

(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
2020年5月14日(14.05.2020)



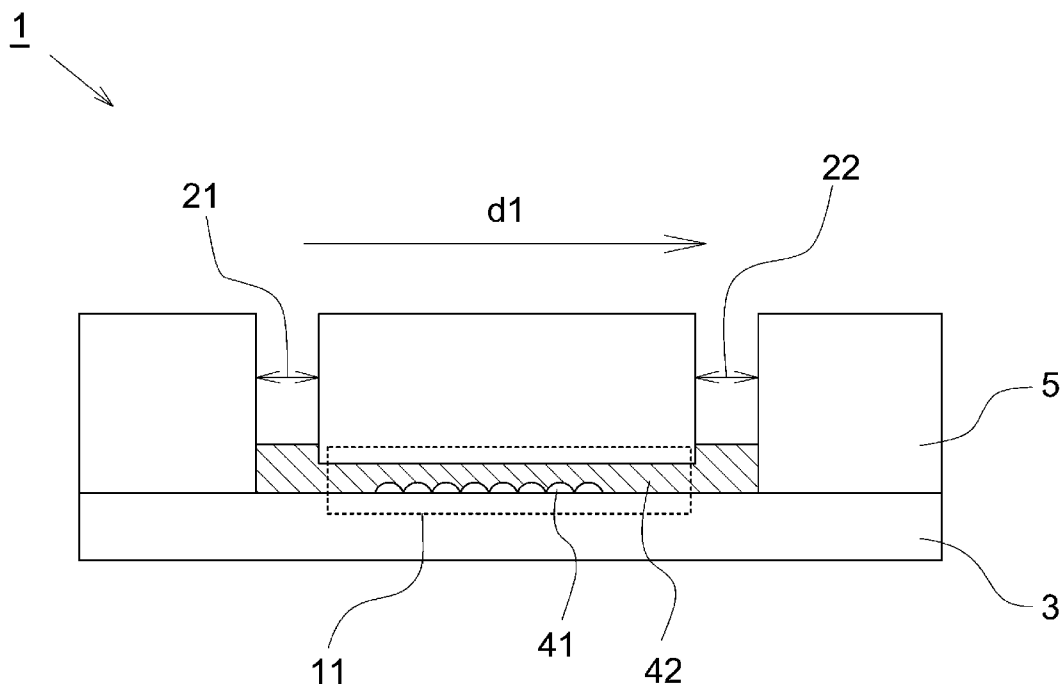
(10) 国際公開番号

WO 2020/095852 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/043128
- (22) 国際出願日: 2019年11月1日(01.11.2019)
- (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 2018-210066 2018年11月7日(07.11.2018) JP
- (71) 出願人: ウシオ電機株式会社 (**USHIO DENKI KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1008150 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 Tokyo (JP).
国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**)
- [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 山中 誠 (**YAMANAKA, Makoto**); 〒1008150 東京都千代田区丸の内1丁目6番5号 ウシオ電機株式会社内 Tokyo (JP).
亀井 謙一郎 (**KAMEI, Kenichiro**); 〒6068501 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 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 ユニウス国際特許事務所 (**UNIUS PATENT ATTORNEYS OFFICE**); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目13-9 新大阪MTビル1号館2階 Osaka (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,

(54) Title: CELL CULTURING CHIP

(54) 発明の名称: 細胞培養チップ



(57) Abstract: Realized is a cell culturing chip which enables, when cells are cultured in a minute three-dimensional environment, imitation of the extracellular micro environment more strictly. This cell culturing chip comprises: a wall section made of a substantially non-porous body material; and a culture chamber formed of a tubular space covered by the wall section and extending in a longitudinal direction, wherein the inscribed circle of the shape of a cross-section plane, of the culture chamber, perpendicular to the longitudinal direction, has a diameter in the range of 200-500 μm .

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

(57) 要約: 微小3次元環境下で細胞を培養する場合において、細胞外微小環境をより厳密に模擬することを可能にする、細胞培養チップを実現する。細胞培養チップは、実質的に非多孔質体の材料からなる壁部と、壁部に覆われ、長手方向に延伸する細管状空間からなる培養チャンバとを備え、培養チャンバを前記長手方向に直交する平面で切断したときの形状の内接円が、直径200 μ m以上500 μ m以下の範囲である。

明 細 書

発明の名称：細胞培養チップ

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養チップに関する。

背景技術

[0002] 細胞は、生体・組織内において、(i) 成長因子、ビタミン、ガス分子などの可溶性因子、(ii) 細胞外マトリックスタンパク、硬さ、圧力などの不可溶性因子、(iii) 細胞間相互作用、などで構成される「細胞外微小環境」中に存在する。細胞は、これらの因子が複雑且つ厳密に制御されながら、その機能が制御される。つまり、再生医療、細胞移植治療、薬剤開発などに有望視されているヒト多能性幹細胞（ヒトES/iPS細胞）などの目的細胞の機能を自在に制御するためには、この細胞外微小環境を自在に制御することが必須となる。

[0003] 従来、ヒトES/iPS細胞を含む細胞の培養や実験は、培養ディッシュやプレートを用いた2次元環境下で行われていた（非特許文献1、非特許文献2参照）。しかし、本来、細胞は3次元環境下に置かれており、2次元環境下では本来の機能を発現することができないと考えられる。ヒトES/iPS細胞を用いた組織工学においても、3次元環境を整えることは非常に重要である。

[0004] また、細胞外微小環境の大きさも非常に重要な因子となる。細胞は、生体内において、マイクロメートル（ μm ）スケールの微小環境下で制御される。しかし、従来の培養方法では、このように微小空間内において因子を制御することが困難であった。更に、これらの因子を網羅的に解析することは、ほぼ不可能であった。このような事情により、従来方法では困難であった、3次元での細胞培養環境を作製する手法が望まれていた。

[0005] 上記の課題を受け、本発明者の一人は、既に、細胞を3次元環境下で培養するのに適したマイクロ流体デバイス及びこれを用いた培養方法を提案して

いる（下記特許文献 1 参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第 2 0 1 5 / 1 2 9 6 7 3 号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：K. Kamei et al. Lab Chip, 9(4), 555-563 (2009)

非特許文献2：K. Kamei et al. Lab Chip, 10(9), 1113-1119 (2010)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、微小 3 次元環境下で細胞を培養する場合において、細胞外微小環境をより厳密に模擬することを可能にする、細胞培養チップを実現することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明に係る細胞培養チップは、
実質的に非多孔質体の材料からなる壁部と、
前記壁部に覆われ、長手方向に延伸する細管状空間からなる培養チャンバとを備え、
前記培養チャンバを前記長手方向に直交する平面で切断したときの形状の内接円が、直径 2 0 0 μ m 以上 5 0 0 μ m 以下の範囲であることを特徴とする。

[0010] 前記細胞培養チップは、長手方向に直交する平面で切断したときの形状の内接円が、直径 2 0 0 μ m 以上 5 0 0 μ m 以下の範囲である、極めて細い管状の空間からなる培養チャンバを備える。このため、かかる培養チャンバ内で培養された細胞から放出された生理活性物質は、培養チャンバの周囲を覆う壁部に衝突すると、再び細胞側へと戻される。

[0011] 前記培養チャンバは、いわゆるマイクロ流路を構成する。マイクロ流路を有する培養チップとしては、PDMS（ポリジメチルシロキサン）からなる

樹脂で形成されるのが従来、一般的とされていた。その理由は、前記材料が、光透過性や酸素透過性に優れ、成形が容易であるためである。

[0012] しかし、PDMSからなる樹脂は、材料分子間に微小間隙を有するため培養試験液に添加される薬剤を吸収してしまい、正確な薬剤試験濃度の制御が困難である。また、PDMSで形成されたマイクロ流路を培養チャンバとした場合、当該培養チャンバ内で培養された細胞から放出された生理活性物質についても、マイクロ流路の壁部内に吸収・吸着されてしまう。この結果、培養細胞を自己に再帰させる作用を十分に機能させることができない。

[0013] これに対し、前記細胞培養チップによれば、壁部が実質的に非多孔質体の材料で構成されているため、薬剤や生理活性物質が壁部内に吸収されにくい。この結果、薬剤試験濃度の制御が容易化されると共に、細胞自身から放出された生理活性物質を自身に再帰させ、自己作用を生じさせることが可能となる。これにより、生体に近い細胞応答を評価することができる。

[0014] なお、周囲を壁部で覆われたマイクロ流路によって培養チャンバを構成することで、培養液の液面を下げた場合であっても、培養液が乾燥して培地の濃度が変わるといえることが起こりにくい。このため、再現性の高い細胞培養が可能となる。

[0015] 前記内接円の直径を500 μm 以下としたことで、培養チャンバ内で培養している細胞から放出された生理活性物質を、細胞外への拡散を抑制しながら当該細胞に再帰させることが可能となる。また、前記内接円の直径を200 μm 以上としたことで、細管状空間からなる培養チャンバ内に細胞を容易に配置することが可能となる。例えば、ヒトiPS細胞の場合、長径が約10～20 μm 程度であるため、このような小型の細胞を培養する際にも、チャンバ内に配置することができる。

[0016] 前記壁部は、好ましくは、吸水率（測定法ASTM D570、浸漬時間24hr）が0.5%以下であり、より好ましくは前記方法による吸水率が0.001%以上、0.1%以下であり、更に好ましくは0.001%以上、0.01%以下である。吸水率が当該範囲であることにより、細胞自身が

ら放出された生理活性物質（例えば、内分泌作用を示すサイトカイン、ホルモン、脂質、細胞外基質、マイクロRNA、エクソソーム、栄養素、又は薬剤など）を、壁部内での吸収を抑制しながら、細胞側に再帰させることが可能となる。

[0017] 前記壁部は、高いガスバリア性（低い酸素透過性）を有するのが好ましい。より好ましくは、前記壁部は、25℃における酸素透過係数が $10^{-9} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 以下であり、更に好ましくは前記酸素透過係数が $10^{-12} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 以上、 $10^{-10} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 以下である。なお、本明細書において、単位中の「 $\text{cm}^3 (\text{STP})$ 」という表記は、標準状態に換算した気体の体積を示す。壁部の酸素透過係数が、当該範囲であることにより、細胞に供給される酸素又は二酸化炭素の濃度を、材料からの自然拡散による非制御下の供給を受けることなく、溶液のみからの供給により高精度に制御することができる。また、上記において、酸素透過係数は、JIS K 7126（プラスチックフィルム及びシートガス透過度試験法）に準拠した方法によって行われるものとして構わない。

[0018] 前記壁部は、光透過性を有する材料からなるものとしても構わない。これにより、細胞培養チップの外側から培養チャンバ内で培養されている細胞を視認することができる。

[0019] 前記壁部は、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンコポリマー、ポリスチレン、及びシクロオレフィンポリマーからなる群より選ばれた1種又は2種以上の樹脂材料からなるものとしても構わない。これにより、射出成形によって製造できると共に、光透過性に優れ、且つ、非多孔質体の壁部を有する細胞培養チップを実現することができる。

[0020] なお、前記壁部は、耐水性が高い材料であるのがより好ましい。上述した各樹脂材料は、いずれも耐水性が高いため培養液に含まれる水分で分解されにくい。これにより、細胞を培養している過程において、壁部の表面状態が

劣化しにくく、細胞から放出された生理活性物質を吸収しにくい性質が維持される。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、細胞外微小環境がより厳密に模擬された3次元環境を構築できる細胞培養チップが実現される。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]細胞培養チップの一実施形態の構造を示す斜視図である。

[図2]図1に示す細胞培養チップを平面 α で切断したときの模式的な断面図である。

[図3]図1に示す細胞培養チップ内で細胞を培養している様子を模式的に示す断面図である。

[図4]図1に示す細胞培養チップにおいて、培養チャンバを含む領域を、長手方向に直交する平面で切断したときの模式的な平面図である。

[図5]図3に示す断面図に、寸法の符号を付記した図面である。

[図6]細胞培養チップの培養チャンバ近傍の模式的な拡大断面図である。

[図7]高さの高い培養チャンバ内で細胞を培養した場合の生理活性物質の動きを模式的に示す図面である。

[図8]多孔質体からなる壁部で覆われた培養チャンバ内で細胞を培養した場合の生理活性物質の動きを模式的に示す図面である。

[図9A]構成材料を異ならせて製造された細胞培養チップ内で細胞を培養したときの細胞の死細胞数をグラフ化したものである。

[図9B]構成材料を異ならせて製造された細胞培養チップ内で細胞を培養したときの写真、及び染色後の写真である。

[図10]PDMS、COP、PMMA、PS、及びPCからなる各種樹脂のナイルレッドの吸収性を評価した結果をグラフ化したものである。

[図11]PDMS、COP、PMMA、PS、及びPCからなる各種樹脂のドキソルビシンの吸収性を評価した結果をグラフ化したものである。

[図12]培養チャンバの高さを変化させて細胞を培養したときの写真である。

[図13]培養チャンバの高さを変化させて細胞を培養したときの、染色後の死細胞数を比較するための写真である。

[図14]図 1 3 の結果をグラフ化したものである。

[図15]培養空間の大きさ、及び／又は培養チャンバの構成材料を変えた細胞培養チップ内で細胞を培養したときの酵素活性を比較した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明に係る細胞培養チップにつき、図面を参照して説明する。なお、以下の各図面はあくまで模式的に図示されたものである。すなわち、図面上の寸法比と実際の寸法比とは必ずしも一致しておらず、また、各図面間においても寸法比は必ずしも一致していない。

[0024] [構造]

図 1 は、細胞培養チップの一実施形態の構造を示す模式的に示す斜視図である。図 2 は、図 1 内の平面 α で細胞培養チップ 1 を切断したときの模式的な断面図である。

[0025] 本実施形態において、細胞培養チップ 1 は、底部 3 と本体 5 とを備える。本体 5 には、離間した位置に 2 つの貫通孔が形成されており、これらの貫通孔の一方の面が底部 3 と接触することで、ウェル 2 1 及びウェル 2 2 が形成されている。また本体 5 は、底部 3 側の面に、一对の細管状の凹部を有しており、この凹部と底部 3 との間の領域によって培養チャンバ 1 1 が形成されている。培養チャンバ 1 1 は、一方の端部がウェル 2 1 に連結され、他方の端部がウェル 2 2 に連結されている。

[0026] すなわち、培養チャンバ 1 1 は、本体 5 の一部と底部 3 の一部からなる壁部によって周囲が覆われ、ウェル 2 1 からウェル 2 2 に向かう方向 d 1 を長手方向とする細管状空間で構成される（図 3 参照）。例えば、図 3 において、ウェル 2 1 から細胞 4 1 を含む培養液 4 2 が注入されることで、培養チャンバ 1 1 内において細胞 4 1 が培養される。

[0027] 本体 5 及び底部 3 は、実施的に非多孔質体の材料で構成される。ここで、

「実質的に非多孔質体」であるとは、媒体の見かけ状の表面積が、実際の表面積に近似している状態を指す。より詳細には、本体5及び底部3のうち、少なくとも培養チャンバ11の壁部を構成する領域のBET比表面積が $10\text{ m}^2/\text{g}$ 以下である。

[0028] 上記のような非多孔質体を形成する材料の例としては、ガラスやシリコンなどの無機材料、又はポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、シクロオレフィンコポリマー（COC）、シクロオレフィンポリマー（COP）、ポリスチレン（PS）などの樹脂材料が挙げられる。なお、これらの樹脂材料が2種以上組み合わせられていても構わない。

[0029] 本体5及び底部3は、好ましくは光透過性を有する材料で構成される。例えば、本体5及び底部3が上記の樹脂材料で構成された場合、細胞41を細胞培養チップ1の外側から視認することができる。

[0030] 培養チャンバ11は、長手方向d1、すなわちウェル21からウェル22に向かう方向に直交する平面で切断したときの形状の内接円c11の直径D11が、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下の範囲であるような形状を示す（図4参照）。

[0031] 寸法の一例は以下の通りである（図5参照）。底部3の高さ（厚み）w3は約 1 mm であり、好ましくは $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 2 mm 以下である。ウェル21の高さh21、及びウェル22の高さh22は、いずれも約 3 mm である。培養チャンバ11の高さ（流路高さ）h11は、約 $300\text{ }\mu\text{m}$ である。ウェル21及びウェル22の、底部3の面に平行な方向に係る面（開口面）の大きさは、直径 2 mm である。培養チャンバ11の長手方向に係る長さt11は、約 5.5 mm である。なお、上述したように、培養チャンバ11の高さh11は、内接円c11の直径D11に対応するため、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。

[0032] 図6は、培養チャンバ11の近傍を模式的に示す拡大図である。本発明の細胞培養チップ1は、培養チャンバ11の高さh11が、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下と極めて細く構成されている。このため、培養チャンバ11内

で培養されている細胞 4 1 から生理活性物質 4 5 が放出された場合、細胞 4 1 から離れた場所まで拡散することなく、培養チャンバ 1 1 の壁部、すなわち本体 5 の内壁面に衝突する。そして、この壁部は、上述したように、非多孔質体で構成されているため、生理活性物質 4 5 をほとんど吸収することなく、細胞 4 1 側へと戻すことができる。この結果、細胞 4 1 に対する生理活性物質 4 5 の自己作用の影響を正しく評価することができる。

[0033] これに対し、例えば図 7 に示すように、高さの高い培養チャンバ 6 1 内で細胞 4 1 を培養した場合には、細胞 4 1 から放出された生理活性物質 4 5 が、培養チャンバ 6 1 の壁面に衝突するまでに大きく拡散してしまい、細胞 4 1 側に再帰させることのできる量が減少してしまう。また、図 8 に示すように、高さが十分短い場合であっても、多孔質体で壁部が構成された培養チャンバ 6 2 内で細胞 4 1 が培養される場合には、細胞 4 1 から放出された生理活性物質 4 5 が、培養チャンバ 6 2 の壁部で吸収されてしまい、やはり細胞 4 1 側に再帰させることのできる量が減少してしまう。図 7 又は図 8 に示される構成によれば、生理活性物質 4 5 を十分に細胞 4 1 自身に作用させることができないため、生体に近い環境を正しく模擬することができない。

[0034] [実施例]

以下、実施例を参照して説明する。

[0035] <検証 1 A>

図 9 A は、底部 3 及び本体 5 の構成材料を異ならせて同一寸法の細胞培養チップ 1 を製造し、培養チャンバ 1 1 内で細胞 4 1 を培養した場合の、培養日数ごとの死細胞数をグラフ化したものである。図 9 A において、横軸は培養日数を示し、縦軸は死細胞数を示す。なお、いずれの例においても、培養チャンバ 1 1 の寸法を、 $400\mu\text{m} \times 800\mu\text{m} \times 9\text{mm}$ とした。細胞 4 1 の死細胞数は、細胞を含む培養液とトリパンブルー染色液とを 1 : 1 で混和した後、血球計算盤を用いて染色された死細胞数を計測した。

[0036] 実施例 1 は、底部 3 及び本体 5 の双方をシクロオレフィンポリマー (COP) で形成した場合に対応する。比較例 1 は、底部 3 及び本体 5 の双方をポ

リジメチルシロキサン（PDMS）で形成した場合に対応する。

[0037] COPは、酸素透過係数が $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 程度であり、吸水率が0.01%程度である。なお、JIS K 7126-1（差圧法）に準拠した方法で得られた、室温37℃におけるCOPの酸素透過係数の実測値は、 $5.5 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ であった。

[0038] また、PDMSは、酸素透過係数が $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 程度であり、吸水率が1%程度である。なお、JIS K 7126-1（差圧法）に準拠した方法で得られた、室温37℃におけるPDMSの酸素透過係数の実測値は、 $6.4 \times 10^{-8} \text{ cm}^3 \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ であった。

[0039] なお、細胞41としては、ヒトiPS細胞が用いられた。

[0040] 図9Aによれば、比較例1の場合、実施例1と比較して死細胞数が高いことが確認される。このことから、培養チャンバ11を取り囲む壁部の材料によって、細胞41の活性状態への影響が左右されることが分かる。

[0041] 図9Aの結果より、周囲の壁部をCOPで形成した培養チャンバ11を含む実施例1の方が、細胞41から放出された生理活性物質45を細胞41に再作用できていることが分かる。一方、前記壁部をPDMSで形成した培養チャンバを含む比較例1によれば、細胞41から放出された生理活性物質45を十分に細胞41に戻すことができず、生体環境が構築できていないことが示唆される。

[0042] <検証1B>

検証1Aと同様に、底部3及び本体5の構成材料を異ならせて同一寸法の細胞培養チップ1を製造し（実施例1、比較例1）、培養チャンバ11内で細胞41を培養した。図9Bは、このときの培養状態を示す写真である。なお、図9Bに示す写真は、5日間培養されたときの状態を示している。なお、図9Bには、死細胞を目立たせる目的で、培養チャンバ11内を染色した後の写真も併せて表示されている。

[0043] なお、検証１Ｂにおいても、実施例１、及び比較例１における各培養チャンバ１１の寸法は、 $400\mu\text{m}\times 800\mu\text{m}\times 9\text{mm}$ とした。染色に際しては、細胞を含む培養液とトリパンブルー染色液とを１：３で混和した後に培養チャンバ１１にこの混合液を導入することで、細胞４１を染色した。染色後の写真では、黒く表示されている箇所が多いほど、死細胞数が多いことを示している。

[0044] 図９Ｂの写真によれば、比較例１の方が、実施例１よりも黒く表示されている箇所が多く、死細胞数が多いことが分かる。すなわち、この検証１Ｂによれば、検証１Ａと同様の結果が確認される。

[0045] <検証２>

ポリジメチルシロキサン（PDMS）、シクロオレフィンポリマー（COP）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリスチレン（PS）、及びポリカーボネート（PC）からなる各種樹脂を、蛍光色素溶液（ナイルレッド）、及び抗がん剤液（ドキソルビシン）に対してそれぞれ浸漬し、各溶液の吸着量を蛍光強度によって観察した。この結果を、図１０及び図１１に示す。なお、両図では、比較のために、白板ガラスを各溶液に対して浸漬した場合も示している。

[0046] より具体的には、所定の計測容器内に $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のナイルレッド水溶液及び、 $20\mu\text{M}$ の濃度のドキソルビシン水溶液を収容し、それぞれ 37°C の温度に設定した状態で、各材料からなるサンプル（寸法は $75\text{mm}\times 25\text{mm}\times 1\text{mm}$ ）を溶液に応じた適切な時間だけ浸漬させた。具体的な浸漬時間は、ナイルレッド水溶液を１０分間とし、ドキソルビシン水溶液を２４時間とした。次に、純水によって前記サンプルを複数回洗浄した後、窒素パージによって乾燥させた。その後、各サンプルに対して、波長 480nm の励起光を照射して、 $550\text{nm}\sim 700\text{nm}$ の波長範囲内の蛍光の強度を測定した。蛍光の強度が高いことは、乾燥後のサンプルに薬剤が含まれる量が多いことを意味する。

[0047] 図１０及び図１１によれば、PDMSは、他の樹脂材料と比べて、薬剤の

吸着性が高いことが確認される。このことは、PDMSが多孔質性を示し、材料を吸収する傾向が高いことを示す。

[0048] つまり、検証1及び検証2の結果を総合すると、PDMSで培養チャンバ11の周囲を覆う壁部を形成した場合、細胞41から放出された生理活性物質45が壁部内に吸収された結果、細胞41に対して再作用させることのできる生理活性物質45の量が低下したことが分かる。これに対し、COP、PMMA、PS、及びPCからなる樹脂によって、培養チャンバ11の周囲を覆う壁部を構成することで、細胞41から放出された生理活性物質45の吸収量が抑制され、細胞41自身に再作用できることが分かる。

[0049] なお、ポリスチレン（PS）は、酸素透過係数が $10^{-10} \sim 10^{-9} \text{ cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ 程度であり、吸水率が0.01%程度である。なお、JIS K 7126-1（差圧法）に準拠した方法で得られた、室温37℃におけるPSの酸素透過係数の実測値は、 $1.6 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$ であった。

[0050] 以下の表1は、上記のシクロオレフィンポリマー（COP）、ポリスチレン（PS）のに加えて、ポリカーボネート（PC）、シクロオレフィンコポリマー（COC）の酸素透過係数の値を示すものである。

[0051] [表1]

材料	酸素透過係数 [$\text{cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$]
ポリカーボネート（PC）	$10^{-10} \sim 10^{-9}$
シクロオレフィンコポリマー（COC）	$10^{-12} \sim 10^{-10}$
シクロオレフィンポリマー（COP）	$10^{-12} \sim 10^{-10}$
ポリスチレン（PS）	$10^{-10} \sim 10^{-9}$

[0052] PSの実測値、及び表1に示す値によれば、COP以外の材料である、PC、COC、PSであっても、PDMSよりは低い酸素透過係数を示すことが確認される。

[0053] <検証3>

培養チャンバ11の高さ h_{11} を $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $400\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 、 $600\mu\text{m}$ 、 $800\mu\text{m}$ と異ならせて、培養チャンバ11内に細胞41を培養した場合の培養状態を比較した。このときの写真を図12に示す。

[0054] 細胞41としては、ヒトiPS細胞が用いられ、また培養液42としては、ヒトES/iPS細胞維持培地 (TeSR-E8) が用いられた。各写真は、細胞41を 37°C の下で5日間培養した後に撮影されたものである。

[0055] また、死細胞数を比較するため、図9の計測時に使用された方法と同様に、図12の各培養液をトリパンブルー染色液を用いて染色した。この染色後の写真を図13に示す。図13の写真では、黒く表示されている箇所が多いほど、死細胞数が多いことを示している。

[0056] また、図14は、図13に示す死細胞数と流路高さ h_{11} との関係をグラフ化したものである。図14において、横軸は流路高さ h_{11} を示し、縦軸は死細胞密度を示す。死細胞密度は、計測された死細胞数を培養チャンバ11の面積で除した値に対応する。

[0057] 図12によれば、培養チャンバ11の高さ h_{11} が $100\mu\text{m}$ の場合、 $200\mu\text{m}$ 以上の場合と比較して、細胞が十分に増殖されていないことが分かる。これは、培養チャンバ11の高さ h_{11} があまりに小さすぎた結果、増殖された細胞同士が極めて密接した状態で存在することになり、十分に増殖できなかったものと推察される。

[0058] また、図13及び図14によれば、培養チャンバ11の高さ h_{11} が $600\mu\text{m}$ 以上である場合には、死細胞数が顕著に増加していることが分かる。これは、培養チャンバ11の高さ h_{11} が大き過ぎた結果、各細胞41から放出された生理活性物質が、当該細胞41に十分に再帰されずに拡散したことで、十分な生体環境が構築できていないことが示唆される。

[0059] 以上、図12～図14の結果に基づけば、培養チャンバ11の高さ h_{11} は、 $200\mu\text{m}$ 以上、 $500\mu\text{m}$ 以下とするのが好ましいことが確認される。

[0060] <検証4>

培養チャンバの形状や材質が細胞の酵素活性に与える影響について検証を行った。より具体的には、肝臓細胞HepaRG（登録商標）（BIOPREDIC International社製）を各培養チャンバ（比較例2，比較例3，実施例2）内で、分化誘導培地にて2週間培養した後、P450-Glo（登録商標）CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA, Lot: 0000333082（Promega Corporation社製）を使用して、酵素CYP3A4の活性を発光法により評価した。

[0061] 比較例2は、従来から培養試験に使用されているポリスチレン（PS）製の96ウェルマルチウェルプレート（ヌンク社製）である。

比較例3は、底部3及び本体5の双方をPDMSで形成し、高さh11を250 μ mとした、培養チャンバに対応する（図5参照）。

実施例2は、底部3及び本体5の双方をCOPで形成し、高さh11を250 μ mとした、培養チャンバ11に対応する（図5参照）。

[0062] 図15は、この検証4における結果を示すグラフである。図15において、縦軸の「Lum/Cell」は、細胞数あたりの発光量であり、細胞あたりの酵素活性の程度に対応する。すなわち、細胞数あたりの発光量が大きいということは、酵素CYP3A4の活性が高いことを示している。

[0063] 上述したように、PDMSと比べると、PSとCOPは酸素透過係数が共に低い。そして、図15によれば、比較例2よりも実施例2の方が、酵素活性が高いことが分かる。この理由としては、比較例2の培養チャンバが、実施例2の培養チャンバと比較して充分大きいことが挙げられる。

[0064] すなわち、比較例2の場合、細胞数に対して、培養される空間及び培地量が大きすぎたことで、肝細胞から放出された生理活性物質が培養液中に拡散した結果、細胞周辺の生理活性物質の濃度が低下し、効能が十分得られなかったものと考えられる。一方、実施例2の場合、培養チャンバ11の高さh11がミクロンオーダー（250 μ m）と小さいため、肝細胞から放出された生理活性物質が細胞周辺にとどまり、細胞機能を向上させることが可能な

濃度を維持することができたものと考えられる。

[0065] また、図 15 によれば、比較例 3 と実施例 2 を比較すると、培養チャンバ 11 の高さ h_{11} が同等であるにもかかわらず、実施例 2 の方が酵素活性が高いことが分かる。この理由としては、検証 1 A 及び検証 1 B における検証結果と同様、比較例 3 の培養チャンバ (PDMS) の酸素透過係数が、実施例 2 の培養チャンバ (COP) の酸素透過係数よりも大幅に高いことが要因として挙げられる。

[0066] すなわち、比較例 3 の場合、培養チャンバの壁部を構成する材料の物質透過性が高く、材料分子間に生理活性物質が吸収されてしまった結果、細胞周辺の生理活性物質の濃度が低下し、肝細胞に対して生理活性物質を再帰させる作用が十分に得られなかったためと考えられる。これに対し、実施例 2 では、培養チャンバの壁部を構成する材料の物質透過性が低く、肝細胞から放出された生理活性物質を細胞周辺に留められたことで、細胞機能を向上させることが可能な濃度を維持することができたためと考えられる。

[0067] 以上、検証 4 から、物質を透過しにくい材料で構成された微小空間内で細胞培養することで、細胞から放出された有効成分を細胞に回帰させることにより、細胞機能を向上させることが可能となることが確認された。

[0068] [別実施形態]

以下、別実施形態について説明する。

[0069] <1> 上記実施形態では、本体 5 及び底部 3 の構成材料の例として、シクロオレフィンポリマー (COP)、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリスチレン (PS)、及びポリカーボネート (PC) を例示した。しかし、培養チャンバ 11 の周囲を覆う壁部が、非多孔質体であれば、これらの材料には限定されない。ただし、光透過性に優れる上、射出成形による製造が可能となるという観点から、上記材料で構成されるのが好ましく、吸水率が低いという観点から、特にシクロオレフィンポリマー (COP) が好ましい。

[0070] なお、本体 5 と底部 3 とは別の材料で構成されていても構わない。

- [0071] 〈2〉培養チャンバ11は同一の平面上に複数個配置されていても構わない。一例として、本体5と底部3との間の位置において、複数箇所に独立して凹部が設けられており、各凹部によって、ウェル21と、ウェル22と、これらのウェル(21, 22)に連結された培養チャンバ11とが形成されているものとしても構わない。かかる構成により、異なる条件下で複数の細胞41を培養することができ、効率的な実験が可能となる。
- [0072] 〈3〉細胞培養チップ1は、培養チャンバ11に対して細胞41を含む培養液42を注入することができればよく、この限りにおいてウェル(21, 22)を必ずしも備えなくても構わない。
- [0073] 〈4〉上記実施形態では、培養チャンバ11と、各ウェル(21, 22)とが、底部3の上面を共通の底面である場合について説明した。しかし、この態様は一例である。ただし、細胞培養チップ1の製造工程を容易化すると共に、細胞培養チップ1のサイズを極めて小型化することができるという点において、培養チャンバ11及び各ウェル(21, 22)の底面が共通化されるのが好ましい。

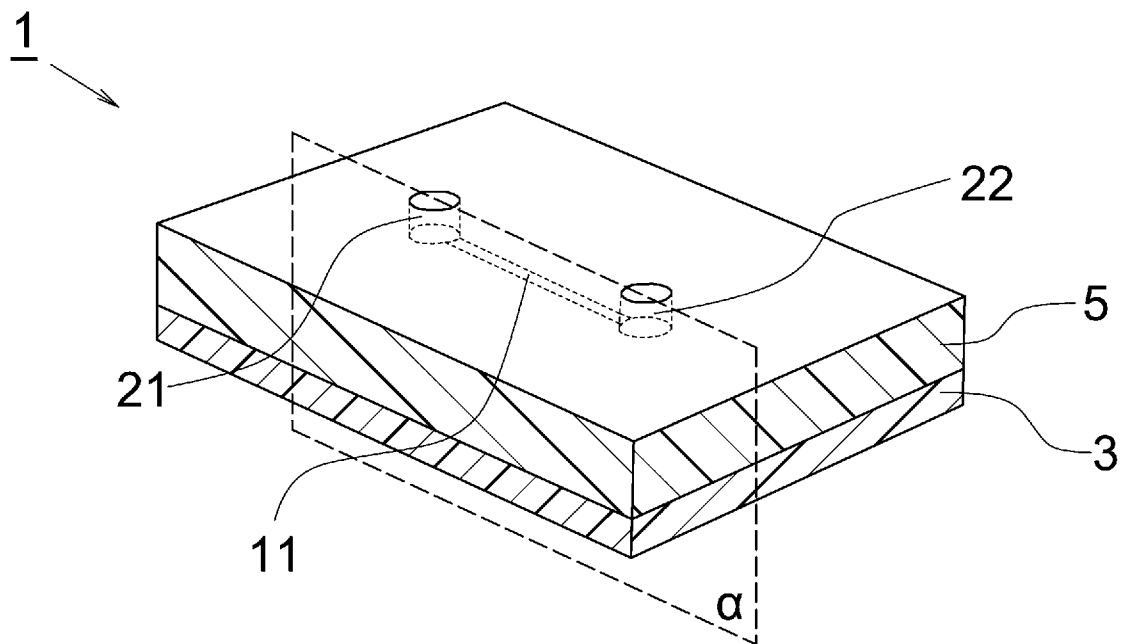
符号の説明

- [0074]
- | | | |
|----|---|---------|
| 1 | : | 細胞培養チップ |
| 3 | : | 底部 |
| 5 | : | 本体 |
| 11 | : | 培養チャンバ |
| 21 | : | ウェル |
| 22 | : | ウェル |
| 41 | : | 細胞 |
| 42 | : | 培養液 |
| 45 | : | 生理活性物質 |
| 61 | : | 培養チャンバ |
| 62 | : | 培養チャンバ |

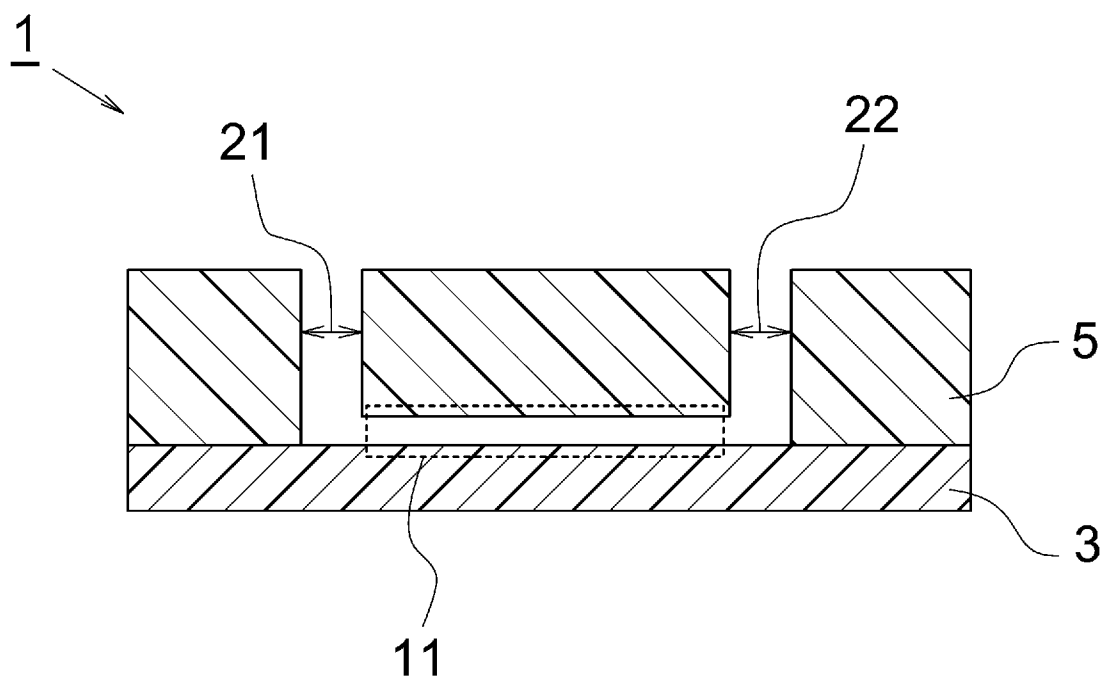
請求の範囲

- [請求項1] 実質的に非多孔質体の材料からなる壁部と、
前記壁部に覆われ、長手方向に延伸する細管状空間からなる培養チャンバとを備え、
前記培養チャンバを前記長手方向に直交する平面で切断したときの形状の内接円が、直径 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下の範囲であることを特徴とする、細胞培養チップ。
- [請求項2] 前記壁部は、吸水率が 0.5% 以下であることを特徴とする、請求項1に記載の細胞培養チップ。
- [請求項3] 前記壁部は、 25°C における酸素透過係数が $10^{-9}\text{ cm}^3(\text{STP})\text{ cm}/(\text{cm}^2\cdot\text{sec}\cdot\text{cmHg})$ 以下であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の細胞培養チップ。
- [請求項4] 前記壁部は、光透過性を有する材料からなることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞培養チップ。
- [請求項5] 前記壁部は、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンコポリマー、ポリスチレン、及びシクロオレフィンポリマーからなる群より選ばれた1種又は2種以上の樹脂材料からなることを特徴とする、請求項4に記載の細胞培養チップ。
- [請求項6] 前記壁部は、 25°C における酸素透過係数が $10^{-12}\sim 10^{-10}\text{ cm}^3(\text{STP})\text{ cm}/(\text{cm}^2\cdot\text{sec}\cdot\text{cmHg})$ の範囲内であり、シクロオレフィンポリマーからなる樹脂材料からなることを特徴とする、請求項5に記載の細胞培養チップ。

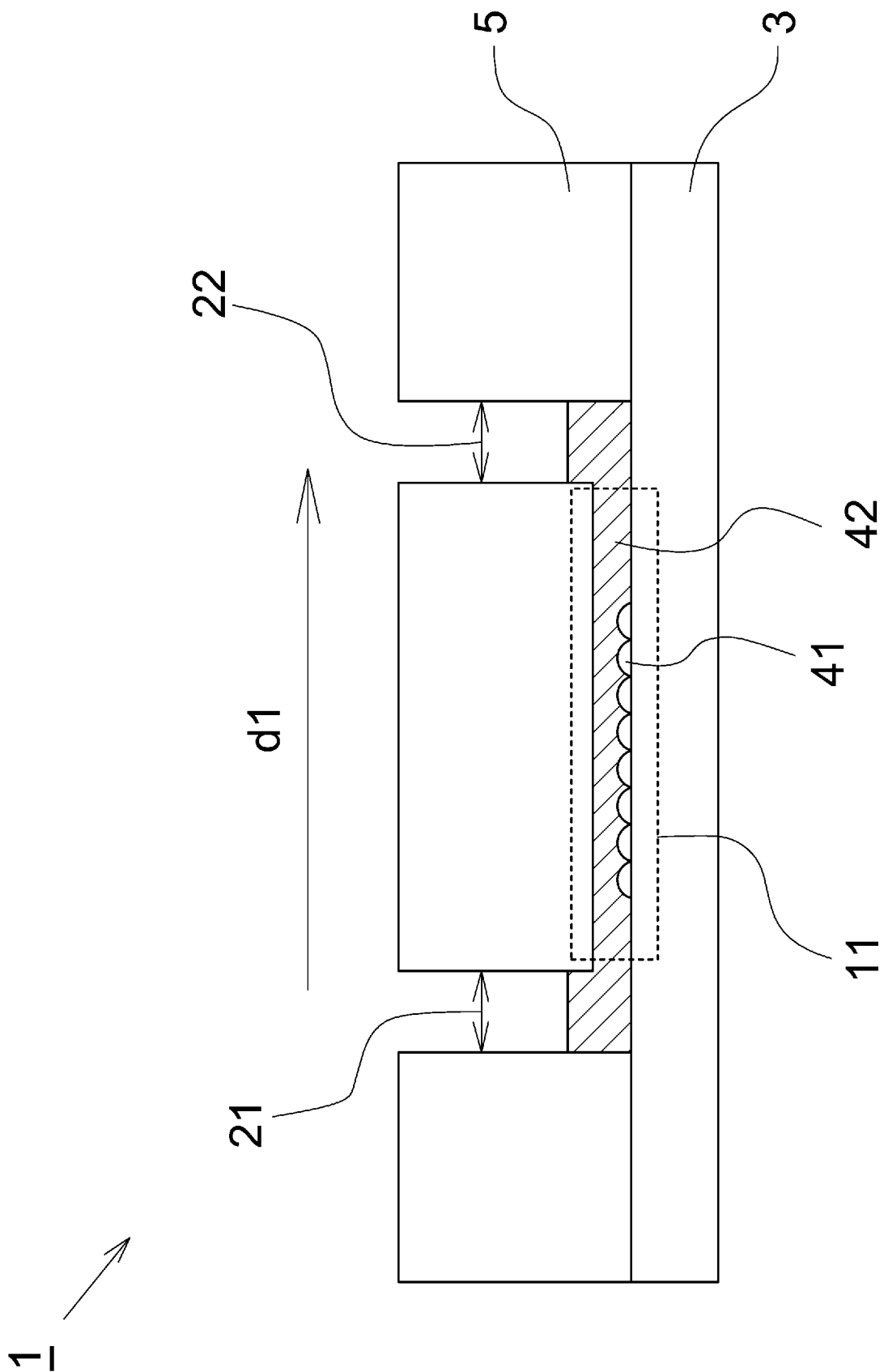
[図1]



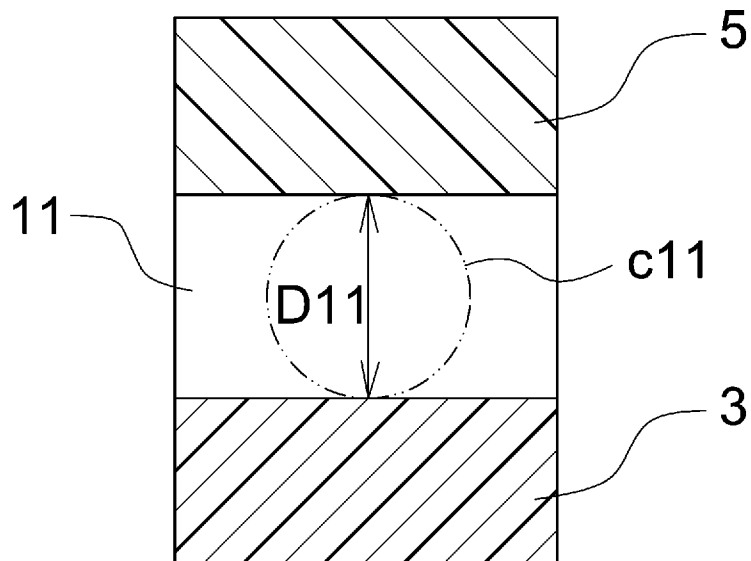
[図2]



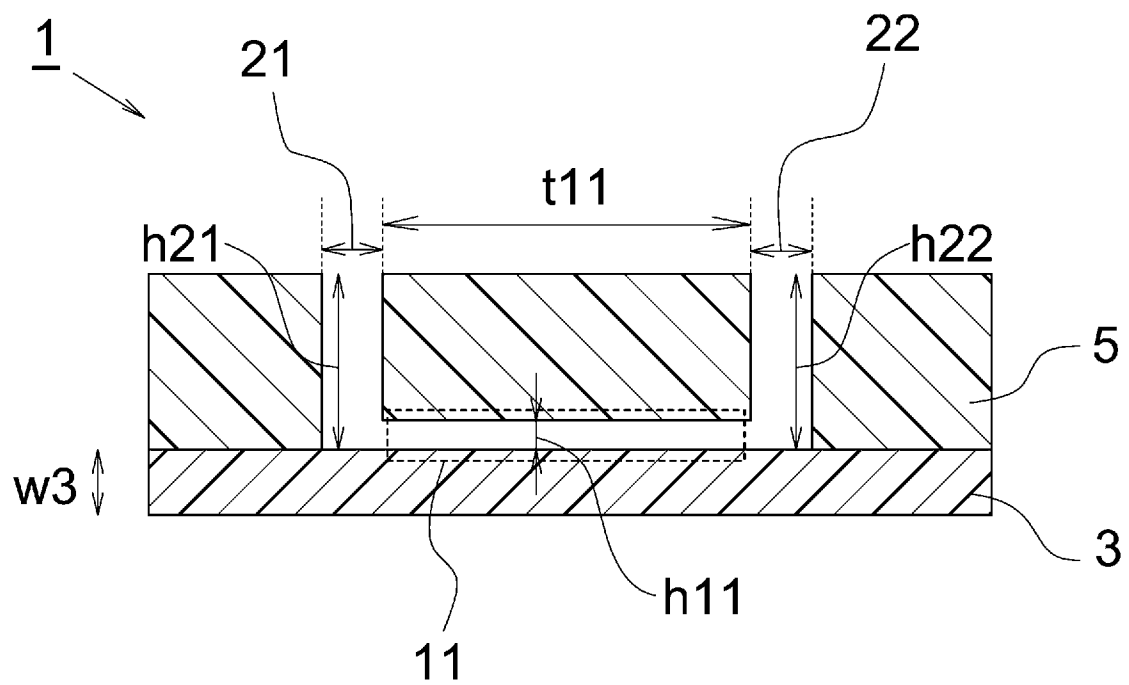
[図3]



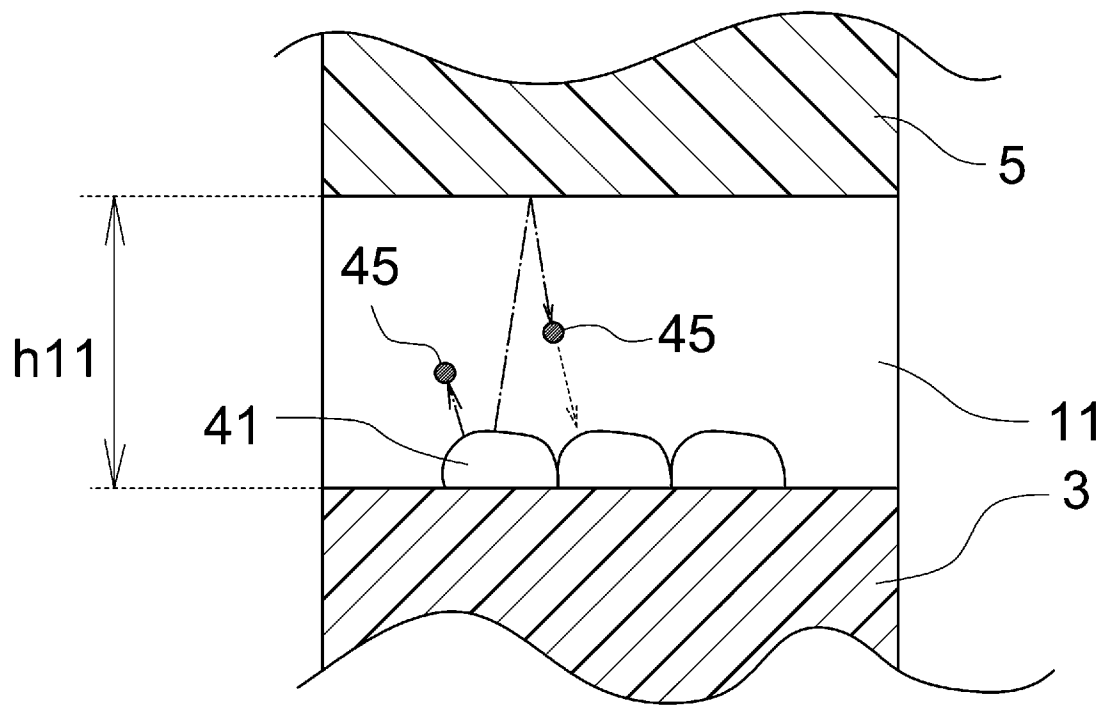
[図4]



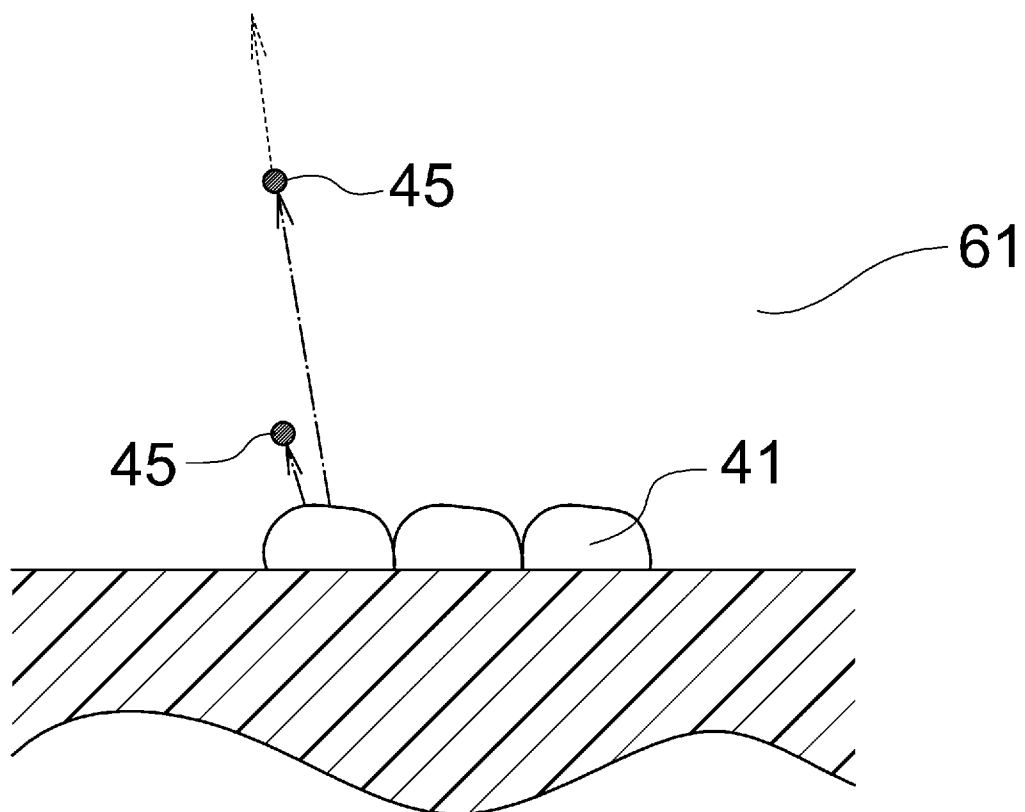
[図5]



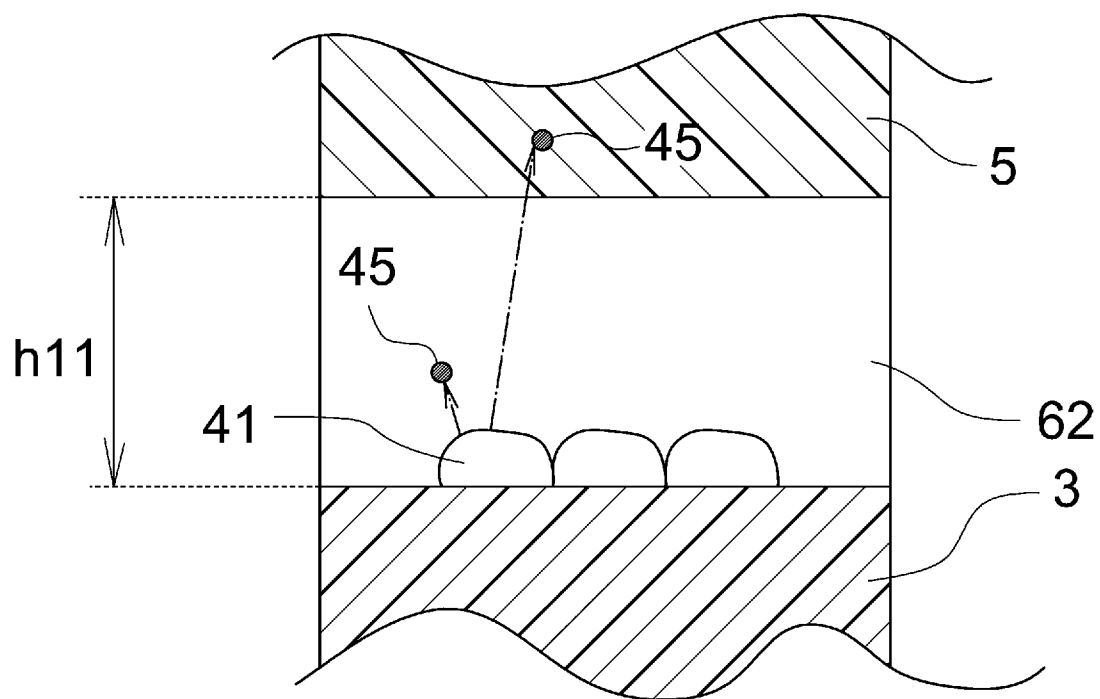
[図6]



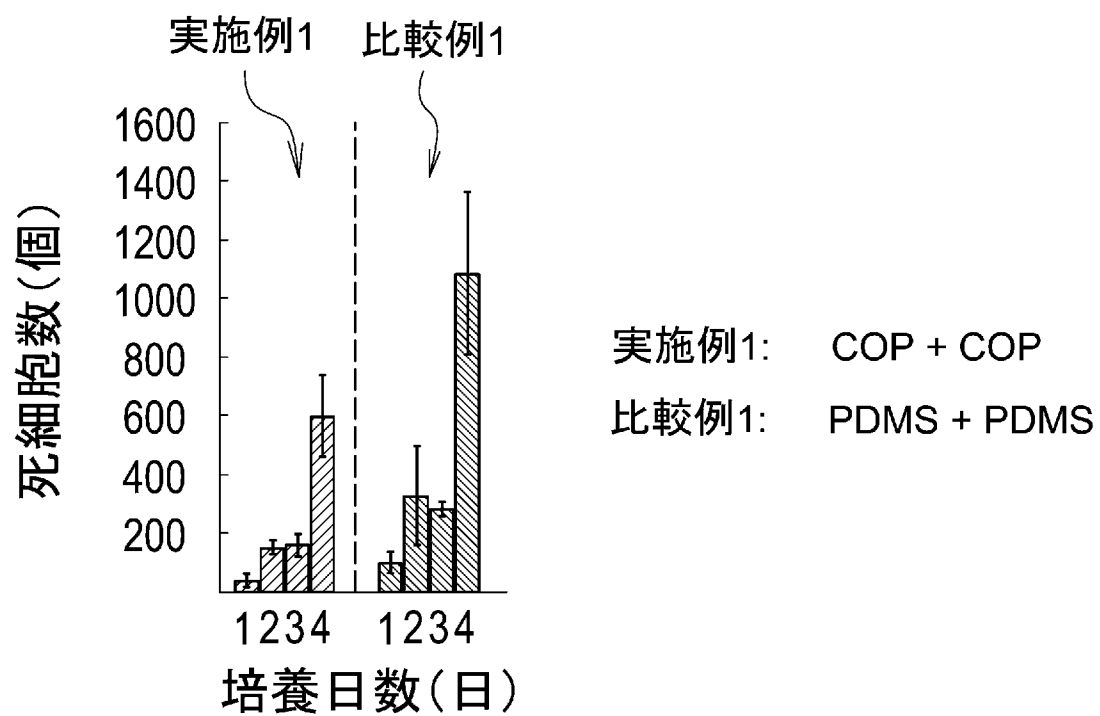
[図7]



[図8]

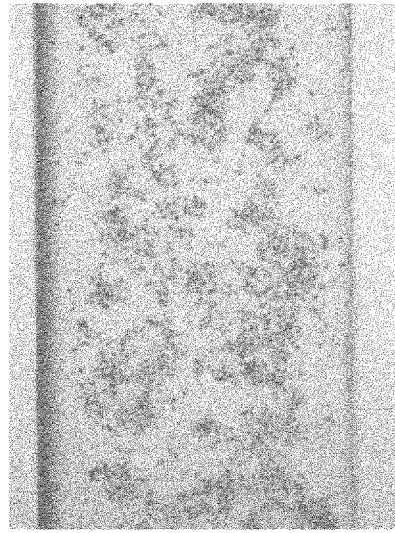
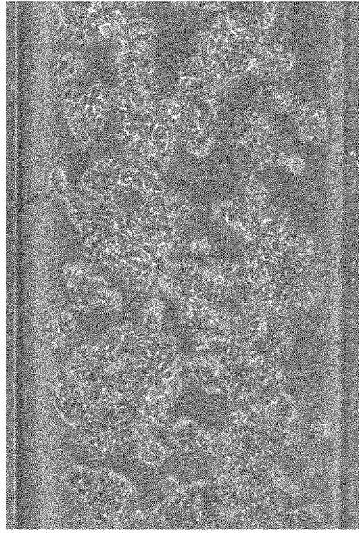


[図9A]

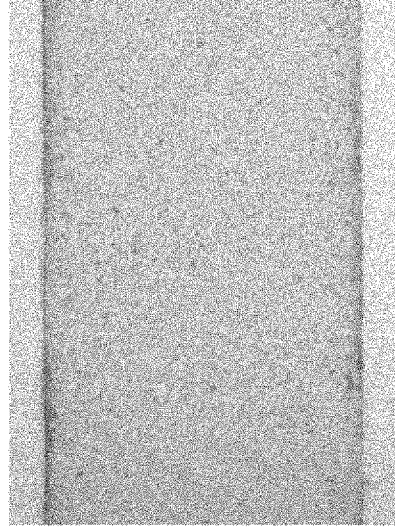
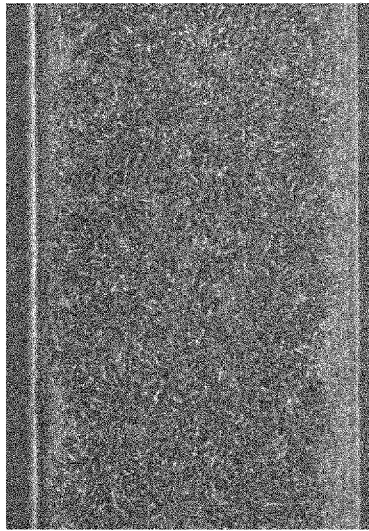


[図9B]

比較例1
(PDMS + PDMS)



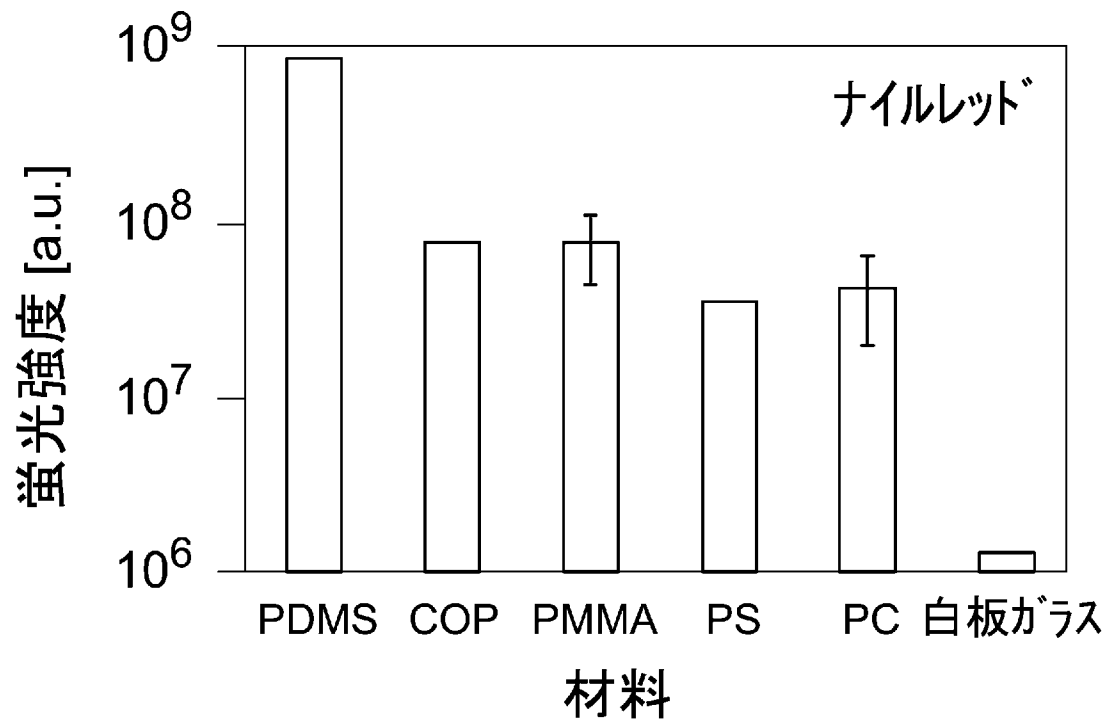
実施例1
(COP + COP)



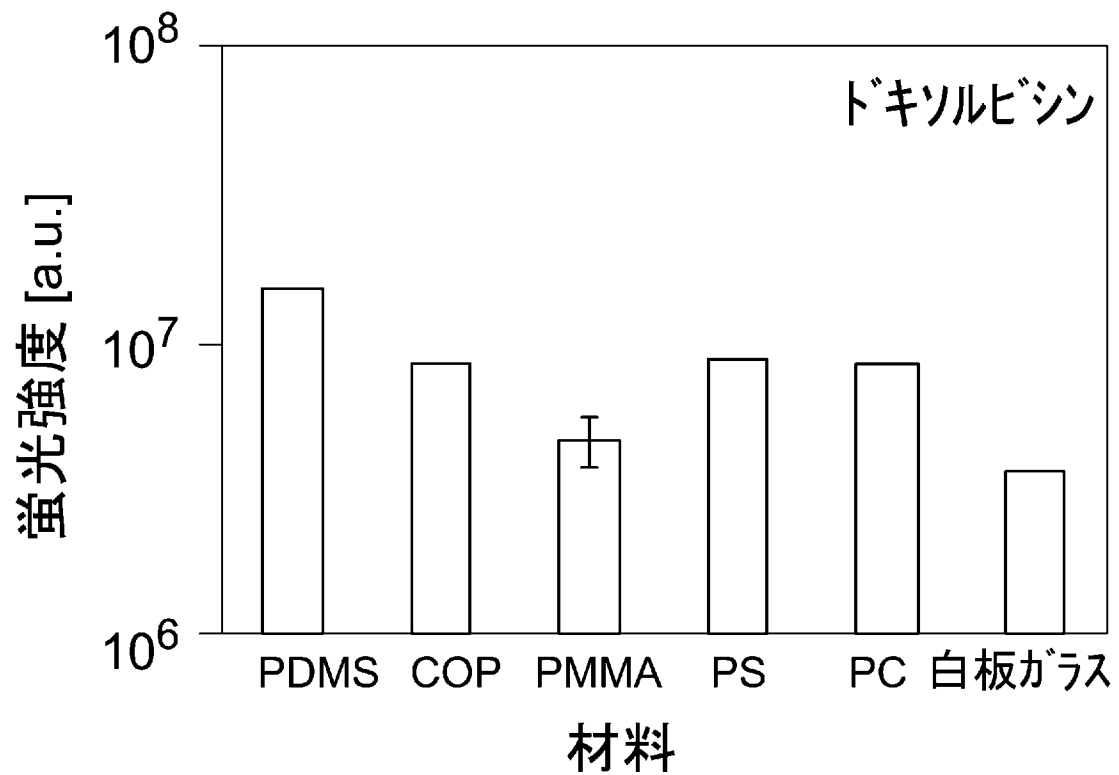
培養状態の写真

染色後の写真

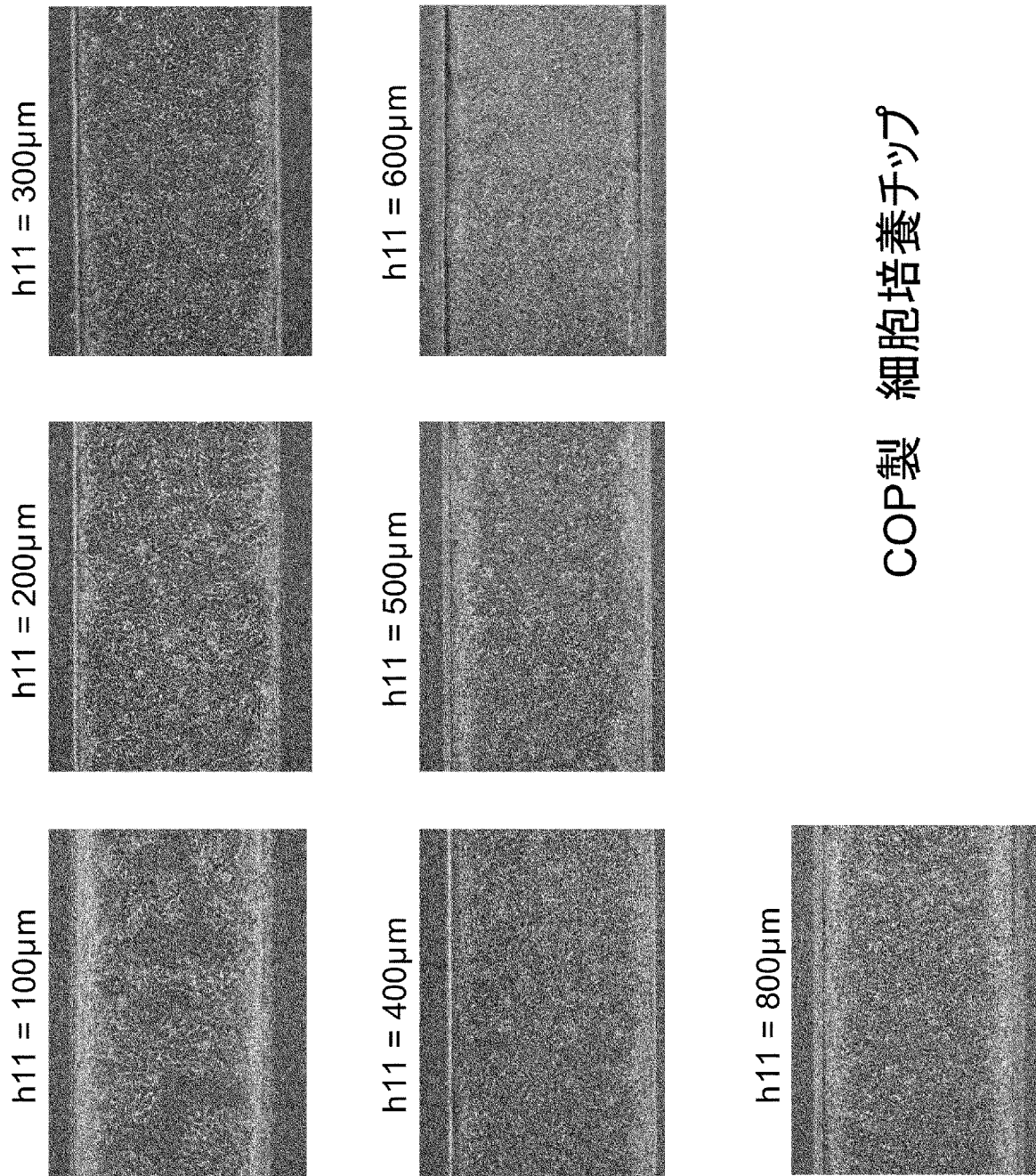
[図10]



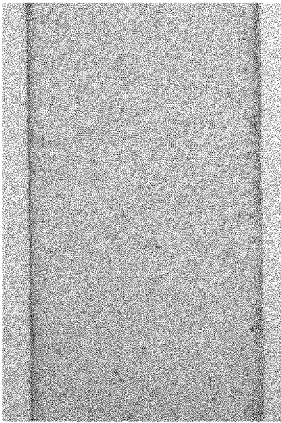
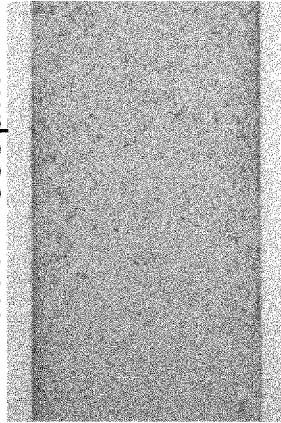
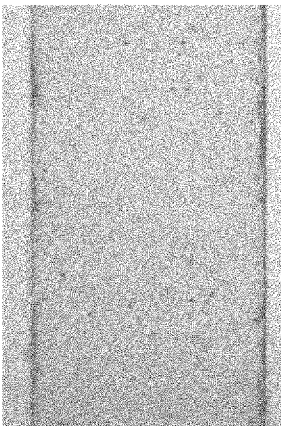
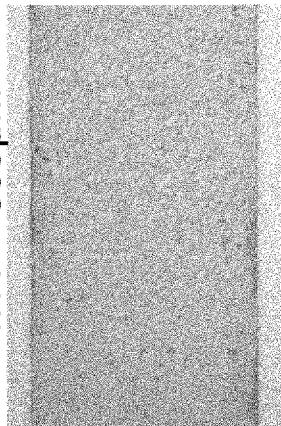
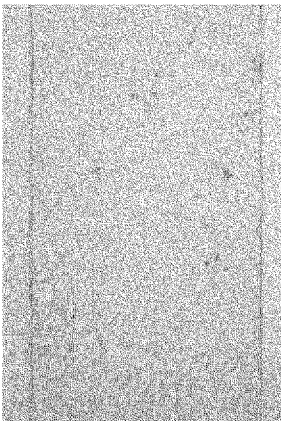
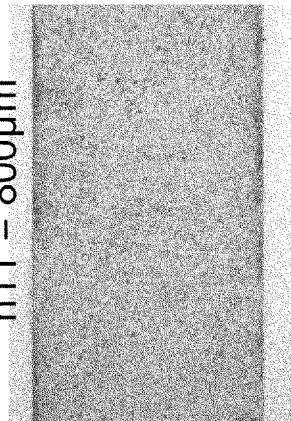
[図11]



[図12]

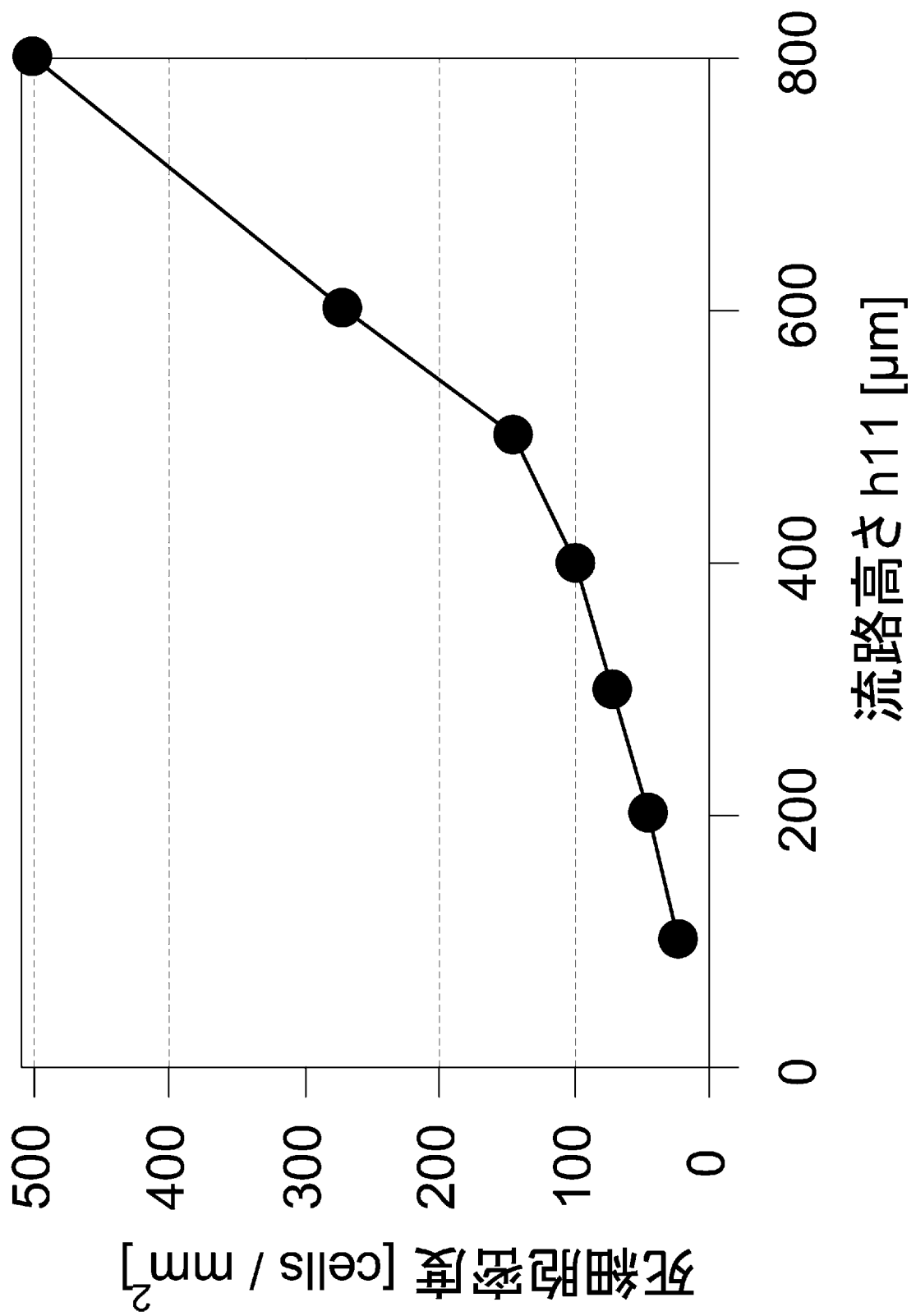


[図13]

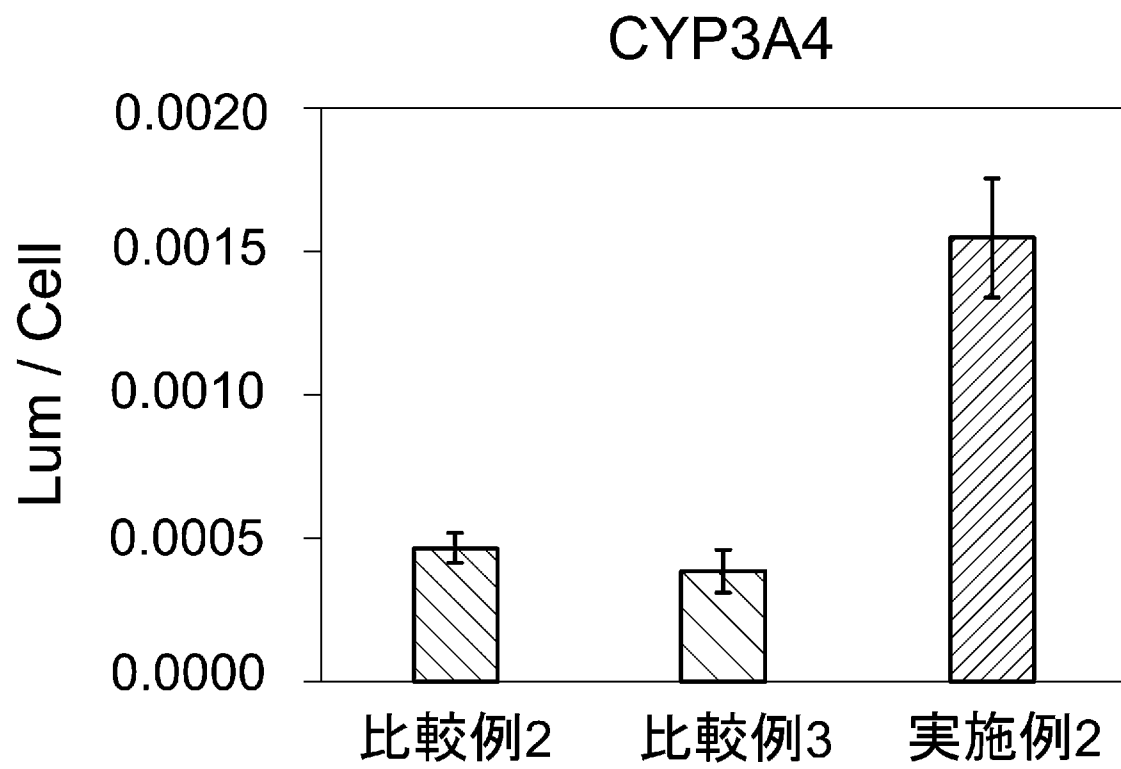
h11 = 300 μ mh11 = 600 μ mh11 = 200 μ mh11 = 500 μ mh11 = 100 μ mh11 = 400 μ mh11 = 800 μ m

COP製細胞培養チップ

[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/043128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 3/00 (2006.01) i

FI: C12M3/00 A

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00-3/10

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 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2017-533725 A (AIM BIOTECH PTE., LTD.) 16.11.2017 (2017-11-16) claims 1, 3, paragraphs [0002], [0026]-[0027], fig. 4	1-6
X	JP 2005-103423 A (FUJI KAGAKU KK, STARLITE CO., LTD.) 21.04.2005 (2005-04-21) claim 4, paragraphs [0001]-[0002], [0004]	1-6
X	JP 2018-515146 A (INTECRYPT B.V.) 14.06.2018 (2018- 06-14) claim 1, paragraphs [0038], [0043]-[0044]	1-5
A	WO 2015/129673 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 03.09.2015 (2015-09-03) entire text	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"I" 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

17 January 2020 (17.01.2020)

Date of mailing of the international search report

28 January 2020 (28.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/043128

Patent referred in the Report	Documents in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2017-533725 A		16 Nov. 2017	US 2018/0327700 A1 claims 1, 3, paragraphs [0002]- [0006], [0044]- [0045], fig. 4 WO 2016/076795 A1 EP 3218300 A1 KR 10-2017-0078841 A CN 107108199 A (Family: none)	
JP 2005-103423 A		21 Apr. 2005	US 2018/0141047 A1 claim 1, paragraphs [0042], [0047]-[0048] WO 2016/186503 A1 EP 3298125 A1 CN 107980057 A	
JP 2018-515146 A		14 Jun. 2018	US 2016/0369218 A1 entire text EP 3112450 A1	
WO 2015/129673 A1		03 Sep. 2015		

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 FI: C12M3/00 A														
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）） C12M1/00-3/10 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> 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 (JDreamIII); PubMed			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
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												
X	JP 2017-533725 A (エーアイエム バイオテック ピーティーイー、リミテッド) 16.11.2017 (2017 - 11 - 16) 請求項 1 及び 3, [0002], [0026] - [0027], 図 4	1-6												
X	JP 2005-103423 A (富士化学株式会社, スターライト工業株式会社) 21.04.2005 (2005 - 04 - 21) 請求項 4, [0001] - [0002], [0004]	1-6												
X	JP 2018-515146 A (インテクリプト・ペー・フェー) 14.06.2018 (2018 - 06 - 14) 請求項 1, [0038], [0043] - [0044]	1-5												
A	WO 2015/129673 A1 (国立大学法人京都大学) 03.09.2015 (2015 - 09 - 03) 全文	1-6												
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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	"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	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
* 引用文献のカテゴリー	"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													
"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	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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														
国際調査を完了した日 17.01.2020	国際調査報告の発送日 28.01.2020													
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） 鈴木 崇之 4B 4152 電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

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/JP2019/043128

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2017-533725	A	16.11.2017	US 2018/0327700 A1 Claims 1 and 3, [0002]- [0006], [0044]-[0045], Fig. 4 WO 2016/076795 A1 EP 3218300 A1 KR 10-2017-0078841 A CN 107108199 A	
JP	2005-103423	A	21.04.2005	(ファミリーなし)	
JP	2018-515146	A	14.06.2018	US 2018/0141047 A1 Claim 1, [0042], [0047]- [0048] WO 2016/186503 A1 EP 3298125 A1 CN 107980057 A	
WO	2015/129673	A1	03.09.2015	US 2016/0369218 A1 全文 EP 3112450 A1	