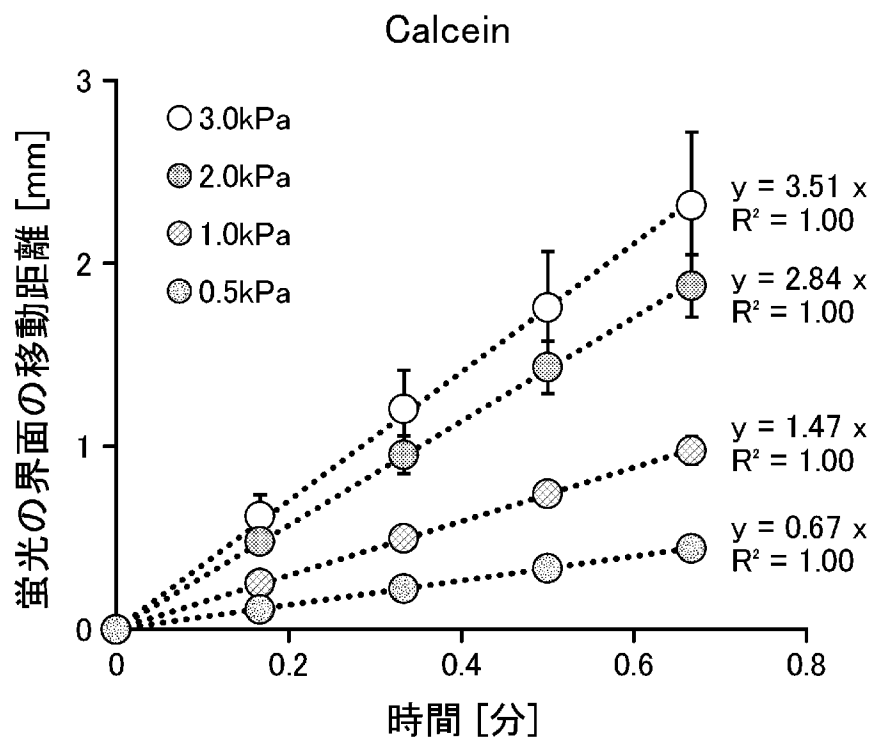
[図28]



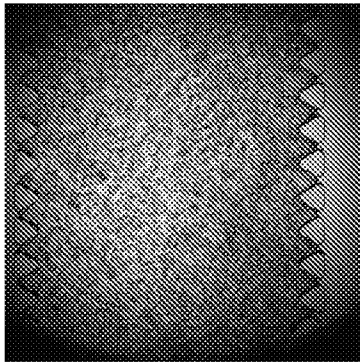
[図29]



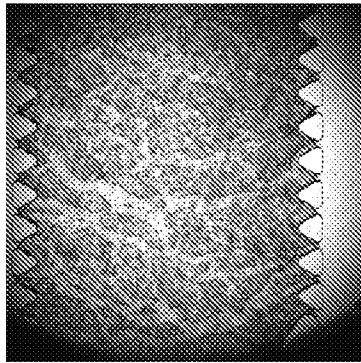
[図30]



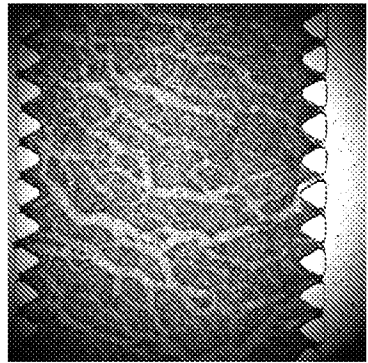
[図31]



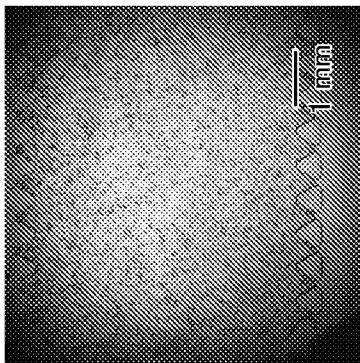
間葉系幹細胞あり  
4日目



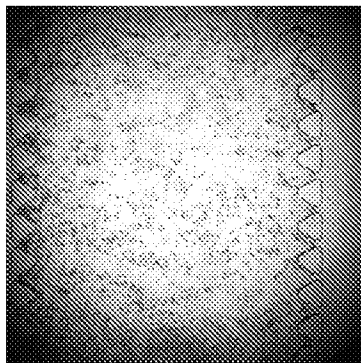
間葉系幹細胞あり  
6日目



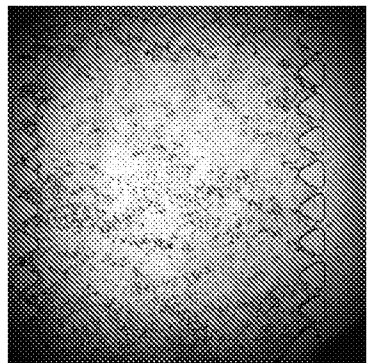
間葉系幹細胞あり  
8日目



間葉系幹細胞なし  
4日目

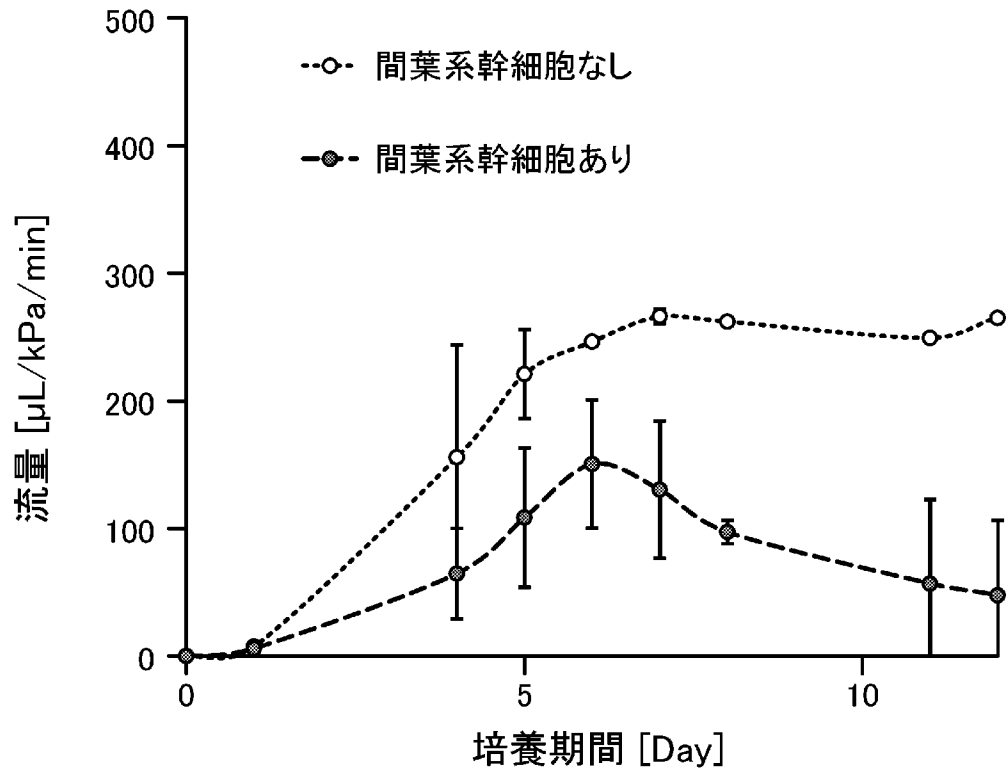


間葉系幹細胞なし  
6日目

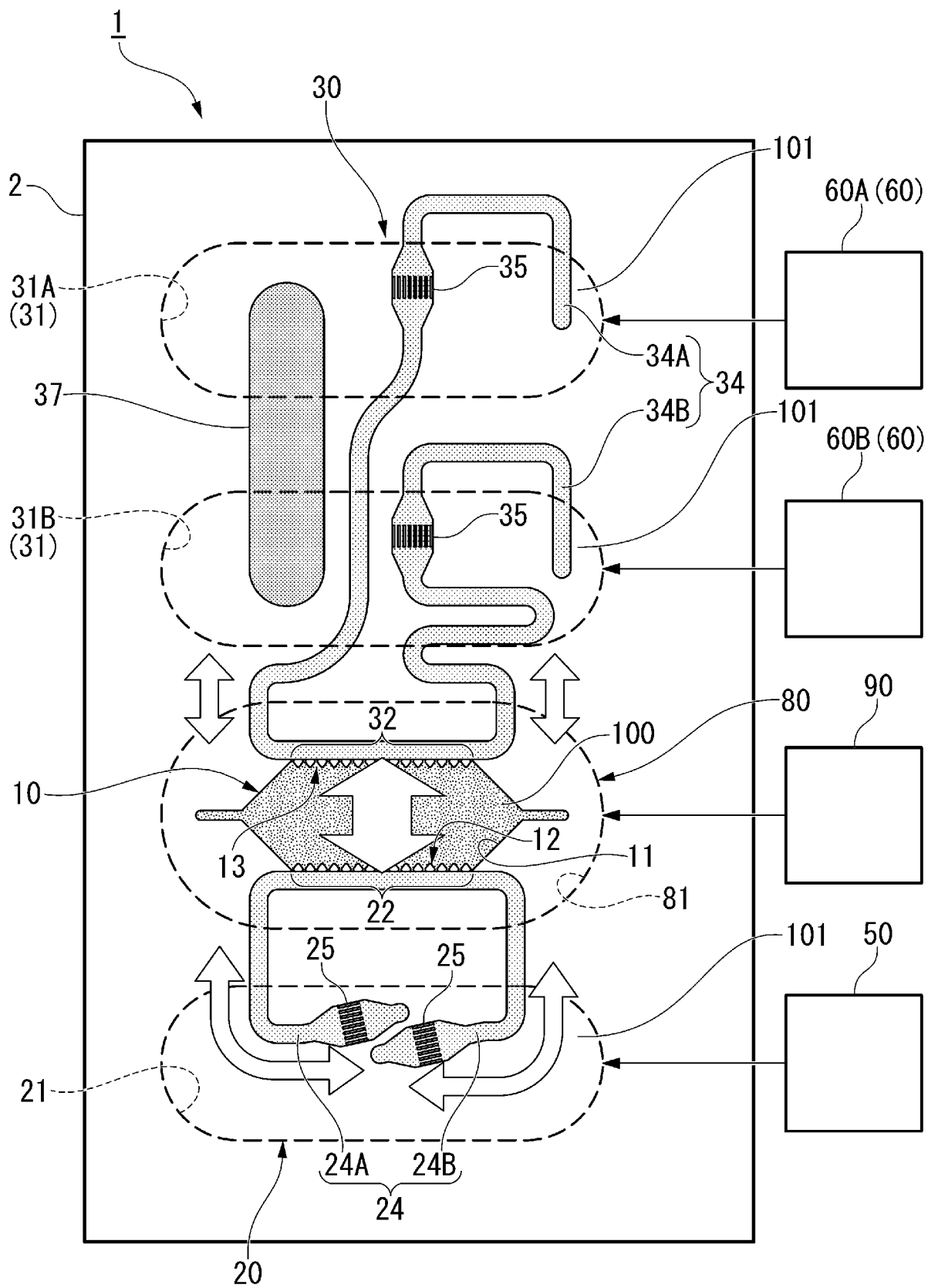


間葉系幹細胞なし  
8日目

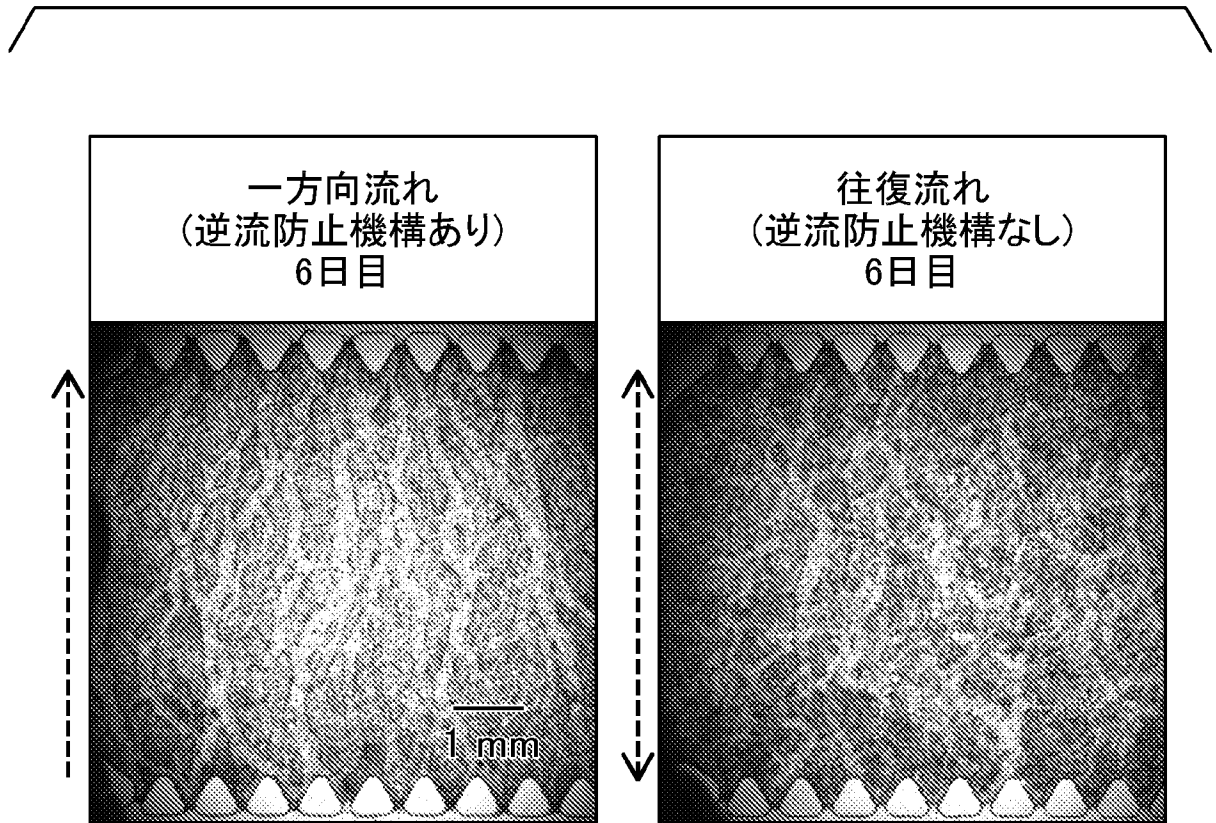
[図32]



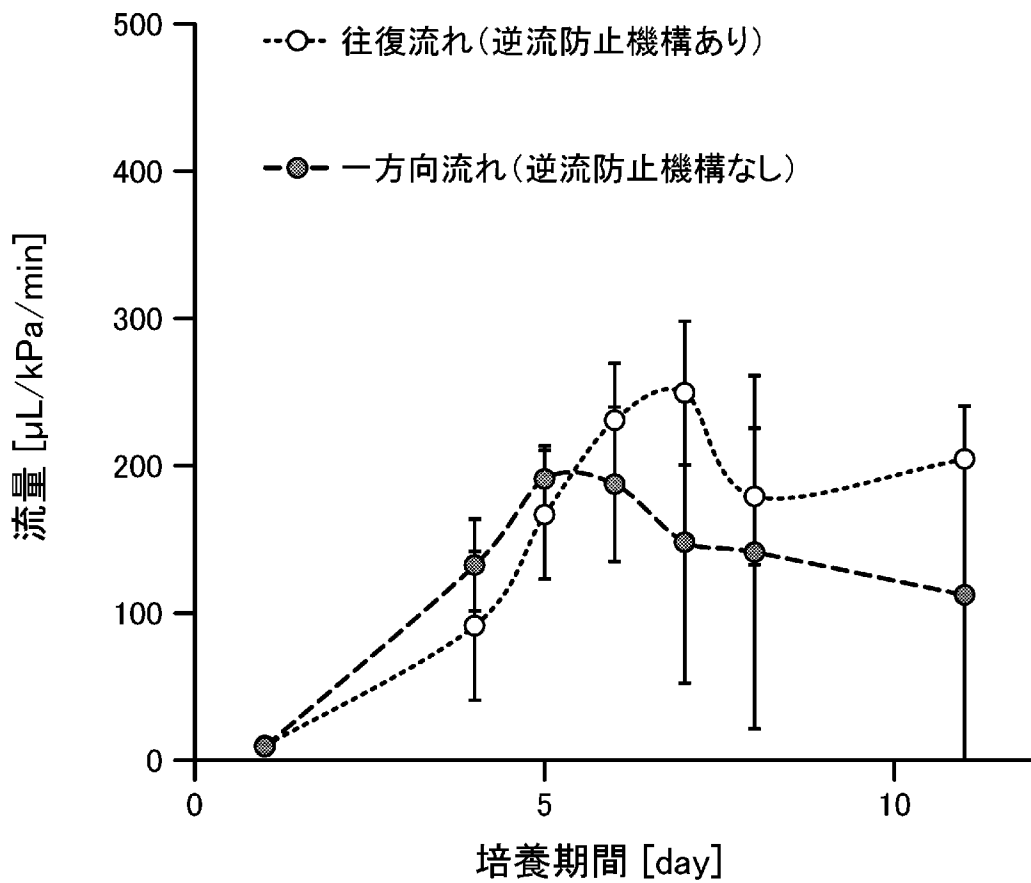
[図33]



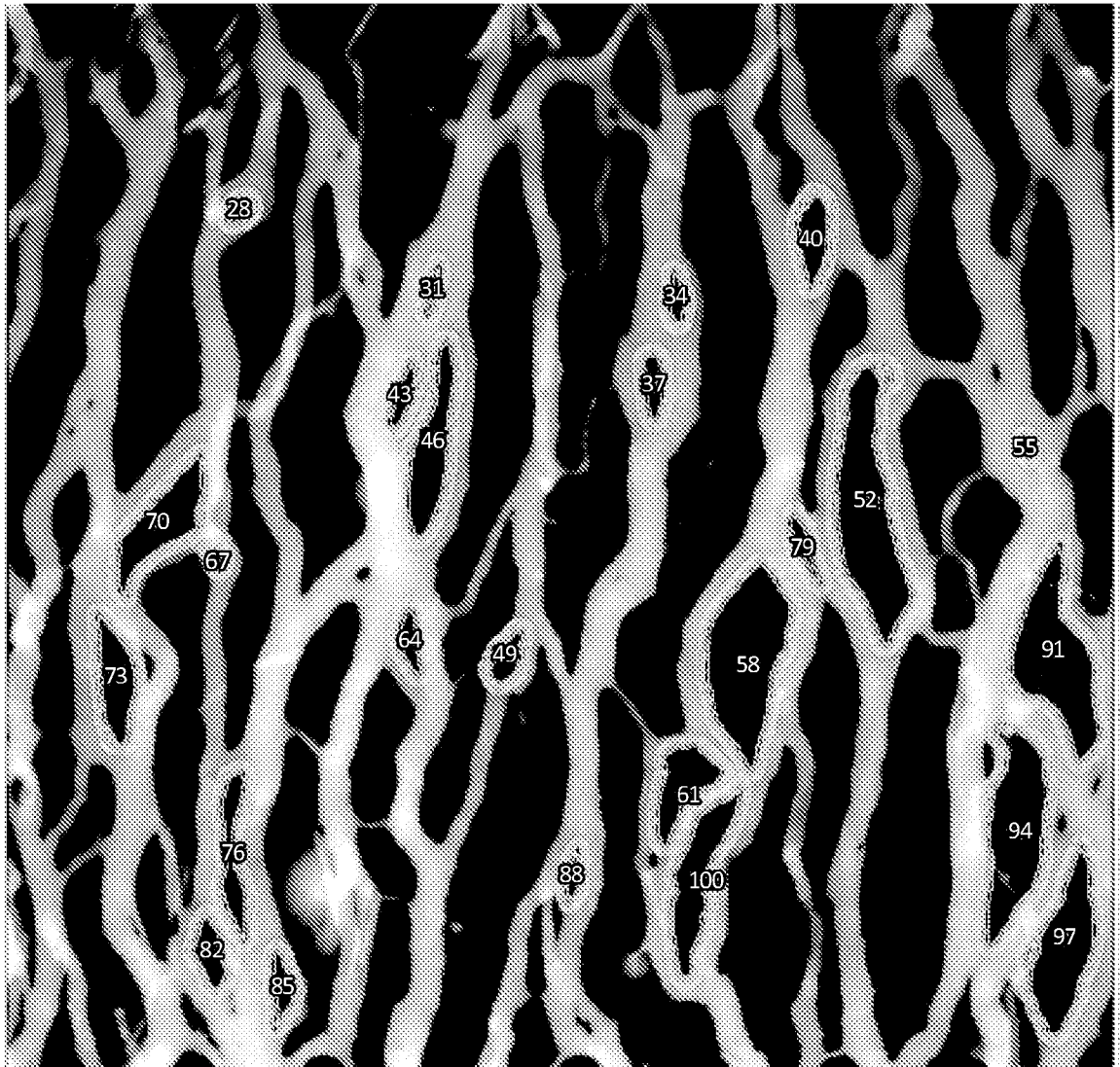
[図34]



[図35]

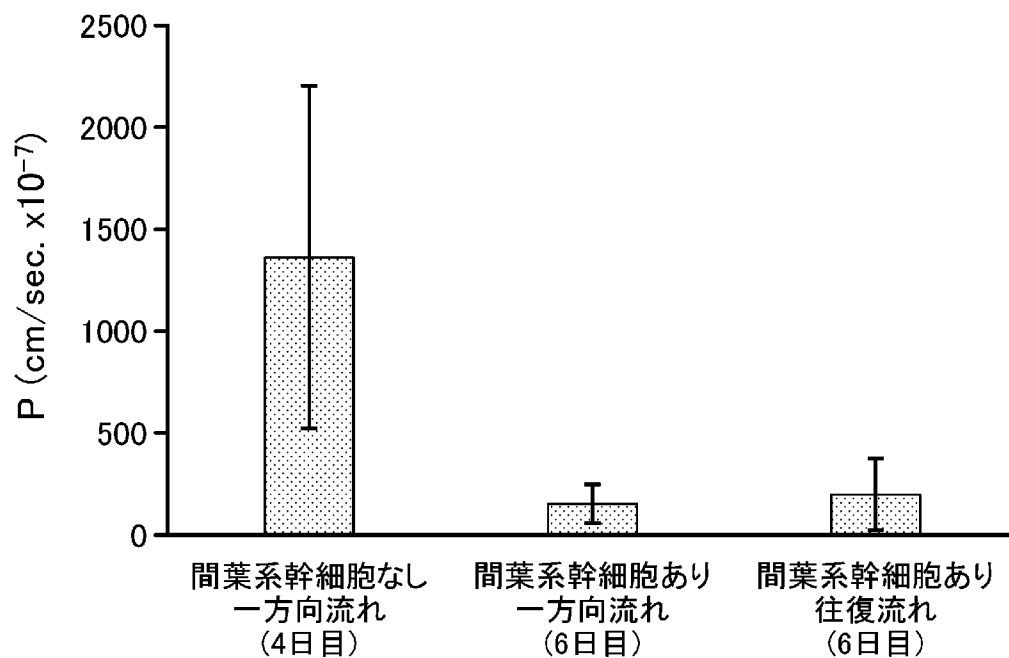


[図36]



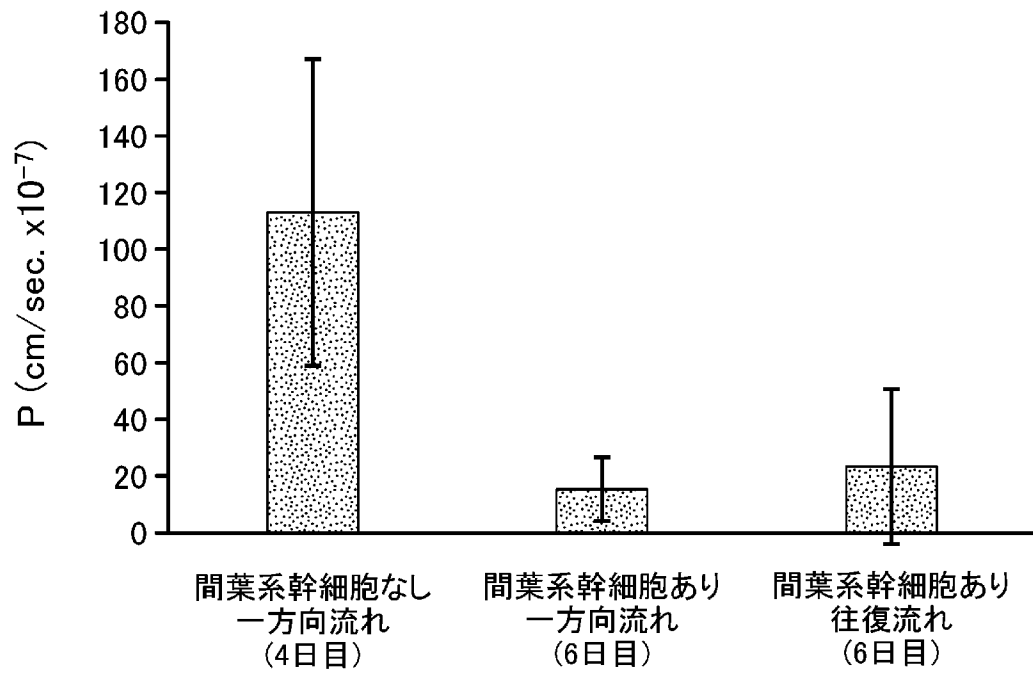
[図37]

## Calceinの透過係数

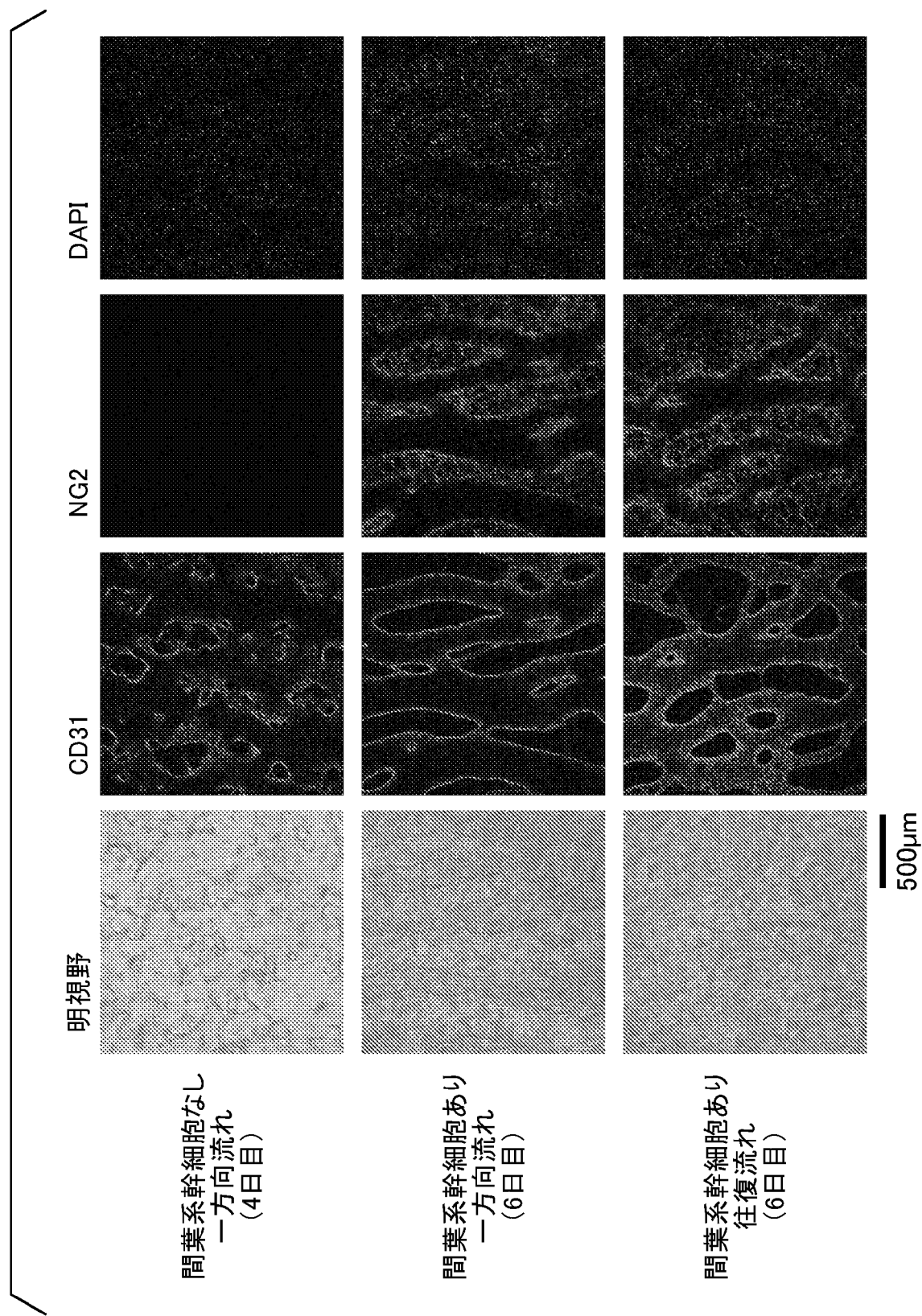


[図38]

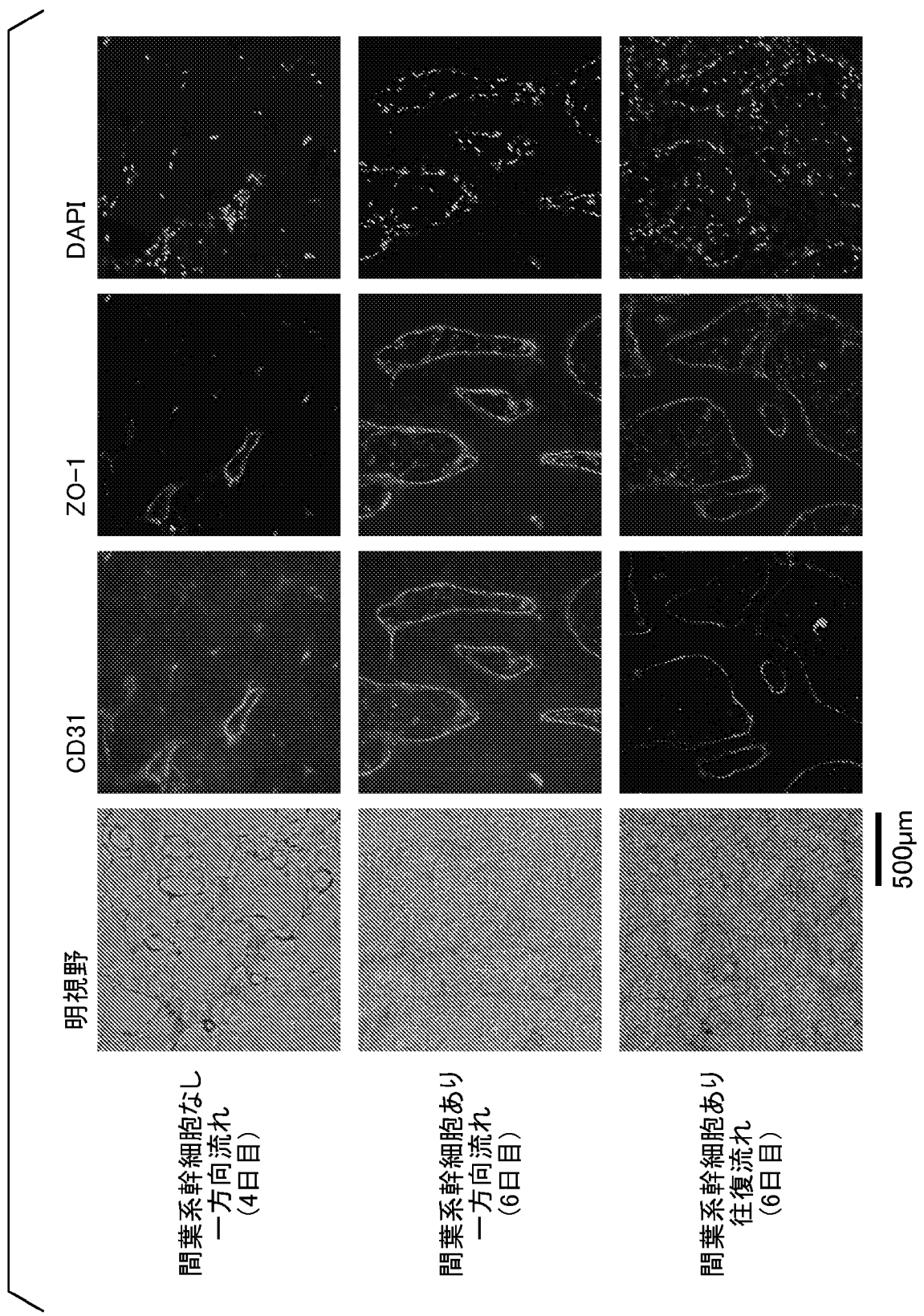
## Rhodamine dextranの透過係数



[図39]



[図40]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/025128

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i FI: C12M1/00 A; C12M3/00 Z; C12N5/071		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M3/00; C12N5/071; C12M1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	杉浦慎治, 圧力駆動型 Microphysiological systems の開発, 生物工学会誌, 2020, vol. 98, no. 3, pp. 123-129 Pressure-driven circulation culture device, fig. 1, (SUGIURA, Shinji. Development of Pressure Driven Microphysiological Systems. Biotechnology.)	1-15
Y	SATO, T. et al. A pneumatic pressure-driven multi-throughput microfluidic circulation culture system. Lab on a Chip. 2016, vol. 16, pp. 2339-2348 abstract, fig. 2, 3, discussion	1-15
Y	WO 2015/129673 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 03 September 2015 (2015-09-03) claims, paragraphs [0008]-[0020], [0024]-[0030], examples 1, 2	1-15
Y	WO 2016/159380 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 October 2016 (2016-10-06) claims, paragraphs [0003], [0026], [0035], [0039], examples 1-8, paragraph [0066]	1-15
Y	WO 2019/142614 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 25 July 2019 (2019-07-25) claims, paragraphs [0028]-[0041], [0070]-[0089], [0093]-[0094], examples 1-6	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>08 August 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 September 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/025128

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-113118 A (NIPPON MENA ADE KESH OHIN KK) 26 June 2014 (2014-06-26) claims, paragraphs [0013]-[0014], examples 1, 2, paragraph [0047], fig. 1	1-15
Y	JP 2017-055734 A (NAT UNIV YOKOHAMA) 23 March 2017 (2017-03-23) claims, paragraphs [0026]-[0033], examples	1-15
A	JP 2005-168436 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 30 June 2005 (2005-06-30) claims, paragraph [0017], example 1, fig. 1-5	1-15
A	WO 2019/054287 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 March 2019 (2019-03-21) claims, paragraphs [0010], examples 1-6	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/025128**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2015/129673	A1	03 September 2015	US 2016/0369218 A1 claims, paragraphs [0009]- [0032], [0056]-[0062], examples 1, 2 EP 3112450 A1	
WO	2016/159380	A1	06 October 2016	US 2018/0086883 A1 claims, paragraphs [0008]- [0009], [0056]-[0057], [0077]- [0084], [0139]-[0142], examples 1-8, paragraphs [0214]-[0216]	
WO	2019/142614	A1	25 July 2019	(Family: none)	
JP	2014-113118	A	26 June 2014	(Family: none)	
JP	2017-055734	A	23 March 2017	(Family: none)	
JP	2005-168436	A	30 June 2005	US 2005/0042745 A1 claims paragraph [0087], example 1, fig. 1-8	
WO	2019/054287	A1	21 March 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12M 1/00(2006.01)i FI: C12M1/00 A; C12M3/00 Z; C12N5/071		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M3/00; C12N5/071; C12M1/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	杉浦慎治, 圧力駆動型 Microphysiological systems の開発, 生物工学会誌, 2020, 第98巻, 第3号, 123~129頁 圧力駆動型の循環培養デバイス, 図1	1-15
Y	SATO T. et al., A pneumatic pressure-driven multi-throughput microfluidic circulation culture system, Lab on a Chip, 2016, Vol.16, p.2339-2348 Abstract, Fig.2, 3, Discussion	1-15
Y	WO 2015/129673 A1 (国立大学法人京都大学) 03.09.2015 (2015-09-03) 特許請求の範囲、[0008]~[0020]、[0024]~[0030]、 実施例1, 2	1-15
Y	WO 2016/159380 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 06.10.2016 (2016-10-06) 特許請求の範囲、[0003]、[0026]、[0035]、[0039]、 実施例1~8、[0066]	1-15
Y	WO 2019/142614 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 25.07.2019 (2019-07-25) 特許請求の範囲、[0028]~[0041]、[0070]~[0089]、 [0093]~[0094]、実験例1~6	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
08.08.2023	05.09.2023	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  上條 のぶよ 4N 9454  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-113118 A (日本メナード化粧品株式会社) 26.06.2014 (2014 - 06 - 26) 特許請求の範囲、 [0013] ~ [0014]、実施例1, 2、 [0047]、 図1	1 - 15
Y	JP 2017-055734 A (国立大学法人横浜国立大学) 23.03.2017 (2017 - 03 - 23) 特許請求の範囲、 [0026] ~ [0033]、実施例	1 - 15
A	JP 2005-168436 A (富士写真フイルム株式会社) 30.06.2005 (2005 - 06 - 30) 特許請求の範囲、 [0017]、実施例1、図1 ~ 5	1 - 15
A	WO 2019/054287 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 21.03.2019 (2019 - 03 - 21) 特許請求の範囲、 [0010]、実験例1 ~ 6	1 - 15

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/025128

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2015/129673	A1	03.09.2015	US 2016/0369218 A1 CLAIMS, [0009]-[0032], [0056]-[0062], EXAMPLES 1,2 EP 3112450 A1	
WO	2016/159380	A1	06.10.2016	US 2018/0086883 A1 CLAIMS, [0008]-[0009], [0056]-[0057], [0077]- [0084], [0139]-[0142], EXAMPLES 1-8, [0214]- [0216]	
WO	2019/142614	A1	25.07.2019	(ファミリーなし)	
JP	2014-113118	A	26.06.2014	(ファミリーなし)	
JP	2017-055734	A	23.03.2017	(ファミリーなし)	
JP	2005-168436	A	30.06.2005	US 2005/0042745 A1 CLAIMS, [0087], EXAMPLE 1, Fig.1-8	
WO	2019/054287	A1	21.03.2019	(ファミリーなし)	