(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年8月17日(17.08.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/153058 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/044238

(22) 国際出願日： 2022年11月30日(30.11.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-020642 2022年2月14日(14.02.2022) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社(**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 笠井 宥佑(**KASAI, Yusuke**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 大場 孝浩(**OBA, Takahiro**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人太陽国際特許事務所(**TAIYO, NAKAJIMA & KATO**); 〒1600022 東京都新宿区新宿４丁目３番１７号 Tokyo (JP).

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

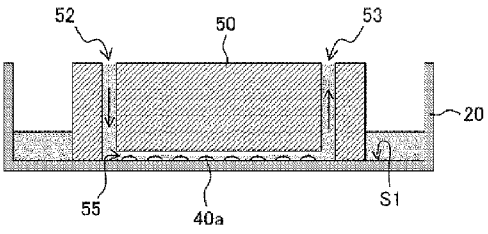
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,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

添付公開書類：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2023/153058 A1

(54) **Title:** METHOD FOR EVALUATING CELLS AND EVALUATION DEVICE

(54) 発明の名称： 細胞の評価方法及び評価用デバイス



(57) **Abstract:** A method for evaluating cells according to the present disclosure comprises culturing cells such that a plurality of cells or a plurality of cellular aggregates are arranged in a row on a culture surface, placing a removable flow channel upon the culture surface, and providing a flow of liquid to each of the plurality of cells or plurality of cellular aggregates by passing a liquid through the flow channel.

(57) 要約：開示の技術に係る細胞の評価方法は、培養面上に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が配列されるように細胞を培養し、培養面上に着脱可能な流路を設置し、流路に液体を流通させることにより複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流を与えることを含む。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞の評価方法及び評価用デバイス

技術分野

[0001] 開示の技術は細胞の評価方法及び評価用デバイスに関する。

背景技術

[0002] 細胞の評価方法に関する技術として以下の技術が知られている。例えば、特開２０１２－１００６４２号公報には、基材表面上で培養した細胞において、基材表面と細胞との付着力を流体のせん断応力を利用して測定する培養細胞評価方法が記載されている。

[0003] 国際公開第２０１５／１２５７４２号には、液体が通過する蛇行した通路を有し、通路の底面に、当該通路を通過する細胞が播種される複数の細胞播種領域が、当該通路に沿って等間隔に設けられた細胞培養容器が記載されている。

[0004] T. Ohashi et al., JSME Inter. J. Series C, 43(4), 780-786, 2000には、内皮細胞を細胞培養皿に培養し、内皮細胞単層を幅１４ｍｍ、高さ０．５ｍｍのフローセクションを有する平行板フローチャンバーにロードし、せん断応力にさらすことが記載されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 接着性細胞は流れ場に対して配向、分化、剥離あるいは細胞死などの様々な応答を示すことが知られており、細胞の接着特性は、細胞の培養条件検討や品質評価において重要な評価指標である。また、細胞の接着性評価は、培養基板や細胞接着剤の研究開発においても必要とされており、研究用途及び産業用途の双方において重要な関心事とされている。従って、接着性細胞に関わる幅広い分野において、液流に対する接着性細胞の応答評価を簡便且つ効率的に行う技術が望まれる。

[0006] 特許文献１及び特許文献２に記載のように、閉鎖系マイクロ流路を用いる

場合、閉鎖系マイクロ流路に細胞を導入する必要があるが、閉鎖系マイクロ流路の内部に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊を区画化し、流路に沿って配列させることは容易ではない。また、マイクロ流路に細胞を導入する際に細胞にダメージを与えるおそれがある。更に、閉鎖系マイクロ流路内では培地成分が不均一となり、標準的な培養環境とは異なる環境となるおそれがある。その結果、細胞の状態に影響が及び、ひいては評価結果に影響が及ぶおそれがある。また、非特許文献１の技術では、単一の内皮細胞単層が処理対象とされており、複数の対象を一括処理するものではないため、効率的な細胞評価が困難である。

[0007] 開示の技術は、上記の点に鑑みてなされたものであり、液流に対する接着性細胞の応答評価を簡便且つ効率的に行うことを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 開示の技術に係る細胞の評価方法は、培養面上に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が配列されるように細胞を培養し、培養面上に着脱可能な流路を設置し、流路に液体を流通させることにより複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流を与えることを含む。

[0009] 流路を構成する溝を表面に有する流路部材の表面を培養面に密着させることにより流路が形成されてもよい。

[0010] 複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が液体の流通方向に沿って配列するように、流路部材の位置合わせを行ってもよい。流路部材の位置合わせを、流路部材の表面に設けられた第１のアライメントマークと、培養面に設けられた第２のアライメントマークを用いて行ってもよい。

[0011] 液流により複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、液体の流通方向に沿って変化していてもよい。液流により複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、液体の流通方向に沿って直線的に変化していてもよい。液流による複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、液体の流通方向における各位置で一定であってもよい。

[0012] 流路の、液体の流通方向と交差する断面の面積が、液体の流通方向に沿って変化していてもよい。流路の、液体の流通方向と交差する断面の面積が、液体の流通方向の上流側から下流側に向けて拡大していてもよい。

[0013] 開示の技術に係る細胞の評価方法は、培養面上において複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が所定のパターンを形成するように細胞の培養を行うことを含み得る。開示の技術に係る細胞の評価方法は、複数の開口部を有するシートを培養面に貼り付け、培養面の開口部において露出した部分に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊を形成することを含み得る。複数の細胞又は複数の細胞凝集塊のサイズが互いに同じであってもよい。

[0014] 開示の技術に係る評価用デバイスは、培養面上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊に液流を与えるための評価用デバイスであって、培養面上に着脱可能な流路を形成し、流路に液体を流通させることにより複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流が与えられるものである。

[0015] 開示の技術に係る評価用デバイスは、流路を構成する溝を表面に有する流路部材を含み得る。流路部材の溝を有する表面を培養面に密着させることにより流路が形成される。

[0016] 流路は、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、液体の流通方向に沿って変化するように構成されていてもよい。流路は、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、液体の流通方向に沿って直線的に変化するように構成されていてもよい。

[0017] 流路の、液体の流通方向と交差する断面の面積が、液体の流通方向に沿って変化していてもよい。流路の、液体の流通方向と交差する断面の面積が、液体の流通方向の上流側から下流側に向けて拡大していてもよい。

[0018] 開示の技術の実施形態に係る評価用デバイスは、流路部材が取り付けられる取り付け部と、取り付け部を、回転可能又は移動可能に保持する保持部と、培養面を有する基板が搭載される搭載領域を有し、保持部を搭載領域に対応する位置に固定する固定部と、更に含み得る。

[0019] 流路部材及び取り付け部が光透過性を有する材料によって構成されていて

もよい。

発明の効果

[0020] 開示の技術によれば、任意の基板上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊に対して着脱可能な流路を用いて液流を与えるので、液流に対する接着性細胞の応答評価を簡便且つ効率的に行うことが可能となる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]開示の技術の実施形態に係る細胞のパターン培養に用いるマスキングシートの構成の一例を示す斜視図である。

[図2A]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2B]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2C]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2D]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2E]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2F]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図2G]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法の一例を示す図である。

[図3A]開示の技術の実施形態に係る流路部材の構成の一例を示す斜視図である。

[図3B]開示の技術の実施形態に係る流路部材の構成の一例を示す平面図である。

[図4A]培養面に流路部材を設置している様子を示す図である。

[図4B]培養面に流路部材を設置している様子を示す図である。

[図5]開示の技術の実施形態に係る第１のアライメントマーク及び第２のアライメントマークの構成の一例を示す斜視図である。

[図6]細胞凝集塊に液流によるせん断応力を与えている様子を示す平面図である。

[図7]開示の技術の実施形態に係る流路を流通する液体の流通方向における位置と液流によって生じるせん断応力との関係の一例を示す図である。

[図8]開示の技術の実施形態に係る流路の断面を座標平面上に表した図である

。

[図9]せん断応力によって細胞凝集塊が剥離する状況の一例を示す図である。

[図10]開示の技術の実施形態に係る流路の構成と、当該流路を流通する液体の流通方向における位置と液流によって生じるせん断応力との関係の一例を示す図である。

[図11]開示の技術の実施形態に係る流路の構成と、当該流路を流通する液体の流通方向における位置と液流によって生じるせん断応力との関係の一例を示す図である。

[図12A]開示の技術の実施形態に係る評価用デバイスの構成の一例を示す断面図である。

[図12B]開示の技術の実施形態に係る評価用デバイスの構成の一例を示す断面図である。

[図13A]開示の技術の実施形態に係る取り付け部の構成の一例を示す斜視図である。

[図13B]開示の技術の実施形態に係る取り付け部の構成の一例を示す平面図である。

[図13C]図１３Ｂにおける１３Ｃ－１３Ｃ線に沿った断面図である。

[図13D]開示の技術の実施形態に係る取り付け部に流路部材を取り付けた状態を示す断面図である。

[図14A]開示の技術の実施形態に係る取り付け部を保持した状態の保持部の構成の一例を示す斜視図である。

[図14B]開示の技術の実施形態に係る取り付け部を保持した状態の保持部の構成の一例を示す平面図である。

[図14C]図１４Ｂにおける１４Ｃ－１４Ｃ線に沿った断面図である。

[図15A]開示の技術の実施形態に係る保持部を構成するベース部の構成の一例を示す斜視図である。

[図15B]開示の技術の実施形態に係る保持部を構成する蓋部の構成の一例を示す斜視図である。

[図16]開示の技術の実施形態に係る流路部材の構成の一例を示す平面図である。

[図17]開示の技術の実施例に係るパターン培養によりパターニングされた細胞コロニーの顕微鏡写真である。

[図18]開示の技術の実施例に係る流路部材を示す図である。

[図19]開示の技術の実施例に係る保持部によって保持された状態の取り付け部を示す図である。

[図20]開示の技術の実施例に係る評価用デバイスを示す図である。

[図21]開示の技術の実施例に係る培養面上に配列された細胞コロニーが、液流によるせん断応力によって剥離する様子を示す顕微鏡写真である。

[図22]開示の技術の実施例に係る液流を与えた後の流路全体の状態を示す顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、開示の技術の実施形態の一例を、図面を参照しつつ説明する。なお、各図面において同一または等価な構成要素及び部分には同一の参照符号を付与し、重複する説明は省略する。

[0023] 開示の技術の実施形態に係る細胞の評価方法は、培養面上に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が配列されるように培養面上に細胞を培養する第１のステップ、培養面上に着脱可能な流路を設置する第２のステップ、流路に液体を流通させることにより複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流を与える第３のステップを含む。以下において上記した第１乃至第３のステップの詳細について説明する。

[0024] 第１のステップにおいて、培養面上に細胞又は細胞凝集塊を規則的に配列するように細胞を培養するために、マスキングシートを用いたパターン培養技術を用いることが可能である。図１は、細胞のパターン培養に用いるマスキングシート１０の構成の一例を示す斜視図である。

[0025] マスキングシート１０は、細胞の接着培養に用いられる基板（図示せず）の表面（培養面）に対して接着性を有する材料によって構成されている。マ

スキングシート１０は、培養面に対する密着性を確保するために十分な柔軟性を有していることが好ましい。マスキングシート１０の材料として、例えばシリコーンゴム（ＶＭＱ、ＰＶＭＱ、ＦＶＭＱ）、イソプレンゴム（ＩＲ）及びフッ素ゴム（ＦＫＭ）などのゴム部材を好適に用いることが可能である。マスキングシート１０は、基材を貫通する複数の開口部１２を有する。開口部１２の数、形状、サイズ及び隣接する開口部１２間の間隔は、任意に定めることが可能である。パターン培養の対象となる細胞又は細胞凝集塊は、マスキングシート１０の開口部１２のパターンに対応したパターンを有して培養面上に形成されることとなる。マスキングシート１０は、間隙を隔てて配列された互いに同じ形状及び同じサイズの複数の開口部１２を有していてもよい。このような開口部１２のパターンによれば、細胞又は細胞凝集塊を均一に区画化し、細胞の区画単位ごとに培養又は評価を行うことが可能となる。また、各区画における細胞の状態を定量化又は規格化することが可能となる。図１には、互いに同じサイズを有する複数の矩形の開口部１２が一直線上に並んで配列された構成が例示されている。

[0026] 図２Ａ～図２Ｇは、マスキングシート１０を用いてパターン培養を行う細胞培養方法の一例を示す図である。初めに、基板２０及びマスキングシート１０を用意する（図２Ａ）。基板２０の表面が培養面を構成する。基板２０として、市販の細胞培養ディッシュを用いることが可能である。マスキングシート１０は、基板２０の形状（図２Ａに示す例では
円形）と同じ形状にカットされていてもよい。マスキングシート１０の直径は基板２０の直径と同程度であることが好ましい。これにより、開口部１２以外での細胞接着剤３０の付着領域および細胞４０の接着領域が低減される。

[0027] 次に、マスキングシート１０を基板２０の表面（培養面）に貼り付ける（図２Ｂ）。具体的には、マスキングシート１０を基板２０の表面（培養面）に接触させた後、マスキングシート１０に荷重を加えることにより、マスキングシート１０を基板２０に密着させる。マスキングシート１０の柔軟性に

より高い密着性が確保され、マスキングシート１０は、基板２０との間に気泡を生じることなく基板２０に貼り付けられる。マスキングシート１０の開口部１２において基板２０の表面（培養面）が露出する。

[0028] 次に、マスキングシート１０をマスクとして、基板２０の表面（培養面）に細胞接着剤３０を塗布する（図２Ｃ）。これにより、基板２０の表面（培養面）の、マスキングシート１０の開口部１２において露出した部分に細胞接着剤３０が付着する。これにより、マスキングシート１０の開口部１２のパターンに対応した細胞接着剤３０のパターンが培養面上に形成される。細胞接着剤３０として、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン類およびゼラチン類等の細胞外マトリックスタンパク質を用いることが可能である。

[0029] 次に、細胞接着剤３０をリン酸緩衝液に置換した後、マスキングシート１０を培養面から剥離する（図２Ｄ）。基板２０の表面（培養面）にはパターンニングされた細胞接着剤３０が維持される。次に、基板２０の表面（培養面）にブロッキング剤を塗布する。この処理は、培養面の細胞接着剤３０が付着した領域以外の領域における、非特異的細胞接着を阻害するためのブロッキング処理である。ブロッキング剤として、例えば所定濃度に調製されたウシ血清アルブミン溶液を用いることが可能である。

[0030] 次に、基板２０の表面（培養面）に所定の濃度に調整された細胞４０を播種する（図２Ｅ）。細胞４０は、接着性細胞であればよく、例えば、ｉＰＳ細胞（induced pluripotent stem cells）、ＥＳ細胞（Embryonic Stem Cell）、間葉系幹細胞及び造血幹細胞等の幹細胞、肺細胞、胃細胞、肝細胞、腎細胞、腸細胞、神経細胞、眼細胞、血管内皮細胞、心筋細胞及び骨細胞等の体細胞、肺がん細胞、胃がん細胞、大腸がん細胞、乳がん細胞、平滑筋肉腫細胞、線維肉腫細胞及び骨肉腫細胞等のがん細胞、並びにＨＥＫ２９３細胞（ヒト胚性腎臓細胞）及びＶｅｒｏ細胞（アフリカミドリザル腎臓細胞）等の株化された細胞を用いることができ、典型的には、ヒト由来のｉＰＳ細胞を用いることが可能である。また、ヒト以外の動物（具体的には、マウス、

ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリなど）由来の細胞を用いてもよい。

[0031] その後、細胞４０の静置培養を行う。培養期間中、細胞４０が播種された基板２０は、適切な温度及びCO_2濃度に維持されたインキュベータ内に収容される。細胞４０は、基板２０の表面（培養面）の、細胞接着剤３０が付着した領域に接着する（図２Ｆ）。

[0032] 所定のタイミングで培地交換を行いながら培養を継続する。これにより、細胞４０は、基板２０の表面（培養面）の、細胞接着剤３０が付着した領域内で増殖する。その結果、マスキングシート１０の開口部１２のパターンに対応したパターンの細胞又は細胞凝集塊（コロニー）を得ることができる（図２Ｇ）。なお、本実施形態においては、細胞接着剤３０を塗布した後であり、且つ細胞４０を播種する前にマスキングシート１０を培養面から剥離する場合を例示したが、細胞接着剤３０を塗布した後であり、且つ細胞４０を播種した後にマスキングシート１０を培養面から剥離してもよい。

[0033] 第２のステップにおいて、上記のパターン培養により、細胞又は細胞凝集塊が配列され

た培養面上に着脱可能な流路が設置される。図３Ａ及び図３Ｂは、それぞれ、培養面に対して着脱可能な流路を形成するための流路部材５０の構成の一例を示す斜視図及び平面図である。

[0034] 流路部材５０の外形は、特に限定されないが、培養面の形状に応じた形状を有していることが好ましい。図３Ａには、円形の培養面を有する市販のディッシュを用いて細胞培養を行うことを想定し、円柱形の流路部材５０が例示されている。

[0035] 流路部材５０の一方の面には、流路を構成する溝５１が設けられている。溝５１の一端には流入口５２が接続され、溝５１の他端には流出口５３が接続されている。流入口５２及び流出口５３は、流路部材５０の、溝５１が形成された面とは反対側の面にまで引き出されている。流路部材５０は、加工が容易であり且つ培養面との密着性が高い材料によって構成されていること

が好ましい。また、流路部材５０は、光透過性を有する材料によって構成されていることが好ましい。流路部材５０の材料として、ＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）を好適に用いることが可能である。流路部材５０は例えば、鋳型成型によって形成することが可能である。

[0036] 図４Ａ及び図４Ｂは、細胞凝集塊４０ａが配列された基板２０の培養面Ｓ１に流路部材５０を設置している様子を示す断面図である。図４Ｂに示すように、流路部材５０の溝５１が形成された面を培養面Ｓ１に密着させることにより培養面Ｓ１上に流路５５が形成される。流路５５は、その高さ及び幅が数百ｍオーダであるマイクロ流路であってもよい。なお、流路部材５０は、培養面Ｓ１から容易に離脱させることが可能であり、培養面Ｓ１への着脱を繰り返し行うことが可能である。

[0037] 流路部材５０を培養面Ｓ１に設置する際には、培養面Ｓ１上に形成された複数の細胞凝集塊４０ａが、流路５５を流通する液体の流通方向（すなわち流路方向）に沿って配列するように流路部材５０の位置合わせが行われる。典型的には、複数の細胞凝集塊４０ａの各々が、流路５５の幅方向における中心線上に位置するように位置合わせが行われる。流路部材５０が光透過性を有する材料によって構成されることで、溝５１及び細胞凝集塊４０ａの双方の位置を、流路部材５０越しに視認することができるので、流路部材５０の位置合わせが容易となる。

[0038] 流路部材５０の位置合わせをアライメントマークを用いて行ってもよい。図５は、流路部材５０の位置合わせに用いられる第１のアライメントマーク２０１及び第２のアライメントマーク２０２の構成の一例を示す斜視図である。第１のアライメントマーク２０１は、流路部材５０の溝５１が形成された表面に設けられる。第１のアライメントマーク２０１は、流路部材５０の溝５１が形成された表面から突出した凸状のパターンを有する。第２のアライメントマーク２０２は、培養面に設けられる。第２のアライメントマーク２０２は、第１のアライメントマーク２０１に対応した凹状のパターンを有する。凹状の第２のアライメントマーク２０２に、凸状の第１のアライメン

トマーク２０１を嵌め込むように流路部材５０の位置合わせが行われる。図５には、第１のアライメントマーク２０１及び第２のアライメントマーク２０２のパターンとして十字型のパターンが例示されているが、任意のパターンとすることができる。

[0039] 第２のアライメントマーク２０２は、マスキングシート１０に形成されてもよい。すなわち、マスキングシート１０は、細胞又は細胞凝集塊のパターニングを行うための開口部１２（図１参照）のみならず、第２のアライメントマーク２０２を構成する開口部を有していてもよい。この場合、マスキングシートの１０の開口部１２とアライメントマーク２０２の間に切り取り線を設け、パターン培養において、マスキングシート１０の開口部１２の形成部分を、切り取り線に沿って切り取ることにより、第２のアライメントマーク２０２の形成部分から切り離しながら剥離する一方、第２のアライメントマーク２０２の形成部分を培養面に残してもよい。マスキングシート１０において、細胞又は細胞凝集塊のパターニングを行うための開口部１２と第２のアライメントマーク２０２との相対的な位置関係は固定されているので、第２のアライメントマーク２０２を用いて流路部材５０の位置合わせを行うことで、流路５５の配置を、培養面上にパターニングされた細胞又は細胞凝集塊に整合させることが可能となる。また、流路部材５０の位置合わせは、後述する評価用デバイス１００（図１２Ａ、図１２Ｂ参照）を用いることで容易に実施することができる。

[0040] なお、以上の説明では、凸状の第１のアライメントマーク２０１と凹状の第２のアライメントマーク２０２の組み合わせを用いて流路部材５０の位置合わせを行う場合を例示したが、凹状の第１のアライメントマークと凹状の第２のアライメントマークの組み合わせを用いて流路部材５０の位置合わせを行ってもよい。また、凸状の第１のアライメントマーク２０１と凹状の第２のアライメントマークの組み合わせ、及び凹状の第１のアライメントマークと凹状の第２のアライメントマークの組み合わせの双方を用いて流路部材５０の位置合わせを行ってもよい。この場合、初めに、凸状の第１のアライ

メントマークと凹状の第２のアライメントマークの組み合わせを用いてラフな位置合わせを行い、その後、凹状の第１のアライメントマークと凹状の第２のアライメントマークの組み合わせを用いて厳密な位置合わせを行ってもよい。

[0041] 第３のステップでは、ポンプ等の送液手段を用いて流路部材５０の流入口５２から液体を導入して流路５５に液体を流通させることにより、培養面Ｓ１上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流を与える。本実施形態では、複数の細胞凝集塊の各々に液流によるせん断応力を与えたときの細胞凝集塊の応答評価を行う場合を例示するが、液流によって細胞又は細胞凝集塊に作用させるパラメータはせん断応力に限定されない。例えば、水圧（すなわち細胞面に働く、細胞中心方向の圧力）、圧力抗力（すなわち液体の流通方向に垂直な細胞の面に作用する流通方向の力）、培地濃度、又は細胞剥離剤濃度などを、細胞又は細胞凝集塊に作用させるパラメータとしてもよい。

[0042] 図６は、培養面上に形成された流路５５に液体を流通させることにより、培養面上に配列された複数の細胞凝集塊４０ａの各々に液流によるせん断応力を与えている様子を示す平面図である。複数の細胞凝集塊４０ａは、図６において矢印によって示される液体の流通方向に沿って配列されている。

[0043] 図７は、流路５５を流通する液体の流通方向における位置と、液流によって生じるせん断応力との関係の一例を示す図である。図７における複数のプロットは、培養面上に配列された細胞凝集塊４０ａの各々に対応する。本実施形態では、図７に示すように、複数の細胞凝集塊４０ａの各々に与えられるせん断応力が液体の流通方向に沿って直線的に変化している。より具体的には、せん断応力は、流路５５の流入口５２側（上流側）から流出口５３側（下流側）に向けて直線的に低下している。液体の流通方向に沿ったせん断応力の変化は、流路５５の、液体の流通方向と交差する断面（以下、流路断面という）の面積（以下、流路断面積という）を液体の流通方向に沿って変化させることにより実現される。

[0044] 本実施形態において、流路断面の形状は矩形であり、流路５５の高さは全域に亘り一定である。流路５５の幅は、液体の流通方向の上流側から下流側に向けて連続的に拡大している。すなわち、流路断面積が、液体の流通方向の上流側から下流側に向けて連続的に拡大している。本実施形態においては、液体の流通方向に沿ってせん断応力の大きさを直線的に変化させるために、図６に示すように、平面視における流路５５の側面の外形線は曲線状とされている。

[0045] 液流によって生じるせん断応力σ［Ｐａ］と、流路５５の幅ｗ［ｍ］との関係は、流路高さに対して流路幅が十分に大きい場合には、下記の（１）式によって表される。（１）式において、μは流路５５を流通する液体の粘度［Ｐａ・ｓ］であり、Ｑは流路５５を流通する液体の流量［m^3／ｓｅｃ］である。ｘは流路５５を流通する液体の流通方向における位置［ｍ］であり、ｈは流路５５の高さ［ｍ］である。流路５５の断面形状は矩形である。

[0046] [数1]

$$\sigma(w(x))=\frac{6\mu Q}{h^2 w(x)} \quad \cdots \quad (1)$$

[0047] しかし、（１）式は、幅ｗが高さｈに対して十分に大きい場合に適用可能であり、このような場合、所望のせん断応力を得るために必要な流量Ｑが大きくなり、必要液量が多くなってしまう。また、流路の総面積が大きくなってしまい面積効率が低下する。なお、「幅ｗが高さｈに対して十分に大きい」とは、例えば、幅ｗが、高さｈの１０倍以上であることをいう。上記の課題を解決するため、高さｈに対する幅ｗの割合が小さくても適用可能なせん断応力の厳密解を用いて流路を設計する。図８左は、幅ｗ［ｍ］、高さｈ［ｍ］の矩形の断面を有する流路５５の断面を座標平面上に表した図であり、図８右側は、流路５５の断面を無次元化して表した図である。図８において、Γ＝ｗ／ｈである。断面が矩形である無次元化された流路５５を流通する液体の流速分布の厳密解ｕ（ｙ，　ｚ）は、下記の（２）式によって表される。（２）式において、ｍ＝（２ｎ＋１）π／２である。

[数2]

$$u(y,z)=\frac{1-y^2-4\sum_{n=0}^{\infty}\frac{(-1)^n\cos(my)\cosh(mz)}{m^3\cosh(m\Gamma)}}{1-4\sum_{n=0}^{\infty}\frac{(-1)^n}{m^3\cosh(m\Gamma)}} \quad \cdots (2)$$

[0048] （２）式を簡略化することで、（３）式が得られる。（３）式においてαは下記の（４）式によって表され、β（ｎ）は（５）式によって表される。

[数3]

$$u(y,z)=\frac{1}{\alpha}(1-y^2-4\sum_{n=0}^{\infty}\beta\cos(my)\cosh(my)) \quad \cdots (3)$$

$$\alpha=1-4\sum_{n=0}^{\infty}\beta \quad \cdots (4)$$

$$\beta(n)=\frac{(-1)^n}{m^3\cosh(m\Gamma)} \quad \cdots (5)$$

[0049] 無次元化された流路５５を流通する液体の流速分布の厳密解ｕ（ｙ，　ｚ）は、下記の（６）～（９）式のように有次元化される。

[数4]

$$U(Y,Z)=\frac{\overline{U}}{\overline{u}}u(Y,Z) \quad \cdots (6)$$

$$y=\frac{2Y}{h},Z=\frac{2Z}{h} \quad \cdots (7)$$

$$\overline{U}=\frac{Q}{wh} \quad \cdots (8)$$

$$\overline{u}=\frac{1}{\alpha\Gamma}\left(\frac{2}{3}\Gamma-4\sum_{n=0}^{\infty}\frac{\beta}{m^2}\sin(m)\sinh(m\Gamma)\right) \quad \cdots (9)$$

[0050] （６）式～（９）式によって表される流速分布は、下記の（１０）式のようにせん断応力τ（ｗ，ｈ，Ｑ）に変換される。

[数5]

$$\tau_{Y=h/2,Z=0}=\mu\left.\frac{\partial U}{\partial Y}\right|_{Y=h/2,Z=0}=\frac{2\mu}{h}\frac{\overline{U}}{\overline{u}}\frac{1}{\alpha}(-2+4\sum_{n=0}^{\infty}\beta m\sin(m)) \quad \cdots (10)$$

[0051] （１０）式を用いて、流量Ｑ及び流路５５の高さｈを任意の値に固定し、所定の定数ａ及びｂを用いてτ＝ａｘ＋ｂとなるように、流路５５の幅ｗと

位置ｘとの関係ｗ（ｘ）を数値解析的に求めることで、図７に示すように、液流によるせん断応力が液体の流通方向に沿って直線的に変化するような流路５５を構築することができる。

[0052] 液流によるせん断応力が、培養面に接着している細胞凝集塊４０ａの接着力を上回ると細胞凝集塊４０ａは培養面から剥離する。本実施形態に係る評価方法によれば、図９に例示するように、相対的に大きいせん断応力が作用する流路５５の流入口側（上流側）に位置するいくつかの細胞凝集塊４０ａが培養面から剥離し、相対的に小さいせん断応力が作用する流路５５の流出口側（下流側）に位置するいくつかの細胞凝集塊４０ａが剥離せずに培養面上に残ることが想定される。この場合、剥離が生じる領域Ｒ１と、剥離が生じない領域Ｒ２の境界位置から細胞凝集塊４０ａが剥離に至るせん断応力の閾値を推定することが可能である。

[0053] なお、図１０に示すように、平面視における流路５５の側面の外形線を直線状とし、流路５５の幅ｗを、液体の流通方向に沿って直線的に変化させてもよい。この構成によれば、流路の設計が容易になる一方、液体の流通方向位置に対するせん断応力の大きさの変化が非線形となり、流路５５の流通口側（上流側）において、液体の流通方向の位置ずれに対するせん断応力の変化が大きくなる。

[0054] また、図１１に示すように、流路断面積（流路５５の幅ｗ）を、液体の流通方向の全域に亘り一定としてもよい。これにより、細胞凝集塊４０ａの各々に加わるせん断応力を、液体の流通方向における各位置で一定とすることができる。この構成によれば、例えば、複数の細胞凝集塊４０ａの接着力のばらつきを評価することができる。

[0055] 図１２Ａ及び図１２Ｂは、開示の技術の実施形態に係る評価用デバイス１００の構成の一例を示す断面図である。評価用デバイス１００は、流路部材５０の培養面Ｓ１への設置をサポートする機能を有する。評価用デバイス１００は、流路部材５０、取り付け部７０、保持部８０及び固定部９０を含んで構成されている。以下において、評価用デバイス１００の上記の各構成要

素の詳細について説明する。

[0056] 取り付け部７０には流路部材５０が取り付けられる。図１３Ａ及び図１３Ｂは、それぞれ、取り付け部７０の構成の一例を示す斜視図及び平面図である。図１３Ｃは、図１３Ｂにおける１３Ｃ－１３Ｃ線に沿った断面図である。図１３Ｄは、取り付け部７０に流路部材５０を取り付けた状態を示す断面図である。

[0057] 取り付け部７０は、円盤状のフランジ部７１と、フランジ部７１よりも直径の小さい円盤状の突出部７２とを有する。図１３Ｄに示すように、流路部材５０は、突出部７２の表面に取り付けられる。流路部材５０は、その密着性によって取り付け部７０に固定される。流路部材５０は、取り付け部７０から容易に離脱させることが可能であり、取り付け部７０への着脱を繰り返し行うことが可能である。取り付け部７０は、流路部材５０が取り付けられた場合に、流路部材５０の流入口５２及び流出口５３にそれぞれ連通する貫通孔７３を有する。

[0058] 取り付け部７０は、流路部材５０との密着性が高い材料によって構成されていることが好ましい。また、取り付け部７０は、光透過性を有する材料によって構成されていることが好ましい。取り付け部７０が光透過性を有する材料によって構成されることで、流路部材５０を取り付け部７０に取り付ける際の位置合わせが容易となる。取り付け部７０の材料として、ポリカーボネートを好適に用いることが可能である。

[0059] 保持部８０は、取り付け部７０を回転可能又は移動可能に保持する。図１４Ａ及び図１４Ｂは、それぞれ、取り付け部７０を保持した状態の保持部８０の構成の一例を示す斜視図及び平面図である。図１４Ｃは、図１４Ｂにおける１４Ｃ－１４Ｃ線に沿った断面図である。図１５Ａは、保持部８０を構成するベース部８１の構成の一例を示す斜視図であり、図１５Ｂは、保持部８０を構成する蓋部８２の構成の一例を示す斜視図である。

[0060] ベース部８１は、取り付け部７０のフランジ部７１が嵌め込まれる凹部８３と、凹部８３にフランジ部７１が嵌め込まれ状態において、取り付け部７

０の突出部７２が挿通される開口部８４とを有する。この状態においてベース部８１に蓋部８２を被せることで、フランジ部７１がベース部８１と蓋部８２の間に挟まれる。これにより、取り付け部７０は、突出部７２がベース部８１から突き出した状態で保持部８０によって保持される。蓋部８２の中央には、開口部８５が設けられており、開口部８５においてフランジ部７１の表面が露出する。ベース部８１の互いに対向する２つの端面には、それぞれ切り欠き部８６が設けられており、フランジ部７１の外周部分が切り欠き部８６を超えて保持部８０の外側に迫り出している。

[0061] ベース部８１に設けられた凹部８３の側面とフランジ部７１との間には、数百μｍオーダのクリアランスＣが設けられており、取り付け部７０は、保持部８０によって保持された状態において、回転軸ＡＸの軸回りに回転可能であり、且つ培養面の面方向（図１４ＢにおけるＸＹ方向）の移動が可能である。取り付け部７０の回転及び移動は、保持部８０の外側に迫り出したフランジ部７１の外周部分を手動操作することによって行うことができる。取り付け部７０が、回転可能又は移動可能に保持されることで、流路部材５０を取り付け部７０に取り付けた状態において、流路部材５０の培養面に対する位置合わせが可能となる。

[0062] 図１２Ａ及び図１２Ｂに示すように、固定部９０は、培養面を有する基板２０が搭載される搭載領域Ｒ３を有する。搭載領域Ｒ３には、基板２０の外形に応じた形状の溝９１が設けられている。また、搭載領域Ｒ３には、開口部９２が設けられており、固定部９０の底面側から開口部９２を介して培養面Ｓ１を観察することが可能である。固定部９０は、保持部８０を搭載領域Ｒ３に対応する位置に固定する。すなわち、搭載領域Ｒ３と保持部８０との相対的な位置関係が固定される。保持部８０は、例えば、ボルト９３を用いて固定部９０に締結されてもよい。流路部材５０を取り付け部７０に取り付け、取り付け部７０を保持部８０によって保持し、固定部９０の搭載領域Ｒ３に基板２０を搭載した状態で（図１２Ａ参照）、保持部８０を固定部９０に締結することで、流路部材５０が培養面Ｓ１に設置され、培養面Ｓ１上に

流路５５が形成される（図１２Ｂ参照）。

[0063] 固定部９０は、ばねを含んで構成されるストッパー９４を有し、保持部８０はストッパー９４によって支持される。これにより、保持部８０を固定部９０に締結する前の段階で、流路部材５０と培養面Ｓ１とを非接触状態に維持することができ、この状態において、流路部材５０の培養面Ｓ１に対する位置合わせを行うことができる。

[0064] 以下において、評価用デバイス１００を用いた細胞の評価手順について説明する。初めに、取り付け部７０を保持部８０によって保持する。次に、取り付け部７０に流路部材５０を取り付ける。次に、流路部材５０の溝５１、流入口５２、流出口５３及び取り付け部７０の貫通孔７３を液体で満たす。例えば、流路部材５０の溝５１の形成面を液体に浸漬した状態で、貫通孔７３に挿入されたチューブを通じて送液を行うことで、溝５１、流入口５２、流出口５３及び貫通孔７３を液体で満たしてもよい。次に、培養面Ｓ１に細胞又は細胞凝集塊４０ａが配列された基板２０を固定部９０の搭載領域Ｒ３に搭載する。

[0065] 次に、保持部８０を固定部９０に取り付ける。具体的には、保持部８０を固定部９０に締結するためのボルト９３を仮締めする。この状態では、保持部８０は、ストッパー９４によって支持され、流路部材５０と培養面Ｓ１とが非接触状態に維持される。次に、保持部８０を回転及び移動させることで流路部材５０の位置合わせを行う。培養面Ｓ１上に形成された複数の細胞凝集塊４０ａが、流路５５を流通する液体の流通方向に沿って配列するように、流路部材５０の位置合わせが行われる。溝５１と細胞凝集塊４０ａとの相対的な位置関係は、固定部９０の開口部９２から露出する基板２０越しに確認することが可能である。流路部材５０の位置合わせを、固定部９０の下側に設置される顕微鏡（図示せず）を用いて行ってもよい。また、図５に例示するような第１のアライメントマーク２０１及び第２のアライメントマーク２０２を用いて流路部材５０の位置合わせを行ってもよい。流路部材５０の位置合わせが完了した後、ボルト９３の本締めを行うことで、流路部材５０

の溝５１の形成面を培養面Ｓ１に密着させる。これにより、培養面Ｓ１上に流路５５が形成される。

[0066] 次に、取り付け部７０の貫通孔７３に挿入されたチューブ１１０（図１２Ｂ参照）を通じて送液を行い、流路５５に液体を流通させることにより、複数の細胞凝集塊４０ａの各々に液流によるせん断応力を与える。せん断応力に対する細胞凝集塊４０ａの応答は、固定部９０の開口部９２から露出する基板２０越しに観察することが可能である。細胞凝集塊４０ａの応答の観察を、固定部９０の下側に設置される顕微鏡（図示せず）を用いて行ってもよい。

[0067] 以上のように、開示の技術の実施形態に係る細胞の評価方法は、培養面上に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が配列されるように培養面上に細胞を培養し、培養面上に着脱可能な流路５５を設置し、流路５５に液体を流通させることにより複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に液流を与えることを含む。流路５５は、溝５１を表面に有する流路部材５０の表面を培養面に密着させることにより形成される。複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が液体の流通方向に沿って配列するように、流路部材５０の位置合わせが行われる。

[0068] ここで、液流に対する接着性細胞の応答評価を行う場合に、閉鎖系マイクロ流路内に、細胞又は細胞凝集塊を培養する手法が考えられる。この場合、閉鎖系マイクロ流路に細胞を導入する必要があるが、閉鎖系マイクロ流路の内部に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊を区画化し、流路に沿って配列させることは容易ではない。また、マイクロ流路に細胞を導入する際に細胞にダメージを与えるおそれがある。更に、閉鎖系マイクロ流路内では培地成分が不均一となり、標準的な培養環境とは異なる環境となるおそれがある。その結果、細胞の状態に影響が及び、ひいては評価結果に影響が及ぶおそれがある。

[0069] 開示の技術の実施形態に係る細胞の評価方法によれば、培養面に着脱可能に設置される流路を用いるので、市販のディッシュを用いた開放系で培養された細胞を評価対象とすることができる。すなわち、標準的な環境での培養

が可能であり、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊を区画化し、規則的に配列させることも容易である。また、各区画における細胞の状態を定量化又は規格化することも容易である。また、閉鎖系マイクロ流路を用いる場合と比較して、培養時における細胞へのダメージを抑制することが可能である。また、開示の技術の実施形態に係る評価方法によれば、培養面上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊に同時に液流を与えることができるので、効率的な評価を行うことができる。このように、開示の技術の実施形態に係る細胞の評価方法によれば、液流に対する接着性細胞の応答評価を簡便且つ効率的に行うことが可能である。

[0070] また、開示の技術の実施形態に係る評価方法は、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊のサイズを互いに同じにすることを含む。これにより、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の状態を定量化又は規格化することが可能となり、有用な評価データの取得に寄与することができる。

[0071] また、開示の技術の実施形態に係る評価方法は、液流により複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力を、液体の流通方向に沿って変化させることを含み得る。これにより、培養面上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊に互いに異なる大きさのせん断応力を与えることができ、例えば、細胞又は細胞凝集塊が剥離に至るせん断応力の閾値を推定するといった評価を効率的に行うことができる。

[0072] また、開示の技術の実施形態に係る評価方法において、液体の流通方向に沿ったせん断応力の変化は直線的であり得る。これにより、液体の流通方向に沿ったせん断応力の大きさの変化が非線形とされる場合と比較して、液体の流通方向の位置ずれに対するせん断応力の変化を抑制することができる。

[0073] また、開示の技術の実施形態に係る評価方法は、液流による複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力を、液体の流通方向における各位置で一定とすることを含む。これにより、複数の細胞又は複数の細胞凝集塊における液流に対する応答性のばらつきを評価することができる。

[0074] 図１６は、開示の技術の他の実施形態に係る流路部材５０の構成の一例を

示す平面図である。流路部材５０は、流路を構成する複数の溝５１を有していてもよい。これにより、培養面上に複数の流路を形成することが可能となり、１度の送液で、多数の細胞を評価することができる。また、複数の溝５１を放射状に配置し、中心部に共通の流入口５２を配置してもよい。

[0075] ［実施例］

以下、開示の技術を実施例によりさらに詳細に説明するが、開示の技術は以下の実施例に限定されない。

＜パターン培養＞

市販の３５ｍｍディッシュ（Falcon製）の表面にマスキングシートを貼り付けた。マスキングシートは、一辺の長さが２００μｍである正方形の２１個の開口部が一直線上に配列されたものを用いた。マスキングシートをディッシュの表面に接触させた後、マスキングシートに荷重を加えることにより、マスキングシートをディッシュの表面に密着させた。

[0076] 次に、マスキングシートをマスクとして、ディッシュの表面に細胞接着剤である濃度２．５μｇ/ｍｌのビトロネクチン溶液を塗布し、１時間静置した。これにより、ディッシュの表面に、マスキングシートの開口部のパターンに対応した細胞接着剤のパターンが形成された。次に、ビトロネクチン溶液をリン酸緩衝液に置換した後、マスキングシートをディッシュの表面から剥離した。

[0077] 次に、ディッシュの表面にブロッキング剤である３％ウシ血清アルブミン溶液を塗布した。この処理は、培養面の細胞接着剤が付着した領域以外の領域における、非特異的細胞接着を阻害するためのブロッキング処理である。処理時間を３０分とした。その後、ブロッキング剤をリン酸緩衝液に置換し、リン酸緩衝液のアスピレーションを行った。

[0078] 次に、濃度を０．１Ｍｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整したヒト由来のｉＰＳ細胞の細胞懸濁液をディッシュに播種し、２４時間の静置培養を行った。培養期間中、ディッシュを３７℃、ＣＯ２濃度５％に維持されたインキュベータ内に収容した。その後、培地交換を行い、浮遊している細胞を除去した。これ

により、ディッシュの表面に細胞コロニーのパターンが形成された。図１７は、上記のパターン培養によりパターニングされた細胞コロニーの顕微鏡写真である。マスキングシートの開口部のパターンに対応した細胞パターンが形成されていることが確認された。

[0079] ＜流路の設置＞

ＰＤＭＳを鋳型成型法により加工することで流路部材を作製した。具体的には、主剤と硬化剤の割合を１０：１としたＰＤＭＳを金型に流し込み、５０℃の環境下で３時間かけて硬化を行った。離型したＰＤＭＳを穴あけポンチで型抜きし、直径３２ｍｍ、高さ６ｍｍのＰＤＭＳからなる流路部材を作製した。液流によって流路内に生じるせん断応力が、液体の流通方向に沿って直線的に変化するように流路（溝）を設計した。流路の断面形状を矩形とし、流路の高さを２００μｍ一定とした。流路の幅は、流体の基礎方程式であるナビエ・ストークス方程式に対して、矩形断面流路の境界条件化を与え、微分方程式を解くことで得られた厳密解に基づいて導出した。流路の流入口側端部の幅を３００μｍとし、流出口側端部の幅を２５００μｍとした。作製した流路部材を図１８に示す。

[0080] 流路部材、取り付け部、保持部及び固定部を含む評価用デバイスを構築した。光透過性を有するポリカーボネートによって構成される取り付け部に流路部材を取り付けた。保持部は、アルマイト処理が施されたアルミニウムからなるベース部と蓋部からなり、ベース部と蓋部の間に取り付け部を挟むことで、取り付け部を保持した。取り付け部は、保持部によって保持された状態で回転及び面方向の移動が可能である。保持部によって保持された状態の取り付け部を図１９に示す。

[0081] 固定部を３７℃、CO_2濃度５％の環境に維持されインキュベータに設置した。細胞コロニーが配列されたディッシュを、固定部の搭載領域に搭載した。流路部材が取り付けられた取り付け部を保持した保持部を固定部に取り付けた。細胞パターンと流路（流路部材に形成された溝）の位置を顕微鏡で観察しながら、ディッシュ上の細胞コロニーが、流路に沿って配列するように

流路部材の位置合わせを行った。その後、保持部の四隅に設けられているネジ穴に挿通されるボルトを用いて保持部を固定部に締結し、評価用デバイスを構築した。構築された評価用デバイスを図２０に示す。

[0082] ＜液流に対する接着性細胞の応答評価＞

シリンジポンプを用いて流路部材の流入口から培地を導入して流路に液体を流通させることにより、培養面上に配列された細胞コロニーにせん断応力を与えた。流路に流通させる液体の流量を０．６ｍｌ／ｍｉｎとした。このとき、流路の流入口側端部に生じるせん断応力は約５Ｐａであり、流路の流出口側端部に生じるせん断応力は約０．５Ｐａである。

[0083] 図２１は、培養面上に配列された細胞コロニーが、液流によるせん断応力によって剥離する様子を示す顕微鏡写真である。図２１に示すように、せん断応力が相対的に大きい流路の上流側から順に細胞コロニーが剥離していく様子が観察された。図２２は、液流を与えた後の流路全体の状態を示す顕微鏡写真である。図２２に示すように、せん断応力が相対的に小さい流路の下流側に位置する複数の細胞コロニーが、剥離せずに培養面に接着した状態に維持された。細胞コロニーの剥離が生じた領域と、剥離が生じなかった領域の境界位置から細胞コロニーが剥離に至るせん断応力の閾値が１．２Ｐａであると推定された。

[0084] 以上のように、液流に対する接着性細胞の応答評価を簡便且つ効率的に実施することができ、細胞の応答性の定量化も実現できることが確認された。

[0085] なお、２０２２年２月１４日に出願された日本国特許出願２０２２－０２０６４２の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。また、本明細書に記載された全ての文献、特許出願および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1] 培養面上に複数の細胞又は複数の細胞凝集塊が配列されるように細胞を培養し、

前記培養面上に着脱可能な流路を設置し、

前記流路に液体を流通させることにより前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に液流を与えることを含む

細胞の評価方法。

[請求項2] 前記流路を構成する溝を表面に有する流路部材の前記表面を前記培養面に密着させることにより前記流路が形成される

請求項１に記載の評価方法。

[請求項3] 前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊が前記液体の流通方向に沿って配列するように、前記流路部材の位置合わせを行う

請求項２に記載の評価方法。

[請求項4] 前記流路部材の位置合わせを、前記流路部材の表面に設けられた第１のアライメントマークと、前記培養面に設けられた第２のアライメントマークを用いて行う

請求項３に記載の評価方法。

[請求項5] 前記液流により前記複数の細胞又は複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、前記液体の流通方向に沿って変化している

請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の評価方法。

[請求項6] 前記液流により前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、前記液体の流通方向に沿って直線的に変化している

請求項５に記載の評価方法。

[請求項7] 前記流路の、前記液体の流通方向と交差する断面の面積が、前記液体の流通方向に沿って変化している

請求項５又は請求項６に記載の評価方法。

[請求項8] 前記流路の、前記液体の流通方向と交差する断面の面積が、前記液

体の流通方向の上流側から下流側に向けて拡大している

請求項７に記載の評価方法。

[請求項9] 前記液流による前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、前記液体の流通方向における各位置で一定である

請求項１から請求項４のいずれか１項に記載の評価方法。

[請求項10] 前記培養面上において前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊が所定のパターンを形成するように前記細胞の培養を行う

請求項１から請求項９のいずれか１項に記載の評価方法。

[請求項11] 複数の開口部を有するシートを前記培養面に貼り付け、

前記培養面の前記開口部において露出した部分に前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊を形成する

請求項１から請求項１０のいずれか１項に記載の評価方法。

[請求項12] 前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊のサイズが互いに同じである

請求項１から請求項１１のいずれか１項に記載の評価方法。

[請求項13] 培養面上に配列された複数の細胞又は複数の細胞凝集塊に液流を与えるための評価用デバイスであって、

前記培養面上に着脱可能な流路を形成し、

前記流路に液体を流通させることにより前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に液流が与えられる

評価用デバイス。

[請求項14] 前記流路を構成する溝を表面に有する流路部材を含み、

前記流路部材の前記溝を有する表面を前記培養面に密着させることにより前記流路が形成される

請求項１３に記載の評価用デバイス。

[請求項15] 前記流路は、前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、前記液体の流通方向に沿って変化するように構成

されている

請求項１４に記載の評価用デバイス。

[請求項16] 前記流路は、前記複数の細胞又は前記複数の細胞凝集塊の各々に加わるせん断応力が、前記液体の流通方向に沿って直線的に変化するように構成されている

請求項１５に記載の評価用デバイス。

[請求項17] 前記流路の、前記液体の流通方向と交差する断面の面積が、前記液体の流通方向に沿って変化している

請求項１５又は請求項１６に記載の評価用デバイス。

[請求項18] 前記流路の、前記液体の流通方向と交差する断面の面積が、前記液体の流通方向の上流側から下流側に向けて拡大している

請求項１７に記載の評価用デバイス。

[請求項19] 前記流路部材が取り付けられる取り付け部と、

前記取り付け部を、回転可能又は移動可能に保持する保持部と、

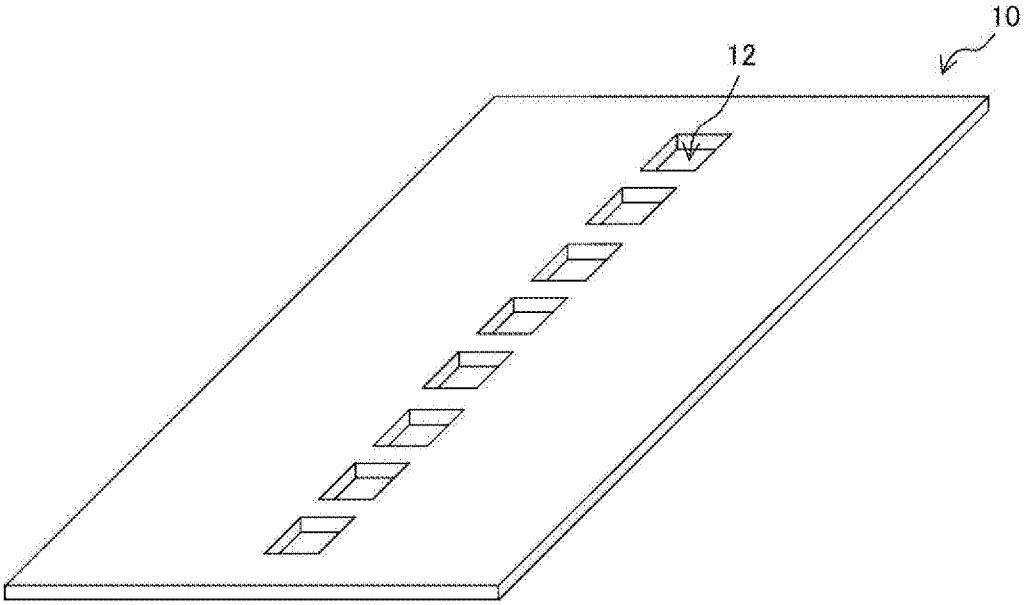
前記培養面を有する基板が搭載される搭載領域を有し、前記保持部を前記搭載領域に対応する位置に固定する固定部と、更に含む

請求項１４から請求項１８のいずれか１項に記載の評価用デバイス。

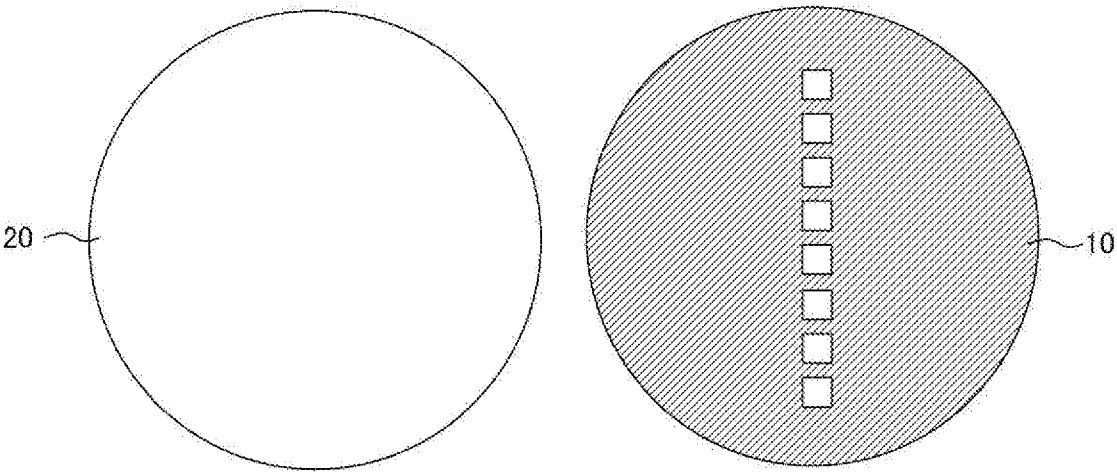
[請求項20] 前記流路部材及び前記取り付け部が光透過性を有する材料によって構成されている

請求項１９に記載の評価用デバイス。

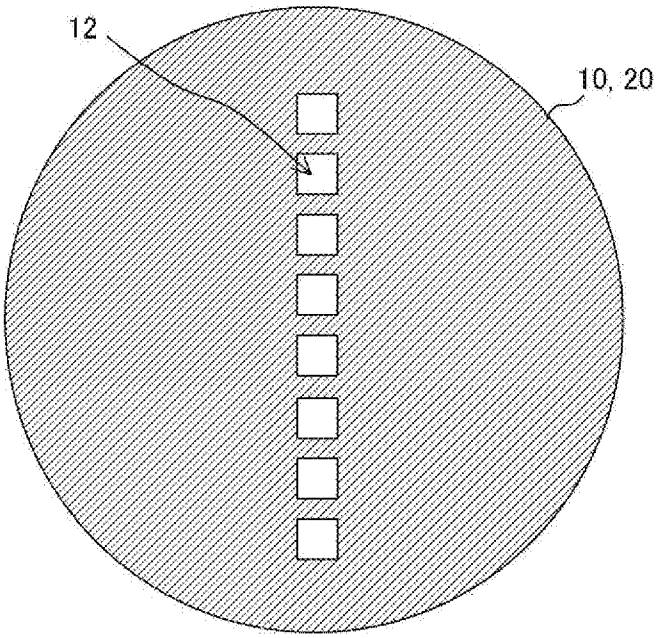
[図1]



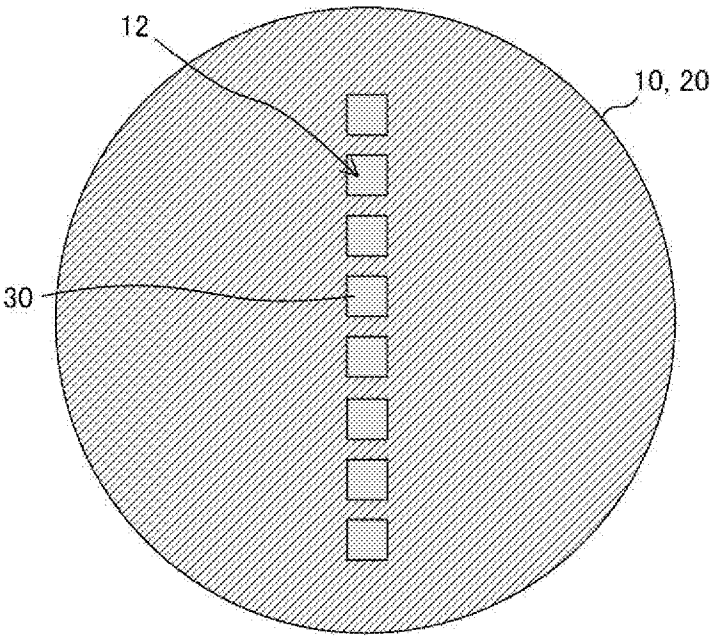
[図2A]



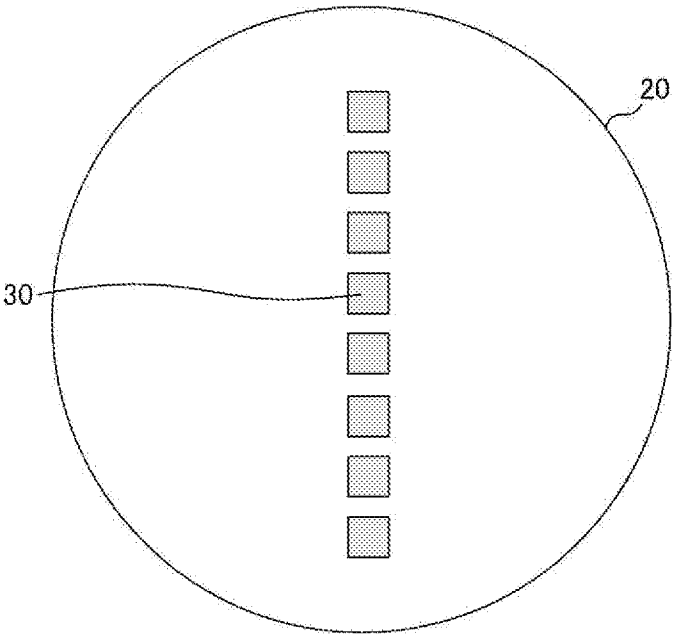
[図2B]



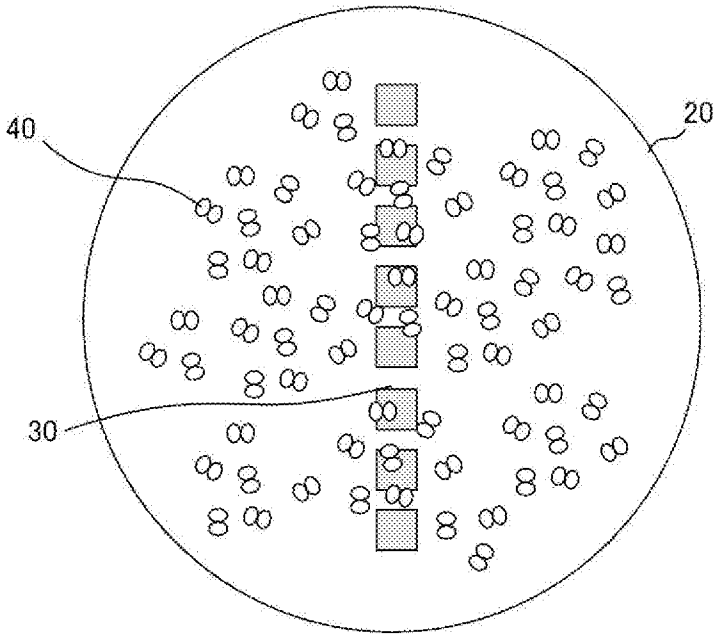
[図2C]



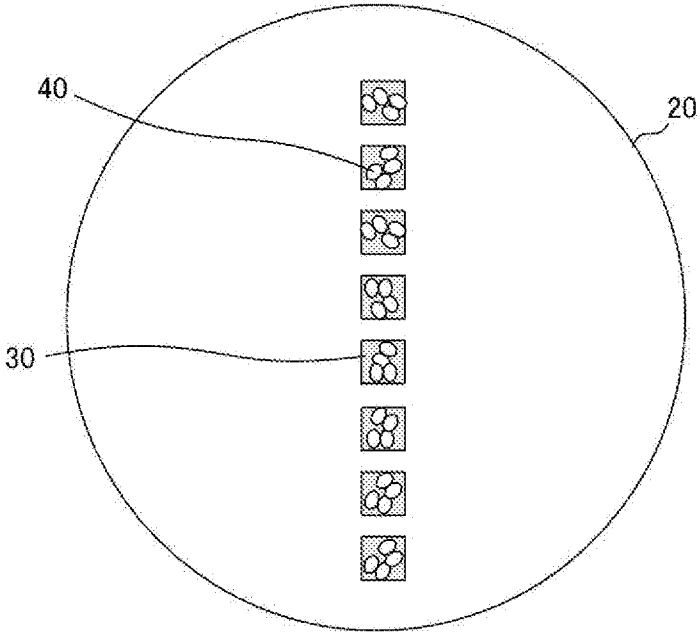
[図2D]



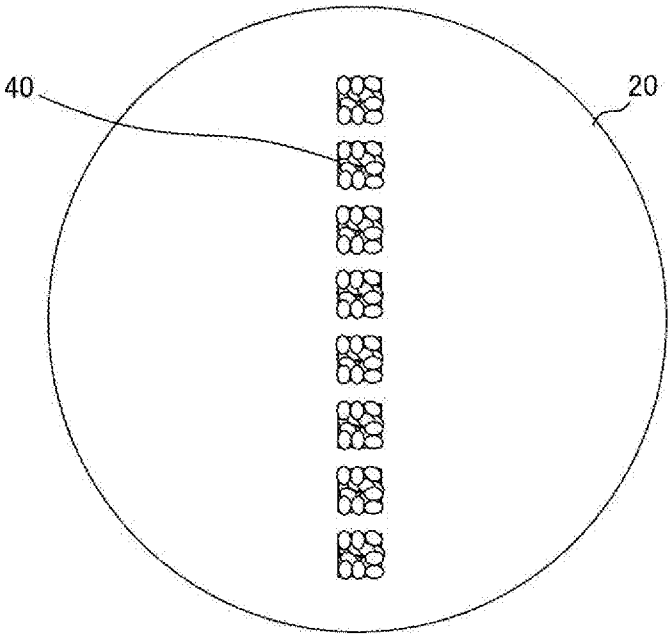
[図2E]



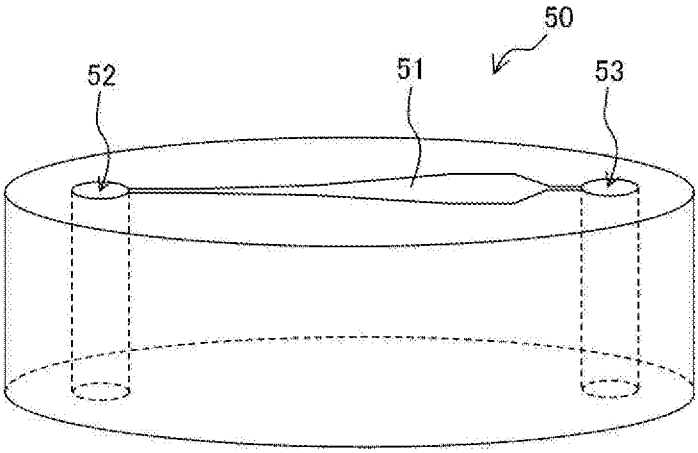
[図2F]



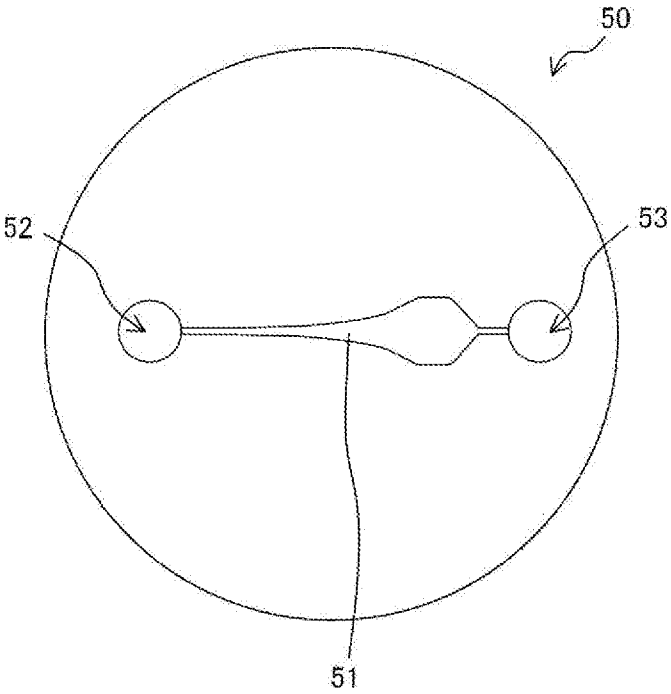
[図2G]



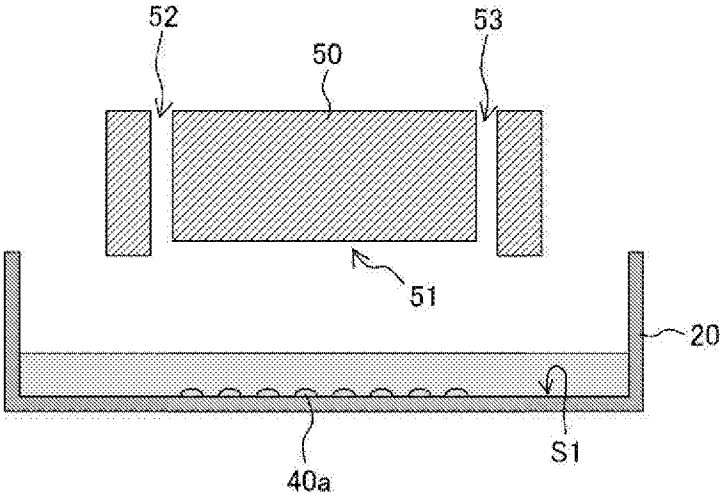
[図3A]



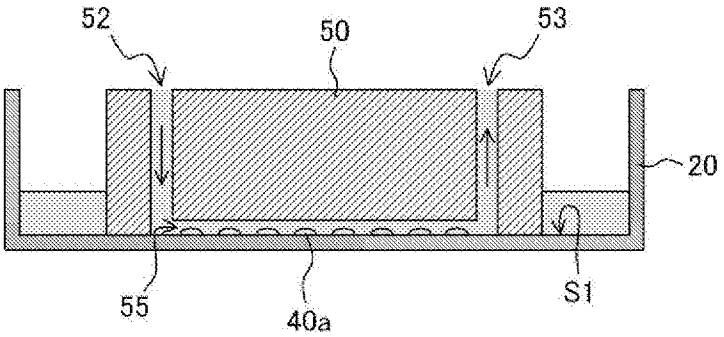
[図3B]



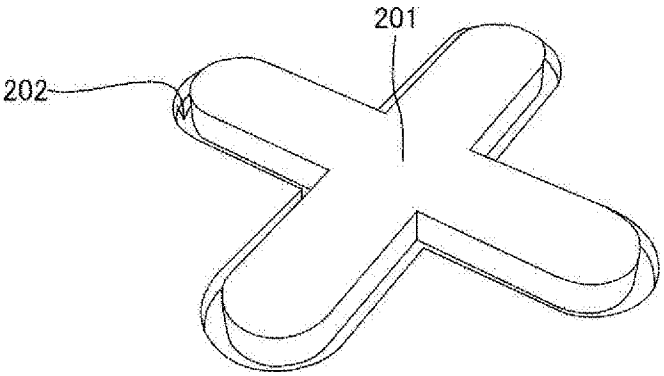
[図4A]



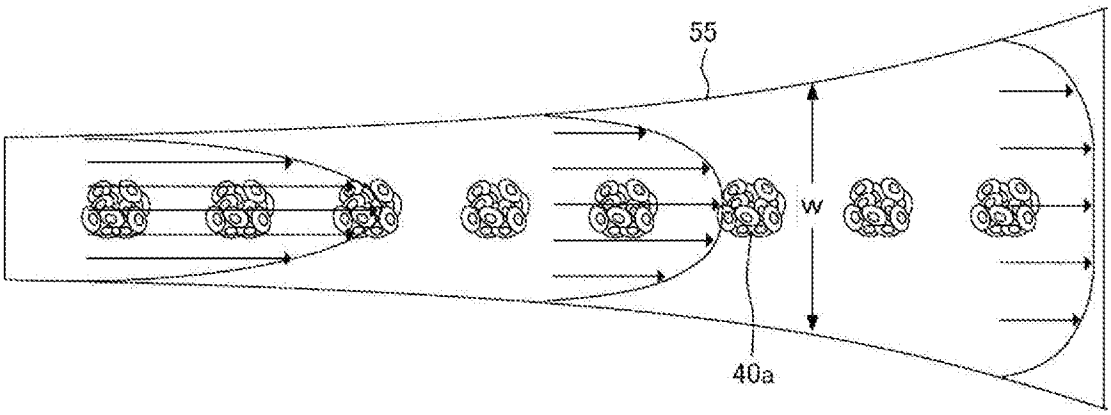
[図4B]



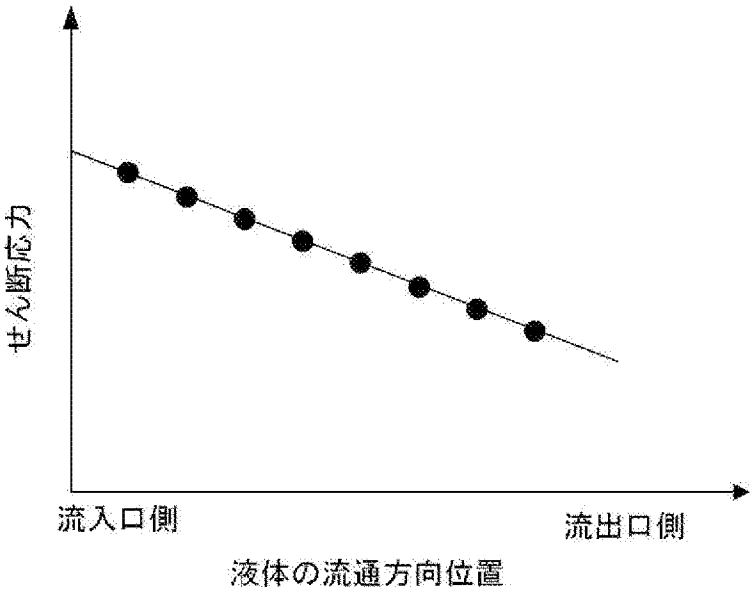
[図5]



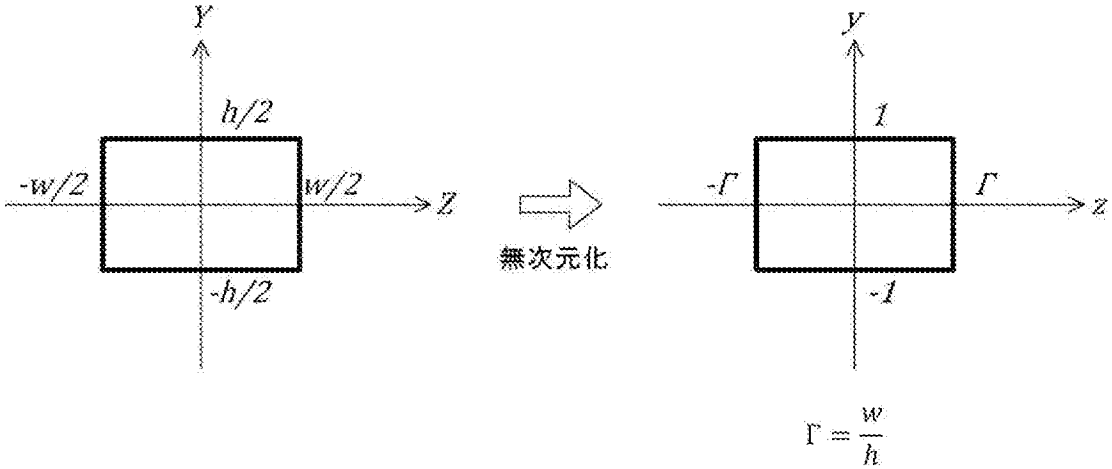
[図6]



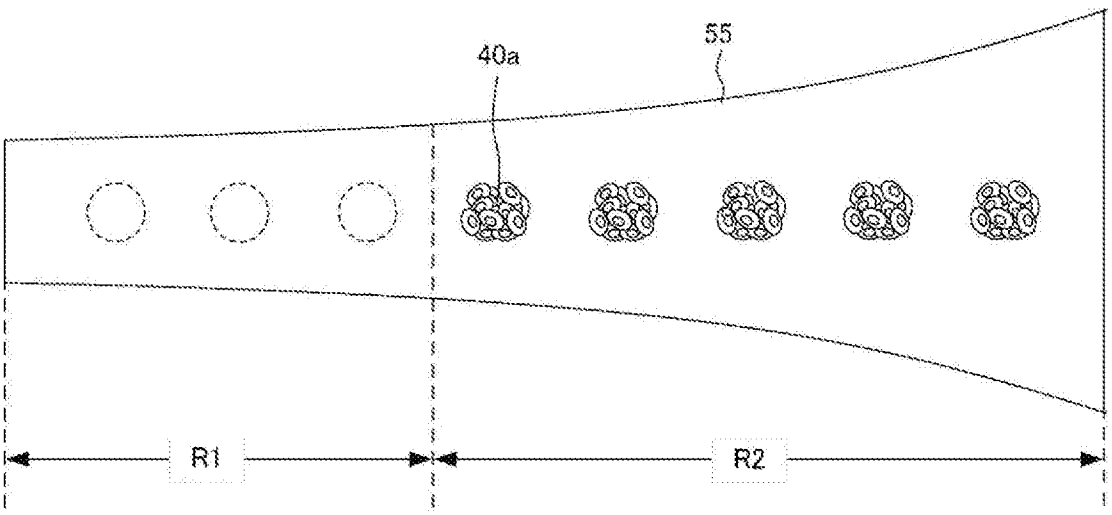
[図7]


せん断応力
流入口側
流出口側
液体の流通方向位置

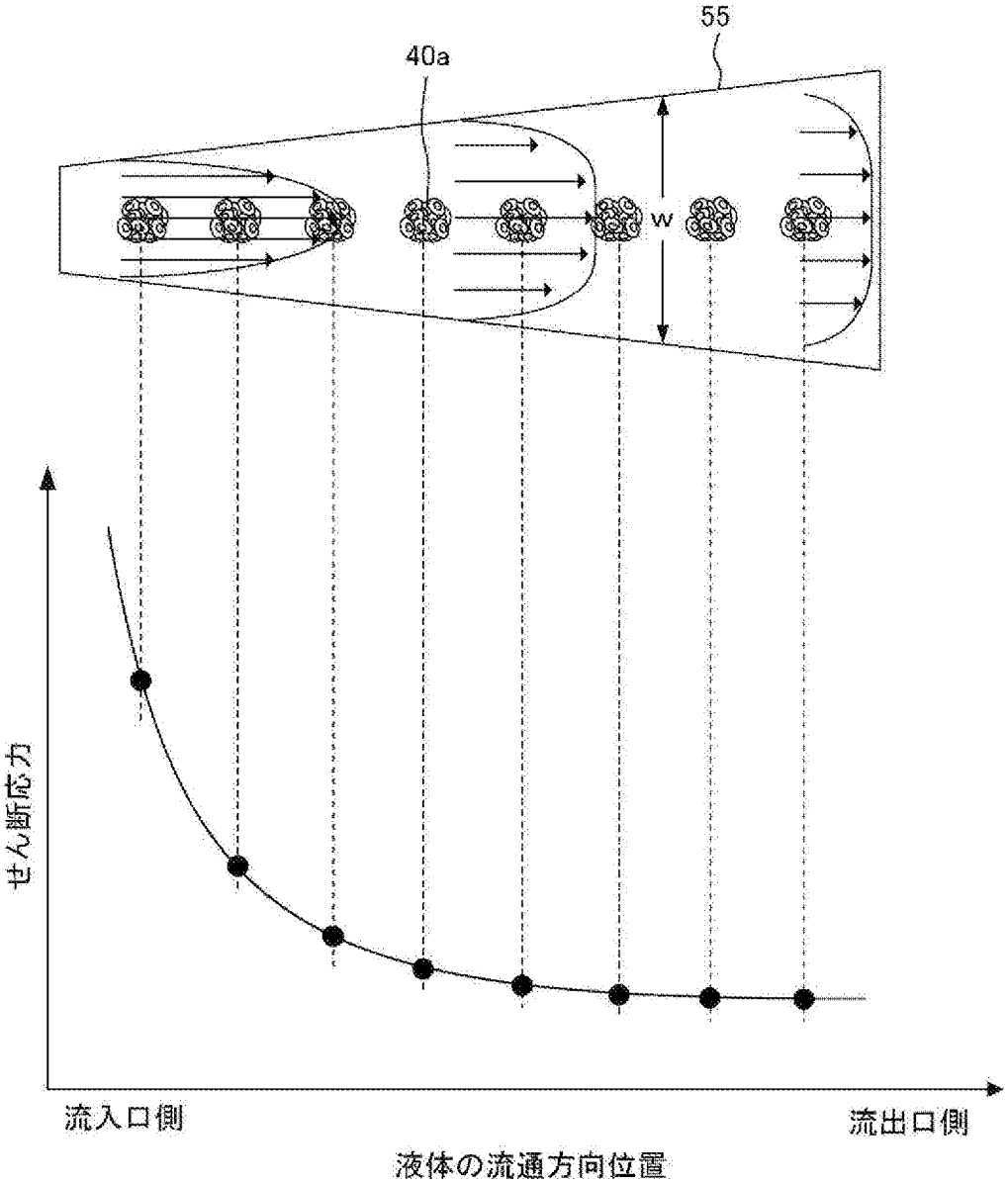
[図8]


Y
h/2
-w/2
w/2
Z
-h/2
無次元化
y
1
-Γ
Γ
z
-1
$\Gamma = \frac{w}{h}$

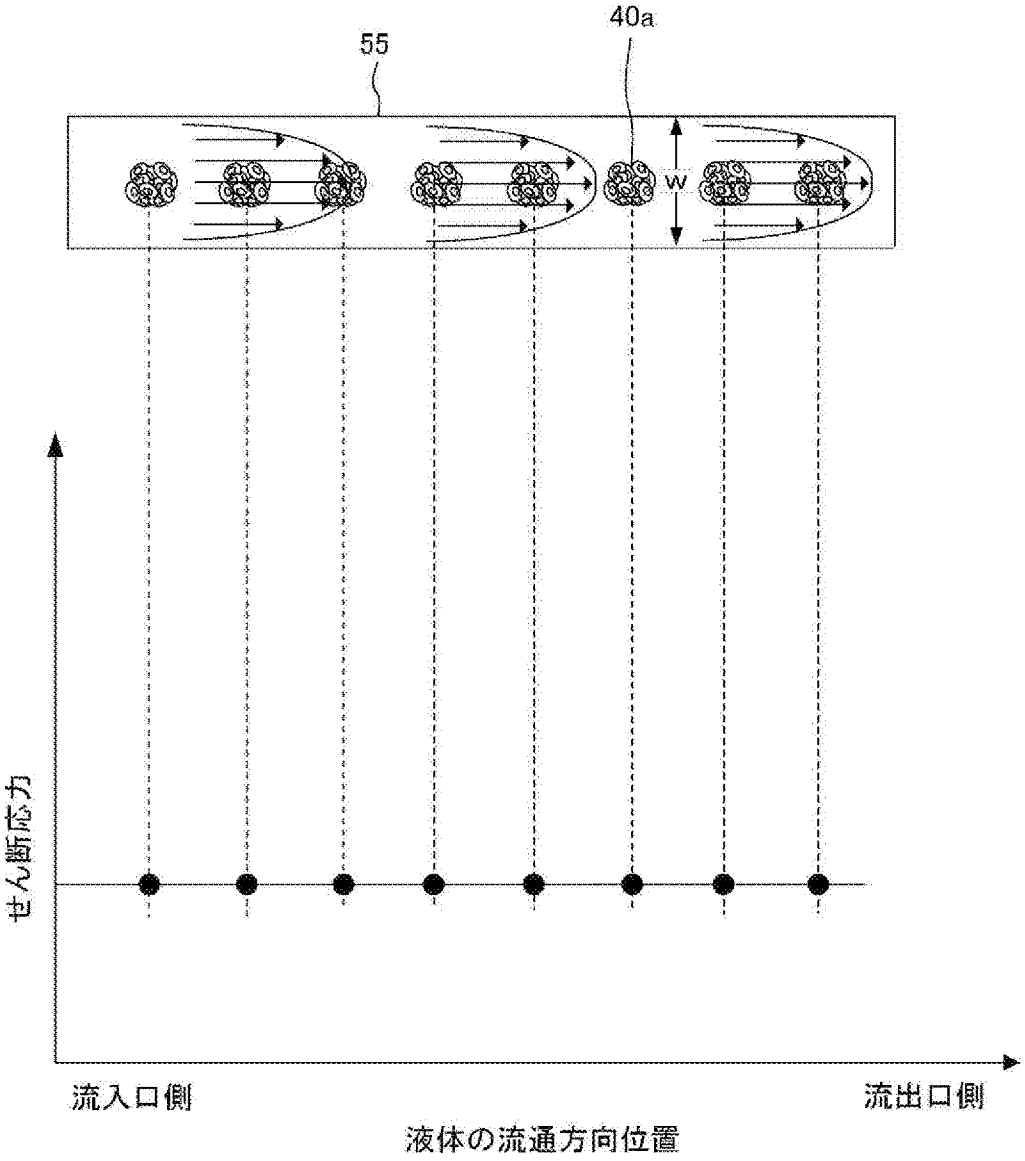
[図9]


40a
55
R1
R2

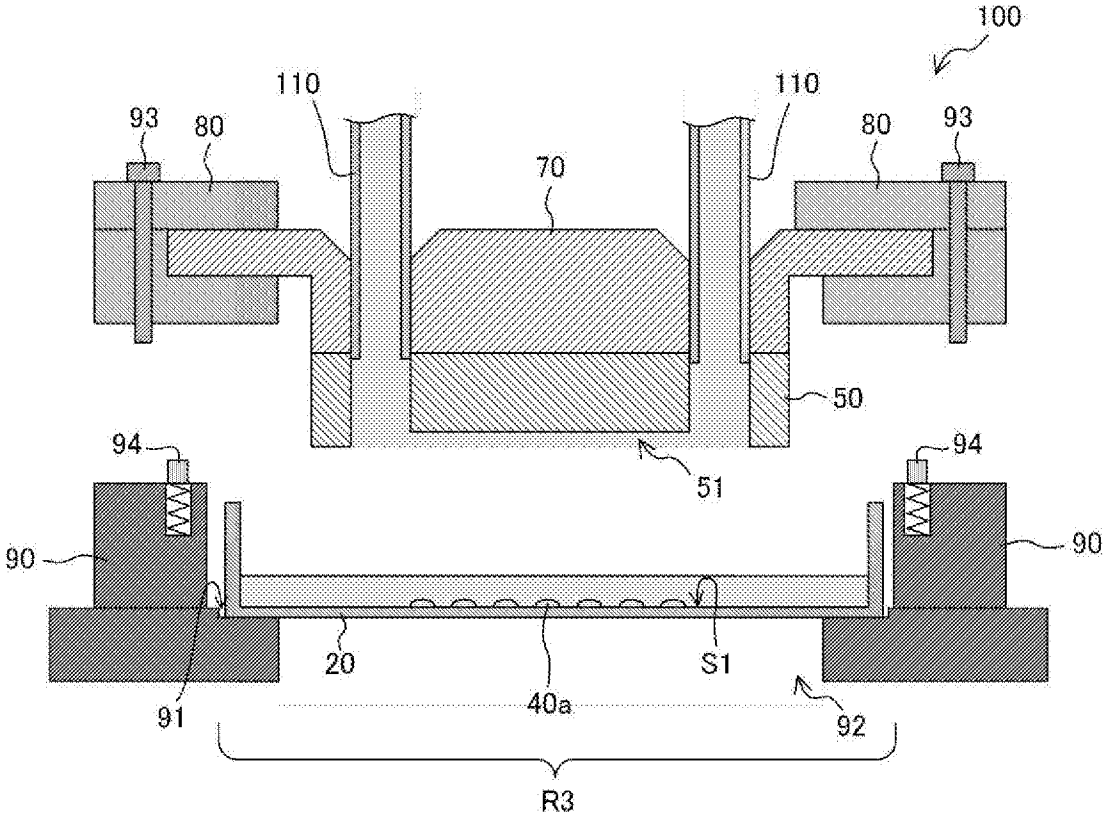
[図10]



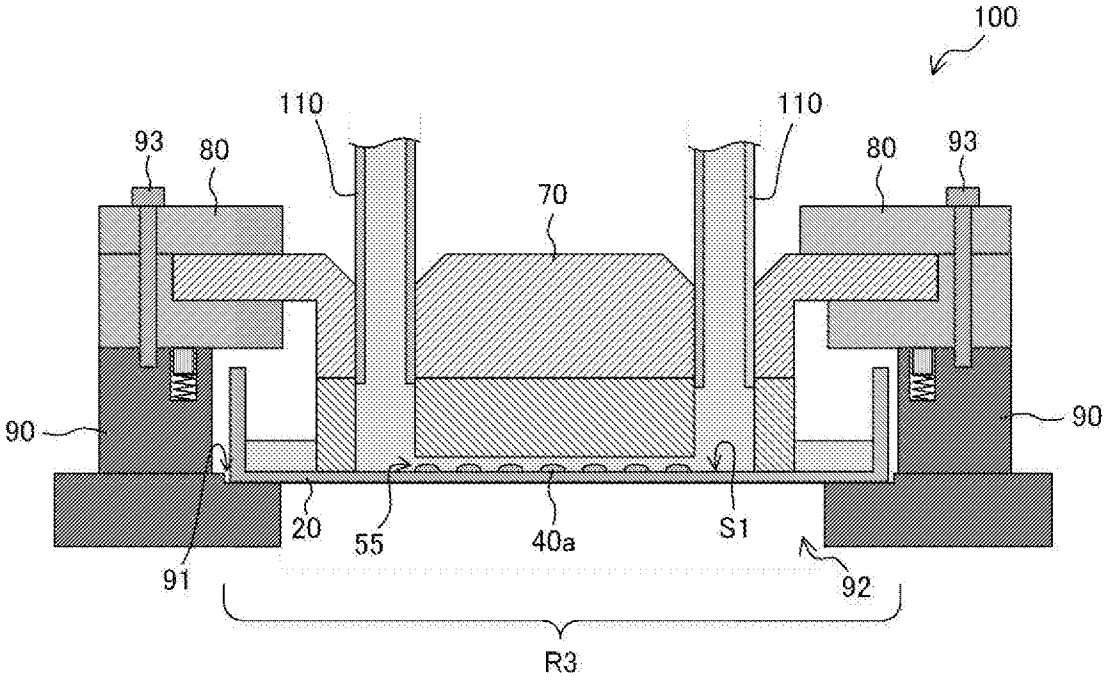
[図11]



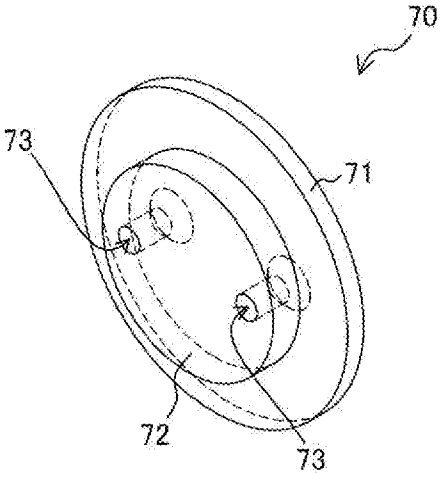
[図12A]


100
110
110
93
80
80
93
70
50
51
94
94
90
90
20
S1
40a
91
92
R3

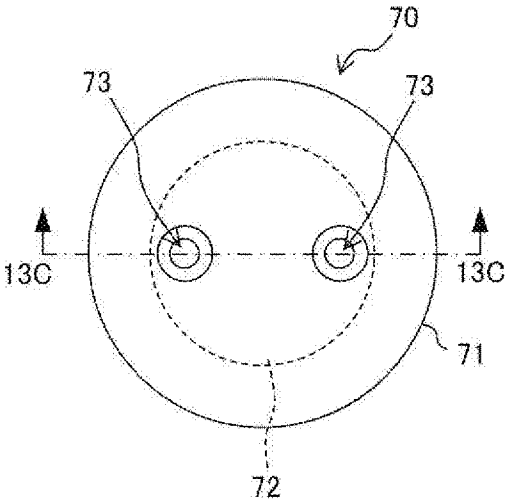
[図12B]


100
110
110
93
80
80
93
70
90
90
20
55
40a
S1
91
92
R3

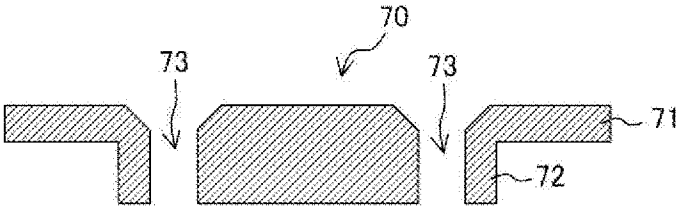
[図13A]



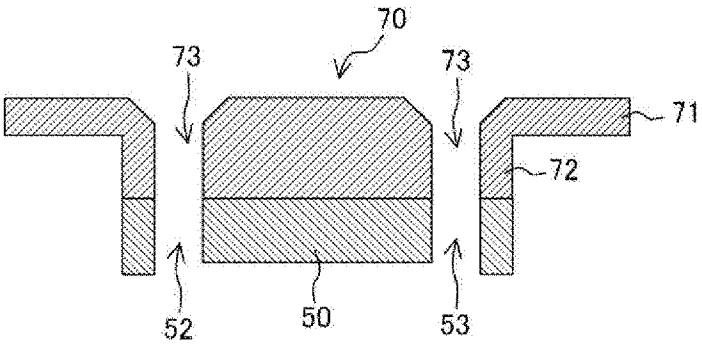
[図13B]



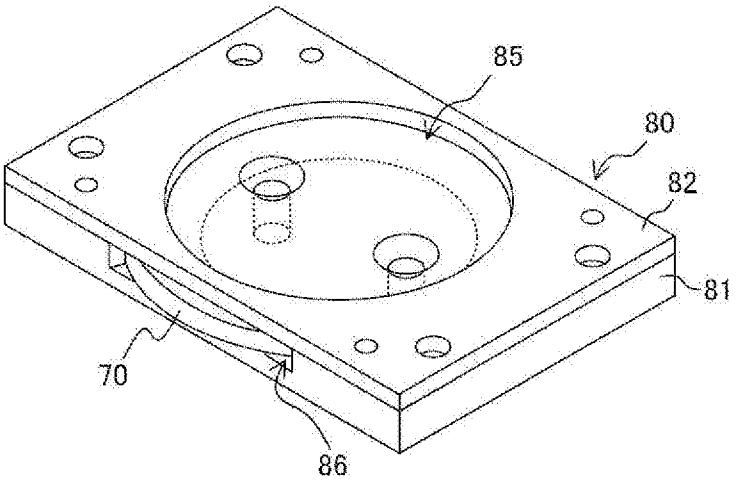
[図13C]



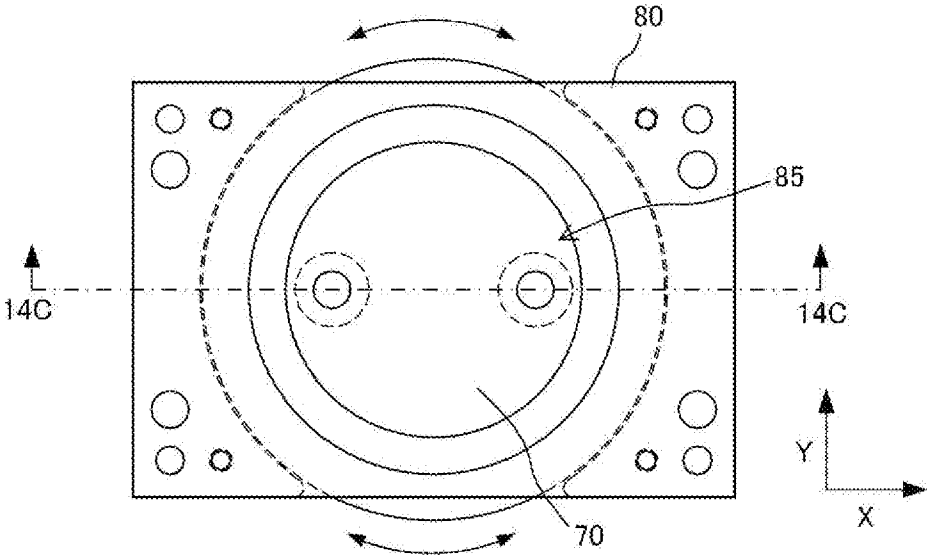
[図13D]



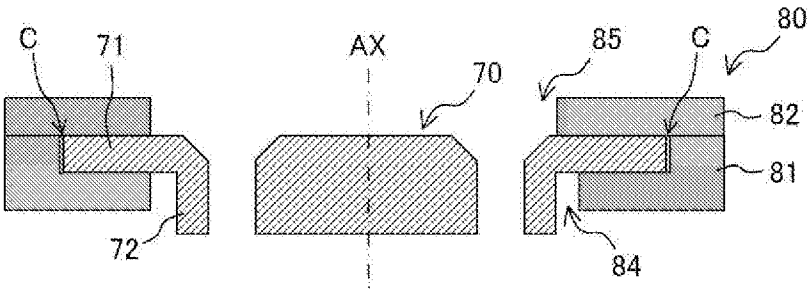
[図14A]



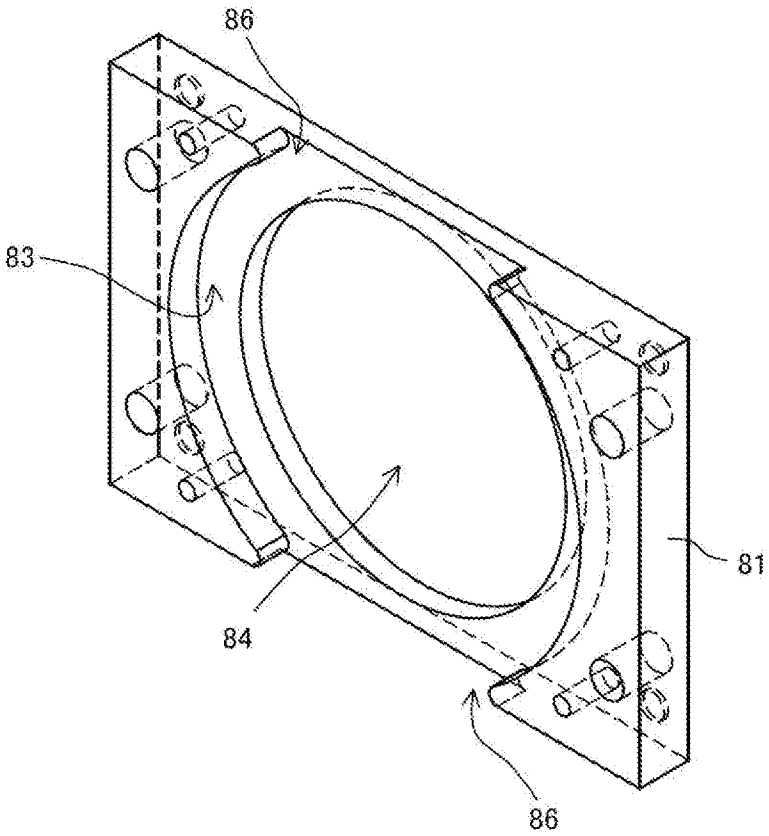
[図14B]



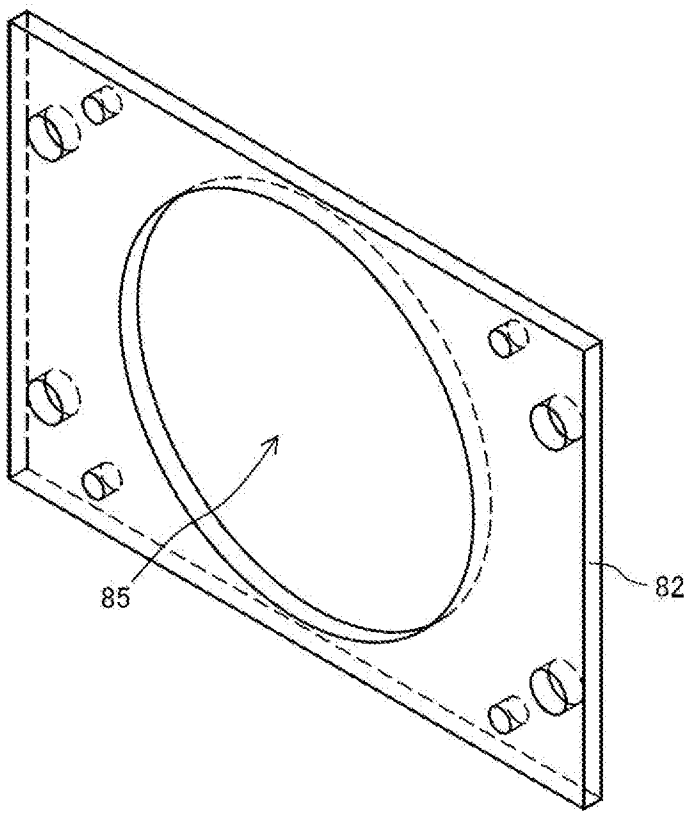
[図14C]



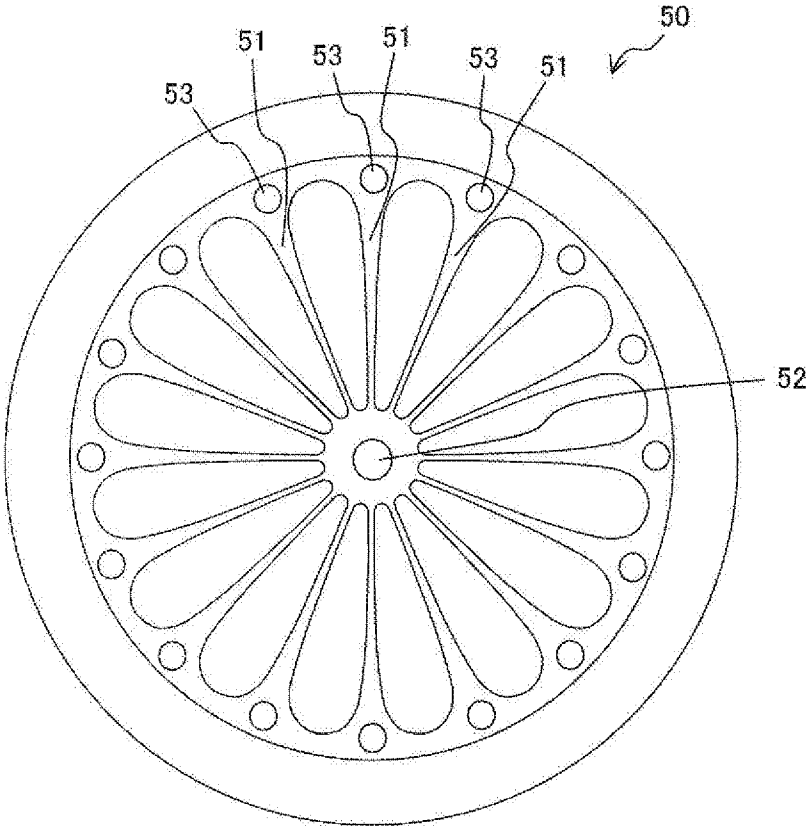
[図15A]



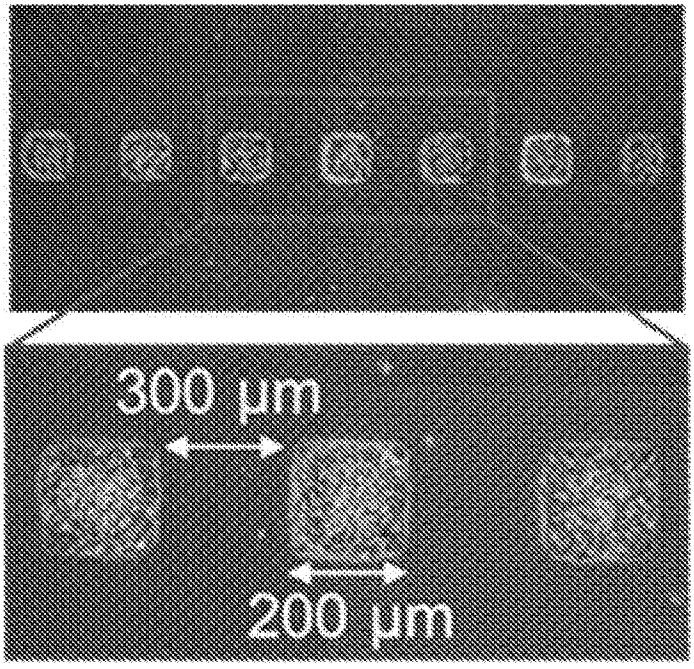
[図15B]



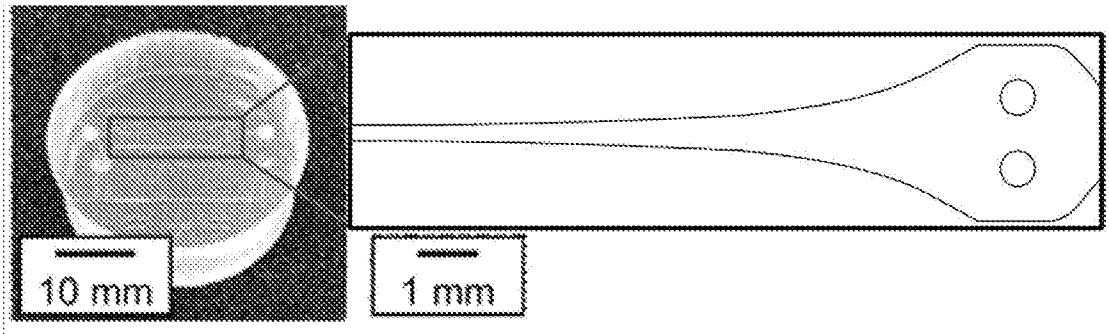
[図16]



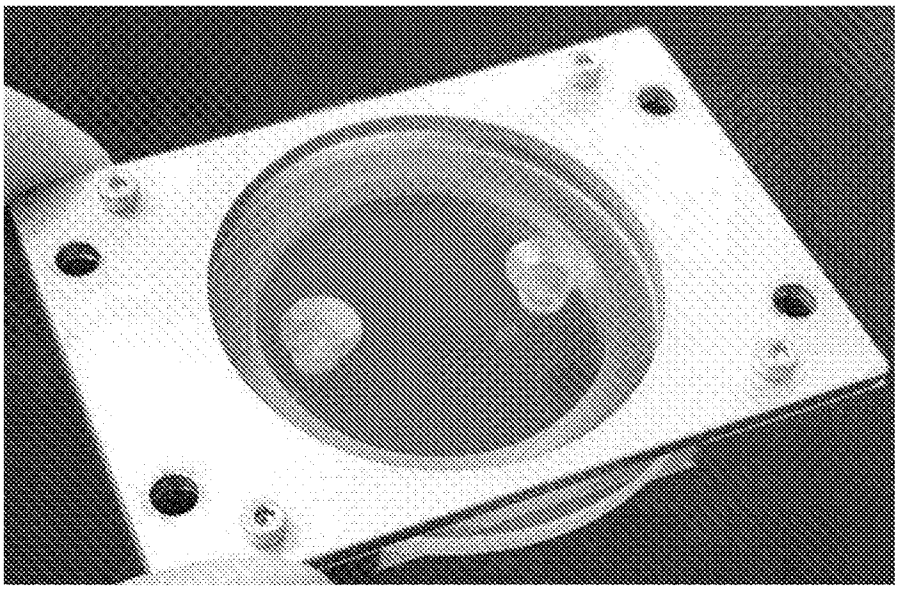
[図17]



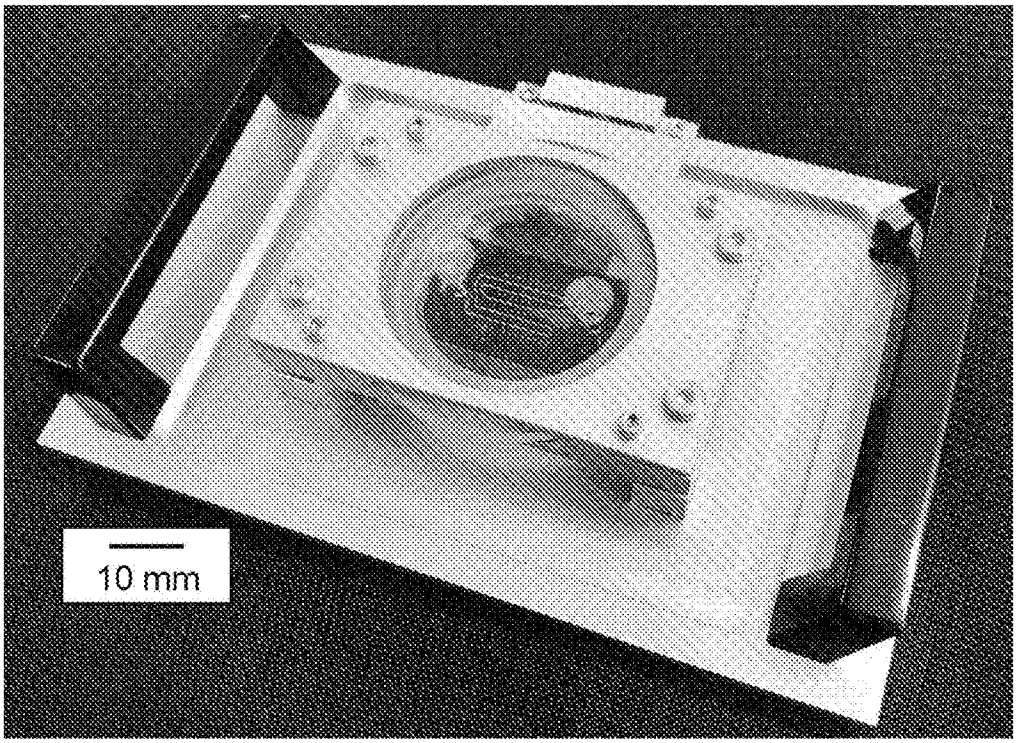
[図18]



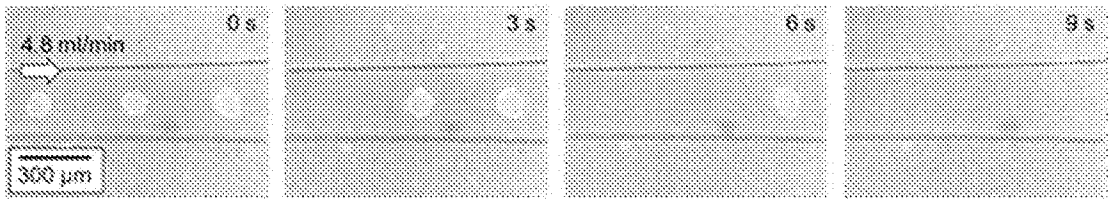
[図19]



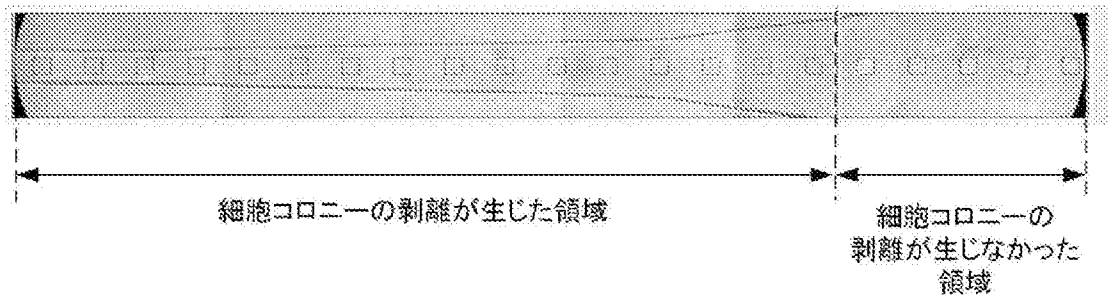
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/044238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i; ***C12M 3/00***(2006.01)i
FI: C12Q1/02; C12M3/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/00-3/00; C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2021-104015 A (UNIV TOKYO) 26 July 2021 (2021-07-26) claims, paragraphs [0021]-[0030], [0054]-[0057], examples, fig. 2, 4-5	1-10, 12-20
Y		11
Y	WO 2021/256452 A1 (SHINETSU POLYMER CO) 23 December 2021 (2021-12-23) claims, paragraphs [0002]-[0005]	11
A	JP 2012-100642 A (TOKYO WOMEN'S MEDICAL COLLEGE) 31 May 2012 (2012-05-31) claims, examples	1-20
A	WO 2020/195458 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 01 October 2020 (2020-10-01) claims	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 December 2022	**14 February 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/044238

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-104015 A	26 July 2021	(Family: none)	
WO 2021/256452 A1	23 December 2021	(Family: none)	
JP 2012-100642 A	31 May 2012	(Family: none)	
WO 2020/195458 A1	01 October 2020	US 2022/0082503 A1 claims EP 3936603 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/044238

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/02(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i
FI: C12Q1/02; C12M3/00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/00-3/00; C12M1/00-3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2021-104015 A (国立大学法人東京大学) 26.07.2021 (2021-07-26) 特許請求の範囲、「００２１」－「００３０」、「００５４」－「００５７」、実施例、図２、４－５	1-10,12-20
Y		11
Y	WO 2021/256452 A1 (信越ポリマー株式会社) 23.12.2021 (2021-12-23) 特許請求の範囲、「０００２」－「０００５」	11
A	JP 2012-100642 A (学校法人東京女子医科大学) 31.05.2012 (2012-05-31) 特許請求の範囲、実施例	1-20
A	WO 2020/195458 A1 (富士フイルム株式会社) 01.10.2020 (2020-10-01) 特許請求の範囲	1-20

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
15.12.2022	14.02.2023

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

松本　淳 4N 4675

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/044238

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-104015 A	26.07.2021	（ファミリーなし）	
WO 2021/256452 A1	23.12.2021	（ファミリーなし）	
JP 2012-100642 A	31.05.2012	（ファミリーなし）	
WO 2020/195458 A1	01.10.2020	US 2022/0082503 A1 Claims EP 3936603 A1	