

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5703302号
(P5703302)

(45) 発行日 平成27年4月15日(2015.4.15)

(24) 登録日 平成27年2月27日(2015.2.27)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 M 1/04 (2006.01)	C 1 2 M 1/04	
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z
C 1 2 M 3/06 (2006.01)	C 1 2 M 3/06	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
請求項の数 8 (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-532891 (P2012-532891)	(73) 特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(86) (22) 出願日	平成23年7月8日(2011.7.8)	(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/065662	(73) 特許権者	899000068 学校法人早稲田大学 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地
(87) 国際公開番号	W02012/032844	(74) 代理人	100085464 弁理士 野口 繁雄
(87) 国際公開日	平成24年3月15日(2012.3.15)	(72) 発明者	務中 達也 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
審査請求日	平成25年3月12日(2013.3.12)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-200679 (P2010-200679)		
(32) 優先日	平成22年9月8日(2010.9.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】細胞培養容器及びその容器を用いた細胞培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基体内部に形成され、細胞を收容する空間をもち、細胞培養液を流通させる流路に繋がり、前記空間の対向する一对の側面の一方が気体を透過させ液体を透過させない第1ガス透過膜からなり、前記一对の側面の他方が気体を透過させ液体を透過させない第2ガス透過膜からなるウエルと、

前記第1ガス透過膜を介して前記ウエルと接し、特定成分を含むガスを流通させる第1流路と、

前記第2ガス透過膜を介して前記ウエルと接し、特定成分を含まないか又は前記第1流路に流すガスよりも特定成分を低濃度を含むガスを流通させる第2流路と、を備えた細胞培養容器。

【請求項2】

前記ウエルは $6.3 \times 10^{-6} \text{mm}^3$ から 1mm^3 の間の容積を有する請求項1に記載の細胞培養容器。

【請求項3】

前記ウエルの上下面を封止している上下面封止部の少なくとも一方が外部から前記ウエル内部を視認可能な透明窓となっている請求項1又は2に記載の細胞培養容器。

【請求項4】

一方の前記透明窓の内面に、接触液中の酸素濃度に応じて光学的性質を変化させる酸素モニタ物質が固定されている請求項3に記載の細胞培養容器。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の細胞培養容器のウエルに細胞培養液を充填するとともに細胞を導入するステップと、

前記ウエルに導入された細胞のウエル内における停止位置を前記透明窓を介して認識するステップと、

前記第 1 流路及び第 2 流路のガス流量とウエル内に形成される特定成分の濃度分布との予め求められた関係に基づいて、細胞の停止位置における前記特定成分の濃度を所定濃度にするために第 1 流路及び第 2 流路のガス流量を設定するステップと、

前記ウエル内の細胞培養液は静止させたままで、前記第 1 流路及び第 2 流路に前記ガス流量設定ステップで設定したガス流量でガスを流すステップと、
を備えて細胞の培養を行なう細胞培養方法。

10

【請求項 6】

前記特定成分は酸素である請求項 5 に記載の細胞培養方法。

【請求項 7】

前記ウエル内の酸素濃度は 21% 未満である請求項 6 に記載の細胞培養方法。

【請求項 8】

前記細胞は iPS 細胞であり、細胞の停止位置における酸素濃度を iPS 細胞が活性化する酸素濃度にする請求項 7 に記載の細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

20

【0001】

本発明は、細胞を培養するためのウエルを有し、そのウエル内に細胞の培養に適した環境を形成するための細胞培養容器と、その容器を用いた細胞培養方法に関するものである。そのような細胞培養容器は、例えば生体内の微小環境の模擬を行なうことにより、細胞の機能や細胞に対する薬剤の効用を解析するために使用されるものである。

【背景技術】**【0002】**

生体内の正常な組織では血管から十分な酸素や栄養が供給されている。これに対して、腫瘍組織内では、癌細胞の増殖に応じた血管の新生が伴わないことや、個々の血管構造が無秩序で脆弱であることなどから、酸素や栄養の低濃度状態になっているといわれている。このような癌と酸素や栄養の低濃度の関係については従来から議論されてきたが、最近特に活発に研究がなされている。これまでに得られた知見として、例えば一部の癌細胞は低酸素濃度領域における耐性を獲得していることがわかっている（例えば、非特許文献 1 参照。）。

30

【0003】

さらに、非特許文献 1 において幹細胞ニッチの重要な要素の一つとして低酸素濃度が挙げられているとともに、低酸素濃度により癌細胞が癌幹細胞“様”になることが示されている。このように癌の機能を詳細に調べるアプローチの一つとして、低酸素濃度状態での癌細胞の培養が重要となっており、癌細胞の存在する環境を再現することが必要とされている。

40

【0004】

現在、細胞の培養は、一般的に温度 37℃、水蒸気飽和、約 5% CO₂ の状態を維持することができるインキュベータ内で行われている。インキュベータ内の酸素濃度は大気中とほぼ同じ 20% 程度である。また、低酸素濃度状態で研究を行なう場合には、酸素濃度を 0.7% や約 5% といった低酸素濃度の状態を保持することの可能な特別なインキュベータが用いられている。

【0005】

しかし、血管からはなれた癌細胞や、例えば 10 個以上の一定の大きさの塊になった癌細胞群の周辺微小環境では、酸素濃度に勾配があると考えられる。特に骨髄内から骨に向かう方向については、骨の深部の酸素濃度がほぼ 0% と考えられることから、同方向に酸

50

酸素濃度勾配が存在すると考えられる。そのため、癌細胞を培養するためには低酸素濃度領域における酸素濃度勾配をもつ環境を作り出すことが必要となる。

【0006】

しかし、従来の細胞の培養において一般的に用いられてきたシャーレ、フラスコ又はウエルプレート等の容器では、酸素濃度勾配を形成しようとしても、それらの容器は容積が大きく、また、熱源として炭酸ガスインキュベータ、顕微鏡照明ランプ、蛍光ランプ、その他の電気機器等が存在するので、熱の対流を主な原因とする液体（ここでは培地）の移動が起き、酸素濃度勾配をもつ環境を安定的に作り出すことはできなかった。

【0007】

これに対して、 μ TAS (micro Total Analysis system) 又は微小流体制御技術 (micro fluidics) と呼ばれる研究領域においては、微細加工技術を用いて作製されたマイクロ容器（例えば容積が $1 \mu\text{L}$ 以下）が用いられている。容器内の容積を微小にすれば、液体は微小空間の密閉系に閉じ込められて周囲の壁の影響が大きくなり、流れにくくなると考えられ、熱源があったとしても対流の発生が抑制される。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特表2004-508571号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】実験医学 Vol.25, No.14, P2139-2143, 2007

【非特許文献2】島津評論 66〔1・2〕 37~44 (2009.9)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記のようなマイクロ容器を用いて特定成分の濃度勾配を作り出す方法として、例えば特許文献1に示されるように、濃度の異なる複数の液体を流しながら接触させる方法が一般的であった。しかし、そのような方法を細胞の培養に転用すると、細胞培養液が常に流れることになるため、細胞が細胞培養液の流れにより何らかのストレスを受けるといった問題や、細胞周辺の微小環境の液性因子が細胞培養液の流れによって流されてしまい、実際の細胞周辺環境とは異なった環境となってしまうという問題が生じる。

20

30

【0011】

また、マイクロ容器のウエルの上面などはPDMS（ポリジメチルシロキサン）によって形成されているものが多い。PDMSは気体透過性であるため、通常の細胞培養であればインキュベータ内と同様の各気体分圧をウエル内で維持するという点に対しては有効である。しかし、ウエル内がPDMS膜を介してインキュベータ内と平衡状態になるので、低酸素濃度領域における酸素濃度勾配のような濃度勾配を形成することは困難であった。

【0012】

以上のことから、細胞培養液の流れのない状態では低酸素濃度領域における酸素濃度勾配をもつ環境を作り出すことができなかった。そのため、腫瘍周辺の微小環境を模擬することも、癌幹細胞と同様の振る舞いをする細胞を安定して再現性良く培養することも、癌幹細胞様となった癌細胞を取り出すことも困難であった。また、白血病の研究においても、低酸素濃度領域における酸素濃度勾配を維持することができなかったため、骨髄内微小環境を模擬することができなかった。

40

【0013】

そこで本発明は、酸素や二酸化炭素に代表される気体の、細胞の培養に適した濃度領域をもつ環境を安定的に作り出すことができるようにすることを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

50

本発明の細胞培養容器は、基体内部に形成され、細胞を收容する空間をもち、細胞培養液を流通させる流路に繋がり、空間の対向する一対の側面の一方が気体を透過させ液体を透過させない第1ガス透過膜からなり、一対の側面他方が気体を透過させ液体を透過させない第2ガス透過膜からなるウエルと、第1ガス透過膜を介してウエルと接し、特定成分を含むガスを流通させる第1流路と、第2ガス透過膜を介してウエルと接し、特定成分を含まないか又は第1流路に流すガスよりも特定成分を低濃度に含むガスを流通させる第2流路と、を備えたものである。

【0015】

本発明の細胞培養容器のウエルの体積について考える。このウエルでは、生体内の微小環境をそのままのスケールで模擬することが望ましい。ここで、細胞や組織の機能を測定するための最小単位として細胞を考える。細胞を近似的に直径Rの球とみなせば、2個の細胞間相互作用を観測するためには、ウエルの底面は細胞を2個並べられることが必要であり、最小で直径2Rの円以上の大きさとなる。細胞径を10 μ mとすれば最小で直径20 μ mの円が必要となる。高さは細胞の2倍が必要とすれば、最小体積は6.3 \times 10⁻⁶mm³となる。

10

【0016】

一方、最大の体積を考えると、1mm \times 1mm \times 1mm=1mm³程度である。それより大きくなると細胞間が離れすぎて相互作用を観察できなくなる。

【0017】

以上から、6.3 \times 10⁻⁶mm³から1mm³の間の容積を有するものであることが好ましい。

20

【0018】

この最大の体積においても、液体は微小空間の密閉系に閉じ込められて周囲の壁の影響が大きくなり、流れにくくなって対流の発生が抑制される。実際に、実験する際は流れがない状態であり、培養液を交換する際などの流速もせいぜい10 μ m/s程度と考えられる。仮に流速10mm/sという桁はずれに大きい液体の流れがあったとしても、レイノルズ数(Re)は層流から乱流に遷移する2300よりも十分に小さく、層流となるため、ウエル内では液体は拡散に支配されて混合していくと考えられる。すなわち、ウエル内に形成した環境を安定して維持することができる。

【0019】

30

ウエルの上下面を封止している上下面封止部の少なくとも一方が外部からウエル内部を視認可能な透明窓となっていることが好ましい。そうすれば、顕微鏡等を使って外部から培養細胞の位置や様子を確認することが可能になる。

【0020】

その場合、その透明窓の内面に、接触液中の酸素濃度に応じて光学的性質を変化させる酸素モニタ物質を固定することができる。そうすれば、ウエル中に形成される酸素濃度分布を光学的に測定することができる。このような細胞培養容器はウエル中の酸素濃度勾配の検証に使用するためのテストチップとしても利用することができる。

【0021】

「酸素モニタ物質」としては、例えば白金ポルフィリン等の蛍光色素を用いることができる。白金ポルフィリン等を用いた酸素濃度分布の測定については実施例において詳述する。

40

【0022】

本発明の細胞培養方法は、本発明の細胞培養容器のうち、基体のウエル上下面を封止している上下面封止部の少なくとも一方が外部からウエル内部を視認可能な透明窓となっているものを用い、ウエルに細胞培養液を充填するとともに細胞を導入するステップと、ウエルに導入された細胞のウエル内における停止位置を透明窓を介して認識するステップと、第1流路及び第2流路のガス流量とウエル内に形成される特定成分の濃度分布との予め求められた関係に基づいて、細胞の停止位置における特定成分の濃度を所定濃度にするために第1流路及び第2流路のガス流量を設定するステップと、ウエル内の細胞培養液は静

50

止させたままで、第1流路及び第2流路に上記ガス流量設定ステップで設定したガス流量でガスを流すステップと、を備えて細胞の培養を行なうものである。

【0023】

ウエル内に形成する濃度勾配の対象となる特定成分として酸素を挙げることができる。その場合、ウエル内の酸素濃度は21%未満であることが好ましい。そうすれば、生体内環境に近い酸素濃度勾配をウエル内に作り出すことができる。

【0024】

本発明の細胞培養方法により培養する細胞としてiPS細胞を挙げることができる。その場合、細胞の停止位置の酸素濃度を約5%にするように高濃度ガス及び低濃度ガスの流量を調整することが好ましい。

10

【0025】

一部の癌細胞の培養には低酸素濃度状態を作ることが好ましい。ここで低酸素濃度状態とは、酸素濃度が概ね0~5%の状態である。その理由は次の通りである。ヒト肺胞は人体中で酸素が一番豊富にある環境であり、その酸素分圧は一気圧下で100mmHg、即ち $100/760 = 13\%$ である。この酸素は血管を通じてヘモグロビンにより全身に循環され、毛細血管の末端の酸素濃度は、45-50mmHg、即ち5.9%-6.5%となる。また正常組織の神経、膠原繊維、繊維芽細胞等の間質では、20-40mmHg、即ち2.6%-5.2%となる。さらに腫瘍内では0-5%の領域に分布し、中央値は1.3%程度となる。一方、幹細胞/前駆細胞の増殖と分化の制御は、多くが酸素濃度1~5%の範囲内であり、iPS細胞も酸素濃度5%で増殖能が亢進されることが報告されている。よって、生体を模した癌細胞の培養のための「低酸素濃度状態」とは、概ね0~5%程度の酸素濃度とするのが適当である。

20

【発明の効果】

【0026】

本発明にかかる細胞培養容器は、ウエル内部の空間の対向する一対の側面がそれぞれ気体を透過させ液体を透過させない第1ガス透過膜と第2ガス透過膜からなり、特定成分を含むガスを流通させる第1流路が第1のガス透過膜を介してウエルと接し、特定成分を含まないか又は第1流路に流すガスよりも特定成分を低濃度に含むガスを流通させる第2流路が第2のガス透過膜を介してウエルと接するので、第1流路及び第2流路においてそれぞれ一定流量でガスを流通させることでウエル内の細胞培養液中に特定成分の濃度勾配を安定的に形成することができる。ウエル内の細胞培養液中に形成される特定成分の濃度勾配は、第1流路及び第2流路を流れるガスの特定成分濃度と各ガス流量によって調整することができる。

30

【0027】

本発明にかかる細胞培養方法は、本発明の細胞培養容器のうち、外部からウエル内部を視認できるように構成されたものを用い、ウエル内に導入した細胞の位置を認識して、その位置の特定成分濃度を所定の濃度に調整するようにしたので、細胞の周囲環境を培養に適した環境にしたり、生体内環境に近い環境にしたりすることができる。この方法では、第1流路及び第2流路では高濃度ガスと低濃度ガスを常時流通させるがウエル内では細胞培養液を流通させないため、細胞に不要なストレスを与えることなく細胞の培養に適した環境を安定的に作り出すことが可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A】細胞培養容器の一実施例を示す平面図である。

【図1B】図1AのA-A位置における断面図である。

【図2】同実施例の斜視図である。

【図3】ウエル内の酸素濃度分布のシミュレーション用の容器の要部斜視図である。

【図4A】ウエル内の酸素濃度分布のシミュレーション結果を示す濃度分布模式図である。

【図4B】ウエル中央部分における酸素濃度勾配を示すグラフである。

50

【図5】同実施例の細胞培養容器を用いた細胞培養方法を示すフローチャートである。

【図6】酸素分圧と測定された蛍光量をStern - Bolmerの式によりプロットした結果の一例を示すグラフである

【発明を実施するための形態】

【0029】

図1及び図2を用いて細胞培養容器の一実施例を説明する。

この実施例の細胞培養容器1はウエル5、第1流路10及び第2流路12を内部に備えている。ウエル5は直方体形状の空間であり、その対向する一对の側面の一方の側面に第1流路10の一部区間がガス透過膜14を介して接し、反対側の側面に第2流路12の一部区間がガス透過膜16を介して接している。ガス透過膜14、16は、ガスは通すが液体を通さない膜である。ウエル5の他の一对の側面の一方の側面には細胞培養液の導入用流路6、他方の側面には排出用流路8を備えている。

10

【0030】

細胞培養容器1は封止基板としての2枚の透明基板2、4の間に、ウエル5、第1流路10及び第2流路12をなす貫通溝を備えた流路形成シート3が挟み込まれて熱圧着により一体化され、1つのチップとして構成されている。透明基板2、4は外側からウエル5の内部を視認できる程度に透明で気体及び液体を透過させない平板、例えばガラス基板や石英ガラス基板を用いることができる。透明基板4は強度保持のため0.5~1.0mm程度の厚みが好適である。透明基板2は、例えばウエル5の内部を倒立顕微鏡を用いて観察することを前提とする場合には厚さ0.17mm程度の厚みが好適である。

20

【0031】

流路形成シート3の材質としては、接着性フッ素樹脂であるネオフロン(登録商標)E F E P(エチレン-ペルフルオロエチレンプロペンコポリマー)を用いることができる。流路形成シート3の厚さは20 μ m~1000 μ mが適当である。ネオフロンはカットイングによるパターン化が可能である。また、ウエル5と第1流路10及び第2流路12との間を仕切るガス透過膜14、16としては、PTFE(ポリテトラフルオロエチレン)製の多孔質膜であるポアフロン(登録商標:住友電工ファインポリマー株式会社の製品)で、孔径が例えば0.1 μ mのものを用いることができる。

【0032】

ウエル5、第1流路10及び第2流路12の上面を封止している透明基板4には、導入用流路6、排出用流路8、第1流路10及び第2流路12の端部の位置に各流路6、8、10、12の入口又は出口となる貫通孔18、20、22、24、26及び28が開けられている。

30

【0033】

細胞培養容器1は、ウエル5に細胞培養液を充填し、その細胞培養液中に細胞を收容し、ウエル5内の細胞培養液は静止させた状態で、第1流路10と第2流路12で互いに特定成分濃度の異なる高濃度ガスと低濃度ガスを流通させることにより、ウエル5内に特定成分の濃度分布を形成することができる。含有する特定成分の濃度が高い方のガスを高濃度ガスとし、低い方のガスを低濃度ガスとする。特定成分とは例えば酸素や二酸化炭素である。この実施例では、図2に示しているように、貫通孔22を第1流路10への高濃度ガス入口、貫通孔24をその排出口とし、貫通孔26を第2流路12への低濃度ガス入口、貫通孔28をその排出口としている。第1流路10に高濃度ガスを一定流量で流し、第2流路12に低濃度ガスを一定流量で流すことにより、ウエル5内には高濃度ガスの特定成分濃度を最大濃度、低濃度ガスの特定成分濃度を最低濃度とする濃度勾配を形成することができる。

40

【0034】

透明基板2又は4のウエル5部分の内側表面に酸素モニタ物質として白金ポルフィリン等の蛍光色素を固定することにより、酸素濃度分布を測定するためのテストチップとすることができる。酸素分圧の分布を可視化するには、以前から感圧塗料法が知られている。これは白金ポルフィリン等の蛍光色素が酸素により消光し、発光量が酸素分圧の関数とな

50

ることを利用したものである。その蛍光色素をマトリクスポリマーとともに溶媒に溶かした試薬を作製し、これを透明基板 2 又は 4 の内側表面に例えば 3 μm の厚みで塗布する。具体的には、P T M S P (ポリ 1 トリメチルシリル 1 プロピン) というガス透過性の良いポリマーをマトリクスポリマーとして選択することにより、酸素による蛍光量の変化を大きくするとともに、温度依存性を小さくすることができる(非特許文献 2 参照。)。蛍光強度の測定は、例えば 405 nm の紫色レーザーを励起光とし、これを拡散板により均一化して酸素濃度可視化テストチップ上面に照射し、蛍光色素から発する 650 nm の蛍光を CCD カメラで測定する。

【0035】

CCD カメラで測定した蛍光強度をデータ処理することにより蛍光色素を塗布した各位置における酸素分圧が得られる。白金ポルフィリン等の蛍光試薬は次式(1)に示される Stern - Bolmer の式に従って酸素により消光することが知られている。なお、次式(1)における I は酸素分圧 p のときの発光強度、 I_{ref} は酸素分圧 p_{ref} (通常は大気圧 21 kPa に設定) のときの発光強度、 $A_0 \sim A_3$ はフィッティング係数である。

$$I_{ref}/I = A_0 + A_1(p/p_{ref}) + A_2(p/p_{ref})^2 + A_3(p/p_{ref})^3$$

【0036】

酸素分圧と測定された蛍光量を上記(1)式によりプロットした結果を図 6 に示す。縦軸は規格化した蛍光量の逆数であり、横軸は規格化した酸素分圧である。この図から、酸素分圧零付近では常圧に比べて蛍光量が数十倍大きく、酸素分圧に対して発光量が大きく変わる試薬であり、本発明における酸素濃度勾配用チップウエル内の酸素濃度を測定するのに十分な性能を持つことがわかる。

【0037】

この手法によればテストチップウエル内の酸素濃度分布を可視化することができる。これにより、テストチップウエル内の酸素濃度分布を観測・解析することができ、ウエル内の酸素濃度勾配を制御し、さらにはウエル内の任意の位置を所望の濃度に制御することも可能である。

【0038】

次に、流体解析ソフトウェアを使用してウエル 5 内に形成される濃度勾配をシミュレーションしたデータを図 4 に示す。シミュレーション用の流体解析ソフトウェアとして有限要素法により解析を行う CoventorWare (Coventor, Inc.) を用いた。流体解析ソフトウェアとしては有限要素法を用いる他の解析ソフトウェアを使用することもできる。

【0039】

このシミュレーションは、細胞培養容器 1 を模擬した図 3 に示されるモデルを使用した。このモデルは、多孔質膜 50, 52 でそれぞれ周囲を囲われた 2 本の流路 54, 56 の間に水を充填した領域(濃度勾配形成領域) 58 を配置したものである。各流路 54, 56 と濃度勾配形成領域 58 の間の多孔質膜 50, 52 の幅は 100 μm であり、濃度勾配形成領域 58 の平面形状を 500 μm \times 500 μm の正方形とした。

【0040】

このシミュレーションでは、一方の流路に酸素濃度が 100% のガス、他方の流路に酸素濃度が 0% のガスをそれぞれ 0.001 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、0.01 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で流したときの酸素濃度分布を算出した。図 4 A は図 3 のモデルでの酸素濃度分布を表わしている。図 4 B に示した結果は濃度勾配形成領域の中央部(図 4 A に矢印で示される線上の位置)におけるものであるが、この結果からわかるように、濃度勾配形成領域内には直線的な濃度勾配が形成され、さらにその濃度勾配はガス流量が大きいほど勾配が大きく、ガス流量が小さいと勾配が小さくなる。このことから、細胞培養容器 1 において第 1 流路 10 を流れる高濃度ガスの濃度と流量、第 2 流路 12 を流れる低濃度ガスの濃度と流量を制御することにより、ウエル 5 内に形成される濃度勾配を制御することができるとともに、ウエル 5 内の任意の位置の特

10

20

30

40

50

定成分濃度を所望の濃度に制御することもできる。

【0041】

次に、細胞培養容器1による細胞培養方法について図2及び図5を参照しながら説明する。ここでは、癌細胞を培養する場合について説明する。第1流路10で流す高濃度ガスは酸素を約5%含有するガスであり、第2流路12で流す低濃度ガスは酸素を0.1%含有するガスである。この細胞培養方法を実施する前提として、高濃度ガスと低濃度ガスの流量とその流量で両ガスを流して平衡状態となったときにウエル5に形成される濃度分布との関係が予め測定又はシミュレーションされ、その測定データ又はシミュレーションデータが記憶媒体等に保持されている。そして、その保持されている測定データ又はシミュレーションデータに基づいてウエル5内の任意の位置の濃度を所望の濃度にするための両ガスの流量が設定できる状態となっている。

10

【0042】

ここで、高濃度ガスと低濃度ガスの流量とウエル5に形成される濃度分布との関係の測定データは例えば白金モルフィリンを塗布したテストチップを用いて求めることができ、シミュレーションデータは図3及び図4を用いて説明したシミュレーションにより求めることができる。

【0043】

まず、培養液入口である貫通孔18から培養液を供給してウエル5内を充填する。このとき、癌細胞を培養液とともにウエル5に導入する。培養液の供給流量は細胞がウエル5の中央部付近に停止して留まるように制御することが好ましい。ウエル5内に培養液を充填した後、培養液の供給を停止し、ウエル5内の培養液を静止状態とする。

20

【0044】

ウエル5内に導入された細胞の位置を認識する。細胞位置の認識方法としては、例えば顕微鏡画像を用いた画像認識を挙げることができる。認識した細胞の位置の酸素濃度やその周辺環境が培養に適した環境となるような条件を予め用意されている測定データ又はシミュレーションデータの中から選択して設定する。高濃度ガス、低濃度ガスをそれぞれ設定した流量で供給することにより、一定時間経過後に第1流路10と第2流路12の間のウエル5内の酸素濃度が平衡状態に達し、ウエル5内に安定した酸素濃度勾配が形成され、ウエル5内に導入した癌細胞の培養に適した条件で行なうことができるようになる。ウエル5内では培養液の流れがないため、癌細胞がストレスを受けることなくその周辺環境も安定した状態を維持することができる。ウエル5は容積が 1 mm^3 以下のサイズであるため、培養液の対流も起こらず、細胞の培養に適した環境を安定的に維持することができる。

30

【0045】

なお、この例では、高濃度ガスとして酸素を約5%含有するガスを用いているが、より高濃度の条件が必要な場合には、例えば酸素を21%含有するガスを高濃度ガスとして用いる。生体内は0~21%の酸素濃度勾配が存在するとされているため、高濃度ガスとして酸素を21%含有するガスを用いれば、生体内のあらゆる環境もウエル5内で再現することができる。

【0046】

また、骨髄をウエル5内で模擬したい場合には、ウエル5内に配置する細胞として骨芽細胞、骨髄細胞、破骨細胞などを用いるようにしてもよいし、場合によってはウエル5内に骨片を配置してもよい。骨片の配置は、例えばチップ作製途中の上面部を開放した状態のウエルに骨片を置くことで行うことができる。骨片はメスなどを用いてウエル内に入る大きさに細かく切り取り、ピンセット等を用いてウエル底面上の所望の位置に置く。その後、上部材を接着する工程を行う。血管から遠くに存在する骨の端部を骨の長手方向に切断した場合、同方向に酸素濃度勾配が存在する。血管が通っている方向に向かって酸素濃度勾配があり、血管で酸素濃度は最大になる。ただし、肺から離れた末端器官での酸素濃度は大気中の20%とは異なり、約5%程度と考えられている。

40

【0047】

50

白血病癌細胞の挙動を研究する際には、ウエル内に癌細胞を導入して観察する。他の腫瘍周辺微小環境を模擬する場合には、ウエル5の低濃度側に癌細胞を1個又は複数個導入する事により行なうことができる。ここで、ある細胞が細胞周期の休止期にいることや、抗癌剤に対する薬剤耐性があることなどを確認することにより、癌幹細胞様に振舞う癌細胞を特定することができる。癌幹細胞様の細胞を検知することができれば、例えば光ピンセットを用いてその細胞を取り出すことができる。また、ウエル5内でi P S細胞を培養してもよい。i P S細胞は約5%程度の酸素濃度の領域で活性化するとされており、ウエル5内のi P S細胞の位置に酸素濃度約5%の領域を形成して培養することができる。

【0048】

このように、この細胞培養容器1を用いた細胞培養方法により、種々の細胞を培養することができる。培養して取り出された細胞は遺伝子解析など従来の様々な手法の解析に供することができる。

10

【産業上の利用可能性】

【0049】

本発明は、遺伝子解析など種々の解析に供する細胞の培養に利用することができる。

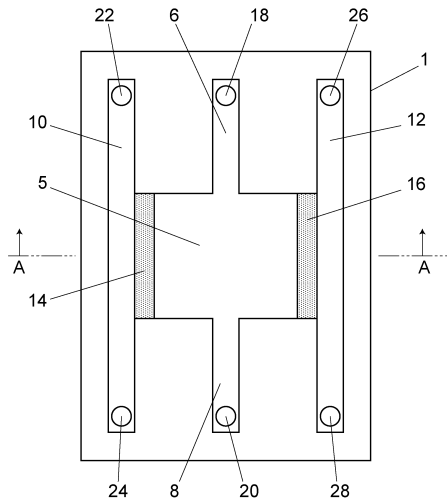
【符号の説明】

【0050】

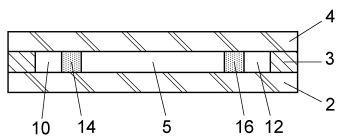
- 1 細胞培養容器
- 2, 4 透明基板
- 3 流路形成シート
- 5 ウエル
- 6 導入用流路
- 8 排出用流路
- 10 第1流路
- 12 第2流路
- 14, 16 ガス透過膜(多孔質膜)
- 18, 20, 22, 24, 26, 28 貫通孔

20

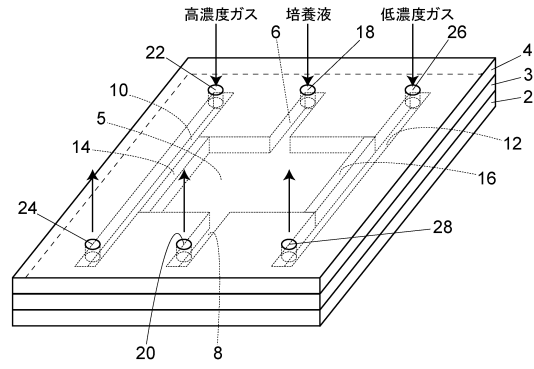
【図1A】



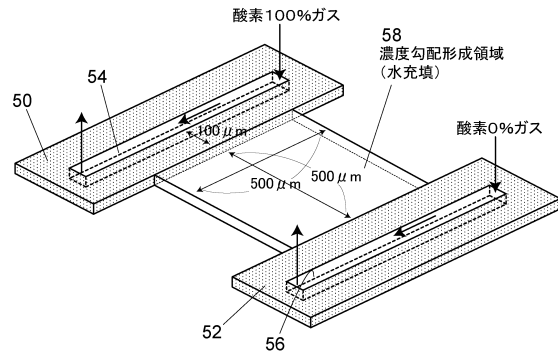
【図1B】



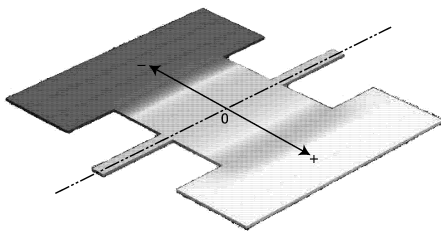
【図2】



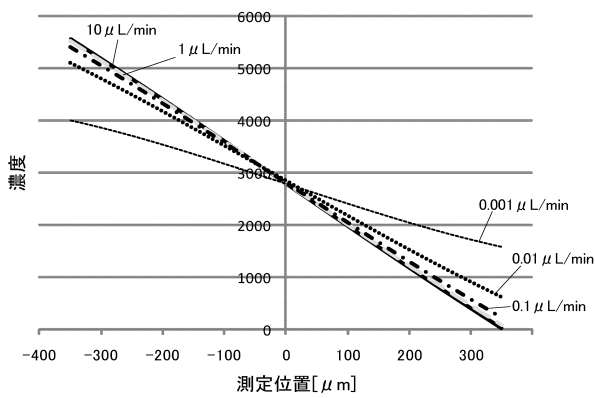
【図3】



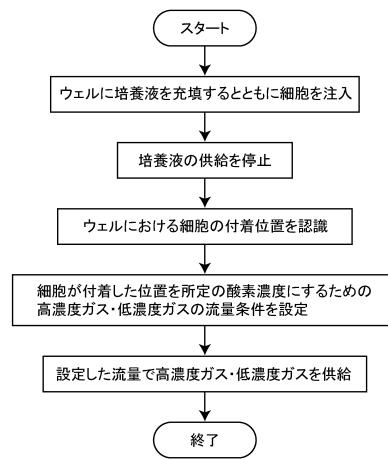
【図4A】



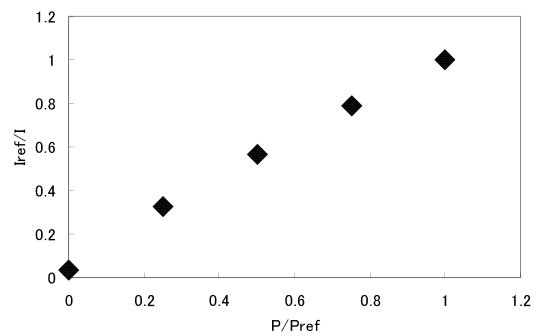
【図4B】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/07 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 0 2

- (72)発明者 阿部 浩久
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 叶井 正樹
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 明地 将一
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 前川 平
 京都府京都市左京区聖護院川原町5-4 国立大学法人京都大学医学部付属病院内
- (72)発明者 木村 晋也
 京都府京都市左京区聖護院川原町5-4 国立大学法人京都大学医学部付属病院内
- (72)発明者 芦原 英司
 京都府京都市左京区聖護院川原町5-4 国立大学法人京都大学医学部付属病院内
- (72)発明者 庄子 習一
 東京都新宿区戸塚町1丁目10-4番地 学校法人早稲田大学内
- (72)発明者 川合 健太郎
 東京都新宿区戸塚町1丁目10-4番地 学校法人早稲田大学内

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 国際公開第2007/077607(WO, A1)
 特開2004-329122(JP, A)
 特表2004-508571(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0
 CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)
 PubMed