

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4857191号
(P4857191)

(45) 発行日 平成24年1月18日(2012.1.18)

(24) 登録日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl. F1
C12M 3/06 (2006.01) C12M 3/06

請求項の数 17 外国語出願 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2007-134013 (P2007-134013)	(73) 特許権者	595117091
(22) 出願日	平成19年5月21日 (2007.5.21)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公開番号	特開2007-306925 (P2007-306925A)		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公開日	平成19年11月29日 (2007.11.29)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O7417-1880
審査請求日	平成22年3月10日 (2010.3.10)		フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
(31) 優先権主張番号	60/747,696		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(32) 優先日	平成18年5月19日 (2006.5.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/750,067	(74) 代理人	100077481
(32) 優先日	平成19年5月17日 (2007.5.17)		弁理士 谷 義一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィルター底上に細胞播種するためのエラストマー装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析装置の少なくとも1つのウェルにわたって延在する少なくとも1つのフィルター上に細胞を播種する際に使用するための物品であって、

離間された第1および第2表面と、

前記第1および第2表面の間に前記第1および第2表面を貫いて延びる少なくとも1つの流路と、を有するエラストマー本体を含み、

前記流路は、前記ウェルの外側の表面に、フィルターとの距離を離して、封止状態でかつ取外し可能に嵌合し、

前記フィルターは前記流路によって少なくとも部分的に包囲されるように形成されている、

ことを特徴とする物品。

【請求項 2】

前記エラストマー本体がポリジメチルシロキサンから形成されることを特徴とする請求項1に記載の物品。

【請求項 3】

前記流路がテーパ形状であることを特徴とする請求項1に記載の物品。

【請求項 4】

分析装置の少なくとも1つのウェルにわたって延在する少なくとも1つのフィルター上に細胞を播種するための方法であって、

10

20

離間された第 1 および第 2 表面と、
 前記第 1 および第 2 表面の間に前記第 1 および第 2 表面を貫いて延びる少なくとも 1 つの流路と、を有する本体を提供する工程；および
 前記本体を前記ウェル上に配置して、前記流路を前記ウェルに、フィルターとの距離を離して、封止状態で嵌合し、前記フィルターを前記流路によって少なくとも部分的に包囲する工程、
 を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

前記フィルターが、前記ウェルの内部に面する内表面と前記ウェルの内部からみて外方に面する外表面とを含み、前記フィルターの前記外表面が前記流路によって包囲されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記本体を前記ウェル上に配置する工程の前に、前記フィルターの前記外表面を重力的に上方に面するように前記フィルターの前記外表面を方向付ける工程をさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記フィルターの前記内表面上に細胞を播種する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記フィルターの前記内表面上に細胞を播種する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記本体がエラストマーであることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記本体がポリジメチルシロキサンから形成されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記流路がテーパ形状であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記流路が前記第 1 表面から前記第 2 表面に向かって収束し、および、前記本体が前記ウェル上に配置される状態で、前記ウェルが前記第 2 表面を貫いて前記流路内へと延びることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記ウェル上に前記本体を配置する工程の後に、前記流路内に少なくとも 1 種の細胞培地溶液を配置する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 14】

前記流路内に少なくとも 1 種の細胞培地溶液を配置する工程の後に、細胞を培養する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

細胞を培養する工程の後に、前記ウェルから前記本体を取り外す工程をさらに含むことを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記流路内に少なくとも 1 種の細胞培地溶液を配置する工程の後に、前記ウェルから前記本体を取り外す工程をさらに含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記分析装置がマルチウェルプレート、インサートプレート、カラム、試験管およびピペットからなる群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、分析装置のフィルター上に細胞を播種する際に使用するための物品および方法を対象とする。

【背景技術】

【0002】

薬物透過性スクリーニング分析は、先行技術において知られている。図1を参照して、そのような分析を行うための典型的な配置を説明する。各ウェル12の底端部にわたって延在する多孔質膜すなわちフィルター14を有する多数のオープンウェル12を有する、マルチウェルインサートプレート10が示されている。フィルター14は、典型的には、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、またはポリカーボネート(PC)材料から成る。閉じられた底部のレシーバーウェル18を有する、対応するレシーバープレート16が同様に示されている。使用にあたっては、分析されるべき化合物を含有する緩衝液をレシーバーウェル18内に配置する。対象の化合物を有さない緩衝液をインサートプレート10のウェル12内に配置し、インサートプレート10をレシーバープレート16の上に配置し、フィルター14をレシーバーウェル18内に含有される化合物の緩衝液と接触させる。インサートプレート10およびレシーバープレート16の両方の溶液中の化合物の濃度を分析して、フィルター14を通る化合物の拡散を観察し、および化合物の浸透性を測定する。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

特定の環境下(例えば、特定の分析)では、フィルター上に形成される1つまたは複数の細胞単層を有することが望ましい場合がある。図2を参照して、インサートプレートのウェル12内に細胞培地溶液を配置して、各フィルター14の内表面上で細胞を培養し、およびその上に細胞単層を形成することは、当技術分野において知られている。しかしながら、フィルターの外表面上に細胞単層を形成することには、より大きな困難がある。図3に示されるように、インサートプレート10を反転させ、細胞培地溶液の滴を各フィルター14上に配置する。制限された容積の細胞培地溶液が各フィルター14上に配置され得るので、高い細胞密度および長い培養時間を必要とする密な細胞単層を一貫して達成することは難しい。密な細胞単層の形成の失敗は、細胞単層中の「穴」および薬物透過性スクリーニング分析での起こり得る失敗をもたらす可能性がある。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0004】

フィルター膜の外表面上の細胞単層の形成は、様々な理由で望まれる。第一に、フィルター膜の両面上に細胞単層がある場合、特に、異なるタイプの細胞の細胞単層がフィルター膜の両面上にある場合、細胞コミュニケーションを研究することができる。第二に、外表面の単層は、薬物輸送の各方向(頂端から基底外側および基底外側から頂端)に対して同一の緩衝液の構成の使用を可能にする方法で、研究者が分極化された薬物輸送の研究を行うことを可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本明細書中では、分析装置の少なくとも1つのウェルにわたって延在する少なくとも1つのフィルター上に細胞を播種する際に使用するための物品が提供される。該物品は、離間された第1および第2表面と、第1および第2表面の間に第1および第2表面を貫いて延びる少なくとも1つの流路とを有するエラストマー本体を含む。該流路は、ウェルの外側の表面に封止状態でかつ取り外し可能に嵌合するように形成され、フィルターは、該流路によって少なくとも部分的に包囲される。好都合には、本発明によって、細胞単層をフィルターの外表面上に形成することができる。分析装置は、マルチウェルプレート、インサートプレート、カラム、試験管、またはピペットであってもよい。

40

【0006】

本発明のさらなる態様では、分析装置の少なくとも1つのウェルにわたって延在する少

50

なくとも1つのフィルター上に細胞を播種するための方法が提供される。該方法は、離間された第1および第2表面と、第1および第2表面の間に第1および第2表面を貫いて延びる少なくとも1つの流路とを有する本体を提供する工程；および流路がウェルに封止状態で嵌合し、フィルターが流路によって少なくとも部分的に包囲される状態で、本体をウェル上に配置する工程を含む。

【0007】

本発明のこれらおよび他の形態は、以下の詳細な記載および添付する図面の検討を通してよりよく理解されるであろう。

【0008】

図4を参照して、物品20は、1つまたは複数の膜すなわちフィルター22上に細胞を播種する際に使用するために提供される。物品20は、好ましくは一体型の本体24と、好ましくは互いに平行であるように形成される離間された第1表面26および第2表面28とを含む。1つまたは複数の流路30は、第1および第2表面26、28の間に第1および第2表面26、28を貫いて延びるように形成される。本体24を様々な寸法で形成してもよく、流路30を様々な数で提供し、および様々な配列で配置してもよい。

【0009】

流路30の断面は、その長さ方向において一定であっても変動してもよい。好ましくは、図4に示されるように、流路30は、第2表面28に向かって収束するテーパ構造を有して形成される。流路30の断面は、以下に記載されるように、分析装置の対応するウェルと液体不浸透性シールを画定するように形成される。

【0010】

本体24は、エラストマー材料で形成されることが好ましい。より好ましくは、本体24は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)から形成される。PDMSは、不浸透性のシール状態と、使用後の容易で非破壊的な除去とを可能にする。

【0011】

フィルター22を、PVDF、PETまたはポリカーボネート(PC)材料を含む任意の知られている材料で形成してもよい。また、フィルター22は、様々な厚さであってもよく、ならびに様々な寸法および構成の孔を含んでもよい。

【0012】

物品20を様々な用途において使用してもよいが、しかし物品20は、分析装置32と組み合わせての使用に特によく適している。分析装置32は、分析または試験手順(例えば、薬物透過性スクリーニング分析)において使用される任意の装置であってもよい。分析装置32は、マルチウェルプレート、インサートプレート、カラム、試験管およびピペットを含むが、これらに限定されない。例示目的で、分析装置32を示し、インサートプレートとして記載するが、しかし他の構造も可能である。分析装置32は、少なくとも1つのウェル34を含み、フィルター22がウェル34にわたって延在する。好ましくは、ウェル34は、開口端36で終端し、フィルター22が開口端36にわたって延在する。非限定的な例として、結合形成、融合、および機械的な固定を含む様々な技術を使用して、フィルター22をウェル34に固着させてもよい。フィルター22の内表面38は、ウェル34の内部40に面し、一方、フィルター22の外表面42は、内部40からみて外方に面する。分析装置32は、各々が1つまたは複数のフィルター22を有する複数のウェル34を含んでいてもよい。好ましくは、ウェル34の各々は、開口端36の反対側に、個々のウェル34内に分析溶液(例えば緩衝液)を受けるために形成される開口受容端44を含む。

【0013】

物品20には、分析装置32上のウェル34の数および位置に対応する数および位置の流路30が提供されることが好ましい。このように、複数のフィルター22上に細胞を同時に播種するために、物品20を使用することができる。さらに、流路30は、各々、特に第2表面28において、ウェル34上に液体不浸透性シールを画定するように形成され、フィルター22は流路30によって少なくとも部分的に包囲される。具体的には、流路

10

20

30

40

50

30によってフィルター22の少なくとも外表面42が包囲されるべきであるが、しかしながら、流路30によってフィルター22が完全に包囲されることが好ましい。

【0014】

図4を参照して、物品20の使用を説明する。第1の工程46において、フィルター22の外表面42を重力的に上方に面するように（例えば、分析装置32を反転させることによって）分析装置32を配置する。第2の工程48において、流路30がウェル34に封止状態で嵌合し、フィルター22が流路30によって少なくとも部分的に包囲される状態で、本体24を分析装置32上に配置する。流路30は、ウェル34の外側の表面50上に液体不浸透性シールを形成する。テーパ構造を有する流路30を用いて、第1表面26よりも狭い開口部を流路30内に画定する第2表面28を貫いて、流路30内にウェル34を挿入することが好ましい。

10

【0015】

第3の工程52において、フィルター22の上の各流路30内に、1種または複数種の細胞培地溶液54を配置する。流路30によって画定される液体不浸透性シールと、流路30によるフィルター22の少なくとも部分的な包囲とを用いて、フィルター22と連通する流路30内に、細胞培地溶液54を保持する。フィルター22の外表面42上の細胞増殖の形成を促進するように、細胞を培養することが好ましい。調製されたならば、細胞培地溶液54を除去し、および物品20を取り外して、分析装置32を使用可能な状態にする。

【0016】

20

図5において示されるように、本発明を用いて、1つまたは複数のフィルター22の外表面42上に、細胞単層56を成長させることができる。各フィルター22に関して、フィルター22の一面全体の外表面42にわたって十分に多量の細胞培地溶液54を維持する能力によって、細胞単層56を密に形成することができる。

本発明を、慣用の手法とともに使用することができる。例えば、図6を参照して、細胞を播種するための知られている技術を使用して、1つまたは複数のフィルター22の内表面38上に細胞単層56を成長させることができる。また、本発明を使用して、細胞単層56によって挟まれるフィルター22を有するように、1つまたは複数のフィルター22の外表面42上に細胞単層56を成長させることができる。細胞コミュニケーションの研究を可能にするために、細胞単層56を、同一のまたは異なるタイプの細胞で形成することが

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】インサートプレートおよびレシーバプレートの配置を示す図である。

【図2】フィルターの内表面上に形成される細胞単層の概略図である。

【図3】フィルターの外表面上に細胞を播種するための先行技術の方法を示す図である。

【図4】インサートプレートの形態の分析装置とともに使用される本発明に従って形成される物品を示す図である。

【図5】フィルターの外表面上に形成される細胞単層の概略図である。

【図6】フィルターの内表面および外表面上に形成される細胞単層の概略図である。

40

【符号の説明】

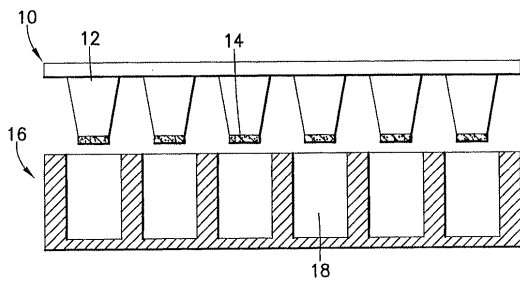
【0018】

- 10 マルチウェルインサートプレート
- 12 オープンウェル
- 14 フィルター
- 16 レシーバプレート
- 18 レシーバウェル
- 20 物品
- 22 フィルター
- 24 本体

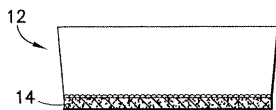
50

- 2 6 第 1 表面
- 2 8 第 2 表面
- 3 0 流路
- 3 2 分析装置
- 3 4 ウェル
- 3 6 開口端
- 3 8 内表面
- 4 0 内部
- 4 2 外表面
- 4 4 開口受容端
- 4 6 第 1 の工程
- 4 8 第 2 の工程
- 5 0 外側の表面
- 5 2 第 3 の工程
- 5 4 細胞培地溶液
- 5 6 細胞単層

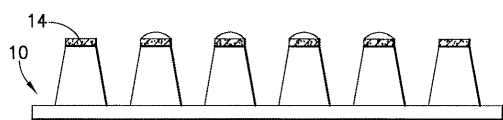
【 図 1 】



【 図 2 】

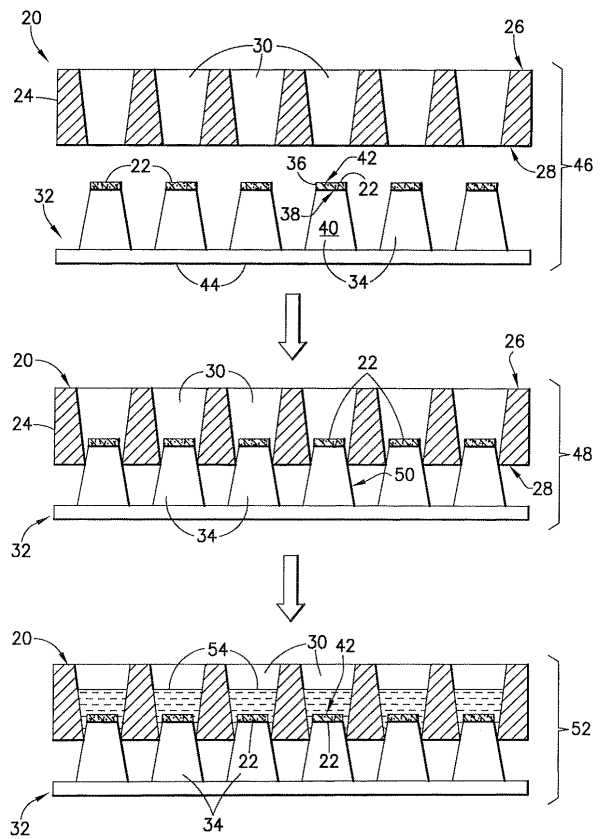


【 図 3 】

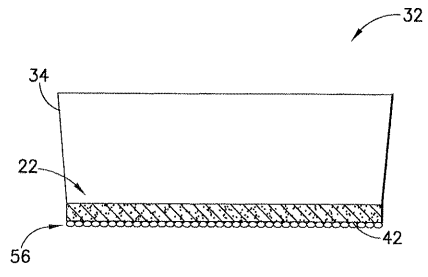


先行技術

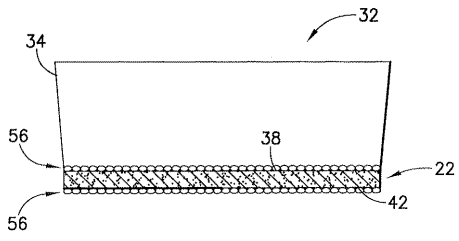
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(74)復代理人 100133721

弁理士 主代 静義

(72)発明者 チャールズ エル・クリスピ

アメリカ合衆国 01945 マサチューセッツ州 マーブルヘッド エバンス ロード 4

(72)発明者 シャオシ ケビン チェン

アメリカ合衆国 01581 マサチューセッツ州 ウェストバーロウ インディアン ボンド
ロード 31

審査官 福間 信子

(56)参考文献 米国特許第05665596 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)