(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2022-79964
(P2022-79964A)
(43)公開日　令和4年5月27日(2022.5.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12M	*1/00 (2006.01)*	C12M	1/00	C	4B029
C12M	*3/00 (2006.01)*	C12M	3/00	A	4B065
C12N	*5/071(2010.01)*	C12M	3/00	Z	
		C12N	5/071		

審査請求　未請求　請求項の数　14　ＯＬ　（全21頁）

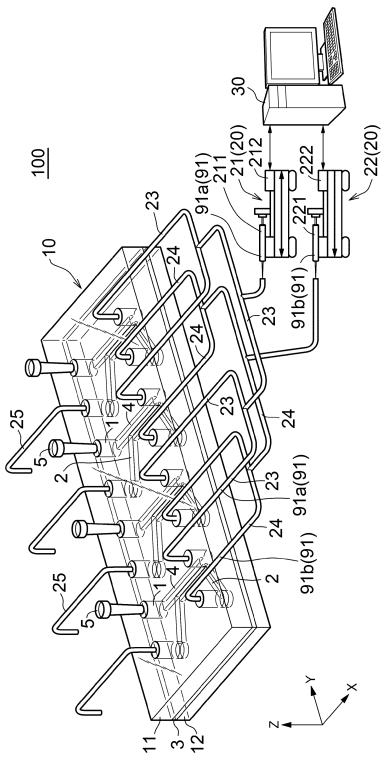
(21)出願番号　特願2020-190869(P2020-190869)
(22)出願日　令和2年11月17日(2020.11.17)
特許法第３０条第２項適用申請有り　（その１）ウェブサイトの掲載日 令和１年１２月２９日 （投稿日：令和１年１２月２３日） ウェブサイトのアドレス ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｒｘｉｖ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／１０．１１０１／２０１９．１２．２３．８８６２４２ｖ１ （ｄｏｉ： ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／２０１９．１２．２３．８８６２４２） （その２）ウェブサイトの掲載日 令和２年３月１１日 ウェブサイトのアドレス ｈｔｔｐｓ：／／ｐｕｂｓ．ｒｓｃ．ｏｒｇ／ｅｎ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ａｒｔｉｃｌｅｌａｎｄｉｎｇ／２０２０／ｌｃ／ｃ９ｌｃ０１２５６ｇ（ｄｏｉ： ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３９／Ｃ９ＬＣ０１２５６Ｇ） （その３）
最終頁に続く

(71)出願人　504132272
国立大学法人京都大学
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　亀井 謙一郎
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
国立大学法人京都大学内
(72)発明者　ルデイアデイーブ アブドアルカーデイル
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
国立大学法人京都大学内

Ｆターム（参考）　4B029　AA02 BB11 CC02 CC11 DA10 DF10 DG06 DG10 GA02 GB10
4B065　AA93X BC18 BC22 CA44
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　マイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法

(57)【要約】
【課題】細胞に作用する剪断応力を再現するマイクロ流体デバイスを提供する。
【解決手段】マイクロ流体デバイス１０は、流体９１が流される第１の流路１と、流体９１が流される第２の流路２と、第１の流路１と第２の流路２との間に設けられ、表面に細胞が載置される透過膜３と、を備え、第１の流路１を流れる流体９１の流束の加速度と、第２の流路２を流れる流体９１の流束の加速度とを変化させることが可能である。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
流体が流される第１の流路と、
流体が流される第２の流路と、
前記第１の流路と前記第２の流路との間に設けられ、表面に細胞が載置される透過膜と、
を備え、
前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能である、マイクロ流体デバイス。
【請求項２】
前記第１の流路および前記第２の流路のうち、
一方の流路では、前記流体のフローの方向を変化させることが可能であり、
他方の流路では、前記流体のフローの方向が一定である、請求項１に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項３】
前記細胞は、前記透過膜において前記一方の流路側の表面に載置され、
前記一方の流路としての前記第１の流路では、前記流体のフローの方向が双方向に変化し、
前記他方の流路としての前記第２の流路では、前記流体のフローの方向が一定である、請求項２に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項４】
前記一方の流路内に、前記細胞が載置されている、請求項３に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項５】
前記一方の流路は、ストレートな形状を有している、請求項２から４のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項６】
前記一方の流路は、前記透過膜の上側に配置されている、請求項２から５のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項７】
前記流体は前記細胞の培養液を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項８】
前記一方の流路の終端には、リザーバタンクが接続されている、請求項２から７のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項９】
前記第１の流路が設けられる第１の透明基板と、
前記第２の流路が設けられ、前記第１の透明基板に対向して配置される第２の透明基板と、
をさらに備え、
前記透過膜は、前記第１の透明基板および前記第２の透明基板の間に配置される、請求項１から８のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項１０】
前記第１の流路には第１の流体が流注され、前記第２の流路には第２の流体が流注される、請求項１から９のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項１１】
前記細胞は極性を有する細胞である、請求項１から１０のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
【請求項１２】
請求項１から１１のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイスと、
前記第１の流路および前記第２の流路のそれぞれに前記流体を流注する流注手段と、

前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能なように、前記流注手段による前記流体の流注動作を制御する制御手段とを、
備える、細胞培養システム。
【請求項１３】
流体が流される第１の流路および第２の流路と、前記第１の流路と前記第２の流路との間に設けられ、表面に細胞が載置される透過膜と、を備えるマイクロ流体デバイスと流注手段とを用いて、細胞を培養する方法であって、
前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能なように、前記流体の流注動作を実行するステップ、
を含む、細胞培養方法。
【請求項１４】
前記流注動作を実行するステップは、
前記第１の流路および前記第２の流路のうち、一方の流路について、前記流体のフローの方向を変化させることが可能であり、他方の流路について、前記流体のフローの方向が一定である流注動作を実行する、請求項１３に記載の細胞培養方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞の培養に用いるマイクロ流体デバイスに関し、より詳細には、マイクロ流体デバイスを備える細胞培養システムおよびマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年における生体機能チップ（organ-on-a-chip）技術は、例えば腸、肝臓および肺等の様々な臓器の反復発生（recapitulation）を解明するための魅力的なソリューションになっている。細胞や組織は、マイクロ流体チャネルを備えるマイクロ流体デバイスを用いて培養し成長させることができ、このようなマイクロ流体デバイスは、インビトロ（in vitro）での臓器のメカノバイオロジーを研究するために使用されている。例えば下記特許文献１には、体組織およびそれらの機能を模倣するための、マイクロ流体チャネルを備える組織培養装置が開示されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】特表２０１７－５１３４８３号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
ヒトの角膜は、眼の最も外側に位置する屈折層であり、上皮細胞の層で構成されている。常々、角膜上皮は、眼の薬物透過性および毒性の研究にとっての主要な障壁となっている。眼に対するこれら薬物透過性および毒性の研究は、角膜の株化細胞（established cell lines）を二次元培養することによりインビトロで、または特にウサギを使用してインビボ（in vivo）で行われる。
【０００５】
しかしながら、インビトロモデルには、バリアの生物学的機能の評価に影響を与え得る角膜の三次元構造が無い。そのうえ、インビトロモデルは、まばたきをする際の、インビボでの動的な条件とは異なる静的な条件下において実行される。まばたきによる動的なダイナミクスには、次に示す２つの重要な側面がある。
【０００６】

１つ目の側面は、薬物の毒性および分布に関連している。この場合、ウサギの眼球モデルは、先の臨床試験の結果に対する解釈を誤解させる可能性がある。その理由は、ウサギのまばたき率（１時間あたり約１０～１２回）はヒトのまばたき率（１時間あたり約１０００回）と比較して低いため、薬物と眼球表面との相互作用が高くなり、その結果、薬物透過率が高くなるためである。

【０００７】

２つ目の側面は、まばたきをする際に生じる剪断応力による動的な刺激下での、角膜表面の恒常性（homeostasis）および機能性に関連している。剪断応力による作用の適切な調査を行うためには、ヒトの角膜に構造的に関連するプラットフォームとしてのマイクロ流体チャネル、すなわち、眼の涙液を保持する頂端側（apical side）と、房水に相互接続する基部側（proximal side）とを含むマイクロ流体チャネルが必要となる。したがって、理想的なマイクロ流体チャネルは、まばたき中に発生する、眼球表面における流体の動的なフローによる剪断応力を再現する能力を備えている必要があり、マイクロ流体デバイスにおいて、培養の対象とする細胞に剪断応力を再現することが求められている。

【０００８】

本発明は、細胞に作用する剪断応力を再現するマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

上記目的を達成するための本発明は、例えば以下に示す態様を含む。

（項１）

流体が流される第１の流路と、

流体が流される第２の流路と、

前記第１の流路と前記第２の流路との間に設けられ、表面に細胞が載置される透過膜と、を備え、

前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能である、マイクロ流体デバイス。

（項２）

前記第１の流路および前記第２の流路のうち、

一方の流路では、前記流体のフローの方向を変化させることが可能であり、

他方の流路では、前記流体のフローの方向が一定である、項１に記載のマイクロ流体デバイス。

（項３）

前記細胞は、前記透過膜において前記一方の流路側の表面に載置され、

前記一方の流路としての前記第１の流路では、前記流体のフローの方向が双方向に変化し、

前記他方の流路としての前記第２の流路では、前記流体のフローの方向が一定である、項２に記載のマイクロ流体デバイス。

（項４）

前記一方の流路内に、前記細胞が載置されている、項３に記載のマイクロ流体デバイス。

（項５）

前記一方の流路は、ストレートな形状を有している、項２から４のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

（項６）

前記一方の流路は、前記透過膜の上側に配置されている、項２から５のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

（項７）

前記流体は前記細胞の培養液を含む、項１から６のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

（項８）

前記一方の流路の終端には、リザーバタンクが接続されている、項２から７のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
（項９）
前記第１の流路が設けられる第１の透明基板と、
前記第２の流路が設けられ、前記第１の透明基板に対向して配置される第２の透明基板と、
をさらに備え、
前記透過膜は、前記第１の透明基板および前記第２の透明基板の間に配置される、項１から８のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
（項１０）
前記第１の流路には第１の流体が流注され、前記第２の流路には第２の流体が流注される、項１から９のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
（項１１）
前記細胞は極性を有する細胞である、項１から１０のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。
（項１２）
項１から１１のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイスと、
前記第１の流路および前記第２の流路のそれぞれに前記流体を流注する流注手段と、
前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能なように、前記流注手段による前記流体の流注動作を制御する制御手段とを、
備える、細胞培養システム。
（項１３）
流体が流される第１の流路および第２の流路と、前記第１の流路と前記第２の流路との間に設けられ、表面に細胞が載置される透過膜と、を備えるマイクロ流体デバイスと流注手段とを用いて、細胞を培養する方法であって、
前記第１の流路を流れる前記流体の流束の加速度と、前記第２の流路を流れる前記流体の流束の加速度とを変化させることが可能なように、前記流体の流注動作を実行するステップ、
を含む、細胞培養方法。
（項１４）
前記流注動作を実行するステップは、
前記第１の流路および前記第２の流路のうち、一方の流路について、前記流体のフローの方向を変化させることが可能であり、他方の流路について、前記流体のフローの方向が一定である流注動作を実行する、項１３に記載の細胞培養方法。
【発明の効果】
【００１０】
本発明によると、細胞に作用する剪断応力を再現するマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】本発明の一実施形態に係る細胞培養システム１００の模式的な構成を示す図である。
【図２】ヒトの眼球における角膜の構造を模式的に示す図であり、ヒトのまばたきによるダイナミクスにより角膜上皮細胞に剪断応力が作用することを説明するための図である。
【図３】図１に示すマイクロ流体デバイス１０の斜視図である。
【図４】図１に示すマイクロ流体デバイス１０の分解斜視図である。
【図５】図１に示すマイクロ流体デバイス１０の上面図である。
【図６】図１に示すマイクロ流体デバイス１０の断面図である。（Ａ）は図５に示すＡ－Ａ線に沿った断面図であり、（Ｂ）は図５に示すＢ－Ｂ線に沿った断面図であり、（Ｃ）

は図５に示すＣ－Ｃ線に沿った断面図である。
【図７】実施例に係るマイクロ流体デバイスを用いて培養した角膜上皮バリアの特性を示す図である。
【図８】実施例に係るマイクロ流体デバイスを用いて培養した角膜上皮バリアの特性を示す図である。
【図９】実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激が細胞の接着性に及ぼす影響を説明するための図である。
【図１０】実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激が細胞の機能および形態に及ぼす影響を説明するための図である。
【図１１】実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激が細胞の機能および形態に及ぼす影響を説明するための図である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
以下、本発明の実施形態を、添付の図面を参照して詳細に説明する。なお、以下の説明および図面において、同じ符号は同じまたは類似の構成要素を示すこととし、よって、同じまたは類似の構成要素に関する重複した説明を省略する。
［発明の概略］
【００１３】
図１は、本発明の一実施形態に係る細胞培養システム１００の模式的な構成を示す図である。
【００１４】
本発明では、第１の流路１と第２の流路２と透過膜３とが構成するマイクロ流体チャネル４内に、培養の対象とする細胞９０を載置し、第１の流路１を流れる培養液９１の流束の加速度と、第２の流路２を流れる培養液９１の流束の加速度とを変化させることが可能な、培養液９１の送液動作を実行する。これにより、培養の対象とする細胞９０に剪断応力が再現される。このような培養液９１の送液動作は、第１の流路１を流れる培養液９１の流速と第２の流路２を流れる培養液９１の流速とが異なるような、培養液９１の送液動作、と表現することもできる。
【００１５】
より具体的には、以下においてより詳細に説明するように、本実施形態では、透過膜３の上側に配置されている第１の流路１について、第１の培養液９１ａのフローの方向を変化させることが可能な送液動作を実行し、透過膜３の下側に配置されている第２の流路２について、第２の培養液９１ｂのフローの方向を変化させることが可能ではない送液動作を実行する。これにより、第１の流路１を流れる第１の培養液９１ａの流束の加速度と、第２の流路２を流れる第２の培養液９１ｂの流束の加速度とを変化させる。これにより、培養の対象とする細胞９０に剪断応力が再現される。
【００１６】
なお、以下に例示する本発明の一実施形態においては、培養液９１のフローの方向を変化させることが可能な送液動作として、双方向フロー（Bi-directional flow）の送液動作を例示し、培養液９１のフローの方向を変化させることが可能ではない送液動作として、単方向フロー（Unidirectional flow）の送液動作を例示する。また、培養液９１のフローの方向を変化させることが可能ではない送液動作とは、培養液のフローの方向が一定である送液動作を含むことができる。
【００１７】
図２は、ヒトの眼球における角膜の構造を模式的に示す図であり、ヒトのまばたきによるダイナミクスにより角膜上皮細胞に剪断応力が作用することを説明するための図である。（Ａ）は眼球における角膜の位置を示す。（Ｂ）は瞼が開いている状態を示し、（Ｃ）は瞼が閉じている状態を示す。
【００１８】
角膜８１は、眼球８２の正面に見える「黒目」の領域に存在する。角膜８１の構造は、眼

の涙液を保持する頂端側（apical side）から、房水に相互接続する基部側（proximal side）に向けて順番に、表面から、角膜上皮８３、角膜実質８４および角膜内皮（図示せず）に分かれる。角膜上皮８３は外気に曝されており、角膜８１を外界から保護するバリアとしての機能と、角膜８１へ酸素を取り込む機能とを有している。角膜上皮８３の表面には、涙腺から分泌される涙液により涙液の膜８５が形成されている。ヒトがまばたきをして瞼８６が開閉する度に、（Ｂ）および（Ｃ）に示すように涙液の膜８５が双方向に流れ、これにより、涙液の膜８５の下方に位置する角膜上皮８３に剪断応力が作用する。このように、ヒトがまばたきをして瞼８６が開閉する度に、涙液の膜８５が双方向に流れることによる流体の動的な刺激として、角膜上皮８３に剪断応力が作用する。

【００１９】

図１を参照する。本発明では、第１の流路１を流れる第１の培養液９１ａの流束の加速度と、第２の流路２を流れる第２の培養液９１ｂの流束の加速度とを変化させることが可能な、第１の培養液９１ａおよび第２の培養液９１ｂの送液動作を実行する。これにより、図２に示すような、ヒトがまばたきをする際に生じる、涙液の膜８５による動的な剪断応力を再現する。

【００２０】

本発明に係るマイクロ流体デバイス１０、細胞培養システム１００および細胞培養方法において、このような動的な剪断応力は、培養の対象とする細胞９０の一方表面における流束の加速度と他方表面における流束の加速度とを変化させると、細胞９０に作用する。言い替えると、このような動的な剪断応力は、培養の対象とする細胞９０の一方表面における流速と他方表面における流速とが異なっていると、細胞９０に作用する。本発明では、ヒトがまばたきをする際に生じる涙液の膜８５の双方向の流れは、第１の流路１について実行される第１の培養液９１ａの双方向フローとして実現される。このような第１の培養液９１ａの双方向フローにより、培養の対象とする角膜上皮細胞９０に剪断応力が作用し、これにより、バリア機能が保たれた角膜上皮細胞９０の培養が可能となる。

［細胞培養システム］

【００２１】

図１に示すように、本発明の一実施形態に係る細胞培養システム１００は、第１の流路１および第２の流路２と透過膜３とを備えるマイクロ流体デバイス１０と、送液手段２０と、制御手段３０とを備える。マイクロ流体デバイス１０は、第１の流路１を流れる培養液９１の流束の加速度と、第２の流路２を流れる培養液９１の流束の加速度とを変化させることが可能である。図６（Ａ）に例示するように、本発明において培養の対象とする細胞９０は、本実施形態では、第１の流路１を流れる培養液９１が接する透過膜３の表面に載置されている。本実施形態では、ヒトの眼の角膜上皮細胞９０を培養の対象とする。好ましくは、マイクロ流体デバイス１０は、図示しないインキュベータ内に配置され、約３７℃の温度に維持される。好ましくは、送液手段２０および制御手段３０は、インキュベータの外部に配置される。

【００２２】

本実施形態に係るマイクロ流体デバイス１０は、例えばステレオリソグラフィー３次元プリンティング技術と、溶液キャストモールディングプロセスとを用いることにより製造することができる。マイクロ流体デバイス１０は、このような技術以外にも、例えばＭＥＭＳ（Micro Electro Mechanical Systems）のような他の微細加工技術により製造することができる。

【００２３】

図３は、図１に示すマイクロ流体デバイス１０の斜視図であり、図４は、図１に示すマイクロ流体デバイス１０の分解斜視図である。図５は、図１に示すマイクロ流体デバイス１０の上面図である。図６は、図１に示すマイクロ流体デバイス１０の断面図である。（Ａ）は図５に示すＡ－Ａ線に沿った断面図であり、（Ｂ）は図５に示すＢ－Ｂ線に沿った断面図であり、（Ｃ）は図５に示すＣ－Ｃ線に沿った断面図である。

【００２４】

図３～図６を参照して、本実施形態に係るマイクロ流体デバイス１０について説明する。マイクロ流体デバイス１０は、第１の流路１が設けられる第１の透明基板１１と、第２の流路２が設けられる第２の透明基板１２とを備えており、第１の透明基板１１と第２の透明基板１２とは対向して配置される。このように構成されるマイクロ流体デバイス１０のチャネル長Ｌは、例示的には約１５．４ｍｍであり、チャネル径Ｗは、例示的には約１．５ｍｍである。

【００２５】

第１の流路１および第２の流路２には、細胞９０の培養液９１が流される。本実施形態では、第１の流路１は透過膜３の上側に配置されており、第２の流路２は透過膜３の下側に配置されている。第１の流路１には第１の培養液９１ａ（９１）が送液され、第２の流路２には第２の培養液９１ｂ（９１）が送液される。

【００２６】

第１の透明基板１１および第２の透明基板１２は、透明な材料で形成されており、本実施形態ではポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）で形成されている。第１の流路１および第２の流路２のそれぞれは、第１の透明基板１１および第２の透明基板１２のそれぞれに有底の溝として設けられている。例示的には、第１の透明基板１１の厚さは約４ｍｍであり、第２の透明基板１２の厚さは約０．５ｍｍである。

【００２７】

透過膜３は、第１の透明基板１１および第２の透明基板１２の間に配置される。本実施形態では、透過膜３は、第1の流路１を流れる培養液９１が第１の表面３ａに接し、第２の流路２を流れる培養液が第２の表面３ｂに接するように、第１の流路１および第２の流路２の間に設けられる。

【００２８】

透過膜３（または物質透過膜３）は、細胞９０が浸潤せず物質の拡散が可能（例えば、代謝物や薬物が透過可能）な膜または層である。例示的には、透過膜３には、多孔質構造を有する透明な材料を用いることができる。他の実施形態では、線状の多数の貫通穴で構成される透明な材料を透過膜３に用いることができる。本実施形態では、透過膜３は多孔質膜であり、透明なポリエチレンテレフタラート（ＰＥＴ）で形成されている。例示的には、透過膜３の厚さは約１０μｍであり、透過膜３が有する孔のサイズは約０．４μｍであり、孔の密度は約４×１０^{6}個／ｃｍ^{2}である。例示的には、透過膜３の開口率は約１％である。

【００２９】

好ましくは、マイクロ流体デバイス１０は、透過膜３を介して第１の流路１および第２の流路２が鉛直方向に対向するマイクロ流体デバイス１０の部分であるマイクロ流体チャネル４を複数備えることができる。図示する本実施形態では、マイクロ流体デバイス１０は４つのマイクロ流体チャネル４を備えている。マイクロ流体デバイス１０はマイクロ流体チャネル４を少なくとも一つ備えていればよい。他の実施形態では、マイクロ流体デバイス１０は、図示する４つ以上の、例えば８つのマイクロ流体チャネル４を備えることができる。

【００３０】

例示的には、図示するマイクロ流体チャネル４の長さＬ（透過膜３を介して第１の流路１および第２の流路２が鉛直方向に対向している部分の長さ）は約１５ｍｍである。マイクロ流体チャネル４の幅Ｗ（透過膜３を介して第１の流路１および第２の流路２が鉛直方向に対向している部分の幅）は約１．５ｍｍである。図示するマイクロ流体チャネル４の高さＨ（第１の流路１の厚さと第２の流路２の厚さと透過膜３の厚さとの合計）は約０．５ｍｍである。

【００３１】

図１を参照して、本実施形態に係る細胞培養システム１００が備える送液手段２０と制御手段３０とについて説明する。

【００３２】

送液手段２０は、第１の流路１および第２の流路２のそれぞれに培養液９１を送液する。本実施形態では、送液手段２０は、第１の流路１に第１の培養液９１ａを送液する第１の送液手段２１と、第２の流路２に第２の培養液９１ｂを送液する第２の送液手段２２と、を備える。第１の送液手段２１と第１の流路１との間は、中空のチューブ２３を介して第１の培養液９１ａが流体搬送可能に接続されている。第２の送液手段２２と第２の流路２との間は、中空のチューブ２４を介して第２の培養液９１ｂが流体搬送可能に接続されている。

【００３３】

例示的には、第１の送液手段２１には、市販のシリンジ２１１および市販のシリンジポンプ２１２の組み合わせを用いることができ、第２の送液手段２２には、市販のシリンジ２２１および市販のシリンジポンプ２２２の組み合わせを用いることができる。他の実施形態では、送液手段２０には、シリンジポンプに代えてペリスタルティックポンプ（peristaltic pump）を用いることもできる。

【００３４】

例示的には、培養液９１には、カルシウムを添加したハンクス平衡型バッファー（HBSS+: Hank’s Balanced Salt Solution）に、フルオレセインナトリウムおよびローダミンＢの蛍光色素を溶解した溶液を用いる。例示的には、第１の培養液９１ａには、培養液９１にローダミンＢ溶液を混合した溶液を用いることができ、第２の培養液９１ｂには、培養液９１にフルオレセインナトリウムを追加した溶液を用いることができる。これにより、例えば、流路１，２を蛍光顕微鏡で可視化することが可能になる。

【００３５】

本実施形態では、透過膜３の上側に配置されている第１の流路１は、ストレートな形状を有しており、チューブ２３の一端は、第１の流路１の一方端１ａに接続される。第１の流路１の他方端１ｂにはリザーバタンク５が接続されている。

【００３６】

本実施形態では、送液手段２１は、第１の流路１について、培養液９１のフローの方向を変化させることが可能な送液動作を実行、すなわち、培養液９１のフローの方向が時間とともに双方向に変化する双方向フローの送液動作を実行する。

【００３７】

双方向フローの送液動作は、例えば次のような手順により実行することができる。まずは、シリンジポンプ２１２がシリンジ２１１のプランジャを前進させることで、チューブ２３を介して第１の送液手段２１から送液される第１の培養液９１ａは、第１の流路１の一方端１ａから第１の流路１内を流れた後、第１の流路１の他方端１ｂに到達してリザーバタンク５に貯留する。その後、所定の時間が経過した後に引き続き、シリンジポンプ２１２がシリンジ２１１のプランジャを後退させることで、リザーバタンク５に貯留した第１の培養液９１ａは、第１の流路１の他方端１ｂから第１の流路１内を流れた後、第１の流路１の一方端１ａに到達して、チューブ２３を介して第１の送液手段２１に戻る。

【００３８】

本実施形態では、透過膜３の下側に配置されている第２の流路２は、マイクロ流体デバイス１０の上面視において両端２ａ，２ｂが折れ曲がった形状を有しており、第２の流路２の両端２ａ，２ｂは、マイクロ流体デバイス１０の上面視において第１の流路１の両端１ａ，１ｂから離れた位置に存在する。本実施形態では、チューブ２４の一端は、第１の透明基板１１を上方から貫通し、第２の透明基板１２内において、第１の流路１の一方端１ａからずれた位置に存在する第２の流路２の一方端２ａに接続される。これにより、チューブ２３やチューブ２４から培養液９１が漏れたときのクロスコンタミネーションをより確実に防ぐことが可能になる。第２の流路２の他方端２ｂには中空のドレインチューブ２５が接続されている。

【００３９】

なお、チューブ２４の一端は、第２の透明基板１２を側方から貫通し、第２の透明基板１２内において第２の流路２の一方端２ａに接続されてもよい。

【００４０】
本実施形態では、送液手段２２は、第２の流路２について、培養液９１のフローの方向を変化させることが可能ではない送液動作を実行、すなわち、培養液９１のフローの方向が時間とともに変化しない単方向フローの送液動作を実行する。
【００４１】
単方向フローの送液動作は、例えばシリンジポンプ２２２がシリンジ２２１のプランジャを前進させることにより実行することができる。シリンジポンプ２２２がシリンジ２２１のプランジャを前進させることで、チューブ２４を介して第２の送液手段２２から送液される第２の培養液９１ｂは、第２の流路２の一方端２ａから第２の流路２内を流れた後、第２の流路２の他方端２ｂに到達する。他方端２ｂに到達した第２の培養液９１ｂは、ドレインチューブ２５を介して排出される。なお、第２の流路２に継続的な第２の培養液９１ｂの流れを供給する図示していない別のポンプを設けておくことが望ましい。
【００４２】
或いは、単方向フローの送液動作は、例えばシリンジポンプ２２２がシリンジ２２１のプランジャを後退させることにより実行することもできる。この場合は、第２の流路２の他方端２ｂにおいて、ドレインチューブ２５に代えて、第１の流路１の他方端１ｂに接続したものと同様のリザーバタンクを接続する。シリンジポンプ２２２がシリンジ２２１のプランジャを後退させることで、リザーバタンクに貯留されている第２の培養液９１ｂは、第２の流路２の他方端２ｂから第２の流路２内を流れた後、第２の流路２の一方端２ａに到達する。なお、ドレインチューブ２５に代えて接続したリザーバタンクに第２の培養液９１ｂを継続的に供給するために、リザーバタンクには、第２の培養液９１ｂを供給する図示していない別のポンプを設けておくことが望ましい。
【００４３】
双方向フローの送液動作を、透過膜３の下側に配置されている第２の流路２についてではなく、透過膜３の上側に配置されている第１の流路１について実行することによる効果について説明する。本実施形態では、透過膜３の上側に配置されている第１の流路１について、第１の培養液９１ａのフローの方向が時間とともに双方向に変化する双方向フローの送液動作を実行する。これにより、図２を参照して説明したように、眼の涙液を保持する頂端側（apical side）において、涙液の膜８５が双方向に流れることによる流体の動的な刺激を再現することができ、涙液の膜８５の下方に位置する角膜上皮８３に作用する剪断応力を再現することができる。
【００４４】
また、本実施形態では、双方向フローの送液動作が実行されている第１の流路１内に、細胞９０が載置されている。これにより、培養の対象とする細胞９０を、双方向フローの送液動作が実行される培養液９１に直接的に曝すことができ、より効率的に剪断応力を細胞９０に作用させることができる。
【００４５】
また、本実施形態では、双方向フローの送液動作が実行されている第１の流路１はストレートな形状を有している。これにより、双方向フローの送液動作を実行する第１の流路１において、吸引フローと注入フローとを切り替える際に生じる乱流の発生を低減し、設定したとおりの流量で第１の培養液９１ａを送液することができる。
【００４６】
また、本実施形態では、双方向フローの送液動作が実行されている第１の流路１の終端にはリザーバタンク５が接続されている。これにより、双方向フローの送液動作が実行される第１の流路１の他方端１ｂにおいて、第１の培養液９１ａのオーバーフローを防止することができる。
【００４７】
制御手段３０は、第１の流路１を流れる培養液９１の流束の加速度と、第２の流路２を流れる培養液９１の流束の加速度とを変化させることが可能な、送液手段２０による培養液９１の送液動作を制御する。制御手段３０は送液手段２０と通信可能に接続されている。

例示的には、制御手段３０には、市販のパーソナル・コンピュータやタブレット端末、スマートフォン等を用いることができる。他の実施形態では、制御手段３０は送液手段２０（２１，２２）と一体化することができる。例えば市販のシリンジポンプ２１２，２２２には、ＣＰＵ等を含む制御手段が予め組み込まれており、シリンジポンプ２１２，２２２は、このＣＰＵ等を含む制御手段により、例えばプランジャを動かすモーター等の動力源（モーターなど）の駆動を制御することにより、シリンジ２１１，２２１内の培養液９１（９１ａ，９１ｂ）を注入および吸引する送液動作の制御が可能となっている。

【００４８】

例示的には、双方向フローが実行される第１の流路１を流れる培養液９１の流速は、約０．１μＬｓｅｃ$^{-1}$～約５０μＬｓｅｃ$^{-1}$の範囲の流速であり、単方向フローが実行される第２の流路２を流れる培養液９１の流速は、約０．１μＬｍｉｎ$^{-1}$～約１０μＬｍｉｎ$^{-1}$の範囲の流速である。本実施形態では、第１の流路１を流れる培養液９１の流速は、約５μＬｓｅｃ$^{-1}$～約０．１μＬｍｉｎ$^{-1}$であり、第２の流路２を流れる培養液９１の流速は、約０．１μＬｍｉｎ$^{-1}$である。

【００４９】

より詳細には、第１の流路１について双方向フローの送液動作を実行する本実施形態では、第１の流路１について次の３つのフェーズに例示する双方向フローを繰り返し実行する。まず第１のフェーズでは、約５μＬｓｅｃ$^{-1}$の流量での吸引フローを２０秒間行う。次に第２のフェーズでは、約５μＬｓｅｃ$^{-1}$の流量での注入フローを２０秒間行う。最後に第３のフェーズでは、約０．１μＬｍｉｎ$^{-1}$の流量での注入フローを１２０秒間行う。第３のフェーズを完了した後は、第１のフェーズから第３のフェーズを繰り返し実行する。第１のフェーズから第３のフェーズを行う間に吸引フローおよび注入フローを行うことにより、双方向フローの送液動作が実現される。第２の流路２については、約０．１μＬｍｉｎ$^{-1}$の流量での単方向の注入フローを連続的に実行する。例示的には、第１の流路１および第２の流路２に対するこのような送液動作により、マイクロ流体チャネル４には約０．６ｄｙｎ・ｓ・ｃｍ$^{-2}$の剪断応力が発生する。

［細胞培養方法］

【００５０】

本発明の一実施形態に係る細胞培養方法は、上記した一実施形態に係るマイクロ流体デバイス１０と送液手段２０とを用いて細胞を培養する方法であって、第１の流路１を流れる培養液９１の流束の加速度と、第２の流路２を流れる培養液９１の流束の加速度とを変化させることが可能な、培養液９１の送液動作を実行するステップ、を含む、細胞培養方法である。

【００５１】

本発明に係る細胞培養方法において、送液動作は制御手段３０およびオペレータの双方が行うことができる。具体的には、送液動作は、送液手段２０と制御手段３０とを備える細胞培養システム１００において、制御手段３０が送液手段２０の動作を制御することにより自律的に行うことができる。または、送液動作は、オペレータがマイクロ流体デバイス１０と送液手段２０とを用いて行うこともできる。例えば、オペレータがシリンジ２１１，２２１のプランジャを前進および後退させることにより、双方向フローの送液動作を行うことができる。

【００５２】

本発明の一実施形態に係る細胞培養方法では、制御手段３０が送液手段２０の動作を制御することにより、送液動作を自律的に行う。制御手段３０は、第１の流路１を流れる第１の培養液９１ａの流束の加速度と、第２の流路２を流れる第２の培養液９１ｂの流束の加速度とを変化させることが可能な、第１の送液手段２１および第２の送液手段２２の送液動作を制御する。すなわち本実施形態では、第１の送液手段２１は、第１の流路１について、第１の培養液９１ａのフローの方向を変化させることが可能な送液動作を実行し、第２の送液手段２２は、第２の流路２について、第２の培養液９１ｂのフローの方向が一定である送液動作を実行する。

［効果］
【００５３】
以上、本発明によると、細胞に作用する剪断応力を再現するマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法を提供することができる。
【００５４】
本発明に係るマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法によると、バリア機能が保たれた角膜上皮細胞を培養することが可能となる。これにより、眼球の表面におけるインシチュ（in situ）でのメカノバイオロジーの研究や眼科用医薬品の開発が可能となる。また、本発明に係るマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法により培養した角膜上皮細胞は、バリア機能が保たれた角膜上皮細胞であり、医薬品のスクリーニング試験に使用することが可能となる。
【００５５】
本発明に係るマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法によると、まばたき中に発生する、眼球表面における流体の動的なフローによる剪断応力を再現することができる。これにより、従来の動物実験では困難であった、眼科用医薬品である点眼薬の薬効、安全性および毒性のヒトへの影響を予測するための新規なプラットフォームを提供することが可能となる。すなわち、本発明に係るマイクロ流体デバイス、細胞培養システムおよび細胞培養方法により、動物実験の代替法を提供することが可能となる。
［その他の形態］
【００５６】
以上、本発明を特定の実施形態によって説明したが、本発明は上記した実施形態に限定されるものではない。
【００５７】
上記した実施形態では、ヒトの眼の角膜の上皮細胞を培養しているが、本発明において培養の対象とする細胞はこれに限定されない。細胞に作用する剪断応力を再現する本発明において、培養の対象とする細胞は角膜の上皮細胞に限らず、例えば腸の上皮細胞や、肺上皮細胞、血管内皮細胞、表皮角化細胞、およびニューロンとすることができる。これら上皮細胞、内皮細胞、表皮角化細胞、およびニューロンは、ヒトや動物から採取したものでもｉＰＳ細胞由来のものであってもよい。すなわち、細胞に作用する剪断応力を再現する本発明では、極性を有する細胞を培養の対象とすることができる。
【００５８】
上記した実施形態では、双方向フローの送液動作を、透過膜３の上側に配置されている第１の流路１について実行し、単方向フローの送液動作を、透過膜３の下側に配置されている第２の流路２について実行することにより、細胞９０に剪断応力を再現しているが、送液動作と送液動作を実行する流路との組み合わせはこれに限定されない。例えば、双方向フローの送液動作を第２の流路２について実行し、単方向フローの送液動作を第１の流路１について実行することにより、第１の流路１を流れる培養液９１の流速と、第２の流路２を流れる培養液９１の流速とを異ならせて、細胞９０に剪断応力を再現することもできる。
【００５９】
また例えば、第１の流路１および第２の流路２のどちらについても双方向フローの送液動作を実行することにより、細胞９０に剪断応力を再現することができる。例えば、第１の流路１については注入および吸引フェーズの切り替え周期が短い（例えば、約６０秒周期）双方向フローを実行し、第２の流路２については注入および吸引フェーズの切り替え周期が長い（例えば、約６０分周期）双方向フローを実行することにより、第１の流路１を流れる培養液９１の流速と、第２の流路２を流れる培養液９１の流速とを異ならせて、細胞９０に剪断応力を再現することができる。このように、第１の流路１について実行する双方向フローにおける注入および吸引フェーズと、第２の流路２について実行する双方向フローにおける注入および吸引フェーズとが、同一ではなく時間に応じて異なっていると、第１の流路１を流れる培養液９１の流速と、第２の流路２を流れる培養液９１の流速と

が異なるタイミングが存在し、細胞９０に剪断応力を再現することができる。
【００６０】
上記した実施形態では、第１の流路１は透過膜３の上側に配置されており、第２の流路２は透過膜３の下側に配置されているが、第１の流路１および第２の流路２の配置は、透過膜３を間に挟んだ鉛直方向に限定されない。第１の流路１と第２の流路２との間において流速に差異が生じることにより、培養の対象とする細胞９０に剪断応力が作用すればよく、第１の流路１および第２の流路２は、透過膜３を間に挟んで水平方向に配置することができる。
【００６１】
上記した実施形態では、細胞培養システム１００は一体型のシステムであり、送液手段２０および制御手段３０はどちらも細胞培養システム１００に備えられているが、送液手段２０および制御手段３０は同じ場所に配置される必要は無い。例えば、制御手段３０を細胞培養システム１００および送液手段２０とは別の場所に配置して、送液手段２０および制御手段３０を互いにネットワークで通信可能に接続してもよい。送液手段２０と制御手段３０との間のネットワーク接続は、Ethernet（登録商標）等の有線であってもよいし、Wi-Fi（登録商標）やBluetooth（登録商標）等の無線であってもよい。
【００６２】
上記した実施形態では、第１の流路１は第１の透明基板１１に有底の溝として設けられているが、第１の透明基板１１に有底の溝を設ける態様はこれに限定されない。例えば、２枚の透明基板を準備し、第１の流路１となる貫通溝を一方の透明基板に形成し、この一方の透明基板と他方の透明基板とを積層することにより、有底の溝が設けられた第１の透明基板１１を構成することができる。すなわち、第１の透明基板１１に第１の流路１を設けるとは、第１の透明基板１１に第１の流路１として直接的に有底の溝を設ける態様と、一方の透明基板に貫通溝が設けられた２枚の透明基板を積層することにより、有底の溝としての第１の流路１が設けられた第１の透明基板１１を構成する態様と、の双方の態様を意味する。第２の流路２についても第１の流路１と同様である。
【００６３】
上記した実施形態では、第１の流路１および第２の流路２に流す流体は細胞９０の培養液９１であるが、流体は、培養液９１以外の液体として例えば緩衝液を含むことができる。例示的な緩衝液としては、例えば、トリス緩衝生理食塩水（TBS: Tris-buffered saline）、リン酸緩衝生理食塩水（PBS: Phosphate-buffered saline）、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）、クレブス液（Krebs-Ringer液またはKrebs-Henseleit液）、およびタイロード（Tyrode）液等を用いることができる。第１の流路１および第２の流路２に流す流体が、細胞９０の培養液９１に加えて緩衝液を含むことにより、例えば継続的な使用により流体の濃度が変化するような環境下であっても、流体の水素イオン指数ｐＨの大きな変動を抑えることが可能になる。また、第２の流路２に流す流体が培養液９１であれば、第１の流路１に流す流体を培養液９１とせず緩衝液としても良い。
【００６４】
上記した実施形態では、第１の流路１および第２の流路２に流す流体は細胞９０の培養液９１であるが、流体は液体に限定されない。流体は、細胞９０の培養に適した気体とすることができるし、液体と気体とを混合した流体とすることもできる。例えば、炭酸ガス（CO_2）や酸素ガス（O_2）等の気体を、第１の流路１および第２の流路２に流すことができる。或いは、このような気体を泡状にして細胞９０の培養液９１と共に混合した流体を、第１の流路１および第２の流路２に流すこともできる。すなわち、上記した実施形態において培養液９１を送液する送液手段２０は、液体および気体を含む流体を流注（aflux）する流注手段２０と表現することができる。
【００６５】
上記した実施形態では、第２の流路２について実行する単方向フローの送液動作により、

第２の培養液９１ｂはドレインチューブ２５を介して排出されているが、例えばシリンジポンプ２２２に代えてペリスタルティックポンプを用いることにより、第２の培養液９１ｂは排出されずにシリンジ２２１へ循環させることができる。このように、ペリスタルティックポンプを用いることにより、単方向フローの送液動作により送液される培養液は、排出せずにシリンジへ循環させることができる。

【実施例】

【００６６】

以下に本発明の実施例を示し、本発明の特徴をより明確にする。以下の実施例では、上記した実施形態における細胞培養システムを用いて、ヒト角膜上皮細胞（ＨＣＥ－Ｔ）を培養した。培養したヒト角膜上皮細胞の性能を評価することにより、上記した実施形態におけるマイクロ流体デバイスおよび細胞培養システムが剪断応力を再現する能力を評価した。

＜準備＞

【００６７】

細胞の培養液として、濃度が２５０μｇ ｍＬ$^{-1}$のフルオレセインナトリウムとローダミンＢとを、カルシウムを添加したハンクス平衡型バッファー（ＨＢＳＳ＋）に別々に溶解した。下部流路として機能する第２の流路へフルオレセインナトリウムを充填しながら、上部流路として機能する第１の流路へローダミンＢ溶液を加えた。

【００６８】

ヒト角膜上皮細胞（ＨＣＥ－Ｔ）は、理研バイオリソースリサーチセンター（日本国、茨城県）から提供されたものを使用した。細胞は、５％（ｖ／ｖ）のウシ胎児血清（ＦＢＳ）、５μｇｍＬ$^{-1}$のインスリン、１０ｎｇｍＬ$^{-1}$のヒト上皮成長因子（ｈＥＧＦ）、および０．５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を添加したＤＭＥＭ／Ｆ１２培地を用いて培養した。細胞を、トリプシン－ＥＤＴＡ（０．２５－０．０２％）溶液を用いて１：２から１：４の継代培養比で継代培養した。

【００６９】

蛍光顕微鏡画像に基づく単一細胞プロファイリングは、ＣｅｌｌＰｒｏｆｉｌｅｒソフトウェア（バージョン３．１．８；米国 Broad Institute of Harvard and MIT）を使用して実施した。大津の二値化法を使用して細胞を判別し、個々の全細胞、細胞質、および細胞核からの蛍光信号を自動的に個別に定量化した。単一細胞の形態学的な記述子についてのさらなる分析は、オープンソースのＯｒａｎｇｅ ３ソフトウェア（バージョン３．２３．１；スロベニア Bioinformatics Laboratory, Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana）を使用して、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding（ｔ－ＳＮＥ）技術によって実行した。

＜角膜上皮細胞の培養およびバリア形成能の評価＞

【００７０】

図７は、実施例に係るマイクロ流体デバイスを用いて培養した角膜上皮バリアの特性を示す図である。

【００７１】

（Ａ）は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて培養したヒト角膜上皮細胞（ＨＣＥ－Ｔ）についての、ＺＯ－１の免疫蛍光法による蛍光画像である。５日目、７日目、および１０日目の蛍光画像を示す。緑色はＺＯ－１であり、青色はＤＡＰＩである。画像のスケールバーは５０μｍである。（Ｂ）は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて培養したＨＣＥ－Ｔにおける、ＺＯ－１発現の定量的単一細胞プロファイリングである。７日目および１０日目のデータを示す。蛍光強度は３つの独立した実験の画像から得られた。１８００個の細胞をランダムに選択し、各サンプルについて分析した。データは平均値±標準偏差（ＳＤ）として表される。ｐ値は、対応のないｔ検定（unpaired t test）によって決定した。

【００７２】

図８は、実施例に係るマイクロ流体デバイスを用いて培養した角膜上皮バリアの特性を示

す図である。
【００７３】
（Ａ）は、ＺＯ－１発現を示す角膜上皮バリアのＺスタックの蛍光画像である。従来のトランスウェル（ＴＷ）システムについては７日目の画像を示し、実施例に係るマイクロ流体デバイス（ＭＤ）については５日目の画像を示す。緑色はＺＯ－１であり、青色はＤＡＰＩである。画像のスケールバーは１００μｍである。（Ｂ）は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて７日間培養した角膜上皮バリアのフルオレセインナトリウム透過性を示すグラフである。上部流路として機能する第１の流路にフルオレセインナトリウム溶液を追加し、下部流路として機能する第２の流路をＨＢＳＳバッファーで満たした。約０．０１ｍＬ・ｍｉｎ$^{-1}$のフローを適用した。バリア透過性は、見かけ上の透過性（Ｐａｐｐ）として表示される。データは平均値±標準偏差（ＳＤ）として表される。ｐ値は、対応のないｔ検定（unpaired t test）によって決定した。
【００７４】
角膜上皮バリアの成長と形成とを評価するために、ＨＣＥ－Ｔを６×１０^{3}セルｃｍ$^{-2}$の密度で実施例に係るマイクロ流体デバイスに播種した。これは、従来のトランスウェルシステムにおいて使用される細胞の密度である０．８９×１０^{5}セルｃｍ$^{-2}$よりも低くなっている。角膜上皮バリアは、培養開始後の５日目から形成された。培養開始後の７日目には、マイクロ流体チャネルは細胞で完全に覆われた。細胞のクラスターが目視され、細胞の第２層が形成されていた。
【００７５】
図７の（Ａ）および（Ｂ）に示すように、ＺＯ－１の発現は７日目において明らかに増加し、１０日目において減少した。さらに、図８の（Ａ）に示すように、実施例に係るマイクロ流体デバイス（ＭＤ）において培養した細胞は、従来のトランスウェル（ＴＷ）システムにおいて培養した細胞と比較して、より厚いバリアを形成した。
【００７６】
実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて培養した角膜上皮バリアの完全性を確認するために、７日間の細胞培養後にフルオレセインナトリウムの透過率を検査した。図８の（Ｂ）に示すように、実施例に係るマイクロ流体デバイス（ＭＤ）におけるフルオレセインナトリウムの透過率Ｐａｐｐ値は、５．０７×１０$^{-7}$±９．４×１０$^{-8}$であり、従来のトランスウェル（ＴＷ）システムにおけるフルオレセインナトリウムの透過率Ｐａｐｐ値は、４．１８×１０$^{-7}$±７．９×１０$^{-8}$であった。
【００７７】
実施例に係るマイクロ流体デバイスのバリアと従来のトランスウェルシステムのバリアとの間において、フルオレセインナトリウムの透過性に有意差はなく、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて培養した角膜上皮バリアの完全性が、従来のトランスウェルシステムにおいて培養した角膜上皮バリアの完全性と同等であることを示した（ｐ値＝０．３３１１）。
＜細胞の接着性、機能、形態、および表現型に対する流体の動的な刺激による影響の評価＞
【００７８】
図９は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激が細胞の接着性に及ぼす影響を説明するための図である。
【００７９】
実施例に係る構造のマイクロ流体デバイスを用いて、動的なフローの条件下および静的なフローの条件下のそれぞれにおいてＨＣＥ－Ｔを培養した。培養を開始してから１２時間後および２４時間後のそれぞれのタイミングにおいて、固定された細胞を核染色ＤＡＰＩ（青色）により染色した。蛍光画像は、（Ａ）に示すように、マイクロ流体チャネルにおける３つの異なる領域である、入口の近く（Ａ３）、中央（Ａ２）、および出口の近く（Ａ１）のそれぞれから得た。得られた蛍光画像を（Ｂ）に示す。画像のスケールバーは１００μｍである。得られた蛍光画像に対して細胞核のカウントを行い、総核数を画像取得

面積によって正規化した。得られたデータを（Ｃ）に示す。データは平均値±標準偏差（ＳＤ）として表される。ｐ値は、Ｔｕｋｅｙの検定（Tukey’s test）によって決定した。

【００８０】

実施例に係るマイクロ流体デバイスを用いたＨＣＥ－Ｔの培養において、動的な刺激である１つのまばたきサイクルは、４０秒間の吸引フローと注入フローとで構成される。したがって、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて流体の動的な刺激を得るために、２つの異なるタイプのフローを適用した。双方向のフローは、シリンジポンプの吸引（withdraw）－注入（infuse）サイクルで構成され、上部流路として機能する第１の流路に適用した。単方向の注入フローは、下部流路として機能する第２の流路のみに適用した。双方向のフローにより、マイクロ流体チャネルに０．６ｄｙｎ・ｓ・ｃｍ－２の剪断応力が発生した。

【００８１】

角膜細胞の接着性に対する、流体の動的な刺激による剪断応力の影響を調査するために、１２時間後および２４時間後のそれぞれのタイミングにおいて細胞核の数をカウントした。動的なフローの条件下および静的なフローの条件下のどちらの条件下においても、核数の有意な減少は観察されなかった。

【００８２】

図１０、図１１は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激が細胞の機能および形態に及ぼす影響を説明するための図である。

【００８３】

図１０（Ａ）は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて流体の動的な刺激に２４時間曝されたヒト角膜上皮細胞（ＨＣＥ－Ｔ）についての、ＣＫ－１９の免疫蛍光法による蛍光画像である。ピンク色はＣＫ－１９であり、青色はＤＡＰＩである。画像のスケールバーは５０μｍである。図１０（Ｂ）は、実施例に係る構造のマイクロ流体デバイスにおいて培養したＨＣＥ－Ｔにおける、ＣＫ－１９発現の定量的単一細胞プロファイリングおよび関連する形態学的特徴である。ＨＣＥ－Ｔの培養は、動的なフローの条件下および静的なフローの条件下のそれぞれについて行った。分析は３つの独立した実験の画像に対して実行した。画像内から合計３０００個の細胞をランダムに選択し、選択した各サンプルについて分析を行った。データは平均値±標準偏差（ＳＤ）として表される。ｐ値（＜０．００１、０．０００１）は、ネストｔ検定（nested t test）によって決定した。

【００８４】

図１１は、ＨＣＥ－Ｔの集団（populations）に対するｔ－ＳＮＥ分析の可視化された分析結果を示す図である。３つの独立した実験の画像から、１００を超える細胞の特徴（形態、強度、テクスチャ）が抽出された。

【００８５】

実施例に係るマイクロ流体デバイスにおいて適用した流体の動的な刺激が細胞の機能に及ぼす影響を確認するために、ＣＫ－１９の発現を調べた。サイトケラチンＣＫ－１９は、細胞の柔軟性と弾力性とを維持する中間フィラメントであり、角膜上皮バリアの完全性を維持するために重要である。図１０の（Ａ），（Ｂ）に示すように、流体の動的な刺激を適用した後２４時間で、ＣＫ－１９の発現は、静的なフローの条件下において培養した細胞と比較して有意に増加した（ｐ値＜０．０００１）。

【００８６】

動的なフローの条件下において培養した細胞の形態学的変化をさらに評価するために、単一細胞プロファイリングを行った。評価した機能には、細胞表面のテクスチャと、ＣＫ－１９およびＤＡＰＩの染色の強度とに加えて、細胞核および細胞体の形態学的な記述子が含まれていた。図１１に示すように、ｔ－ＳＮＥ分析は、流体の動的な刺激に曝された細胞の集団と、静的なフローの条件に保たれた細胞の集団との間において、明確な分離を示した。さらに、マイクロ流体チャネルの異なる領域における細胞は、均質な表現型の変化を示した。一方で、ｔ－ＳＮＥ分析では、動的なフローの条件下と静的なフローの条件下

との間で細胞核集団間の明確な分離は示さなかった。この結果は、実施例に係るマイクロ流体デバイスにおける流体の動的な刺激によって媒介される剪断応力が、細胞核ではなく細胞体の形態学的変化につながったことを示していた。言い替えると、角膜環境の一つである動的な剪断応力をヒト角膜上皮細胞（ＨＣＥ－Ｔ）に印加することにより、その結果として細胞体に形態学的変化が現れた。すなわち、実施例に係るマイクロ流体デバイスによれば、細胞に作用する剪断応力を再現することが可能になる。

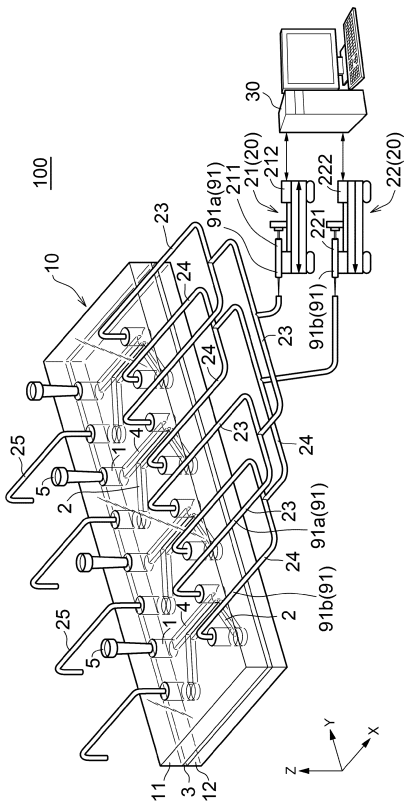
【符号の説明】

【００８７】

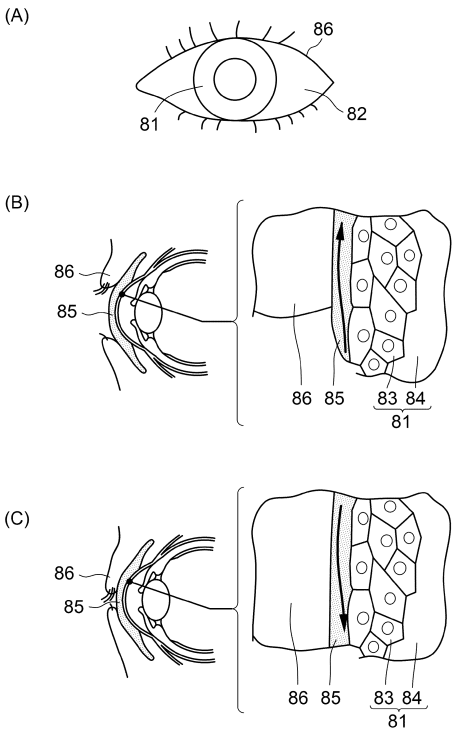
１　第１の流路
２　第２の流路
３　透過膜（物質透過膜）
４　マイクロ流体チャネル
５　リザーバタンク
１０　マイクロ流体デバイス
１１　第１の透明基板
１２　第２の透明基板
２０　送液手段（流注手段）
２１　第１の送液手段
２１１　シリンジ
２１２　シリンジポンプ
２２　第２の送液手段
２２１　シリンジ
２２２　シリンジポンプ
２３　チューブ
２４　チューブ
２５　ドレインチューブ
３０　制御手段
８１　角膜
８２　眼球
８３　角膜上皮
８４　角膜実質
８５　涙液の膜
８６　瞼
９０　細胞（角膜上皮細胞）
９１　培養液（流体）
９１ａ　第１の培養液
９１ｂ　第２の培養液
１００　細胞培養システム

【図面】

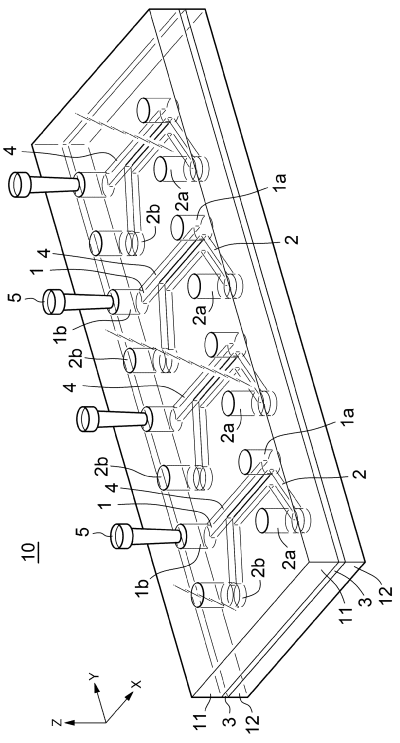
【図１】


100
10
30
21(20)
211
212
91a(91)
91b(91)
221
222
22(20)
23
24
25
1
2
3
4
5
11
12
X
Y
Z

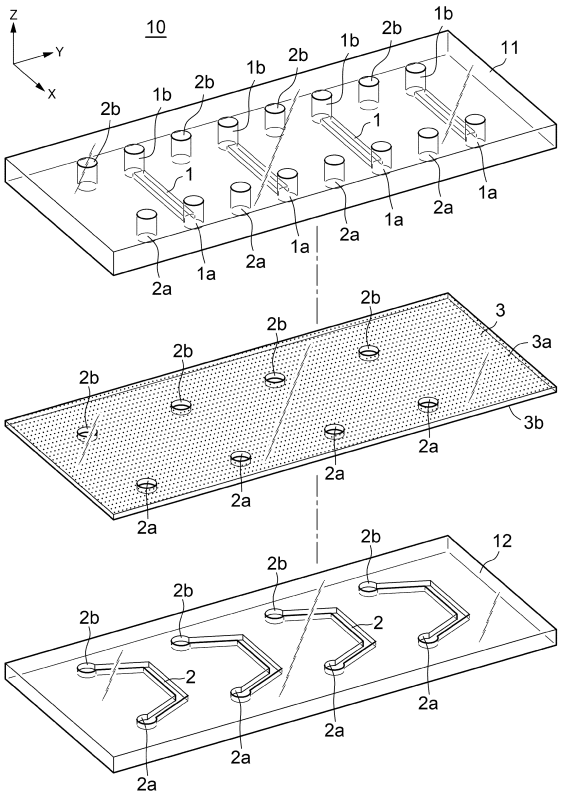
【図２】


(A)
86
81
82
(B)
86
85
83
84
81
(C)
86
85
83
84
81

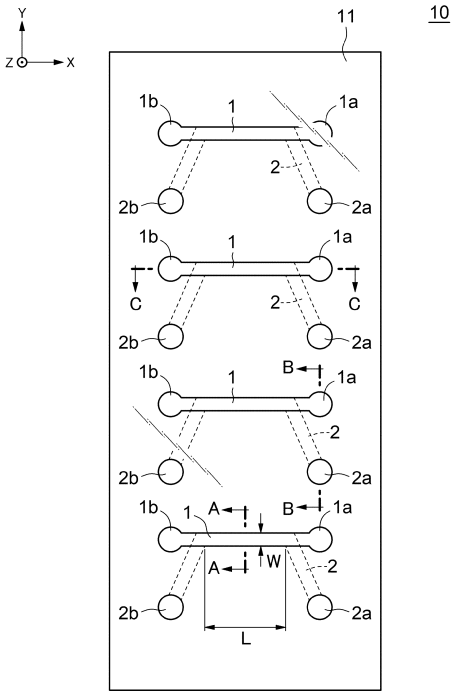
【図３】


10
1
1a
1b
2
2a
2b
3
4
5
11
12
X
Y
Z

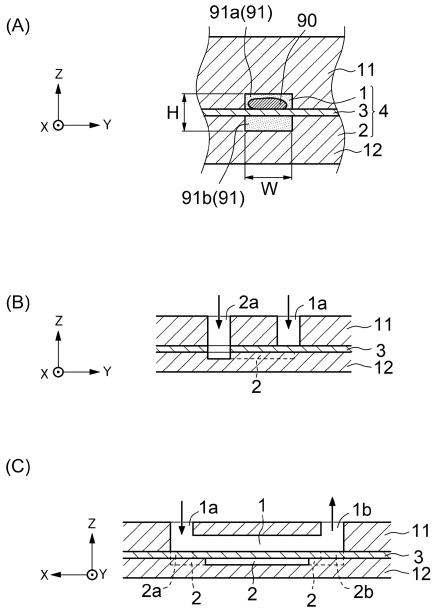
【図４】


10
1
1a
1b
2
2a
2b
3
3a
3b
11
12
X
Y
Z

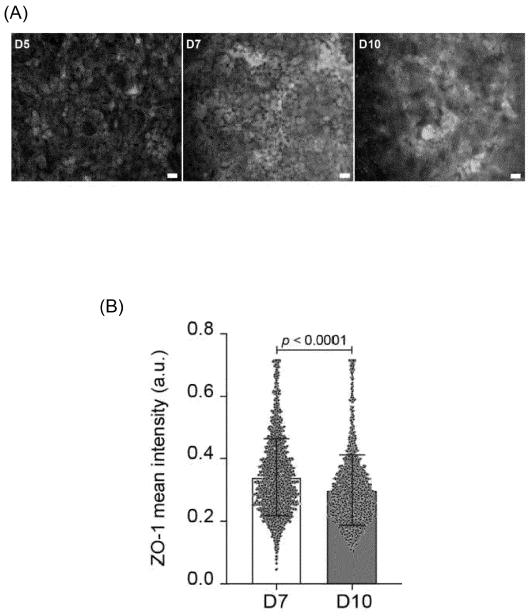
【図５】


Y
Z
X
11
10
1b
1
1a
2
2b
2a
C
B
A
W
L

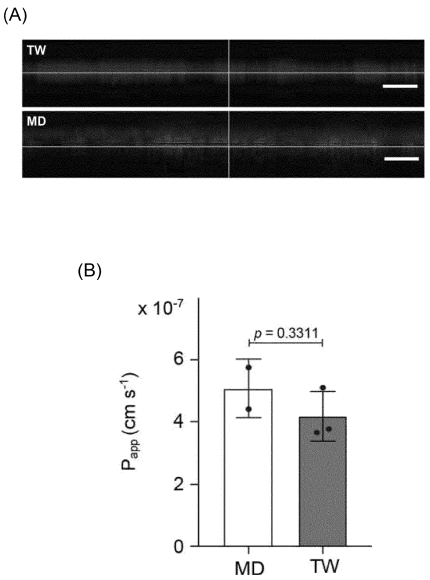
【図６】


(A)
91a(91)
90
11
1
3
4
2
12
H
W
91b(91)
(B)
2a
1a
11
3
12
2
(C)
1a
1
1b
11
3
12
2a
2
2
2
2b

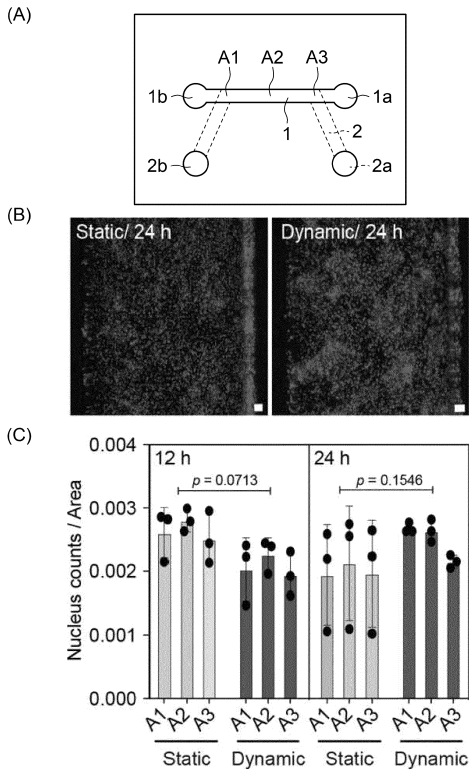
【図７】


(A)
D5
D7
D10
(B)
ZO-1 mean intensity (a.u.)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
p < 0.0001
D7
D10

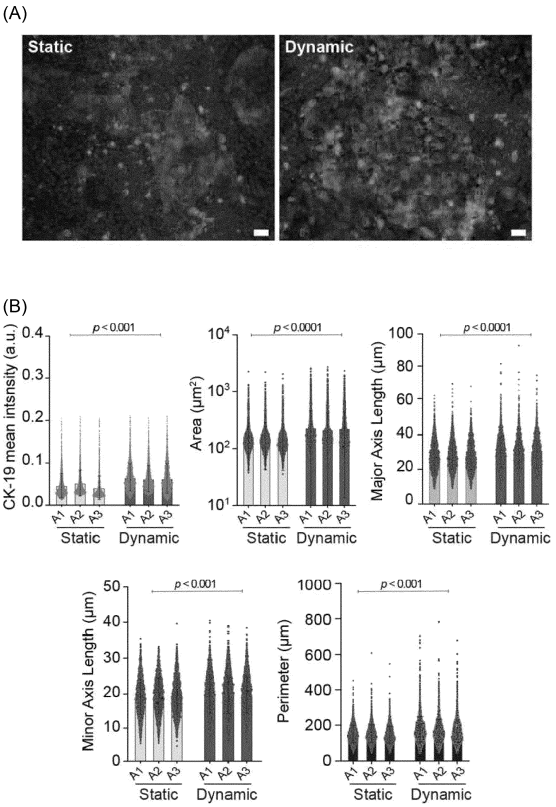
【図８】


(A)
TW
MD
(B)
x 10-7
p = 0.3311
Papp (cm s-1)
6
4
2
0
MD
TW

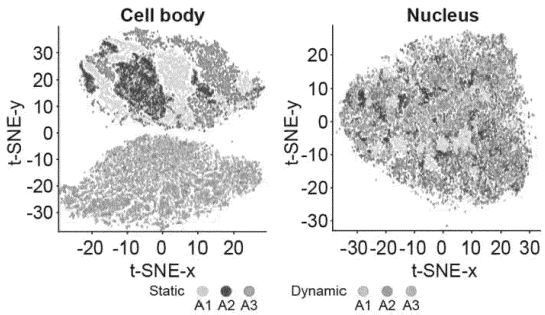
【図９】


(A)
A1
A2
A3
1b
1a
1
2
2b
2a
(B)
Static/ 24 h
Dynamic/ 24 h
(C)
Nucleus counts / Area
12 h
24 h
p = 0.0713
p = 0.1546
Static
Dynamic
Static
Dynamic

【図１０】


(A)
Static
Dynamic
(B)
CK-19 mean intsnsity (a.u.)
Area (μm²)
Major Axis Length (μm)
Minor Axis Length (μm)
Perimeter (μm)
p < 0.001
p < 0.0001
Static
Dynamic

【図１１】


Cell body
Nucleus
t-SNE-y
t-SNE-x
Static
Dynamic
A1 A2 A3

フロントページの続き

ウェブサイトの掲載日 令和２年３月１９日、令和２年３月２４日および令和２年３月３１日 ウェブサイトのアドレス ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｃｅｍｓ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／＿ｗｐ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／２０２０／０３／１＿ｊａｐａｎｅｓｅ＿ｐｒ＿ｉｃｅｍｓ＿ｋａｍｅｉ－１．ｐｄｆ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｃｅｍｓ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ｊａ／ｎｅｗｓ／５３０２ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ｊａ／ｒｅｓｅａｒｃｈ／ｒｅｓｅａｒｃｈ＿ｒｅｓｕｌｔｓ／２０１９／２００３１１＿１．ｈｔｍｌ ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｋｙｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ｊａ／ｒｅｓｅａｒｃｈ／ｒｅｓｅａｒｃｈ＿ｒｅｓｕｌｔｓ／２０１９／ｄｏｃｕｍｅｎｔｓ／２００３１１＿１／０１．ｐｄｆ
Ｆターム（参考） CA46