

(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
2017年11月30日(30.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/204111 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/018850

(22) 国際出願日: 2017年5月19日(19.05.2017)

(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 2016-105075 2016年5月26日(26.05.2016) JP

(71) 出願人:株式会社 I F G (IFG CORPORATION)

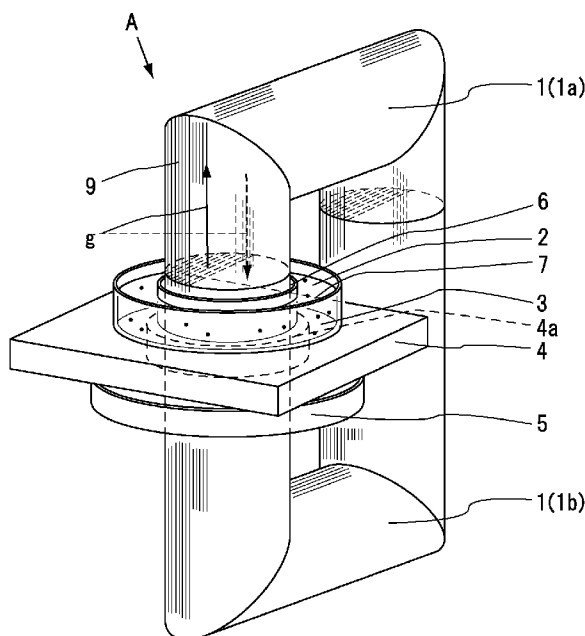
[JP/JP]; 〒9820261 宮城県仙台市青葉区折立一丁目14番9号 Miyagi (JP). 国立大学法人 東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/

(72) 発明者: 永 富 良 一 (NAGATOMI Ryoichi); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 高木 敏行(TAKAGI Toshiyuki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 出江 紳一(IZUMI Shinichi); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 阿部 利彦(ABE Toshihiko); 〒9820261 宮城県仙台市青葉区折立一丁目14番9号 株式会社 I F G 内 Miyagi (JP). 森 仁(MORI Hitoshi); 〒9820261 宮城県仙台市青葉区折立一丁目14番9号 株式会社 I F G 内 Miyagi (JP). 八

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR NON-CONTACT ELECTRICAL STIMULATION OF CELLS IN LIQUID CULTURE MEDIUM

(54) 発明の名称: 培養液中の細胞の非接触電気刺激装置と非接触電気刺激方法

[図1]



(57) Abstract: The present invention provides an apparatus for applying electrical stimulation to cells in a liquid culture medium without requiring the use of a liquid culture medium dipping electrode. An electrical stimulation apparatus A for applying electrical stimulation to cells in a liquid culture medium 2. A liquid culture medium vessel 3 is provided with: a ring-shaped depressed part 7 in which the liquid culture medium 2 is to be stored; and through-holes 6 formed on the inner surface side of the ring-shaped depressed part 7. A magnetic core 1 is made from a magnetic material, and is arranged so

[続葉有]



WO 2017/204111 A1



島 建樹(YASHIMA Kenji); 〒9820261 宮城県仙台市青葉区折立一丁目 1 4 番 9 号 株式会社 I F G 内 Miyagi (JP). 森 和美(MORI Kazumi); 〒9820261 宮城県仙台市青葉区折立一丁目 1 4 番 9 号 株式会社 I F G 内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 森 義 明, 外 (MORI Yoshiaki et al.); 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田一丁目 1 1 番 4 号 大阪駅前第 4 ビル 9 1 1 Osaka (JP).

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

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 補正された請求の範囲及び説明書 (条約第19条(1))

as to penetrate through the thorough-holes 6 in the liquid culture medium vessel 3. An exciting coil 5 is wound around the magnetic core 1. A power supply 8 for coils can supply a fluctuating current to the exciting coil 5.

(57) 要約: 本発明は、培養液浸漬電極を用いることなく培養液中の細胞に電気刺激を与える装置を提供する。培養液 2 中の細胞に電気刺激を与える電気刺激装置 A である。培養液容器 3 は培養液 2 を収納するためのリング状凹部 7 と該リング状凹部 7 の内側に貫通孔 6 を備えている。磁気コア 1 は磁性体を材料とし、培養液容器 3 の貫通孔 6 を貫通するように配置されている。励磁コイル 5 は磁気コア 1 に巻設されている。コイル用電源 8 は励磁コイル 5 に変動電流を供給する。

明 細 書

発明の名称：

培養液中の細胞の非接触電気刺激装置と非接触電気刺激方法

技術分野

[0001] 本発明は、培養液に電極を浸漬することなく非接触で培養液中の細胞に電気刺激を与える装置と該装置を用いた電気刺激方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、培養液中の細胞へ電氣的刺激を加えることにより、様々な細胞機能の制御が可能であることが分かってきている。現在までに報告されている効果として、「（１）特定遺伝子の発現やタンパク質産生」、「（２）細胞の分化誘導」、「（３）細胞の形態変化」、「（４）膜流動性の減少効果」、「（５）細胞増殖の遅延効果」などが発見されている。

[0003] 「（１）特定遺伝子の発現やたんぱく質の産生」の一例として、筋芽細胞の培養過程において培養液中に間歇的な電圧変化を加えることで、筋細胞の分化を促進するタンパク質（C×43）の発現が確認されている（非特許文献１）。

[0004] また、一定方向の電気刺激下にて筋芽細胞を培養することにより、培養された細胞に収縮能を獲得させることができることも確認されている（非特許文献２）。

[0005] 電気刺激による「（２）細胞の分化誘導」の一例として、ラット副腎髄質の好クロム性細胞腫PC12に対する細胞分化誘導があげられる。このPC12細胞は、神経成長因子（NGF）の存在下で培養すると神経様細胞に分化し、神経突起をNGFの分布する方向へ伸長させる。最近の研究では、NGFなしでも、矩形変動電圧を加えながら96時間培養することによって、PC12は神経様細胞に分化することが発見された（非特許文献３）。

[0006] 上記のような電気刺激を用いた細胞培養方法については、特許出願もされており、特許文献１、２においては、電極を用いて細胞に所定時間以上の電

電気刺激を与えることにより、細胞の分化を誘導する細胞分化誘導法が示されている。

[0007] 一方、電気ではなく、磁場を用いて細胞機能制御を行う技術についても特許出願がなされている。特許文献3では、高周波交番磁界を印可することにより、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させ、神経栄養因子群の合成及び細胞外への放出を促進させる装置について公開されている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：河原裕美，梅田知佳，吉元玲子，佐々木輝，呉樹亮，弓削類著「筋芽細胞への電気刺激効果」JAPANESE PHYSICAL THERAPY ASSOCIATION, 2005(0)、2006年、A0617-A0617

非特許文献2：Hideaki Fujita, Taku Nedachi, Makoto Kanzaki 著「Accelerated denovo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes」EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 313, 2007年、p.1853-1865

非特許文献3：小山純弘，相澤益男著「電気刺激による細胞機能の制御」化学と生物Vol.38, No.8, 2000年、p.503-507

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2004-129603号公報

特許文献2：特開2005-027501号公報

特許文献3：再表2008-056414号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上記に示したように、電気刺激を用いた細胞制御方法は、今後様々な医療

分野への応用が期待されているが、いくつかの問題を抱えている。特に大きな問題は電極の問題である。培養液中に電気刺激を加えるためには、電極を培養液に接する（浸漬）状態とし、その上で電圧を加えることになる。

[0011] その際、培養液と電極の間では電子の授受が行われるが、その結果として、電極の金属はイオン化して培養液に溶出し、培養液中のイオンは電子を受け取り電極上に析出する。

[0012] 培養液の主体である水（ H_2O ）は電気分解されて水素と酸素となり、培養液中に放出される。その結果、培養液中のpHは変動し、加えて特定のイオンの濃度が変化してしまい、一定の培養環境を保持し続けることは難しい。そのため、培養液の化学的環境の定期的な調整が必要となってしまうという問題がある。培養液の化学的環境の変化は細胞の培養条件を固定できていないことを意味しており、研究の信頼性に関わる課題である。

[0013] また、特に臨床応用を目的として行われる細胞培養は、その過程において無菌状態を維持することが極めて重要である。細胞培養容器自体は滅菌状態にて納品されるため、再利用しない限りは滅菌の手間暇が必要ではないが、電極は基本的に再利用が前提となるため、実験のたびに滅菌処理を行う必要があり、無菌状態の維持に困難さを伴う。その滅菌作業を必要とせず電気刺激を行うことが可能な装置があれば医療研究者の負担が大幅に軽減される。

[0014] 本発明は上記問題点に鑑みてなされたもので、主たる課題としては、培養液浸漬電極を用いることなく培養液中の細胞に電気刺激を与える装置と該装置を利用した非接触電気刺激方法を提供することにあり、従たる課題としては、上記方法及びその装置において、培養液中を流れる電流密度を部分的に簡単に変えることができ、培養液中の細胞に異なる電気刺激を与えられるようにする、或いは少量の細胞に低電力の電気刺激を与えられるようにすることにある。

課題を解決するための手段

[0015] 以上の課題に鑑み、本発明は、以下の技術を用いて上記の課題を解決した。請求項1に記載の発明（図1）は、培養液2中の細胞に電気刺激を与える

電気刺激装置 A であって、

培養液 2 を収納するためのリング状凹部 7 と該リング状凹部 7 の内側に貫通孔 6 を備えた培養液容器 3 と、

強磁性体を材料とし、該培養液容器 3 の貫通孔 6 を貫通するように配置された磁気コア 1 と、

該磁気コア 1 に巻設された励磁コイル 5 と、

該励磁コイル 5 に変動電流を供給するコイル用電源 8 とで構成されていることを特徴とする。

[0016] 請求項 1 の発明によれば、励磁コイル 5 に変動電流を通電することにより磁気コア 1 内に変動する磁束を発生させ、この変動する磁束により培養液容器 3 に蓄えられた培養液 2 中に変動する渦電流 U （及び電界）を誘導し、この渦電流 U （及び電界）を以って、換言すれば、培養液浸漬電極を用いることなく培養液 2 に対して非接触にて培養液容器 3 内の細胞に電気刺激を与えることが可能となる。

[0017] 請求項 2 に記載の発明は、上記磁気コア 1 が閉磁路を構成することを特徴とする電気刺激装置 A である。

[0018] 請求項 2 の発明によれば、磁気コア 1 内の反磁界がほぼゼロとなり、効率的に磁気コア 1 内に磁束を発生させることが可能となる。

[0019] 請求項 3 に記載の発明は、上記培養液容器 3 のリング状凹部 7 の一部が隘路 7 a となっており、培養液 2 中に誘導される渦電流 U の通電路となる該隘路 7 a 部分の断面積すなわち通電断面積 S_1 が、リング状凹部 7 の隘路 7 a 以外の部分の通電断面積 S_2 に比較して小に形成されていることを特徴とする電気刺激装置 A である。

[0020] 請求項 3 の発明によれば、リング状凹部 7 の隘路 7 a 部分は、隘路 7 a 以外の部分と比較して高い電流密度（及び電界）を得ることが可能となり、培養液 2 中の細胞の一部（即ち、隘路 7 a 部分に居る細胞）のみ選択して刺激を行いたい場合や、隘路 7 a 部分に滴下された少量の細胞を低電力にて刺激を行いたい場合に有用である。

[0021] 請求項 4 に記載の発明は、上記磁気コア 1 が、該磁気コア 1 に発生する磁束の方向 g に対して垂直な方向に積層された（換言すれば、積層面がその磁束方向 g に対して平行な方向に積層された）電磁鋼板 9 により構成されていることを特徴とする電気刺激装置 A である。

[0022] 請求項 4 の発明によれば、磁気コア 1 内の渦電流損を最小限にすることが可能であり、磁気コア 1 の発熱の抑制が可能であるとともに、装置の省電力化が実現可能である。

[0023] 請求項 5 に記載の発明は、請求項 1 に記載の電気刺激装置 A による培養対象細胞の電気刺激方法であって、

培養液容器 3 に形成されたリング状凹部 7 に培養対象の細胞を含む培養液 2 を収納し、

培養液容器 3 の該リング状凹部 7 の内側に形成された貫通孔 6 に、強磁性体を材料とした磁気コア 1 を貫通するように配置し、

該磁気コア 1 に巻設された励磁コイル 5 に通電することで磁気コア 1 内に磁束を発生させ、この磁束により培養液容器 3 に蓄えられた培養液 2 中に変動する渦電流 U （及び電界）を誘導し、この渦電流 U （及び電界）を以って前記リング状凹部 7 内の培養液 2 に含まれている培養対象細胞に電気刺激を与える電気刺激方法である。

発明の効果

[0024] 本発明の電気刺激装置を用いることにより、上記のように培養液浸漬電極を用いずに培養液に対して非接触で細胞へ電気刺激をすることが可能となる。このことにより、培養液中の化学的環境の維持が可能となり、培養液管理のためのメンテナンス周期を抑えることができると共に、培養液中の成分変化の原因を、細胞の生活動を起因とする変化に絞ることが可能となるため、より信頼性の高い研究を行うことが可能となる。また、培養液に浸漬させる電極を用いないため、滅菌作業が不要となり、これまでにないクリーンかつ使い勝手のよい電気刺激装置を最新医療研究の現場に提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0025] [図1]本発明の第1実施形態の通電状態の斜視図である。
- [図2]図1における培養容器の設置時又は交換時の斜視図である。
- [図3]図1の正断面図である。
- [図4]図1の平面図である。
- [図5]本発明に使用される培養液容器の第1実施例の斜視図である。
- [図6]図5の正断面図である。
- [図7]本発明に使用される培養液容器の第2実施例の斜視図である。
- [図8]図7の正断面図である。
- [図9]図7の他の実施例の正断面図である。
- [図10] (a) (b) 本発明の磁気コアの斜視図である。
- [図11]本発明に使用される培養液容器の第3実施例の斜視図である。
- [図12]本発明におけるコイル電流、コア内磁束密度及び誘導磁界の関係を示すタイムチャートグラフである。

発明を実施するための形態

- [0026] 本発明は、従来装置では必須であった培養液内浸漬電極を用いず、培養液2内に変動する渦電流 U （及び電界）を発生させる（換言すれば、変動する磁界によって培養液2に電界を及ぼし、これによって培養液2中に誘導電流「変動する渦電流 U 」を発生させる）ことを目的とし、本発明者らは鋭意研究を行った。
- [0027] その結果、第1に磁気コア1を用いて集中し且つ急激に変化する磁束をリング状の培養液容器3の貫通孔6中に貫通させることにより、培養液2中の細胞の刺激に十分な渦電流 U などを誘導することが可能となった。
- [0028] 第2に培養液2中の電流径路の一部（隘路7a）の通電断面積 S_1 を他の電流径路の通電断面積 S_2 より小さくすることにより、部分的に隘路7aの電流密度を高め、当該部分7aに居る細胞に、より強力な電気刺激を行うことが可能となった。
- [0029] 第3に磁気コア1を閉磁路構造とすることにより、より効率よく渦電流 U

を誘導することが可能となった。

[0030] 第4に磁気コア1の材料として、積層ケイ素鋼板（或いは、フェライト、積層パーマロイ、積層アモルファス）を使用することにより、渦電流Uの影響を最小限にし、強力な誘導電界を発生することが可能となった。

[0031] 以下、本発明を図に従って説明する。図1に示す通り、本装置Aは、大きくわけて培養液容器3、磁気コア1、励磁コイル5、該励磁コイル5に変動電流（パルス電流又は交流電流）を供給するコイル用電源8より構成される。

[0032] 培養液容器3は、平面視円形のリング状または四角形を含む多角形のリング状の容器で、中央に円形または四角形を含む多角形の貫通孔6が穿設されており、貫通孔6の周囲に上面開放の平面視円形のリング状または四角形を含む多角形のリング状の凹部7が凹設され、その内部に培養液2を蓄えることができる構造となっている。

[0033] 図6に示す培養液容器3は、図6の貫通孔6の中心を通る縦断面で、リング状凹部7内に形成される通電断面積S2（即ち、培養液2の縦断面断面積）は全周に亘って等しく形成されている。

[0034] これに対して、図7～図9の培養液容器3は、図6に示す培養液容器3の変形例で、リング状凹部7の一部に隘路7aが形成されており、貫通孔6の中心を通る隘路7a部分の縦断面である通電断面積S1は、リング状凹部7の他の部分の通電断面積S2より小さく形成されている。なお、隘路7a部分は図8のように、隘路7a部分の底が他の部分の底より高く形成されている例であり、図9は平面視でその溝幅が他の部分より狭く形成されている例である。

[0035] 電気刺激時はこのリング状凹部7を通電路として渦電流Uが発生する。培養液容器3のリング状凹部7の内部には上記のように貫通孔6が設けられており、その貫通孔6を強磁性体よりなる磁気コア1が貫通している。磁気コア1には励磁コイル5として導体が巻設されており、この励磁コイル5には、変動電流を供給するコイル用電源8がケーブル（図示されていない）にて

接続されている。

- [0036] 磁気コア 1 は、積層ケイ素鋼板その他上記素材で形成され、ケイ素鋼板を用いた電磁鋼板 9（或いはその他上記積層材料）により構成される場合は、磁気コア 1 の磁束方向 g に対して垂直な方向（換言すれば、積層面がその磁束方向 g に対して平行な方向）に積層されることになる。
- [0037] 磁気コア 1 の形状は、培養液容器 3 の貫通孔 6 に挿通できれば足り、その形状は、例えば、棒状、コ字状（或いは馬蹄形）、閉磁路を構成する口字状（図 1 ～ 4, 10）などがある。口字状の磁気コア 1 は、上記のように貫通孔 6 を貫通するように配設する必要があるため、上下 2 分割され、コ字型の上部コア 1 a と下部コア 1 b とに分かれる。
- [0038] 磁気コア 1 の横断面形状は、図 1, 2 に示すように円形、図 10 に示すように四角形（更には、四角形を含む多角形）のものがある。
- [0039] 横断面円形の磁気コア 1 は、幅が広い電磁鋼板 9（或いはその他上記積層材料）の両側に幅を漸減させた電磁鋼板 9 を重ねて行き、横断面円形としたもので、四角形の磁気コア 1 は、コ字状又は逆コ字状の電磁鋼板 9 を重ねて行き、横断面四角としたもの（図 10（a））、或いは、角柱に電磁鋼板帯を多数層巻き付け、中央で切断して形成したもの（図 10（b））が挙げられる。
- [0040] 次に、本発明の動作原理について説明する。コイル用電源 8 よりケーブルを通して急峻に変化する励磁電流（即ち、変動電流でパルス励磁電流又は交流励磁電流が含まれる。）が励磁コイル 5 に供給されると、この励磁コイル 5 により発生した起磁力により磁気コア 1 が励磁され、その内部に変動する磁束が発生する。
- [0041] 磁気コア 1 は強磁性体であるため、その磁束密度はかなり高密度となる。例えば、閉磁路の磁気コア 1（図 1）で、ケイ素鋼板を使用すれば最大 2.0 T（テスラ）程度、鉄系アモルファス材料を使用すれば 1.5 T 程度の磁束密度を発生させることが可能である。
- [0042] 磁気コア内磁束は、励磁電流の急峻な変化と同期して急峻に変動する。こ

の磁気コア 1 は培養液容器 3 の貫通孔 6 を貫通して配設されているため、培養液容器 3 のリング状凹部 7 をこの高密度な変動磁束が貫通することとなる。その結果、電磁誘導により、この変動磁束を打ち消そうとする電界及び渦電流 I が培養液 2 内に発生し、培養液 2 内の細胞が刺激されることとなる。

[0043] 誘導電界パルスが発生させる場合の励磁コイル 5 の電流波形、コア内磁束波形、培養液 2 中に誘導される誘導電界の一例を図 12 に示す。誘導電界の大きさは、磁束の変化率に比例するため、一定の誘導電界を維持するためには、磁気コア 1 内の磁束は一定に変化させ続けることが望ましい。一定の変化を与えるためには、磁気コア 1 内の磁束密度が飽和するに従って、電流変化を大きくする必要がある。

[0044] 図 5 ～図 10 は、既に述べた培養液容器 3 の一例である。図 5 に示す円形容器 3 は全周にわたってほぼ均一な電界が発生可能な点に特徴がある。一方、図 11 に示す角型容器 3 は 4 隅の部分と 4 辺の部分でそれぞれ発生する電界及び渦電流密度が異なる点に特徴がある。材質的には、電気刺激時に培養液容器 3 に渦電流 I が流れない様にするため、培養液容器 3 はガラスのように、非磁性、非電気伝導性である必要がある。

[0045] なお、既述したように、図 1 に示す磁気コア 1 は丸い断面を持つものであり、図 4 のタイプの培養液容器 3 に適している。図 10 に示す磁気コア 1 は角型の断面を持った磁気コアであり、図 11 のタイプの培養液容器 3 に適している。

[0046] 磁気コア 1 は、いずれにしても絶縁された薄い磁性体をコア内磁束と直交する方向に積層して形成することで渦電流損の小さい磁気コア 1 を製作することができる。磁気コア 1 の材料としては、飽和磁化の大きいケイ素鋼板を使用することが適している。磁気コア 1 の形状は図 1、図 10 に示すように、ループの閉じた閉磁路とすると、磁気コア 1 内の反磁界が小さくなり、所要の磁束を磁気コア 1 内に生じるために必要な励磁電流を小さくできるため、できるだけ閉磁路とすることが望ましい。逆に閉磁路としなくても十分大

きな電流さえ流せば、細胞に有用な電気刺激が得られる。また、開磁路でも磁路長を断面積に比較して大幅に大きくすること（例えば、長い棒状コア）で反磁界を小さくすることが可能である。

[0047] 磁気コア 1 には培養液容器 3 を乗せるステージ 4 が備わっていることが望ましい。ステージ 4 も培養液容器 3 と同様、非磁性、非電気伝導性の材料で作成する必要がある。ステージ 4 には、貫通孔 6 に合致する位置に通孔 4 a が形成されている。

[0048] 磁気コア 1 を閉磁路で製作した場合は、培養液容器 3 をステージ 4 にセットできるようにするため、既述のように、磁気コア 1 を途中で分割できる構造とする必要がある（図 1、図 10）。

[0049] 図 2 に示すように分割した磁気コア 1 の上部コア 1 a を回転させて開き、培養液容器 3 の貫通孔 6 に下部コア 1 b のステージ 4 から突出している部分を挿通してセットし、再度、閉じると電気刺激を行うことができる状態となる。この場合、従来の浸漬電極と異なり、磁気コア 1 は培養液 2 に非接触であるため、従来の浸漬電極のように滅菌作業を行うことなく、培養液容器 3 の交換だけで次の電気刺激を行うことが可能であることは本装置の大きなメリットである。

[0050] 励磁コイル 5 は、一般に銅線を数回～数十回程度巻きまわして製作する。巻き数が多いとインダクタンスが高くなるため、コイル電源 8 に要求される出力電圧が高くなる。逆に巻数が少ないとコイル電源 8 には高い出力電流が要求される。コイル電源 8 としては、大容量の高速バイポーラ電源か、パルス発生に特化したパルス電源を使用することが好ましい。なお、コイル電源 8 としては、交流電源の使用も可能である。

[0051] 強い電気刺激が求められる場合には、励磁コイル 5 は磁気コア 1 の培養液容器 3 近くの位置に巻設することが好ましい。

[0052] 閉磁路の磁気コア 1 であっても、その表面からは僅かながら磁束が漏れ出しているため、励磁コイル 5 と培養液容器 3 との距離が離れると、励磁コイル 5 付近で発生した磁束の一部が培養液容器 3 を貫通する前に磁気コア 1 の

外に漏れだし、培養液容器 3 を貫通する磁束が低下してしまうためである。

[0053] 培養液容器 3 の変形例として、既述したように図 7～図 9 にリング状凹部 7 の一部を隘路 7 a とし、渦電流 U の通電路の一部の断面積を狭くした形状の培養液容器 3 を示す。

[0054] 図 8 はリング状凹部 7 の深さの一部（隘路 7 a 部分）を浅くすることにより、通電断面積 S 1 をその他の部分の通電断面積 S 2 より狭くするタイプの培養液容器であり、図 9 はリング状凹部 7 の幅の一部（隘路 7 a 部分）を狭くすることにより、同様に通電断面積 S 1 を狭くするタイプの培養液容器である。

[0055] 同様にリング状凹部の一部の深さを浅くしかつ幅を狭くしてもよい。このように通電路の一部（隘路 7 a 部分）の断面積を狭めることにより、その部分を流れる渦電流密度の高密度化、ひいては電界強度の強化を図ることができる。その結果、培養液 2 内の一部（隘路 7 a 部分）において高い電流密度（及び電界）を得ることが可能となり、培養液中の細胞の一部のみ選択して強く刺激することが可能となる。また、電氣的またサイズの制約により、通常の培養液容器では十分な電流密度が得られなかった場合、この方法を用いれば電流密度を凝縮することにより目的とする電流密度を得ることが可能となる。

実施例

[0056] 次に、本発明の詳細を実施例に基づいて説明する。なお、この実施例は当業者の理解を容易にするためのものである。すなわち、本発明は明細書の全体に記載される技術思想によってのみ限定されるものであり、本実施例によってのみ限定されるものでないことは理解されるべきことである。

[0057] （実施例 1）幅 90 mm 厚み 0.27 mm のケイ素鋼板を 100 mm × 80 mm の巻き芯に 230 回程度巻回し、磁路断面積 90 mm × 65 mm、磁路長 560 mm の巻コアを作成し、これを 2 分割して磁気コアとした。また、幅 16 mm × 深さ 18 mm リング長 400 mm のリング状凹部を持つ培養液容器をガラスにて製作した。ガラスの厚みは 2 mm、容器の大きさは、幅 1

0.8 mm×奥行13.4 mm×高さ20 mmであり、その中心にはリング状凹部の内部に6.8 mm×9.4 mmの貫通孔を設けた。また、1×11 mmの平角線を磁気コアに4回巻まわし、これを励磁コイルとした。コイル電源としてはパルス電源を用いて、励磁コイルとコイル電源を8 mm sqのケーブルで接続した。またコアのガラスエポキシの板を接着しステージとした。製作した磁気コアがこの貫通孔を貫通するようにステージ上に培養液容器を配置した。その後培養液容器に0.9%食塩水を深さ15 mmまで注いだ。その結果、図1と同様の構成が完成した。

[0058] 図1と同様の構成が完成したところで、コイル電源から600 Vのパルス電圧を発生させた。その結果1100 A程度のパルス電流が励磁コイルを通電した。パルス電流のパルス幅は100 μ s程度であった。培養液容器のリング状凹部の一部を隔壁にて隔て、渦電流が流れない状態にて隔壁の両面の電位差を測定したところ115 Vの電位差が励磁コイルのパルス電流と同時に発生していることがわかった。よって、現在の構成では115 V/400 mm=287.5 V/m程度の電界が発生できていると考えられる。

[0059] 次に、隔壁を外した状態にて、培養液内に長さ10 mm程度の三次元培養筋を投入した。この三次元培養筋は筋細胞の集合体であり、間隔50 mmの電極にて電圧40 V、パルス幅1 msの電圧を加えることにより収縮を行うことで知られている。この状態で先程と同様600 Vのパルス電圧を発生させたところ、1100 A程度のパルス電流が励磁コイルを通電した。パルス電流のパルス幅は100 μ s程度であった。この条件では、三次元培養筋の収縮は観測できなかった。

[0060] 次に、培養液容器の底面に、厚み0.5 mmの15 mm×15 mmのガラスエポキシの板を何枚か積み重ね、培養液中の通電路の一部（長さ15 mm）の断面積を6分の1にまで狭めた。この状態で先程と同様600 Vのパルス電圧を発生させたところ、1100 A程度のパルス電流が励磁コイルを通電した。パルス電流のパルス幅は100 μ s程度であった。この条件では、電気刺激により三次元培養筋の収縮がパルス電圧の発生と同期して収縮する

様子が観測できた。このことは、電極を用いずに、三次元培養筋の収縮を誘発で

きる程度に大きな電流密度を三次元培養筋の周囲に発生させることができていることを示している。

産業上の利用可能性

[0061] i P S細胞、E S細胞等の多能性幹細胞の研究をはじめ、各種細胞制御の研究及び細胞を用いた製品の製造において、本発明による機器は非常に重要な機器となりうると考える。

符号の説明

[0062] A : 電気刺激装置、S 1 ・ S 2 : 通電断面積、U : 渦電流、g : 磁束方向、1 : 磁気コア、1 a : 上部コア、1 b : 下部コア、2 : 培養液、3 : 培養液容器、4 : ステージ、4 a : 通孔、5 : 励磁コイル、6 : 貫通孔、7 : リング状凹部、7 a : 隘路、8 : コイル用電源、9 : 電磁鋼板

請求の範囲

- [請求項1] 培養液を収納するためのリング状凹部と該リング状凹部の内側に貫通孔を備えた培養液容器と、
- 強磁性体を材料とし、該培養液容器の貫通孔を貫通するように配置された磁気コアと、
- 該磁気コアに巻設された励磁コイルと、
- 該励磁コイルに変動電流を供給するコイル用電源とで構成されていることを特徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項2] 上記磁気コアが閉磁路を構成することを特徴とする請求項1に記載の培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項3] 上記培養液容器のリング状凹部の一部が隘路となっており、培養液中に誘導される渦電流の通電路となる該隘路部分の通電断面積が、リング状凹部の隘路以外の部分の通電断面積に比較して小に形成されていることを特徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項4] 上記磁気コアが、該磁気コアに発生する磁束の方向に対して垂直な方向に積層された電磁鋼板により構成されていることを特徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項5] 請求項1に記載の非接触電気刺激装置による培養対象細胞の電気刺激方法であって、
- 培養液容器に形成されたリング状凹部に培養対象の細胞を含む培養液を収納し、
- 培養液容器の該リング状凹部の内側に形成された貫通孔に、強磁性体を材料とした磁気コアを貫通するように配置し、
- 該磁気コアに巻設された励磁コイルに通電することで磁気コア内に磁束を発生させ、この磁束により培養液容器に蓄えられた培養液中に変動する渦電流及び電界を誘導し、この渦電流及び電界を以って前記リング状凹部内の培養液に含まれている培養対象細胞に電気刺激を与えることを特徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激方法。

補正された請求の範囲
[2017年8月30日(30.08.2017)国際事務局受理]

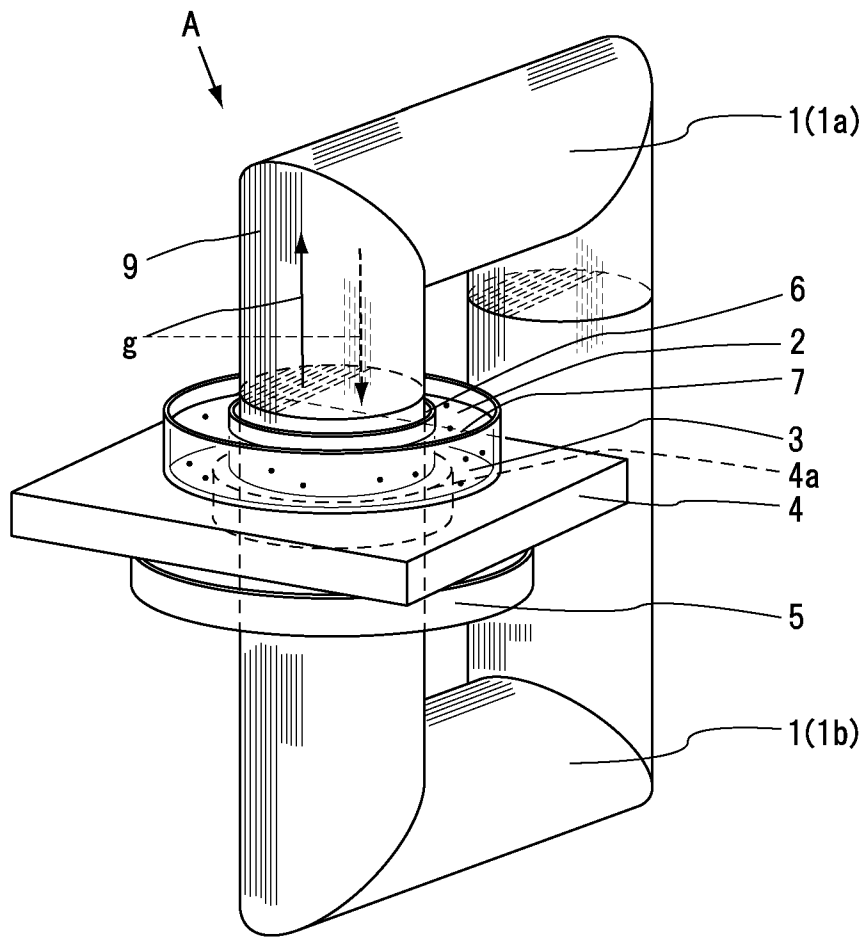
- [請求項 1] 培養液を収納するためのリング状凹部と該リング状凹部の内側に貫通孔を備えた培養液容器と、
- 強磁性体を材料とし、該培養液容器の貫通孔を貫通するように配置された磁気コアと、
- 該磁気コアに巻設された励磁コイルと、
- 該励磁コイルに変動電流を供給するコイル用電源とで構成されていることを特徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項 2] 上記磁気コアが閉磁路を構成することを特徴とする請求項 1 に記載の培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項 3] (補正後) 上記培養液容器のリング状凹部の一部が隘路となっており、培養液中に誘導される渦電流の通電路となる該隘路部分の通電断面積が、リング状凹部の隘路以外の部分の通電断面積に比較して小に形成されていることを特徴とする請求項 1 に記載の培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項 4] (補正後) 上記磁気コアが、該磁気コアに発生する磁束の方向に対して垂直な方向に積層された電磁鋼板により構成されていることを特徴とする請求項 1 に記載の培養液中の細胞の非接触電気刺激装置。
- [請求項 5] 請求項 1 に記載の非接触電気刺激装置による培養対象細胞の電気刺激方法であって、
- 培養液容器に形成されたリング状凹部に培養対象の細胞を含む培養液を収納し、
- 培養液容器の該リング状凹部の内側に形成された貫通孔に、強磁性体を材料とした磁気コアを貫通するように配置し、
- 該磁気コアに巻設された励磁コイルに通電することで磁気コア内に磁束を発生させ、この磁束により培養液容器に蓄えられた培養液中に変動する渦電流及び電界を誘導し、この渦電流及び電界を以って前記リング状凹部内の培養液に含まれている培養対象細胞に電気刺激を与えることを特

徴とする培養液中の細胞の非接触電気刺激方法。

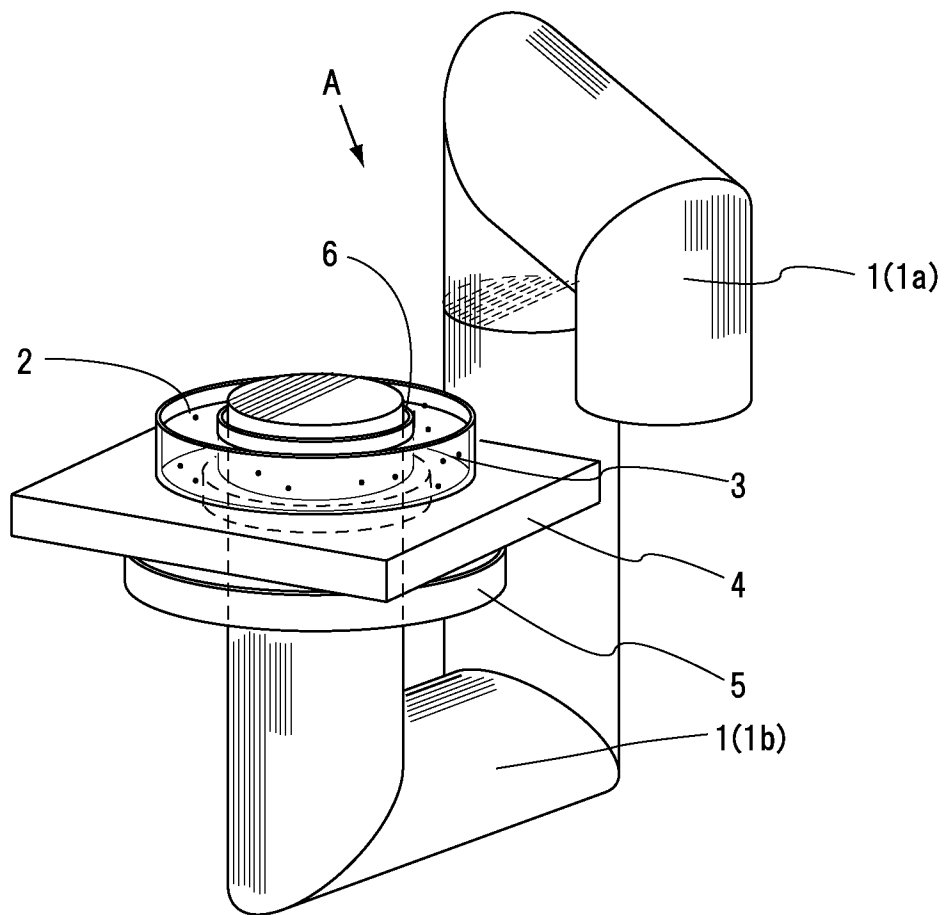
条約第 19 条（1）に基づく説明書

請求項 3 及び請求項 4 において「請求項 1 に記載の」なる文言を追加した補正は、単に誤記を訂正したものである。

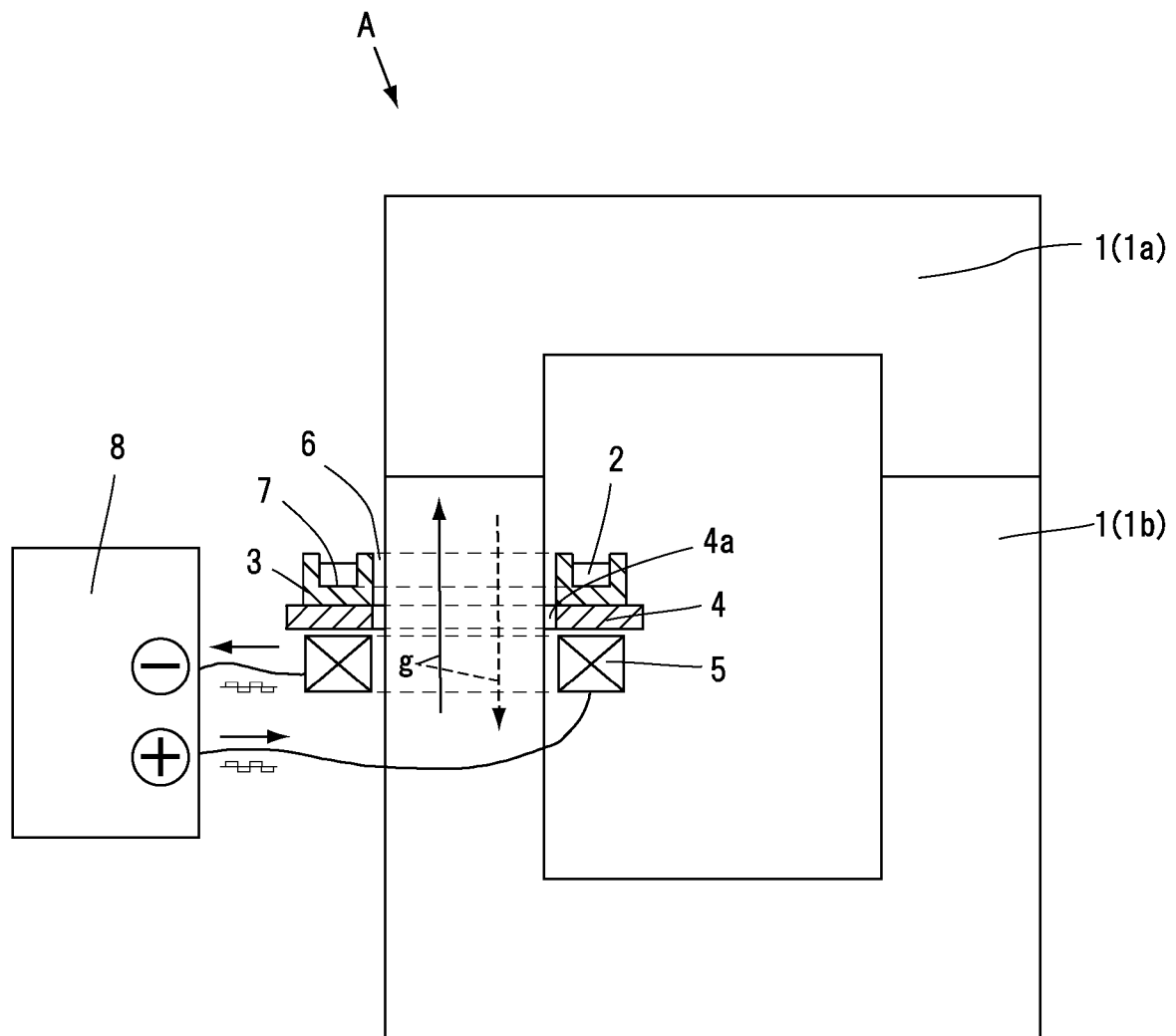
[図1]



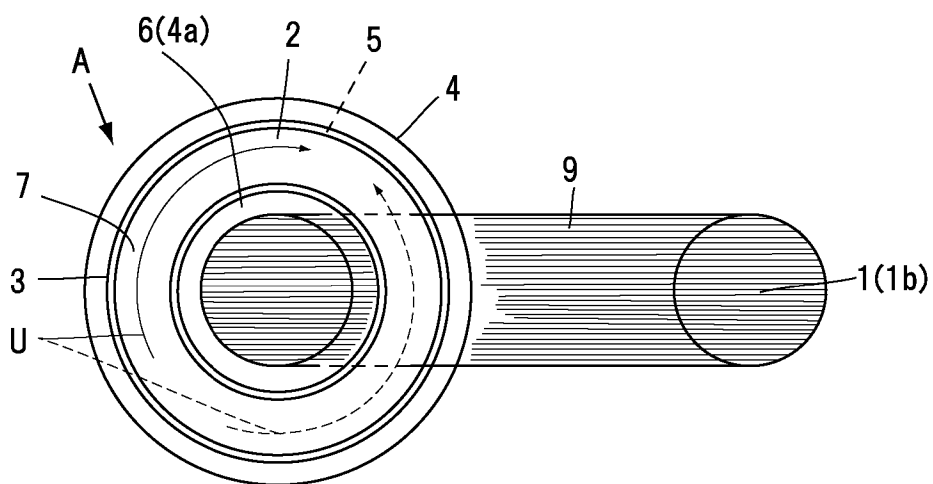
[図2]



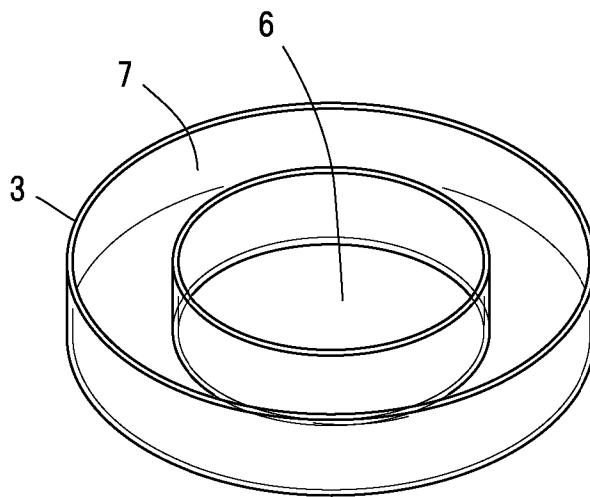
[図3]



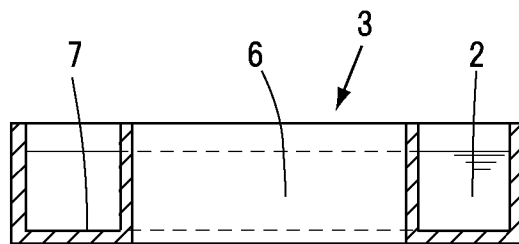
[図4]



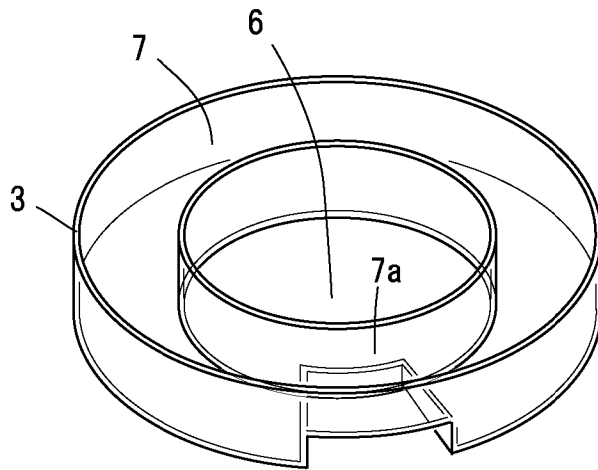
[図5]



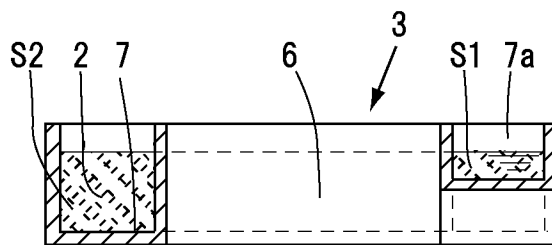
[図6]



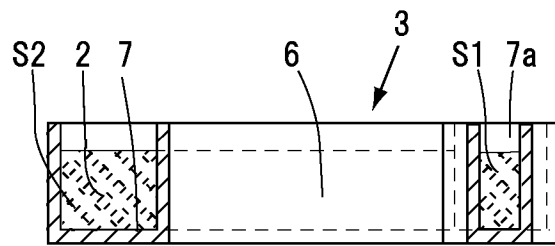
[図7]



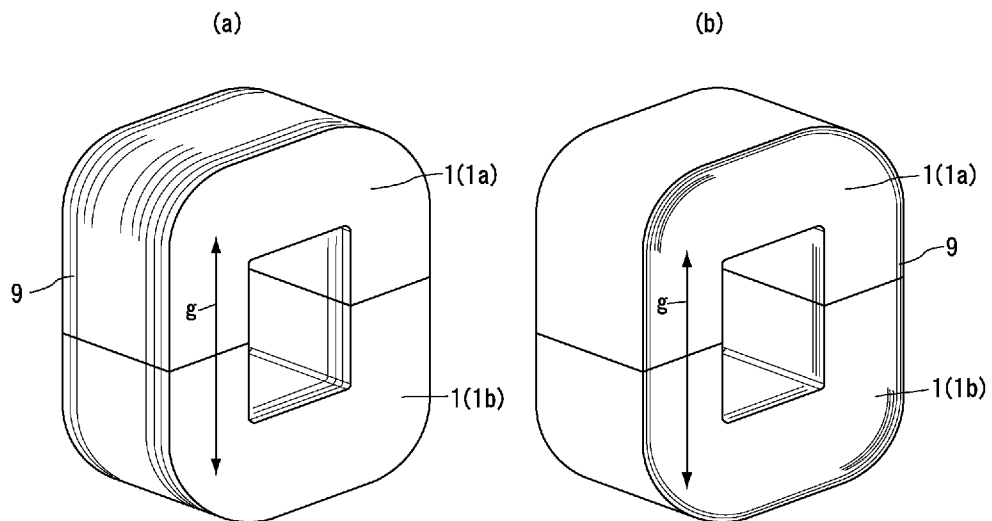
[図8]



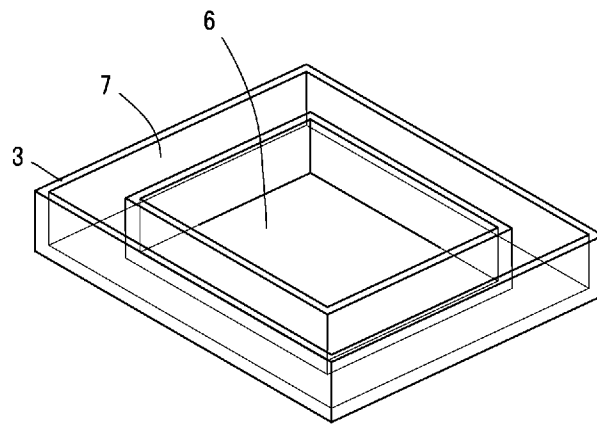
[図9]



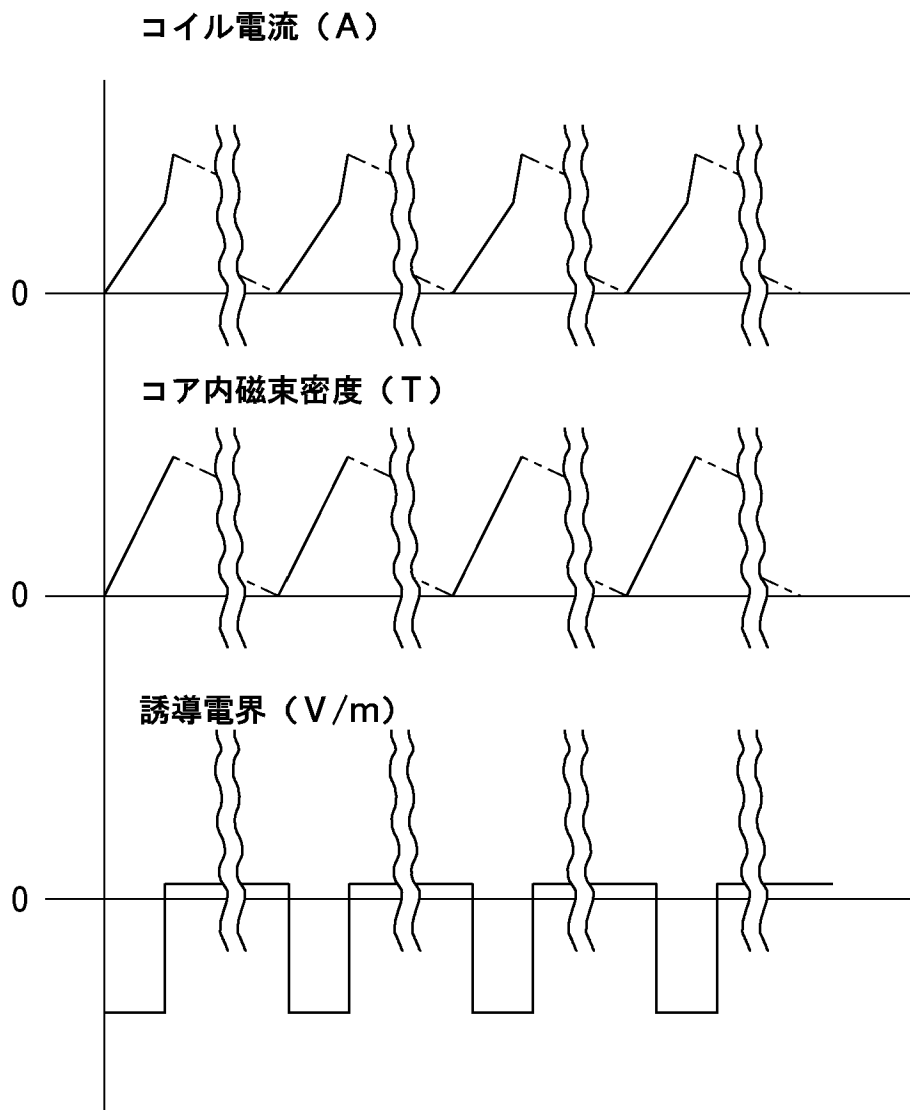
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/42(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/42, C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-161323 A (Tohoku University), 08 September 2014 (08.09.2014), claim 1; paragraphs [0002], [0020]; example 1; fig. 1, 2 (Family: none)	1-5
A	JP 2004-290180 A (Japan Science and Technology Agency), 21 October 2004 (21.10.2004), claims 1 to 3; fig. 1, 2; paragraphs [0003], [0008], [0023], [0029] & WO 2005/071057 A1	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 August 2017 (03.08.17)

Date of mailing of the international search report
15 August 2017 (15.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018850

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-274940 A (Zaidan Hojin Kumamoto Techno Sangyo Zaidan), 30 September 2003 (30.09.2003), claim 5; paragraph [0034] (Family: none)	1-5
A	JP 2004-305120 A (Zaidan Hojin Kumamoto Techno Sangyo Zaidan), 04 November 2004 (04.11.2004), claim 1; paragraphs [0031] to [0032] (Family: none)	1-5
A	JP 2005-350396 A (Japan Science and Technology Agency), 22 December 2005 (22.12.2005), claims 1, 8; paragraph [0022]; fig. 1 & WO 2006/008887 A1	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018850

Object to be covered by this search:

Claims 3 and 4 are set forth as independent claims.

However, in these claims, the "liquid culture medium vessel" or the "magnetic core" recited in claim 1 is specified and there is found a wording "the liquid culture medium vessel" or "the magnetic core". Such being the case, the search was carried out under the understanding that the inventions described in claims 3 and 4 refer to claim 1.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/42(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12M1/42, C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
A	JP 2014-161323 A (国立大学法人東北大学) 2014.09.08, 請求項1、[0002]、[0020]、実施例1、図1、図2 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2004-290180 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2004.10.21, 請求項1~3、図1、図2、[0003]、[0008]、[0023]、[0029] & WO 2005/071057 A1	1-5

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矛盾するものではなく、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

03.08.2017

国際調査報告の発送日

15.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 知美

4 B

3335

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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
A	JP 2003-274940 A (財団法人くまもとテクノ産業財団) 2003. 09. 30, 請求項 5、[0034] (ファミリーなし)	1 – 5
A	JP 2004-305120 A (財団法人くまもとテクノ産業財団) 2004. 11. 04, 請求項 1、[0031]-[0032] (ファミリーなし)	1 – 5
A	JP 2005-350396 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2005. 12. 22, 請求項 1、8、[0022]、図 1 & WO 2006/008887 A1	1 – 5

＜調査の対象について＞

請求項3及び4は独立請求項として記載されている。しかしながら、当該請求項中には、請求項1中に記載の「培養液容器」又は「磁気コア」についての特定があり、かつ、「上記培養液容器」又は「上記磁気コア」なる記載があることから、請求項3及び4に係る発明は、請求項1を引用しているものとして、調査を行った。