

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6983180号
(P6983180)

(45) 発行日 令和3年12月17日(2021.12.17)

(24) 登録日 令和3年11月25日(2021.11.25)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 M 3/00 (2006.01) C 1 2 M 3/00 A

請求項の数 24 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2018-559754 (P2018-559754)	(73) 特許権者	516065504
(86) (22) 出願日	平成29年5月11日 (2017.5.11)		ユニヴェルシテ グルノーブル アルブ
(65) 公表番号	特表2019-518443 (P2019-518443A)		フランス共和国、38400 サン マル
(43) 公表日	令和1年7月4日 (2019.7.4)		タン デール、アヴェニュー セントラー
(86) 国際出願番号	PCT/FR2017/051148		ル 621
(87) 国際公開番号	W02017/194894	(73) 特許権者	502124444
(87) 国際公開日	平成29年11月16日 (2017.11.16)		コミッサリア ア レネルジー アトミー
審査請求日	令和2年5月8日 (2020.5.8)		ク エ オ ゼネルジ ザルタナティヴ
(31) 優先権主張番号	16/54213		フランス国 エフー75015 パリ、
(32) 優先日	平成28年5月11日 (2016.5.11)		バテイマン ル ポナン、リュ ルブラ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)		ン 25
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞共培養チップ及びその製造に関するプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 中央ユニット(105)であって、
 - 少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた、上面(2)及び下面(3)を備える、非吸収性膜から成る支持体(1)である、支持体(1)と、
 - 上面(6)及び下面(7)を備え且つ少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)であって、前記少なくとも1つの突起が、外面(9)及び内面(10)を備え、且つ3Dナノ構造膜(5)の上面(6)の側上でレリーフ構造を形成し、前記3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記下面(7)が、前記支持体(1)の前記上面(2)に固定されて位置付けられる、
 - 又は、3Dナノ構造膜(5)の前記上面(6)が、前記支持体(1)の前記下面(3)に固定されて位置付けられ、
 - 前記3Dナノ構造多孔質膜(5)及び少なくとも1つの突起(8)が、2つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、3Dナノ構造多孔質膜(5)と、
 - を含む、中央ユニット(105)と、
- ベース(106)であって、
 - 前記中央ユニット(105)が、前記ベース(106)に統合され且つ前記ベース(106)によって全体を形成する、ベース(106)と、
 - を備える中央モジュール(104)を含むマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 2】

- 中央ユニット（１０５）であって、
- 少なくとも１つの穿孔（４）によって穴のあいた、上面（２）及び下面（３）を備える、非吸収性膜から成る支持体（１）である、支持体（１）と、
- 上面（６）及び下面（７）を備え且つ少なくとも１つの突起（８）を備える３Ｄナノ構造多孔質膜（５）であって、前記少なくとも１つの突起が、外面（９）及び内面（１０）を備え、且つ３Ｄナノ構造膜（５）の上面（６）の側上でレリーフ構造を形成し、
前記３Ｄナノ構造多孔質膜（５）の前記下面（７）が、前記支持体（１）の前記上面（２）に固定されて位置付けられ、
前記３Ｄナノ構造多孔質膜（５）及び少なくとも１つの突起（８）が、２つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、３Ｄナノ構造多孔質膜（５）と、
を含む、中央ユニット（１０５）と、
- ベース（１０６）であって、
前記中央ユニット（１０５）が、前記ベース（１０６）に統合され且つ前記ベース（１０６）によって全体を形成する、ベース（１０６）と、
を備える中央モジュール（１０４）を含む、請求項１に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項３】

- 中央ユニット（１０５）であって、
- 少なくとも１つの穿孔（４）によって穴のあいた、上面（２）及び下面（３）を備える、非吸収性膜から成る支持体（１）である、支持体（１）と、
- 上面（６）及び下面（７）を備え且つ少なくとも１つの突起（８）を備える３Ｄナノ構造多孔質膜（５）であって、前記少なくとも１つの突起が、外面（９）及び内面（１０）を備え、且つ３Ｄナノ構造膜（５）の上面（６）の側上でレリーフ構造を形成し、
３Ｄナノ構造膜（５）の前記上面（６）が、前記支持体（１）の前記下面（３）に固定されて位置付けられ、
前記３Ｄナノ構造多孔質膜（５）及び少なくとも１つの突起（８）が、２つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、３Ｄナノ構造多孔質膜（５）と、
を含む、中央ユニット（１０５）と、
- ベース（１０６）であって、
前記中央ユニット（１０５）が、前記ベース（１０６）に統合され且つ前記ベース（１０６）によって全体を形成する、ベース（１０６）と、
を備える中央モジュール（１０４）を含む請求項１に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項４】

前記支持体（１）が、バイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はＳＵ８から成る、請求項１又は２に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項５】

前記突起が、円形ベース（１３）を有する中空ドームの形状である、請求項１、２及び４の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項６】

支持体（１）の前記少なくとも１つの穿孔（４）が、
直径 d_1 （穿孔の上部直径 d_1 ）、及び、穿孔（４）の上部セクション（１１）の中心を通り抜け且つ前記支持体（１）に垂直な軸（ x ）を有する、支持体（１）の上面での円形形状セクション（１１）（穿孔の上部セクション）と、
直径 d_2 （穿孔の下部直径 d_2 ）、及び、穿孔の下部セクションの中心を通り抜け且つ前記支持体（１）に垂直な軸（ w ）を有する、支持体（１）の下面（３）での円形形状セクション（１２）（穿孔の下部セクション）と、を有し、前記軸（ x ）及び（ w ）が組み合わされ、

直径 d_1 が $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上の値から $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下の値であり、直径 d_2 が $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上

10

20

30

40

50

の値から 500 μm 以下の値であり、

直径 d2 の値が直径 d1 の値以上であり、

前記突起 (8) の前記円形ベース (13) が直径 d3 (突起の円形ベースの直径 d3) を有し、突起 (8) の前記直径 d3 が 10 μm の値から 500 μm の値であり、d1 未満、等しい又は大きい値からであり、前記突起が、1 から 600 μm の高さを有する、請求項 5 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの突起 (8) の前記内面 (10) が全体において又は部分的に、前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) に面している、請求項 6 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

10

【請求項 8】

- 前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) の上部直径 d1 の値が前記少なくとも 1 つの突起 (8) の直径 d3 の値以上であり、前記円形ベース (13) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記穿孔 (4) の上部セクション (11) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (x) とが組み合わされるとき；又は、

- 前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) の上部直径 d1 の値が前記少なくとも 1 つの突起 (8) の直径 d3 の値より大きく、前記円形ベース (13) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記穿孔 (4) の上部セクション (11) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (x) とが $[(d1 \text{ の値} - d3 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき；

20

前記少なくとも 1 つの突起 (8) の前記内面 (10) が全体において、前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) に面している、請求項 7 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 9】

前記突起 (8) の外面 (9) が少なくとも 1 つの接着細胞を支え、前記突起 (8) の内面 (10) が少なくとも 1 つの接着細胞を支える、請求項 6 から 8 の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 10】

前記突起 (8) の前記外面 (9) が合流の段階で第 1 のセットの接着細胞を支え、前記第 1 のセットが間質細胞のセットであり、前記突起 (8) の前記内面 (10) が合流の段階で第 2 のセットの接着細胞を支え、前記第 2 のセットが上皮細胞のセットである、請求項 9 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

30

【請求項 11】

少なくとも 2 つの突起 (8) を備え、2 つの隣接する突起間の距離が値 l であり、前記値 l が 10 から 100 μm であり、

1 cm^2 の中央ユニットの表面に関する突起 (8) の最大数が以下の式に等しく、

【数 1】

$$\frac{\pi (d3/2)^2}{(l + d3) - \pi (d3/2)^2}$$

40

l が 2 つの隣接する突起 (8) 間の距離であり、前記値 l が 10 から 100 μm であり、

d3 が前記突起 (8) の円形ベース (13) の直径である、請求項 6 から 10 の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 12】

3D ナノ構造多孔質膜 (5) がポリ (4 - スチレンスルホン酸ナトリウム) (PSS)、ポリ (エチレンイミン)、ポリ (ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ポリ (

50

アクリルアミド - c o - ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド、ポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)、ポリアネトールスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリ(スチレン - a l t - マレイン酸)、ポリビニル硫酸塩、ポリビニルスルホン酸、ポリ(2 - アクリルアミド - 2 - メチル - 1 - プロパンスルホン酸)、ポリ(2 - アクリルアミド - 2 - メチル - 1 - プロパンスルホン酸 - c o - アクリロニトリル)、ポリ(4 - スチレンスルホン酸)、ポリ(4 - スチレンスルホン酸 - c o - マレイン酸)、水和4 - スチレンスルホン酸ナトリウム塩の内から選択される高分子電解質の少なくとも1つの層から成り、

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)が、少なくとも2つの連続する層から成り、正に帯電した高分子電解質から成る層が、負に帯電した高分子電解質から成る層と交互になっている、請求項6から11の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

10

【請求項13】

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)が、互いに交互になっているポリ(4 - スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)及び/又はポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)の15個の連続する層から成る、請求項12に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項14】

- 上面、下面及び少なくとも1つの側面を含む下部ユニット(108)であって、

上部オリフィスの中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)を有する直径d4の上部オリフィス(15)及び直径d5の下部オリフィス(16)を備える少なくとも1つの管状形状ダクト(14)を備える、下部ユニット(108)と、

20

- ベース(109)であって、

前記下部ユニット(108)が前記ベース(109)において統合され、前記ベース(109)によって全体を形成し、

前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値が前記ダクト(14)の前記下部オリフィス(16)の直径d5の値以上であり、直径d4の前記値が前記少なくとも1つの穿孔(4)の下部直径d2の値以上であり、

前記下部ユニット(108)の前記上面が少なくとも1つのダクトの前記上部オリフィス(15)を備え、前記下部オリフィス(16)が、それ自身で又は中間手段(17)によって、前記ベース(109)の外側につながる、ベース(109)と、

を備える、固体の下部モジュール(107)を含む、請求項6から13の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

30

【請求項15】

前記下部モジュール(107)及び前記中央モジュール(104)は、前記下部ユニット(108)の前記上面の、少なくとも1つのダクト(14)の上部オリフィス(15)が前記中央ユニット(105)の前記支持体(1)の前記穿孔(4)の内の少なくとも1つの上で開くように組み立てられ、少なくとも1つのダクト(14)の下部オリフィス(16)が、チップの外側にそれ自身で、又は、液体を回収することが可能であり且つ前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にするリザーバ(17)によって構成される中間手段を介して、つながり、

40

前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有し、前記下部ユニット(108)及び前記中央ユニット(105)が下部モジュール(109)の及び中央モジュール(106)の各々のベース上にそれぞれ位置する取付要素(204)によって組み立てられて、前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体(3)の前記下面を密封して組み立てる、請求項14に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項16】

- 前記穿孔(4)の下部直径d2の値が前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値と等しく、穿孔(4)の前記下部セクション(12)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(w)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(1

50

5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (t) とが組み合わされるとき ;
又は、

- 前記穿孔 (4) の下部直径 d 2 の値が前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の直径 d 4 の値未満であり、穿孔 (4) の前記下部セクション (1 2) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (w) と前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (t) とが組み合わされる、若しくは、 $[(d 4 \text{ の値} - d 2 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき ;

前記少なくとも 1 つのダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) が前記支持体 (1) の 1 つの単一の穿孔 (4) につながり、前記支持体 (1) の前記穿孔 (4) が全体において、前記少なくとも 1 つのダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面している、請求項 1 4 又は 1 5 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

10

【請求項 1 7】

前記下部モジュール (1 0 7) が少なくとも 2 つのダクト (1 4) を備え、

少なくとも 2 つのダクト (1 4) の各々の上部オリフィス (1 5) が穿孔 (4) につながり、且つ、

- 少なくとも 2 つのダクト (1 4) の少なくとも 2 つの下部オリフィス (1 6) が少なくとも 2 つの異なるサイトへそれぞれ、チップの外側につながる、又は、

- 少なくとも 2 つのダクト (1 4) の内のすべて、の少なくとも 2 つの下部オリフィス (1 6) が、液体を回収することが可能であり且つ前記下部モジュール (1 0 7) のベース (1 0 9) の外側につながる出口ダクト (1 8) を介してチップの外側への輸送を可能にする、リザーバ (1 7) によって構成される 1 つの同じ中間手段につながる、請求項 1 4 から 1 6 の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

20

【請求項 1 8】

- 開放容積 (チャンバ) (2 0 3) を画定する固体の表面から成る、固体の且つ中空の上部ユニット (1 0 2) であって、固体の表面の端が、前記中央モジュール (1 0 4) の前記中央ユニット (1 0 5) と接触し且つ前記開放容積の開口部の表面を区切ることが可能である、固体の且つ中空の上部ユニット (1 0 2) と ;

- ベース (1 0 3) であって、

前記上部ユニット (1 0 2) が、前記ベース (1 0 3) に統合され且つ前記ベース (1 0 3) によって全体を形成する、ベース (1 0 3) と、

30

を備える上部モジュール (1 0 1) を含む、請求項 1 4 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 1 9】

前記上部モジュール (1 0 1) の前記上部ユニット (1 0 2) 及び前記中央モジュール (1 0 4) の前記中央ユニット (1 0 5) は、前記上部ユニット (1 0 2) の開口部の前記表面が前記中央ユニット (1 0 5) の 3 D ナノ構造多孔質膜 (5) の前記上面 (6) 上に位置付けられように組み立てられて、

前記上部ユニット (1 0 2) の前記固体の表面及び 3 D ナノ構造多孔質膜 (5) の前記上面 (6) によって区切られる閉鎖空間を形成し、

前記上面 (6) 及び開口部の前記表面が、互いに同一形状及び同一表面を有し、

40

前記上部モジュール (1 0 1) の前記上部ユニット (1 0 2) 及び前記中央モジュール (1 0 4) の前記中央ユニット (1 0 5) が、上部モジュール (1 0 1) の及び中央モジュール (1 0 4) の各々のベース (1 0 3 、 1 0 6) 上に位置する取付要素 (2 0 1 、 2 0 4) によって組み立てられて、前記上部ユニット (1 0 2) の開口部の前記表面及び前記中央ユニット (1 0 5) の 3 D ナノ構造多孔質膜 (5) の前記上面 (6) を密封して組み立て、

有利には前記上部ユニット (1 0 2) の前記少なくとも 1 つの固体面が、入口 / 出口ダクト (2 0 2) へそれぞれにつながる 2 つのオリフィスを有し、

前記閉鎖空間が、ベース (1 0 9) の外側につながる前記入口 / 出口ダクト (2 0 2) を介して前記マイクロ流体チップの外側と連通することを可能にする、請求項 1 8 に記載

50

のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 20】

上部モジュール（101）、中央モジュール（104）及び下部モジュール（107）を備え、上記前記モジュールは、前記上部モジュール（101）の前記上部ユニット（102）の開口部の前記表面が、前記中央モジュール（104）の前記中央ユニット（105）の3Dナノ構造多孔質膜（5）の前記上面（2）の上に位置付けられ、

前記下部モジュール（107）の前記下部ユニット（108）の前記上面の、少なくとも1つのダクト（14）の上部オリフィス（15）が、前記中央ユニット（105）の前記支持体（1）の前記穿孔（4）の内の少なくとも1つの上で開いており、

前記上部ユニット（102）の開口部の前記表面及び前記中央ユニット（105）の3Dナノ構造多孔質膜（5）の前記上面（2）が、互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記下部ユニット（108）の前記上面及び前記中央ユニット（105）の前記支持体（3）の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記上部モジュール（101）、前記中央モジュール（104）及び前記下部モジュール（107）が、各々の個別のベース（103、106、109）上に位置する取付要素（201、204）によって組み立てられる、ように組み立てられる、請求項18又は19に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 21】

前記少なくとも1つの突起（8）の前記内面（10）が全体において、前記支持体（1）の前記少なくとも1つの穿孔（4）に面してあり；

- 前記少なくとも1つの穿孔（4）の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起（8）の直径d3の値以上であり、前記円形ベース（13）の中心を通り抜け且つ前記支持体（1）に垂直な軸（y）と前記穿孔（4）の上部セクション（11）の中心を通り抜け且つ前記支持体（1）に垂直な軸（x）とが組み合わされ；又は、

- 前記少なくとも1つの穿孔（4）の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起（8）の直径d3の値より大きく、前記円形ベース（13）の中心を通り抜け且つ前記支持体（1）に垂直な軸（y）と前記穿孔（4）の上部セクション（11）の中心を通り抜け且つ前記支持体（1）に垂直な軸（x）とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なり；

前記突起（8）の前記内面（10）が全体において、前記ダクト（14）の前記上部オリフィス（15）に面している、請求項20に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【請求項 22】

前記中央モジュール（104）の前記中央ユニット（105）の製造が：

- 前記支持体（1）の少なくとも1つの穿孔（4）を通して、再吸収性高分子溶液（22）を押し出して、前記支持体（1）の前記上面（2）の側上で少なくとも1つの3Dナノ構造（23）を形成するステップと、その後

- 前記再吸収性高分子溶液を重合して前記少なくとも1つの3Dナノ構造（23）を固くするステップであって、前記少なくとも1つの3Dナノ構造（23）が重合後に前記支持体の前記上面の側上で再吸収性高分子モールド（22）を形成する、ステップと、その後

- 前記支持体（1）の上面（2）及び前記再吸収性高分子モールド（22）の表面を覆う少なくとも1つの高分子電解質の少なくとも1つの連続した層を適用して、3Dナノ構造多孔質膜（5）を構成するステップと、よって、

- 前記再吸収性高分子モールドを溶解させて、前記支持体（1）の前記上面（2）に固定されて位置付けられた前記3Dナノ構造多孔質膜（5）の前記下面（7）、及び全体において前記少なくとも1つの穿孔（4）に面して位置付けられる少なくとも1つの突起（8）の前記内面（10）を得るステップと、

を備える、請求項2及び6から13の何れか一項に記載のマイクロ流体細胞培養チップを製造するための方法。

【請求項 23】

中央ユニットを備える中央モジュールの製造が：

(i) 中央ユニットの形式においてサイドフレーム (2 1 3)、開いた上面 (2 1 4)、及び、切断部 (2 1 6) を備える固体の下面 (2 1 5)、から成る支持体部分 (I、i)、並びに、上面 (2 0 9) 上に少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造 (2 0 8) を備える、前記支持体部分 (I、i) の形状及び寸法におけるモールド (H、H 1、H 2、h 1、h 2) を組み立てるステップと、

(i i) 前記モールド (H、H 1、H 2、h 1、h 2) の前記上面 (2 0 9) 上に再吸収性高分子溶液 (2 2) を注ぐステップ (図 6 1) と、その後

(i i i) 前記再吸収性高分子溶液 (2 2) を重合して、前記再吸収性高分子溶液を固くし、前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の少なくとも 1 つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス (2 1 0) を形成するステップと、その後

(i v) 前記モールド (H、H 1、H 2、h 1、h 2) を除去して、前記支持体部分 (I、i) の固体の下面 (2 1 5) の前記切断部 (2 1 6) において形成される前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス (2 1 0) を得るステップと、その後

(v) ベース (1 0 6) において統合された少なくとも 1 つの穿孔 (4) によって穴のあいた非吸収性膜 (1) から成る支持体を備える、穿孔部分 (G、G 1、G 2、g 1、g 2) によって、前記支持体部分 (I、i) を組み立てるステップであって、

前記穿孔部分 (G、G 1、G 2、g 1、g 2) が前記支持体部分 (I、i) の形状及び寸法であり、前記穿孔部分 (G、G 1、G 2、g 1、g 2) の穿孔 (4) の数がステップ (i) において用いられる前記モールド (H、H 1、H 2、h 1、h 2) における成形された 3 D ナノ構造 (2 1 1) の数と同一であり、

前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) が、前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の前記少なくとも 1 つの負のモールドと位置合わせされる、ステップと、その後

(v i) 前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) で前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス (2 1 0) の下面 (2 1 2) と前記支持体 (1) の下面 (3) とから成る連続した表面上に少なくとも 1 つの高分子電解質の少なくとも 1 つの連続した層を適用して、少なくとも 1 つの突起 (8) を備える 3 D ナノ構造多孔質膜 (5) を構成するステップと、その後

(v i i) 前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス (2 1 0) を溶解させるステップと、

(v i i i) 支持体部分 (I、i) を除去して、その下面 (3) 上で 3 D ナノ構造多孔質膜 (5) を、その上面の側上で前記少なくとも 1 つの突起を備える前記穿孔部分 (G、G 1、G 2、g 1、g 2) を得るステップと、

を備える、請求項 3 に記載のマイクロ流体細胞培養チップを製造するための方法。

【請求項 2 4】

前記支持体 (1) の前記穿孔 (4) が全体において、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面しており、

前記突起 (8) の前記円形ベース (1 3) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (t) とが、組み合わされ、又は、d 4 の値が d 2 の値より大きいとき $[(d 4 \text{ の値} - d 3 \text{ の値}) / 2]$ 以下の距離によって互いに異なり、

前記突起 (8) の前記内面 (1 0) が全体において、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面している、請求項 2 0 又は 2 1 に記載のマイクロ流体細胞培養チップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、「モジュール」との用語によって各々参照され且つ 2 つずつ組み立てられる

10

20

30

40

50

可能性のある、複数の部品を備えるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0002】

本発明はまた、前記チップを製造するためのプロセス、及び、診断の分野におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

チップ上で臓器を真似る目的で発展した多数の現在のデバイスは、2D膜から成る。

【0004】

2011年10月13日に出願されたIngber等による特許US8647861B2において、著者は、組織/組織界面にて生体内で存在する機械的応力を再現するために、膜の周りで差圧を生成するし、そのためその膨張又は収縮を発生させること可能にさせる、手段を備えた、膜のいずれかの上で接着細胞の共培養を可能にさせる有機模倣デバイスを発展させた。このデバイスは、2つのマイクロ流体ダクトの界面で、ポリジメチルシロキサン(PDMS)で作製された柔軟な多孔質膜を備えるマイクロ流体システムに基づき、前記膜に沿って流体の循環を可能にさせ、特に呼吸の間の肺胞を真似ることを可能にさせる。

10

【0005】

2012年2月28日に出願されたIngber等による特許US2014/0038279A1において、著者は、自然の腸上皮構造を再現しその挙動を真似ることを可能にさせる細胞共培養システムを提案する。マイクロ流体システムに基づいたこの有機模倣デバイスは、前記膜に沿った流体の循環を可能にさせる2つのマイクロ流体ダクトの界面に位置付けられたPDMS多孔質膜を備え、その上で腸上皮細胞の層が側面の内の少なくとも1つの上で培養される。支持体要素による膜の結合は、少なくとも1つの寸法において膜を長くする動きにつながるもので、生体内での組織の動きを再現することを可能にさせる。

20

【0006】

これらのデバイスが組織/組織界面及び生体内に存在する機械的応力を再現することを可能にさせて、臓器の微細構造を真似る場合でさえ、細胞共培養物は、2D媒体上に残り、特定の臓器のトポグラフィーを再現することを可能にさせない。

【0007】

30

2013年に、Kim等は、Integr. Biol., 5, 1130、「Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation」というタイトルの彼らの出版物において、有機模倣マイクロ流体チップを提案し、そのため、腸において生体内で形成されるもののような、3D腸絨毛を再現することを可能にさせる。マイクロ流体システムに基づいたこのチップは、前記膜に沿った流体の循環を可能にさせる2つのマイクロ流体ダクトの界面に位置付けられたPDMS多孔質膜を備え、30µLの媒体の一定の流れの存在下で2日の培養を超えて絨毛を自発的に形成するCaco-2腸上皮細胞がその上で培養される。

【0008】

40

しかしながらすべてのこれらのデバイスは、生体適合性(慣性、多孔性)の観点から最適でない、PDMS多孔質膜上で細胞共培養を提案する。PDMSは、小さな有機成分、薬も吸収し得、特定の用途を妨げ得るガスに対する透過性有し得る。さらに、PDMS膜は、組織の自然の基底膜のようなものとは異なる固有の輸送、機械的及び構造的特性を有し得る。これらのタイプの界面を再現することによって、著者は、臓器の微細構造を再現することを好む。

【0009】

2014年では、March等は、「Differentiating Intestinal Stem Cells in a 3D Niche」というタイトルの彼らの出版物において、Caco-2及びHT29-MTX腸上皮細胞の共培養等の、微絨毛

50

の３Ｄ形態を有し且つその表面上で異なるタイプの上皮細胞の共培養を支持することが可能なポリ乳酸グリコール酸構造を用いる体外腸モデルを提案する。このモデルは、生体内で腸へ同様の方法において微絨毛の表面上で細胞分化を得ることを可能にさせる。

【００１０】

そのため、特定の現在のデバイスが、臓器の微絨毛を真似ることを可能にさせる、ＰＤＭＳで又はＰＧＬＡで作製された、構造を有する場合でさえ、既知のマーカーの検出は、細胞の付着及び抗体を用いたマーキングの後で免疫蛍光によって行われるので、分析に関する細胞の溶解を意味する。

【００１１】

多数の出版物が、３Ｄ構造上での培養における細胞が、２Ｄにおいて培養された同じ細胞と同じ特性を有さないことに言及し；差異は、遺伝子及びタンパク質発現プロファイル、細胞の接着、増殖速度及び細胞分化において実際に観察される。加えて、Kim等がIntegr. Biol., 5, 1130「Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation」というタイトルの彼らの出版物において、２０１３年に示したように、細胞が２Ｄにおいてと３Ｄにおいて培養されるかにしたがって、細胞型の薬に対する代謝反応が異なる。彼らは、薬を代謝するシトクロム酵素Ｐ４５０の活性の、Transwell（登録商標）２Ｄ培養モデルと微絨毛を真似る３Ｄ構造を備える培養モデルとの間での比較を為し、２Ｄでは、培養の間に活性が変わらないままであり、一方で３Ｄでは、この活性は微絨毛の形成の間に増加しその後安定化することを示す。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

細胞培地のトポグラフィーは細胞の挙動に大きな影響を有するので、細胞培養の信頼できるモデルを発展させるために、細胞の生体内条件を、可能な限り正確に、再現することが重要である。

【００１３】

本発明では、発明者は、腺房／管状構造を有する臓器の微絨毛及び内腔の微小環境を真似る、細胞共培養マイクロ流体チップを発展させた。

【００１４】

本発明によるマイクロ流体チップは、折りたたみを備えるので、突起で前記膜のいずれかの側上で接着細胞がその上で培養される３Ｄ中空突起を形成する多孔性材料で作製される膜を備える。マイクロ流体システムによるこの膜の結合は、その培養の間に細胞分泌物を回収して、その構成を分析することを可能にさせる。

【００１５】

そのため、マーカーが付着細胞上の免疫マーキングによって検出されるので細胞の死を意味する（Kim等、２０１３年）従来技術とは逆に、本発明によるチップは、マイクロ流体システムによって回収される、突起上で培養される細胞の分泌物におけるこれらの検出を実行することを可能にさせる。

【００１６】

そのため、本発明によるチップは、経時的に細胞の生存率及び機能性を維持しつつ、生細胞上の分泌物を収集し、その結果として、動力学的研究を実行するための、数日さえ超える、培養の間の異なる時間に分泌物を収集することを可能にさせる。

【００１７】

これらの分泌物は、ペプチド、タンパク質、アミノ酸、miRNA、DNA、RNA等の細胞培養培地において分泌され得る分子すべてから成る。

【００１８】

これらの分泌物の分析プロファイルは、セクレトーム、つまり分泌物の成分の定性的及び定量的プロファイル、を得ることを可能にさせる。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は、以下を備える中央モジュール(104)を含むマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 中央ユニット(105)であって、
 - 少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた、上面(2)及び下面(3)を備える、非吸収性膜から成る支持体(1)と、
 - 上面(6)及び下面(7)を備え且つ少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)であって、前記少なくとも1つの突起が、外面(9)及び内面(10)を備え、且つ3Dナノ構造膜(5)の上面(6)の側上でレリーフ構造を形成し(図40)、

10

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記下面(7)が、前記支持体(1)の前記上面(2)に固定されて位置付けられる、

又は、3Dナノ構造膜(5)の前記上面(6)が、前記支持体(1)の前記下面(3)に固定されて位置付けられ、

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)及び少なくとも1つの突起(8)が、2つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、3Dナノ構造多孔質膜(5)と、を含む、中央ユニット(105)と、

- ベース(106)であって、

前記中央ユニット(105)が、前記ベース(106)に統合され且つ前記ベース(106)によって全体を形成する、ベース(106)と(図39及び40)。

20

【0020】

「非吸収性膜」との表現は、膜が、物理的プロセスによっても水性溶媒における化学的プロセスによっても除去されないことがあることを意味する。

【0021】

支持体に関する「穿孔」との表現は、一端から他へ支持体を通り抜ける開口部、つまり、下面と上面と間の支持体を通る開口部、を意味し、そのため、これらの2つの面間の連通を可能にさせる。

【0022】

前記支持体のこの穿孔は、前記支持体を通る空き空間を生み出し、前記支持体の上面でのセクション及び前記支持体の下面でのセクションによって特徴付けられる。

30

【0023】

3Dナノ構造多孔質膜に関する「突起」との表現は、前記3Dナノ構造多孔質膜の上面の側上で、レリーフ構造を形成する突出した突部を意味する。

【0024】

3Dナノ構造多孔質膜に関する「多孔性」との表現は、前記膜が、前記膜の上面から下面へ伸びる、2と10nmとの間の直径の、互いに相互接続した連続した細孔を含むことを意味する。これらの細孔は、膜を通るガス交換、及び、小さな分子が培地に含まれること(成長因子、血清タンパク質、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 等のイオン等の細胞の生存率を確保する栄養素)を可能にさせる。これらの細孔はまた、阻害物質、又は抗癌性分子、小さなRNAs(例えば、緩衝RNAs)、ホルモン(例えば、ジヒドロテストステロン)等の薬理学的分子を通り抜けさせることを可能にさせる。

40

【0025】

多孔質膜に関する「3Dナノ構造」との表現は、前記多孔質膜の上面上の、3次元である、少なくとも1つのレリーフ構造の存在を意味し、前記構造のスケールは約1ナノメートルである。

【0026】

前記支持体と前記膜との間の接続のタイプを意味する「固定された」との表現は、化学結合、並びに、疎水性及び静電相互作用が、密封された接続によって凝集して前記膜と前記支持体とを結合するために、前記支持体と前記膜との間で確立されることを意味する。

50

【 0 0 2 7 】

「ベース」との用語は、統合された前記ユニットである固体の部分を意味する。

【 0 0 2 8 】

ベースとユニットとの間の配置を特徴付けるために用いられる「全体を形成する」との表現は、ベース及びユニットが1つの単一の保持の一部と一緒に形成し、互いに分離されないことがあることを意味する。

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態によると、本発明は、以下を備える中央モジュール(104)を含むマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 中央ユニット(105)であって、10
 - 少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた、上面(2)及び下面(3)を備える、非吸収性膜から成る支持体(1)と、
 - 上面(6)及び下面(7)を備え且つ少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)であって、前記少なくとも1つの突起が、外面(9)及び内面(10)を備え、且つ3Dナノ構造膜(5)の上面(6)の側上でレリーフ構造を形成し(図40)、

前記3Dナノ構造膜(5)の前記下面(7)が、前記支持体(1)の前記上面(2)に固定されて位置付けられ、

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)及び少なくとも1つの突起(8)が、2つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、3Dナノ構造多孔質膜(5)と、を含む、中央ユニット(105)と、20

- ベース(106)であって、

前記中央ユニット(105)が、前記ベース(106)に統合され且つ前記ベース(106)によって全体を形成する、ベース(106)と(図39及び40)。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態によると、本発明は、以下を備える中央モジュール(104)を含むマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 中央ユニット(105)であって、30
 - 少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた、上面(2)及び下面(3)を備える、非吸収性膜から成る支持体(1)と、
 - 上面(6)及び下面(7)を備え且つ少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)であって、前記少なくとも1つの突起が、外面(9)及び内面(10)を備え、且つ3Dナノ構造膜(5)の上面(6)の側上でレリーフ構造を形成し、

前記3Dナノ構造膜(5)の前記上面(6)が、前記支持体(1)の前記下面(3)に固定されて位置付けられ、

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)及び少なくとも1つの突起(8)が、2つの異なる細胞型の培養に適した材料から成る、3Dナノ構造多孔質膜(5)と、を含む、中央ユニット(105)と、

前記中央ユニット(105)が、前記ベース(106)に統合され且つ前記ベース(106)によって全体を形成する。40

【 0 0 3 1 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記マイクロ流体細胞培養チップのナノ構造多孔質膜の前記少なくとも1つの突起(8)が中空ドームの形状であり且つ円形ベース(13)を有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 0 3 2 】

突起の形状に関する「ドームの形状において」との表現は、前記突起が、前記支持体の上面の側上で凸部を形成する、円形ベースを有するアーチの形の、丸みを帯びた構造を有することを意味する。

【 0 0 3 3 】

他の1つの実施形態では、前記突起は、前記支持体の上面の側の凸部を形成する、楕円50

ベースを有するアーチの形状における丸みを帯びた構造を有し得る。

【0034】

「中空ドームの形状において」との表現は、前記突起がその下面の側上で前記3Dナノ構造膜の強化に対応するので、前記突起の内面が、自由体積を区切ることを意味し、そのため前記強化は、前記膜の下面の側上で凹部、それゆえ自由体積を形成する。

【0035】

中空ドームに関する「円形ベース」との表現は、前記突起の内面によって区切られ、その上にドームの形状における突起が置かれる自由下面を意味する。

【0036】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の前記少なくとも1つの穿孔が、前記支持体の上面での円形セクション及び前記支持体の下面での円形セクションによって特徴付けられるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

10

【0037】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)が、

穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)を有する、支持体(1)の上面(2)でのセクション(11)(穿孔の上部セクション)と、

穿孔(4)の前記下部セクション(12)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(w)を有する、支持体(1)の下面(3)でのセクション(12)(穿孔の下部セクション)と、を有し、

20

前記軸(x)及び(w)が組み合わされる、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0038】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径d2が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径d1以上であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0039】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)が、

直径d1(穿孔の上部直径d1)、及び、穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)を有する、支持体(1)の上面での円形形状セクション(11)(穿孔の上部セクション)と、

30

直径d2(穿孔の下部直径d2)、及び、穿孔の前記下部セクションの中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(w)を有する、支持体(1)の下面(3)での円形形状セクション(12)(穿孔の下部セクション)と、を有し、

直径d1が500µm以下の値で10µm以上の値であり、好ましくは150µmの値であり、直径d2が500µm以下の値であり、好ましくは150µmの値であり、

直径d2の値が直径d1の値以上であり、

前記軸(x)及び(w)が組み合わされる(図1及び2)、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0040】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径d2が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径d1より大きいマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0041】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径d2が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径d1より大きく、比率(d1の値/d2の値)が0.3の値から1未満の値である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0042】

50

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_2 が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_1 より大きく、前記支持体の前記穿孔が円錐台の形状であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0043】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径 d_1 の値が前記少なくとも1つの穿孔(4)の下部直径 d_2 の値未満であり、前記穿孔(4)が円錐台形状である(図2)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0044】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_2 が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_1 に等しいマイクロ流体細胞培養チップに関する。

10

【0045】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体の下面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_2 が、支持体の上面での前記穿孔の円形セクションの直径 d_1 に等しく、前記支持体の前記穿孔が円筒形状である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0046】

この実施形態では、そのため、前記支持体の穿孔は、規則的な形状であり、つまり、そのセクションの内のすべて、の直径は等しい長さであり、前記セクションは円形形状である。

【0047】

20

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径 d_1 の値が前記少なくとも1つの穿孔(4)の下部直径 d_2 の値に等しく、前記穿孔(4)が円筒形状である(図1)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0048】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)が円形ベース(13)を有し、直径 d_3 を有し(突起の円形ベースの直径 d_3)、突起(8)の前記直径 d_3 が $10\ \mu\text{m}$ の値から $500\ \mu\text{m}$ の値である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0049】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の直径 d_3 の値が、前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径 d_1 の値に等しい(図1及び2)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

30

【0050】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の直径 d_3 の値が、前記少なくとも1つの穿孔の上部直径 d_1 の値に等しく、前記少なくとも1つの穿孔(4)の下部直径 d_2 の値に等しい(図1及び3)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0051】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の直径 d_3 の値が、前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径 d_1 の値より大きい(図4、5及び6)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0052】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の直径 d_3 の値が、前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径 d_1 の値未満である(図7、8、9、10及び11)マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0053】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において又は一部において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0054】

少なくとも1つの突起及び少なくとも1つの穿孔によって穴のあいた支持体を備える3

50

Dナノ構造膜は、前記突起の内面が全体において又は一部において、支持体の上面で前記穿孔の円形セクションに面しているように、位置付けられる。

【0055】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるとき(図1、2、7及び9)；

10

- 又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき(図8及び11)。

【0056】

軸(x)及び(y)を特徴付けるために用いられる「組み合わされる」との用語は、これらの2つの軸間の距離がゼロに等しいことを意味する。

【0057】

20

軸(x)及び(y)を特徴付けるために用いられる「異なる」との用語は、これらの2つの軸間の距離が厳密にゼロより大きいことを意味する。

【0058】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値未満であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるとき(図6)；

30

- 又は、
- 前記穿孔(4)の上部直径d1の値が前記突起(8)の直径d3の値以下であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とがd3の値未満の値の距離によって互いに異なるとき(図3、4及び5)；

- 又は、
- 前記穿孔(4)の上部直径d1の値が前記突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 + d3の値) / 2]$ 未満の値で $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ より大きい値の距離によって互いに異なるとき(図10)。

【0059】

40

特定の実施形態によると、本発明は、突起(4)が斜めの変形を有するマイクロ流体細胞培養チップに関し、前記斜めの変形が、

- 前記支持体(1)の上面(2)で前記突起(8)によって及び前記突起(8)の頂部によって区切られた、直径d3の円形ベース(13)の中心を通り抜ける軸(z)と、
- 前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と、

間で形成される角度 によって画定される(図12)。

【0060】

特定の実施形態によると、本発明は、軸(y)と軸(z)との間で形成された角度 が0と45°との間であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0061】

50

特定の実施形態によると、本発明は、軸（ y ）と軸（ z ）との間で形成された角度 が 0 と 60° との間であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0062】

軸（ y ）と軸（ z ）との間で形成される角度 が 45° より大きい場合、突起の傾きは、分泌物の回収を部分的に妨げる。角度 を取り得る最大理論値は 90° であるが、この実施形態では、突起は、前記 3D ナノ構造膜の上面に沿って完全に折りたたまれ、分泌物の回収は妨げられる。

【0063】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起（8）の外表面（9）が前記外面上で少なくとも 1 つの接着細胞を支え、前記突起（8）の内面（10）が前記内面（10）上で少なくとも 1 つの接着細胞を支え、少なくとも 2 つの細胞が 2 つの異なる細胞型に属する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

10

【0064】

「接着細胞」との用語は、その成長が支持体への接着を必要とし、それに関して前記支持体への脱離が機械的又は酵素処理（例えば、トリプシンによる）を必要とする任意のタイプの細胞を意味する。

【0065】

「異なる細胞型」との用語は、異なる性質又は機能の、又は異なる組織に由来する細胞型を意味するために用いられる。

【0066】

20

特定の実施形態によると、本発明は、前記外面上の前記接着細胞が間質細胞であり、前記内面上の前記接着細胞が上皮細胞であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0067】

特定の実施形態によると、本発明は、前記外表面（9）上の前記少なくとも 1 つの接着細胞が間質細胞、より具体的には線維芽細胞であり、前記内面（10）上の前記少なくとも 1 つの接着細胞が上皮細胞であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0068】

特定の実施形態によると、本発明は、前記外面上の前記接着細胞が上皮細胞であり、前記内面上の前記接着細胞が間質細胞であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0069】

30

上皮細胞は、前立腺、膀胱若しくは腎臓非腫瘍形成性市販の細胞株、又は市販の初代培養物であり得る。

【0070】

間質細胞は、線維芽細胞（市販の初代培養物若しくは株）、間充織細胞（市販の培養若しくは株）、又は、内皮細胞等の他の間質細胞であり得る。

【0071】

前記突起の内面及び外面上に培養される 2 つの細胞型は、「中立」又は正常細胞と呼ばれる。つまり、それらは非腫瘍形成性である。

【0072】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起（8）の外表面（9）が合流の段階で第 1 のセットの接着細胞を支え、前記突起（8）の内面（10）が合流の段階で第 2 のセットの接着細胞を支え、第 1 の及び第 2 のセットの接着細胞の細胞が 2 つの異なる細胞型に属する、マイクロ流体細胞培養チップに関する（図 13）。

40

【0073】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起（8）の外表面（9）が、有利には合流の段階で、第 1 のセットの接着細胞を支え、前記第 1 のセットは間質細胞の、より具体的には線維芽細胞のセットであり、前記突起（8）の内面（10）は合流の段階で第 2 のセットの接着細胞を支え、前記第 2 のセットが上皮細胞のセットである、マイクロ流体細胞培養チップに関する（図 52）。

【0074】

50

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起（８）の外表面（９）が、第１のセットの接着細胞を支え、前記第１のセットは間質細胞の、より具体的には線維芽細胞のセットであり、前記突起（８）の内面（１０）は合流の段階で第２のセットの接着細胞を支え、前記第２のセットが上皮細胞のセットである、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００７５】

特定の実施形態によると、本発明は、突起の外表面及び内表面が、これらの表面上に細胞を導入する前、つまり細胞培養前に、細胞外マトリクス（ECM）調製（Matrigel（登録商標）、コラーゲン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸）によって覆われるマイクロ流体細胞培養チップに関する。より具体的には、前記ECM調製は、Matrigel（登録商標）又はMatrigel（登録商標）/コラーゲン混合物から成る。

10

【００７６】

特定の実施形態によると、本発明は、前記３Ｄナノ構造多孔質膜が２から３００nm、より具体的には３０nmの厚さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００７７】

特定の実施形態によると、本発明は、前記３Ｄナノ構造多孔質膜が２から３００nmの厚さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００７８】

特定の実施形態によると、本発明は、前記３Ｄナノ構造多孔質膜が３０nmの厚さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００７９】

20

突起はその円形状ベースでセクションを有し、このセクションの表面は、半径に従って計算され得る。

【００８０】

特定の実施形態によると、本発明は、中空ドームの形状における前記突起が１から６０μm、より具体的には１から３００μm、より具体的には５０から３００μm、より具体的には５０μmの高さを、及び、 $78.5\mu\text{m}^2$ から $200000\mu\text{m}^2$ 、より具体的には 2000 から $70000\mu\text{m}^2$ 、さらにより具体的には $17500\mu\text{m}^2$ の、さらにより具体的には $7850\mu\text{m}^2$ のドームのベースによって区切られた表面を有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００８１】

30

「高さ」との用語は、突起の頂部の中心と直径d3の開口部の中心との間の距離を意味する。

【００８２】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体が同一形状及び寸法の少なくとも２つの穿孔を備え、前記３Ｄナノ構造多孔質膜が同一形状及び寸法の少なくとも２つの突起を備え、穿孔の数が突起の数に等しい、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【００８３】

前記膜が少なくとも２つの突起を備えるとき、距離は、これらの少なくとも２つの突起間で画定されなくてはならない。

【００８４】

40

「２つの隣接する突起間の距離」との表現の定義は、２つの隣接する突起の前記３Ｄナノ構造膜の外表面の交差によって形成される円周上にそれぞれ位置し、且つ、２つの隣接する突起の前記円周上にそれぞれ位置する点の対の間のすべての可能な距離の内の最短距離を形成する、２つの点の間の距離であるとしなくてはならない（図３２）。

【００８５】

前記膜が少なくとも２つの突起を備えるとき、これらは適切な距離によって分離されなくてはならない。

【００８６】

特定の実施形態によると、本発明は、２つの隣接する突起間の距離が値１であり、前記値１が１０から１００μmである、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

50

【 0 0 8 7 】

特定の実施形態によると、本発明は、2つの隣接する突起間の距離が値1であり、前記値1が10から100 μm、より具体的には50から100 μmである、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 0 8 8 】

特定の実施形態によると、本発明は、2つの隣接する突起間の距離が値1であり、前記値1が50から100 μmである、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 0 8 9 】

各々の以下の段落では、「2つの隣接する突起間の距離」との表現は、上記で与えられた定義によって置き換えられ得る。

10

【 0 0 9 0 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体が少なくとも2つの穿孔を備え、前記ナノ構造多孔質膜が少なくとも2つの突起を備える、マイクロ流体細胞培養チップに関する。例えば比率

【 0 0 9 1 】

【数1】

$$\frac{d1}{d2}$$

20

【 0 0 9 2 】

は1から

【 0 0 9 3 】

【数2】

$$\frac{d1}{(d1+l)}$$

30

【 0 0 9 4 】

まで変化し、1は2つの隣接する突起間の距離の値であり、直径d1が500 μm以下の値で10 μm以上の値であり、直径d2が500 μm以下且つ10 μm以上の値である。

【 0 0 9 5 】

そのため、支持体の下面での前記穿孔の下部直径d2は常に、支持体の上面での前記穿孔の上部直径d1以上である。

【 0 0 9 6 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記3Dナノ構造多孔質膜が1 cm²の中央ユニットの表面に関して1から100個の突起を備えるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【 0 0 9 7 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記3Dナノ構造膜が、以下の式に等しい、1 cm²の中央ユニットの表面に関する最大数の突起を備えるマイクロ流体細胞培養チップに関し、

【 0 0 9 8 】

【数 3】

$$\frac{\pi (d3/2)^2}{(l + d3) - \pi (d3/2)^2}$$

【0099】

l が 2 つの隣接する突起間の距離であり、前記値 l が 10 から 100 μm、より具体的には 50 から 100 μm であり、

d3 が前記突起の直径である。

10

【0100】

3D ナノ構造多孔質膜は、層の連続性が少なくとも 2 つの層から適用されると理解される、1 から 150 個までの高分子電解質の多数の連続する層から成る。

【0101】

層の数は、突起の機械的強度を変化させることを可能にさせる。実際、層の数の増加が大きいほど、突起の機械的抵抗の増加は大きくなり、これらの外面及び内面上で細胞培養を支えつつ、そのいずれかの側面上で（例えば培地の）流れに抵抗することによって、それらはその外形を保ち得るようになる。

【0102】

特定の実施形態によると、本発明は、高分子電解質の連続する層の数が 1 から 150、特に 15 であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

20

【0103】

3D ナノ構造多孔質膜を構成するための高分子電解質の使用は、その上に接着細胞が組織において付着されるようになる基底膜を真似るための生体適合性且つ機能性代替物を提供する。

【0104】

3D ナノ構造多孔質膜は、高分子電解質の層から成り得る。

【0105】

特定の実施形態によると、本発明は、3D ナノ構造多孔質膜がポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ポリ(アクリルアミド-co-ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド、ポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)、ポリアネトールスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリ(スチレン-alt-マレイン酸)、ポリビニル硫酸塩、ポリビニルスルホン酸、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン-co-アクリロニトリル)酸、ポリ(4-スチレンスルホン酸)、ポリ(4-スチレンスルホン酸-co-マレイン酸)、水和 4-スチレンスルホン酸ナトリウム塩の中から選択される高分子電解質の層から成る、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

30

【0106】

3D ナノ構造多孔質膜は、高分子電解質の少なくとも 2 つの連続する層から成り得る。

40

【0107】

前記膜が少なくとも 2 つの層を備えるとき、この膜の構造は、層ごとに、必要不可欠である。

【0108】

前記 3D ナノ構造多孔質膜の不可欠な部分である少なくとも 1 つの突起、前記 3D ナノ構造多孔質膜の構成は、前記少なくとも 1 つの突起の構成と同一であろう。

【0109】

特定の実施形態によると、本発明は、3D ナノ構造多孔質膜がポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(ジアリルジメチルアン

50

モニウムクロライド)、ポリ(アクリルアミド-co-ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド、ポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)、ポリアネトールスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリ(スチレン-alt-マレイン酸)、ポリビニル硫酸塩、ポリビニルスルホン酸、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン-co-アクリロニトリル)酸、ポリ(4-スチレンスルホン酸)、ポリ(4-スチレンスルホン酸-co-マレイン酸)、水和4-スチレンスルホン酸ナトリウム塩の中から選択される高分子電解質の連続する層から成る、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0110】

10

前記膜が少なくとも2つの連続する層を備えるとき、前記層は、異なる性質の少なくとも2つの高分子電解質に対応し得る：少なくとも1つの負に帯電した高分子電解質及び少なくとも1つの正に帯電した高分子電解質。

【0111】

この場合では、この膜の構造は、層ごとに、正に帯電した高分子電解質層が負に帯電した高分子電解質層と交互になるようにされなくてはならない。

【0112】

そのため、膜は、正に帯電した高分子電解質層と負に帯電した高分子電解質層との間の静電相互作用のため高度に凝集性である。これは、約1キロパスカルであるヤング率を有する膜を得ることを可能にさせる。

20

【0113】

多孔質膜の下部層及び上部層が、互いに独立して、高分子電解質の内の任意の1つからなり得ることが留意されなくてはならない。

【0114】

しかしながら、最後の層から成る、それゆえ前記膜の上面から成る高分子電解質の電荷は、膜の疎水性に影響を有する。そのため、最後の層が負に帯電した高分子電解質から成るとき、膜の上面は、その上面が正に帯電した膜と比較して、比較的親水性の性質である。逆に、最後の層が正に帯電した高分子電解質から成るとき、膜の上面は、その上面が負に帯電した膜と比較して、比較的疎水性の性質である。

【0115】

30

膜の上面の粗さは、前記膜の上面から成る層である、膜の最後の層から成る高分子電解質によって担持される基によって管理される。例えば、それはPSS層であり、この高分子電解質は、宙ぶらりんの付着されたベンゼン環及び結合した硫酸基を有するので、任意の付着されたベンゼン環を有さない電解質に、PAH層よりも粗い、表面を提供する。3Dナノ構造多孔質膜の粗さは、約1ナノメートルである。

【0116】

特定の実施形態によると、本発明は、正に帯電した高分子電解質及び負に帯電した高分子電解質の、連続する層の数が1から150、特に15であり、負に帯電した高分子電解質層及び前記正に帯電した高分子電解質層が互いに交互になっている、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0117】

特定の実施形態によると、本発明は、3Dナノ構造多孔質膜が少なくとも2つの高分子電解質の連続する層から成り、その少なくとも1つの高分子電解質が正に帯電し、少なくとも1つの高分子電解質が負に帯電し、

前記正に帯電した高分子電解質が、ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ポリ(アクリルアミド-co-ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ジアリルジメチルアンモニウムクロライドの中から選択され、

前記負に帯電した高分子電解質が、ポリ(アリルアミン塩酸塩)、ポリアネトールスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリ(スチレン-alt-マレイン酸)、ポリビニル硫酸塩、

50

ポリビニルスルホン酸、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸-co-アクリロニトリル)、ポリ(4-スチレンスルホン酸)、ポリ(4-スチレンスルホン酸-co-マレイン酸)、水和4-スチレンスルホン酸ナトリウム塩の内から選択され、前記負に帯電した高分子電解質層及び前記正に帯電した高分子電解質層が互いに交互になっている、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0118】

特定の実施形態によると、本発明は、3Dナノ構造多孔質膜が正に帯電した高分子電解質の及び負に帯電した高分子電解質の連続する層から成り、前記正に帯電した高分子電解質がポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)であり前記負に帯電した高分子電解質がポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)であり、前記負に帯電した高分子電解質層及び前記正に帯電した高分子電解質が互いに交互になっている、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

10

【0119】

特定の実施形態によると、本発明は、ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)の及び/又はポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)の連続する層の数が1から150、特に15であるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0120】

特定の実施形態によると、本発明は、各高分子電解質層が2から300nmの、より具体的には約2nmの厚さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

20

【0121】

特定の実施形態によると、本発明は、正に帯電した高分子電解質及び負に帯電した高分子電解質の、連続する層の数が15であり、前記負に帯電した高分子電解質層及び前記正に帯電した高分子電解質層が互いに交互になっており、各層が2nmの厚さを有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0122】

特定の実施形態によると、本発明は、高分子電解質の連続する層の内のすべての、厚さの値が、層の厚さの値から前記突起の直径d3の半分未満の値までから成る、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0123】

30

特定の実施形態によると、本発明は、3Dナノ構造多孔質膜(5)がポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ポリ(アクリルアミド-co-ジアリルジメチルアンモニウムクロライド)、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド、ポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)、ポリアネトールスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリ(スチレン-al-マレイン酸)、ポリビニル硫酸塩、ポリビニルスルホン酸、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸-co-アクリロニトリル)、ポリ(4-スチレンスルホン酸)、ポリ(4-スチレンスルホン酸-co-マレイン酸)、水和4-スチレンスルホン酸ナトリウム塩の内から選択される高分子電解質の少なくとも1つの層から成り、

40

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)が、少なくとも2つの連続する層から成り、正に帯電した高分子電解質から成る層が、負に帯電した高分子電解質から成る層と交互になっているとき、

前記3Dナノ構造多孔質膜(5)が特に、高分子電解質の1から150個の連続する層から成り、

より具体的には、前記3Dナノ構造多孔質膜(5)が、互いに交互になっているポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)及び/又はポリ(アリルアミン塩酸塩)(PAH)の15個の連続する層から成る、RXに従ったマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0124】

50

従って、3Dナノ構造多孔質膜は、高分子電解質の連続する層から成るので、可変パラメータとして：

- 層の数と、
- 各々の層の厚さと、
- 用いられる高分子電解質の電荷と、を含む。

【0125】

層の数を変えることによって、前記膜、それゆえ前記突起の粗さ、厚さ及び剛性は、修正され得る。

【0126】

層の数又は用いられる高分子電解質の電荷のタイプを変えることによって、前記膜の及び前記突起の疎水性もまた修正され得る。

【0127】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体が $2\mu\text{m}$ から $1000\mu\text{m}$ の、より具体的には $20\mu\text{m}$ の厚さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0128】

特定の実施形態によると、本発明は、前記穿孔が $78.5\mu\text{m}^2$ から $200000\mu\text{m}^2$ の、より具体的には 2000 から $70000\mu\text{m}^2$ の、さらにより具体的には $17500\mu\text{m}^2$ の、及びさらにより具体的には $7850\mu\text{m}^2$ の前記非吸収性膜によって区切られた表面を有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0129】

支持体は、少なくとも1つの穿孔を備える。前記支持体が少なくとも2つの穿孔を備えるとき、これらの少なくとも2つの穿孔間の距離は画定されなくてはならない。

【0130】

「2つの隣接する穿孔間の距離」は、前記隣接する穿孔の、各々の上部円形セクションの円周上にそれぞれ位置し、且つ、前記隣接する穿孔の、各々の上部円形セクションの円周上にそれぞれ位置する点の対の間のすべての可能な距離の内の、最短距離を形成する、2つの点の間の距離であるとして理解されなくてはならない。

【0131】

前記支持体が少なくとも2つの穿孔を備えるとき、これらは適切な距離によって分離されなくてはならない。

【0132】

特定の実施形態によると、本発明は、2つの隣接する穿孔間の前記距離が値Lであり、前記値Lが10から $100\mu\text{m}$ 、より具体的には50から $100\mu\text{m}$ である、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図32)。

【0133】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体が 1cm^2 の中央ユニットの表面に関して1から100個の穿孔を備えるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0134】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はSU-8樹脂から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0135】

SU-8樹脂は、約8の平均エポキシド基官能性を有するノボラックエポキシド系負の感光性高分子樹脂である。SU-8樹脂は、当業者に良く知られており、マイクロシステムを製造することにおいて一般的に用いられる。「負の」との用語は、UVへさらされた部分が架橋され、一方でフィルムの残りが可溶のままであり洗浄によって除去され得ることを意味する。

【0136】

バイオプリントプラスチックは、3D印刷装置に適切な且つ適合する(押出、温度制限)、当業者に知られるプラスチックに対応する。

10

20

30

40

50

【0137】

組織培養プラスチックは、ベース処理（親水性表面を為すための電気又はプラズマ放電によって、つまり明確な負の電荷によって、実行される処理）を備え、且つ、（細菌学に関して処理されない、プラスチック培養ボックスとは異なる）真核性接着細胞の付着及び成長を可能にさせる、モールドボックスから成る、プラスチックに対応する。

【0138】

特定の実施形態によると、本発明は、支持体がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はSU-8樹脂から成り、前記支持体が透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0139】

下部モジュール

特定の実施形態によると、本発明は、

- 上面、下面及び少なくとも1つの側面を含む下部ユニット（108）であって、上部オリフィス（15）及び下部オリフィス（16）を備える少なくとも1つの管状形状ダクト（14）を備える、下部ユニット（108）と、
- ベース（109）であって、

前記下部ユニット（108）が、前記ベース（109）に統合され且つ前記ベース（109）によって全体を形成し、

前記下部ユニットの前記上面が少なくとも1つのダクトの前記上部オリフィス（15）を備え、前記下部オリフィス（16）が、それ自身で又は中間手段（17）によって、前記ベース（109）の外側につながる、ベース（109）と、を備える固体の下部モジュール（107）を含むマイクロ流体細胞培養チップに関する（図41及び45）。

【0140】

少なくとも1つのダクトの上部オリフィスは下部ユニット内に位置し、少なくとも1つのダクトは下部ユニットを通して、その後下部モジュールのベースを通して伸び、前記ユニット及び前記ベースが1つの単一の保持の一部を形成し、少なくとも1つのダクトの下部オリフィスが前記ベースの外側につながるようになる。

【0141】

少なくとも1つのダクトの下部オリフィスは、それ自身が前記ベースの外側につながる、又は、それ自身が前記ベースの外側につながる、リザーバ等の中間手段内につながるかのいずれかである。

【0142】

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部モジュール（107）及び前記中央モジュール（104）は、前記下部ユニット（108）の前記上面の、少なくとも1つのダクト（14）の上部オリフィス（15）が前記中央ユニット（105）の前記支持体（1）の前記穿孔（4）の内の少なくとも1つの上で開くように組み立てられ、少なくとも1つのダクト（14）の下部オリフィス（16）が、チップの外側につながり、

前記下部ユニット（108）の前記上面及び前記中央ユニット（105）の前記支持体（3）の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0143】

「チップの外側」との表現は、「ベースの外側」として解釈されなくてはならない。逆もまた同様である。

【0144】

下部モジュールが中央モジュールへ組み立てられるとき、前記下部ユニット（108）の前記上面の、少なくとも1つのダクト（14）の上部オリフィス（15）が、前記支持体（1）の前記穿孔（4）の内の少なくとも1つの上で開いている。この少なくとも1つのダクトは、少なくとも1つの突起の内面上で、培養された細胞の分泌物を回収することを可能にさせる。

【0145】

この少なくとも1つのダクトはまた、培地、及び場合により、前記突起の内面上で培養される細胞を導入することを可能にさせる。

【0146】

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部モジュール(107)及び前記中央モジュール(104)は、前記下部ユニット(108)の前記上面の、少なくとも1つのダクト(14)の上部オリフィス(15)が前記中央ユニット(105)の前記支持体(1)の前記穿孔(4)の内の少なくとも1つの上で開くように組み立てられ、少なくとも1つのダクト(14)の下部オリフィス(16)が、液体を回収することが可能なりザーバ(17)から成る中間手段を介してチップの外側につながり、前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にし、

10

前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0147】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも1つのダクト(14)の前記下部オリフィス(16)が、溶液において化合物を分析することを可能にさせるデバイス上でチップの外側につながる、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0148】

分析デバイスは、質量分析計、RMNデバイス、(液体又は気体相における)クロマトグラフデバイス、免疫学的相互作用に基づいたデバイス(ELISA、免疫沈降)、PCT又はRT-PCRデバイス等の、当業者に知られた任意の分析デバイスから成り得る。

20

【0149】

実際、細胞の分泌物は、タンパク質及びペプチドの両方から、またDNA及びRNAから成る。そのため、選択された分析デバイスは、これらの分子の内のすべてを分析することを可能にしなければならない。

【0150】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも1つのダクト(14)の前記下部オリフィス(16)が、溶液において化合物を分析することを可能にさせるデバイス上でチップの外側につながり、前記デバイスが質量分析計である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

30

【0151】

本発明によるマイクロ流体チップは、分泌物のリアルタイム且つ連続した分析を実行するために、質量分析計を統合するチップと直接結合され得る。

【0152】

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部ユニット(108)及び前記中央ユニット(105)が下部モジュール(109)の及び中央モジュール(106)の、各々のベース上にそれぞれ位置する取付要素(204)によって組み立てられて、前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体(3)の前記下面を密封したやり方で組み立てる、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0153】

特定の実施形態によると、本発明は、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値が前記ダクト(14)の前記下部オリフィス(16)の直径d5の値より大きい、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0154】

特定の実施形態によると、本発明は、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値が前記ダクト(14)の前記下部オリフィス(16)の直径d5の値に等しく、前記少なくとも1つのダクトが円筒形状である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0155】

50

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つのダクト(14)の前記上部オリフィス(15)が直径d4、及び、前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)を有し、直径d4の値が前記少なくとも1つの穿孔(4)の下部直径d2の値以上である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0156】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つのダクト(14)の前記上部オリフィス(15)が前記支持体(1)の1つの単一の穿孔につながる、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0157】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)が全体において、前記少なくとも1つのダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記穿孔(4)の下部直径d2の値が前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値と等しく、穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが組み合わされるとき(図14及び15)；又は、

- 前記穿孔(4)の下部直径d2の値が前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値未満であり、穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが組み合わされる、若しくは、 $[(d4の値 - d2の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき(図16、17及び18)。

【0158】

特定の実施形態によると、本発明は、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)が、前記少なくとも1つのダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に部分的に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記穿孔(4)の下部直径d2の値が前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値に等しく、穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、 $[d4の値 / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき(図19、21、22、24、29及び30)、又は、

- 前記穿孔(4)の下部直径d2の値が前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の直径d4の値未満であり、穿孔(4)の前記上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、 $[d4の値 / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき(図20、23、25、26、27及び28)。

【0159】

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部モジュール(107)が少なくとも2つのダクト(14)を備えるマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0160】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)の、各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、少なくとも2つのダクト(14)の少なくとも2つの下部オリフィス(16)が少なくとも2つの異なるサイトへそれぞれ、チップの外側につながる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図32)。

【0161】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)の、各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、少なくとも2つのダクト(14)の少なく

10

20

30

40

50

とも2つの下部オリフィス(16)が、液体を回収することが可能なりザーバ(17)から成る中間手段にそれぞれつながり、前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にさせる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図31)。

【0162】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)の、各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、少なくとも2つのダクト(14)の少なくとも2つの下部オリフィス(16)が、液体を回収することが可能なりザーバ(17)から成る中間手段にそれぞれつながり、前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にさせ、各々の前記リザーバの前記出口ダクトが互いに接続されて同じサイトでチップの外側につながる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図34)。

10

【0163】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)が互いに接続されてネットワークを形成して、少なくとも2つのダクト(14)の、各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、各々の少なくとも2つのダクト(14)の下部オリフィス(16)がそれら自身で、同じサイトでチップの外側に、又は、液体を回収することが可能なりザーバ(17)から成る中間手段を介して、つながり、前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にさせる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図33及び35)。

20

【0164】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)の、各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、少なくとも2つのダクト(14)の第1のセットの少なくとも2つの下部オリフィス(16)が、リザーバ(17)から成る第1の中間手段につながり、

少なくとも2つのダクト(14)の、1つの第2のセットの少なくとも2つの下部オリフィス(16)が、リザーバ(17)から成る少なくとも1つの第2の中間手段につながり、

前記第1の及び少なくとも第2のリザーバ(17)が液体を回収することが可能であり、且つ、異なるサイトで、前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる個別の出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を各々可能にさせる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図37)。

30

【0165】

特定の実施形態によると、本発明は、少なくとも2つのダクト(14)の各々の上部オリフィス(15)が穿孔(4)につながり、少なくとも2つのダクト(14)のセットの少なくとも2つの下部オリフィス(16)が、液体を回収することが可能なりザーバ(17)から成る1つの同じ中間手段につながり、且つ前記下部モジュール(107)のベース(109)の外側につながる出口ダクト(18)を介してチップの外側への輸送を可能にさせる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図36)。

【0166】

40

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部モジュール(107)が100 μ mから2 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0167】

特定の実施形態によると、本発明は、下部モジュール(107)の前記ベース(109)が100 μ mから2 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0168】

特定の実施形態によると、本発明は、前記下部ユニット(108)が100 μ mから2 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0169】

特定の実施形態によると、本発明は、下部モジュール(107)がバイオプリントブラ

50

スティック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又はSU8から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0170】

特定の実施形態によると、本発明は、下部モジュール(107)がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はSU-8樹脂から成り、前記下部モジュール(107)が透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0171】

特定の実施形態によると、本発明は、下部モジュール(109)のベースがバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又はSU8から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

10

【0172】

特定の実施形態によると、本発明は、下部モジュール(109)のベースがバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はSU-8樹脂から成り、下部モジュール(109)の前記ベースが透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0173】

特定の実施形態によると、本発明は、下部ユニット(108)がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又はSU8から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0174】

特定の実施形態によると、本発明は、下部ユニット(108)がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又はSU-8樹脂から成り、前記下部ユニット(108)が透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

20

【0175】

上部モジュール

特定の実施形態によると、本発明は、以下を備える上部モジュール(101)を含むマイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 開放容積(チャンバ)(203)を画定する固体の表面、及び、前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)と接触して前記開放容積の開口部の表面を区切ることが可能な固体の表面の端から成る、固体の且つ中空の上部ユニット(102)と；

30

- ベース(103)であって、

前記上部ユニット(102)が、前記ベース(103)に統合され且つ前記ベース(103)によって全体を形成する、ベース(103)と、を備える上部モジュール(101)を含む、ベース(103)と。

【0176】

チャンバ(203)は、上部モジュール(101)のベース(103)において統合され、且つ、前記チャンバ(203)の開放容積の表面を除いて、前記ベース(103)によってその表面のすべての上でこのように囲まれて位置する。

【0177】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)及び前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)は、前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面が前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(6)の上に位置付けられるように組み立てられ、開口部の前記表面及び前記上面(6)が互いに同一形状及び同一表面を有する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0178】

特定の実施形態では、上部ユニットは、3Dナノ構造多孔質膜の外表面及び少なくとも1つの突起の外表面上で細胞培養を観察するために、顕微鏡観察に適合した、透明ガラス部品、好ましくは顕微鏡スライドを挿入することを可能にする前記チャンバから成る固体の表面で、外側上の開口部(窓)を備える。

50

【 0 1 7 9 】

開口部は好ましくは、前記チャンバの固体の表面の場所に、位置して、それが突起の外面上で細胞培養の観察を垂直に可能にさせるようにする。

【 0 1 8 0 】

前記透明ガラス部分は、前記チャンバから成る固体の表面の前記開口部上に位置付けられ、前記上部ユニットへ封止されて維持されて、上部ユニットと中央ユニットとの間で閉鎖空間を維持する。

【 0 1 8 1 】

好ましくは、前記透明ガラス部分は、封止接着剤を用いて前記上部ユニットへ封止されて維持される。

10

【 0 1 8 2 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール（ 1 0 1 ）の前記上部ユニット（ 1 0 2 ）及び前記中央モジュール（ 1 0 4 ）の前記中央ユニット（ 1 0 5 ）が、上部モジュール（ 1 0 1 ）の及び中央モジュール（ 1 0 4 ）の、各々のベース（ 1 0 3、 1 0 6 ）上に位置する取付要素（ 2 0 1、 2 0 4 ）によって組み立てられて、前記上部ユニット（ 1 0 2 ）の開口部の前記表面及び前記中央ユニット（ 1 0 5 ）の 3 D ナノ構造多孔質膜（ 5 ）の前記上面（ 6 ）を、密封したやり方で、組み立てる、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 1 8 3 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記固体の矩形面に隣接し且つ互いに隣接した、4つの固体面及び固体の矩形面を固体の表面が備える、前記固体の且つ中空上部ユニット（ 1 0 2 ）が前記チャンバ（ 2 0 3 ）を形成し、前記4つの固体面の自由端が前記チャンバ（ 2 0 6 ）の開口部の前記表面を区切る、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

20

【 0 1 8 4 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール（ 1 0 1 ）がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又は S U 8 から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 1 8 5 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール（ 1 0 1 ）がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又は S U - 8 樹脂から成り、前記上部モジュール（ 1 0 1 ）が透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

30

【 0 1 8 6 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール（ 1 0 3 ）のベースがバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又は S U 8 から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 1 8 7 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール（ 1 0 3 ）のベースがバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又は S U - 8 樹脂から成り、上部モジュール（ 1 0 3 ）の前記ベースが透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【 0 1 8 8 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部ユニット（ 1 0 2 ）がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、又は S U 8 から成るマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 1 8 9 】

特定の実施形態によると、本発明は、上部ユニット（ 1 0 2 ）がバイオプリントプラスチック、ポリカーボネート、組織培養プラスチック、ガラス又は S U - 8 樹脂から成り、前記上部ユニット（ 1 0 2 ）が透明である、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【 0 1 9 0 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部ユニット（ 1 0 2 ）の前記チャンバ（ 2

50

03)の開口部の前記表面が前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(6)の上に位置付けられて、前記上部ユニット(102)の前記固体の表面及び3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(6)によって区切られた閉鎖空間を形成する、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0191】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部ユニット(102)の前記チャンバ(203)の開口部の前記表面が前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(6)の上に位置付けられ、前記上部ユニット(102)の前記少なくとも1つの固体面が入口/出口ダクト(202)にそれぞれつながる2つのオリフィスを有して、

10

ベース(109)の外側につながる前記入口/出口ダクト(202)を介して前記2つのオリフィスによってのみ、前記マイクロ流体チップの外側と連通し得る前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(6)と前記上部ユニット(102)の前記固体の表面とによって区切られた閉鎖空間を形成する、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図38及び43)。

【0192】

上部ユニットが、入口/出口ダクトにそれぞれつながる2つのオリフィスを備える。2つの入口/出口ダクトは上部モジュールのベースを通して伸び、前記ユニット及び前記ベースは1つの単一の保持の一部を形成し、前記2つの入口/出口ダクトは前記上部ベースの外側につながるようになる。

20

【0193】

上部モジュールが中央モジュールへ組み立てられるとき、3Dナノ構造多孔質膜上のチャンバのアセンブリは、前記入口/出口ダクトを介して前記2つのオリフィスによってのみ、前記マイクロ流体チップの外側と連通し得る閉鎖空間を画定することを可能にさせる。これらのダクトはまた、チャンバにおける培地の導入を、及び場合により、前記膜の上面又は少なくとも1つの突起の外面上で培養される細胞の導入を可能にさせる。

【0194】

これらの入口/出口ダクトはセンサーと結合され得て、培養条件及びパラメータ(CO_2 、 O_2 、圧力、温度、グルコース、pHセンサー)の連続したモニタリングを可能にさせる。代替実施形態では、これらのセンサーは、チャンバ(203)において直接統合され得る。

30

【0195】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール(101)が50 μm から2 cmの、特に1 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0196】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール(101)の前記ベース(103)が50 μm から2 cmの、特に1 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0197】

特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)が50 μm から2 cmの、特に1 cmの高さを有するマイクロ流体細胞培養チップに関する。

40

【0198】

3つのモジュールのアセンブリ

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール(101)、中央モジュール(104)及び下部モジュール(107)を備え、上記前記モジュールは、

前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面が、前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(2)の上に位置付けられ、

前記下部モジュール(107)の前記下部ユニット(108)の前記上面の、少なくと

50

も1つのダクト(14)の上部オリフィス(15)が、前記中央ユニット(105)の前記支持体(1)の前記穿孔(4)の内の少なくとも1つの上で開いており、

前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面及び前記中央ユニット(105)の3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記上面(2)が、互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体(3)の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記上部モジュール(101)、前記中央モジュール(104)及び前記下部モジュール(107)が、各々の個別のベース(103、106、109)上に位置する取付要素(201、204)によって組み立てられる、ように組み立てられる、マイクロ流体細胞培養チップに関する(図42、46及び47)。

10

【0199】

各々のモジュールのベース上に位置する取付要素は、モジュール2つずつロックして、中央モジュールによって上部モジュールを組み立て且つ下部モジュールによって中央モジュールを組み立てる、又は、第3のモジュール上に2つのモジュールをロックして、上部モジュール上で下部モジュール及び中央モジュールを組み立てる、のいずれかを可能にさせる。

【0200】

これらの取付要素は、オス/メス取手又は要素、好ましくはオス/メス要素であり得る。

【0201】

特定の実施形態によると、上部モジュールのベースは、オス取付要素として高台(201)を備え、中央モジュール及び下部モジュールのベースは、メス取付要素として穿孔(204)を備えて、上部モジュールの前記高台上にロックされることを可能にする。

20

【0202】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるようなとき；又は、

30

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように；

及び、前記支持体(1)の前記穿孔(4)が全体において、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面しているとき：

40

前記突起(8)の前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、組み合わされる、又は、d4の値がd2の値より大きいとき $[(d4の値 - d3の値) / 2]$ 以下の距離によって互いに異なるように。

【0203】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

50

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるようなとき；又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように。

及び

- 前記突起(8)の前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、組み合わされる、若しくは、 $[(d4の値 / 2) + (d3の値の4 / 10)]$ 以下距離によって互いに異なる。

【0204】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるようなとき；又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように。

及び

- 前記突起(8)の前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、組み合わされる、又は、 $[(d4の値 + d4の値) / 2] - 10 \mu m]$ 以下距離によって互いに異なるとき。

【0205】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

- 前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるときのように；又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように。

及び

- 前記突起 (8) の前記円形ベース (1 3) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (t) とが、組み合わされる、又は、 $[d 4 \text{ の値} / 2]$ 以下距離によって互いに異なる。

【 0 2 0 6 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも 1 つの突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) に面しているとき：

- 前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) の上部直径 d 1 の値が前記少なくとも 1 つの突起 (8) の直径 d 3 の値未満であり、前記円形ベース (1 3) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記穿孔 (4) の上部セクション (1 1) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (x) とが、組み合わされる、又は、 $[(d 1 \text{ の値} / 2) + (d 3 \text{ の値の} 4 / 1 0)]$ 以下の値によって互いに異なるように。

及び、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な前記軸 (x) 及び軸 (t) は、直径 d 2 の値が直径 d 4 の値以上であるとき組み合わされる、

又は、直径 d 4 の値が直径 d 2 の値より大きいとき $[(d 4 \text{ の値} - d 1 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なる。

【 0 2 0 7 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも 1 つの突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) に面しているとき：

- 前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) の上部直径 d 1 の値が前記少なくとも 1 つの突起 (8) の直径 d 3 の値未満であり、前記円形ベース (1 3) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記穿孔 (4) の上部セクション (1 1) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (x) とが、組み合わされる、又は、 $[[(d 3 \text{ の値} + d 1 \text{ の値}) / 2] - 1 0 \mu m]$ 以下の値によって互いに異なるように。

及び、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な前記軸 (x) 及び軸 (t) は、直径 d 2 の値が直径 d 4 の値以上であるとき組み合わされる、

又は、直径 d 4 の値が直径 d 2 の値より大きいとき $[(d 4 \text{ の値} - d 1 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なる。

【 0 2 0 8 】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも 1 つの突起 (8) の前記内面 (1 0) が部分的に、前記支持体 (1) の前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) に面しているとき：

- 前記少なくとも 1 つの穿孔 (4) の上部直径 d 1 の値が前記少なくとも 1 つの突起 (8) の直径 d 3 の値未満であり、前記円形ベース (1 3) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (y) と前記穿孔 (4) の上部セクション (1 1) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な軸 (x) とが、組み合わされる、又は、 $[(d 3 \text{ の値} - d 1 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値によって互いに異なるように、

且つ、前記ダクト (1 4) の前記上部オリフィス (1 5) の中心を通り抜け且つ前記支持体 (1) に垂直な前記軸 (x) 及び軸 (t) は、直径 d 2 の値が直径 d 4 の値以上であるとき組み合わされる、

又は、直径 d_4 の値が直径 d_2 の値より大きいとき $[(d_4 \text{ の値} - d_1 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なる。

【0209】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

- 前記穿孔(4)の上部直径 d_1 の値が前記突起(8)の直径 d_3 の値に等しく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[d_1 \text{ の値} / 2]$ より小さい値の距離によって互いに異なるように、

且つ、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な前記軸(x)及び軸(t)は、直径 d_2 の値が直径 d_4 の値以上であるとき組み合わされる、

又は、直径 d_4 の値が直径 d_2 の値より大きいとき $[(d_4 \text{ の値} - d_1 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なる。

【0210】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

- 前記穿孔(4)の上部直径 d_1 の値が前記突起(8)の直径 d_3 の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d_1 \text{ の値} - d_3 \text{ の値}) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように、

且つ、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な前記軸(x)及び軸(t)は組み合わされる、

又は、前記軸(x)及び前記軸(y)は組み合わされる。

【0211】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記支持体(1)の少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

- 前記穿孔(4)の上部直径 d_1 の値が前記突起(8)の直径 d_3 の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが以下の値によって互いに異なる、組み合わされる、又は、 $[(d_1 \text{ の値} / 2) + (d_3 \text{ の値の} 4 / 10)]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように、

且つ、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な前記軸(x)及び軸(t)は、直径 d_3 の少なくとも $1 / 10$ が全体において直径 d_4 に面しているようにある距離によって互いに異なる。

【0212】

特定の実施形態によると、本発明は、前記突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している、マイクロ流体細胞培養チップに関する：

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が部分的に、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき：

- 前記穿孔(4)の上部直径d1の値が前記突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが以下の値によって互いに異なる、互いに組み合わせられる、又は、 $[(d3の値 + d1の値) / 2] - 10 \mu m$ 以下の値の距離によって互いに異なるように

且つ、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な前記軸(x)及び軸(t)は、直径d3の少なくとも $10 \mu m$ が全体において直径d4に面しているようにある距離によって互いに異なる。

【0213】

本発明の実施形態では、中央ユニットは以下を含む：

- 少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた、上面(2)及び下面(3)を備える、非吸収性膜から成る支持体(1)と

- 上面(6)及び下面(7)を備え且つ少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)であって、前記少なくとも1つの突起が、外面(9)及び内面(10)を備え、且つ3Dナノ構造膜(5)の上面(6)の側上でレリーフ構造を形成し、前記突起が、特に、円形ベース(13)を有する中空ドームの形状であり、

3Dナノ構造膜の前記上面(6)が前記支持体の前記下面(2)に固定されて位置付けられ、前記少なくとも1つの突起(8)が前記支持体(1)の上面(2)の側上である。

【0214】

そのため、特定の実施形態によると、本発明は、前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)及び前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)は、前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面が前記中央ユニット(105)の非吸収性膜(1)から成る支持体の前記上面(2)の上に位置付けられるように組み立てられて、

前記上部ユニット(102)の前記固体の表面、非吸収性膜(1)から成る支えの前記上面(2)及び突起の外面(9)によって区切られる閉鎖空間を形成し、

前記上面(2)及び開口部の前記表面が、互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)及び前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)が、上部モジュール(101)の及び中央モジュール(104)の、各々のベース(103、106)上に位置する取付要素(201、204)によって組み立てられて、前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面及び前記中央ユニット(105)の非吸収性膜(1)から成る支持体の前記上面(2)を、密封したやり方で組み立て、

有利には前記上部ユニット(102)の前記少なくとも1つの固体面が、入口/出口ダクト(202)へそれぞれにつながる2つのオリフィスを有し、

前記閉鎖空間が、ベース(109)の外側につながる前記入口/出口ダクト(202)を介して前記マイクロ流体チップの外側と連通することを可能にする、マイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0215】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において又は部分的に、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する。

【0216】

少なくとも1つの突起及び少なくとも1つの穿孔によって穴のあいた支持体を備える3Dナノ構造膜は、前記突起の内面が全体において、又は部分的に、支持体の上面で前記穿孔の円形セクションに面しているように、互いに位置付けられる。

【0217】

特定の実施形態によると、本発明は、前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているマイクロ流体細胞培養チップに関する：

10

20

30

40

50

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるとき；又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるとき。

【0218】

特定の実施形態によると、本発明は、上部モジュール(101)、中央モジュール(104)及び下部モジュール(107)を備え、上記前記モジュールは、

前記上部モジュール(101)の前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面が、前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)の前記少なくとも1つの突起(8)の外周面(9)の、及び、非吸収性膜(1)から成る支持体の前記上面(2)の上に位置付けられ、

前記下部モジュール(107)の前記下部ユニット(108)の前記上面の、少なくとも1つのダクト(14)の上部オリフィス(15)が、前記中央ユニット(105)の前記支持体(1)の前記穿孔(4)の内の少なくとも1つの上で開いており、

前記上部ユニット(102)の開口部の前記表面及び前記中央ユニット(105)の非吸収性膜(1)から成る支持体の前記上面(2)が、互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記下部ユニット(108)の前記上面及び前記中央ユニット(105)の前記支持体(3)の前記下面が互いに同一形状及び同一表面を有し、

前記上部モジュール(101)、前記中央モジュール(104)及び前記下部モジュール(107)が、各々の個別のベース(103、106、109)上に位置する取付要素(201、204)によって組み立てられ、

前記突起(8)の前記内面(10)は全体において、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面している；

前記少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)が全体において、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)に面しているとき；

- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(4)の直径d3の値以上であり、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが組み合わされるようなとき；又は、
- 前記少なくとも1つの穿孔(4)の上部直径d1の値が前記少なくとも1つの突起(8)の直径d3の値より大きく、前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記穿孔(4)の上部セクション(11)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(x)とが $[(d1の値 - d3の値) / 2]$ 以下の値の距離によって互いに異なるように；

及び、前記支持体(1)の前記穿孔(4)が全体において、前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)に面しているとき；

前記突起(8)の前記円形ベース(13)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(y)と前記ダクト(14)の前記上部オリフィス(15)の中心を通り抜け且つ前記支持体(1)に垂直な軸(t)とが、組み合わされる、又は、d4の値が2の値より大きいとき $[(d4の値 - d3の値) / 2]$ 以下の距離によって互いに異なるように。

【0219】

本発明はまた、本発明によるマイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記中央モジュール(104)の前記中央ユニット(105)の製造は以下を備える：

- 前記支持体(1)の少なくとも1つの穿孔(4)を通して再吸収性高分子溶液(22)を押し出して、前記支持体(1)の前記上面(2)の側上で少なくとも1つの3Dナノ構造(23)を形成するステップと(図48及び49)、その後

- 前記再吸収性高分子溶液を重合して前記少なくとも1つの3Dナノ構造(23)を固くするステップであって、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(23)が重合後に前記支持体の前記上面の側上で再吸収性高分子モールド(22)を形成する、ステップと、その後

- 前記支持体(1)の上面(2)及び前記再吸収性高分子モールド(22)の表面を覆う少なくとも1つの高分子電解質の少なくとも1つの連続した層を適用して、3Dナノ構造多孔質膜(5)を構成するステップと(図50)、よって、

- 前記再吸収性高分子モールドを溶解させて、前記支持体(1)の前記上面(2)に固定されて位置付けられた前記3Dナノ構造多孔質膜(5)の前記下面(7)及び全体において前記少なくとも1つの穿孔(4)に面して位置付けられる少なくとも1つの突起(8)の前記内面(10)を得るステップと(図51)。

【0220】

中央モジュールを製造する第1のステップは、非吸収性材料、つまり、物理的プロセスによって又は水性溶媒における化学的プロセスによって除去されないことがある材料から成る前記支持体の一以上の穿孔を通して再吸収性高分子溶液を押し出すステップである。

【0221】

溶液に関して用いられる再吸収性高分子材料は、最初は粘性液体の形であり、支持体の穿孔を通る押出を可能にさせる。

【0222】

「粘性の」との用語はここでは、剪断応力下での変形への抵抗を有する流体を認定するために用いられ、純水のものと同様であり、好ましくは純水のものより実質的に大きい。言い換えると、押出に関して用いられる粘性液体は、純水よりも大きいその粘度特性に起因して、純水よりも遅く循環する。押出に関して用いられる液体の粘度特性は重要であり、例えば粘性液体は、純水の粘度を有する溶液よりも、押出プロセスの間に、突起の形状の優れた保存を可能にさせる。押出に関する液体の粘度の好ましい範囲は、1(純水)と100Pa・sとの間であり、好ましくは、液体の粘度は0.1Pa・sと1Pa・sとの間である。

【0223】

「押出」との用語は、粘性液体の形である材料が、マトリクスを通る力によって通されて、前記粘性材料へ、前記マトリクスによってあらかじめ定められる、形状を与えるステップを定義するために用いられる。本発明の範囲では、マトリクスは、少なくとも1つの穿孔を備える支持体から成り、粘性液体状態における前記材料は、再吸収性高分子から成る。少なくとも1つの穿孔を通る、前記支持体の外面への、前記支持体の下面からの、粘性状態におけるこの再吸収性高分子の押出は、前記支持体の上面の側上で前記再吸収性高分子へ3Dナノ構造形状を与えることを可能にさせる。

【0224】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記支持体(1)の少なくとも1つの穿孔(4)を通る前記再吸収性高分子溶液(22)を押し出すステップは、ドームの形状において前記支持体(1)の前記上面(2)の側上で3Dナノ構造(23)を形成することを可能にさせる。

【0225】

穿孔を通る押出及び前記再吸収性高分子溶液の重合後に得られる3Dナノ構造は、3Dナノ構造多孔質膜の突起の形成に関するモールドとして用いられるという技術的效果を有する。

【0226】

押出は、再吸収性高分子溶液が、所望の突起に関するモールドとして用いられることになる、所望の長さの3Dナノ構造を形成したときに停止される。

【0227】

再吸収性高分子溶液はこのように、ストレスなしで残されて、その重合又はゲル化を可能にさせるので、穿孔を通る前記支持体の上面の側を超える固体の3Dナノ構造を与える。

【0228】

重合は、非吸収性膜から成り且つ少なくとも1つの穿孔を備える支持体上で直接行われる。

【0229】

重合後、得られた3Dナノ構造は、モールドを構成して3Dナノ構造多孔質膜の突起を得ることを可能にさせる。

【0230】

穿孔を通る前記支持体の上面の側を超え且つ押出によって形成される3Dナノ構造及び支持体の上面によって形成される表面はその後、高分子電解質フィルムから成る多孔質膜によって覆われる。

【0231】

高分子電解質は、モールドとして用いられた3D構造の除去の間に、任意のタイプの材料（再吸収性さえ）から成る任意のタイプの3D構造の形状をとり、且つ、このように与えられた3D形状を保つことを可能にするという特性を有する。

【0232】

この高分子電解質フィルムは、レイヤーバイレイヤー技術を用いて作製される多層フィルムである。

【0233】

この技術の目的は、前記支持体の穿孔を通して超える3Dナノ構造及び支持体の上面によって形成される表面上の高分子電解質の連続する層を吸着して、複数の微細な高分子電解質層を生成することである。

【0234】

好ましくは、用いられる高分子電解質は、PAH及びPSSである。PAH及びPSS溶液は、0.5 mol/lのNaClによって1 mg/mlの濃度で調製される。

【0235】

高分子電解質多層フィルムは、高分子電解質の内の1つによって等しく開始することによって、且つ高分子電解質の内の1つによって等しく終わることによって、しかし、逆に帯電した高分子電解質間の交互の層を考慮することによって、構成される。

【0236】

高分子電解質溶液の電荷の間で、表面は、MilliQ 水(18 MΩ・cm)によって十分にすすがれる。

【0237】

このプロセスは、所望の数の高分子電解質層が得られるまで繰り返される。

【0238】

このプロセスは、前記支持体の穿孔を通して超える3Dナノ構造及び支持体の上面によって形成される表面のすべての上の連続したフィルムから成る連続した、最終的な高分子電解質多層フィルムを得ることを可能にさせる。

【0239】

そのため、この最終的な高分子電解質多層フィルムは、支持体の穿孔を通る押出に由来する3Dナノ構造上の高分子電解質の連続する層の適用の間に成形することによって得られる突起を有する。

【0240】

3Dナノ構造及び支持体の上面によって形成される表面が連続した高分子電解質多層フィルムによって覆われるとすぐに、再吸収性高分子材料で作製された3Dナノ構造によって形成されるモールドは溶解される。

【0241】

非吸収性材料、つまり、物理的プロセスによって、又は水性溶媒における化学的プロセ

10

20

30

40

50

スによって除去されないことがある材料から成る支持体の使用は、この溶解ステップに由来する前記無傷の支持体を保つことを可能にさせることに留意しなくてはならない。

【0242】

再吸収性高分子材料の溶解は、その上にそれらが成形された3Dナノ構造の形状を保つ突起を有する、支持体に固く結合する、連続した高分子電解質多層フィルムを与える。そのため、この連続したフィルムは、3Dナノ構造多孔質膜から成る。

【0243】

支持体上に付着された3Dナノ構造多孔質膜から成る最終的な構造は、容易に取り扱うことが可能であり、前記マイクロ流体細胞培養チップの中央モジュールを形成する。

【0244】

この中央モジュールは、70%エタノールによって連続して3回洗浄することによって、その後、細胞培養培地によって連続して3から4回洗浄してエタノールの任意の残りの痕跡を除去することによって、消毒され得る。

【0245】

エチレンオキシドガスを用いることによって中央モジュールを殺菌することも可能である。

【0246】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記支持体(1)の少なくとも1つの穿孔(4)を通る前記再吸収性高分子溶液(22)を押し出すステップは、ポンプシステムを用いることによって実行される。

【0247】

再吸収性高分子溶液の押出は、手動で又は(モーターによって)機械的に制御され得るポンプシステムを用いて行われる。

【0248】

ポンプシステムは、例えば、前記少なくとも1つの穿孔(4)を通る前記再吸収性高分子溶液(22)の連続した流れを誘起するためのシリンジ又はピストンから成り得る。

【0249】

他の1つの実施形態では、前記再吸収性高分子溶液(22)は、例えば、手動で、又は、モーターを用いて機械的に、の何れかで、互いに向かって動かされ得る2つの平行な平板を用いて少なくとも1つの穿孔(4)を通して押し出され得る。平板の内の1つは、上部モジュール(204)の外面上に位置付けられ、他の平板は、下部モジュール(101)の外面上に位置付けられるので、2つの平板は互いに対して平行に位置付けられる。そのため、互いに向かう、前記平坦且つ平行な板の動きは、前記再吸収性高分子溶液(22)へ力を適用することを可能にさせる。このような場合では、再吸収性高分子溶液(22)へ適用される力は、前記再吸収性高分子溶液(22)が前記少なくとも1つの穿孔(4)を通して循環することを強制する。

【0250】

押出は、液体において又は空気において行われ得る。

【0251】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記支持体(1)の少なくとも1つの穿孔(4)を通る前記再吸収性高分子溶液(22)を押し出すステップは、液体において実行される。

【0252】

液体における押出の場合では、液体は、突起を形成するために用いられる高分子の再吸収につながらないように選択される。

【0253】

液体において押し出される3Dナノ構造の場合では、液体が支持体の上面の上であるとき、これは、3Dナノ構造の長さを増加することに対して反対方向において向けられる力から成る静止流体圧力につながるもので、3Dナノ構造の長さの増加に逆らう役目を果たす

10

20

30

40

50

。静止流体圧力の大きさは、式 $t g$ の形である、支持体の上面の上の液体の深さ (t) によって及び重力 (g) によって、液体の密度 (ρ) を掛けることによって計算される。静止流体圧力の大きさは、3Dナノ構造の高さを減少させるような役目を果たす。例えば、希釈塩溶液 (密度 = 1)、体の細胞外液の真似の場合に用いられる溶液、の1mmの深さに関して、3Dナノ構造の長さにおける形成に逆らう役目を果たす静止流体圧力の大きさは、9.8ミリパスカルである。

【0254】

押出に関する再吸収性高分子として用いられる高分子電解質溶液のヤング率は一般的に、約100から400メガパスカルであるので、押出の間に形成された3Dナノ構造の長さのわずかな (marginal) 減少が存在する (例えば、最悪の場合では、100メガパスカルのヤング率に関して、長さの減少は、約 10^{-5} % であろう)。

10

【0255】

そのため、液体において押し出される3Dナノ構造の場合では、液体が支持体の下面の下である場合、3Dナノ構造の長さにおける形成に逆らう役目を果たす静止流体抵抗力は存在しない。この場合では、突起は、空気において押し出された3Dナノ構造と同じ長さになる。

【0256】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記支持体 (1) の少なくとも1つの穿孔 (4) を通る前記再吸収性高分子溶液 (22) を押し出すステップは、空気において実行される。

20

【0257】

空気において押し出される3Dナノ構造の場合では、3Dナノ構造の長さにおける形成に逆らう役目を果たす圧力は存在しない。

【0258】

本発明はまた、本発明によるマイクロ流体細胞培養物を製造するための代替プロセスに関し、前記中央モジュール (104) の前記中央ユニット (105) の製造は以下を備える：

- モールド (H) の上面 (209) 上に再吸収性高分子溶液 (22) を注ぐステップであって、前記モールドが特に、前記上面 (209) 上に少なくとも1つの成形された3Dナノ構造 (208) を備える、プラスチックで作製される、ステップ (図53及び54) と、その後
- 前記再吸収性高分子溶液 (22) を重合して、前記再吸収性高分子溶液を固くし、再吸収性高分子マトリクス (210) を形成するステップと、その後
- 前記少なくとも1つの3Dナノ構造 (211) の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス (210) を形成するために前記モールドを除去するステップと (図55)、その後
- 前記少なくとも1つの3Dナノ構造 (211) の少なくとも1つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス (210) の下面 (212) 上の少なくとも1つの高分子電解質の少なくとも1つの連続した層を適用して、少なくとも1つの突起 (8) を備える3Dナノ構造多孔質膜 (5) から成るステップ (図56) と、その後
- 前記再吸収性高分子マトリクスを溶解させるステップと。

30

40

【0259】

特定の実施形態によると、本発明はまた、本発明によるマイクロ流体細胞培養チップを製造するための代替プロセスに関し、前記中央モジュール (104) の前記中央ユニット (105) の製造は以下を備える：

- モールド (H) の上面 (209) 上に再吸収性高分子溶液 (22) を注ぐステップであって、前記モールドが特に、前記上面 (209) 上に少なくとも1つの成形された3Dナノ構造 (208) を備える、プラスチックで作製される、ステップ (図53及び54) と、その後
- 前記再吸収性高分子溶液 (22) を重合して、前記再吸収性高分子溶液を固くし、再吸

50

収性高分子マトリクス(210)を形成するステップと、その後

- 前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス(210)を形成するために前記モールド(H)を除去するステップと(図55)、その後

- 少なくとも1つの穿孔(4)を備える非吸収性膜(1)から成る支持体によって前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス(210)を組み立てて、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドが、前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)と位置合わせされるようにするステップと、(図57)、その後

- 前記支持体(1)の穿孔(4)で前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス(210)の下面(212)及び前記支持体(1)の下面(3)によって形成される連続した表面上の少なくとも1つの高分子電解質の少なくとも1つの連続した層を適用して、少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)から成るステップ(図58)と、その後

- 前記再吸収性高分子マトリクス(210)を溶解させるステップと(図59)。

【0260】

本発明また、本発明によるマイクロ流体細胞培養チップを製造するための代替プロセスに関し、中央ユニットを備える中央モジュールの製造は以下を備える：

(i) 中央ユニットの形式でサイドフレーム(213)、開いた上面(214)、及び、切断部(216)を備える固体の下面(215)から成る支持体部分(I、i)、並びに、上面(209)上に少なくとも1つの成形された3Dナノ構造(208)を備える、前記支持体部分(I、i)の形状及び寸法におけるモールド(H、H1、H2、h1、h2)を組み立てるステップであって、前記モールドが特に、プラスチックで作製される、ステップと(図60)、

(ii) 前記モールド(H、H1、H2、h1、h2)の前記上面(209)上に再吸収性高分子溶液(22)を注ぐステップ(図61)と、その後

(iii) 前記再吸収性高分子溶液(22)を重合して、前記再吸収性高分子溶液を固くし、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス(210)を形成するステップと、その後

(iv) 前記モールド(H、H1、H2、h1、h2)を除去して、前記支持体部分(I、i)の固体の下面(215)の前記切断部(216)において形成される前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス(210)を得るステップと(図62)、その後

(v) ベース(106)において統合された少なくとも1つの穿孔(4)によって穴のあいた非吸収性膜(1)から成る支持体を備える、穿孔部分(G、G1、G2、g1、g2)によって、前記支持体部分(I、i)を組み立てるステップ(図63)であって、

前記穿孔部分(G、G1、G2、g1、g2)が前記支持体部分(I、i)の形状及び寸法であり、前記穿孔部分(G、G1、G2、g1、g2)の穿孔(4)の数がステップ(i)において用いられる前記モールド(H、H1、H2、h1、h2)における成形された3Dナノ構造(211)の数と同一であり、

前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)が、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の前記少なくとも1つの負のモールドと位置合わせされる、ステップと、その後

(vi) 前記支持体(1)の前記少なくとも1つの穿孔(4)で、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス(210)の下面(212)と前記支持体(1)の下面(3)とから成る連続した表面上に少なくとも1つの高分子電解質の少なくとも1つの連続した層を適用して、少なくとも1つの突起(8)を備える3Dナノ構造多孔質膜(5)から成るステップと(図64)、その後

(vii) 前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールド

10

20

30

40

50

ドを備える前記再吸収性高分子マトリクス(210)を溶解させるステップと(図65)、
(viii)支持体部分(I、i)を除去して、その下面(3)上で3Dナノ構造多孔質膜(5)を、その上面の側上で前記少なくとも1つの突起を備える前記穿孔部分(G、G1、G2、g1、g2)を得るステップと(図66)。

【0261】

図69に示されるように、上述したプロセスのステップ(i)は、モールドH1を揃えるための穴(218)に挿入される支持体部分Iを揃えるためのピン(217)及び部品の平坦なセクションによって導かれる再現性がある特定のアライメントにおいて、モールドH、特に100個の成形された3Dナノ構造(208)を備えるモールドH1、による支持体部分Iのアセンブリに対応する。

【0262】

支持体部分I及びモールドHのアセンブリに関して、前記支持体部分Iの固体面(215)は、モールドHの上面(209)上に配され、前記モールドHの成形された3Dナノ構造(208)が支持体部分Iの前記固体面の切断部(216)で位置付けられるようになる。

【0263】

支持体部分IによるモールドHの接続によってこのように形成されたチャンバはその後、ステップ(iii)に従って再吸収性高分子(22)によって満たされる。

【0264】

再吸収性高分子の重合(ステップiii)後、前記少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス(210)は、支持体部分Iの固体面(215)上の切断部(216)において形成される。

【0265】

その後、モールドHは、ステップ(iv)に従って支持体部分Iから除去される。支持体部分Iのベースは、少なくとも1つの3Dナノ構造(211)の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス(210)によって切断部(216)でこのように形成される。

【0266】

支持体部分Iはその後、穿孔部分Gを揃えるための穴(218)に挿入される支持体部分Iを揃えるためのピン(217)及び部品の平坦なセクションによって導かれる再現性がある特定のアライメントにおいて、ステップ(v)に従って、穿孔部分G、特に100個の穿孔(4)を備える穿孔部分G1によって組み立てられる(図70)。

【0267】

穿孔部分Gは、少なくとも1つの穿孔(4)を備える支持体(1)から成り、前記支持体(1)はベース(106)に挿入される。

【0268】

穿孔部分(G1、G2、g1、g2)を選択することは、ステップ(i)におけるモールド(H1、H2、h1、h2)の選択に依存し、モールド(H1、H2、h1、h2)の3Dナノ構造の形状及び数は、穿孔部分(G1、G2、g1、g2)の形状と及び穿孔の数と同一である必要がある(図67、68、72、73)。

【0269】

穿孔部分Gの支持体(1)の上面(2)は、前記再吸収性高分子マトリクス(210)の下面(212)と接触して位置付けられる。

【0270】

穿孔部分Gの穿孔(4)は、穿孔部分Gを揃えるための穴(218)において引き起こされる支持体部分Iを揃えるためのピン(217)を用いて前記マトリクス(210)の3Dナノ構造(211)の負のモールドとこのように位置合わせされる。

【0271】

組み立てられる部品I及びG1はその後、図70-Eに示されるように戻されて、部品

10

20

30

40

50

G 1 を支持体部分 I の上にする。

【 0 2 7 2 】

部分 G 1 の穿孔の壁は、チャンバの形成を可能にさせて、前記支持体 (1) の穿孔 (4) で、前記少なくとも 1 つの 3 D ナノ構造 (2 1 1) の少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクス (2 1 0) の下面 (2 1 2) 及び支持体 (1) の下面 (3) によって形成される連続した表面上で、ステップ (v i) に従って少なくとも 1 つの高分子電解質の少なくとも 1 つの連続した層を適用することによって突起 (8) の形成を促進する。

【 0 2 7 3 】

少なくとも 1 つの突起 (8) が形成されるとすぐに、負のモールド (2 1 1) の前記マトリクス (2 1 0) を形成する再吸収性高分子は、ステップ (v i i) に従って溶解する。

10

【 0 2 7 4 】

支持体部分 I は、穿孔部分 G 1 からこのように除去される。

【 0 2 7 5 】

穿孔部分 G 1 は、3 D ナノ構造多孔質膜 (5) を、支持体 (1) の下面 (3) の側上で、及び、穿孔部分 G 1 の支持体の前記少なくとも 1 つの穿孔の延長において前記少なくとも 1 つの突起を、支持体 (1) の上面 (2) の側上で、このように備える (図 6 6) 。

【 0 2 7 6 】

この実施形態では、3 D ナノ構造多孔質膜 (5) の上面 (6) は、非吸収性膜 (1) から成る支持体の下面 (5) に (接触して) 固定される。

20

【 0 2 7 7 】

突起 (8) を備える 3 D ナノ構造膜 (5) 及び穿孔 (4) を有する支持体 (1) を備えるこのように得られた穿孔部分 G 1 は、マイクロ流体チップの中央モジュールから成り、且つ、前記少なくとも 1 つの突起の各側の細胞の培養のために用いられる。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 2 7 8 】

円形状部分 I、H 及び G の例

特定の実施形態によると、前記支持体部分 (I)、前記モールド (H 1、H 2) 及び前記穿孔部分 (G 1、G 2) は円形状であり、特に 3 5 m m の直径を有する細胞培養ボックスへ適合されることを可能にさせる。

30

【 0 2 7 9 】

図 6 7 は、前記モールド (H 1) 及び前記穿孔部分 (G 1) がそれぞれ、1 0 0 個の成形された 3 D ナノ構造及び 1 0 0 個の穿孔を備えるプロセスの特定の実施形態を与える。

【 0 2 8 0 】

このようなプロセスは、1 0 0 個の突起を有する中央ユニットを得ることを可能にさせる。

【 0 2 8 1 】

図 6 8 は、前記モールド (H 2) 及び前記穿孔部分 (G 2) がそれぞれ、9 個の成形された 3 D ナノ構造及び 9 個の穿孔を備えるプロセスの特定の実施形態を与える。

40

【 0 2 8 2 】

このようなプロセスは、9 個の突起を有する中央ユニットを得ることを可能にさせる。

【 0 2 8 3 】

穿孔及び成形された 3 D ナノ構造の数のこれらの例は限定するものではない。

【 0 2 8 4 】

モールド及び穿孔部分を選択することは、中央ユニットの 3 D ナノ構造膜に関する突起の所望の数に依存する。

【 0 2 8 5 】

この特定の実施形態では、詳細に上述したプロセスから得られる突起を有する穿孔部分 G から成る中央モジュールは、図 7 1 に示されるように、部品 F として、培地を含む 3 5

50

mmの直径を有する細胞培養ボックス等の、細胞培養チャンバ上に配され得る。

【0286】

本発明の実施形態によると、上述したプロセスによって得られる中央モジュールは、少なくとも1つの突起からの分泌物を収集するための少なくとも1つのダクトを備える、本発明において説明されたような下部モジュール上に配される。

【0287】

下部モジュールは、前記中央モジュールと同一形状及び同一寸法である。

【0288】

下部モジュールは、中央モジュールを揃えるための穴に挿入される下部モジュールの部品を揃えるためのピン及び部品の平坦なセクションによって導かれる、再現性がある特定の

10

【0289】

下部モジュールは、穿孔、それゆえ中央モジュールの突起の数と同一であるダクトの数を備え、前記下部モジュールによる前記中央モジュールのアセンブリは、穿孔それゆえ突起とダクトを揃えることを可能にさせて、マイクロ流体システムを介して細胞から分泌物を収集する。

【0290】

本発明によるこの他の特定の実施形態では、下部モジュールは、部品Fによって置き換えられる。図67、68及び71に示されるような培養ボックス上の中央モジュールの支持体として用いられるこの部品Fは、前記少なくとも1つの突起の内面上の成長細胞へ栄

20

【0291】

正方形形状部分I、H及びGの例

特定の実施形態によると、前記支持体部分(i)、前記モールド(h1、h2)及び前記穿孔部分(g1、g2)は、正方形形状である。

【0292】

図72は、前記モールド(h1)及び前記穿孔部分(g1)がそれぞれ、100個の成形された3Dナノ構造及び100個の穿孔を備えるプロセスの特定の実施形態を与える。

【0293】

このようなプロセスは、100個の突起を有する中央ユニットを得ることを可能にさせる。

30

【0294】

図73は、前記モールド(h2)及び前記穿孔部分(g2)がそれぞれ、9個の成形された3Dナノ構造及び9個の穿孔を備えるプロセスの特定の実施形態を与える。

【0295】

このようなプロセスは、9個の突起を有する中央ユニットを得ることを可能にさせる。

【0296】

穿孔及び成形された3Dナノ構造の数のこれらの例は限定するものではない。

【0297】

モールド及び穿孔部分を選択することは、中央ユニットの3Dナノ構造膜に関する突起の所望の数に依存する。

40

【0298】

再吸収性高分子溶液は好ましくは、キトサン、アガロース又はアルギン酸塩で作製される。

【0299】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液(22)はキトサンである。

【0300】

キトサンが用いられるとき、再吸収性モールドは、一晩の間2%酢酸において2%キトサンを溶解させることによって、その後、エタノールによって1.5%キトサンを希釈す

50

ることによって調製され得る。キトサン溶液はその後、比率 1 : 1 での NaOH : エタノールの 5 M 温浴において重合される。

【0301】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液 (22) を重合するステップであって、前記再吸収性高分子溶液 (22) がキトサンである、ステップは、2 % 酢酸溶液による培養によって為される。

【0302】

キトサンが再吸収性高分子材料として用いられるとき、溶解は、当業者に良く知られる慣習に従って、2 % 酢酸溶液による一晩中の培養によって行われる。

10

【0303】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液 (22) はアガロースである。

【0304】

アガロースが用いられるとき、再吸収性モールドは、加熱することによって及び PBS (リン酸緩衝食塩水) において $40 \mu\text{g/ml}$ のアガロースを溶解させることによって調製され得る。アガロースは、そのゲル化点より下の温度で得られる溶液を配することによって重合される。

【0305】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液 (22) を重合するステップであって、前記再吸収性高分子溶液 (22) がアガロースである、ステップは、アガロースのゲル化温度より高い温度での培養によって実行される。

20

【0306】

アガロースが再吸収性高分子材料として用いられるとき、溶解は、120 分間、周囲温度から 70°C の温度へゆっくり加熱することによって、その後アガロースの温度を一晩掛けて周囲温度へ戻させることによって行われる。

【0307】

この加熱は水浴において行われ得る。3D ナノ構造多孔質膜を損傷し得る熱的対流を最小化するために温度はゆっくり増加することが重要である。

30

【0308】

当業者に良く知られる、この加熱プロトコルの変形は、アガロースのゲル化特性を修正するために水浴の水における DMSO の追加を含む。

【0309】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液 (22) はアルギン酸塩である。

【0310】

特定の実施形態によると、本発明は、マイクロ流体細胞培養チップを製造するためのプロセスに関し、前記再吸収性高分子溶液を重合するステップであって、前記再吸収性高分子溶液 (22) がアルギン酸塩である、ステップは、EDTA 又は EGT A 等の、加えられる Ca^{2+} 又は Ca^{2+} イオン結合剤を有さない溶液による一晩中の培養によって実行される。

40

【0311】

高分子電解質多層フィルムは、可変パラメータとして：

- 層の数と、
- 各々の層の厚さと、
- 用いられる高分子電解質の電荷と、を含む。

【0312】

層の数を変えることによって、最終的な多層フィルムの粗さ、厚さ及び剛性は、修正され得る。

50

【0313】

好ましくは、フィルムは、高分子電解質の、2nm厚さの、15個の層から成る。

【0314】

層の数又は用いられる高分子電解質に関する電荷のタイプを変えることによって、最終的な多層フィルムの疎水性もまた修正され得る。

【0315】

3Dナノ構造の押出は、押出のために用いられるポンプシステムに起因して、以下の不良を発生し得る：

- 支持体の穿孔と直接的に位置合わせされた、提供されたサイトを残すことに関する突起の移転が存在するときの、移転不良、
- 例えばベースの厚化又は当業者に良く知られるであろう他の不良のような、突起の形状における不良が存在するときの、押出不良。

10

【0316】

移転不良又は押出不良によって3Dナノ構造からこのように形成された突起は、デバイス内で最初に設けられたその技術的機能を発揮し続け得るが、このように形成された突起がより最適でない形状を有するとき、デバイス内のその性能はまた、より最適でない。しかしながら、デバイスは、減少した性能を有してであるが、設けられたその機能を発揮し続け得る。

【0317】

突起は、以下のような異なる変化を有し得る：

20

- 前記開口部の中心を通り抜け且つ前記支持体に垂直な軸(y)に関する傾き、
- その高さの変動、
- 支持体上の3Dナノ構造多孔質膜の移転に起因した、穿孔に関する移転。

【0318】

これらの変化は、中央モジュールを調製するためのプロセス、及び特に、前記支持体の穿孔を通して高分子溶液を押し出す段階に起因する。

【0319】

特定の変化はまた、デバイスにおける突起の使用の間に直接的に駆動される。

【0320】

I - 共培養のためにチップを使用する例

30

1. 前立腺上皮細胞及び間質細胞の細胞系を維持するための条件

すべての実験に関して用いられる培地は、5ng/mLの上皮成長因子(EGF)及び50µg/mLの牛下垂体抽出物によって補われたケラチノサイト無血清培地(KSFM)(Life Technologies, Carlsbad, CA, Ref. 17005-075)である。

【0321】

前立腺上皮細胞及び間質細胞の株は、培地において維持され、37°C及び5%CO₂での雰囲気において培養される。

【0322】

新鮮な培地における細胞の二次培養は、上皮細胞に関して3日ごとに、間質細胞に関して2日ごとに行われる。このために、細胞は、カルシウムなし且つマグネシウムなし(Life Technologies, Ref. 14190)のDulbecco (D-PBS)からのリン酸緩衝食塩水によって洗浄され、その後、約7分間、37°Cで、0.25mg/mLで1mLのトリプシン-EDTA(Lonza, Basel, CH, Ref. CC-5012)によって培養される。

40

【0323】

すべての実験に関して、細胞の培地は、新鮮な培地によって毎日補われた。

【0324】

2. 中央ユニットにおける導入前の細胞の調製

細胞の化学的分離は、カルシウムなし且つマグネシウムなしのPBS培地において0.

50

25 mg/ml で 1 ml のトリプシン - EDTA (Life Technologies, Ref. 25300-054) によって 37 °C で 5 分の培養によって行われる。

【0325】

独立して、本発明によるマイクロ流体チップは、70 % エタノール (体積 / 体積) 溶液を、ダクトを通して循環させることによって、その後、少なくとも 30 分間 35 °C と 45 °C との間の温度で炉においてマイクロ流体システムのすべてを乾燥させることによって、その後、それを紫外線照射へ及び 40 分間オゾンにさらすことによって、殺菌される。

【0326】

3 . 中央ユニットの 3 D ナノ構造多孔質膜の調製

10

3 D ナノ構造多孔質膜は、正に帯電した高分子電解質層と負に帯電した高分子電解質層とが交互である高分子電解質の連続する層から成る。製造プロセスによると、この同じ膜は突起から成る。

【0327】

高分子電解質多孔質膜から成る突起の外面及び内面は、Matrigel (登録商標) 及び / 又はコラーゲン、フィブロネクチン又はヒアルロン酸から成る細胞外マトリクス (ECM) 調製によって覆われる。

【0328】

ここで用いられる Matrigel (登録商標) マトリクスは、Corning (登録商標) 社によって製造される市販の製品である。それは、細胞外マトリクスタンパク質において豊富な腫瘍である、Engelbreth - Holm - Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出される、再構成基底膜調製である。一旦単離されると、この材料は、約 60 % のラミニン、30 % のコラーゲン IV 及び 8 % のエンタクチンから成る。エンタクチンは、ラミニン及びコラーゲン IV と相互作用する架橋分子であり、細胞外マトリクスのこれらの分子の構造的構成に寄与する。

20

【0329】

Corning (登録商標) からの Matrigel (登録商標) マトリクスはまた、形質転換成長因子 (TGF -) の、上皮成長因子の、インスリンタイプ成長因子の、線維芽細胞成長因子の、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (パールカン)、プラスミノゲン組織アクチベーター、及び、EHS 腫瘍に必然的に存在する他の成長因子を含む。それはまた、腫瘍細胞由来の残りのマトリクスメタロプロテイナーゼを含む。

30

【0330】

Matrigel (登録商標) は、6 mg/ml の濃度で、多孔質膜を機能的にするために単独で、又は、0.75 と 2.5 mg/ml との間の濃度でタイプ I コラーゲンによる混合物として、用いられ得る。

【0331】

4 . 中央ユニットにおける 2 つの細胞及び細胞共培養タイプの導入

4 . 1 . 上皮細胞の導入

最初に、上皮細胞が導入されて、細胞接合層、つまり合流の段階での細胞培養を形成する。

40

【0332】

特定の実施形態によると、上皮細胞は、中央ユニットの突起の内面上に導入される。

【0333】

細胞の接着を得るために 3 時間、細胞を接合するための、つまり細胞合流の段階での層の形成のために 24 時間が必要とされる。これらの接着細胞及び増殖細胞は、それら自身の細胞外マトリクスを分泌するので、バリアの役割を果たす基底層を構築する。

【0334】

中央ユニットの突起の内面は、患者の尿から単離された、ヒト細胞の成長及び分化のための生理学的支持体として用いられる、上皮細胞の密な単一層によってこのように覆われる。

50

【 0 3 3 5 】

突起の内面上の細胞の導入は、3つの方法に従って、行われ得る：

- ・穿孔の下部セクションを頂部へ向かわせるために中央モジュールへ戻し、細胞懸濁液を手動でピペティングする。
- ・穿孔の下部セクションを頂部へ向かわせるために中央モジュールへ戻し、流体を取り扱うためのロボットを用いて細胞懸濁液を導入する。
- ・上部モジュール、中央モジュール及び下部モジュールを組み立てて、下部ユニットのマイクロ流体ダクトを用いて突起の内面の側上で中央ユニットを満たす。したがって、3つのモジュールのこの予備アセンブリの場合では、細胞は、下部モジュールのダクトを介して導入される。3つのモジュールの予備アセンブリ後に細胞を導入する方法は、2つの他の方法よりも好ましい。なぜならそれは、以前に殺菌したシステムが閉じられたままなので、任意の細菌汚染を防止するからである。

10

【 0 3 3 6 】

特定の実施形態によると、上皮細胞は、シリンジによって穿孔（第1及び第2の方法）を介して直接的に、又は、自動化され且つ圧力及び流れ（F l u i g e n t）によって制御された流体システム若しくはシリンジポンプを用いることによって下部ユニット（第3の方法）のダクトを介してのいずれかで、中央ユニットにおいて $3 \cdot 10^6$ 細胞 / mL の濃度で導入される。

【 0 3 3 7 】

細胞の滑らか且つ制御された導入を提供するために、調節可能な流れによるシリンジポンプを用いることが好ましい。

20

【 0 3 3 8 】

安定した連続した流れは、圧力ポンプ（F l u i g e n t、フランス）を用いることによって送達される。培地を含む加圧容器は、制御された温度及び CO_2 レベルでチャンバにおいて保持される。流れは、約 $5 - 10$ mL / 時間（ 10 m b a r）へ調節され、細胞の接着及び増殖は、経時的に観察される。すべてのサンプルは、 $37^\circ C$ 及び $5\% CO_2$ での加湿された培養器に保持される。

【 0 3 3 9 】

特定の実施形態では、中央ユニットは、直径 $150 \mu m$ の円形ベースを有する $350 \mu m$ の高さの突起を備える。そのため、突起の内面の面積は $329700 \mu m^2$ であり、その上に約 50 個の上皮細胞が合流段階（接合細胞層）でカウントされ、 $66 \mu m^2$ 毎に約 1 個の細胞である。

30

【 0 3 4 0 】

4 . 2 . 突起の外面上の細胞の導入

第2に、一旦接合（又は合流）上皮細胞の層が突起の内面上で形成されると、間質細胞は、突起の外表面及び内面で多孔質膜上に分配される。

【 0 3 4 1 】

突起の内面上の細胞の導入は、2つの方法に従って、行われ得る：

- ・突起の頂部を頂部へ向かわせるために中央モジュールへ戻し、細胞懸濁液を手動でピペティングする。
- ・上部モジュール、中央モジュール及び下部モジュールを組み立てて、下部ユニットのマイクロ流体ダクトを用いて突起の内面の側上で中央ユニットを満たす。したがって、3つのモジュールのこの予備アセンブリの場合では、細胞は、上部ユニットの入口 / 出口ダクトを介して導入される。3つのモジュールの予備アセンブリ後に細胞を導入する方法は、他の方法よりも好ましい。なぜならそれは、以前に殺菌したシステムが閉じられたままなので、任意の細菌汚染を防止するからである。

40

【 0 3 4 2 】

特定の実施形態によると、間質細胞は、シリンジを用いて直接的に中央ユニットにおいて $3 \cdot 10^6$ 細胞 / mL の濃度で上部モジュールの入口 / 出口ダクトを介して（第1の方法）、また、自動化され且つ圧力及び流れ（F l u i g e n t）によって制御された流体

50

システム若しくはシリンジポンプを用いることによって上部モジュールのダクトを介して（第2の方法）、導入される。

【0343】

間質細胞は非常にすばやく付着する（1時間未満）。

【0344】

間質細胞が合流（又は接合）細胞の層を形成することは必要不可欠ではなく、この例では外面上のその単純な接着で充分である。

【0345】

一般的に、上皮細胞と間質細胞との間の比率は1：2である。

【0346】

そのため、特定の実施形態によると、 0.7 cm^2 の表面上の共培養に関して、突起の外表面及び内面での多孔質膜は、 6 mg/ml へ希釈された $90\text{ }\mu\text{l}$ のMatrigel（登録商標）溶液によって機能的にされ、その後、 7000 個の上皮細胞/ cm^2 及び 14000 個の間質細胞（線維芽細胞）/ cm^2 を最終的に得るために播種される。

【0347】

細胞培養を供給するために上部モジュールの入口／出口ダクトを介して及び下部モジュールのダクトを介して導入される培地は、突起のいずれかの側上で同一であり、且つ、 5 ng/mL の上皮成長因子（EGF）によって及び $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ の牛下垂体抽出物によって補われるKSFMP培地から成る。

【0348】

4.3. 上皮細胞及び間質細胞の例

これらの上皮細胞は、非腫瘍形成性の市販の細胞株（前立腺若しくは膀胱若しくは腎臓）又は市販の初代培養物であり得る。

【0349】

これらの間質細胞は以下であり得る：

- いずれかの線維芽細胞（市販の初代培養物又は株）、
- 又は間葉細胞（市販の培養又は株）、
- 又は他の間質細胞（内皮等）。

【0350】

これらの細胞の単一層を形成するために用いられる2つの細胞型は、「中立」又は「正常」と呼ばれ、それらは非腫瘍形成性であり且つ基底層の役割を果たすのみである。これらの「中立」細胞は、免疫蛍光及びイメージング（E-カドヘリン部分の5つのマーキング）によって特徴付けられることが可能である、密な封止を確立する、突起の内面及び外面上の細胞の高度に隣接する層を、合流の段階で、形成する。

【0351】

4.4. 突起の内面及び外面上の培養の互換性

特定の実施形態によると、上皮細胞は、突起の内面上に導入され、間質細胞は、突起の外面上に導入される。

【0352】

しかしながら、共培養は、交換可能な方法で確立され得る、つまり、間質細胞はまた、突起の内面上に、上皮細胞は突起の外面上に導入され得る。両方の場合では、2つの細胞型間に位置する高分子電解質層は、正に及び負に帯電したその高分子電解質メッシュを用いて、多孔質バリアを構成することを可能にさせる。

【0353】

5. 中央ユニットにおける細胞の可視化（突起上の共培養の概念の証明）

中央ユニットの突起上の共培養の方法を有効にするために、免疫マーキング（immunomark）が実行される。

【0354】

したがって、この免疫マーキングは、（PFAによって付着された）死細胞上で実行され、この可視化は、正しく所定の位置にある共培養を制御すること、及び、正しく細胞を

10

20

30

40

50

導入する手法という唯一の目的を有する。

【0355】

細胞は、免疫マーキングによって中央モジュールにおいて可視化される。

・ファロイジンは、原形質膜の端をたどる皮質のアクチンフィラメントを識別し、その結果として、細胞及びその膜の範囲を区切るための手段を提供するために用いられる。

・E-カドヘリンは、細胞-細胞接点を検出するために用いられる。

免疫染色は、周囲温度でダクトを介してシリンジポンプによってE-カドヘリンを導入することによって実行される。

【0356】

上皮細胞の合流層の形成後、その導入後約24時間、それらは、細胞骨格バッファーにおける10%スクロースから成る溶液(溶液A)において4%パーフルオロアルコキシ(PFA)(体積対体積)によって20分間付着される。

【0357】

細胞はその後、溶液Aによって洗浄され、0.1%Triton TX-100によって加えられた溶液Aによって3分間透過処理される。TBS溶液による洗浄が10分間実行され、30分間のPBS溶液による第2の洗浄が続く。PFAの自己蛍光は、TBS溶液に含まれるNH₄Clによって不活性化される。非特異部位は、10%ヤギ血清及び3%BSAを有するPBS溶液による培養によって妨げられる。細胞はその後、1時間の間一次抗体によって培養される。用いられる一次抗体は、0.1%Tween-20及び1%BSAによってPBS溶液において1/50へ希釈された抗E-カドヘリン抗体(Abcam, Ref. ab1416)である。培養物はその後、PBS溶液によって30分間洗浄され、その後、20分間、0.1%Tween-20及び1%BSAによってPBS溶液において1:1000へ希釈されたファロイジンFITC(Sigma, Ref. P5282)の1/1000へ希釈された、シトクロムCy3(Jackson, Ref. 115-162-062)と結合された二次抗マウス抗体によって培養される。

・PBS溶液による30分の洗浄後、リングは、5分間、1:7000へ希釈された、Hoechst着色剤(Life Technologies, Ref. H-1399)によって対比染色される。細胞はその後、10分間洗浄され、Dako蛍光媒体が手動で導入される。

・結合焦点が、Vinculineを用いることによるマーキングによって検出された。Vinculineによる対比マーキングに関して、細胞は、Triton X-100によって40秒間予備透過処理され、20分間、4%PFA(v/v)を有するPBS溶液によって付着され、その後PBS溶液によって一度洗浄される。

【0358】

任意の非特異的抗体吸着を避けるために、細胞は、1時間、0.1%BSA及び10%ヤギ血清溶液によって培養される。

【0359】

細胞はその後、0.05%のTween-20及び5%のヤギ血清を有するPBS溶液において1:700へ希釈されたVinculine(Sigma, Ref. V9131)に対する一次抗体によって1時間培養され、その後、PBS溶液によって45分間4回連続で洗浄される。

【0360】

細胞はその後、0.05%のTween-20を有し且つ5%のヤギ血清(Jackson)を有するPBS溶液において1/500へ希釈された、シトクロムCy5と結合された、抗マウス抗体によって培養される。

【0361】

中央モジュールはその後、PBS溶液によって15分間4回洗浄される。リング及びアクチンは、上述のように染色される。

【0362】

共培養物は、蛍光顕微鏡法によって観察される、又は、位相差顕微鏡法、レンズなしイメージング、共焦点顕微鏡法、光シート顕微鏡法等の他の顕微鏡法によって観察され得る。

【0363】

画像は、細胞培養の間にキャプチャされる。

【0364】

デバイスの全幅の全体の像を提供するために、細胞画像は、レンズなしセンサーを用いて記録される。SEM分析もまた実行される。

【0365】

特定の実施形態では、細胞の共培養物を含む中央モジュールの蛍光画像は、直径150 mmの、チューブに関する、軸zにおける3 mm毎のショットを有する、zスタックフィールド深さによる取得に関する正しいApotomeモジュールを備えた20倍レンズを有するZeiss AxioImager Z1顕微鏡を用いて得られる。画像は、顕微鏡上に取り付けられたデジタルAxioCam MRmデジタルカメラを用いて記録される。

10

【0366】

6. リアルタイムでの中央ユニットにおける細胞の可視化

中央ユニットにおける細胞培養は、モジュールから成る材料の透明度のため、非マークの生きた細胞を可視化することを可能にさせる位相差顕微鏡観察によってリアルタイムでモニタリングされ得る。

20

【0367】

II - 診断のためにチップを用いる例

1. 患者に由来する細胞の導入

特定の実施形態によると、上皮細胞は、突起の内面上に導入され、間質細胞は、突起の外面上に導入される。一旦細胞の単一層が各々の面上で得られると、つまり24時間後、細胞がこのように設けられたマイクロ流体チップは、患者の診断のために用いられ得る。

【0368】

このために、細胞は、少なくとも50 ml、特に50から100 mlの患者の尿サンプルから単離される。単離は、低速、特に5分間800 gで尿サンプルを遠心分離することによって行われて、尿サンプルに含まれる細胞の沈降を可能にさせる。遠心分離ステップは、当業者に良く知られる。

30

【0369】

沈降した細胞の下部はその後、培地において再懸濁され、細胞懸濁液は、本発明によるマイクロ流体チップに直接的に導入され、細胞が、チップにおけるその導入前に任意の予備培養を必要としないことを意味する。

【0370】

尿サンプルから得られる細胞の濃度は、数百細胞から数千である、又は数百細胞から数千で変動する。

【0371】

患者の単離された尿細胞は、上皮細胞の培養を支える突起の面の側上で、又は、間質細胞の培養を支える突起の面の側上で導入され得る。言い換えると、これらの培養は突起のいずれかの側上で交換可能であり、患者の尿の単離細胞は、内面上及び突起の外面上の両方で導入され得る。

40

【0372】

特定の実施形態によると、患者の尿の単離細胞は、上皮細胞の培養を支える突起の面の側上で導入される。そのため、上皮細胞の単一層が突起の内面の側上で形成されるとき、それらは下部ユニットのダクトを介して、また、上皮細胞の単一層が突起の外面の側上で形成されるとき上部モジュールの入口/出口ダクトを介して、導入される。

【0373】

患者の尿から単離された細胞は、膀胱、前立腺及び腎臓上皮細胞をすべて含む、剥離さ

50

れた尿道上皮（又は尿路上皮）細胞である。

【0374】

特定の実施形態では、突起の内面は、以前に培養された上皮細胞で予備形成された層によって覆われ、突起の外表面は、線維芽細胞（間質細胞）で予備形成された層によって覆われ、単離細胞は、下部モジュールのダクトを介して分配される。

【0375】

これらの単離細胞は、正常線維芽細胞の層によって支えられた、突起の内面の側上で、正常上皮細胞で予備形成されたこの層において挿入される。

【0376】

2. 患者に由来する細胞の増殖の観察

10

デバイスにおける単離細胞の増殖の進行を観察し、且つ、この増殖が正常基底細胞の置き換えをもたらす且つ組織の全体的な分泌プロファイルに影響を与えるかどうかを調査するために、単離細胞の増殖はこのようにモニタリングされる。

【0377】

3. 分泌物の回収

一旦患者の尿から単離された細胞の導入が行われると、患者の上皮細胞は、突起の外表面又は内表面上に0.1 ng/mlのDHT（ジヒドロテストステロン）を加えることによって刺激される。DHTによる細胞のこの刺激は、24時間と48時間との間続く。

【0378】

突起の外表面及び内面から成る膜が多孔性であり、この刺激は、突起のいずれの側上で等しく為され得る。

20

【0379】

上皮細胞はまた、ミボレロン（非代謝ホルモン）を加えることによって刺激され得る。

【0380】

上皮細胞の刺激はこのように、突起のいずれかの側上の2つの細胞型の結合後、及び合流段階までのその成長後に為される。

【0381】

突起の外表面の側上で正常線維芽細胞の層によって支えられた、突起の内表面の側上で、正常上皮細胞で予備形成された、この層において挿入され且つ患者の単離細胞が結合するとき分泌物は回収され得る。患者の単離細胞の結合は約3時間続き、その統合は約6時間続く。

30

【0382】

十分な体積の分泌物の蓄積が次第に生じる。

【0383】

セクレトームの分析に関する分泌物の最終的な回収は、少なくとも12時間放置した後で実行される。

【0384】

より具体的には、分泌物は、DHTによる24から48時間の刺激の終わりで回収される。

【0385】

40

それらはその後、溶液における化合物の分析を可能にさせるデバイスによって分析される。特定の実施形態によると、セクレトームは、質量分析法によって分析される。

【0386】

分泌物は、前記チップに組み込まれたセンサーによってインラインで分析され得る。

【0387】

前記チップを構成する異なるモジュールは、分泌物が回収されるとき又は分泌物がインラインでセンサーによって連続的に分析されるときに、影響されないことに留意しなくてはならない。

【0388】

免疫学的方法による特異的マーカーに関する探索はまた、回収された分泌物において行

50

われ得る。

【0389】

例えば、P S A（前立腺特異抗原）、前立腺癌の参照バイオマーカー、の検出が為され得る。

【0390】

350 μ mの高さの突起及び150 μ mの直径を有する円形ベースに関して、24時間の終わりで回収された分泌物の体積は約2 nLである。

【0391】

P S Aの検出及び定量化は、E L I S A試験によって行われる。

【0392】

これに関して、いくつかの突起内部の約50 μ Lの媒体が収集され、その後、45分間37°Cで配された、96ウェルプレートに堆積される。抗P S A一次抗体へ付着されないタンパク質を除去するために、蒸留水による5回の連続する洗浄は必要不可欠である。

【0393】

H R P（西洋ワサビペルオキシダーゼ）と結合された100 μ Lの遊離抗P S A二次抗体はその後、E L I S Aプレートの37°Cでの45分の培養の前に各ウェルにおいて加えられる。最後に、100 μ Lの基質（T M B）が加えられ、基質酵素比色反応を生じさせる。

【0394】

37°Cで15分の後、100 μ Lの硫酸を加えることによって反応は停止され、450 nmでE L I S Aプレートリーダーを用いて吸光度が検出される。

【0395】

I I I - スクリーニング分子に関するチップを用いることの例

特定の実施形態では、本発明によるマイクロ流体細胞培養チップは、スクリーニング分子に関して用いられる。

【0396】

I V - 患者における泌尿器癌の処置の効果を決定するためにチップを用いることの例

特定の実施形態では、本発明によるマイクロ流体細胞培養チップは、泌尿器癌に苦しむ患者における泌尿器癌に関する処置の効果を決定するために用いられる。

【0397】

この実施形態では、突起上の上皮細胞の培養物において挿入される、患者の尿の単離細胞のセクレトームの分析は、患者の処置の前後、及び/又は、処置の間に行われる。

【0398】

処置前に得られるセクレトームと、処置後に得られるもの、及び/又は処置の間に得られるものとの比較は、患者が苦しむ泌尿器癌上の処置の効果を決定することを可能にさせる。

【符号の説明】

【0399】

図面

- 1 非吸収性膜から成る支持体（中央ユニット）
- 2 非吸収性膜から成る支持体の上面（中央ユニット）
- 3 非吸収性膜から成る支持体の下面（中央ユニット）
- 4 非吸収性膜から成る支持体の穿孔（中央ユニット）
- 5 3Dナノ構造多孔質膜（中央ユニット）
- 6 3Dナノ構造多孔質膜の上面（中央ユニット）
- 7 3Dナノ構造多孔質膜の下面（中央ユニット）
- 8 突起（中央ユニット）
- 9 突起の外表面（中央ユニット）
- 10 突起の内表面（中央ユニット）
- 11 支持体の上面での穿孔のセクション（中央ユニット）

10

20

30

40

50

1 2	支持体の下面での穿孔のセクション（中央ユニット）	
1 3	突起の円形ベース（中央ユニット）	
1 4	ダクト（下部ユニット）	
1 5	ダクトの上部オリフィス（下部ユニット）	
1 6	ダクトの下部オリフィス（下部ユニット）	
1 7	リザーバ（下部ユニット）	
1 8	リザーバのダクト（下部ユニット）	
1 9	入口／出口ダクトにつながる上部ユニットのオリフィス（上部ユニット）	
2 0	ダクトの上部オリフィス（下部モジュール）	
2 1	ダクトの下部オリフィス（下部モジュール）	10
2 2	再吸収性高分子	
2 3	3 D ナノ構造	
2 4	上皮細胞	
1 0 1	上部モジュール	
1 0 2	上部ユニット	
1 0 3	上部モジュールのベース	
1 0 4	中央モジュール	
1 0 5	中央ユニット	
1 0 6	中央モジュールのベース	
1 0 7	下部モジュール	20
1 0 8	下部ユニット	
1 0 9	下部モジュールのベース	
2 0 1	取付要素	
2 0 2	入口／出口ダクト（上部モジュール）	
2 0 3	チャンバ（上部ユニット）	
2 0 4	取付要素	
2 0 5	ダクトの下部オリフィスのセット（下部モジュール）	
2 0 6	ダクトの上部オリフィスのセット（下部モジュール）	
2 0 7	突起のセット（中央モジュール）	
2 0 8	成形された 3 D ナノ構造	30
2 0 9	モールドの上面	
2 1 0	再吸収性高分子マトリクス	
2 1 1	3 D ナノ構造の負のモールド	
2 1 2	マトリクスの下面	
F	中央モジュールの支持体部分	
2 1 3	支持体部分のサイドフレーム	
2 1 4	支持体部分の開いた上面	
2 1 5	支持体部分の固体の下面	
2 1 6	支持体部分の固体面の切断部	
2 1 7	アライメントピン	40
2 1 8	アライメント穴	
H、H 1、H 2、h 1、h 2	モールド	
I、i	支持体部分	
G、G 1、G 2、g 1、g 2	穿孔部分	
【図面の簡単な説明】		
【0400】		

【図1】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、突起は全体において、穿孔に面している。

【図 2】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値未満であり、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、突起は全体において、穿孔に面している。

【図 3】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、突起は部分的に、穿孔に面している。

【図 4】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値未満であり、突起は部分的に、穿孔に面している。

10

【図 5】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値未満であり、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値未満であり、突起は部分的に、穿孔に面している。

【図 6】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値未満であり、突起は部分的に、穿孔に面している。

20

【図 7】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値より大きく、突起は全体において、穿孔に面している。

【図 8】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値より大きく、突起は全体において、穿孔に面している。

【図 9】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値未満であり、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値より大きく、突起は全体において、穿孔に面している。

30

【図 10】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値未満であり、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値より大きく、突起は部分的に、穿孔に面している。

【図 11】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値未満であり、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値より大きく、突起は全体において、穿孔に面している。

40

【図 12】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、突起は垂直軸 (y) に関して軸 (z) に沿って傾けられる。

【図 13】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、突起の内面は、合流の段階で第 1 の細胞型のアセンブリによって覆われ、突起の外表面は、合流の段階で第 2 の細胞型のアセンブリによって覆われる。

【図 14】3 D ナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その上部オリフィスの直径 d_4 の値が前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値に等しいダクトを備える下

50

【図 15】3Dナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、前記穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ前記突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その上部オリフィスの直径 d_4 の値が前記穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値より大きいダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、突起が全体において、ダクトに面している。

10

20

30

40

50

【図 23】3Dナノ構造膜における突起、及び支持体における穿孔を備える中央ユニット

10

20

30

40

50

直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値に等しい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスがそれぞれリザーバにつながり、出口ダクトを介して下部モジュールの外側につながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

【図 3 2】3 D ナノ構造膜における 2 つの突起、及び支持体における 2 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値に等しい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスが、2 つの異なるサイトにおいて下部モジュールの外側につながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

10

【図 3 3】3 D ナノ構造膜における 2 つの突起、及び支持体における 2 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値に等しい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトは互いに接続されて、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスが、同じサイトにおいて下部モジュールの外側につながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

20

【図 3 4】3 D ナノ構造膜における 2 つの突起、及び支持体における 2 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値に等しい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスがそれぞれリザーバにつながり、各々のリザーバは、互いに接続された出口ダクトを介して、同じサイトにおいて下部モジュールの外側につながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

30

【図 3 5】3 D ナノ構造膜における 2 つの突起、及び支持体における 2 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値より大きい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトは互いに接続されて、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスが、出口ダクトを介して下部モジュールの外側につながるリザーバ上の同じサイトにつながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

【図 3 6】3 D ナノ構造膜における 2 つの突起、及び支持体における 2 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく且つ下部オリフィスの直径 d_5 の値より大きい 2 つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、2 つのダクトの 2 つの下部オリフィスはそれぞれ、出口ダクトを介して下部モジュールの外側につながる 1 つの同じリザーバ上の 2 つの異なるサイトにつながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

40

【図 3 7】3 D ナノ構造膜における 4 つの突起、及び支持体における 4 つの穿孔を備える中央ユニットの概略的な、断面図であり、各々の穿孔の上部セクションの直径 d_1 の値は

50

、各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しく、且つ各々の突起の円形ベースの直径 d_3 の値に等しく、前記中央ユニットは、その各々のダクトの上部オリフィスの直径 d_4 の値が各々の穿孔の下部セクションの直径 d_2 の値に等しい4つのダクトを備える下部ユニット上に位置付けられ、第1のセットの2つのダクトの2つの下部オリフィスがそれぞれ、第1のリザーバ上の2つの異なるサイトにつながり、第2のセットの2つのダクトの2つの下部オリフィスがそれぞれ、第2のリザーバ上の2つの異なるサイトにつながり、第1の及び第2のリザーバがそれぞれ、異なるサイトにおいて下部モジュールの外側につながる（突起が全体において、ダクトに面している）。

【図38】上部モジュールの概略的な、斜視図である。

【図39】中央モジュールの概略的な、斜視図である。

【図40】突起のセットを備える中央ユニットの、3Dナノ構造多孔質膜の上面の上から取られた概略的な、斜視図である。

【図41】下部モジュールの概略的な、斜視図である。

【図42】上部モジュールの、中央モジュールの、及び下部モジュールのアセンブリ備えるマイクロ流体チップの概略的な、斜視図である。

【図43】上部モジュールの写真（チャンバの開口部の側面図）である。

【図44】中央モジュールの写真である。突起のセットを備える3Dナノ構造多孔質膜の上面の上面図である。

【図45】下部モジュールの写真である。ダクトの上部オリフィスのセットを備える下部ユニットの上面の上面図である。

【図46】上部モジュールの、及び下部モジュールの写真である。

【図47】解体された上部モジュールの、解体された中央モジュールの、及び解体された下部モジュールの写真である。

【図48】穿孔を備える、中央ユニットの、非吸収性膜から成る支持体の概略的な、断面図である。

【図49】それを通して再吸収性高分子が押し出されて前記支持体の上面の側上で3Dナノ構造を形成する穿孔を備える、中央ユニットの、非吸収性膜から成る支持体の概略的な、断面図である。

【図50】それを通して再吸収性高分子が押し出されて前記支持体の上面の側上で3Dナノ構造を形成する穿孔を備える、中央ユニットの、非吸収性膜から成る支持体の概略的な、断面図であり、支持体はその上で高分子電解質層が適用されて前記3Dナノ構造上の成形された突起を備える3Dナノ構造多孔質膜を得る。

【図51】その上で中空突起を備える3Dナノ構造膜に固定されて位置付けられる、中央ユニットの、非吸収性膜から成り且つ穿孔を備える支持体の概略的な、断面図である。

【図52】合流の段階で上皮細胞の培養を支持する突起の内面の共焦点顕微鏡を用いる写真である。

【図53】その上面の側上で少なくとも1つの成形された3Dナノ構造を備えるモールドの概略的な、断面図である。

【図54】前記モールドの上面の側上で再吸収性高分子によって覆われたモールドの概略的な、断面図である。

【図55】少なくとも1つの成形された3Dナノ構造の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクスの概略的な、断面図である。

【図56】少なくとも1つの成形された3Dナノ構造の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクスの概略的な、断面図であり、前記マトリクスの下面が高分子電解質層によって覆われる。

【図57】少なくとも1つの穿孔によって穴のあいた非吸収性膜から成る支持体を備える穿孔部分によって組み立てられ少なくとも1つの成形された3Dナノ構造の少なくとも1つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクスの概略的な、断面図であり、前記マトリクスが前記支持体の上面によってその下面の側上で組み立てられて、3Dナノ構造の負のモールドが支持体の前記穿孔と位置合わせされる。

10

20

30

40

50

【図 5 8】少なくとも 1 つの穿孔によって穴のあいた非吸収性膜から成る支持体を備える穿孔部分によって組み立てられ少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の少なくとも 1 つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス of 概略的な、断面図であり、前記マトリクスが前記支持体の上面によってその下面の側上で組み立てられて、3 D ナノ構造の負のモールドが支持体の前記穿孔と位置合わせされ、前記支持体の前記少なくとも 1 つの穿孔で少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクスの下面及び前記支持体の下面によって構成される連続した表面は、高分子電解質層によって覆われて、少なくとも 1 つの突起を備える 3 D ナノ構造膜を形成する。

【図 5 9】3 D ナノ構造多孔質膜を、支持体の下面の側上で、及び、穿孔部分の支持体の少なくとも 1 つの穿孔の延長において少なくとも 1 つの突起を、支持体の上面の側上で、備える穿孔部分に対応する中央モジュールの概略的な、断面図である。

10

【図 6 0】その下面において切断部を備える支持体部分によってその上面の側上で組み立てられ、その上面の側上で少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造を備えるモールドの概略的な、断面図である。

【図 6 1】その下面において切断部を備える支持体部分によってその上面の側上で組み立てられ、その上面の側上で少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造を備えるモールドの概略的な、断面図であり、前記モールドが、その上面の側上で再吸収性高分子によって覆われる。

【図 6 2】少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の少なくとも 1 つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクス of 概略的な、断面図であり、前記マトリクスが支持体部分の切断部で形成される。

20

【図 6 3】その固体の下面の切断部で、少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の少なくとも 1 つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクスを含む支持体部分の概略的な、断面図であって、前記支持体部分は、少なくとも 1 つの穿孔を有する支持体を備える穿孔部分へ組み立てられて、少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の前記負のモールドが前記穿孔と位置合わせされるようになる。

【図 6 4】その固体の下面の切断部で、少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の少なくとも 1 つの負のモールドを備える再吸収性高分子マトリクスを含む支持体部分の概略的な、断面図であって、前記支持体部分は、少なくとも 1 つの穿孔を有する支持体を備える穿孔部分へ組み立てられて、少なくとも 1 つの成形された 3 D ナノ構造の前記負のモールドが前記穿孔と位置合わせされるようになり、前記支持体の前記少なくとも 1 つの穿孔で少なくとも 1 つの負のモールドを備える前記再吸収性高分子マトリクスの下面及び前記支持体の下面によって構成される連続した表面は、高分子電解質層によって覆われて、少なくとも 1 つの突起を備える 3 D ナノ構造膜を形成する。

30

【図 6 5】3 D ナノ構造多孔質膜を、その下面の側上で、及び、穿孔部分の支持体の少なくとも 1 つの穿孔の延長における少なくとも 1 つの高分子電解質突起を、その上面の側上で、備える穿孔部分の支持体、及び支持体部分 I の概略的な、断面図である。

【図 6 6】3 D ナノ構造多孔質膜を、支持体の下面の側上で、及び、穿孔部分の支持体の少なくとも 1 つの穿孔の延長において少なくとも 1 つの突起を、支持体の上面の側上で、備える穿孔部分に対応する中央モジュールの概略的な、断面図である。

40

【図 6 7】円形状支持体部分 I の、100 個の成形された 3 D ナノ構造を備える円形状モールド H (H 1) の、100 個の穿孔を備える円形状穿孔部分 G (G 1) の、及び、中央モジュールの支持体部分 F の、概略的な、斜視図である。

【図 6 8】円形状支持体部分 I の、9 個の成形された 3 D ナノ構造を備える円形状モールド H (H 2) の、9 個の穿孔を備える円形状穿孔部分 G (G 2) の、及び、中央モジュールの支持体部分 F の、概略的な、斜視図である。

【図 6 9】I のアライメントピン及び H 1 のアライメント穴を介した、100 個の成形された 3 D ナノ構造を備える円形状モールド H (H 1) 上の円形状支持体部分 I のアセンブリの概略的な、斜視図である。A : 2 つの要素が組み立てられるときの上面図。B : 要素が解体されるときの上図。C : 2 つの要素が組み立てられるときの輪郭図。D : 2

50

つの要素が解体されるときに輪郭図。

【図 70】アライメントピン I 及び G 1 のアライメント穴を介した、100 個の穿孔を備える円形状穿孔部分 G (G 1) 上の円形状支持体部分 I のアセンブリの概略的な、斜視図である。A : 2 つの要素が組み立てられるときの上面図。B : 要素が解体されるとき
の上面図。C : 2 つの要素が組み立てられるときの底面図。D : 2 つの要素が解体され
ときの底面図。E : G 1 が上に向いており且つ I が底に向いているように 2 つの組み立て
られた要素が戻されるとき
の輪郭図。

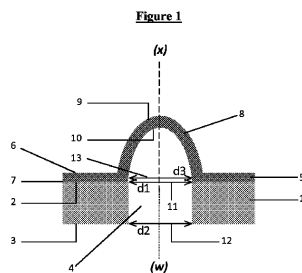
【図 7 1】中央モジュールの支持体部分 F 上に、100 個の穿孔を備える円形状穿孔部分 G (G 1) のアセンブリの概略的な、斜視図である。A : 2 つの組み立てられた要素の底面図。B : 2 つの要素が解体されときの底面図。C : 2 つの要素が組み立てられるときの輪郭図。D : 2 つの要素が組み立てられるときの輪郭図。

【図 7 2】正方形形状支持体部分 i の、100 個の成形された 3 D ナノ構造を備える正方形形状モールド H (h 1) の、100 個の穿孔を備える正方形形状穿孔部分 G (g 1) の、概略的な、斜視図である。

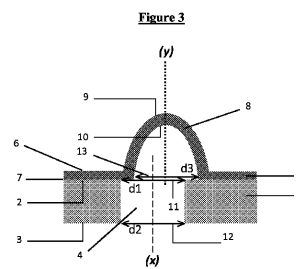
【図 7 3】正方形形状支持体部分 i の、9 個の成形された 3 D ナノ構造を備える正方形形状モールド H (h 2) の、9 個の穿孔を備える正方形形状穿孔部分 G (g 2) の、概略的な、斜視図である。

10

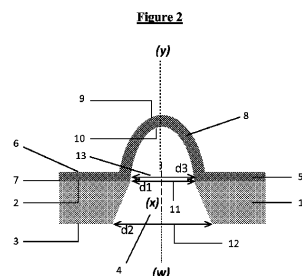
【 図 1 】



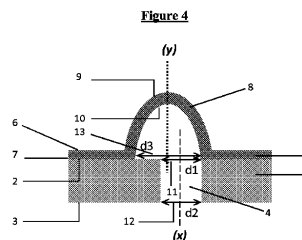
【圖 3】



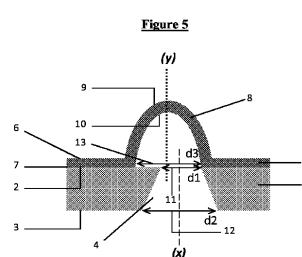
【圖 2】



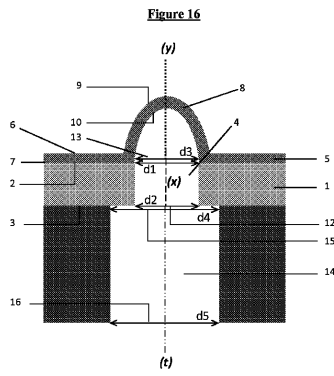
【圖 4】



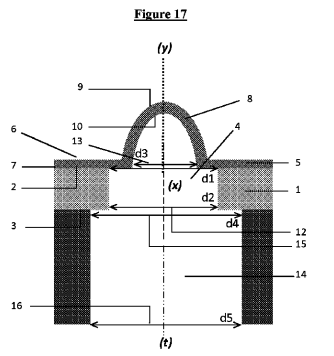
【 図 5 】



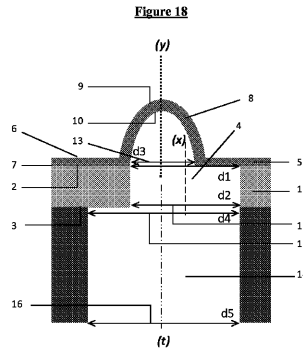
【図 16】



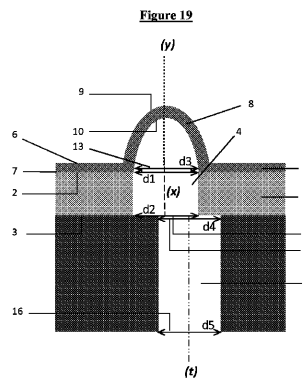
【図 17】



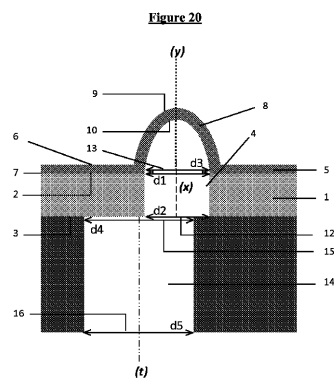
【図 18】



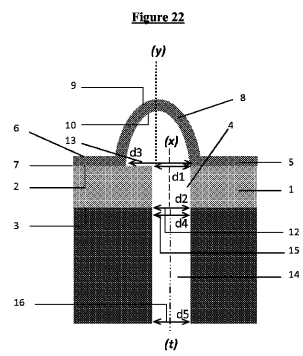
【図 19】



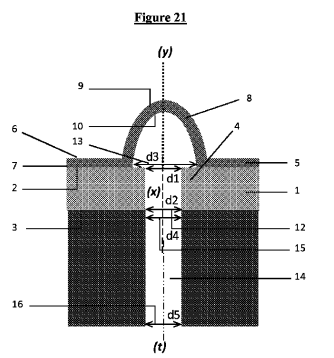
【図 20】



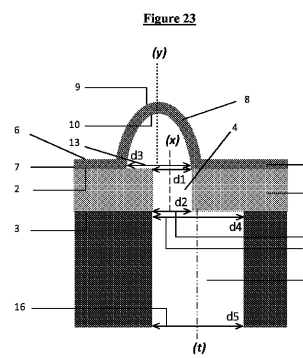
【図 22】



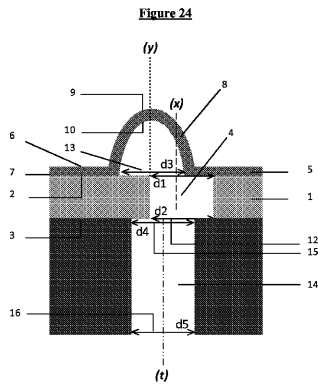
【図 21】



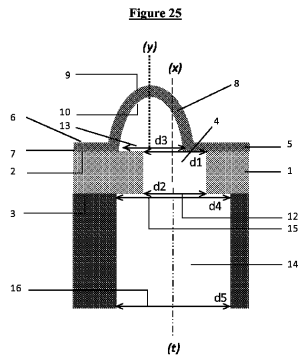
【図 23】



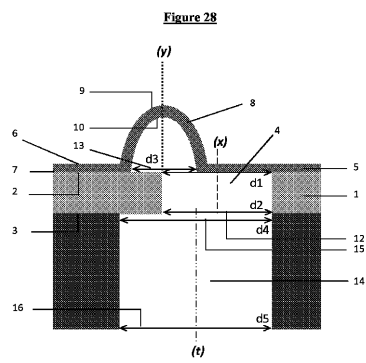
【図 24】



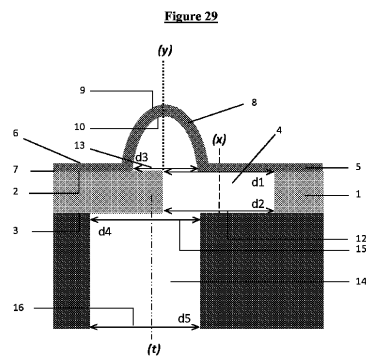
【図 25】



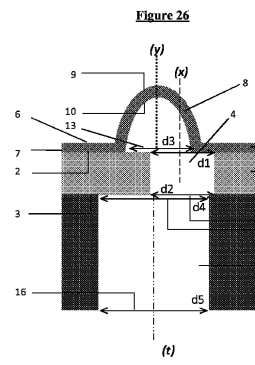
【図 28】



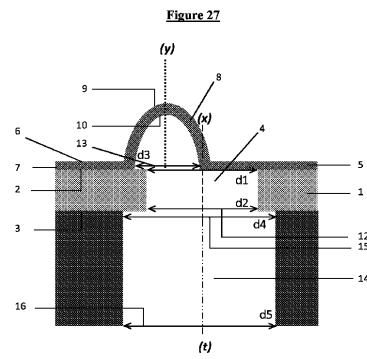
【図 29】



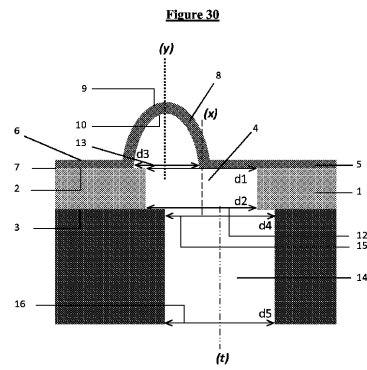
【図 26】



【図 27】

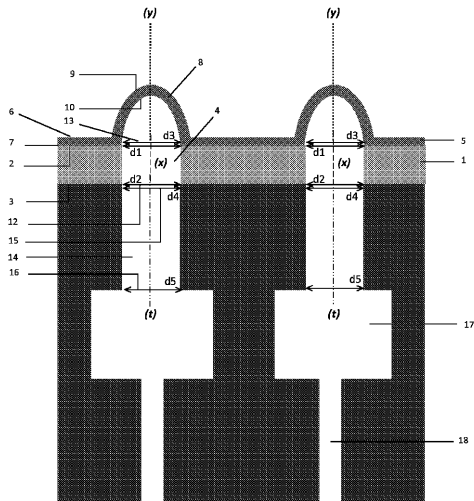


【図 30】



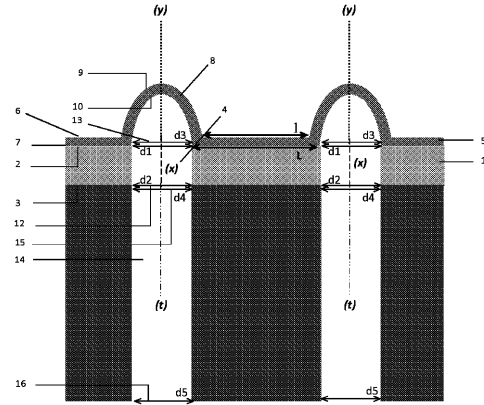
【図 3 1】

Figure 31



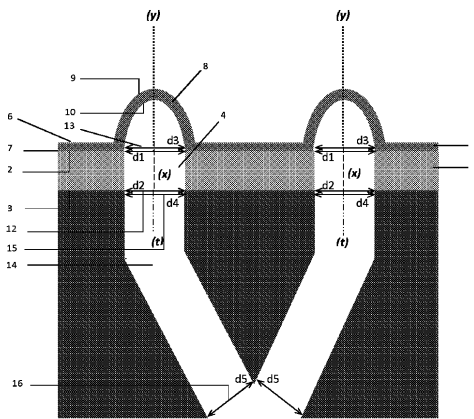
【図 3 2】

Figure 32



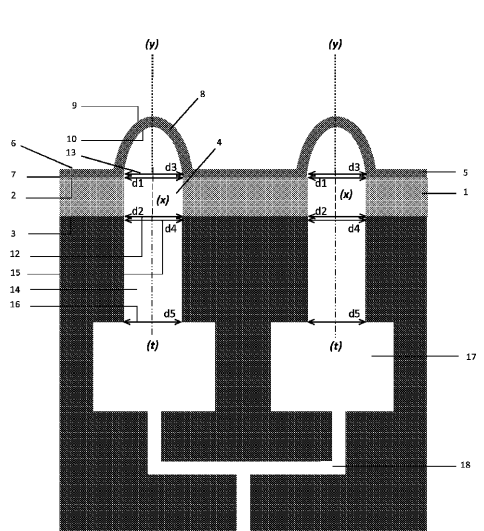
【図 3 3】

Figure 33



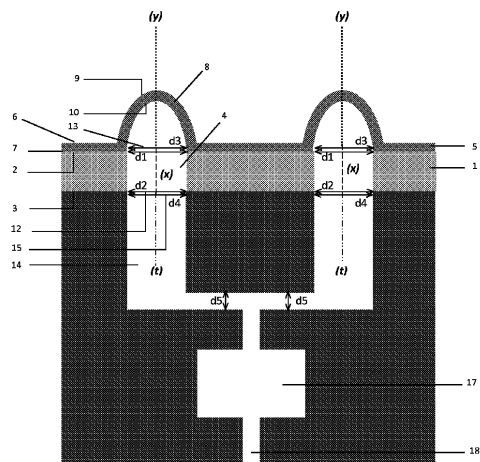
【図 3 4】

Figure 34



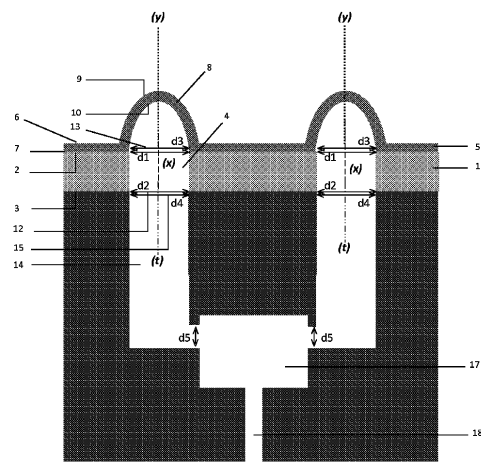
【 図 3 5 】

Figure 35



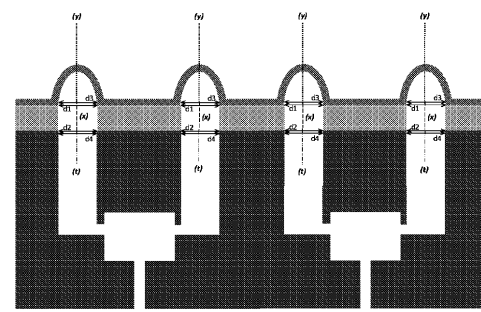
【 図 3 6 】

Figure 36



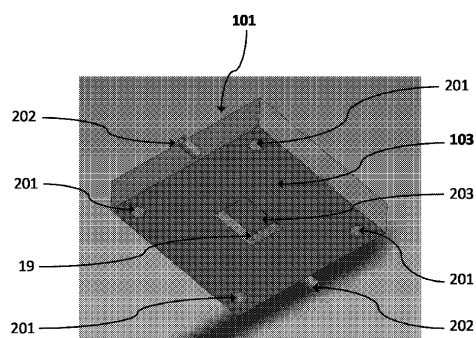
【 図 3 7 】

Figure 37



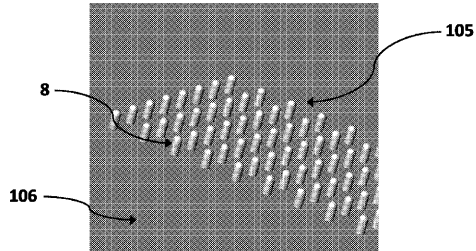
【 図 3 8 】

Figure 38



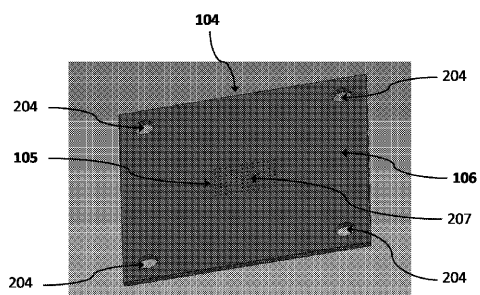
【 図 4 0 】

Figure 40



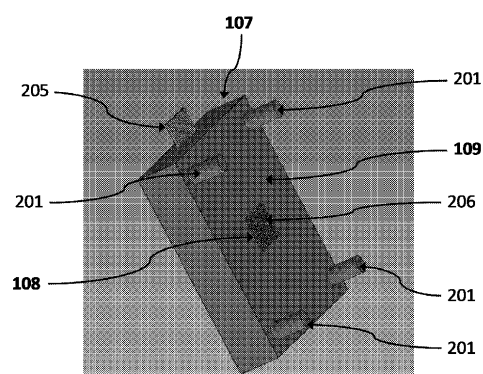
【 図 3 9 】

Figure 39



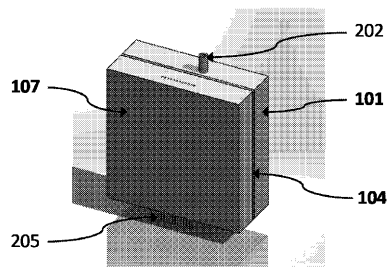
【 図 4 1 】

Figure 41



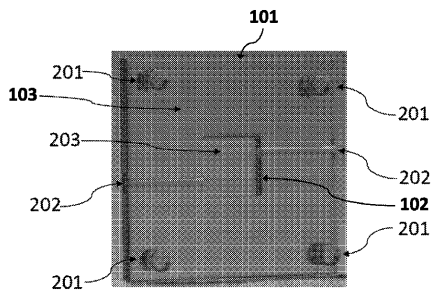
【図 4 2】

Figure 42



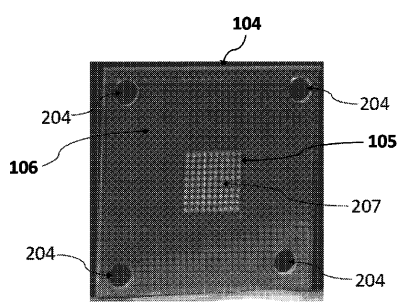
【図 4 3】

Figure 43



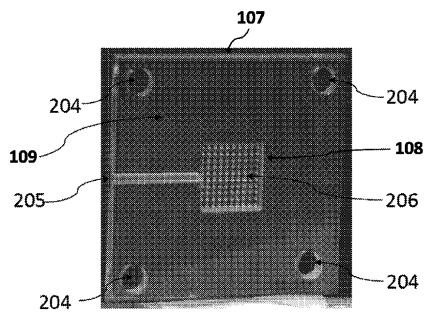
【図 4 4】

Figure 44



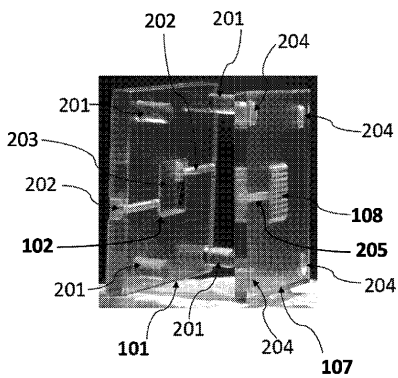
【図 4 5】

Figure 45



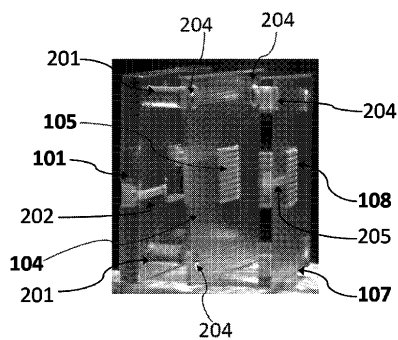
【図 4 6】

Figure 46



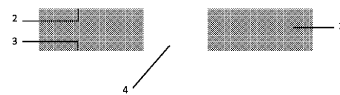
【図 4 7】

Figure 47



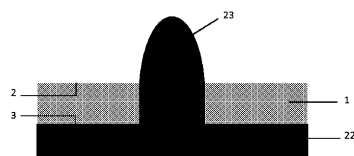
【図 4 8】

Figure 48



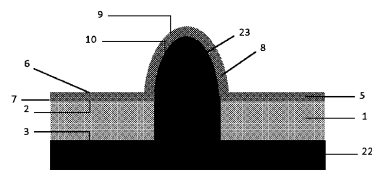
【図 4 9】

Figure 49

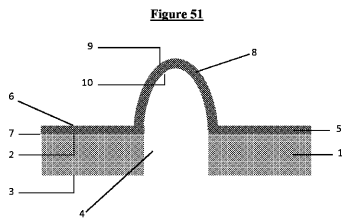


【図 5 0】

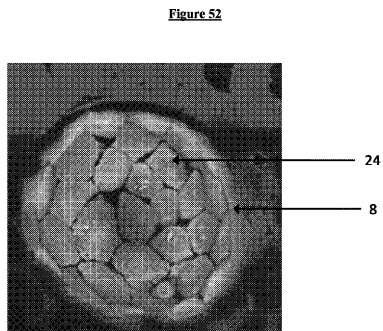
Figure 50



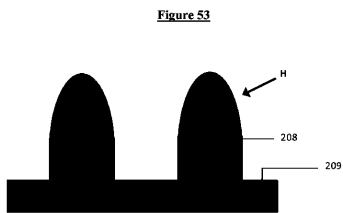
【図 5 1】



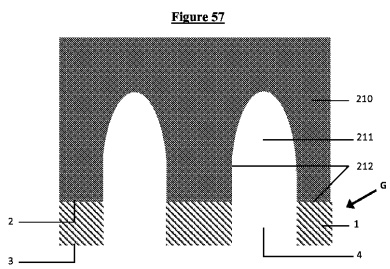
【図 5 2】



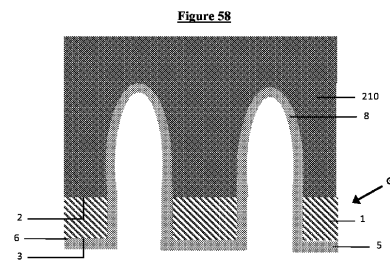
【図 5 3】



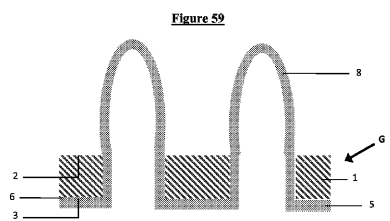
【図 5 7】



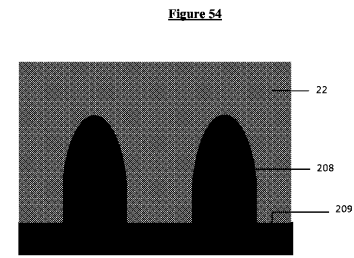
【図 5 8】



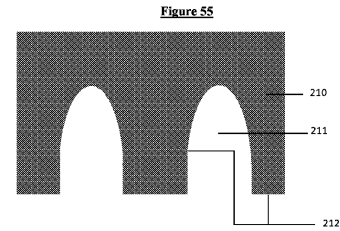
【図 5 9】



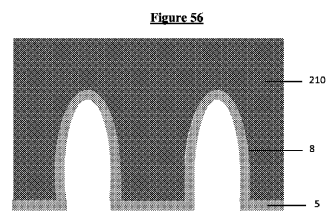
【図 5 4】



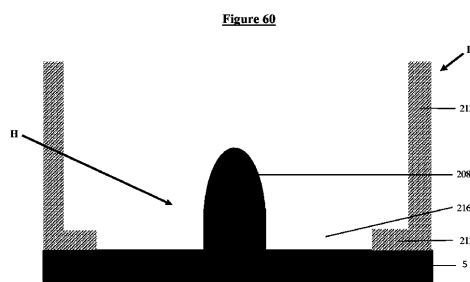
【図 5 5】



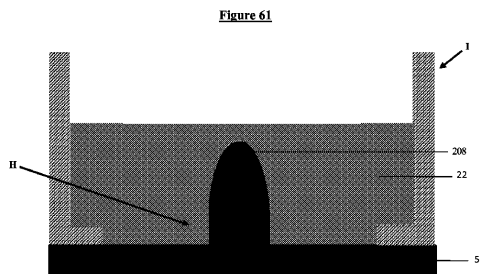
【図 5 6】



【図 6 0】

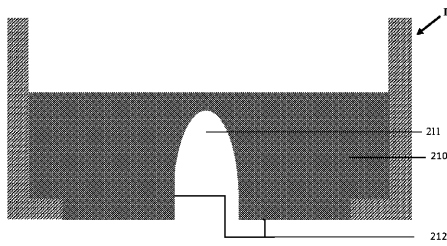


【図 6 1】



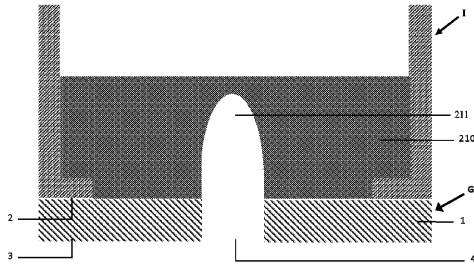
【図 6 2】

Figure 62



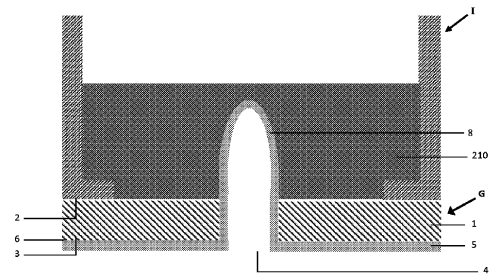
【図 6 3】

Figure 63



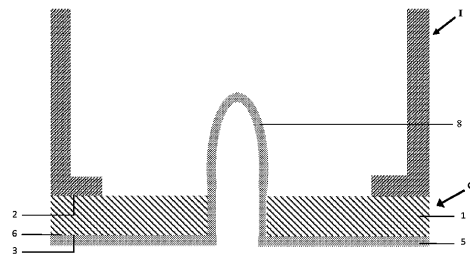
【図 6 4】

Figure 64



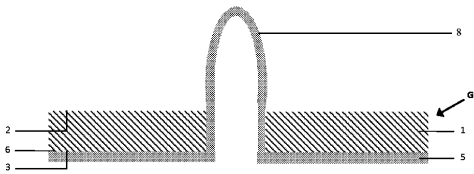
【図 6 5】

Figure 65



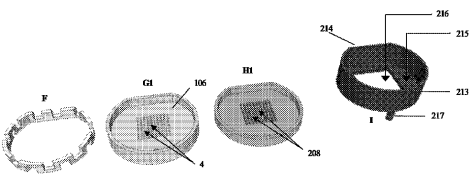
【図 6 6】

Figure 66



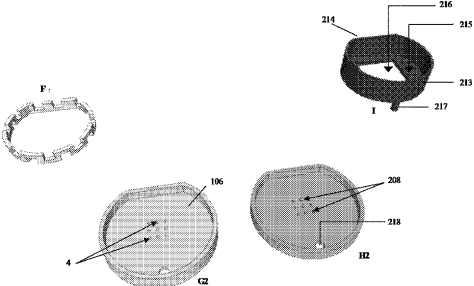
【図 6 7】

Figure 67



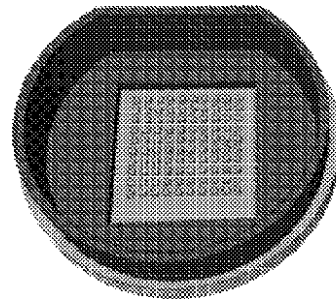
【図 6 8】

Figure 68



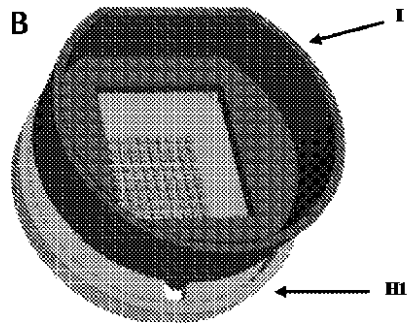
【図 6 9 A】

A

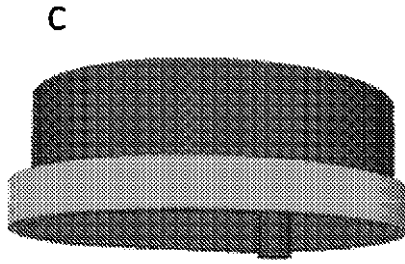


【図 6 9 B】

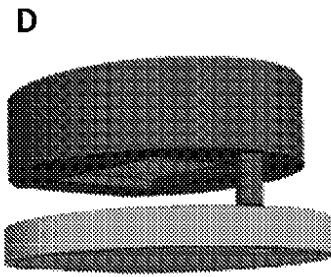
B



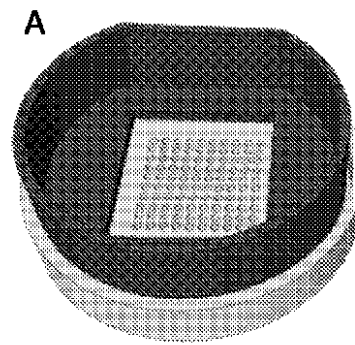
【図 69 C】



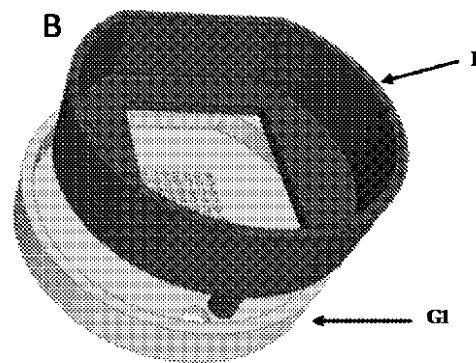
【図 69 D】



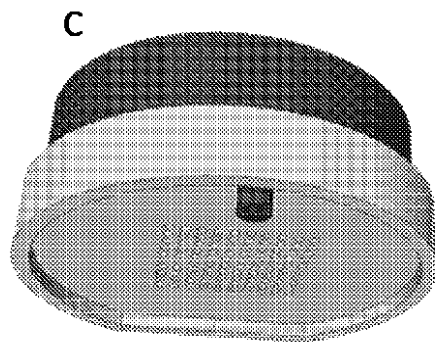
【図 70 A】



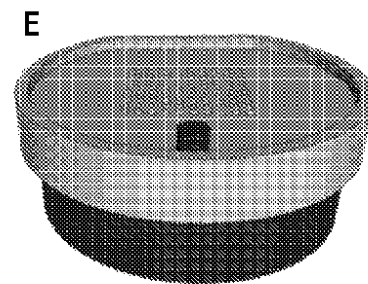
【図 70 B】



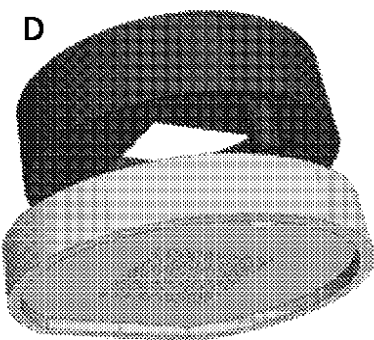
【図 70 C】



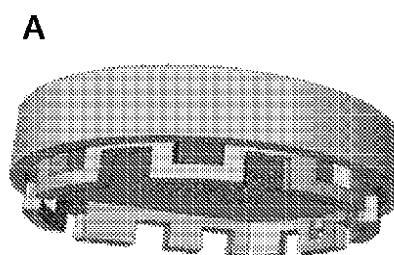
【図 70 E】



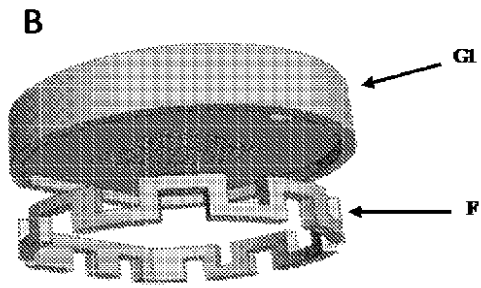
【図 70 D】



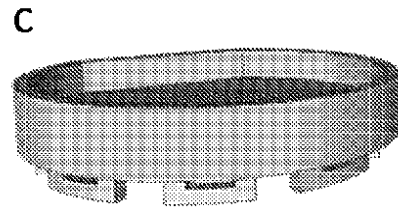
【図 71 A】



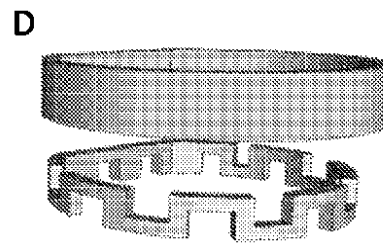
【図 7 1 B】



【図 7 1 C】

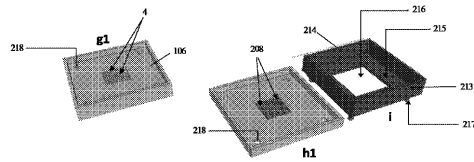


【図 7 1 D】



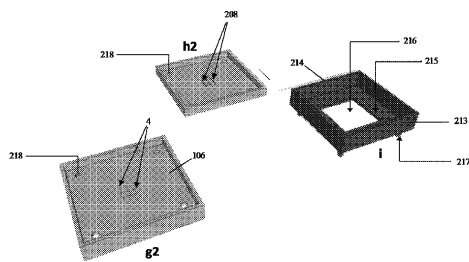
【図 7 2】

Figure 72



【図 7 3】

Figure 73



フロントページの続き

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ドナルド・キース・マルタン

フランス・38610・ジエール・シュマン・デュ・プラターヌ・18

(72)発明者 ナタリー・ピコレ・ダハン

フランス・38580・ラ・フェリエール・ル・クロザ・(番地なし)

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 国際公開第2012/032646(WO, A1)

特表2014-506801(JP, A)

特表2011-528232(JP, A)

特開2004-065087(JP, A)

特開2005-143343(JP, A)

特表2012-509663(JP, A)

国際公開第2010/009307(WO, A1)

Daverey, A et al, Langmuir, 2015年, 31(36), 9991-10001

Kim, H J et al, Integrative biology, 2013年, 5(9), 1130-1140

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)