(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
2024年3月7日(07.03.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/048716 A1

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

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/031800

(22) 国際出願日： 2023年8月31日(31.08.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

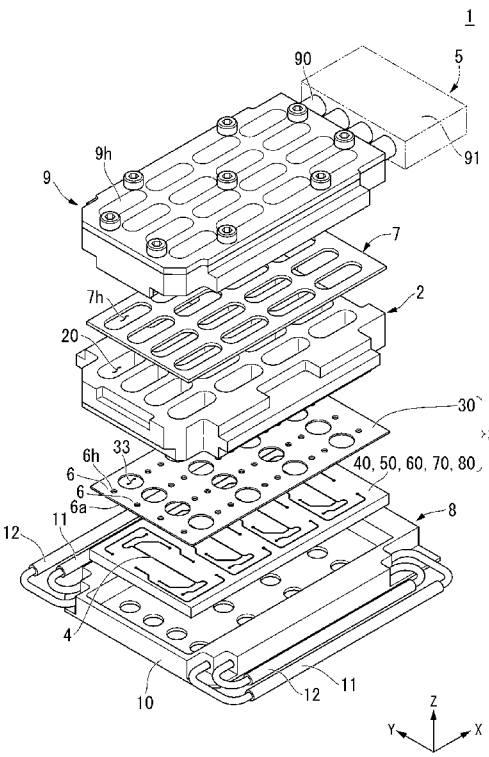
(30) 優先権データ：
特願 2022-138716 2022年8月31日(31.08.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関１丁目３番１号 Tokyo (JP). 東京応化工業株式会社(**TOKYO OHKA KOGYO CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒2110012 神奈川県川崎市中原区中丸子１５０番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 杉浦 慎治(**SUGIURA Shinji**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 金森 敏幸(**KANAMORI Toshiyuki**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 進 和美(**SHIN Kazumi**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 吉岡 孝広(**YOSHIOKA Takahiro**); 〒2110012 神奈川県川崎市中原区中丸子１５０番地 東京応化工業株式会社内 Kanagawa (JP). 藤本 隆史(**FUJIMOTO Takashi**); 〒2110012 神奈川県川崎市中原区中丸子１５０番地 東京応化工業株式会社内 Kanagawa (JP). 藤井 恭(**FUJII Yasushi**);

(54) **Title:** CELL CULTURE DEVICE AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称： 細胞培養装置及びその製造方法



(57) **Abstract:** The cell culture device comprises: a storage section having a first space and a second space capable of storing a liquid medium; a flow-path-forming section having a first flow path and a second flow path that allow the first space and the second space to communicate with each other; a cell culture section provided in at least part of the first space, the second space, the first flow path, and the second flow path; a circulation flow control section for controlling circulation flow of a culture broth from the first space or the second space through the first flow path or the second flow path and returning to the first space or the second space; and a gas inflow prevention section, which is a planar structure having at least one through hole, for preventing inflow of gas in the circulation flow.

(57) 要約：細胞培養装置は、液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、第１空間、第２空間、第１流路及び第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、第１空間又は第２空間から第１流路又は第２流路を経て第１空間又は第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、少なくとも１つの貫通孔を有し且つ面状の構造体であって循環流れにおける気体の流入を防止するための気体流入防止部と、を備える。

WO 2024/048716 A1

［続葉有］

〒2110012 神奈川県川崎市中原区中丸子１５０番地 東京応化工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人：西澤 和純，外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.)；〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２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, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, SC, 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)）

明　細　書

発明の名称 ： 細胞培養装置及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養装置及びその製造方法に関する。

本願は、２０２２年８月３１日に、日本に出願された特願２０２２－１３８７１６号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 例えば、特許文献１－４及び非特許文献１には、空圧駆動による培養液の循環を実現するために、界面張力によって空気の流入を防止可能なラプラスバルブを備えた細胞培養装置が開示されている。例えば、ラプラスバルブは、深さ０．１ｍｍ以下の浅い流路で形成される。例えば、ラプラスバルブは、フォトリソグラフィーやレプリカモールディングによって作製される。一方、産業化に向けて、ラプラスバルブを射出成型や熱融着等の接合技術によって作製する事例がある。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第２０１６／１５８２３３号

特許文献2：国際公開第２０１７／１５４８８０号

特許文献3：国際公開第２０１７／１５４８９９号

特許文献4：国際公開第２０１９／０５４２８８号

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Satoh, T, et al.: A multi-throughput multi-organ-on-a-chip system on a plate formatted pneumatic pressure-driven medium circulation platform. Lab Chip, 18, 115-125 (2018).

非特許文献2：Kurihara, K, et al.: Low-deformation precision thermal bonding of nanostructured microfluidic chips. Japanese Journal of Applied Physics, 59, SIIJ08 (2020).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、ラプラスバルブを射出成型で作製する場合は、細い流路の作成が困難である。ラプラスバルブを熱融着で作製する場合は、平板との接合時に流路が潰れてしまう可能性が高い。そのため、ラプラスバルブを射出成型や熱融着等の接合技術によって寸法精度良く作製することは困難であり、大量生産が難しい。

[0006] そこで本発明は、気体の流入を防止するための構造体を寸法精度良く作製することができ、産業化に好適な構造を実現することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] （１）本発明の一態様に係る細胞培養装置は、液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、前記第１空間及び前記第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、前記第１空間、前記第２空間、前記第１流路及び前記第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、を備え、前記流路形成部は、前記第１流路及び前記第２流路が形成された少なくとも１つの流路形成体と、少なくとも１つの貫通孔が形成され前記循環流れにおける気体の流入を防止する領域である気体流入防止部が１以上設けられたフィルタ部と、を有する。

[0008] （２）上記（１）に記載の細胞培養装置では、前記気体流入防止部は、前記第１流路の端部又は前記第２流路の端部に設けられてもよい。

[0009] （３）上記（１）又は（２）に記載の細胞培養装置では、前記貯留部、前記少なくとも１つの流路形成体及び前記気体流入防止部は、それぞれ層状に形成されており、前記少なくとも１つの流路形成体、前記フィルタ部、前記貯留部の順に積層されていてもよい。

[0010] （４）上記（１）から（３）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記貫通孔の直径は、０．００５ｍｍ以上０．２ｍｍ以下であってもよい。

[0011] （５）上記（１）から（４）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記貯留部は、空気を供給可能な空圧ポンプに接続されていてもよい。

[0012] （６）上記（１）から（５）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記フィルタ部の少なくとも一部は、感光性のフォトレジストによって構成されており、前記少なくとも１つの貫通孔は、前記フォトレジストに形成されていてもよい。

[0013] （７）上記（１）から（６）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記気体流入防止部の少なくとも一部は、ポリイミド、ポリカーボネート又はポリエステル製のトラックエッチ膜で構成されていてもよい。

[0014] （８）上記（１）から（７）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記気体流入防止部の少なくとも一部は、ハニカムフィルムで構成されていてもよい。

[0015] （９）上記（１）から（８）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記細胞培養部は、前記第２流路及び／又は前記第２流路に設けられていても良い。

（１０）上記（１）から（９）の何れか一つに記載の細胞培養装置では、前記流路形成部は、細胞を培養するための第１面と前記第１面とは反対の第２面とを有する多孔質膜層を更に有しており、前記少なくとも１つの流路形成体は、前記多孔質膜層の前記第１面の側に配置される第１流路層及び第２流路層と、前記多孔質膜層の前記第２面の側に配置される第３流路層及び第４流路層と、を含み、前記第１流路層及び前記第２流路層は、前記多孔質膜層の前記第１面の側において、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る前記培養液の循環流れを形成する流路を含み、前記第３流路層及び前記第４流路層は、前記多孔質膜層の前記第２面の側において、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る前記培養液の循環流れを形成する流路を含んでいてもよい。

[0016] （１１）本発明の一態様に係る細胞培養装置の製造方法は、液体培地を貯留

可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、前記第１空間及び前記第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、前記第１空間、前記第２空間、前記第１流路及び前記第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、を備える細胞培養装置の製造方法であって、前記貯留部を層状に形成し、前記第１流路及び前記第２流路が形成された少なくとも１つの流路形成体と、少なくとも１つの貫通孔が形成され前記循環流れにおける気体の流入を防止する領域である気体流入防止部が１以上設けられたフィルタ部とを有する前記流路形成部を、前記少なくとも１つの流路形成体と前記フィルタ部とがそれぞれ層状となるように形成し、前記少なくとも１つの流路形成体、前記フィルタ部、前記貯留部をこの順に積層して接合する。

発明の効果

[0017] 本態様の細胞培養装置及びその製造方法によれば、気体の流入を防止するための構造体である気体流入防止部を寸法精度良く作製することができ、産業化に好適な構造を実現することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]実施形態の細胞培養装置の分解斜視図。

[図2]実施形態の細胞培養部の模式図。

[図3]実施形態のチャンバ層の平面図。

[図4]図３のＩＶ－ＩＶ断面を含む斜視図。

[図5]図４の一部をＹ方向から見た図。

[図6]実施形態の流路プレートの平面図。

[図7]実施形態の流路プレートの構成の説明図。図７（Ａ）はフィルタ層の平面図、図７（Ｂ）は第１流路層の平面図、図７（Ｃ）は第２流路層の平面図、図７（Ｄ）は多孔質膜層の平面図、図７（Ｅ）は第３流路層の平面図、図７（Ｆ）は第４流路層の平面図。

[図8]実施形態のフィルタ層の構成の説明図。図８（Ａ）はフィルタ層の一部を拡大した第１の図、図８（Ｂ）はフィルタ層の一部を拡大した第２の図。

[図9]実施形態の気体流入防止部の一例を示す第１の図。

[図10]実施形態の気体流入防止部の一例を示す第２の図。

[図11]トラックエッチ膜の一例を示す平面図。

[図12]ハニカムフィルムの一例を示す斜視図。

[図13]フィルタ層の一例を示す第１の図。

[図14]フィルタ層の一例を示す第２の図。

[図15]フィルタ層の一例を示す第３の図。

[図16]比較例の細胞培養装置の流量測定結果を示すグラフ。

[図17]実施例の細胞培養装置の流量測定結果を示すグラフ。

[図18]ＰＤ－ＭＰＳの細胞の蛍光画像。

[図19]６ウェルプレートの細胞の蛍光画像。

[図20]ＰＤ－ＭＰＳの細胞の配向の分析結果を示すグラフ。

[図21]６ウェルプレートの細胞の配向の分析結果を示すグラフ。

[図22]遺伝子発現解析の結果を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0019] 以下に、本発明の実施形態について各図を基に説明を行う。各図には、必要に応じてＸＹＺ座標系を示している。本明細書においては、必要に応じてＸＹＺ座標系に沿って各方向を定めて説明する。本実施形態において、Ｘ方向は第１方向の一例であり、水平面に沿う方向である。Ｙ方向は、水平面において第１方向と直交する第２方向の一例である。Ｚ方向は、第１方向及び第２方向のそれぞれと直交する第３方向の一例であり、鉛直方向に沿う方向である。＋Ｚ方向は、鉛直方向の上側に相当する。以下の説明で用いる図面は、本発明の特徴をわかりやすくするために、特徴となる部分を拡大して示している場合がある。以下の説明で用いる図面では、各構成要素の寸法比率などが実際と同じであるとは限らない。

[0020] ＜細胞培養装置＞

図１は、実施形態の細胞培養装置１の分解斜視図である。図２は、実施形態の細胞培養部４の模式図である。

細胞培養装置１は、チャンバ層２（貯留部の一例）、流路プレート３（流路形成部の一例）、加圧調整装置５（循環流れ制御部の一例）、ラバーシート７、ホルダ８及び蓋９を備える。流路プレート３は、細胞培養部４を有する流路層４０，５０，７０，８０（少なくとも１つの流路形成体の一例）及びフィルタ層３０（フィルタ部の一例）を有している。細胞培養装置１は、ホルダ８上に、流路プレート３、チャンバ層２、ラバーシート７及び蓋９がこの順に積み重ねられることで構成されている。

[0021] ＜ホルダ＞

ホルダ８は、流路プレート３、チャンバ層２、ラバーシート７及び蓋９を固定する。図の例では、ホルダ８は、流路プレート３等を収納可能な箱状の収納部材１０と、収納部材１０に向けて蓋９等を押さえつけるための第１留め具１１（押圧部材の一例）と、収納部材１０に向けてチャンバ層２等を押さえつけるための第２留め具１２（押圧部材の一例）と、を備える。第１留め具１１及び第２留め具１２は、収納部材１０に対してＸ方向に沿う軸回りに回動自在に取付けられている。図の例では、一対の第１留め具１１および一対の第２留め具１２が設けられている。なお、ホルダ８の構成態様及び留め具の設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

実施形態の細胞培養装置１のホルダ８はアルミニウムの切削加工によって作製することができる。

[0022] ＜チャンバ層＞

図３は、実施形態のチャンバ層２の平面図である。図４は、図３のＩＶ－ＩＶ断面を含む斜視図である。図５は、図４の一部をＹ方向から見た図である。

チャンバ層２は、液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部として機能する。チャンバ層２は、培養液（液体）を貯留可能な貯留空間２０を有する。貯留空間２０は、平面視で（＋Ｚ方向側から見て）、長円

形状の外形を有する。図の例では、チャンバ層２は、複数の培養液チャンバ２０Ａ１－２０Ａ４，２０Ｂ１－２０Ｂ４，２０Ｃ１－２０Ｃ４，２０Ｄ１－２０Ｄ４を有する。培養液チャンバは、平面視で第１方向（Ｘ方向）に長手を有し且つ第２方向（Ｙ方向）に短手を有する。

実施形態のチャンバ層２はポリカーボネートの切削加工によって作製することができる。

[0023] 複数の培養液チャンバは、４行４列の１６個設けられている。ここで、４行４列において行方向（第１方向の一例）は、平面視で培養液チャンバの長手に沿う方向である。一方、列方向（第２方向の一例）は、平面視で培養液チャンバの短手（平面視で培養液チャンバの長手と直交する方向）に沿う方向である。なお、培養液チャンバの平面視形状および設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0024] 各列において４つの培養液チャンバが流路プレート３内のマイクロ流路で接続されることで、１つの培養ユニットを構成している。実施形態の細胞培養装置１は、Ｘ方向に並ぶ４つの培養ユニット１０１，１０２，１０３，１０４により構成されている。以下、Ｘ方向に並ぶ４つの培養ユニット１０１，１０２，１０３，１０４を－Ｘ側から順に「第１培養ユニット１０１」、「第２培養ユニット１０２」、「第３培養ユニット１０３」、「第４培養ユニット１０４」ともいう。以下、１つの培養ユニットを構成しＹ方向に並ぶ４つの培養液チャンバ２０Ａ１（２０Ａ２－２０Ａ４），２０Ｂ１（２０Ｂ２－２０Ｂ４），２０Ｃ１（２０Ｃ２－２０Ｃ４），２０Ｄ１（２０Ｄ２－２０Ｄ４）を＋Ｙ側から順に「第１チャンバ２Ａ」、「第２チャンバ２Ｂ」、「第３チャンバ２Ｃ」、「第４チャンバ２Ｄ」ともいう。なお、培養ユニットの構成態様及び設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0025] 培養液チャンバは、液体培地（液体）を貯留可能な貯留空間２０と、貯留空間２０に連通する第１連絡路２１及び第２連絡路２２と、第１連絡路２１と第２連絡路２２との間に位置する窓孔２３（以下「チャンバ窓孔２３」と

もいう。）と、を有する。培養液チャンバは、貯留空間２０の－Ｚ側に位置する底部２５と、底部２５から＋Ｚ方向に向かって隆起する隆起部２６と、を備える。隆起部２６は、貯留空間２０の＋Ｘ側に設けられている。

[0026] 隆起部２６の上面は、底部２５の上面よりも高い位置にある。隆起部２６の上面は、－Ｘ側に向かうに従って－Ｚ側に位置するように徐々に傾斜している。第１連絡路２１は、培養液チャンバの底部２５をＺ方向に貫通している。第２連絡路２２は、隆起部２６をＺ方向に貫通している。第２連絡路２２の上端は、第１連絡路２１の上端よりも高い位置にある。チャンバ窓孔２３は、底部２５のＸ方向中央側をＺ方向に貫通している。チャンバ窓孔２３は、平面視で第１連絡路２１よりも大きい円形である。

[0027] 図の例では、第１チャンバ２Ａ、第２チャンバ２Ｂ、第３チャンバ２Ｃ及び第４チャンバ２Ｄのそれぞれは、チャンバ窓孔２３の－Ｘ側の部位に培養液入口（図中ｉｎ）を有し、チャンバ窓孔２３の＋Ｘ側の部位に培養液出口（図中ｏｕｔ）を有する。図の例では、第１連絡路２１の上端が培養液入口（図中ｉｎ）に相当し、第２連絡路２２の上端が培養液出口（図中ｏｕｔ）に相当する。

[0028] ＜流路プレート＞

図６は、実施形態の流路プレート３の平面図である。図７は、実施形態の流路プレート３の構成の説明図である。図７（Ａ）はフィルタ層３０の平面図、図７（Ｂ）は第１流路層４０の平面図、図７（Ｃ）は第２流路層５０の平面図、図７（Ｄ）は多孔質膜層６０の平面図、図７（Ｅ）は第３流路層７０の平面図、図７（Ｆ）は第４流路層８０の平面図をそれぞれ示す。

流路プレート３は、第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部として機能する。流路プレート３は、フィルタ層３０と、多孔質膜層６０と、複数の流路層４０，５０，７０，８０と、によって構成されている。

実施形態の流路プレート３は、フィルタ層３０と、多孔質膜層６０と、複数の流路層４０，５０，７０，８０とを積層して接着剤等で接合することで

作製することができる。

[0029] ＜フィルタ層＞

図８は、実施形態のフィルタ層３０の構成の説明図である。図８（Ａ）はフィルタ層３０の一部を拡大した第１の図、図８（Ｂ）はフィルタ層３０の一部を拡大した第２の図をそれぞれ示す。図８（Ａ）はフィルタ層３０において第１チャンバ２Ａ又は第２チャンバ２Ｂと平面視で重なる部分、図８（Ｂ）はフィルタ層３０において第３チャンバ２Ｃ又は第４チャンバ２Ｄと平面視で重なる部分に相当する。図９は、実施形態の気体流入防止部６の一例を示す第１の図である。図１０は、実施形態の気体流入防止部６の一例を示す第２の図である。

[0030] 以下、フィルタ層３０において第１チャンバ２Ａと平面視で重なる部分を「第１フィルタ３０Ａ」、第２チャンバ２Ｂと平面視で重なる部分を「第２フィルタ３０Ｂ」、第３チャンバ２Ｃと平面視で重なる部分を「第３フィルタ３０Ｃ」、第４チャンバ２Ｄと平面視で重なる部分を「第４フィルタ３０Ｄ」ともいう。１つの培養ユニットにおいては、平面視で＋Ｙ側から第１フィルタ３０Ａ、第２フィルタ３０Ｂ、第３フィルタ３０Ｃ、第４フィルタ３０Ｄの順にＹ方向に連なって並んでいる。

[0031] フィルタ層３０は、面状の構造体６ａ（以下、面状構造体、とも言う）によって構成され、面状構造体６ａにおいて少なくとも１つの貫通孔６ｈが形成された領域であり気体の流入を防止する気体流入防止部６を備える。本明細書においては気体流入防止部６自体及びフィルタ部（フィルタ層等）も「構造体」として扱う。気体流入防止部６は面状構造体６ａの面方向の１箇所あるいは複数箇所に設けられる。フィルタ層３０は、フィルタ層３０の面方向の１又は複数箇所に気体流入防止部６が設けられた構成を採用できる。

図９、図１０は、面状構造体６ａの面方向の１部に複数の貫通孔６ｈが集合形成された領域である気体流入防止部６を有するフィルタ層３０の例を示す。また、図９、図１０は、面状構造体６ａの面方向の１部に３以上の貫通孔６ｈが集合形成された領域である気体流入防止部６の例を示す。３以上の

貫通孔６ｈが集合形成された領域である気体流入防止部６は気体流入防止部６の最外周を構成する３以上の貫通孔６ｈを含む。

図９、図１０の例では、フィルタ層３０は、複数の貫通孔３１ｈ（貫通孔６ｈ）を有する第１気体流入防止部３１（気体流入防止部６、図９参照）と、複数の貫通孔３２ｈ（貫通孔６ｈ）を有する第２気体流入防止部３２（気体流入防止部６。図１０参照）と、を備える。第１気体流入防止部３１が有する貫通孔３１ｈの数は、第２気体流入防止部３２が有する貫通孔３２ｈの数よりも多い。各気体流入防止部３１，３２が有する貫通孔３１ｈ，３２ｈは、平面視で円形である。なお、フィルタ層３０の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0032] 例えば、気体流入防止部６の貫通孔６ｈ（各気体流入防止部３１，３２が有する貫通孔３１ｈ，３２ｈ）の直径は、０．００５ｍｍ以上０．２ｍｍ以下である。図の例では、第１気体流入防止部３１は、図８（Ａ）、（Ｂ）に示すように第１チャンバ２Ａ及び第２チャンバ２Ｂのｉｎと平面視で重なる第１フィルタ３０Ａ及び第２フィルタ３０Ｂのｉｎに対応する位置、並びに、第３チャンバ２Ｃ及び第４チャンバ２Ｄのｏｕｔと平面視で重なる第３フィルタ３０Ｃ及び第４フィルタ３０Ｄのｏｕｔに対応する位置に形成されている。

図示例の実施形態の第１気体流入防止部３１は、図９に示すように、直径４０μｍかつ長さ５０μｍ（フィルタ膜厚に相当）の９１個の貫通孔３１ｈを有している。図９に例示した第１気体流入防止部３１の３以上（図９では９１個）の貫通孔３１ｈのうち第１気体流入防止部３１の最外周に位置する３０個は平面視で正六角形状を成す線分上に位置する。第１気体流入防止部３１は面状構造体６ａの面方向において最外周を構成する貫通孔３１ｈの配列の外側を最外周を構成する貫通孔３１ｈの配列に沿って取り囲む平面視で正六角形状の外周形状を有する領域である。

[数1]

$$P_{\mathrm{B}} = \frac{4\gamma}{D_{\mathrm{P}}} \qquad (1)$$

気体流入防止部６の貫通孔の直径は、気体流入防止部の耐圧、液体培地の表面張力を考慮して設計することができる。式（１）において、P_Bは予想される気体流入防止部６の耐圧［Ｐａ］、 γは液体培地培地と空気との間の表面張力[Ｎ／ｍ]、D_Pは気体流入防止部６の貫通孔６ｈの直径[ｍ]である。例えば、液体培地の表面張力が５０ｍＮ／ｍの場合において、耐圧を１ｋＰａとなるようにするためには気体流入防止部の直径を０．２ｍｍと設計することができる。

気体流入防止部６は単一の貫通孔６ｈにおいて気体の流入を防止する機能を発揮しうるが、液体培地が透過する際のほこりなどの目詰まりを回避するためには複数の貫通孔６ｈを有する形態が好ましい。また、気体流入防止部６が複数の貫通孔６ｈを有する場合において、気体流入防止部６の複数の貫通孔６ｈの直径や長さが均一であれば、耐圧や液体培地の流量の推算が容易になる。一方、「液体培地を透過せしめつつ、気体の流入を防止する」という気体流入防止部６の機能を発現するためには、複数の貫通孔６ｈの直径や長さは必ずしも均一である必要はない。なお、気体流入防止部６が直径の異なる複数の貫通孔６ｈで構成されている場合は、気体流入防止部６耐圧性は複数の貫通孔のうち、最も大きな直径を有する貫通孔６ｈによって決定される。

[0033] 図示例の実施形態の第２気体流入防止部３２は、図８（Ａ）、（Ｂ）に示すように第１チャンバ２Ａ及び第２チャンバ２Ｂのｏｕｔと平面視で重なる第１フィルタ３０Ａ及び第２フィルタ３０Ｂのｏｕｔに対応する位置に形成されている。図１０に例示した第２気体流入防止部３２は、直径４０μｍかつ長さ５０μｍ（フィルタ膜厚に相当）の１６個の貫通孔３２ｈを有している。また、図１０に例示した第２気体流入防止部３２は、最外周に位置する１２個の貫通孔３２ｈによって平面視概ね矩形状に配置されている。第２気

体流入防止部３２は面状構造体６ａの面方向において最外周を構成する貫通孔３２ｈの配列の外側を最外周を構成する貫通孔３２ｈの配列に沿って取り囲む平面視矩形状の外周形状を有する領域である。

各気体流入防止部３１，３２が有する複数の貫通孔３１ｈ，３２ｈにおいて、互いに隣り合う２つの貫通孔の間隔は、それぞれ同じ大きさに設定されている。なお、貫通孔のサイズ及び設置数、並びに、複数の貫通孔の外形の平面視形状等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。例えば、フィルタ層３０を培養液が透過する際の抵抗を小さくしたい場合には、貫通孔３１ｈや貫通孔３２ｈの孔径を大きくしたり数を増やしたり、長さを減らしたりすることで、抵抗を小さくすることが可能である。

なお、貫通孔３１ｈや貫通孔３２ｈの孔径を大きくする際には式（１）によって推算される気体流入防止部の耐圧性に留意する必要があり、長さ（フィルタ膜厚）を小さくする際にはフィルタ層の物理的な強度に留意する必要がある。

[0034] 図の例では、フィルタ層３０は、チャンバ窓孔２３に対応する位置に平面視で円形の貫通孔３３（以下「フィルタ窓孔３３」ともいう。）を有する。チャンバ窓孔２３およびフィルタ窓孔をとおして、培養液の流れ具合や細胞の状態を目視および顕微鏡観察にて確認することができる。図の例では、フィルタ層３０は、第３チャンバ２Ｃ及び第４チャンバ２Ｄのｉｎと平面視で重なる第３フィルタ３０Ｃ及び第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する位置に、平面視でフィルタ窓孔３３よりも小さい円形の貫通孔３４（以下「フィルタｉｎ側孔３４」ともいう。）を有する。フィルタｉｎ側孔３４は、流路層への培養液の接続孔として流路層４０の通路や貫通孔に連通している。なお、フィルタ窓孔３３及びフィルタｉｎ側孔３４の配置態様、平面視形状等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0035] 図の例では、第１フィルタ３０Ａ及び第２フィルタ３０Ｂにおいては、平面視で－Ｘ側から第１気体流入防止部３１、フィルタ窓孔３３、第２気体流入防止部３２の順にＸ方向に間隔をあけて並んでいる。第３フィルタ３０Ｃ

及び第４フィルタ３０Ｄにおいては、平面視で－Ｘ側からフィルタｉｎ側孔３４、フィルタ窓孔３３、第１気体流入防止部３１の順にＸ方向に間隔をあけて並んでいる。

[0036] 例えば、フィルタ層３０の少なくとも一部は、感光性のフォトレジストによって構成されていてもよい。例えば、気体流入防止部６の少なくとも一部は、感光性のフォトレジストによって構成されていてもよい。この際に、フィルタ層３０はアクリル、ＰＥＴ、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、シクロオレフィン等によって形成される支持材料層と気体流入防止部６を有するフォトレジスト層によって構成されていてもよい。例えば、各流入防止部３１，３２が有する少なくとも１つの貫通孔は、前記フォトレジスト層の面内に形成されていてもよい。例えば、細胞培養装置１が複数の気体流入防止部６を有する場合は、複数の気体流入防止部６の少なくとも一部は、感光性のフォトレジスト層に設けられた貫通孔によって構成されていてもよい。なお、気体流入防止部６の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

フィルタ層３０は感光性フォトレジストを用いてフォトリソグラフィープロセスにより製造することができる。フォトレジストをPETフィルム上にに塗布して、ベーキング、露光、現像といった一般的なフォトリソグラフィープロセスにて加工した後に使用することができる。ベーキングや露光、現像は市販のフォトレジストの推奨加工条件に従って行うことができる。当該レジストフィルムを流路層に接合し、ＰＥＴフィルムを剥離して使用することができる。

[0037] 例えば、フィルタ層３０を構成する面状の構造体6aは、多孔性膜や貫通孔を有する膜によって構成されていてもよい。貫通孔を有する膜として、ポリカーボネートおよびポリエステルの薄膜を重イオンで照射後、エッチング工程経て製造されるトラックエッチ膜１３０は孔径が均一な貫通孔を有している膜であるため好ましい。図１１は、トラックエッチ膜１３０の一例を示す平面図である。トラックエッチ膜の素材について、例えば、ポリイミド、ポ

リカーボネート又はポリエステル製のトラックエッチ膜を使用してもよい。例えば、フィルタ層はトラックエッチ膜１３０によって構成されていてもよい。例えば、気体流入防止部６の少なくとも一部は、トラックエッチ膜１３０によって構成され、気体流入防止部６の貫通孔６ｈはトラックエッチ膜１３０の有する貫通孔によって構成されていてもよい。フィルタ層３０はトラックエッチ膜１３０を適切な外寸に切り出して製造することができる。

例えば、フィルタ層３０はアクリル、ＰＥＴ、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、シクロオレフィン等によって形成される支持材料層と気体流入防止部６を有するトラックエッチ膜１３０によって構成されていてもよい。フィルタ層３０は支持材料層とトラックエッチ膜１３０を熱融着や接着剤を用いて接着することで製造することができる。例えば、細胞培養装置１が複数のフィルタ層３０を有する場合は、複数のフィルタ層３０の気体流入防止部６の貫通孔６ｈの少なくとも一部は、トラックエッチ膜１３０の貫通孔によって構成されていてもよい。

[0038] トラックエッチ膜１３０は、１０ｎｍ以上の最小孔径（絶対孔径）を有する膜である。トラックエッチ膜１３０は、一般的なメンブレン素材であるデプスフィルタと比較して、孔径分布が狭く、かつ、膜厚が薄い。なお、トラックエッチ膜１３０の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0039] 例えば、フィルタ層３０を構成する面状の構造体6aとして、貫通孔を有する膜としてハニカムフィルムを使用することができる。ハニカムフィルムもトラックエッチ膜と同様に孔径が均一な貫通孔を有しているため、好ましい。図１２は、ハニカムフィルム２３０の一例を示す斜視図である。ハニカムフィルムの素材について、例えば、特開２０１１－２０２１００号公報に記載のようにポリ乳酸やポリーε－カプロラクトン製のハニカムフィルムを使用してもよい。例えば、フィルタ層はハニカムフィルム２３０によって構成されていてもよい。例えば、気体流入防止部６の少なくとも一部は、ハニカムフィルム２３０によって構成され、気体流入防止部６の貫通孔６ｈはハニ

カムフィルム２３０の有する貫通孔によって構成されていてもよい。フィルタ層３０はハニカムフィルム２３０を適切な外寸に切り出して製造することができる。

例えば、フィルタ層３０はアクリル、ＰＥＴ、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、シクロオレフィン等によって形成される支持材料層と気体流入防止部６を有するハニカムフィルム２３０によって構成されていてもよい。フィルタ層３０は支持材料層とハニカムフィルム２３０を熱融着や接着剤を用いて接着することで製造することができる。例えば、細胞培養装置１が複数のフィルタ層３０を有する場合は、複数のフィルタ層３０の気体流入防止部６の貫通孔６ｈの少なくとも一部は、ハニカムフィルム２３０の貫通孔によって構成されていてもよい。

[0040] ハニカムフィルム２３０は、ハチの巣状に配列した微細な孔を表面に持つ構造体である。例えば、ハニカムフィルム２３０は、細孔径が５μｍ以上２０μｍ以下、膜厚が５μｍ以上１０μｍ以下の範囲に設定されている。なお、ハニカムフィルム２３０の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0041] 図１３は、フィルタ層３３０（フィルタ部）の一例を示す第１の図である。

例えば、フィルタ層３３０は、チャンバ層３０２と流路層３４０（少なくとも１つの流路形成体の一例）との間に配置されていてもよい。図の例では、チャンバ層３０２は、液体培地を貯留可能な第１空間３２０Ａ及び第２空間３２０Ｂを有する。図の例では、流路層３４０は、第１空間３２０Ａ及び第２空間３２０Ｂを互いに連通する流路３４１（図の例では第１流路及び第２流路のうち一方の流路のみ図示）を有する。図の例では、第１空間３２０Ａ又は第２空間３２０Ｂから第１流路又は第２流路を経て第１空間３２０Ａ又は第２空間３２０Ｂに戻る培養液の循環流れが制御される。図の例では、フィルタ層３３０は、面状の構造体３３０ａ（面状構造体）によって構成され、面状構造体３３０ａにおいて少なくとも１つの貫通孔３３０ｈを有する

領域であり循環流れにおける気体の流入を防止する気体流入防止部３３１を備える。

[0042] 図１３の例では、気体流入防止部３３１は、流路３４１の端部（第１流路の端部又は第２流路の端部）に設けられる。図の例では、気体流入防止部３３１は、フィルタ層３３０において流路３４１の一方の端部（第１流路の一方の端部又は第２流路の一方の端部）に面する部位に設けられる。図の例では、気体流入防止部３３１は、フィルタ層３３０において流路３４１の他方の端部（第１流路の他方の端部又は第２流路の他方の端部）に面する部位には設けられない。図の例では、フィルタ層３３０において流路３４１の他方の端部（第１流路の他方の端部又は第２流路の他方の端部）に面する部位には、貫通孔３３０ｈが設けられる。

気体流入防止部３３１を流路３４１の一方の端部に面する部位に設け、他方の端部に面する部位には設けないことで、当該流路に細胞を導入することができる。ただし、気体流入防止部３３１を流路３４１の一方にのみに設ける場合において、後述する循環流れを発生させる際に、気体流入防止部３３１が設けられていない端部から液体培地を当該流路に向けて送液する場合には、流路３４１に気泡が侵入しないよう、加圧時間を十分に短くするよう留意する必要がある。

例えば、図３～図7において、第３チャンバ２Ｃの培養液入口ｉｎより、第１連絡路２１、第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４、第１流路層４０の第１ｉｎ側通路４３、第２流路層５０の第２上下連通路５４、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側通路４４、第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防止部３２、第１チャンバ２Ａの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔと連通する送液流路Ｗ１Ａにおいて、当該流路の一方の端部である第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４の部位には気体流入防止部は設けられておらず、当該流路の他方の端部には第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防止部３２が設けられている。 同様に例えば、図３～図7において、第４チャンバ２Ｄの培養液入口ｉｎより、第１連絡路２１、第４フィルタ３０Ｄのフィルタｉｎ側

孔３４、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ側孔５１、多孔質膜層６０のｉｎ側孔６１、第３流路層７０の第３ｉｎ側孔７１、第４流路層８０の第４ｉｎ側通路８３、第３流路層７０の第３上下連通路７４、第４流路層８０の第４ｏｕｔ側通路８４、第３流路層７０の第３ｏｕｔ側孔７２、多孔質膜層６０のｏｕｔ側孔６２、第２流路層５０の第２ｏｕｔ側孔５２、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第２フィルタ３０Ｂの第２気体流入防止部３２、第２チャンバ２Ｂの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔへと連通する送液流路Ｗ２Ａ、当該流路の一方の端部である第４フィルタ４０Ｄのフィルタｉｎ側孔３４の部位には気体流入防止部は設けられておらず、当該流路の他方の端部には第２フィルタ３０Ｂの第２気体流入防止部３２が設けられている。

[0043] 図１４は、フィルタ層３３０の一例を示す第２の図である。図１４において図１３と同一の構成要素には同一の符号を付し、詳細説明は省略する。図の例でも、気体流入防止部３３１は、流路３４１の端部（第１流路の端部又は第２流路の端部）に設けられる。図の例では、気体流入防止部３３１は、フィルタ層３３０において流路３４１の両方の端部（第１流路の両方の端部又は第２流路の両方の端部）に面する部位に設けられる。

例えば、図３～図7において、第１チャンバ２Ａの培養液入口ｉｎより第１連絡路２１、第１フィルタ３０Ａの第１気体流入防止部３１、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ－ｏｕｔ連通路５３、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第３フィルタ３０Ｃの第１気体流入防止部３１、第３チャンバ２Ｃの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔと連通する返送流路Ｗ１Ｂにおいて、当該流路の両端の部位に第１フィルタ３０Ａの第１気体流入防止部３１および第３フィルタ３０Ｃの第１気体流入防止部３１が設けられている。

同様に例えば、図３～図7において、第２チャンバ２Ｂの培養液入口ｉｎより、第１連絡路２１、第２フィルタ３０Ｂの第１気体流入防止部３１、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ側孔５１、多孔

質膜層６０のｉｎ側孔６１、第３流路層７０の第３ｉｎ－ｏｕｔ連通路７３、多孔質膜層６０のｏｕｔ側孔６２、第２流路層５０の第２ｏｕｔ側孔５２、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第４フィルタ３０Ｄの第１気体流入防止部３１、第４チャンバ２Ｄの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔと連通する返送流路Ｗ２Ｂにおいて、当該流路の両端の部位に第２フィルタ３０Ｂの第１気体流入防止部３１および第４フィルタ３０Ｄの第１気体流入防止部３１が設けられている。後述する循環流れを発生させる際に、気体流入防止部３３１を流路３４１の両方の端部に面する部位に設けることで、当該流路のいずれの端部の方向から当該流路へ液体培地を当該流に向けて送液する場合においても、流路３４１への気体の流入を防止することができる。一方、気体流入防止部３３１を流路３４１の両方の端部に面する部位に設ける場合は、当該流路に細胞を導入することは難しい。

[0044] 図１５は、フィルタ層５３０（フィルタ部）の一例を示す第３の図である。図１５において図１４と同一の構成要素には同一の符号を付し、詳細説明は省略する。図の例でも、気体流入防止部５３１は、フィルタ層５３０において流路３４１の両方の端部（第１流路の両方の端部又は第２流路の両方の端部）に面する部位に設けられる。

[0045] 図の例では、流路層３４０は、フィルタ層５３０を取り付け可能に窪む凹部３４２を有する。図の例では、フィルタ層５３０は、流路層３４０の凹部３４２に対して着脱可能に取り付けられる。例えば、フィルタ層５３０は、平面視で円盤状（ディスク状）の形状を有していてもよい。例えば、気体流入防止部５３１は、フィルタ層５３０には設けられず、気体流入防止部５３１自体が、流路層３４０の凹部３４２に対して着脱可能に取り付けられてもよい。なお、フィルタ層５３０の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0046] ＜流路層＞

図６に示す実施形態の流路プレート３の平面図において、一点鎖線の流路は多孔質膜層６０の上に形成された流路、二点鎖線の流路は多孔質膜層６０

の下に形成された流路、実線の流路は多孔質膜層６０の上下に形成された流路、をそれぞれ示す。図７に示す実施形態の流路プレート３の構成の説明図において、図７（Ｂ）から図７（Ｆ）は流路プレート３を構成する多孔質膜層６０および、第１流路層４０から第４流路層８０の平面図である。

[0047] 図の例では、複数の流路層４０，５０，７０，８０は、第１流路層４０、第２流路層５０、第３流路層７０及び第４流路層８０を含む。例えば、各流路層は、ＰＥＴフィルム等の基材にレーザー加工などで孔や溝等を形成することで作製されている。例えばＰＥＴフィルムの厚みは０．１ｍｍ以上1ｍｍ以下である。第１流路層４０、第２流路層５０、第３流路層７０及び第４流路層８０の厚みは異なってもよいが、同じ厚みであれば、各流路の液体培地の流量の推算が容易となる。なお、流路層の材質、設置態様及び形成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。例えば、流路層はポリスチレンやシクロオレフィン樹脂の射出成型によって作製してもよい。

[0048] 図の例では、第１流路層４０は、各チャンバの培養液入口（図中ｉｎ）の一部（平面視で第３チャンバ２Ｃの培養液入口と重なる第３フィルタ３０Ｃのｉｎに対応する部位を除く３つ）に通じる３つの貫通孔４１（以下「第１ｉｎ側孔４１」ともいう。）と、各チャンバの培養液出口（図中ｏｕｔ）の一部（平面視で第１チャンバ２Ａの培養液出口と重なる第１フィルタ３０Ａのｏｕｔに対応する部位を除く３つ）に通じる３つの貫通孔４２（以下「第１ｏｕｔ側孔４２」ともいう。）と、平面視で第３チャンバ２Ｃの培養液入口（図中ｉｎ）と重なる第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４に連なる第１ｉｎ側通路４３と、平面視で第１チャンバ２Ａの培養液出口（図中ｏｕｔ）と重なる第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防止部３２に連なる第１ｏｕｔ側通路４４と、を有する。

[0049] 第１ｉｎ側通路４３は、平面視で第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４と重なる部位から平面視でフィルタ窓孔３３のＸ方向中央と重なる部位に向かって＋Ｘ側かつ－Ｙ側に湾曲しつつ延びた後、＋Ｙ側に延びている。

第１ｏｕｔ側通路４４は、平面視で第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防

止部３２と重なる部位から－Ｘ側に向かって延びた後、平面視でフィルタ窓孔３３のＸ方向中央と重なる部位に向かって－Ｙ側に湾曲しつつ延びている。

なお、第１流路層４０が有する貫通孔及び通路（流路）の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0050] 図の例では、第２流路層５０は、各チャンバの培養液入口（図中ｉｎ）の一部（４つのうち平面視で第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄの培養液入口と重なる第２フィルタ３０Ｂ及び第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する部分の２つ）に通じる２つの貫通孔５１（以下「第２ｉｎ側孔５１」ともいう。）と、各チャンバの培養液出口（図中ｏｕｔ）の一部（４つのうち平面視で第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄの培養液出口と重なる第２フィルタ３０Ｂ及び第４フィルタ３０Ｄのｏｕｔに対応する部分の２つ）に通じる２つの貫通孔５２（以下「第２ｏｕｔ側孔５２」ともいう。）と、平面視で第１チャンバ２Ａの培養液入口（図中ｉｎ）と重なる第１フィルタ３０Ａのｉｎに対応する第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１に連なり且つ平面視で第３チャンバ２Ｃの培養液出口（図中ｏｕｔ）と重なる第３フィルタ３０Ｃのｏｕｔに対応する第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２に連なるとともに多孔質膜層６０の上に位置する第２ｉｎ－ｏｕｔ連通路５３と、多孔質膜層６０の上下に通じる第２上下連通路５４と、を有する。

[0051] 第２ｉｎ－ｏｕｔ連通路５３は、平面視で第１フィルタ３０Ａのｉｎに対応する第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１と重なる部位から＋Ｘ側に向かって延びた後、平面視で第３フィルタ３０Ｃのｏｕｔに対応する第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２と重なる部位に向かって－Ｙ側に延びている。

第２上下連通路５４は、平面視で第１流路層４０の第１ｉｎ側通路４３の＋Ｘ端と第１ｏｕｔ側通路４４の－Ｙ端とを繋ぐように第２流路層５０のＸ方向中央をＹ方向に沿って延びている。

なお、第２流路層５０が有する貫通孔及び通路（流路）の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0052] 多孔質膜層６０の詳細については後述するが、図の例では、多孔質膜層６０は、各チャンバの培養液入口（図中ｉｎ）の一部（４つのうち平面視で第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄの培養液入口と重なる第２フィルタ３０Ｂ及び第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する部分の２つ）に通じる２つの貫通孔６１（以下「ｉｎ側孔６１」ともいう。）と、各チャンバの培養液出口（図中ｏｕｔ）の一部（４つのうち平面視で第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄの培養液出口と重なる第２フィルタ３０Ｂ及び第４フィルタ３０Ｄのｏｕｔに対応する部分の２つ）に通じる２つの貫通孔６２（以下「ｏｕｔ側孔６２」ともいう。）と、を有する。

なお、多孔質膜層６０が有する貫通孔（流路）の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0053] 図の例では、第３流路層７０は、各チャンバの培養液入口（図中ｉｎ）の一部（４つのうち平面視で第４チャンバ２Ｄの培養液入口と重なる第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する部分の１つ）に通じる貫通孔７１（以下「第３ｉｎ側孔７１」ともいう。）と、各チャンバの培養液出口（図中ｏｕｔ）の一部（４つのうち平面視で第２チャンバ２Ｂの培養液出口と重なる第２フィルタ３０Ｂのｏｕｔに対応する部分の１つ）に通じる貫通孔７２（以下「第３ｏｕｔ側孔７２」ともいう。）と、平面視で第２チャンバ２Ｂの培養液入口（図中ｉｎ）と重なる第２フィルタ３０Ｂのｉｎに対応する多孔質膜層６０のｉｎ側孔６１に連なり且つ平面視で第４チャンバ２Ｄの培養液出口（図中ｏｕｔ）と重なる第４フィルタ３０Ｄのｏｕｔに対応する多孔質膜層６０のｏｕｔ側孔６２に連なる第３ｉｎ－ｏｕｔ連通路７３と、多孔質膜層６０の上下に通じる第３上下連通路７４と、を有する。

[0054] 第３ｉｎ－ｏｕｔ連通路７３は、平面視で第２フィルタ３０Ｂのｉｎに対応する多孔質膜層６０のｉｎ側孔６１と重なる部位から－Ｙ側に向かって延びた後、平面視で第４フィルタ３０Ｄのｏｕｔに対応する多孔質膜層６０のｏｕｔ側孔６２と重なる部位に向かって＋Ｘ側に延びている。

第３上下連通路７４は、平面視で第２流路層５０の第２上下連通路５４と

重なる部位であって第３流路層７０のＸ方向中央をＹ方向に沿って延びている。

なお、第３流路層７０が有する貫通孔及び通路（流路）の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0055] 図の例では、第４流路層８０は、平面視で第４チャンバ２Ｄの培養液入口と重なる第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する第３流路層７０の第３ｉｎ側孔７１に連なる第４ｉｎ側通路８３と、平面視で第２チャンバ２Ｂの培養液出口と重なる第２フィルタ３０Ｂのｏｕｔに対応する第３流路層７０の第３ｏｕｔ側孔７２に連なる第４ｏｕｔ側通路８４と、を有する。

[0056] 第４ｉｎ側通路８３は、平面視で第４フィルタ３０Ｄのｉｎに対応する第３流路層７０の第３ｉｎ側孔７１と重なる部位から－Ｘ側に向かって延びた後、平面視で第３流路層７０の第３上下連通路７４の－Ｙ端と重なる部位に向かって＋Ｙ側に湾曲しつつ延びている。

第４ｏｕｔ側通路８４は、平面視で第２フィルタ３０Ｂのｏｕｔに対応する第３流路層７０の第３ｏｕｔ側孔７２と重なる部位から平面視で第３流路層７０の第３上下連通路７４の＋Ｙ端と重なる部位に向かって－Ｘ側かつ＋Ｙ側に湾曲しつつ延びた後、－Ｙ側に延びている。

なお、第４流路層８０が有する貫通孔及び通路（流路）の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0057] ＜多孔質膜層＞

例えば、多孔質膜層６０は、第２流路層５０と第３流路層７０との間に設けられている。例えば、細胞培養部４は、第２流路層５０の第２上下連通路５４と第３流路層７０の第３上下連通路７４との間の多孔質膜層６０上に設けられている。この細胞培養部４にて細胞が培養される。細胞培養部４は、第１空間、第２空間、第１流路及び第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部の一例である。多孔質膜層６０は、流路プレート３内において上側空間と下側空間とを隔てている。多孔質膜層６０は、上側空間と下側空間との圧力差により流体が透過可能である。多孔質膜層６０は、細胞は透過で

きない。

[0058] 例えば、多孔質膜層６０の平均細孔径は、０．１μｍ以上３０μｍ以下である。多孔質膜層６０の細孔の大きさは、液体は透過するが、細胞は透過できない大きさである。例えば、多孔質膜層６０の厚みは、０．１μｍ以上１００μｍ以下である。例えば、多孔質膜層６０の材質は、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリエステル、シリコーン樹脂等である。

[0059] 例えば、多孔質膜層６０の上面（細胞が載置される面）は、細胞接着性材料でコーティングされていることが好ましい。例えば、細胞接着性材料としては、細胞接着性を有するタンパク質が挙げられる。例えば、細胞接着性材料としては、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビドロネクチン、マトリゲル、ポリリジン等が挙げられる。

[0060] 本実施形態の流路プレート３は、多孔質膜層６０の上下に培養液を流すことで、多孔質膜層６０上の細胞を培養する構成となっている。図中において、一点鎖線の流路は多孔質膜層６０の上に形成された流路、二点鎖線の流路は多孔質膜層６０の下に形成された流路、実線の流路は多孔質膜層６０の上下に形成された流路、をそれぞれ示す。例えば、多孔質膜層６０上の細胞は、多孔質膜層６０の上下に形成された流路（本実施形態では上下連通路５４，７４）に沿う部分において培養される。

[0061] ＜ラバーシート＞

ラバーシート７は、平面視で長方形の外形を有する。ラバーシート７は、蓋９とチャンバ層２との間に設けられる封止部材として機能する。ラバーシート７は、蓋９及びチャンバ層２よりも柔軟な材料で形成されている。なお、ラバーシート７の構成態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

実施形態のラバーシート７は、ラバーシートの平板をウォータージェット加工で作製することができる。

[0062] ラバーシート７は、複数の開口孔７ｈを有する。開口孔７ｈは、平面視で培養液チャンバの貯留空間２０に沿う長円形状を有する。複数の開口孔７ｈ

は、複数の培養液チャンバに対応して、４行４列の１６個設けられている。なお、開口孔７ｈの平面視形状および設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0063] なお、ラバーシート７に替えて、又は、ラバーシート７とともに、シリコーン樹脂シートやＯリング等の柔軟性を持つ部品（封止部材の一例）が設けられていてもよい。これにより、蓋９とチャンバ層２との隙間からの圧力漏れ及び液漏れを防止することができる。なお、封止部材の設置態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0064] ＜蓋＞

蓋９は、チャンバ層２の開口（貯留空間２０の上部開口）を開閉自在かつ気密に封止する機能を有する。蓋９は、外部から培養液チャンバ内を観察可能な複数の観察窓９ｈを有する。観察窓９ｈは、平面視で培養液チャンバの貯留空間２０に沿う長円形状を有する。複数の観察窓９ｈは、複数の培養液チャンバに対応して、４行４列の１６個設けられている。なお、観察窓９ｈの平面視形状および設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

実施形態の蓋９は、ポリカーボネートの切削加工で作製することができる。

[0065] 蓋９には、エアフィルタ９０が取り付けられている。エアフィルタ９０を介して、培養液チャンバに空圧を負荷することが可能に構成されている。図の例では、Ｙ方向に並んで４つのエアフィルタ９０が設けられている。なお、エアフィルタ９０の設置数等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0066] 例えば、蓋９には、エアフィルタ９０が接続される空圧配管（不図示、加圧ラインの一例）が設けられている。空圧配管は、エアフィルタ９０を介して空圧ポンプ９１（加圧調整装置５の構成の一例）に連通している。例えば、空圧配管は、エアフィルタ９０に対応して４本設けられている。例えば、４つのエアフィルタ９０のうち最も＋Ｙ側に対応する第１空圧配管は、チャ

ンバ層２において最も＋Ｙ側にある４つの培養液チャンバ（本実施形態では第１チャンバ２Ａ）に連通している。他の３本の空圧配管も、第１空圧配管と同様の構成になっている。なお、空圧配管の構成態様等は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

加圧調整装置5は空圧ポンプ９１と圧力を調整するレギュレーター、圧力を経時的なシークエンスにより、負荷したり開放したりするために電磁弁等によって構成されていてもよい。

[0067] 例えば、空圧配管は、培養液チャンバに対して空気（気体の一例）を供給可能であり、かつ、培養液チャンバから空気を排出可能に構成されていている。本実施形態では、空圧配管にはエアフィルタ９０が接続されている。このため、エアフィルタ９０によって、培養液チャンバ内に異物が混入することを防ぐことができる。

[0068] 例えば、４つの培養液チャンバを同時に加圧することが可能に構成されていてもよい。または、４つの培養液チャンバを順次加圧することが可能に構成されていてもよい。例えば、４つの培養液チャンバを同時に大気圧開放することが可能に構成されていてもよい。または、４つの培養液チャンバを順次大気圧開放することが可能に構成されていてもよい。なお、各培養液チャンバの加圧態様は、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0069] ＜培養液の循環流れの一例＞

図６に示す実施形態の流路プレート３の平面図において、一点鎖線の流路は多孔質膜層６０の上に形成された流路、二点鎖線の流路は多孔質膜層６０の下に形成された流路、実線の流路は多孔質膜層６０の上下に形成された流路、をそれぞれ示す。本実施形態では、流路プレート３を構成する第１流路層４０及び第２流路層５０が有する流路に沿って培養液が多孔質膜層６０の上側を通り、第３流路層７０及び第４流路層８０が有する流路に沿って培養液が多孔質膜層６０の下側を通るように構成されている。

[0070] 例えば、第１チャンバ２Ａ及び第３チャンバ２Ｃを交互に加圧することで、多孔質膜層６０の上側において培養液の送液と返送とを交互に行うことが

できる。

例えば、第３チャンバ２Ｃを加圧すると、第３チャンバ２Ｃの貯留空間２０Ｃに貯留されている培養液は、第３チャンバ２Ｃの培養液入口ｉｎ及び第１連絡路２１、第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４、第１流路層４０の第１ｉｎ側通路４３、第２流路層５０の第２上下連通路５４、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側通路４４、第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防止部３２、第１チャンバ２Ａの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔを通じて、送液される（図中矢印Ｖ１Ａ方向に沿う送液流路Ｗ１Ａ）。

[0071] 本実施形態では、各チャンバにおいてｉｎ側の第１連絡路２１の上端はｏｕｔ側の第２連絡路２２の上端よりも低い場所にある。そのため、第３チャンバ２Ｃを加圧すると、第３チャンバ２Ｃの低い場所から培養液が入り、第１チャンバ２Ａの高い場所から培養液が出てくる。培養液の送液の過程で、第３チャンバ２Ｃの貯留空間２０Ｃに存在する空気は、第３フィルタ３０Ｃの第１気体流入防止部３１によって第１ｏｕｔ側孔４２への流入が防止される。一方、第３フィルタ３０Ｃのフィルタｉｎ側孔３４の部位には気体流入防止部が設けられていないため、第３チャンバ２Ｃの貯留空間２０Ｃに存在する空気が、第１流路層４０の第１ｉｎ側通路４３へ流入する前に第３チャンバ２Cの加圧を停止することが好ましい。

[0072] 一方、第１チャンバ２Ａを加圧すると、第１チャンバ２Ａの貯留空間２０Ａに貯留されている培養液は、第１チャンバ２Ａの培養液入口ｉｎ及び第１連絡路２１、第１フィルタ３０Ａの第１気体流入防止部３１、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ－ｏｕｔ連通路５３、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第３フィルタ３０Ｃの第１気体流入防止部３１、第３チャンバ２Ｃの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔを通じて返送される（図中矢印Ｖ１Ｂ方向に沿う返送流路Ｗ１Ｂ）。

[0073] 本実施形態では、各チャンバにおいてｉｎ側の第１連絡路２１の上端はｏｕｔ側の第２連絡路２２の上端よりも低い場所にある。そのため、第１チャンバ２Ａを加圧すると、第１チャンバ２Ａの低い場所から培養液が入り、第

３チャンバ２Ｃの高い場所から培養液が出てくる。培養液の返送の過程で、第１チャンバ２Ａの貯留空間２０Ａに存在する空気は、第１フィルタ３０Ａの第１気体流入防止部３１によって第１ｉｎ側孔４１への流入が防止される。また、培養液の返送の過程で、第１チャンバ２Ａの貯留空間２０Ａに存在する空気は、第１フィルタ３０Ａの第２気体流入防止部３２によって第１ｏｕｔ側通路４４への流入が防止される。

[0074] 図中矢印Ｖ１Ａ，Ｖ１Ｂ方向で示すように、多孔質膜層６０の上側の流路を通過する培養液は、第１チャンバ２Ａと第３チャンバ２Ｃとの間を循環して流れる。この循環流れにおいて、第１チャンバ２Ａ及び第３チャンバ２Ｃが有する貯留空間２０Ａ，２０Ｃの一方は液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間の一方に相当し、第１チャンバ２Ａ及び第３チャンバ２Ｃが有する貯留空間２０Ａ，２０Ｃの他方は液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間の他方に相当し、送液流路Ｗ１Ａ及び返送流路Ｗ１Ｂの一方は第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路の一方に相当し、送液流路Ｗ１Ａ及び返送流路Ｗ１Ｂの他方は第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路の他方に相当する。なお、多孔質膜層６０の上側の流路を通過する培養液の循環流れは、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0075] 例えば、第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄを交互に加圧することで、多孔質膜層６０の下側において培養液の送液と返送とを交互に行うことができる。

例えば、第４チャンバ２Ｄを加圧すると、第４チャンバ２Ｄの貯留空間２０Ｄに貯留されている培養液は、第４チャンバ２Ｄの培養液入口ｉｎ及び第１連絡路２１、第４フィルタ３０Ｄのフィルタｉｎ側孔３４、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ側孔５１、多孔質膜層６０のｉｎ側孔６１、第３流路層７０の第３ｉｎ側孔７１、第４流路層８０の第４ｉｎ側通路８３、第３流路層７０の第３上下連通路７４、第４流路層８０の第４ｏｕｔ側通路８４、第３流路層７０の第３ｏｕｔ側孔７２、多孔質

膜層６０のｏｕｔ側孔６２、第２流路層５０の第２ｏｕｔ側孔５２、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第２フィルタ３０Ｂの第２気体流入防止部３２、第２チャンバ２Ｂの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔを通じて、送液される（図中矢印Ｖ２Ａ方向に沿う送液流路Ｗ２Ａ）。

[0076] 本実施形態では、各チャンバにおいてｉｎ側の第１連絡路２１の上端はｏｕｔ側の第２連絡路２２の上端よりも低い場所にある。そのため、第４チャンバ２Ｄを加圧すると、第４チャンバ２Ｄの低い場所から培養液が入り、第２チャンバ２Ｂの高い場所から培養液が出てくる。培養液の送液の過程で、第４チャンバ２Ｄの貯留空間２０Ｄに存在する空気は、第４フィルタ３０Ｄの第１気体流入防止部３１によって第１ｏｕｔ側孔４２への流入が防止される。一方、第４フィルタ３０Dのフィルタｉｎ側孔３４の部位には気体流入防止部が設けられていないため、第４チャンバ２Ｄを加圧する際には、第４チャンバ２Dの貯留空間２０Dに存在する空気が、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１へ流入する前に第4チャンバ２Dの加圧を停止することが好ましい。

[0077] 一方、第２チャンバ２Ｂを加圧すると、第２チャンバ２Ｂの貯留空間２０Ｂに貯留されている培養液は、第２チャンバ２Ｂの培養液入口ｉｎ及び第１連絡路２１、第２フィルタ３０Ｂの第１気体流入防止部３１、第１流路層４０の第１ｉｎ側孔４１、第２流路層５０の第２ｉｎ側孔５１、多孔質膜層６０のｉｎ側孔６１、第３流路層７０の第３ｉｎ－ｏｕｔ連通路７３、多孔質膜層６０のｏｕｔ側孔６２、第２流路層５０の第２ｏｕｔ側孔５２、第１流路層４０の第１ｏｕｔ側孔４２、第４フィルタ３０Ｄの第１気体流入防止部３１、第４チャンバ２Ｄの第２連絡路２２及び培養液出口ｏｕｔを通じて返送される（図中矢印Ｖ２Ｂ方向に沿う返送流路Ｗ２Ｂ）。

[0078] 本実施形態では、各チャンバにおいてｉｎ側の第１連絡路２１の上端はｏｕｔ側の第２連絡路２２の上端よりも低い場所にある。そのため、第２チャンバ２Ｂを加圧すると、第２チャンバ２Ｂの低い場所から培養液が入り、第４チャンバ２Ｄの高い場所から培養液が出てくる。培養液の返送の過程で、第２チャンバ２Ｂの貯留空間２０Ｂに存在する空気は、第２フィルタ３０Ｂ

の第１気体流入防止部３１によって第１ｉｎ側孔４１への流入が防止される。また、培養液の返送の過程で、第２チャンバ２Ｂの貯留空間２０Ｂに存在する空気は、第２フィルタ３０Ｂの第２気体流入防止部３２によって第１ｏｕｔ側孔４２への流入が防止される。

[0079] 図中矢印Ｖ２Ａ，Ｖ２Ｂ方向で示すように、多孔質膜層６０の下側の流路を通過する培養液は、第２チャンバ２Ｂと第４チャンバ２Ｄとの間を循環して流れる。この循環流れにおいて、第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄが有する貯留空間２０Ｂ，２０Ｄの一方は液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間の一方に相当し、第２チャンバ２Ｂ及び第４チャンバ２Ｄが有する貯留空間２０Ｂ，２０Ｄの他方は液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間の他方に相当し、送液流路Ｗ２Ａ及び返送流路Ｗ２Ｂの一方は第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路の一方に相当し、送液流路Ｗ２Ａ及び返送流路Ｗ２Ｂの他方は第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路の他方に相当する。なお、多孔質膜層６０の下側の流路を通過する培養液の循環流れは、上記に限らず、要求仕様に応じて変更可能である。

[0080] 本実施形態では、１つの培養ユニット（図の例では第１培養ユニット１０１）を構成する４つの培養液チャンバ２Ａ１，２Ｂ１，２Ｃ１，２Ｄ１のうち２つ（図の例では第１チャンバ２Ａ１及び第３チャンバ２Ｃ１）を組み合わせた第１のセットが流路プレート３内のマイクロ流路（図の例では第１フィルタ３０Ａ、第３フィルタ３０Ｃ、第１流路層４０及び第２流路層５０等が有する流路）で接続されている。これにより、培養液の第１の循環流れ（図の例では、矢印Ｖ１Ａ方向の送液流路Ｗ１Ａ及び矢印Ｖ１Ｂ方向の返送流路Ｗ１Ｂに沿う流れ）を実現することができる。

[0081] さらに、１つの培養ユニット（図の例では第１培養ユニット１０１）を構成する４つの培養液チャンバ２Ａ１，２Ｂ１，２Ｃ１，２Ｄ１のうち別の２つ（図の例では第２チャンバ２Ｂ１及び第４チャンバ２Ｄ１）を組み合わせた第２のセットが流路プレート３内のマイクロ流路（図の例では第２フィル

タ３０Ｂ、第４フィルタ３０Ｄ、第１流路層４０、第２流路層５０、多孔質膜層６０、第３流路層７０及び第４流路層８０等が有する流路）で接続されている。これにより、培養液の第２の循環流れ（図の例では、矢印Ｖ２Ａ方向の送液流路Ｗ２Ａ及び矢印Ｖ２Ｂ方向の返送流路Ｗ２Ｂ）を実現することができる。

[0082] 本実施形態の細胞培養装置１は、Ｘ方向に並ぶ４つの培養ユニット１０１，１０２，１０３，１０４により構成されている。他の培養ユニット（図の例では第２培養ユニット１０２から第４培養ユニット１０４）は、第１培養ユニット１０１と同様の構成を有する。そのため、他の培養ユニットにおいても第１培養ユニット１０１と同様の循環流れを実現することができる。

[0083] なお、循環流れを形成するための流路には、循環流れに沿う順方向の流れは許容し、かつ、順方向とは逆の方向の流れは阻止するための逆止弁が設けられていてもよい。逆止弁は、培養液の流れを制限する逆流防止機構の一例である。例えば、逆止弁としては、弁孔を有する弁座と、弁体とを備えた構造が挙げられる。この構造を持つ逆止弁は、培養液が順方向に流れる際は弁体が弁座から離れることにより弁孔が開かれるため、培養液は弁孔を通過して順方向に流れる。一方、培養液が逆方向に流れる際は弁体が弁座に当接することにより弁孔が閉じられるため、逆方向への培養液の流れは阻止される。

[0084] また、各チャンバにおいてｉｎ側の第１連絡路２１（ｉｎ側貫通孔の一例）の上端はｏｕｔ側の第２連絡路２２（ｏｕｔ側貫通孔の一例）の上端よりも低い場所にあることに限らない。例えば、各チャンバにおいてｉｎ側貫通孔の上端はｏｕｔ側貫通孔の上端と同じ高さの場所にあってもよいし、ｏｕｔ側貫通孔の上端よりも高い場所にあってもよい。例えば、培養液の流れの制御は、各チャンバにおけるｉｎ側貫通孔の上端又はｏｕｔ側貫通孔の上端の高さを変えることで行ってもよい。例えば、培養液の流れの制御態様は、要求仕様に応じて変更可能である。

[0085] ＜作用効果＞

以上説明したように、本実施形態に係る細胞培養装置１は、液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部（実施形態のチャンバ層２）と、第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部（実施形態の流路プレート３）と、第１空間、第２空間、第１流路及び第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部（実施形態の細胞培養部４）と、第１空間又は第２空間から第１流路又は第２流路を経て第１空間又は第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部（実施形態の加圧調整装置５）と、少なくとも１つの貫通孔を有し且つ面状の構造体であって循環流れにおける気体の流入を防止するための気体流入防止部６（実施形態の第１気体流入防止部３１及び第２気体流入防止部３２）と、を備える。

この構成によれば、高い寸法精度が求められるラプラスバルブ部分（実施形態の気体流入防止部６）を事前に高精度で大量生産することができる。したがって、気体の流入を防止するための構造体を寸法精度良く作製することができ、産業化に好適な構造を実現することができる。

[0086] 本実施形態に係る気体流入防止部６は、第１流路の端部又は第２流路の端部に設けられる。

この構成によれば、気体流入防止部６が第１流路の中間部又は第２流路の中間部に設けられる場合と比較して、気体流入防止部６を設置しやすい。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0087] 本実施形態に係る貯留部（実施形態のチャンバ層２）、流路形成部（実施形態の流路プレート３）及び気体流入防止部６は、それぞれ層状に形成されており、流路形成部、気体流入防止部６、貯留部の順に積層されている。

この構成によれば、流路形成部、気体流入防止部６、貯留部の３層を熱圧着等で組み立てることができる。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0088] 本実施形態に係る気体流入防止部６の貫通孔（実施形態の貫通孔３１ｈ，

３２ｈ）の直径は、０．００５ｍｍ以上０．２ｍｍ以下である。

この構成によれば、気体流入防止部６の機能を維持しつつ耐久性も確保することができる。そのため、気体流入防止部６を実用的に大量生産する上で好適である。

[0089] 本実施形態に係る貯留部は、空気を供給可能な空圧ポンプ９１に接続されている。

この構成によれば、空圧ポンプ９１により貯留部を加圧することができる。

[0090] 本実施形態に係る気体流入防止部６の一例は、感光性のフォトレジストによって構成されており、気体流入防止部６が有する少なくとも１つの貫通孔は、フォトレジストに形成されている。

この構成によれば、フォトレジストにより気体流入防止部６が有する貫通孔の配置間隔を所望の間隔に確保することができる。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0091] 本実施形態に係る気体流入防止部６の一例は、ポリイミド、ポリカーボネート又はポリエステル製のトラックエッチ膜１３０で構成されている。

トラックエッチ膜１３０は、一般的なメンブレン素材であるデプスフィルタと比較して、孔径分布が狭く、かつ、膜厚が薄い。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0092] 本実施形態に係る気体流入防止部６の一例は、ハニカムフィルム２３０で構成されている。

ハニカムフィルム２３０は、ハチの巣状に配列した微細な孔を表面に持つ構造体である。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0093] 本実施形態に係る細胞培養部４は、細胞を培養するための第１面６０ａと第１面６０ａとは反対の第２面６０ｂとを有する多孔質膜層６０によって構

成される。流路形成部は、多孔質膜層６０の第１面６０ａの側に配置される第１流路層４０及び第２流路層５０と、多孔質膜層６０の第２面６０ｂの側に配置される第３流路層７０及び第４流路層８０と、を含む。第１流路層４０及び第２流路層５０は、多孔質膜層６０の第１面６０ａの側において、第１空間又は第２空間から第１流路又は第２流路を経て第１空間又は第２空間に戻る培養液の循環流れを形成する流路を含む。第３流路層７０及び第４流路層８０は、多孔質膜層６０の第２面６０ｂの側において、第１空間又は第２空間から第１流路又は第２流路を経て第１空間又は第２空間に戻る培養液の循環流れを形成する流路を含む。

この構成によれば、多孔質膜層６０の第１面６０ａ及び第２面６０ｂの両面側において、培養液の循環流れを形成することができる。そのため、多孔質膜層６０の第１面６０ａの側の培養液の循環流れと、多孔質膜層６０の第２面６０ｂの側の培養液の循環流れとを利用することで、多種多様な細胞培養を実現することができる。

[0094] 本実施形態に係る細胞培養装置１の製造方法は、液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、第１空間及び第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、第１空間、第２空間、第１流路及び第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、第１空間又は第２空間から第１流路又は第２流路を経て第１空間又は第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、少なくとも１つの貫通孔を有し且つ面状の構造体であって循環流れにおける気体の流入を防止するための気体流入防止部６と、を備える細胞培養装置１において、貯留部、流路形成部及び気体流入防止部６は、それぞれ層状に形成されており、流路形成部、気体流入防止部６、貯留部の順に積層して接合する。

この方法によれば、流路形成部、気体流入防止部６、貯留部の３層を熱圧着等で組み立てることができる。そのため、気体流入防止部６の精度を維持するとともに、細胞培養装置１の大量生産を実現する上で好適である。

[0095] ＜変形例＞

上述した実施形態では、気体流入防止部は、第１流路の端部又は第２流路の端部に設けられる例を挙げて説明したが、これに限らない。例えば、気体流入防止部は、第１流路の中間部又は第２流路の中間部に設けられてもよい。例えば、第１流路及び第２流路が立体的に交差する場合は、その交差部分に気体流入防止部が設けられてもよい。例えば、気体流入防止部の設置態様は、要求仕様に応じて変更することができる。

[0096] 上述した実施形態では、貯留部、流路形成部及び気体流入防止部は、それぞれ層状に形成されており、流路形成部、気体流入防止部、貯留部の順に積層されている例を挙げて説明したが、これに限らない。例えば、貯留部、流路形成部及び気体流入防止部は、それぞれブロック状に形成されていてもよい。例えば、細胞培養装置は、貯留部、流路形成部及び気体流入防止部を別々に有する構成に限らず、貯留部、流路形成部及び気体流入防止部が一体となった構造体を有してもよい。

[0097] 上述した実施形態では、気体流入防止部の貫通孔の直径は、０．００５ｍｍ以上０．２ｍｍ以下である例を挙げて説明したが、これに限らない。例えば、気体流入防止部の貫通孔の直径は、０．００５ｍｍ未満又は０．２ｍｍ超過であってもよい。例えば、気体流入防止部の貫通孔の直径は、要求仕様に応じて変更可能である。

[0098] 上述した実施形態では、貯留部は、空気を供給可能な空圧ポンプに接続されている例を挙げて説明したが、これに限らない。細胞培養装置において貯留空間（第１空間又は第２空間）の圧力を調整する構造は特に限定されない。例えば、培養液の供給によって貯留空間の圧力を高める構造でもよいし、培養液の排出によって貯留空間の圧力を低下させる構造でもよい。例えば、貯留空間の容積の変化によって貯留空間の圧力を変化させる構造でもよい。例えば、貯留空間の圧力を調整する構造の態様は、要求仕様に応じて変更することができる。

[0099] 上述した実施形態では、細胞培養部は、細胞を培養するための第１面と第１面とは反対の第２面とを有する多孔質膜層である例を挙げて説明したが、

これに限らない。細胞培養部は、細胞を培養するための第１面と第１面とは反対の第２面とを有する多孔質層であってもよい。例えば、細胞培養部は、単一の膜構造でもよいし、複数の膜を積み重ねた層構造でもよい。例えば、細胞培養部の構成態様は、要求仕様に応じて変更することができる。細胞培養部は、第１空間、第２空間、第１流路及び第２流路におけるこれらの少なくとも一部に設けられていれば良い。

[0100] 上述した実施形態では、流路形成部は、多孔質膜層の第１面の側に配置される第１流路層及び第２流路層と、多孔質膜層の第２面の側に配置される第３流路層及び第４流路層と、を含む例を挙げて説明したが、これに限らない。例えば、流路形成部は、単層構造でもよいし、５層以上の流路層を含んでいてもよい。例えば、流路形成部は、多孔質膜層の第１面の側のみに配置されてもよいし、多孔質膜層の第２面の側のみに配置されてもよい。例えば、流路形成部の構成態様は、要求仕様に応じて変更することができる。

[0101] 本実施形態において培養する細胞は、特に限定されず、例えば、ヒトを含む動物由来の細胞、植物由来の細胞、微生物由来の細胞等を目的に応じて使用可能である。

本実施形態は、細胞工学分野、再生医療分野、バイオ関連工業分野、組織工学分野などにおいて有用である。特に、医薬品の開発、細胞生物学の基礎研究に有用である。

[0102] その他、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、上記した実施形態における構成要素を周知の構成要素に置き換えることは可能である。また、上述した各変形例を組み合わせても構わない。

実施例

[0103] 次に、本発明の上記実施形態に係る細胞培養装置について、実施例を示して詳細に説明する。なお、下記の実施例は、本発明が適用された具体的な一例であり、本発明を限定するものではない。

[0104] ＜細胞培養装置の流量測定結果＞

実施例の細胞培養装置の流量測定結果を比較例と対比して説明する。

図１６は、比較例の細胞培養装置の流量測定結果を示すグラフである。図１６は、比較例の細胞培養装置の流量のバラツキを示す。図１６の比較例の縦軸は、３．９ｋＰａで加圧した際の流量を示す。図１７は、実施例の細胞培養装置の流量測定結果を示すグラフである。図１７は、実施例の細胞培養装置の流量のバラツキを示す。図１７の実施例の縦軸は、５ｋＰａで加圧した際の流量を示す。

[0105] 比較例の細胞培養装置は、非特許文献１（Satoh, T, et al.: A multi-throughput multi-organ-on-a-chip system on a plate formatted pneumatic pressure-driven medium circulation platform. Lab Chip, 18, 115-125 (2018).）に記載の構造の細胞培養装置をポリスチレンの射出成型及び熱圧着によって作製したものである。比較例の細胞培養装置の作製方法は、特許文献５（特開２０２０－１２４８８４号公報）及び非特許文献２（Kurihara, K, et al.: Low-deformation precision thermal bonding of nanostructured microfluidic chips. Japanese Journal of Applied Physics, 59, SIIJ08 (2020).）に開示されている。

実施例の細胞培養装置は、本実施形態の細胞培養装置１である。

[0106] 各細胞培養装置の流量測定は、チャンバに培地を添加した後に、チャンバを加圧し、加圧開始から所定時間後に出口側（ｏｕｔ側）に貯留された培地の重量を測定し、これを１分あたりの培地流量に換算した。培地密度は、１ｇ＝１ｍＬとした。流量の測定は、室温（２５℃）で行った。

[0107] 流量の標準偏差を平均値で除すことで変動係数を推算し、比較例と実施例の流量のバラツキの指標とした。比較例の方法により作製された細胞培養装置の流量の変動係数は、送液流路において０．３３５、返送流路において０．３３１であった。

実施例の方法により作製された細胞培養装置の流量の変動係数は、送液流路において０．０４５、返送流路において０．０８７であった。

比較例に対して実施例の細胞培養装置のほうが、流量のバラツキが小さく、精度良く流量を制御できることが確認された。

[0108] ＜細胞培養の例＞

次に、実施例の細胞培養装置を用いて培養液を流しながら細胞培養を行った例を説明する。

細胞培養装置の滅菌・前処理は、次の手順で行った。

流路プレートは７０％エタノールを用いて外側、流路内を満たし、クリーンベンチ内でエタノールを除去後、滅菌済みのバッグに移し、常温で減圧乾燥した。ホルダ、ラバーシート、チャンバ層及び蓋は、オートクレーブ(１２０℃の温度で２０分)にて滅菌後、乾燥器（６０℃）で完全に乾燥させた。すべてのパーツは、クリーンベンチ内で無菌的に組み立てた。

流路内の送液流路（多孔質膜層の上：第１チャンバから第３チャンバ、多孔質膜層の下：第２チャンバから第４チャンバ）にはコラーゲンコートを行った。セルマトリックスタイプＩ－Ｃ（新田ゼラチン）をｐＨ３．０の滅菌水で１０倍希釈したのち、送液流路上下面のｏｕｔ側(第１チャンバ及び第２チャンバ)から導入し、１時間室温にて静置した。送液流路のｉｎ側(第３チャンバ内及び第４チャンバ内)に培地を添加し、ｏｕｔ側からアスピレーターにて１ｍＬ以上の培地を吸引し、流路内のコート液を培地に置換し、ｐＨを十分に中和した。

[0109] 次に、ラプラスバルブの破壊圧の測定について説明する。

ラプラスバルブの破壊圧の測定は、２日間の灌流後に行った。測定には同一ロットの４枚の流路を用いた。送液流路または返送流路のｉｎ側を４ｋＰａで加圧し、チャンバ内の培地をすべて送液した。その後２０秒ごとに０．２ｋＰａずつ圧力を上昇させ、気泡がラプラスバルブを通過した時点の差圧（第１チャンバ内と第３チャンバ内との間の圧力差、第２チャンバ内と第４チャンバ内との圧力差）を記録した。測定は１枚のプレートを流路毎に３回ずつ行い、最も低い破壊圧を記録し４枚の平均値を算出した。

ラプラスバルブの破壊圧はすでに述べた式（１）によって見積もることができる。

[0110] 式（１）において、P_Bは予想されるラプラスバルブの破壊圧［Ｐａ］、

γは培地と空気との間の表面張力[Ｎ／ｍ]、D_Pはラプラスバルブとなる流路プレートに形成された貫通孔の直径[ｍ]である。非特許文献３（Jiang, L, et al.: Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 10187-10196 (2014).）の表面張力を５５ｍＮ／ｍと想定すると、ラプラスバルブの破壊圧は５．５ｋＰａと推定される。

[0111] 実施例では、測定されたラプラスバルブ（実施形態の気体流入防止部）の破壊圧は、送液流路において７．１８±０．０８ｋＰａ、返送流路において６．７８±０．６１ｋＰａ（平均標準偏差，ｎ＝３)となった。これは推定されていた破壊圧５．５ｋＰａと同程度であり、実施例にて作製されたマイクロ流路が培養液の灌流を行うにあたって十分に利用可能であることが確認された。

[0112] 細胞培養のために、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｍａｎ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｖｅｉｎ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｃｅｌｌｓ：ＨＵＶＥＣ）として、１０ドナー由来混合細胞（倉敷紡績）を準備した。ＨＵＶＥＣの培養にはＭｉｃｒｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ－２ ＢｕｌｌｅｔＫｉｔ （ＥＧＭ－２ＭＶ，Ｌｏｎｚａ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄｓ）をメーカー推奨組成で混合した。

[0113] ＨＵＶＥＣの維持培養にはセルマトリックスタイプＩ－Ｃでコラーゲンコートを行ったディッシュを用いて５％ＣＯ２、３７℃の条件下で培養を行った。細胞がサブコンフルエントに達したのち０．０５％トリプシン－５．３ｍｍｏｌ／Ｌ ＥＤＴＡ液を用いて回収し、遠心分離(１００ｇ×３ｍｉｎ)を行った。

[0114] 細胞培養装置を用いた細胞培養は、次の手順で行った。

ＨＵＶＥＣは培地で２．０×10^6ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調製し、送液流路の上面(第３チャンバのｉｎ側)から１５０μＬ導入した。細胞培養部分は６０

０ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}の密度とした。返送流路への細胞の流出を防ぐため、第１チャンバのｏｕｔ側に空のチップを差し込み、押し出された培地は除去した。ＨＵＶＥＣを接着させるため、３時間５％ＣＯ２で３７℃のインキュベーターの条件で静置培養を行った。非接着細胞を除去するため、第１チャンバのｏｕｔ側に空のチップを差し込み、第３チャンバのｉｎ側から培地を１５０μＬ導入した。押し出された培地は除去した。チャンバ内の培地貯蔵部分に培地を満たし、さらに培地を２ｍｌ添加した。加圧操作は、約５．０ｋＰａで５ｓｅｃ大気圧開放（ステップ１）、その後６０ｓｅｃ第１チャンバ及び第２チャンバを加圧（ステップ２）、その後５ｓｅｃ大気圧開放（ステップ３）、その後６０ｓｅｃ第３チャンバ及び第４チャンバを加圧（ステップ４）、の加圧シークエンスを繰り返した。加圧にはＡＳＴＦ０４０１（エンジニアリングシステム)を用いた。

培地交換は流量測定時に行った。対照には細胞培養用ディッシュ(Ｆａｌｃｏｎ™ ６－ｗｅｌｌ Ｃｌｅａｒ Ｆｌａｔ Ｂｏｔｔｏｍ ＴＣ－ｔｒｅａｔｅｄ Ｍｕｌｔｉｗｅｌｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｐｌａｔｅ)を用いた。メーカー推奨の方法でコラーゲンコートを行い、同様に６００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}の密度で播種した。

[0115] 観察および配向性試験は次の手順で行った。

灌流開始後２日目のＭＰＳまたはＣｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅディッシュ上の細胞のＬｉｖｅＤｅａｄ染色を行った。流路内の培地を１ｍｌ程度のＨＢＳＳ（＋）で置換した。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ™ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ／Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ Ｋｉｔ ｆｗｏｒ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ, Ｗａｌｔｈａｍ, ＭＡ, ＵＳＡ）を無血清培地（Ｌｏｎｚａ＃ＣＣ－３２０２にＦＢＳのみ添加しないもの）でＣａｌｃｅｉｎ－ＡＭ： Ｆｉｎａｌ ｃｏｎｃ．２μＭ、ＥｔｈＤ－１： Ｆｉｎａｌ ｃｏｎｃ．４μＭに希釈し、第３チャンバのｉｎ側、第４チャンバのｉｎ側からそれぞれ１５０μＬ押し出し、遮光して２０分間室温でインキュベートした。染色終了後に染色液をＨＢＳ

Ｓ（＋）に置換し共焦点顕微鏡にて観察を行った。

撮像した画像は、Ｆｉｊｉ（Ｉｍａｇｅ　Ｊ　１．５３ｃ）を用いて明るさとコントラストを同一条件で補正し、同一条件の閾値以上の輝度を持つ図形を１細胞とし、選択範囲を楕円に近似し、楕円長軸のＹ軸方向に対する角度を算出した。この時、閾値の範囲に関しては、明らかに２細胞以上が接触しているもの、画像から細胞が見切れているもの、閾値の面積が１つの細胞としては小さすぎるまたは大きすぎるものを除外した。

[0116] 図１８から図２１に共焦点レーザー顕微鏡（励起波長４８８ｎｍ）で観察した細胞像および細胞の配向性を解析した結果を示す。図１８はＰＤ－ＭＰＳの細胞の蛍光画像、図１９は６ウェルプレートの細胞の蛍光画像、図２０はＰＤ－ＭＰＳの細胞の配向の分析結果を示すグラフ、図２１は６ウェルプレートの細胞の配向の分析結果を示すグラフ、をそれぞれ示す。図１８及び図１９では、２００μｍのスケールバーを示している。

[0117] 実施例の細胞培養装置を用いて培養した細胞は培養液の流れの方向に配向している様子が観察された（図１８、図２０）。一方、比較例の６ウェルプレートで培養した細胞はランダムに配向している様子が観察された（図１９、図２１）。このことにより、実施例のフィルタ層のラプラスバルブを用いた流路構成により、細胞に培養液の流れ刺激を負荷して培養可能であることが確認された。

[0118] 遺伝子発現解析は次の手順で行った。

流路またはディッシュ上で培養した細胞からＲＮＡを抽出し、遺伝子発現解析を行った。２日間灌流培養を行った細胞の表面をＰＢＳ（－）で置換し、０．０５％トリプシン－５．３ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ液で剥離し、遠心分離して細胞を回収した。

抽出・精製にはＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｄｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ，　Ｈｉｄｅｎ，　Ｇｅｒｍａｎｙ）を用い、逆転写反応には　ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。定量的ＰＣＲには　ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ａｓ

ｓａｙｓ （ＱＩＡＧＥＮ） ａｎｄ ａ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ Ｄｉｃｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（ＴＰ８５０，タカラバイオ）を用いた。プライマーにはＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ Ｐｒｉｍｅｒ Ａｓｓａｙｓ（ＱＩＡＧＥＮ）のｎｉｔｒｉｃ ｏｘｉｄｅ ｓｙｎｔｈａｓｅ ３（ＮＯＳ３），ｔｈｒｏｍｂｏｍｏｄｕｌｉｎ（ＴＨＢＤ），ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ（ＧＡＰＤＨ） を用いた（表１）。

[0119] [表1]

List of primers used in the qPCR.

Gene	Primer	Catalog number
nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (*NOS3*)	Hs_NOS3_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00089033
thrombomodulin (*THBD*)	Hs_THBD_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00199920
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00079247

[0120] 図２２に遺伝子発現解析の結果を示す。図２２は、２日間の培養後のＨＵＶＥＣにおけるＴＨＢＤ及びＮＯＳ３の相対的なｍＲＮＡ発現レベルを示すグラフである。図２２において、白抜きのグラフは比較例、ハッチングしたグラフは実施例をそれぞれ示す。

実施例の細胞培養装置で培養したＨＵＶＥＣは比較例の６ウェルプレートで培養した場合と比較して、ＴＨＢＤの発現が３．３倍向上し、ＮＯＳ３の発現が５倍向上したことが確認された。このことにより、実施例のフィルタ層のラプラスバルブを用いた流路構成により、細胞に培養液の流れ刺激を負荷して培養可能であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0121] 本発明の細胞培養装置及びその製造方法を利用すれば、創薬における医薬品候補化合物の薬効試験、安全性試験、薬物動態評価試験といった試験を、培養細胞を用いて行うことが可能となる。また、本発明は、食品、化成品、

化粧品等の機能や安全性を評価するための動物実験代替法としても利用することができる。さらに、本発明において開示する構造を有する細胞培養装置として販売されることや、細胞培養装置を利用した検査装置としても利用することができる。

符号の説明

[0122] １…細胞培養装置、２…チャンバ層（貯留部）、３…流路プレート（流路形成部）、４…細胞培養部、５…加圧調整装置（循環流れ制御部）、６…気体流入防止部、６ａ…面状構造体（面状の構造体）、６ｈ…貫通孔、２０Ａ－２０Ｄ…第１空間（第２空間）、３０…フィルタ層（フィルタ部）３１…第１気体流入防止部（気体流入防止部）、３１ｈ…貫通孔、３２…第２気体流入防止部（気体流入防止部）、３２ｈ…貫通孔、３３…フィルタ窓孔、３４…貫通孔、４０…第１流路層（流路形成体）、４１，４２…第１流路層における貫通孔、４３，４４…第１流路層において培養液の循環流れを形成する流路、５０…第２流路層（流路形成体）、５１，５２…第２流路層における貫通孔、５３，５４…第２流路層において培養液の循環流れを形成する流路、６０…多孔質膜層、６０ａ…第１面、６０ｂ…第２面、６１，６２…多孔質膜層における貫通孔、７０…第３流路層（流路形成体）、７１，７２…第３流路層における貫通孔、７３，７４…第３流路層において培養液の循環流れを形成する流路、８０…第４流路層（流路形成体）、８３，８４…第４流路層において培養液の循環流れを形成する流路、９１…空圧ポンプ、１３０…トラックエッチ膜、２３０…ハニカムフィルム、３３０…フィルタ層（フィルタ部）、３３０ａ…面状構造体（面状の構造体）、３３０ｈ…貫通孔、３３１…気体流入防止部、３４０…流路層（流路形成体）、５３０…フィルタ層（フィルタ部）Ｗ１Ａ，Ｗ２Ａ…送液流路（培養液の循環流れを形成する流路）、Ｗ１Ｂ，Ｗ２Ｂ…返送流路（培養液の循環流れを形成する流路）

請求の範囲

[請求項1] 液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、

前記第１空間及び前記第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、

前記第１空間、前記第２空間、前記第１流路及び前記第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、

前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、

を備え、

前記流路形成部は、

前記第１流路及び前記第２流路が形成された少なくとも１つの流路形成体と、

少なくとも１つの貫通孔が形成され前記循環流れにおける気体の流入を防止する領域である気体流入防止部が１以上設けられたフィルタ部と、を有する、細胞培養装置。

[請求項2] 前記気体流入防止部は、前記第１流路の端部又は前記第２流路の端部に設けられる、請求項１に記載の細胞培養装置。

[請求項3] 前記貯留部、前記少なくとも１つの流路形成体及び前記気体流入防止部は、それぞれ層状に形成されており、

前記少なくとも１つの流路形成体、前記フィルタ部、前記貯留部の順に積層されている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項4] 前記貫通孔の直径は、０．００５ｍｍ以上０．２ｍｍ以下である、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項5] 前記貯留部は、空気を供給可能な空圧ポンプに接続されている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項6] 前記フィルタ部の少なくとも一部は、感光性のフォトレジストによ

って構成されており、

前記少なくとも１つの貫通孔は、前記フォトレジストに形成されている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項7] 前記気体流入防止部の少なくとも一部は、ポリイミド、ポリカーボネート又はポリエステル製のトラックエッチ膜で構成されている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項8] 前記気体流入防止部の少なくとも一部は、ハニカムフィルムで構成されている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項9] 前記細胞培養部は、前記第２流路及び／又は前記第２流路に設けられている、

請求項１又は２に記載の細胞培養装置。

[請求項10] 前記流路形成部は、細胞を培養するための第１面と前記第１面とは反対の第２面とを有する多孔質膜層を更に有しており、

前記少なくとも１つの流路形成体は、前記多孔質膜層の前記第１面の側に配置される第１流路層及び第２流路層と、前記多孔質膜層の前記第２面の側に配置される第３流路層及び第４流路層と、を含み、

前記第１流路層及び前記第２流路層は、前記多孔質膜層の前記第１面の側において、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る前記培養液の循環流れを形成する流路を含み、

前記第３流路層及び前記第４流路層は、前記多孔質膜層の前記第２面の側において、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る前記培養液の循環流れを形成する流路を含む、

請求項９に記載の細胞培養装置。

[請求項11] 液体培地を貯留可能な第１空間及び第２空間を有する貯留部と、前

記第１空間及び前記第２空間を互いに連通する第１流路及び第２流路を有する流路形成部と、前記第１空間、前記第２空間、前記第１流路及び前記第２流路の少なくとも一部に設けられる細胞培養部と、前記第１空間又は前記第２空間から前記第１流路又は前記第２流路を経て前記第１空間又は前記第２空間に戻る培養液の循環流れを制御するための循環流れ制御部と、

を備える細胞培養装置の製造方法であって、

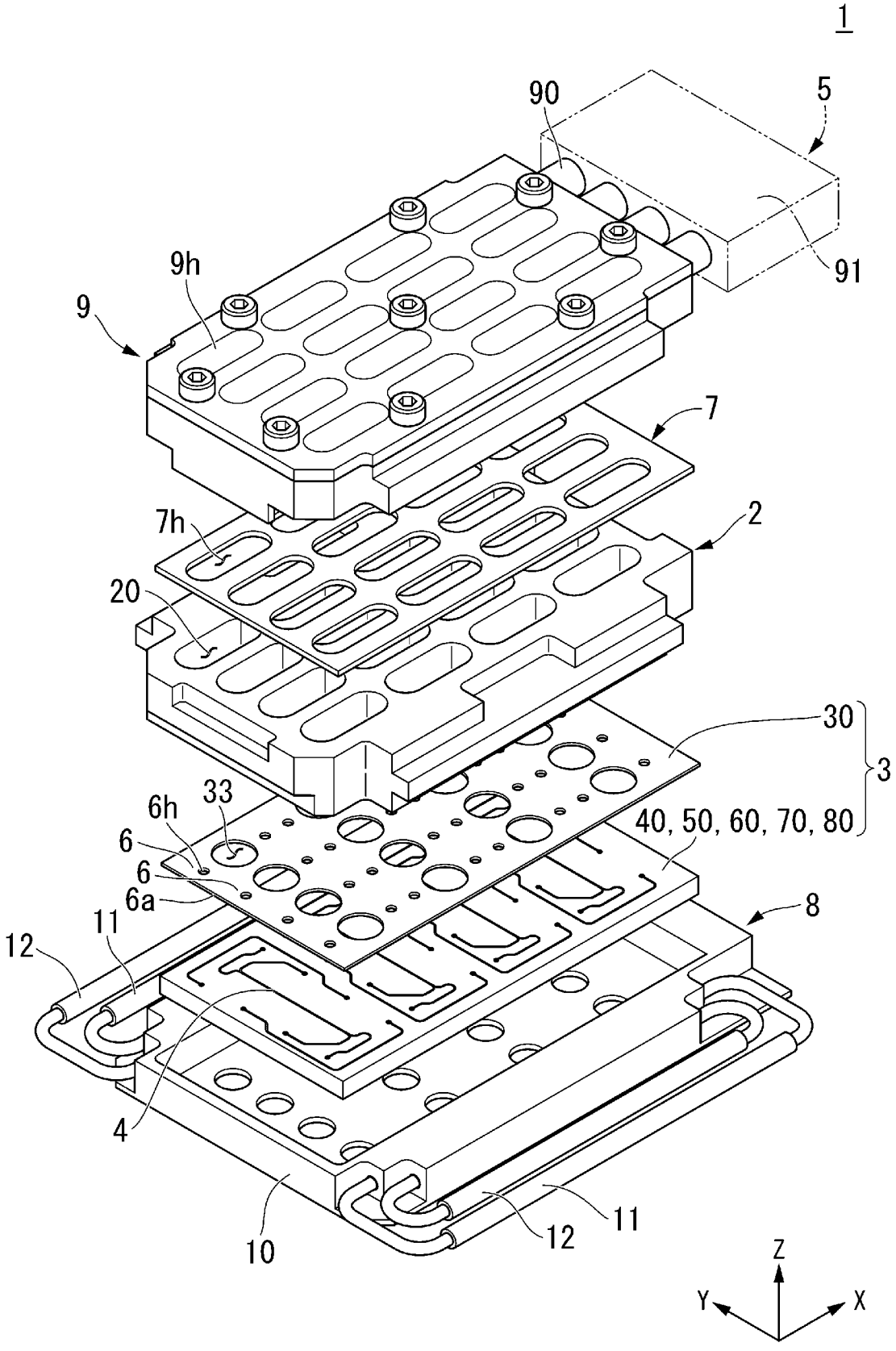
前記貯留部を層状に形成し、

前記第１流路及び前記第２流路が形成された少なくとも１つの流路形成体と、少なくとも１つの貫通孔が形成され前記循環流れにおける気体の流入を防止する領域である気体流入防止部が１以上設けられたフィルタ部とを有する前記流路形成部を、前記少なくとも１つの流路形成体と前記フィルタ部とがそれぞれ層状となるように形成し、

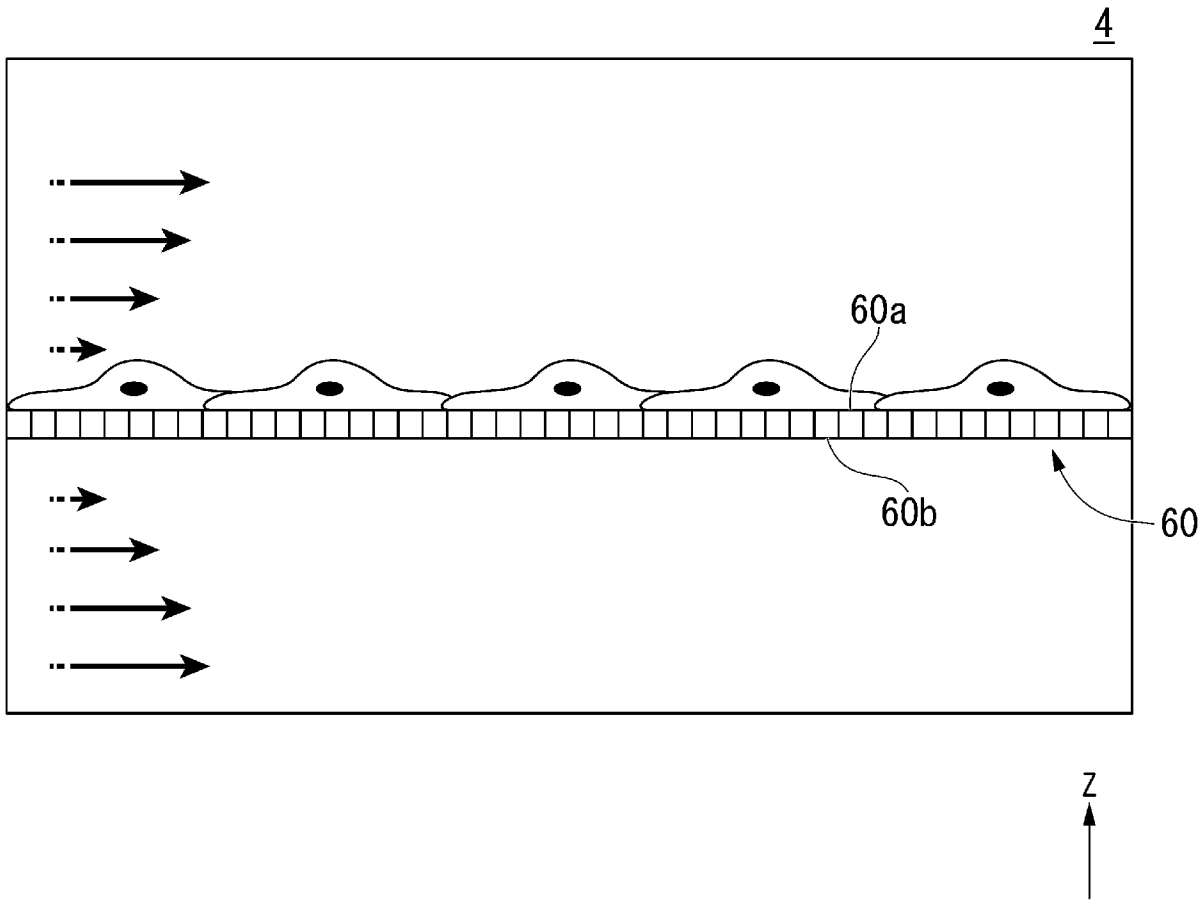
前記少なくとも１つの流路形成体、前記フィルタ部、前記貯留部をこの順に積層して接合する、

細胞培養装置の製造方法。

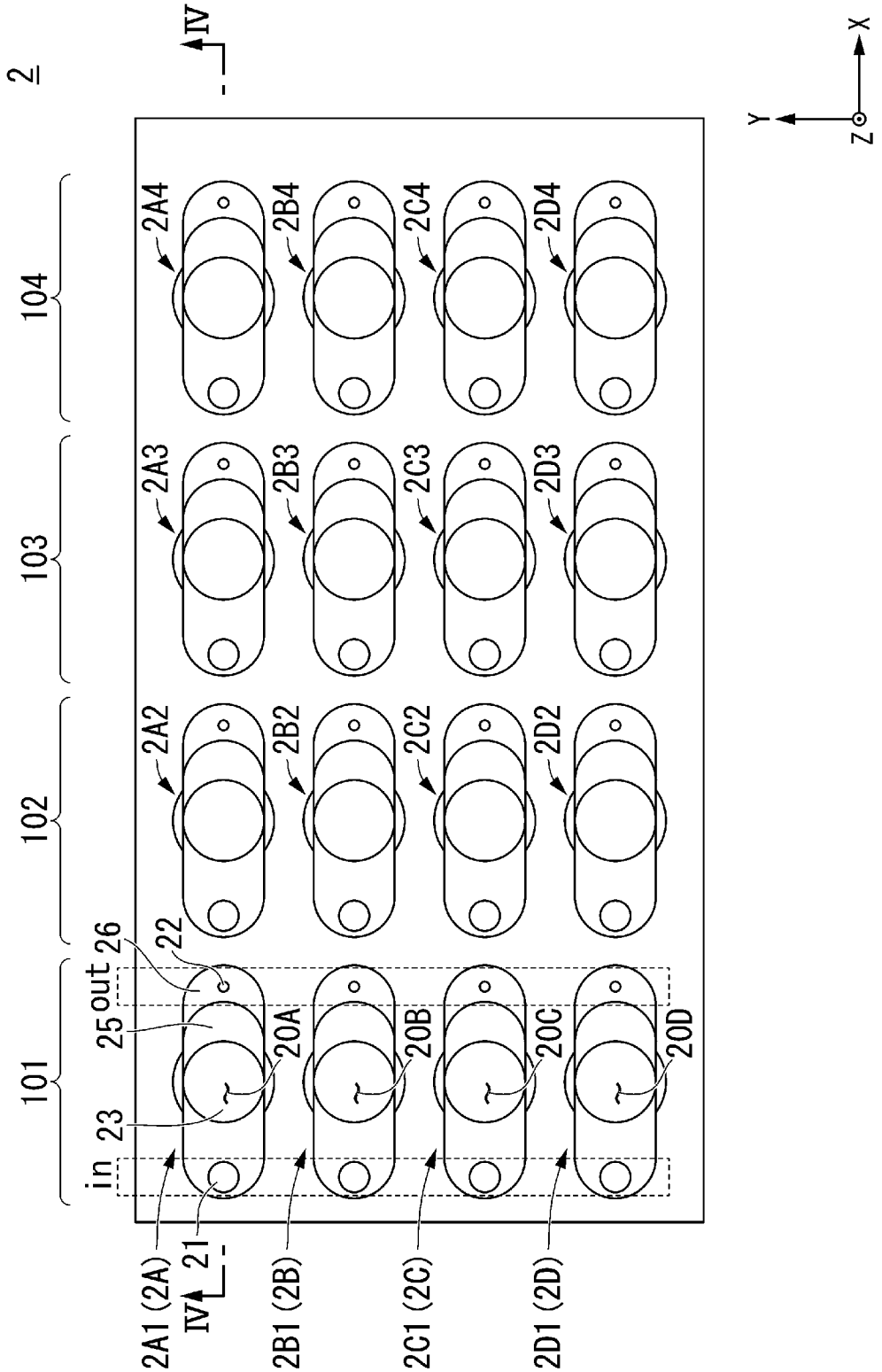
[図1]


1
90
5
91
9h
9
7
7h
2
20
30
3
40, 50, 60, 70, 80
33
6h
6
6
6a
11
12
8
4
10
12
11
Z
Y
X

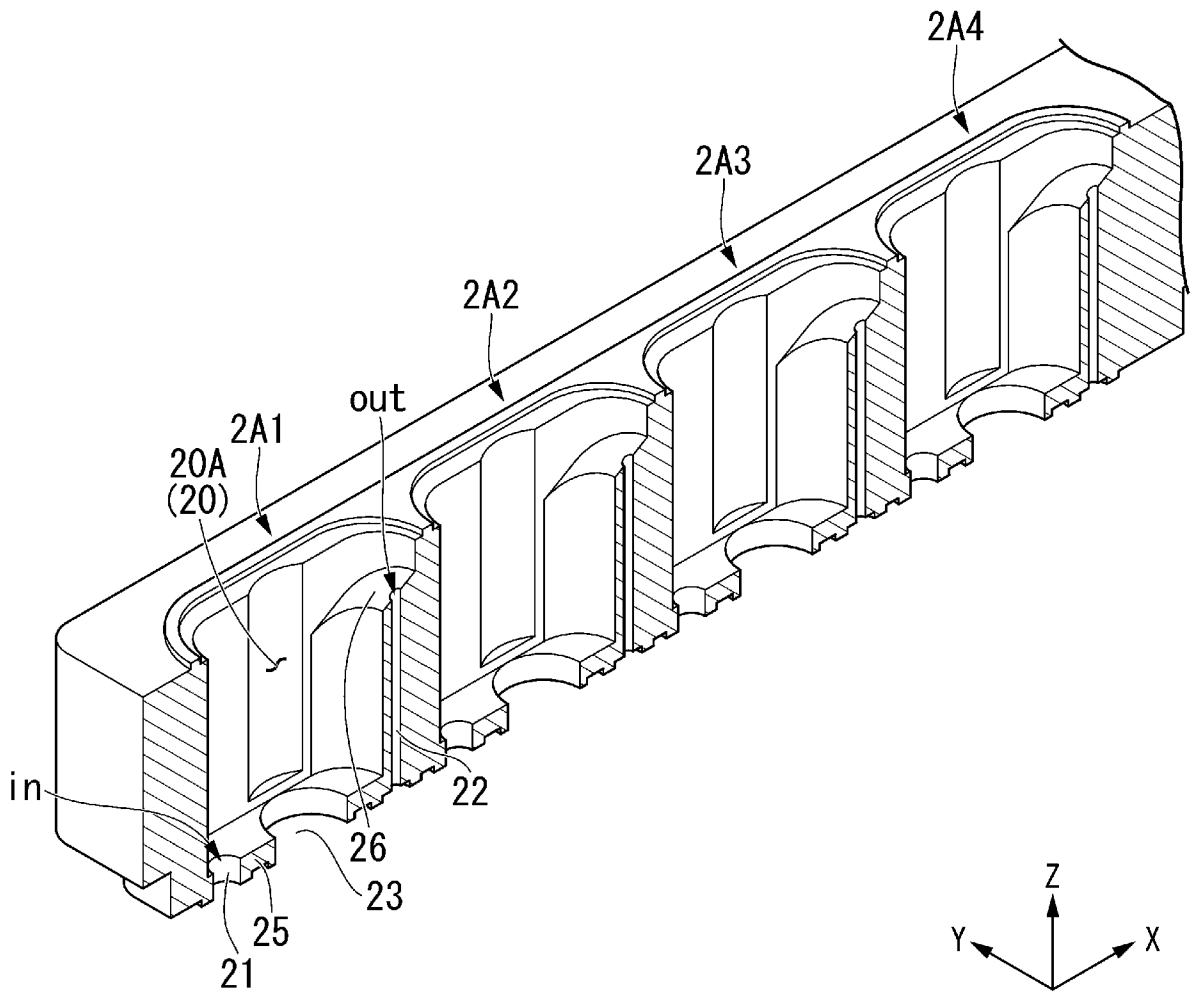
[図2]



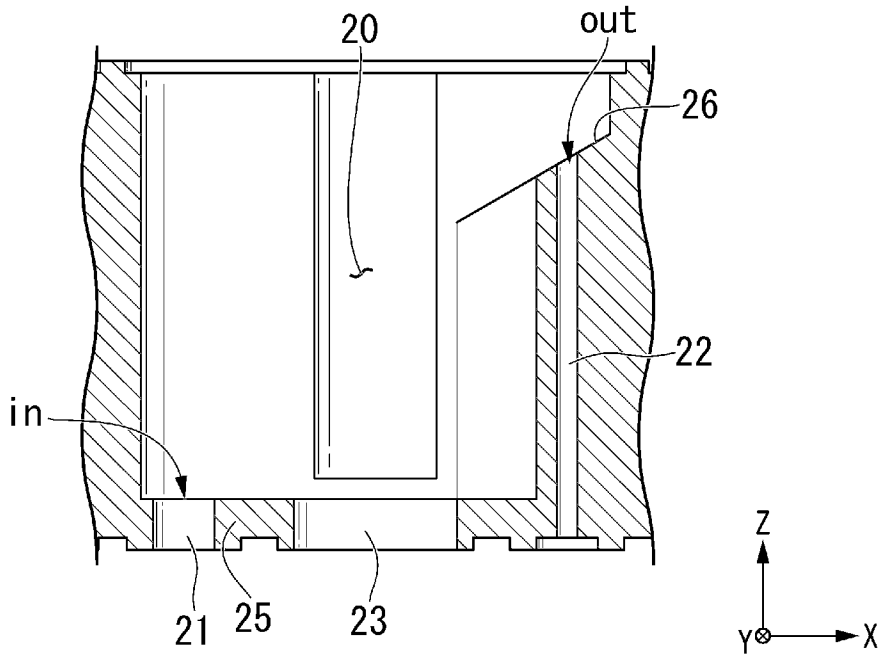
[図3]


2
IV
IV
X
Y
Z
101
102
103
104
2A1 (2A)
2B1 (2B)
2C1 (2C)
2D1 (2D)
2A2
2B2
2C2
2D2
2A3
2B3
2C3
2D3
2A4
2B4
2C4
2D4
20A
20B
20C
20D
21
22
23
25
26
in
out

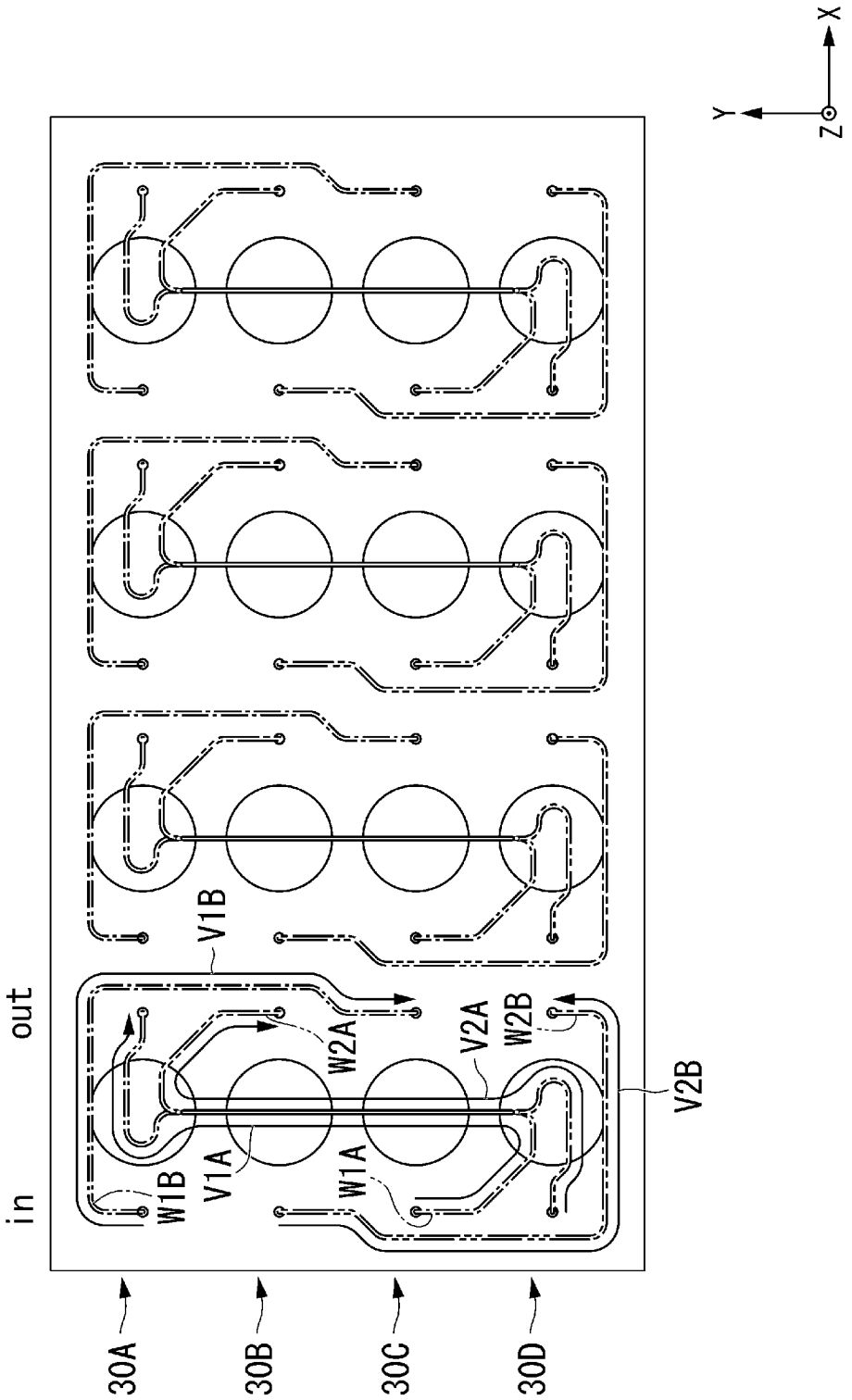
[図4]


2
2A4
2A3
2A2
2A1
out
20A
(20)
in
22
26
23
25
21
Z
Y
X

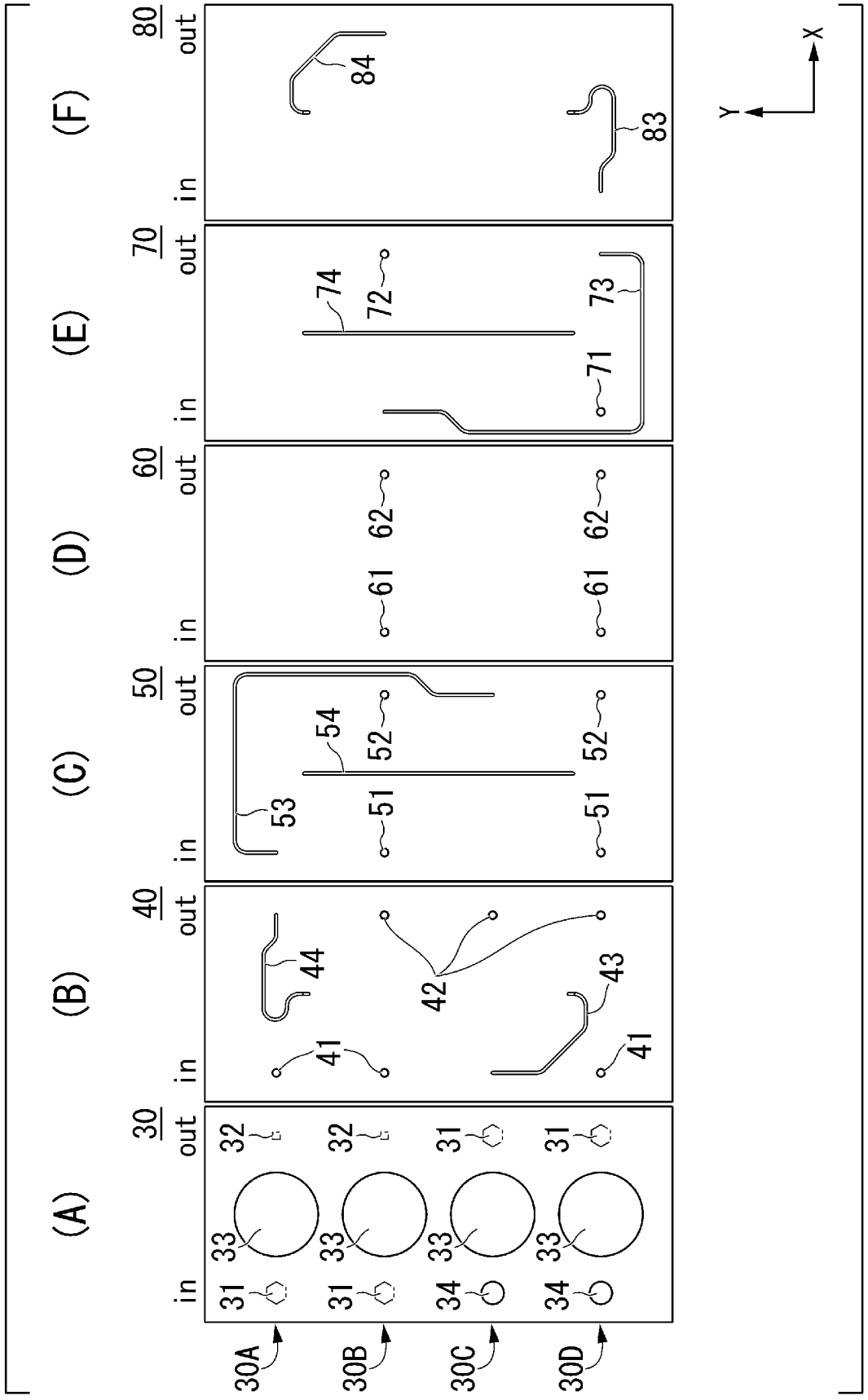
[図5]


20
out
26
22
in
21
25
23
Z
Y
X

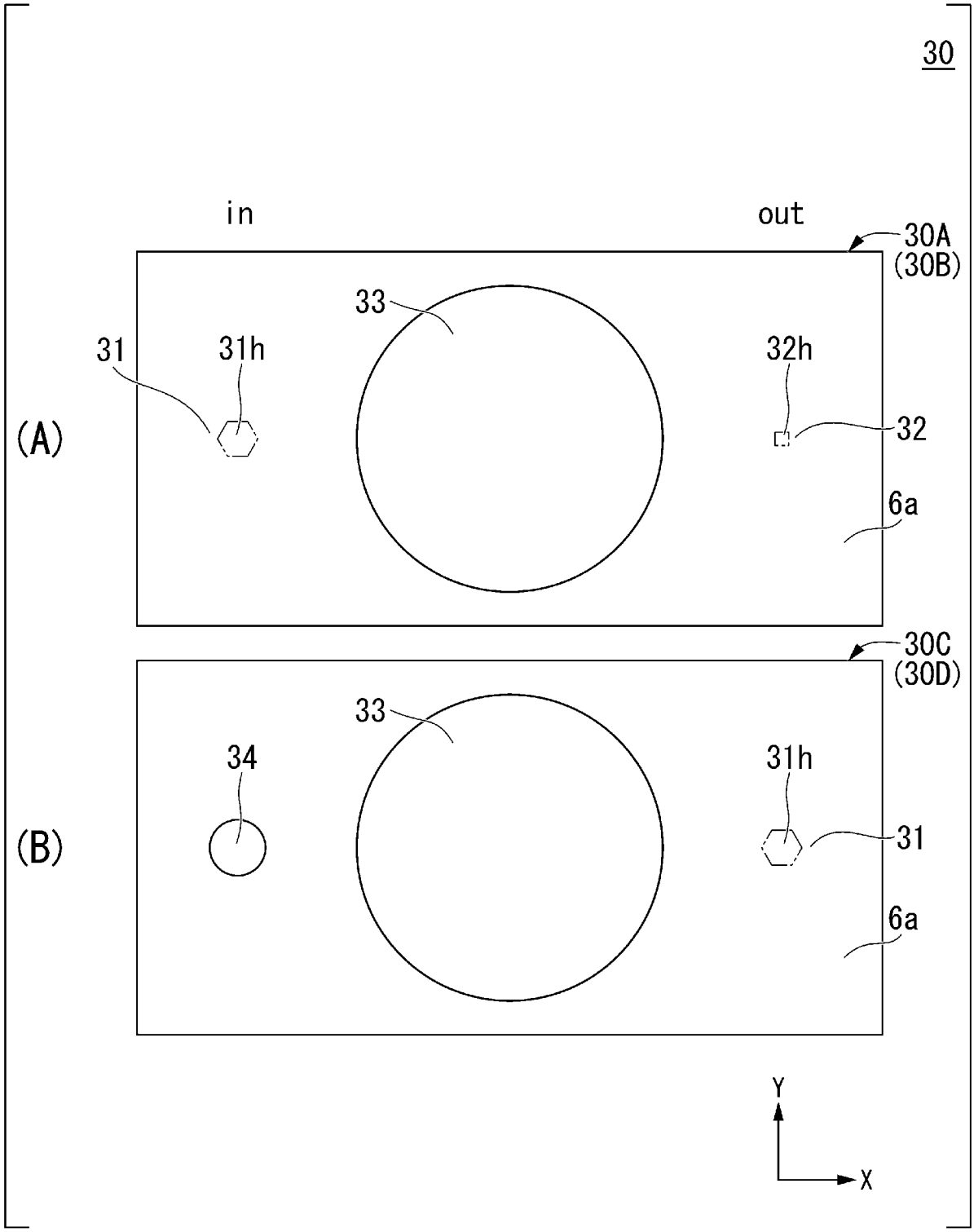
[図6]



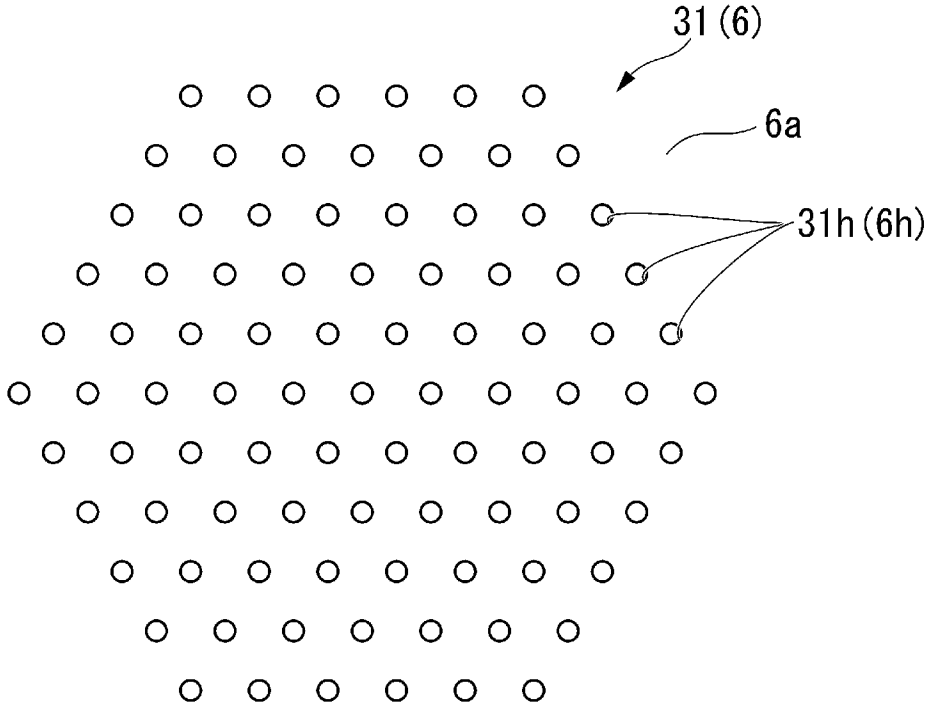
[図7]


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
30
40
50
60
70
80
in
out
31
32
33
34
41
42
43
44
51
52
53
54
61
62
71
72
73
74
83
84
30A
30B
30C
30D
Y
X

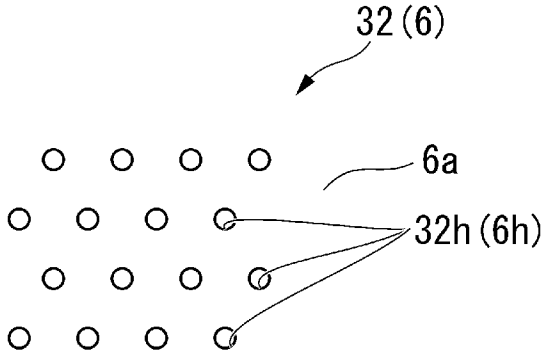
[図8]



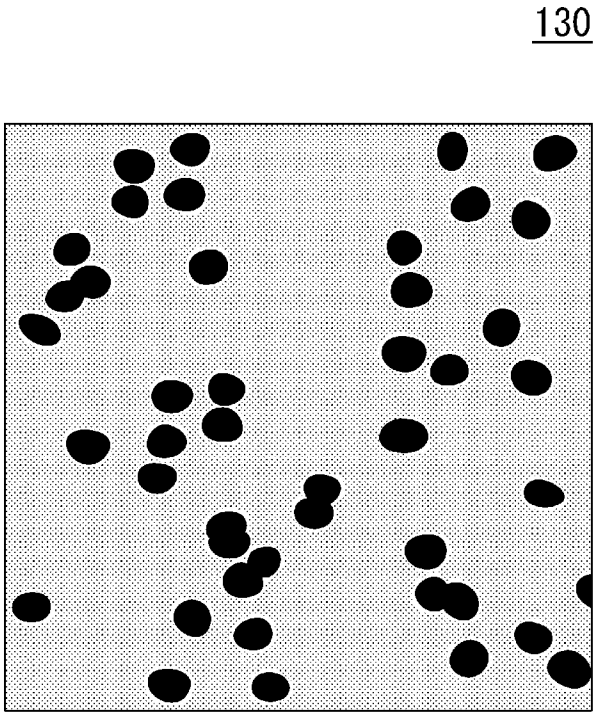
[図9]



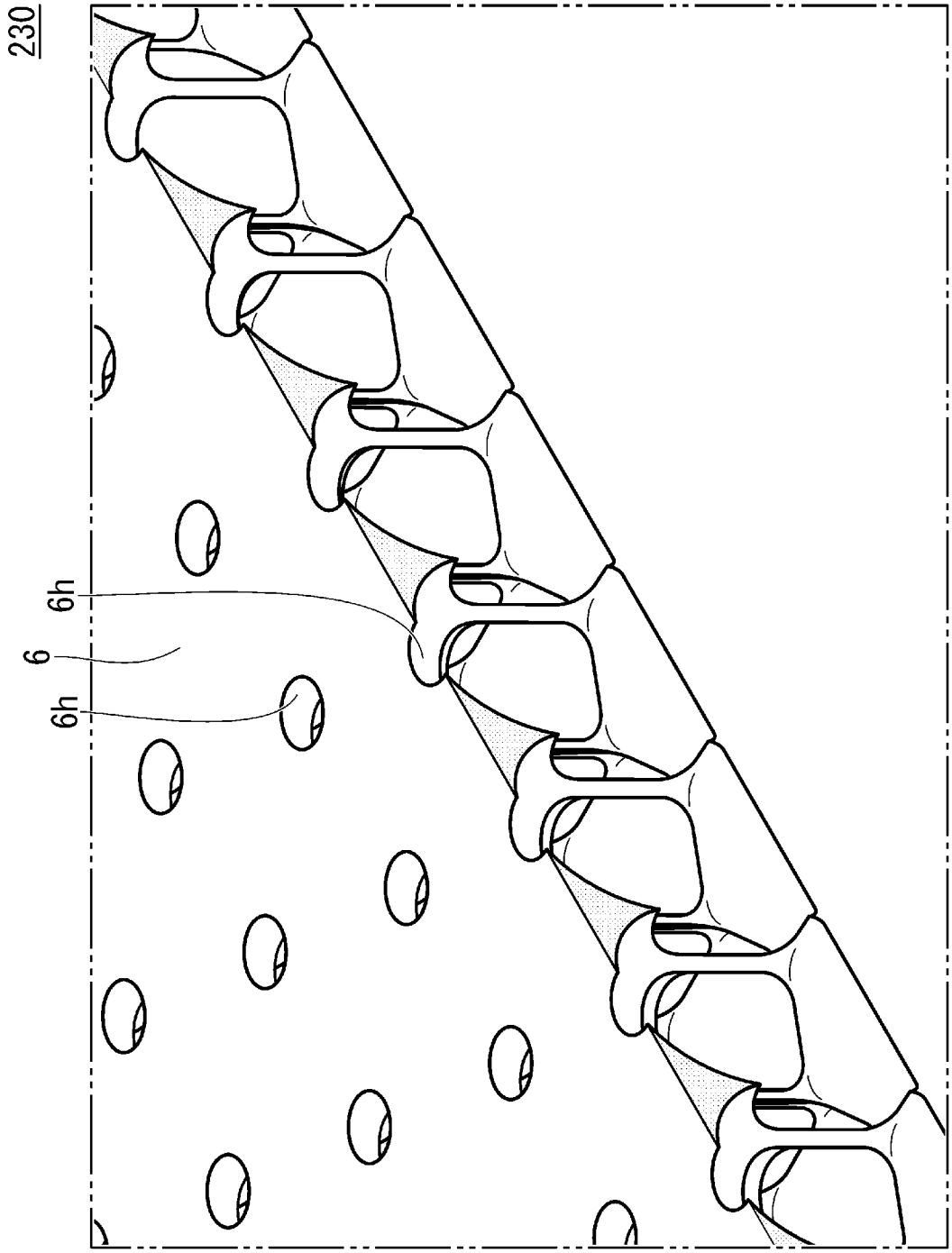
[図10]



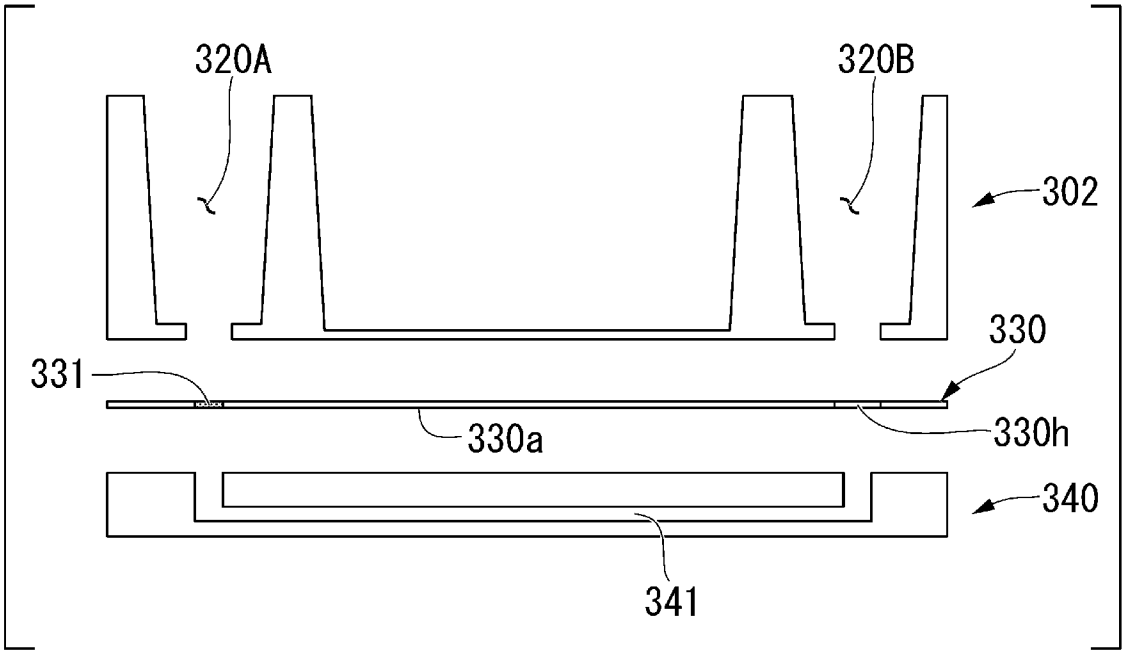
[図11]



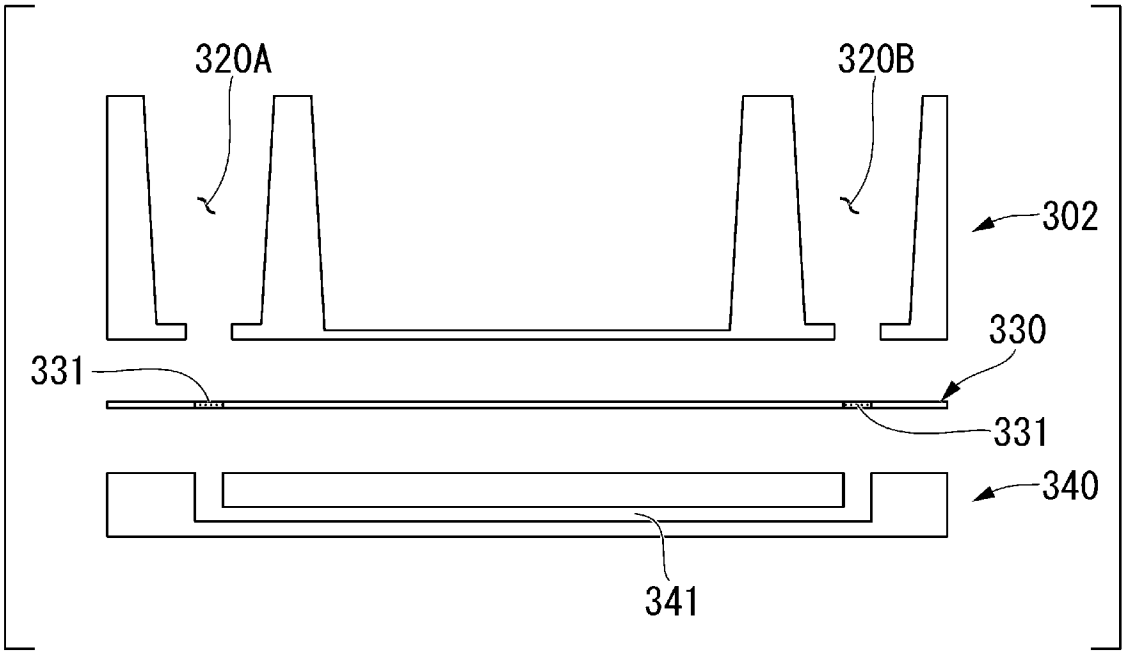
[図12]



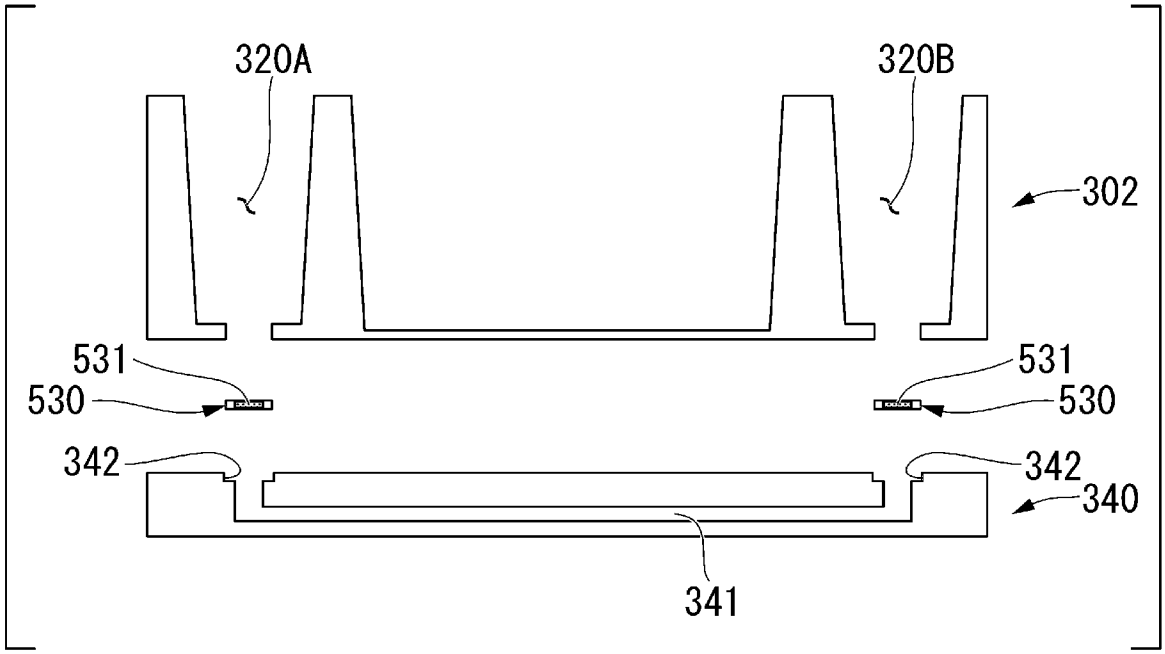
[図13]


320A
320B
302
330
331
330a
330h
340
341

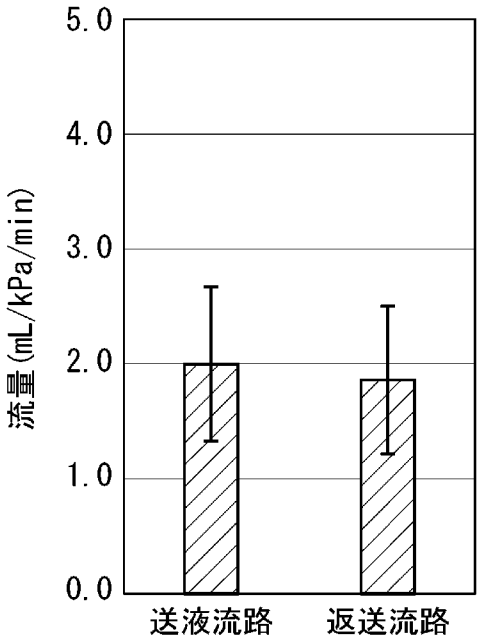
[図14]


320A
320B
302
330
331
331
340
341

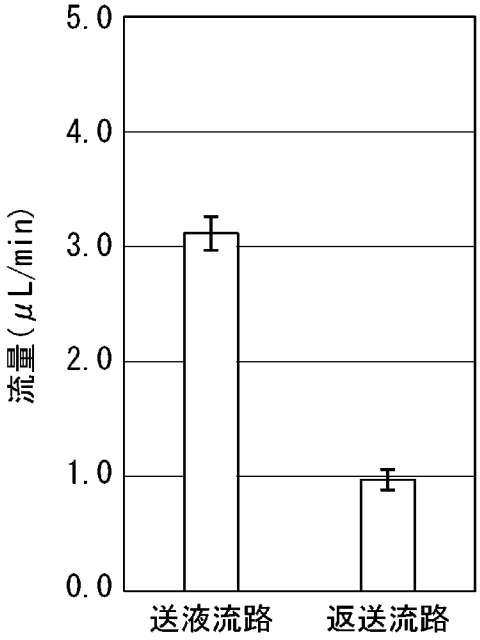
[図15]


320A
320B
302
531
530
531
530
342
342
340
341

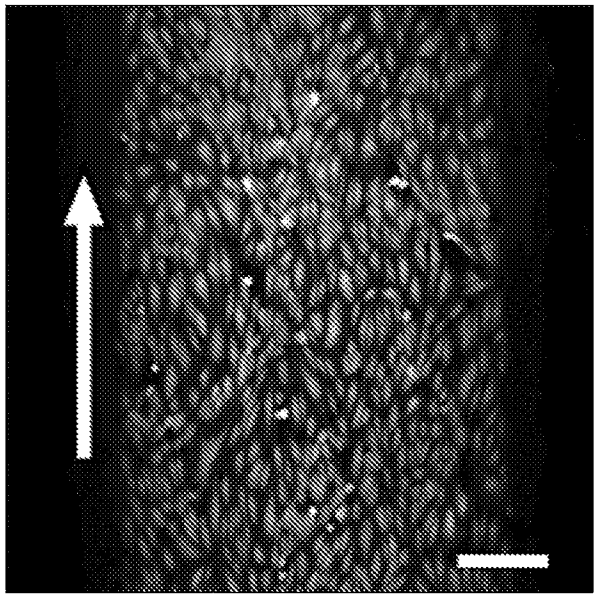
[図16]


5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
流量(mL/kPa/min)
送液流路
返送流路

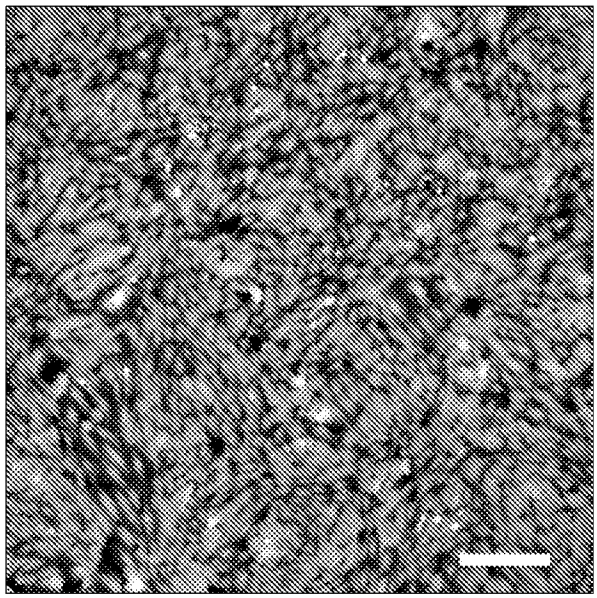
[図17]



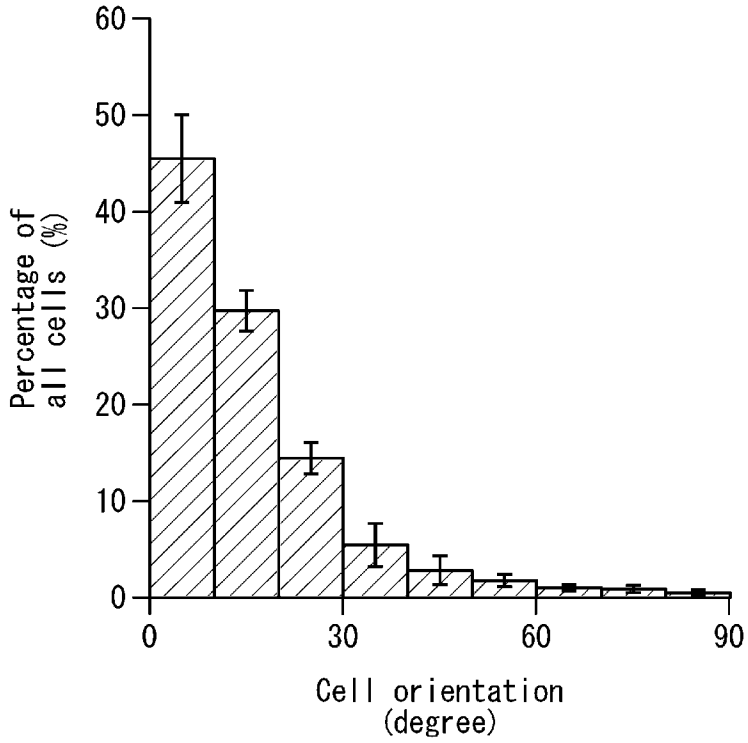
[図18]



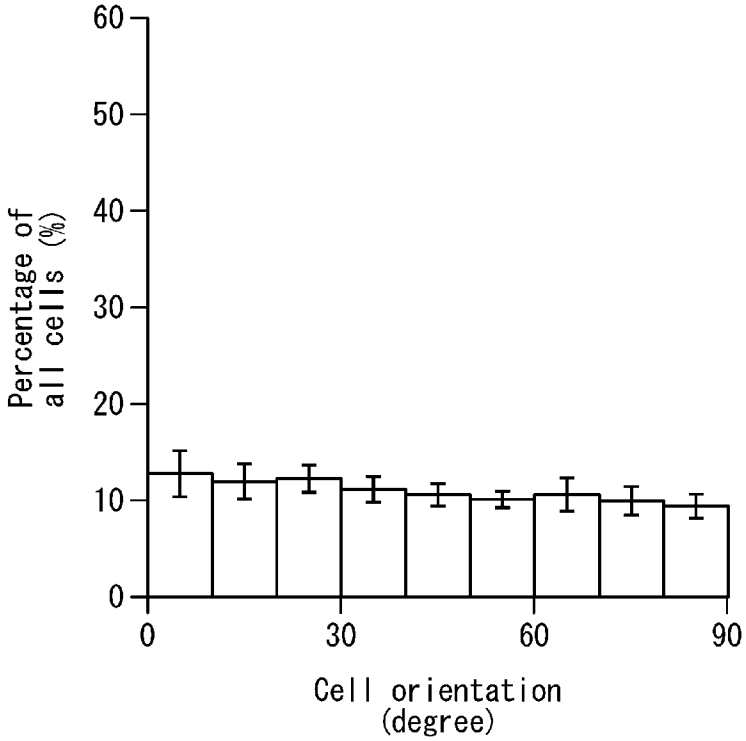
[図19]



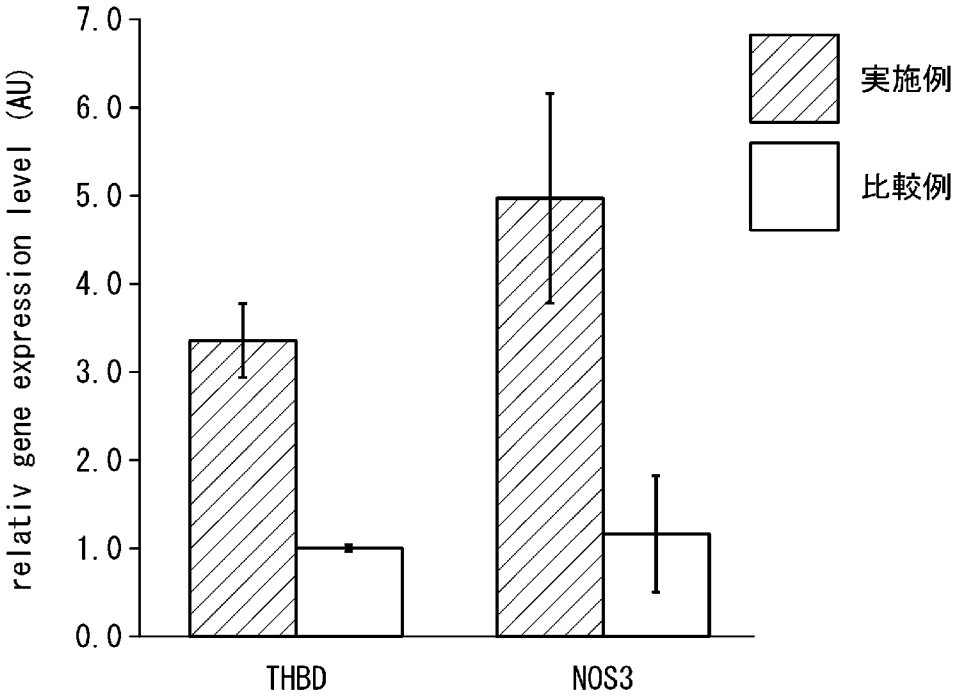
[図20]


60
50
40
30
20
10
0
Percentage of all cells (%)
0
30
60
90
Cell orientation (degree)

[図21]


60
50
40
30
20
10
0
Percentage of all cells (%)
0
30
60
90
Cell orientation (degree)

[図22]


7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
relativ gene expression level (AU)
THBD
NOS3
実施例
比較例

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/031800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 3/00(2006.01)i; ***C12M 1/00***(2006.01)i
FI: C12M3/00 A; C12M1/00 C

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)

C12M3/00; C12M1/00

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/158233 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 October 2016 (2016-10-06) claims, examples, fig. 2A-2C	1-11
Y	US 2018/0200677 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 July 2018 (2018-07-19) paragraph [0109]	1-11

☐ 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
07 November 2023	**14 November 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/JP2023/031800

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2016/158233 A1	06 October 2016	EP 3279310 A1 claims, examples, fig. 2A-2C	
US 2018/0200677 A1	19 July 2018	WO 2016/172675 A1 paragraph [0109]	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/031800

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i
FI: C12M3/00 A; C12M1/00 C

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））

C12M3/00; C12M1/00

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	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
Y	WO 2016/158233 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 06.10.2016 (2016-10-06) 特許請求の範囲、実施例、図２Ａ－２Ｃ	1-11
Y	US 2018/0200677 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19.07.2018 (2018-07-19) [0109]	1-11

☐ 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
07.11.2023	14.11.2023

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）
松原　寛子 4N 4154
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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/JP2023/031800

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2016/158233 A1	06.10.2016	EP 3279310 A1 claims, examples, Fig.2A-2C	
US 2018/0200677 A1	19.07.2018	WO 2016/172675 A1 [00109]	