

(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
2022年4月28日(28.04.2022)



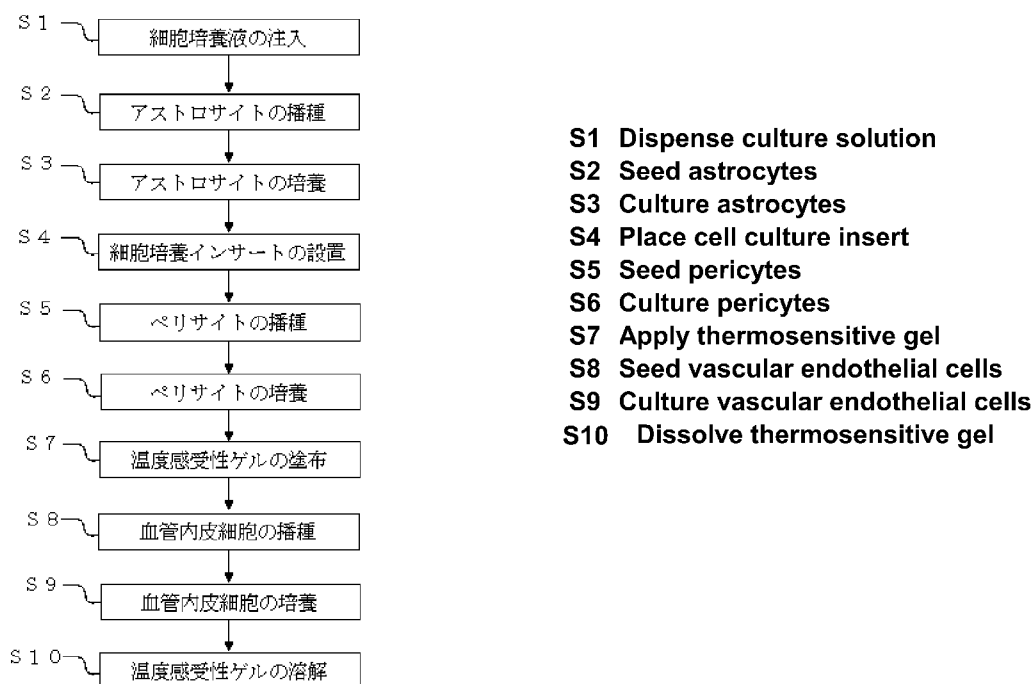
(10) 国際公開番号

WO 2022/085773 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/079 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/039014
- (22) 国際出願日: 2021年10月21日(21.10.2021)
- (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 2020-178448 2020年10月23日(23.10.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 竹下 幸男 (TAKESHITA Yukio); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 藤川 晋(FUJIKAWA Susumu); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 松尾 欣哉 (MATSUO Kinya); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 藤澤 美和子(FUJISAWA Miwako); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 玉田 雅也(TAMADA Masaya); 〒7558505 山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 岡本 雅史(OKAMOTO Masashi); 〒7558505 山

(54) Title: CELL CULTURE METHOD AND CELL CULTURE DEVICE USED THEREFOR

(54) 発明の名称: 細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置



(57) Abstract: The present invention provides: a cell culture method that enables mass production of a BBB model which has a three-layer structure comprising vascular endothelial cells, pericytes, and astrocytes; a cell culture device that is used for the cell culture method; and a cell culture method that enables an increase in mass productivity of the BBB model. A cell culture method according to the present invention comprises: a step for dispensing a culture solution that is in a suspension state onto the outer surface of a porous film of a cell culture insert; a step for seeding astrocyte cells in the



WO 2022/085773 A1

口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人
山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 塩田 考矢
(**SHIOTA Takaya**); 〒7558505 口県宇部市南
小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学医学部
内 Yamaguchi (JP). 畑 朋宏(**HATA Tomohiro**);
〒7558505 口県宇部市南小串1丁目1-1 国
立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP).
福迫 陽人(**FUKUSAKO Haruto**); 〒7558505 山
口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法
人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP).

(74) 代理人: 井上 浩(**INOUE Hiroshi**); 〒7530077 山
口県山口市熊野町1-10 N P Yビル 1F
維新国際特許事務所 Yamaguchi (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, IT, JO, 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,
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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

culture solution and culturing astrocytes; a step for seeding pericyte cells inside the cell culture insert that has been turned upside down, and culturing pericytes; a step for seeding thermosensitive vascular endothelial cells that are embedded in thermosensitive gel, and culturing vascular endothelial cells; and a step for dissolving the thermosensitive gel.

(57) 要約: 血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを量産することが可能な細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置並びにその量産性を高めることが可能な細胞培養方法を提供する。本発明の細胞培養方法は、細胞培養インサートの多孔質膜の外面に懸濁状態の細胞培養液を注入する工程と、この細胞培養液にアストロサイトの細胞を播種してアストロサイトを培養する工程と、上下を反転させた細胞培養インサートの内部にペリサイトの細胞を播種してペリサイトを培養する工程と、温度感受性を有する血管内皮細胞を温度感受性ゲルに包埋された状態で播種して血管内皮細胞を培養する工程と、温度感受性ゲルを溶解させる工程を備えている。

明 細 書

発明の名称：細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置 技術分野

[0001] 本発明は、血液脳関門 (Blood-brain barrier) *in vitro* モデル (以下、BBBモデルという。) を構成する細胞を生体外において培養する技術に係り、特に血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルの大量生産を可能とする細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置に関する。なお、「*in vitro*」とは、「ガラス容器の中で」という意味のラテン語であり、一般に、生体の一部が「生体外に」摘出又は遊離されている状態を表している。

背景技術

[0002] 血液脳関門 (BBB) は解剖学的には脳毛細血管であり、脳由来の血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトなどによって構成されている。血管内皮細胞を取り囲むように存在するペリサイトには血管内皮細胞の分化や増殖を制御するという役割があり、アストロサイトには神経細胞に栄養を与えるとともに、過剰なイオンや神経伝達物質を速やかに除去することによって神経細胞を保護するという役割がある。

血液脳関門 (BBB) には血液と脳の組織液の間で行われる物質の交換を制限するという重要な機能があり、この機能によって神経細胞の恒常性が維持されている。しかしながら、この機能は中枢神経性の疾患に用いられる予防薬や治療薬を開発する上で大きな障害となっている。例えば、中枢神経系に作用させるべき薬物が実際にはBBBによって脳内への移行が阻まれてしまい、期待する効果が得られない場合がある。また、本来、脳内への移行を想定していない薬物が予想に反してBBBを透過してしまい、その結果、中枢神経系に悪影響を及ぼしてしまうこともある。

[0003] どのような物質がBBBを透過するかということについては、一定の法則が無いいため、中枢神経性の疾患に用いられる予防薬や治療薬を開発する際に

は、B B Bモデルを用いたスクリーニングを行うことが必要である。

本願の発明者は、これまでに、B B Bの解剖学的な構造を正確に再現したモデルの開発に成功しており、これにより、現在では、創薬のスクリーニングの研究レベルが飛躍的に向上している。

このB B Bモデルは、アストロサイトとペリサイトが多孔質膜を間に挟むようにしてそれぞれ層状に形成されるとともに、ペリサイトに直接接触するように層状の血管内皮細胞が配置された構造となっている。なお、このB B Bモデルは、従来、熟練した研究者の手作業によって作製されており、その作製には特殊な技術を必要とするため、大量に生産することができないという課題があった。

[0004] 上記B B Bモデルの作製に関連する技術としては、例えば、特許文献1に「細胞培養インサート」という名称で、多孔質膜の両面で細胞を共培養する装置に関する発明が開示されている。

特許文献1に開示された細胞培養装置は、下端に多孔性の膜が取り付けられた外側管状本体と、この外側管状本体の下端の外径に嵌合する相補管状本体と、少なくとも1つのフランジが上端から横方向に延在し、外径の全周または一部が外側管状本体の内径に嵌合する吊下げ構成要素と、を備えており、第1の段階において、外側管状本体が相補管状本体に連結されて第1の細胞培養のための自立インサートを形成し、第2の段階において、外側管状本体が相補管状本体から係脱されるとともに第2の細胞培養のために吊下げ構成要素に取り付けられることを特徴としている。

[0005] この細胞培養装置において、外側管状本体の下端に相補管状本体を連結させた後、両者を反転させることにより、細胞培養チャンバが形成される。そこで、この細胞培養チャンバにおいて、相補管状本体内に突出した膜の外面上に細胞を播種する（第1の細胞播種）。次に、適切な培養期間が経過した時点で、外側管状本体及び相補管状本体の組合体を裏返し、吊下げ構成要素を外側管状本体に連結した後、相補管状本体を取り外す。このようにして得られた吊下げインサートを細胞培養プレートのウェル内に配置し、上方に突

出した状態となっている膜の内面上に第2の細胞播種を実施する。

このように、上記構造の細胞培養装置によれば、膜の外面と内面に対して細胞播種を2段階に分けてそれぞれ行うことで、膜の両面で細胞を共培養することができる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第5674953号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1に開示された発明では、多孔質膜の両面にそれぞれ異なる種類の細胞層が形成された細胞培養モデルを作製することができるものの、細胞培養チャンバ及び吊下げインサートを形成するための操作を1つずつ手作業で行わなければならないことから、細胞培養モデルの量産には不向きである。したがって、特許文献1に開示された細胞培養装置をBBBモデルの作製に適用したとしても、BBBモデルを量産することはできないものと考えられる。

本発明の第1の目的は、このような従来事情に対処してなされたものであり、血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを量産することが可能な細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置を提供することである。また、本発明の第2の目的は、上記3つの細胞が積層された状態を長時間維持することにより、それらの細胞層からなるBBBモデルの量産性を高めることが可能な細胞培養方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記目的を達成するため、第1の発明は、両面が生体材料を定着可能に形成された多孔質膜によって、筒状に形成される内壁が上下に分画された一対の細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備

え、分画されそれぞれ一体化された細胞培養室の少なくともいずれか一方を同時に閉塞する細胞培養室カバーと、を備えていることを特徴とする。

このような構造の細胞培養装置においては、細胞培養室の開口端を覆う細胞培養室カバーを備えているため、細胞培養室内に注入された細胞培養液や播種された細胞がハンドリングの際に細胞培養室から漏出するおそれがないという作用を有する。

なお、一对の細胞培養室の少なくともいずれか一方が細胞培養室カバーによって閉塞される構成としたのは、はじめに多孔質膜の上側（第1の面）に定着させた生体材料を含む一方の細胞培養室を閉塞すれば、その一方の細胞培養室を反転させて下側に向けて他方の細胞培養室を上側にし、先ほどの多孔質膜の裏面（第2の面）に生体材料を定着させて、その後反転させなければ、両方を閉塞しなくとも多孔質膜の両面で生体材料を培養可能であるからである。

また、「分画されそれぞれ一体化された前記細胞培養室の少なくともいずれか一方を同時に閉塞する」とは、一体化された細胞培養室全体を同時に閉塞する場合の他、一体化された細胞培養室を構成する個々の細胞培養室毎に同時に閉塞する場合も含まれることを意味するものである。

[0009] 第2の発明は、第1の発明において、内壁として用いられる複数の第1の貫通孔を有するとともに、この第1の貫通孔を覆うように多孔質膜からなるシートが底面に設置された細胞培養プレートと、上部が開口し、底板に第1の貫通孔とともに内壁として用いられる複数の第2の貫通孔が設けられるとともに、細胞培養プレートの底面に設置される第1の底面カバーと、細胞培養室カバーとして、第1の底面カバーの底板に設置される第2の底面カバーを備え、第2の貫通孔は、細胞培養プレートの底面に設置された状態の第1の底面カバーを平面視した場合に第1の貫通孔と符合する箇所に設けられていることを特徴とする。

第2の発明においては、第1の発明の作用に加え、細胞培養プレートを反転した状態で底面に第1の底面カバーを設置した後、第2の貫通孔の内部に

細胞培養液とともにアストロサイトを播種すると、第2の貫通孔の内壁によって細胞培養液及びアストロサイトの漏出が防止されるため、多孔質膜の外表面でアストロサイトが容易に培養されるという作用を有する。また、第1の底面カバーに第2の底面カバーを設置して、細胞培養プレートに第1の底面カバー及び第2の底面カバーとともに反転させた後、細胞培養プレートの第1の貫通孔の内部に細胞培養液とともにペリサイト及び血管内皮細胞を播種すると、第1の貫通孔の内壁によって細胞培養液、ペリサイト及び血管内皮細胞の漏出が防止されるため、多孔質膜の内表面でペリサイト及び血管内皮細胞が容易に培養されるという作用を有する。さらに、第1の底面カバー及び第2の底面カバーが設置された細胞培養プレートがマイクロプレートとして機能するという作用を有する。

[0010] 第3の発明は、第1の発明において、多孔質膜によって一端が閉塞され、細胞培養室の内壁として用いられる細胞培養インサートの第1内壁と、この細胞培養インサートが内挿され、細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔が設けられた細胞培養プレートと、細胞培養室カバーとして、細胞培養プレートの両面にそれぞれ設置されて細胞培養インサートが内挿された状態の貫通孔を覆う平板状の第1のプレートカバー及び第2のプレートカバーを備えていることを特徴とする。

第3の発明においては、第1の発明の作用に加え、底部を下に向けた状態で細胞培養インサートが貫通孔に設置された細胞培養プレートの上面に第1のプレートカバーを設置した後、この第1のプレートカバーとともに細胞培養プレートを反転させて、細胞培養プレートの貫通孔の内部に細胞培養液とともにアストロサイトを播種すると、細胞培養プレートの貫通孔の内壁によって細胞培養液及びアストロサイトの漏出が防止されるため、多孔質膜の外表面でアストロサイトが容易に培養されるという作用を有する。また、細胞培養プレートにおいて第1のプレートカバーが設置されていない面に第2のプレートカバーを設置して、細胞培養プレートを第1のプレートカバー及び第2のプレートカバーとともに反転させると、細胞培養プレートの貫通孔によ

って細胞培養インサートが底部を下に向けた状態で保持されることになるため、細胞培養インサートの内部に細胞培養液とともにペリサイト及び血管内皮細胞を播種する作業や細胞培養インサートの内部で血管内皮細胞及びペリサイトを培養する作業が容易になるという作用を有する。さらに、第2のプレートカバーが設置された細胞培養プレートがマイクロプレートとして機能するという作用を有する。

[0011] 第4の発明は、第1の発明において、多孔質膜によって一端が閉塞され、内壁として用いられる第2内壁を備えて細胞培養室として用いられる膜保持具と、内壁として用いられる複数の第1の貫通孔が形成された平板状の第1の基部の片面に第1の貫通孔と連通し、膜保持具が内部に設置されて、第1の貫通孔とともに内壁として用いられる第1の筒体が垂直に立設されたプレートと、複数の第1の筒体に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第1の突出部が平板状の第2の基部の片面に設けられ、細胞培養室カバーとして、膜保持具が内部に設置された状態の第1の貫通孔を覆うプレートカバーと、複数の第1の筒体に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第2の突出部が平板状の第3の基部の片面に設けられ、細胞培養室カバーとして、膜保持具が内部に設置された状態の第1の貫通孔を覆うスペーサカバーと、第1の貫通孔と同数の、内壁として用いられる第2の貫通孔が形成された平板状の第4の基部の片面に、第1の筒体とともに細胞培養室を構成し、複数の第1の筒体に対してそれぞれ同時に内挿され、第2の貫通孔とともに内壁として用いられる複数の第2の筒体が第2の貫通孔と連通するように垂直に立設されたスペーサと、平板状の押出板の片面に、複数の第1の貫通孔に対してそれぞれ同時に内挿される複数の押出部が垂直に立設された押出具を備えていることを特徴とする。

[0012] 第4の発明においては、第1の発明の作用に加え、スペーサの第2の筒体の上端に膜保持具を設置し、プレートの第1の筒体をスペーサの第2の筒体に外挿するとともに、第1の筒体に第2の突出部を嵌合させるようにしてスペーサカバーをスペーサに取り付けると、プレートの第1の貫通孔を通して

スペーサの第2の筒体の内部に注入した細胞培養液の漏出がスペーサカバーによって防止されるとともに、スペーサの第2の筒体によって膜保持具が保持された状態になるため、多孔質膜の内面でアストロサイトを培養する作業が容易になるという作用を有する。

また、スペーサの第2の筒体内の細胞培養液を捨てた後、第1の筒体に第1の突出部を嵌合させるようにしてスペーサカバーをスペーサに取り付けて、プレートカバー及びスペーサカバーとともにスペーサを反転させ、さらに、スペーサカバーを取り外した後、スペーサの第2の筒体の内部に細胞培養液とともにペリサイトを播種すると、スペーサの第2の筒体の内壁によって細胞培養液及びペリサイトの漏出が防止されるため、多孔質膜の外面でペリサイトを培養する作業が容易になる。

そして、プレートカバー及びスペーサカバー並びにスペーサをプレートから取り外すとともに、押出具の押出部をプレートの第1の貫通孔に挿入した後、押出板がプレートの第1の基部に当接するように押出具をプレートに近づけると、押出部によって膜保持具が第1の筒体の外部へ押し出されるという作用を有する。

さらに、プレートの第1の筒体の外部へ押し出された膜保持具の上面に血管内皮細胞の細胞シートを敷設した後、血管内皮細胞の細胞シートをスリーブによって上方から打ち抜きつつ、スリーブをそのまま膜保持具に押し込むようにしてスリーブの先端に膜保持具を装着すると、膜保持具とスリーブが一体化することにより、底部に血管内皮細胞の細胞シート、ペリサイト及びアストロサイトからなる3種類の細胞層が形成された細胞培養インサートが得られるという作用を有する。

[0013] 第5の発明は、第1の発明において、多孔質膜によって一端が閉塞され、内壁として用いられる第3内壁を備えて細胞培養室として用いられる膜保持具と、平板状の基部に膜保持具が内部に設置されて細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔が設けられた細胞培養室としてのプレートと、細胞培養室カバーとして、膜保持具が内部に設置された状態の貫通孔を覆うよう

にプレートに設置される平板状の2枚のプレートカバーと、平板状の押出板の片面に、複数の貫通孔に対してそれぞれ同時に内挿される複数の押出部が垂直に立設された押出具を備えていることを特徴とする。

第5の発明においては、第1の発明の作用に加え、プレートの下面にプレートカバーを取り付け、貫通孔の内部に膜保持具を多孔質膜の外面が下側になるように設置した後、プレートの貫通孔の内部に細胞培養液を注入すると、プレートの貫通孔の内壁によって細胞培養液の漏出が防止されるため、多孔質膜の内面でアストロサイトを培養する作業が容易になるという作用を有する。

[0014] また、もう一枚のプレートカバーをプレートの上面に取り付けて、プレートを反転させた後、最初に取り付けたプレートカバーをプレートから取り外した場合、プレートの貫通孔の内部では膜保持具が反転し、多孔質膜の外面が上側を向いた状態となるため、プレートの貫通孔の内部にペリサイトを播種することにより、多孔質膜の内面でペリサイトが容易に培養されるという作用を有する。

さらに、もう一枚のプレートカバーをプレートから取り外すとともに、押出具の押出部をプレートの貫通孔に内挿した後、押出板がプレートの基部に当接するように押出具をプレートに近づけると、押出部によって膜保持具が筒体の外部へ押し出されるという作用を有する。

そして、プレートの筒体の外部へ押し出された膜保持具の上面に血管内皮細胞の細胞シートを敷設した後、血管内皮細胞の細胞シートをインサート本体によって上方から打ち抜きつつ、インサート本体をそのまま膜保持具に押し込むようにしてインサート本体の先端に膜保持具を装着すると、膜保持具とインサート本体が一体化することにより、底部に血管内皮細胞の細胞シート、ペリサイト及びアストロサイトからなる3種類の細胞層が形成された細胞培養インサートが得られるという作用を有する。

[0015] 第6の発明は、第5の発明において、プレートは、基部の両面に貫通孔と連通する第1の突出部及び第2の突出部が基部を平面視して貫通孔を囲むよ

うにそれぞれ設けられ、プレートカバーは、複数の第1の突出部及び第2の突出部に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第1の筒体が片面に設けられ、押出具は、押出部よりも短く、複数の第1の突出部及び第2の突出部に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第2の筒体が押出部をそれぞれ囲むように押出板の片面に設けられていることを特徴とする。

なお、第6の発明における「プレートの第1の突出部及び第2の突出部」、「プレートカバーの第1の筒体」及び「押出具の第2の筒体」はそれぞれ実施の形態において図11(a)、図11(c)及び図11(f)を用いて後述する「プレート14の第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14c」、「プレートカバー15の保持部15bを構成する短円筒体」及び「押出具17の保持部17bを構成する短円筒体」の上位概念に相当する。

第6の発明においては、第5の発明の作用に加え、プレートの第1の突出部又は第2の突出部にプレートカバーの第1の筒体を嵌合させることにより、プレートに対するプレートカバーの密着性が高まるとともに、プレートの第1の突出部又は第2の突出部に押出具の第2の筒体を嵌合させることにより、プレートに対する押出具の位置合わせが正確になされるという作用を有する。

[0016] 第7の発明は、第1の発明において、多孔質膜によって一端が閉塞され、内壁として用いられる第4内壁を備えて細胞培養室として用いられる細胞培養インサートと、上部が開口し、内壁として用いられるとともに細胞培養インサートが内挿される複数の貫通孔が底板に設けられて細胞培養室として用いられる細胞培養ケースと、この細胞培養ケースの複数の貫通孔に対して複数の細胞培養インサートをそれぞれ同時に内挿可能な状態で保持するインサート保持手段と、細胞培養ケースの上部に細胞培養室カバーとして覆設されるケース用蓋を備えることを特徴とする。

第7の発明では、第1の発明の作用に加え、インサート保持手段によって保持された複数の細胞培養インサートを伏せた状態にして、複数の細胞培養インサートに対し底部が各貫通孔からそれぞれ突出するように細胞培養ケー

スを設置した後、細胞培養ケースの中に細胞培養液を注入した場合、細胞培養ケースは細胞培養液が漏出しないように内部に貯留するという機能を有していることから、多孔質膜の外側でアストロサイトが容易に培養されるという作用を有する。

[0017] また、細胞培養ケースの上面にケース用蓋を取り付けた後、インサート保持手段とともに細胞培養ケースを反転させた場合、細胞培養ケースからの細胞培養液の漏出がケース用蓋によって防止されるとともに、複数の細胞培養インサートが同時に反転して、上側を向いた状態となるため、細胞培養インサートの内部にペリサイトを播種することにより、多孔質膜の内側でペリサイトが容易に培養されるという作用を有する。

さらに、細胞培養インサートの内部に血管内皮細胞を播種して培養することにより、血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3種類の細胞層が底部に形成された細胞培養インサートを得た場合、複数の細胞培養インサートがインサート保持手段により一体化されていることから、マイクロプレートのウェルへの移し替え作業が容易である。

[0018] 第8の発明は、両面が生体材料を定着可能に形成された多孔質膜によって、筒状に形成される内壁が上下に分画された複数対の細胞培養室を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する細胞培養方法であって、多孔質膜において上方を向いている第1の面にアストロサイトを播種する工程と、アストロサイトを培養する工程と、複数対の細胞培養室の上端開口部を同時に閉塞する工程と、複数対の細胞培養室を同時に反転して多孔質膜の第2の面にペリサイトを播種する工程と、ペリサイトを培養する工程と、多孔質膜の第2の面上にシート状の血管内皮細胞を敷設する工程と、血管内皮細胞を培養する工程を備えていることを特徴とする。

なお、発明の実施の形態では、アストロサイト、ペリサイト及び血管内皮細胞を培養する工程と細胞培養液を細胞培養インサートに注入する工程を別の工程として説明しているが、細胞培養装置の構造によっては、ペリサイト

や血管内皮細胞の培養時に、アストロサイトの培養に用いられた細胞培養インサートを利用できる状況にあり、改めて細胞培養液を細胞培養インサートに注入する必要がない場合もあることから、第8の発明及び第9の発明においては、アストロサイト、ペリサイト及び血管内皮細胞を培養する工程には、細胞培養インサートに注入済みの細胞培養液を利用できる工程と新たに細胞培養液を細胞培養インサートに注入する工程のいずれかの工程が含まれるものとする。

第8の発明においては、複数対の細胞培養室の上端開口部を同時に閉塞した状態でそれらの細胞培養室を同時に反転する工程を備えているため、細胞培養室内に注入された細胞培養液や播種された細胞がハンドリングの際に細胞培養室から漏出するおそれがないという作用を有する。

[0019] 第9の発明は、第8の発明において、血管内皮細胞は温度感受性を有して所望の温度で細胞増殖が停止するとともに、多孔質膜の第2の面上にシート状の血管内皮細胞を敷設する工程に代えて、上記温度で溶解する温度感受性ゲルに血管内皮細胞を包埋した状態で多孔質膜の第2の面上に播種する工程を備えるとともに、血管内皮細胞を培養する工程の後に温度感受性ゲルを溶解させる工程を備えていることを特徴とする。

第9の発明においては、第8の発明の作用に加え、温度感受性ゲルの溶解により、アストロサイト、ペリサイト及び血管内皮細胞がきれいに積層された状態が完成されるとともに、それらの温度を細胞増殖が開始される温度に下げるまで、上述の3つの細胞が積層された状態が維持されるという作用を有する。

発明の効果

[0020] 第1の発明によれば、多孔質膜によって分画された一对の細胞培養室が複数連結して一体化した細胞培養室の少なくともいずれか一方が細胞培養室カバーによって閉塞されており、細胞培養室の内部に注入された細胞培養液や播種された細胞がハンドリングにおける反転の際に漏出するおそれなく同時にハンドリングを進めることができるため、ハンドリング装置を用いるこ

とにより、多孔質膜の反転作業や作製されたBBBモデルをマイクロプレートのウェルに移し替える作業を効率よく行うことが可能である。さらに、複数の細胞培養室に対して時間差のないハンドリングを施すことが可能であるので、細胞培養室間で均質な細胞培養を実施することが可能である。

[0021] 第2の発明によれば、第1の発明の効果に加え、細胞培養インサートを必要としないことに加え、細胞培養プレートをそのままマイクロプレートとして利用することができることから、細胞培養インサートやマイクロプレートを用いる場合に比べて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルの量産性が高まるという効果を奏する。

[0022] 第3の発明によれば、多孔質膜の外側から細胞培養液及びアストロサイトがこぼれてしまうことが無いように、第1の発明の効果に加え、多孔質膜の外側にアストロサイトの細胞層を効率よく形成することができるという効果を奏する。また、複数の貫通孔の内部に細胞培養インサートがそれぞれ設置された状態の細胞培養プレートを反転させた場合、多孔質膜の反転という作業が全ての細胞培養インサートに対して同時に行われるため、多孔質膜の両面にアストロサイトとペリサイトの細胞層が短時間で形成される。したがって、第3の発明によれば、血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを効率よく作製することが可能である。

[0023] 第4の発明によれば、多孔質膜を反転させる作業、プレートの貫通孔の内部から膜保持具を取り出す作業及びペリサイトの上部に血管内皮細胞を配置する作業が複数の多孔質膜や膜保持具に対して同時に行われるため、第1の発明の効果に加え、複数のBBBモデルを短時間で作製できるという効果を奏する。

[0024] 第5の発明によれば、多孔質膜の両面でアストロサイトとペリサイトをそれぞれ培養する際に必要な多孔質膜を反転させる作業、プレートの貫通孔の内部から膜保持具を取り出す作業及びペリサイトの上部に血管内皮細胞を配置する作業が複数の多孔質膜や膜保持具に対して同時に行われるため、第1の発明の効果に加え、複数のBBBモデルを短時間で作製できるという効果

を奏する。

[0025] 第6の発明によれば、第1の筒体によってプレートに対するプレートカバーの密着性が高まるため、第5の発明の効果に加え、貫通孔の内部に注入された細胞培養液がプレートとプレートカバーの間から漏れ出すことを確実に防止できるという効果を奏する。また、第6の発明によれば、第2の筒体によってプレートに対する押出具の位置合わせが正確になされるため、プレートや押出具が故障し難いという効果を奏する。

[0026] 第7の発明によれば、複数の細胞培養インサートを一体化した状態で反転したり、マイクロプレートのウェルに移し替えたりすることができるため、第1の発明の効果に加え、複数のBBBモデルを短時間で効率よく作製できるという効果を奏する。

[0027] 第8の発明では、細胞培養室の内部に注入された細胞培養液や播種された細胞がハンドリングの際に漏出するおそれがないため、ハンドリング装置などを用いて複数対の細胞培養室を同時に効率よく反転させることができる。これにより、血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルの量産性が高まる。

[0028] 第9の発明によれば、第8の発明の効果に加え、血管内皮細胞の細胞シートを予め準備する必要がなく、当該細胞シートを作成する工程を省くことができるため、上記3つの細胞層からなるBBBモデルの量産性を高めることができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0029] [図1] (a) 及び (b) はそれぞれ細胞培養インサートの外観斜視図及び縦断面図であり、(c) はマイクロプレートの外観斜視図であり、(d) は同図(c) におけるA-A線矢視断面図である。

[図2] 本発明の第1の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図3] (a) 及び (b) は細胞培養インサートの多孔質膜の外面に細胞培養液が注入される様子を示した図であり、(c) はマイクロプレートのウェルに

設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示した図である。

[図4] (a) は図3 (c) におけるB-B線矢視断面図であり、(b) は同図 (a) において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[図5] (a) 及び (b) はそれぞれインサート保持プレート及び細胞培養ケースの外観斜視図である。

[図6] (a) 及び (b) はそれぞれインサート押え具及びケース用蓋の外観斜視図である。

[図7] 本発明の第2の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図8] (a) は細胞培養インサートがインサート保持プレートに設置された状態を示す斜視図であり、(b) は同図 (a) におけるC-C線矢視断面図である。

[図9] (a) は図8 (a) におけるインサート保持プレートの上方に細胞培養ケースが設置された状態を示した斜視図であり、(b) は同図 (a) における細胞培養ケースにケース用蓋が取り付けられた後でインサート保持プレートとともに反転された状態を示した斜視図である。

[図10] (a) は図9 (b) におけるD-D線矢視断面図であり、(b) はインサート保持プレートとインサート押え具が取り付けられた細胞培養インサートがマイクロプレートのウェルに設置された状態を示す斜視図である。

[図11] (a) はプレートカバー及びプレートの側面図であり、(b) 及び (c) はそれぞれスペーサ及び押出具の側面図であり、(d) 乃至 (f) はそれぞれ多孔質膜、膜保持具及びインサート本体の外観斜視図である。

[図12] (a) 及び (c) はそれぞれ図11 (a) に示したプレート及びプレートカバーの平面図であり、(b) 及び (d) はそれぞれ同図 (a) におけるE-E線矢視断面図及び同図 (c) におけるF-F線矢視断面図である。

[図13] (a) は図11 (b) 及び図11 (c) に示したスペーサ及び押出具の平面図であり、(b) 及び (c) はそれぞれスペーサ及び押出具の断面図である。

[図14] (a) 及び (c) はそれぞれ図11 (f) 及び図11 (e) に示したインサート本体及び膜保持具の平面図であり、(b) 及び (d) はそれぞれ同図 (a) におけるH-H線矢視断面図及び同図 (c) におけるI-I線矢視断面図である。

[図15] 本発明の第3の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図16] (a) は下面がプレートカバーで覆われるとともに内部に膜保持具が設置されたプレートの内部にアストロサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、(b) はプレートの上部がプレートカバーで覆われた状態を示した断面図である。

[図17] (a) は図16 (b) において上下が反転された後、下面に設置されていたプレートカバーが取り外されるとともに、プレートの内部にペリサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、(b) は同図 (a) において下面に設置されていたプレートカバーが取り外されて図11 (c) に示す押出具が設置された状態を示した断面図である。

[図18] (a) は図17 (b) において多孔質膜の外面にシート状の血管内皮細胞が敷設された状態を示した断面図であり、(b) は同図 (a) において膜保持具がインサート本体の下端に装着された状態を示した断面図であり、(c) は膜保持具とインサート本体からなる細胞培養インサートの断面図である。

[図19] (a) は下面が図11 (b) に示したスペーサで覆われるとともに内部に膜保持具が設置されたプレートの内部にアストロサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、(b) はプレートの上部と下部がスペーサで覆われた状態を示した断面図である。

[図20] 図19 (b) において上下が反転された後、下面に設置されていたスペーサが取り外されるとともに、プレートの内部にペリサイトの細胞が播種された状態を示した断面図である。

[図21] (a) 及び (b) はプレートの外観斜視図であり、(c) 及び (d)

はそれぞれプレートカバー（スペーサカバー）及びスペーサの外観斜視図である。

[図22] (a) 乃至 (c) はそれぞれ押出具、膜保持具及びスリーブの外観斜視図であり、(d) 及び (e) はそれぞれ同図 (b) における J-J 線矢視断面図及び同図 (c) における K-K 線矢視断面図である。

[図23] (a) 及び (b) はそれぞれプレートの円筒体にスペーサの円筒体が内挿された状態を示す縦断面図及びプレートの円筒体に押出具の押出部が内挿された状態を示す縦断面図である。

[図24] 本発明の第 4 の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図25] (a) は図 2 1 (d) に示したスペーサの円筒体の上端に膜保持具が設置された状態を示す図であり、(b) は同図 (a) のスペーサにおいてスペーサカバー及びプレートが取り付けられて上下が反転された状態を示した図であり、(c) は同図 (b) におけるスペーサ及びプレートの円筒体並びに膜保持具の縦断面図である。

[図26] (a) は図 2 5 (b) のプレートにおいてプレートカバーが取り付けられて上下が反転された状態を示した図であり、(b) は同図 (a) においてスペーサカバーが取り外された状態を示した図である。

[図27] (a) は図 2 6 (b) におけるスペーサ及びプレートの円筒体並びに膜保持具の縦断面図であり、(b) は図 2 6 (b) のスペーサに再びスペーサカバーが取り付けられた状態を示した図であり、(c) は同図 (b) においてプレートカバー及びスペーサカバーが取り外されて押出具がプレートに取り付けられた状態を示した図である。

[図28] (a) は図 2 7 (c) におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及び膜保持具の縦断面図であり、(b) は図 2 7 (c) においてプレートの円筒体の上方へ押し出された膜保持具の上面に血管内皮細胞の細胞シートが敷設された状態を示した図であり、(c) は同図 (b) におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及び膜保持具の縦断面図である。

[図29] (a) は図28 (b) に示した血管内皮細胞の細胞シートがスリーブによって打ち抜かれる様子を表した図であり、(b) は同図(a)において血管内皮細胞の細胞シートを打ち抜いたスリーブに膜保持具が装着された状態を示した図である。

[図30] (a) は図29 (b) においてスリーブと膜保持具からなる細胞培養インサートの縦断面図であり、(b) は同図(a) 示した細胞培養インサートがマイクロプレートのウェルに設置される様子を示した図である。

[図31] 図24 に示した工程図の変形例を示した図である。

[図32] (a) は図27 (c) において膜保持具にスリーブが装着された状態を示した図であり、(b) は同図(a) におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及びスリーブと膜保持具からなる細胞培養インサートの縦断面図である。

[図33] (a) 乃至 (c) はそれぞれ細胞培養プレート、上面カバー（下面カバー）及び細胞培養インサートの外観斜視図である。

[図34] 本発明の第5の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図35] (a) は図33 (c) に示した細胞培養インサートが細胞培養プレートの貫通孔に設置される様子を示した図であり、(b) 及び (c) はそれぞれ同図(a) におけるL-L線矢視断面図及びM-M線矢視断面図である。

[図36] (a) は細胞培養プレートの貫通孔に設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示した図であり、(b) は同図(a) におけるN-N線矢視断面図であり、(c) は同図(b) において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[図37] (a) は図36 (a) の状態から上下を反転させた細胞培養プレートの貫通孔に設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示した図であり、(b) は同図(a) におけるP-P線矢視断面図であり、(c) は同図(b) において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[図38] (a) 及び (c) は細胞培養プレートの外観斜視図であり、(b) は

同図（a）におけるQ-Q線矢視断面図である。

[図39]（a）及び（c）はそれぞれ第1の底面カバー及び第2の底面カバーの外観斜視図であり、（b）は同図（a）におけるR-R線矢視断面図である。

[図40]本発明の第6の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。

[図41]（a）は上下を反転させた細胞培養プレートに第1の底面カバーを取り付けた状態を示した図であり、（b）は同図（a）におけるS-S線矢視断面図であり、（c）は同図（b）において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[図42]（a）は図41（a）において第1の底面カバーに第2の底面カバーを取り付けるとともに細胞培養プレートの上下を反転させた状態を示した図であり、（b）は同図（a）におけるT-T線矢視断面図であり、（c）は同図（b）において破線で囲まれた部分の拡大図である。

発明を実施するための形態

[0030] 本発明の細胞培養方法とそれに用いられる細胞培養装置について図1乃至図42を用いて説明する。なお、本発明の細胞培養装置を構成する部材は全てプラスチック製である。また、一度説明した構成要素については同一の符号を付すことにより適宜その説明を省略する。さらに、実施の形態の説明ではマイクロプレートが12個のウェルを備えた構造となっているが、ウェルの数はこれに限定されるものではなく、適宜変更可能である。例えば、マイクロプレートが384個のウェルを備えている場合にも以下に説明する本発明の作用及び効果は同様に発揮される。そして、以下の説明では37℃で溶解する温度感受性ゲルを例に挙げているが、温度感受性ゲルは血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度で溶解するものであれば良いため、その溶解温度は37℃に限定されない。

実施例 1

[0031] 本発明の第1の実施の形態に係る細胞培養装置について、図1を参照しな

がら説明する。図1(a)及び図1(b)はそれぞれ細胞培養インサートの外観斜視図及び縦断面図であり、図1(c)はマイクロプレートの外観斜視図であり、図1(d)は図1(c)におけるA-A線矢視断面図である。なお、図が煩雑になるのを避けるため、図1(c)及び図1(d)では1つのウェルに対してのみ符号を付している。

図1(a)乃至図1(d)に示すように、本実施例の細胞培養装置は、円形の有底孔からなるウェル2bを有するマイクロプレート2を用いて生化学的分析や臨床検査を行う際にウェル2bに設置されるものであり、側面1aがラッパ状をなす細胞培養インサート1を備えている。

細胞培養インサート1は、一对のフランジ1d、1dが対向するように大径開口部1b側の端部外面にそれぞれ設けられるとともに、両面に生体材料を定着可能に形成されたポリカーボネート製の多孔質膜3が小径開口部1cを閉塞するように底部内面に設けられている。マイクロプレート2は直方体状をなし、12個(縦3列×横4列)のウェル2bが上面2aに設けられている。

多孔質膜3は、孔の直径が1~3 μ m程度であり、後述する細胞培養液が通過可能な構造であり、熱融着によって細胞培養インサート1に固定されている。

また、ウェル2bの内径 s_1 (図1(d)を参照)は、一对のフランジ1d、1dが設けられている箇所側の側面1aの外径 s_2 (図1(b)を参照)よりも長く、一对のフランジ1d、1dの最外面間の距離 s_3 (図1(b)を参照)よりも短い。さらに、ウェル2bの深さ h_1 (図1(d)を参照)は、側面1aにおいて小径開口部1c側の端面から一对のフランジ1d、1dが設けられている箇所までの中心軸Xに沿った距離 h_2 (図1(b)を参照)よりも長い。すなわち、マイクロプレート2は、細胞培養インサート1に対し、一对のフランジ1d、1dをウェル2bの端縁に係止させた状態で、多孔質膜3の外面をウェル2bの底面2c(図1(d)を参照)に接触させることなく、一对のフランジ1d、1dが設けられている箇所以外の部分をウェル2

bの内部に設置可能な構造となっている（図4（a）を参照）。なお、細胞培養室の内壁として用いられる第4内壁1eを備えた細胞培養インサート1は、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0032] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する本発明の細胞培養方法について図2乃至図4を参照しながら説明する。

図2は本発明の第1の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。図3（a）及び図3（b）は細胞培養インサートの多孔質膜の外表面に細胞培養液が注入される様子を示しており、図3（c）はマイクロプレートのウェルに設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示している。また、図4（a）は図3（c）におけるB-B線矢視断面図であり、図4（b）は図4（a）において破線で囲まれた部分の拡大図である。

なお、図が煩雑になるのを避けるため、図3（c）及び図4（a）では1つのウェルに対してのみ符号を付すとともに、図3（c）ではマイクロプレートに設けられた12個のウェルのうち、4個のウェルに対してのみ細胞培養インサートが設置された状態を示している。

[0033] 図3（a）に示すように、まず、細胞培養インサート1を伏せた状態（底部が上側となる状態）に設置し、ピペット4を用いて多孔質膜3の外表面に懸濁状態の細胞培養液5を注入する（図2のステップS1）。そして、図3（b）に示すように、表面張力により多孔質膜3を透過することなく、その外表面で略半球状に盛り上がった状態となっている細胞培養液5に対してアストロサイトを播種する（図2のステップS2）。その後、細胞培養液5の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、アストロサイトを層状になるまで培養する（図2のステップS3）。

図3（b）に示した状態から上下を反転させた細胞培養インサート1を図3（c）及び図4（a）に示すように、内部が細胞培養液5によって満たされているマイクロプレート2のウェル2bに設置する（図2のステップS4）。その後、ピペット4を用いて細胞培養インサート1の内部にペリサイ

トの細胞を播種し（図2のステップS5）、細胞培養インサート1の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、ペリサイトを層状になるまで培養する（図2のステップS6）。そして、ペリサイトが層状に成長した段階で細胞培養液5を捨てる。

このようにして、既に多孔質膜3の外面に層状に形成されているアストロサイトは、細胞からの脚が多孔質膜3の小孔を貫通して、多孔質膜3の内面側に形成されたペリサイトの近傍まで伸びた状態になる。

次に、血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度（例えば、37℃）以上で溶解する温度感受性ゲル6（例えば、新田ゼラチン株式会社製ゼラチンLS-250）をペリサイトの細胞層の上に塗布する（図2のステップS7）。さらに、この温度感受性ゲル6の中に血管内皮細胞を包埋し（図2のステップS8）、細胞培養インサート1の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、血管内皮細胞を培養する（図2のステップS9）。

これにより、図4（b）に示すように、温度感受性ゲル6に包埋された血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3種類の細胞層が細胞培養インサート1の底部に形成された状態になる。なお、ペリサイト8は血管内皮細胞7の分化や増殖を制御する機能を有しているが、このままでは温度感受性ゲル6に包埋されている血管内皮細胞7がペリサイト8に接触していないため、当該機能が発揮されない。そこで、細胞培養インサート1の内部の温度を37℃にすると、血管内皮細胞7の細胞増殖が停止するとともに、温度感受性ゲル6が溶解する（図2のステップS10）。これにより、血管内皮細胞7がペリサイト8に接触する。この状態で細胞培養インサート1の内部の温度を33℃に維持し、血管内皮細胞7の培養を再開することにより、血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3層構造のBBBモデルが完成する。

[0034] このように、本実施例の細胞培養装置では、細胞培養インサート1の多孔質膜3の外面向の細胞培養液5の注入やアストロサイト9の播種あるいはBBBモデルが底部に作製された細胞培養インサート1のマイクロプレート2

のウェル 2 b への移し替えが単純な作業となるため、各作業に簡単な構造のハンドリング装置を用いることができる。そして、そのようなハンドリング装置を用いることによれば、血管内皮細胞 7、ペリサイト 8 及びアストロサイト 9 からなる 3 層構造の BBB モデルの量産化が可能となる。

また、本実施例の細胞培養方法では、ペリサイト 8 の細胞層の上に温度感受性ゲル 6 に包埋された状態の血管内皮細胞 7 を播種する工程を備えている。この場合、温度感受性ゲル 6 が溶解するまで、血管内皮細胞 7 がペリサイト 8 に接触しないため、血管内皮細胞 7 の分化や増殖を制御するというペリサイト 8 の機能が発揮されない。すなわち、本実施例の細胞培養方法においては、細胞培養インサート 1 の内部の温度を温度感受性ゲル 6 が溶解しない温度に保つことで、図 2 に示したステップ S 1 ~ ステップ S 9 の工程によって細胞培養インサート 1 の底部に形成された血管内皮細胞 7、ペリサイト 8 及びアストロサイト 9 の積層状態が長時間維持されるという作用を有する。また、温度感受性ゲル 6 を用いる場合には、血管内皮細胞の細胞シートを予め準備する必要がないため、当該細胞シートを作製する工程を省くことができる。したがって、上述の細胞培養方法によれば、上記 3 つの細胞層からなる BBB モデルの量産性を高めることが可能である。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる第 4 内壁 1 e を備えた細胞培養インサート 1 は、後述するように細胞培養室として用いられる。

実施例 2

[0035] 本発明の第 2 の実施の形態に係る細胞培養装置について、図 5 及び図 6 を参照しながら説明する。図 5 (a) 及び図 5 (b) はそれぞれインサート保持プレート及び細胞培養ケースの外観斜視図であり、図 6 (a) 及び図 6 (b) はそれぞれインサート押え具及びケース用蓋の外観斜視図である。

なお、図が煩雑になるのを避けるため、図 5 (a) 及び図 5 (b) では角孔及び丸孔の一部についてのみ符号を付している。

[0036] 本実施例の細胞培養装置は、平面視した場合に同じ大きさの矩形状をなすインサート保持プレート 10 (図 5 (a) を参照) 及び細胞培養ケース 11

(図5 (b) を参照) と、インサート押え具12 (図6 (a) を参照) と、ケース用蓋13 (図6 (b) を参照) を備えている。

インサート保持プレート10は、図5 (a) に示すように平行な一対の側板10a、10aに角孔10cがそれぞれ5個ずつ設けられるとともに、12個 (縦3列×横4列) の丸孔10dが底板10bに設けられている。また、細胞培養ケース11は、図5 (b) に示すように上部が開口するとともに、12個 (縦3列×横4列) の円形の貫通孔11bが底板11aに設けられている。

なお、インサート保持プレート10の底板10bにおいて、縦に並んだ3個の丸孔10dは、それらの中心軸が側板10a及び底板10bに垂直な同一平面上に配置されるように形成され、横に並んだ4個の丸孔10dは、それらの中心軸が側板10aに平行な同一平面上に配置されるように形成されている。また、2個の丸孔10d、10dの中心線の間隔 s_5 (図5 (a) を参照) は、細胞培養インサート1における一対のフランジ1d、1dの最外面間の距離 s_3 (図1 (b) を参照) よりも長い。すなわち、インサート保持プレート10は、複数の細胞培養インサート1を各中心軸X (図1 (b) を参照) が丸孔10dの中心軸にそれぞれ一致するように底板10bの上に設置した場合、隣接する細胞培養インサート1同士が互いに接触しない構造となっている。

また、細胞培養ケース11は、インサート保持プレート10に対して平行に、かつ、平面視した場合に両者が完全に重なるような状態でインサート保持プレート10の上方に配置した場合に、12個の貫通孔11bの中心軸がインサート保持プレート10の12個の丸孔10dの中心軸と一致する構造となっている。

そして、インサート押え具12は、図6 (a) に示すように互いに平行をなして5個の角孔10cに対して同時に挿通可能に配置された5本の角棒12aと、この5本の角棒12aの一端を連結する連結板12bからなる。なお、角棒12aはインサート保持プレート10の一対の側板10a、10a

の外面間の距離よりも長くなるように形成されている。

また、平面視矩形状をなし、細胞培養室カバーとして用いられるケース用蓋13は、図6(b)に示すように矩形状の凹部13aと、この凹部13aの周囲に設けられた枠状の突出部13bからなり、凹部13aが細胞培養ケース11の上部に設置された際に、突出部13bの内側へ対の側板10a、10aを配置可能な構造となっている。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる貫通孔11bを備えた細胞培養ケース11は、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0037] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する本発明の細胞培養方法について図7乃至図10を参照しながら説明する。

図7は本発明の第2の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図であり、図8(a)はインサート押え具によって細胞培養インサートがインサート保持プレートに固定された状態を示す斜視図であり、図8(b)は図8(a)におけるC-C線矢視断面図である。図9(a)は図8(a)において細胞培養ケースがインサート保持プレートの上方に設置された状態を示しており、図9(b)は図9(a)においてケース用蓋が取り付けられた細胞培養ケースがインサート保持プレートとともに反転された状態を示している。図10(a)は図9(b)におけるD-D線矢視断面図であり、図10(b)はインサート保持プレートとインサート押え具が取り付けられた細胞培養インサートがマイクロプレートのウェルに設置された状態を示す斜視図である。

なお、図が煩雑になるのを避けるため、図9(b)及び図10(a)では角孔及び丸孔の一部についてのみ符号を付すとともに、図8(a)、図9(a)及び図9(b)では1つの細胞培養インサートのみについて符号を付している。また、図10(a)では、細胞培養ケースとケース用蓋の図示を省略している。

[0038] 図8(a)に示すように、12個の細胞培養インサート1を伏せた状態で

、各中心軸X（図1（b）を参照）が丸孔10dの中心軸にそれぞれ一致するようにインサート保持プレート10の底板10bの上に設置する（図7のステップS1）。次に、インサート保持プレート10の一对の側板10a、10aにそれぞれ設けられた角孔10c、10cの全てにインサート押え具12の5本の角棒12aを同時に連通させる。

なお、インサート保持プレート10の2個の角孔10c、10cの間隔 s_4 （図5（a）を参照）は、細胞培養インサート1において一对のフランジ1d、1dが設けられている箇所（図1（b）を参照）の側面1aの外径 s_2 （図1（b）を参照）よりも長く、一对のフランジ1d、1dの最外面間の距離 s_3 （図1（b）を参照）よりも短い。また、角孔10cの底板10bからの高さ h_3 （図5（a）を参照）は、細胞培養インサート1におけるフランジ1dの厚さ h_4 （図1（b）を参照）よりも僅かに長い。そして、角孔10cはインサート保持具12の角棒12a（図6（a）を参照）を連通可能に2つの側板10a、10aにおいて対向する位置にそれぞれ形成されている。したがって、図8（a）に示すようにインサート保持プレート10の底板10bの上に設置された12個の細胞培養インサート1は、インサート押え具12の2本の角棒12a、12aの間に3個ずつ配置されるとともに、一对のフランジ1d、1dがそれぞれ2本の角棒12a、12aとインサート保持プレート10の底板10bの間に配置される（図8（b）を参照）。その結果、細胞培養インサート1はインサート保持プレート10から離脱不能な状態となる。

このようにして、インサート押え具12は角棒12aをインサート保持プレート10の一对の側板10a、10aにおいて対向する位置に形成された一对の角孔10c、10cに連通させることにより、細胞培養インサート1はインサート保持プレート10に固定される（図7のステップS2）。

[0039] 次に、図9（a）に示すように細胞培養ケース11を図8（a）の状態のインサート保持プレート10に対して平行に、かつ、平面視した場合に両者が完全に重なるように、その上方に配置するとともに、細胞培養インサート1の底部を貫通孔11bから突出させて、多孔質膜3の外面が細胞培養ケー

ス 1 1 の内部に露出した状態にする（図 7 のステップ S 3）。その後、細胞培養ケース 1 1 の中に懸濁状態の細胞培養液（図示せず）を注入するとともにアストロサイト 9 を播種する（図 7 のステップ S 4 及びステップ S 5）。そして、細胞培養液の温度を例えば 33℃ に維持したまま、数日間かけて、アストロサイト 9 を層状になるまで培養する（図 7 のステップ S 6）。

細胞培養ケース 1 1 の上面にケース用蓋 1 3 を取り付けた後、細胞培養液とアストロサイト 9 をこぼさないように注意しながら、図 9（b）に示すようにインサート保持プレート 1 0 及びインサート押え具 1 2 とともに細胞培養ケース 1 1 の上下を反転させる（図 7 のステップ S 7）。その後、ピペット 4 を用いてインサート保持プレート 1 0 の丸孔 1 0 d から細胞培養インサート 1 の内部にペリサイト 8 を播種し（図 7 のステップ S 8）、細胞培養インサート 1 の内部の温度を例えば 33℃ に維持したまま、数日間かけて、ペリサイト 8 を層状になるまで培養する（図 7 のステップ S 9）。そして、ペリサイトが層状に成長した段階で細胞培養液を捨てる。これにより、既に多孔質膜 3 の外面に層状に形成されているアストロサイト 9 は、細胞からの脚が多孔質膜 3 の小孔を貫通して、多孔質膜 3 の内面側に形成されたペリサイト 8 の近傍まで伸びた状態になる。

このように、細胞培養インサート 1 の底部が貫通孔 1 1 b から突出している場合、細胞培養ケース 1 1 の内部は細胞培養インサート 1 と同様に細胞培養室として用いることが可能であり、細胞培養インサート 1 の内部と細胞培養ケース 1 1 の内部は多孔質膜 3 によって仕切られている。すなわち、底部が貫通孔 1 1 b から突出するように複数の細胞培養インサート 1 を細胞培養ケース 1 1 に設置した場合、細胞培養ケース 1 1 の内部は複数の細胞培養インサート 1 とそれぞれ多孔質膜 3 によって仕切られた状態となる。したがって、本実施例の細胞培養装置は、筒状に形成される細胞培養インサート 1 の第 4 内壁 1 e（図 1（b）を参照）及び細胞培養ケース 1 1 の底板 1 1 a に設けられた貫通孔 1 1 b の内壁が、多孔質膜 3 によって上下に分画された一対の細胞培養室を構成するとともに、この細胞培養室を、複数連結して上下

に分画されたそれぞれを一体化させて備えた構造であるといえる。

次に、細胞培養インサート1の内部に血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度（例えば、37℃）以上で溶解する温度感受性ゲル6をペリサイトの細胞層の上に塗布し（図7のステップS10）、さらに、この温度感受性ゲル6の中に血管内皮細胞7を包埋する（図7のステップS11）。その後、細胞培養インサート1の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、血管内皮細胞7を培養する（図7のステップS12）。

このようにして、図10（a）に示すように温度感受性ゲル6に包埋された血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3種類の細胞層が細胞培養インサート1の底部に形成される。その後、インサート押え具12によってインサート保持プレート10に固定されている12個の細胞培養インサート1を細胞培養ケース11の貫通孔11bから取り出して、インサート保持プレート10及びインサート押え具12ごと、マイクロプレート2に移動させる（図7のステップS13）。

[0040] 全ての細胞培養インサート1の底部がマイクロプレート2のウェル2bの内部にそれぞれ配置された状態で、インサート押え具12の全ての角棒12aをインサート保持プレート10の角孔10cから同時に抜き出すと、インサート保持プレート10に対する細胞培養インサート1の拘束状態が解消され、全ての細胞培養インサート1がマイクロプレート2のウェル2bに対してそれぞれ同時に配置される。そこで、インサート保持プレート10及びインサート押え具12を細胞培養インサート1から取り外すと、細胞培養インサート1のマイクロプレート2のウェル2bへの設置作業が完了し、前述の図4（a）に示した状態になる（図7のステップS14）。さらに、細胞培養インサート1の内部の温度を37℃にすると、血管内皮細胞7の細胞増殖が停止するとともに、温度感受性ゲル6が溶解し（図7のステップS15）、血管内皮細胞7がペリサイト8に接触する。この状態で細胞培養インサート1の内部の温度を33℃に維持し、血管内皮細胞7の培養を再開させることにより、血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3

層構造のBBBモデルが完成する。

[0041] このように、本実施例の細胞培養装置では、インサート保持プレート10及びインサート押え具12が複数の細胞培養インサート1を細胞培養ケース11の貫通孔11bに対して同時に内挿可能な状態で保持するインサート保持手段として機能することから、複数の細胞培養インサート1を一体化した状態で反転したり、マイクロプレート2のウェル2bに移し替えたりすることができる。したがって、本実施例の細胞培養装置によれば、複数のBBBモデルを短時間で効率よく作製することが可能である。

また、本実施例の細胞培養方法では、ペリサイト8の細胞層の上に温度感受性ゲル6を塗布する工程を備えている。この場合、血管内皮細胞7の細胞シートを予め準備する必要がないため、当該細胞シートを作製する工程を省くことができる。

なお、細胞培養ケース11の底板11aに設けられる貫通孔は貫通孔11bに限定されず、角孔やそれ以外の形状であっても良い。ただし、細胞培養ケース11の内部に注入した細胞培養液5の漏出を防ぐため、細胞培養インサート1はそれらの貫通孔に嵌合する構造であることが必要である。

実施例 3

[0042] 本発明の第3の実施の形態に係る細胞培養装置について、図11乃至図24を参照しながら説明する。図11(a)はプレートカバー及びプレートの側面図であり、図11(b)及び図11(c)はそれぞれスペーサ及び押出具の側面図であり、図11(d)乃至図11(f)はそれぞれ多孔質膜、膜保持具及びインサート本体の外観斜視図である。図12(a)及び図12(c)はそれぞれ図11(a)に示したプレート及びプレートカバーの平面図であり、図12(b)及び図12(d)はそれぞれ図12(a)におけるE-E線矢視断面図及び図12(c)におけるF-F線矢視断面図である。

図13(a)は図11(b)及び図11(c)に示したスペーサ及び押出具の平面図であり、図13(b)及び図13(c)はそれぞれスペーサ及び押出具の断面図であり、いずれも図13(a)におけるG-G線矢視断面図

に相当する。図14(a)及び図14(c)はそれぞれ図11(f)及び図11(e)に示したインサート本体及び膜保持具の平面図であり、図14(b)及び図14(d)はそれぞれ図14(a)におけるH-H線矢視断面図及び図14(c)におけるI-I線矢視断面図である。

なお、図13(a)乃至図13(c)では、スペーサ及び押出具が図12(a)乃至図12(d)に示したプレート及びプレートカバーよりも拡大した状態で示されている。また、スペーサ及び押出具は平面視した場合と同じ形状をしているため、図13(a)では、それらの符号を一緒に示している。

[0043] 図11(a)乃至図11(f)に示すように、本実施例の細胞培養装置は、平板状の基部14aの両面に外径が等しい第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cがそれぞれ設けられたプレート14と、平板状の基部15aの片面に保持部15bが設けられたプレートカバー15と、平板材からなる基部16a及び押出板17aの片面に保持部16b、17b並びに第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cに内挿可能な大きさに形成された円筒体16c及び円筒状の押出部17cが設けられているスペーサ16及び押出具17を備えている。

さらに、この細胞培養装置は、短円筒状をなして第2の環状突出部14cに内挿可能な大きさに形成された膜保持具18と、膜保持具18に対し一端を閉塞するように取り付けられ両面に生体材料を定着可能に形成されているポリカーボネート製の多孔質膜3と、円筒状をなし、一端に膜保持具18が装着され、他端に一对のフランジ19a、19aが設けられて膜保持具18とともに細胞培養インサートを構成するインサート本体19を備えている。

なお、プレートカバー15、スペーサ16及び押出具17は、プレート14の第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cの開口部を閉塞可能な大きさに形成されている。また、多孔質膜3は熱融着によって膜保持具18に固定されている。

[0044] 図12(a)及び図12(b)に示すように、プレート14の基部14a

には細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔14dが形成されており、基部14aの両面には貫通孔14dと内径が等しい第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cが基部14aを挟んで対称に、かつ、貫通孔14dを介して連通するようにそれぞれ設けられている。

図12(c)及び図12(d)に示すように、プレートカバー15の片面に設けられた保持部15bは、プレート14の第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cの開口端を嵌合可能な大きさにそれぞれ形成された複数の短円筒体によって構成されている。すなわち、細胞培養室カバーとして用いられるプレートカバー15は、第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cの開口端を保持部15bに嵌合させるようにしてプレート14の上下に対してそれぞれ着脱可能な構造となっている(図16(b)を参照)。

図13(a)乃至図13(c)に示すように、スペーサ16及び押出具17の片面に設けられた保持部16b、17bは、プレート14に設けられた複数の第1の環状突出部14bの開口端に対して同時に嵌合する複数の短円筒体によって構成されている。すなわち、スペーサ16及び押出具17は、第1の環状突出部14bの開口端を保持部16b、17bにそれぞれ嵌合させるようにしてプレート14の上下に対してそれぞれ着脱可能な構造となっている(図17(b)及び図20を参照)。

[0045] スペーサ16の基部16a及び押出具17の押出板17aには、保持部16b、17bが設けられている側に複数の円筒体16c及び押出部17cが、保持部16b、17bを構成する上述の円筒体に対して互いの円筒軸が一致するとともに、基部16a及び押出板17aをプレート14の基部14aに対して平行となるように配置した場合に、基部16a及び押出板17aのいずれかと基部14aの双方に直交する方向に見て第1の環状突出部14b及び第2の環状突出部14cと符合する箇所に設けられている。すなわち、スペーサ16及び押出板17aは、基部16a及び押出板17aのいずれかがプレート14の基部14aに対して平行に配置されている場合に、全ての

円筒体 16c 及び押出部 17c の円筒軸が全ての第 1 の環状突出部 14b 及び第 2 の環状突出部 14c の円筒軸に対してそれぞれ一致するように形成されている。

また、円筒体 16c 及び押出部 17c は外径が第 1 の環状突出部 14b の内径より小さく、第 1 の環状突出部 14b、第 2 の環状突出部 14c 及び貫通孔 14d に対して嵌合可能に形成されている。すなわち、スペーサ 16 及び押出部 17 は、基部 16a 及び押出板 17a とプレート 14 の基部 14a が平行な状態で全ての円筒体 16c 及び押出部 17c を全ての第 1 の環状突出部 14b、第 2 の環状突出部 14c 及び貫通孔 14d に対してそれぞれ同時に嵌合可能であって、かつ、基部 16a 及び押出板 17a と基部 14a の平行状態を維持したまま、円筒体 16c 及び押出部 17c を貫通孔 14d の内部で移動可能な構造となっている。

そして、スペーサ 16 の円筒体 16c を 2 倍した長さで膜保持具 18 の長さの合計は、第 1 の環状突出部 14b、第 2 の環状突出部 14c 及び貫通孔 14d を合計した長さと同じ。すなわち、スペーサ 16 は、円筒体 16c をプレート 14 の貫通孔 14d に挿入し、基部 16a を第 2 の環状突出部 14c の端面に当接させるとともに、別のスペーサ 16 の円筒体 16c をプレート 14 の貫通孔 14d に挿入し、基部 16a を第 1 の環状突出部 14b の端面に当接させると、後述するように 2 枚のスペーサ 16 の円筒体 16c によって膜保持具 18 が上下から挟持される構造となっている（図 19 (b) を参照）。

さらに、押出部 17 の押出部 17c と膜保持具 18 を合計した長さは、第 1 の環状突出部 14b、第 2 の環状突出部 14c 及び貫通孔 14d を合計した長さよりも長い。すなわち、押出部 17 は、押出部 17c をプレート 14 の貫通孔 14d に挿入し、押出板 17a を第 2 の環状突出部 14c の端面に当接させると、後述するように押出部 17c の先端面 17d に設置された膜保持具 18 に取り付けられた多孔質膜 3 が膜保持具 18 とともに第 1 の環状突出部 14b の外部へ押し出される構造となっている（図 17 (b) を参照）。

)。

[0046] なお、インサート本体 19 の内径及び外径は、膜保持具 18 の内径及び外径とそれぞれ等しいが、膜保持具 18 の外径はプレート 14 の貫通孔 14 d の内径よりも小さい。また、インサート本体 19 のフランジ 19 a、19 a が設けられていない側の端部には、図 14 (a) に示すように先鋭部 19 b が設けられており、膜保持具 18 の多孔質膜 3 が取り付けられている側の端部には、インサート本体 19 の先鋭部 19 b に対して係合可能な環状の凹み (係合部 18 a) が設けられている。

また、スペーサ 16 の円筒体 16 c 及び押出部 17 の押出部 17 c は、内径が膜保持具 18 の内径と等しい。したがって、図 17 (a) を用いて後述するようにプレート 14 の貫通孔 14 d の内部に多孔質膜 3 がプレート 14 の基部 14 a と平行をなすように設置された状態で、スペーサ 16 の円筒体 16 c 又は押出部 17 の押出部 17 c をプレート 14 の貫通孔 14 d の内部に挿入した場合、円筒体 16 c 又は押出部 17 c の先端面 16 d、17 d (図 13 (b) 及び図 13 (c) を参照) と多孔質膜 3 は接触しない (図 17 (b) 及び図 20 を参照)。すなわち、スペーサ 16 の円筒体 16 c 及び押出部 17 の押出部 17 c は、膜保持具 18 において多孔質膜 3 が取り付けられている側の端面に先端面 16 d、17 d を当接させることにより、多孔質膜 3 の外面に形成された細胞層に影響を与えることなく、膜保持具 18 を押し動かすことが可能な構造となっている。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる第 3 内壁 18 b (図 14 (d) を参照) を備えた膜保持具 18 は、細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔 14 d が基部 14 a に設けられたプレート 14 とともに、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0047] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる 3 層構造の BBB モデルを作製する本発明の細胞培養方法について図 15 乃至図 20 を参照しながら説明する。

図 15 は本発明の第 3 の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工

程図である。図16(a)は下面がプレートカバーで覆われるとともに内部に膜保持具が設置されたプレートの内部にアストロサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、図16(b)はプレートの上部がプレートカバーで覆われた状態を示した断面図である。図17(a)は図16(b)において上下が反転された後、下面に設置されていたプレートカバーが取り外されるとともに、プレートの内部にペリサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、図17(b)は図17(a)において下面に設置されているプレートカバーが取り外されて図11(c)に示す押出具が設置された状態を示した断面図である。

図18(a)は図17(b)において多孔質膜の外面にシート状の血管内皮細胞が敷設された状態を示した断面図であり、図18(b)は図18(a)において膜保持具がインサート本体の下端に装着された状態を示した断面図であり、図18(c)は膜保持具とインサート本体からなる細胞培養インサートの断面図である。また、図19(a)は下面が図11(b)に示したスペーサで覆われるとともに内部に膜保持具が設置されたプレートの内部にアストロサイトの細胞が播種された状態を示した断面図であり、図19(b)はプレートの上部と下部がスペーサで覆われた状態を示した断面図である。さらに、図20は図19(b)において上下が反転された後、下面に設置されていたスペーサが取り外されるとともに、プレートの内部にペリサイトの細胞が播種された状態を示した断面図である。

[0048] まず、基部14aが水平であって、かつ、第1の環状突出部14bが上方に開口した状態となるように設置したプレート14の下面にプレートカバー15を取り付けた後、貫通孔14dの内部に膜保持具18を多孔質膜3の外表面が下側になるように設置する(図15のステップS1)。次に、図16(a)に示すように、プレート14の貫通孔14dの内部に細胞培養液(図示せず)を注入するとともに、アストロサイト9を播種する(図15のステップS2及びステップS3)。その状態で、貫通孔14dの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、アストロサイト9を層状になるま

で培養する（図15のステップS4）。

図16（b）に示すようにプレート14の上面にプレートカバー15を取り付けた後、細胞培養液とアストロサイト9をこぼさないように注意しながら、プレート14の上下を反転させる（図15のステップS5）。図17（a）に示すように、第2の環状突出部14cの側に取り付けていたプレートカバー15を取り外した後、プレート14の貫通孔14dの内部にペリサイト8を播種する（図15のステップS6）。そして、貫通孔14dの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、ペリサイト8を層状になるまで培養し、ペリサイト8が層状に成長した段階で細胞培養液を捨てる（図15のステップS7）。これにより、既に多孔質膜3の内面に層状に形成されているアストロサイト9は、細胞からの脚が多孔質膜3の小孔を貫通して、多孔質膜3の外面側に形成されたペリサイト8の近傍まで伸びた状態になる。

このように、プレート14の貫通孔14dの内部は細胞培養室として用いられ、その内部に膜保持具18が設置されている場合には、その細胞培養室が多孔質膜3によって2つに仕切られた状態となっている。したがって、本実施例の細胞培養装置は、筒状に形成される膜保持具18の第3内壁18b（図14（d）を参照）及びプレート14の基部14aに設けられた貫通孔14dの内壁が、多孔質膜3によって上下に分画された一对の細胞培養室を構成するとともに、この細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備えた構造であるといえる。

[0049] 図17（a）においてプレート14の第1の環状突出部14bからプレートカバー15を取り外し、図17（b）に示すようにプレート14の貫通孔14dの内部に下方から押出具17の押出部17cを挿入し、この押出部17cによって、図17（b）に示すように膜保持具18を第2の環状突出部14cの側へ押し出す（図15のステップS8）。

図17（b）においてプレート14の外部に露出しているペリサイト8の上に、図18（a）に示すように血管内皮細胞7の細胞シート20を敷設す

る（図15のステップS9）。さらに、血管内皮細胞7の細胞シート20をインサート本体19によって上方から打ち抜きつつ、インサート本体19をそのまま膜保持具18に押し込むようにしてインサート本体19の先端に膜保持具18を装着する（図18（b）を参照）。これにより、血管内皮細胞7の細胞シート20、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3種類の細胞層がインサート本体19の内部に配置された状態になる（図15のステップS10）。この状態でインサート本体19の内部の温度を例えば33℃に保ち、数日間かけて、血管内皮細胞7を培養する（図15のステップS11）。そして、血管内皮細胞7の培養が終わった段階で、図18（c）に示すようにインサート本体19及び膜保持具18からなる細胞培養インサート21をプレート14から取り外す（図5のステップS12）。

なお、ステップS5においてプレート14の上下を反転させる際に、貫通孔14dの内部における膜保持具18の上下方向への移動を防ぐため、プレートカバー15の代わりにスペーサ16を用いても良い。

すなわち、ステップS1においてプレートカバー15の代わりに、図19（a）に示すようにスペーサ16をプレート14の下面に取り付けるとともに、ステップS5においてプレートカバー15の代わりに、図19（b）に示すように貫通孔14dの上面にスペーサ16を取り付けてプレート14の上下を反転させ、さらに、図20に示すように第2の環状突出部14cの側に取り付けていたスペーサ16を取り外した後、ステップS6においてプレート14の貫通孔14dの内部にペリサイト8を播種するのである。この場合、プレート14の上下を反転させる際に膜保持具18が2枚のスペーサ16の押出部17cによって挟持されており、貫通孔14dの内部で上下方向へ移動しないため、膜保持具18の内部の細胞培養液とアストロサイト9がこぼれ難いというメリットがある。

[0050] このように、本実施例の細胞培養装置によれば、多孔質膜3の両面でアストロサイト9とペリサイト8をそれぞれ培養する際に必要な多孔質膜3を反転させる作業やプレート14の貫通孔14dの内部から膜保持具18取り出

す作業及びペリサイト 8 の上部に血管内皮細胞 7 を配置する作業が複数の多孔質膜 3 や膜保持具 1 8 に対して同時に行われるため、複数の B B B モデルを短時間で作製することが可能である。

また、本実施例の細胞培養装置においては、プレート 1 4 の第 1 の環状突出部 1 4 b 又は第 2 の環状突出部 1 4 c にプレートカバー 1 5 の保持部 1 5 b を嵌合させることにより、プレート 1 4 に対するプレートカバー 1 5 の密着性が高まるとともに、プレート 1 4 の第 1 の環状突出部 1 4 b 又は第 2 の環状突出部 1 4 c に押出具 1 7 の保持部 1 7 b を嵌合させることにより、プレート 1 4 に対する押出具 1 7 の位置合わせが正確になされるという作用を有する。

したがって、本実施例の細胞培養装置によれば、保持部 1 5 b によってプレート 1 4 に対するプレートカバー 1 5 の密着性が高まるため、貫通孔 1 4 d の内部に注入された細胞培養液がプレート 1 4 とプレートカバー 1 5 の間から漏れ出すことを確実に防止することができる。また、保持部 1 7 b によってプレート 1 4 に対する押出具 1 7 の位置合わせが正確になされるため、プレート 1 4 や押出具 1 7 が故障し難い。

本発明の細胞培養装置は、本実施例に示した構造に限定されない。例えば、プレートカバー 1 5 の保持部 1 5 b とプレート 1 4 の第 1 の環状突出部 1 4 b 又は第 2 の環状突出部 1 4 c の間やスペーサ 1 6 の保持部 1 6 b 又は押出具 1 7 の保持部 1 7 b とプレート 1 4 の第 1 の環状突出部 1 4 b 又は第 2 の環状突出部 1 4 c の間にパラフィンやポリエチレンなどによって形成され、水密性を有するフィルムが設置された構造であっても良い。この場合、プレート 1 4 とプレートカバー 1 5 の間やプレート 1 4 とスペーサ 1 6 又は押出具 1 7 の間の水密性が向上するため、貫通孔 1 4 d に注入された細胞培養液 5 がプレートカバー 1 5 乃至押出具 1 7 との間から漏出し難いというメリットがある。

実施例 4

[0051] 本発明の第 4 の実施の形態に係る細胞培養装置について、図 2 1 乃至図 2

3を参照しながら説明する。図21(a)及び図21(b)はプレートの外観斜視図であり、図21(c)及び図21(d)はそれぞれプレートカバー(スペーサカバー)及びスペーサの外観斜視図である。図22(a)乃至図22(c)はそれぞれ押出具、膜保持具及びスリーブの外観斜視図であり、図22(d)及び図22(e)はそれぞれ図22(b)におけるJ-J線矢視断面図及び図22(c)におけるK-K線矢視断面図である。図23(a)及び図23(b)はそれぞれプレートの円筒体にスペーサの円筒体が内挿された状態を示す縦断面図及びプレートの円筒体に押出具の押出部が内挿された状態を示す縦断面図である。

なお、プレートカバーとスペーサカバーは円形突出部の外径のみが異なり、外観の形状は略同一であるため、図21(c)には両者の符号を付している。また、図が煩雑になるのを避けるため、図21(a)乃至図21(d)並びに図22(a)では1つの円筒体、円形突出部及び貫通孔のみについて符号を付している。さらに、図23(a)はプレートの円筒体とその基端の周囲の一部、プレートカバー及びスペーサカバーの円形突出部とその基端の周囲の一部並びにスペーサの円筒体とその基端の周囲の一部及びスペーサの円筒体に設置された膜保持具がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。また、図23(b)は押出具の押出部とその基端の周囲の一部、押出具によって押し出された膜保持具及びプレートの円筒体とその基端の周囲の一部がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。

[0052] 図21(a)乃至図21(d)並びに図22(a)乃至図22(e)に示すように、本実施例の細胞培養装置は、複数の貫通孔22bが形成された平板状の基部22aの片面に細胞培養室の内壁として用いられる円筒体22cが貫通孔22bと同数設けられたプレート22と、平板状の基部23a、24aの片面にプレート22の円筒体22cと同数の円形突出部23b、24bがそれぞれ設けられ、細胞培養室カバーとして用いられるプレートカバー23及びスペーサカバー24と、細胞培養室の内壁として用いられる貫通孔

25b (図23(a)を参照)が貫通孔22bと同数形成された平板状の基部25aの片面に貫通孔25bと同数の円筒体25cが設けられたスペーサ25と、平板状の押出板26aの片面にプレート22の円筒体22cと同数の円筒状の押出部26bが設けられた押出具26と、略短円筒状をなしてプレート22の円筒体22cに内挿可能に形成された膜保持具27と、膜保持具27が一端に装着される略円筒状のスリーブ28を備えている。

図22(b)及び図22(d)に示すように、膜保持具27は一端にフランジ27aを有しており、他端の内面には多孔質膜3が熱融着によって固定されている。

[0053] プレート22の円筒体22cは、内径が貫通孔22bの直径と等しく、かつ、全ての貫通孔22bの中心軸に対して各円筒軸がそれぞれ一致するように設けられている。

プレートカバー23の円形突出部23bは、プレート22の円筒体22cに嵌合可能であって、かつ、基部22aと基部23aが平行な状態において、全ての貫通孔22bの中心軸に対して各円形突出部23bの中心軸がそれぞれ一致するように設けられている。すなわち、プレートカバー23は、プレート22の基部22aに対する基部23aの平行状態を保ちながら基部23aを基部22aに近づけていくと、全ての円筒体22cに対して全ての円形突出部23bがそれぞれ同時に嵌合する構造となっている(図23(a)を参照)。

一方、スペーサカバー24の円形突出部24bは、スペーサ25の円筒体25cに嵌合可能であって、かつ、基部25aと基部24aが平行な状態において、全ての円筒体25cの円筒軸に対して各円形突出部24bの中心軸がそれぞれ一致するように設けられている。すなわち、スペーサカバー24は、スペーサ25の基部25aに対する基部24aの平行状態を保ちながら基部24aを基部25aに近づけていくと、全ての円筒体25cに対して全ての円形突出部24bがそれぞれ同時に嵌合する構造となっている(図23(a)を参照)。

スペーサ25の円筒体25cは、外径がプレート22の円筒体22cの内径よりも小さく、円筒体22cに嵌合可能であって、かつ、基部22aと基部25aが平行な状態において、全ての貫通孔22bの中心軸に対して各円筒軸がそれぞれ一致するように設けられている。すなわち、スペーサ25は、プレート22の基部22aに対する基部25aの平行状態を保ちながら基部25aを基部22aに近づけていくと、全ての円筒体22cに全ての円筒体25cがそれぞれ同時に嵌合する構造となっている（図23(a)を参照）。

押出具26の押出部26bは、外径がプレート22の円筒体22cの内径よりも小さく、円筒体22cに嵌合可能であって、かつ、基部22aと押出板26aが平行な状態において、全ての貫通孔22bの中心軸に対して各円筒軸がそれぞれ一致するように設けられている。すなわち、押出具26は、プレート22の基部22aに対する押出板26aの平行状態を保ちながら押出板26aを基部22aに近づけていくと、全ての円筒体22cに全ての押出部26bがそれぞれ同時に嵌合する構造となっている（図23(b)を参照）。また、押出具26の押出部26bと膜保持具27を合計した長さは、基部22aと円筒体22cを合計した長さよりも長い。すなわち、押出具26は、押出部26bをプレート22の貫通孔22bに内挿し、押出板26aを基部22aに当接させると、押出部26bの先端面26cに設置された膜保持具27に取り付けられた多孔質膜3が膜保持具27とともに円筒体22cの外部へ押し出される構造となっている（図23(b)を参照）。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる第2内壁27b（図22(d)を参照）を備えた膜保持具27は、細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔22b及び円筒体22cが基部22aに設けられたプレート22並びに細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔25b及び円筒体25cが基部25aに設けられたスペーサ25とともに、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0054] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及び

アストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する本発明の細胞培養方法について図24乃至図30を参照しながら説明する。

図24は本発明の第4の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。図25(a)は図21(d)に示したスペーサの円筒体の上端に膜保持具が設置された状態を示しており、図25(b)は図25(a)のスペーサにおいてスペーサカバー及びプレートが取り付けられて上下が反転された状態を示している。そして、図25(c)は図25(b)におけるスペーサ及びプレートの円筒体並びに膜保持具の縦断面図である。また、図26(a)は図25(b)のプレートにおいてプレートカバーが取り付けられて上下が反転された状態を示しており、図26(b)は図26(a)においてスペーサカバーが取り外された状態を示している。

図27(a)は図26(b)におけるスペーサ及びプレートの円筒体並びに膜保持具の縦断面図であり、図27(b)は図26(b)のスペーサに再びスペーサカバーが取り付けられた状態を示している。そして、図27(c)は図27(b)においてプレートカバー及びスペーサカバーが取り外されて押出具がプレートに取り付けられた状態を示している。

図28(a)は図27(c)におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及び膜保持具の縦断面図であり、図28(b)は図27(c)においてプレートの円筒体の上方へ押し出された膜保持具の上面に血管内皮細胞の細胞シートが敷設される状態を示しており、図28(c)は図28(b)におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及び膜保持具の縦断面図である。また、図29(a)は図28(b)に示した血管内皮細胞の細胞シートがスリーブによって打ち抜かれる様子を表しており、図29(b)は図29(a)において血管内皮細胞の細胞シートを打ち抜いたスリーブに膜保持具が装着された状態を示している。さらに、図30(a)は図29(b)においてスリーブと膜保持具からなる細胞培養インサートの縦断面図であり、図30(b)は図30(a)に示した細胞培養インサートが細胞培養プレートのウェルに設置される様子を示している。

なお、図が煩雑になるのを避けるため、図25(a)では一部の円筒体のみ膜保持具27が設置された状態を示している。また、図25(a)、図25(b)、図26(a)、図26(b)、図27(b)、図27(c)、図28(b)、図29(a)及び図29(b)では1つの円筒体、膜保持具及び貫通孔に対してのみ符号を付すとともに、図30(b)では1つのウェルに対してのみ符号を付すとともに、細胞培養プレートに設けられた12個のウェルのうち、1個のウェルに対してのみ細胞培養インサートが設置される様子を示している。

さらに、図25(c)はスペーサの円筒体とその基端の周囲の一部、スペーサカバーの円形突出部とその基端の周囲の一部、プレートの円筒体とその基端の周囲の一部及びスペーサの円筒体に設置された膜保持具がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。また、図27(a)はスペーサの円筒体とその基端の周囲の一部、プレートカバーの円形突出部とその基端の周囲の一部、プレートの円筒体とその基端の周囲の一部及びスペーサの円筒体に設置された膜保持具がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。そして、図28(a)及び図28(c)では押出具の押出部とその基端の周囲の一部、押出具によって押し出された膜保持具及びプレートの円筒体とその基端の周囲の一部がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。さらに、図30(a)は細胞培養インサートがスリーブの円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。

[0055] まず、図25(a)に示すようにスペーサ25の円筒体25cの上端に膜保持具27を設置する(図24のステップS1)。次に、円筒体22cを下方に向けた状態のプレート22を基部25aが基部22aと平行になるように配置し、全ての円筒体22cを全ての円筒体25cに外挿するとともに、基部25aの下面側から円形突出部24bを円筒体25cに嵌合させるようにしてスペーサカバー24をスペーサ25に取り付ける(図24のステップS2)。その後、図25(b)に示すようにピペット4を使って、プレート

22の貫通孔22bを通してスペーサ25の円筒体25cの内部に懸濁状態の細胞培養液（図示せず）を注入するとともにアストロサイト9（図25（c）を参照）の細胞を播種する（図24のステップS3及びステップS4）。そして、細胞培養液の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、アストロサイト9を層状になるまで培養する（図24のステップS5）。

図25（b）に示した状態から細胞培養液を捨て、基部22aの下面側から円形突出部23bを貫通孔22bに嵌合させるようにしてプレートカバー23をプレート22に取り付けた後、図26（a）に示すようにプレートカバー23、スペーサカバー24及びスペーサ25とともにプレート22の上下を反転させる（図24のステップS6）。さらに、図26（b）に示すようにスペーサカバー24を取り外し、ピペット4を用いてスペーサ25の円筒体25cの内部に前述の細胞培養液を注入するとともにペリサイト8（図27（a）を参照）の細胞を播種する（図24のステップS7及びステップS8）。その後、図27（b）に示すように再びスペーサ25にスペーサカバー24を取り付けて、スペーサ25の円筒体25cの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、ペリサイト8を層状になるまで培養し、ペリサイト8が層状に成長した段階で細胞培養液を捨てる（図24のステップS9及びステップS10）。これにより、既に多孔質膜3の内面に層状に形成されているアストロサイト9は、細胞からの脚が多孔質膜3の小孔を貫通して、図28（a）に示すように多孔質膜3の外面側に形成されたペリサイト8の近傍まで伸びた状態になる。

このように、プレート22の貫通孔22b及びスペーサ25の円筒体25cの内部は細胞培養室として用いられ、その内部に膜保持具27が設置されている場合には、その細胞培養室が多孔質膜3によって2つに仕切られた状態となっている。したがって、本実施例の細胞培養装置は、筒状に形成される膜保持具27の第2内壁27b（図22（d）を参照）並びにスペーサ25の基部25aに設けられた貫通孔25b及び円筒体25cの内壁又は膜保持具27の第2内壁27b並びにプレート22の基部22aに設けられた貫

通孔 22 b 及び円筒体 22 c の内壁が、多孔質膜 3 によって上下に分画された一対の細胞培養室を構成するとともに、この細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備えた構造であるといえる。

[0056] 図 27 (c) に示すように、プレートカバー 23 及びスペーサカバー 24 並びにスペーサ 25 を取り外すとともに、押出具 26 の押出部 26 b をプレート 22 の貫通孔 22 b に内挿した後、押出板 26 a が基部 22 a に当接するように押出具 26 をプレート 22 に近づけると、押出部 26 b の先端面 26 c (図 28 (a) を参照) に取り付けられた膜保持具 27 が円筒体 22 c の外部へ押し出される (図 24 のステップ S 11)。

図 27 (c) に示したようにプレート 22 の円筒体 22 c の外部へ押し出された膜保持具 27 の上面に対し、図 28 (b) 及び図 28 (c) に示すように血管内皮細胞 7 の細胞シート 20 を敷設する (図 24 のステップ S 12)。その後、図 28 (b) に示した血管内皮細胞 7 の細胞シート 20 を図 29 (a) に示すようにスリーブ 28 によって上方から打ち抜くとともに、打ち抜かれた残りの細胞シート 20 を除去する (図 24 のステップ S 13)。そして、スリーブ 28 をそのまま膜保持具 27 に押し込むようにして、図 29 (b) に示すようにスリーブ 28 の先端に膜保持具 27 を装着する (図 24 のステップ S 14)。その結果、膜保持具 27 とスリーブ 28 が一体化して、図 30 (a) に示すように血管内皮細胞 7 の細胞シート 20、ペリサイト 8 及びアストロサイト 9 からなる 3 種類の細胞層が細胞培養インサート 21 の底部に形成された状態になる。その後、細胞培養インサート 21 を押出具 26 の押出部 26 b から取り外し、図 30 (b) に示すようにマイクロプレート 2 のウェル 2 b に設置する (図 24 のステップ S 15)。そして、この状態で細胞培養インサート 21 の内部の温度を例えば 33℃ に保ち、数日間かけて、血管内皮細胞 7 を培養する (図 24 のステップ S 16)。

[0057] このように、本実施例の細胞培養装置によれば、多孔質膜 3 を反転させる作業やプレート 22 の貫通孔 22 b の内部から膜保持具 27 を取り出す作業及びペリサイト 8 の上部に血管内皮細胞 7 を配置する作業が複数の多孔質膜

3や膜保持具27に対して同時に行われるため、複数のBBBモデルを短時間で作製することが可能である。

[0058] 本実施例の細胞培養方法の変形例について図31及び図32を参照しながら説明する。図31は図24に示した工程図の変形例を示した図である。また、図32(a)は図27(c)において膜保持具にスリーブが装着された状態を示した図であり、図32(b)は図32(a)におけるプレートの円筒体、押出具の押出部及びスリーブと膜保持具からなる細胞培養インサートの縦断面図である。なお、図が煩雑になるのを避けるため、図32(a)ではそれぞれ1つの円筒体及びスリーブに対してのみ符号を付している。また、図32(b)は押出具の押出部とその基端の周囲の一部、押出具によって押し出された膜保持具及びプレートの円筒体とその基端の周囲の一部がプレートの円筒体の円筒軸を含む平面で切断された状態を示している。さらに、図31に示した工程のうち、ステップS1～ステップS11までは図24におけるステップS1～ステップ11までと同じ工程であるため、それらの工程についての説明は省略する。

具体的には、ステップS1～ステップS11の工程の後、図27(c)に示した状態の膜保持具27にスリーブ28を押し込むようにして、図32(a)に示すようにスリーブ28の先端に膜保持具27を装着する(図31のステップS12)。次に、細胞培養インサート21の内部に血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度(例えば、37℃)以上で溶解する温度感受性ゲル6をペリサイト8の細胞層の上に塗布し(図31のステップS13)、さらに、この温度感受性ゲル6の中に血管内皮細胞7を包埋する(図32のステップS14)。その後、細胞培養インサート21の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、血管内皮細胞7を培養する(図31のステップS15)。

これにより、図32(b)に示すように温度感受性ゲル6に包埋された血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3種類の細胞層が細胞培養インサート21の底部に形成される。その後、細胞培養インサー

ト21を押出具26の押出部26bから取り外し、図30(b)に示すようにマイクロプレート2のウェル2bに設置する(図31のステップS16)。さらに、細胞培養インサート21の内部の温度を37℃にすると、血管内皮細胞7の細胞増殖が停止するとともに、温度感受性ゲル6が溶解し(図31のステップS17)、血管内皮細胞7がペリサイト8に接触する。この状態で細胞培養インサート21の内部の温度を33℃に維持し、血管内皮細胞7の培養を再開させることにより、血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3層構造のBBBモデルが完成する。

[0059] ペリサイト8は血管内皮細胞7の分化や増殖を制御する機能を有しているが、血管内皮細胞7が温度感受性ゲル6に包埋されている状態では血管内皮細胞7がペリサイト8に接触していないため、当該機能が発揮されない。すなわち、図31に示した細胞培養方法においては、細胞培養インサート21の内部の温度を温度感受性ゲル6が溶解しない温度に保つことで、図31に示したステップS1～ステップS15の工程によって細胞培養インサート21の底部に形成された血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9の積層状態が長時間維持されるという作用を有する。また、温度感受性ゲル6を用いる場合には、血管内皮細胞の細胞シートを予め準備する必要がないため、当該細胞シートを作製する工程を省くことができる。したがって、上述の細胞培養方法によれば、上記3つの細胞層からなるBBBモデルの量産性を高めることが可能である。

実施例 5

[0060] 本発明の第5の実施の形態に係る細胞培養装置について、図33を参照しながら説明する。図33(a)乃至図33(c)はそれぞれ細胞培養プレート、第1のプレートカバー(第2のプレートカバー)及び細胞培養インサートの外観斜視図である。なお、図が煩雑になるのを避けるため、図33(a)では1つのウェルに対してのみ符号を付している。また、第1のプレートカバー及び第2のプレートカバーは平面視した場合に同じ形状をしているため、図33(b)では、それらの符号を一緒に示している。

図33(a)乃至図33(c)に示すように、本実施例の細胞培養装置は、細胞培養室の内壁として用いられる円形の貫通孔29eを有する細胞培養プレート29と、この細胞培養プレート29の上下にそれぞれ設置され、細胞培養室カバーとして用いられる第1のプレートカバー30及び第2のプレートカバー31と、細胞培養インサート32を備えている。

細胞培養プレート29は、図33(a)に示すように略直方体状をなし、ウェルとして機能する12個(縦3列×横4列)の貫通孔29eが上面29aに設けられるとともに、上面29a及び下面29b(図35(b)を参照)には第1の矩形状突出部29c及び第2の矩形状突出部29d(図35(b)を参照)が設けられている。

第1のプレートカバー30及び第2のプレートカバー31は、図33(b)に示すように矩形状の凹部30a、31aと、この凹部30a、31aの周囲に設けられた枠状の突出部30b、31bからなり、凹部30a、31aが細胞培養プレート29の上面29aに設置された際に、突出部30b、31bの内側へ第1の矩形状突出部29c及び第2の矩形状突出部29dを配置可能な構造となっている。

細胞培養インサート32は、図33(c)に示すように一端にフランジ32aが設けられた円筒体からなり、この円筒体の他端の内面には多孔質膜3が熱融着によって固定されている。なお、細胞培養プレート29の貫通孔29eは、大径部29fと小径部29gを有する段付き構造をなしている。そして、大径部29fは、内径がフランジ32aの外径よりも大きく、フランジ32aを内部に配置可能な深さを有している。また、小径部29gは内径がフランジ32aの外径よりも小さく、かつ、細胞培養インサート32のフランジ32a以外の部分を内部に配置可能であって、しかもフランジ32aが大径部29fに係止した状態で細胞培養インサート32の多孔質膜3が取り付けられている側の端面が底面に接触しないような深さを有している。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる第1内壁32b(図33(c)を参照)を備えた細胞培養インサート32は、細胞培養室の内壁として用い

られる複数の貫通孔29eが設けられた細胞培養プレート29とともに、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0061] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する本発明の細胞培養方法について図34乃至図37を参照しながら説明する。

図34は本発明の第5の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。図35(a)は図33(c)に示した細胞培養インサートが細胞培養プレートの貫通孔に設置される様子を示しており、図35(b)及び図35(c)はそれぞれ図35(a)におけるL-L線矢視断面図及びM-M線矢視断面図である。図36(a)は細胞培養プレートの貫通孔に設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示しており、図36(b)は図36(a)におけるN-N線矢視断面図であり、図36(c)は図36(b)において破線で囲まれた部分の拡大図である。図37(a)は図36(a)の状態から上下を反転させた細胞培養プレートの貫通孔に設置された細胞培養インサートに細胞が播種される様子を示しており、図37(b)は図37(a)におけるP-P線矢視断面図であり、図37(c)は図37(b)において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[0062] まず、図35(a)及び図35(c)に示すように細胞培養プレート29の大径部29fにフランジ32aを配置するようにして貫通孔29eに細胞培養インサート32を設置する(図34のステップS1)。そして、細胞培養プレート29の上面29aに第1のプレートカバー30を設置した後、図36(b)に示すように第1のプレートカバー30と一体化した細胞培養プレート29の上下を反転させる(図34のステップS2及びステップS3)。次に、図36(a)に示すようにピペット4を用いて細胞培養プレート29の貫通孔29eの内部に細胞培養液(図示せず)を注入するとともに、アストロサイト9を播種する(図34のステップS4及びステップS5)。さらに、この状態で貫通孔29eの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、図36(c)に示すアストロサイト9を層状になるまで培

養する（図34のステップS6）。そして、細胞培養プレート29の下面29bに第2のプレートカバー31を設置し、第1のプレートカバー30及び第2のプレートカバー31と一体化した細胞培養プレート29の上下を反転させる（図34のステップS7及びステップS8）。

さらに、図37（b）に示すように細胞培養プレート29の上面29aから第1のプレートカバー30を取り外した後、図37（a）に示すようにピペット4を用いて細胞培養プレート29の貫通孔29eに設置された細胞培養インサート32の内部に細胞培養液（図示せず）を注入するとともに、ペリサイト8を播種する（図34のステップS9乃至ステップS11）。そして、細胞培養インサート32の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、ペリサイト8を層状になるまで培養し、ペリサイト8が層状に成長した段階で細胞培養液を捨てる（図34のステップS12）。これにより、既に多孔質膜3の外側に層状に形成されているアストロサイト9は、細胞からの脚が多孔質膜3の小孔を貫通して、多孔質膜3の内面側に形成されたペリサイト8の近傍まで伸びた状態になる。

このように、細胞培養プレート29の貫通孔29eの内部は細胞培養室として用いられ、その内部に細胞培養インサート32が設置されている場合には、その細胞培養室が多孔質膜3によって2つに仕切られた状態となっている。したがって、本実施例の細胞培養装置は、筒状に形成される細胞培養インサート32の第1内壁32b（図33（c）を参照）及び細胞培養プレート29に設けられた貫通孔29eの内壁が、多孔質膜3によって上下に分画された一对の細胞培養室を構成するとともに、この細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備えた構造であるといえる。

[0063] 次に、血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度（例えば、37℃）以上で溶解する温度感受性ゲル6をペリサイト8の細胞層の上に塗布し（図34のステップS13）、さらに、この温度感受性ゲル6の中に血管内皮細胞7を包埋する（図34のステップS14）。その後、細胞培養インサート32の内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、血管内皮細胞7

を培養する（図34のステップS15）。

これにより、図37（c）に示すように温度感受性ゲル6に包埋された血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3種類の細胞層が細胞培養インサート32の底部に形成される。その後、細胞培養インサート32を細胞培養プレート29の貫通孔29eから取り出し、マイクロプレート2（図1（c）を参照）のウェル2bに設置する。さらに、細胞培養インサート32の内部の温度を37℃にすると、血管内皮細胞7の細胞増殖が停止するとともに、温度感受性ゲル6が溶解し（図34のステップS16）、血管内皮細胞7がペリサイト8に接触する。そこで、細胞培養インサート21の内部の温度を33℃に維持し、血管内皮細胞7の培養を再開させる。これにより、血管内皮細胞7、ペリサイト8及びアストロサイト9からなる3層構造のBBBモデルが完成する。

[0064] このように、本実施例の細胞培養装置においては、底部を下に向けた状態で細胞培養インサート32が貫通孔29eに設置された細胞培養プレート29の上面29aに第1のプレートカバー30を設置した後、この第1のプレートカバー30とともに細胞培養プレート29を反転させて、貫通孔29eの内部に細胞培養液5とともにアストロサイト9を播種すると、貫通孔29eの内壁によって細胞培養液5及びアストロサイト9の漏出が防止されるため、多孔質膜3の外側でアストロサイト9が容易に培養されるという作用を有する。また、細胞培養プレート29の下面29bに第2のプレートカバー31を設置して、細胞培養プレート29を第1のプレートカバー30及び第2のプレートカバー31とともに反転させると、貫通孔29eによって細胞培養インサート32が底部を下に向けた状態で保持されることになる。そのため、細胞培養インサート32の内部に細胞培養液5とともにペリサイト8及び血管内皮細胞7を播種する作業や細胞培養インサート32の内部で血管内皮細胞7及びペリサイト8を培養する作業が容易になる。さらに、第2のプレートカバー31が設置された細胞培養プレート29がマイクロプレート2として機能する。したがって、本実施例の細胞培養装置によれば、複数の

B B Bモデルを効率よく作製することが可能である。

また、本実施例の細胞方法では、ペリサイト8の細胞層の上に温度感受性ゲル6を塗布する工程を備えている。この場合、血管内皮細胞7の細胞シート20を予め準備する必要がないため、当該細胞シートを作製する工程を省くことができる。

実施例 6

[0065] 本発明の第6の実施の形態に係る細胞培養装置について、図38及び図39を参照しながら説明する。図38(a)及び図38(c)は細胞培養プレートの外観斜視図であり、図38(b)は図38(a)におけるQ-Q線矢視断面図である。図39(a)及び図39(c)はそれぞれ第1の底面カバー及び第2の底面カバーの外観斜視図であり、図39(b)は図39(a)におけるR-R線矢視断面図である。

図38(a)乃至図38(c)並びに図39(a)乃至図39(c)に示すように、本実施例の細胞培養装置は、細胞培養室の内壁として用いられる円形の貫通孔33dが設けられた細胞培養プレート33と、この細胞培養プレート33の底面33bに設置される第1の底面カバー35と、第1の底面カバー35の底板35aに設置され、細胞培養室カバーとして用いられる第2の底面カバー36を備えている。

細胞培養プレート33は、図38(a)乃至図38(c)に示すように略直方体状をなし、ウェルとして機能する12個(縦3列×横4列)の上記貫通孔33dが上面33aに設けられるとともに、底面33bに設けられた矩形状突出部33cには多孔質膜3からなるシート34が貼付又は熱融着されている。

第1の底面カバー35及び第2の底面カバー36は、図39(a)乃至図39(c)に示すように矩形状の底板35a、36aと、この底板35a、36aを囲む枠状の突出部が設けられている。そして、第1の底面カバー35は細胞培養プレート33の底面33bに設置された際に、突出部の内側へ矩形状突出部33cを配置可能な構造となっており、第2の底面カバー36

は第1の底面カバー35に設置された際に、矩形状突出部35bを突出部の内側へ配置可能な構造となっている。また、第1の底面カバー35は、細胞培養プレート33の底面33bに設置された場合に12個の貫通孔33dと符合する箇所に貫通孔33dと内径が等しく、細胞培養室の内壁として用いられる2個（縦3列×横4列）の円形の貫通孔35cが底板35aに設けられている。

なお、細胞培養室の内壁として用いられる貫通孔33dを備えた細胞培養プレート33は、細胞培養室の内壁として用いられる複数の貫通孔35cが設けられた第1の底面カバー35とともに、後述するように細胞培養室として用いられる。

[0066] ここで、本実施例の細胞培養装置を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する本発明の細胞培養方法について図40乃至図42を参照しながら説明する。

図40は本発明の第6の実施の形態に係る細胞培養方法の手順を示した工程図である。図41(a)は上下を反転させた細胞培養プレートに第1の底面カバーを取り付けた状態を示しており、図41(b)は図41(a)におけるS-S線矢視断面図であり、図41(c)は図41(b)において破線で囲まれた部分の拡大図である。また、図42(a)は図41(a)において第1の底面カバーに第2の底面カバーを取り付けるとともに細胞培養プレートの上下を反転させた状態を示しており、図42(b)は図42(a)におけるT-T線矢視断面図であり、図42(c)は図42(b)において破線で囲まれた部分の拡大図である。

[0067] まず、図41(a)及び図41(b)に示すように上下を反転させた細胞培養プレート33の底面33bに第1の底面カバー35を設置する（図40のステップS1）。次に、図41(a)に示すようにピペット4を用いて第1の底面カバー35の貫通孔35cの内部に細胞培養液（図示せず）を注入するとともに、アストロサイト9を播種する（図40のステップS2及びステップS3）。さらに、この状態で貫通孔35cの内部の温度を例えば33

℃に維持したまま、数日間かけて、図41(c)に示すアストロサイト9を層状になるまで培養する(図40のステップS4)。

そして、第1の底面カバー35に第2の底面カバー36を設置した後、第1の底面カバー35及び第2の底面カバー36と一体化した細胞培養プレート33の上下を反転させる(図40のステップS5及びステップS6)。さらに、図42(a)に示すようにピペット4を用いて細胞培養プレート33の貫通孔33dの内部に細胞培養液(図示せず)を注入するとともに、ペリサイト8を播種する(図40のステップS7及びステップS8)。

その後、細胞培養プレート33の貫通孔33dの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、ペリサイト8を層状になるまで培養し、ペリサイト8が層状に成長した段階で細胞培養液を捨てる(図40のステップS9)。これにより、既に多孔質膜3の外側に層状に形成されているアストロサイト9は、細胞からの脚が多孔質膜3の小孔を貫通して、多孔質膜3の内面側に形成されたペリサイト8の近傍まで伸びた状態になる。

このように、細胞培養プレート33の貫通孔33d及び第1の底面カバー35の貫通孔35cの内部は細胞培養室として用いられ、細胞培養プレート33に第1の底面カバー35が設置されている場合には、あたかも1つの細胞培養室が多孔質膜3によって2つに仕切られた状態となる。したがって、本実施例の細胞培養装置は、細胞培養プレート33に設けられた貫通孔33d及び第1の底面カバー35に設けられた貫通孔35cの内壁が、多孔質膜3によって上下に分画された一对の細胞培養室を構成するとともに、この細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備えた構造であるといえる。

[0068] 次に、血管内皮細胞の細胞増殖が停止する温度(例えば、37℃)以上で溶解する温度感受性ゲル6をペリサイト8の細胞層の上に塗布し(図40のステップS10)、さらに、この温度感受性ゲル6の中に血管内皮細胞7を包埋する(図40のステップS11)。その後、細胞培養プレート33の貫通孔33dの内部の温度を例えば33℃に維持したまま、数日間かけて、血

管内皮細胞 7 を培養する（図 40 のステップ S 1 2）。

その結果、図 4 2（c）に示すように温度感受性ゲル 6 に包埋された血管内皮細胞 7、ペリサイト 8 及びアストロサイト 9 からなる 3 種類の細胞層が細胞培養インサート 3 2 の底部に形成される。その後、細胞培養プレート 3 3 の貫通孔 3 3 d の内部の温度を 3 7℃にすると、血管内皮細胞 7 の細胞増殖が停止するとともに、温度感受性ゲル 6 が溶解し（図 40 のステップ S 1 2）、血管内皮細胞 7 がペリサイト 8 に接触する。この状態で、細胞培養プレート 3 3 の貫通孔 3 3 d の内部の温度を 3 3℃に維持し、血管内皮細胞 7 の培養を再開させると、血管内皮細胞 7、ペリサイト 8 及びアストロサイト 9 からなる 3 層構造の BBB モデルが完成する。

[0069] このように、本実施例の細胞培養装置においては、細胞培養プレート 3 3 を反転した状態で底面 3 3 b に第 1 の底面カバー 3 5 を設置した後、貫通孔 3 5 c の内部に細胞培養液 5 とともにアストロサイト 9 を播種すると、貫通孔 3 5 c の内壁によって細胞培養液 5 及びアストロサイト 9 の漏出が防止されるため、多孔質膜 3 の外面でアストロサイト 9 が容易に培養されるという作用を有する。また、第 1 の底面カバー 3 5 に第 2 の底面カバー 3 6 を設置して、細胞培養プレート 3 3 を第 1 の底面カバー 3 5 及び第 2 の底面カバー 3 6 とともに反転させた後、細胞培養プレート 3 3 の貫通孔 3 3 d の内部に細胞培養液 5 とともにペリサイト 8 及び血管内皮細胞 7 を播種すると、貫通孔 3 3 d の内壁によって細胞培養液 5、ペリサイト 8 及び血管内皮細胞 7 の漏出が防止されるため、多孔質膜 3 の内面でペリサイト 8 及び血管内皮細胞 7 が容易に培養されるという作用を有する。さらに、第 1 の底面カバー 3 5 及び第 2 の底面カバー 3 6 が設置された細胞培養プレート 3 3 がマイクロプレート 2 として機能するという作用を有する。

したがって、本実施例の細胞培養装置によれば、細胞培養インサートを必要としないことに加え、細胞培養プレート 3 3 をそのままマイクロプレート 2 として利用することができることから、細胞培養インサートやマイクロプレート 2 を用いる場合に比べて血管内皮細胞 7、ペリサイト 8 及びアストロ

サイト9からなる3層構造のBBBモデルの量産性を高めることが可能である。

また、本実施例の細胞方法では、ペリサイト8の細胞層の上に温度感受性ゲル6を塗布する工程を備えている。この場合、血管内皮細胞7の細胞シート20を予め準備する必要がないため、当該細胞シートを作製する工程を省くことができる。したがって、上述のBBBモデルの量産性がさらに高まる。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明に係る細胞培養方法及びそれに用いられる細胞培養装置は、血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルの量産化を図る場合に適用可能である。

符号の説明

- [0071]
- | | |
|-----|-----------|
| 1 | 細胞培養インサート |
| 1 a | 側面 |
| 1 b | 大径開口部 |
| 1 c | 小径開口部 |
| 1 d | フランジ |
| 1 e | 第4内壁 |
| 2 | マイクロプレート |
| 2 a | 上面 |
| 2 b | ウェル |
| 2 c | 底面 |
| 3 | 多孔質膜 |
| 4 | ピペット |
| 5 | 細胞培養液 |
| 6 | 温度感受性ゲル |
| 7 | 血管内皮細胞 |
| 8 | ペリサイト |

- 9 アストロサイト
- 10 インサート保持プレート
 - 10a 側板
 - 10b 底板
 - 10c 角孔
 - 10d 丸孔
- 11 細胞培養ケース
 - 11a 底板
 - 11b 貫通孔
- 12 インサート押え具
 - 12a 角棒
 - 12b 連結板
- 13 ケース用蓋
 - 13a 凹部
 - 13b 突出部
- 14 プレート
 - 14a 基部
 - 14b 第1の環状突出部
 - 14c 第2の環状突出部
 - 14d 貫通孔
- 15 プレートカバー
 - 15a 基部
 - 15b 保持部
- 16 スペーサ
 - 16a 基部
 - 16b 保持部
 - 16c 円筒体
 - 16d 先端面

- 1 7 押出具
- 1 7 a 押出板
- 1 7 b 保持部
- 1 7 c 押出部
- 1 7 d 先端面
- 1 8 膜保持具
- 1 8 a 係合部
- 1 8 b 第3内壁
- 1 9 インサート本体
- 1 9 a フランジ
- 1 9 b 先鋭部
- 2 0 細胞シート
- 2 1 細胞培養インサート
- 2 2 プレート
- 2 2 a 基部
- 2 2 b 貫通孔
- 2 2 c 円筒体
- 2 3 プレートカバー
- 2 3 a 基部
- 2 3 b 円形突出部
- 2 4 スペーサカバー
- 2 4 a 基部
- 2 4 b 円形突出部
- 2 5 スペーサ
- 2 5 a 基部
- 2 5 b 貫通孔
- 2 5 c 円筒体
- 2 6 押出具

- 2 6 a 押出板
- 2 6 b 押出部
- 2 6 c 先端面
- 2 7 膜保持具
- 2 7 a フランジ
- 2 8 スリーブ
- 2 8 a フランジ
- 2 9 細胞培養プレート
- 2 9 a 上面
- 2 9 b 下面
- 2 9 c 第1の矩形状突出部
- 2 9 d 第2の矩形状突出部
- 2 9 e 貫通孔
- 2 9 f 大径部
- 2 9 g 小径部
- 3 0 第1のプレートカバー
- 3 0 a 凹部
- 3 0 b 突出部
- 3 1 第2のプレートカバー
- 3 1 a 凹部
- 3 1 b 突出部
- 3 2 細胞培養インサート
- 3 2 a フランジ
- 3 2 b 第1内壁
- 3 3 細胞培養プレート
- 3 3 a 上面
- 3 3 b 底面
- 3 3 c 矩形状突出部

- 3 3 d 貫通孔
- 3 4 シート
- 3 5 第 1 の底面カバー
 - 3 5 a 底板
 - 3 5 b 矩形形状突出部
 - 3 5 c 貫通孔
- 3 6 第 2 の底面カバー
 - 3 6 a 底板

請求の範囲

- [請求項1] 両面が生体材料を定着可能に形成された多孔質膜（3）によって、筒状に形成される内壁が上下に分画された一対の細胞培養室を、複数連結して上下に分画されたそれぞれを一体化させて備え、
- 分画されそれぞれ一体化された前記細胞培養室の少なくともいずれか一方を同時に閉塞する細胞培養室カバーと、を備えていることを特徴とする細胞培養装置。
- [請求項2] 前記内壁として用いられる複数の第1の貫通孔（33d）を有するとともに、この第1の貫通孔（33d）を覆うように前記多孔質膜（3）からなるシート（34）が底面（33b）に設置された細胞培養プレート（33）と、
- 上部が開口し、底板（35a）に前記第1の貫通孔（33d）とともに前記内壁として用いられる複数の第2の貫通孔（35c）が設けられるとともに、前記細胞培養プレート（33）の前記底面（33b）に設置される第1の底面カバー（35）と、
- 前記細胞培養室カバーとして、前記第1の底面カバー（35）の前記底板（35a）に設置される第2の底面カバー（36）と、を備え、
- 前記第2の貫通孔（35c）は、前記細胞培養プレート（33）の前記底面（33b）に設置された状態の前記第1の底面カバー（35）を平面視した場合に前記第1の貫通孔（33d）と符合する箇所に設けられていることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養装置。
- [請求項3] 前記多孔質膜（3）によって一端が閉塞され、前記細胞培養室の前記内壁として用いられる細胞培養インサート（32）の第1内壁（32b）と、
- この細胞培養インサート（32）が内挿され、前記細胞培養室の前記内壁として用いられる複数の貫通孔（29e）が設けられた細胞培養プレート（29）と、

前記細胞培養室カバーとして、前記細胞培養プレート（29）の両面にそれぞれ設置されて前記細胞培養インサート（32）が内挿された状態の前記貫通孔（29e）を覆う平板状の第1のプレートカバー（30）及び第2のプレートカバー（31）と、を備えていることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養装置。

[請求項4]

前記多孔質膜（3）によって一端が閉塞され、前記内壁として用いられる第2内壁（27b）を備えて前記細胞培養室として用いられる膜保持具（27）と、

複数の第1の貫通孔（22b）が形成された平板状の第1の基部（22a）の片面に前記第1の貫通孔（22b）と連通し、前記膜保持具（27）が内部に設置されて、前記第1の貫通孔（22b）とともに前記内壁として用いられる第1の筒体（22c）が垂直に立設されたプレート（22）と、

複数の前記第1の筒体（22c）に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第1の突出部（23b）が平板状の第2の基部（23a）の片面に設けられ、前記細胞培養室カバーとして、前記膜保持具（27）が内部に設置された状態の前記第1の貫通孔（22b）を覆うプレートカバー（23）と、

複数の前記第1の筒体（22c）に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第2の突出部（24b）が平板状の第3の基部（24a）の片面に設けられ、前記細胞培養室カバーとして、前記膜保持具（27）が内部に設置された状態の前記第1の貫通孔（22b）を覆うスペーサカバー（24）と、

前記第1の貫通孔（22b）と同数の、前記内壁として用いられる第2の貫通孔（25b）が形成された平板状の第4の基部（25a）の片面に、前記第1の筒体（22c）とともに前記細胞培養室を構成し、複数の前記第1の筒体（22c）に対してそれぞれ同時に内挿され、前記第2の貫通孔（25b）とともに前記内壁として用いられる

複数の第2の筒体（25c）が前記第2の貫通孔（25b）と連通するように垂直に立設されたスペーサ（25）と、

平板状の押出板（26a）の片面に、複数の前記第1の貫通孔（22b）に対してそれぞれ同時に内挿される複数の押出部（26b）が垂直に立設された押出具（26）と、を備えていることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養装置。

[請求項5]

前記多孔質膜（3）によって一端が閉塞され、前記内壁として用いられる第3内壁（18b）を備えて前記細胞培養室として用いられる膜保持具（18）と、

平板状の基部（14a）に前記膜保持具（18）が内部に設置されて前記細胞培養室の前記内壁として用いられる複数の貫通孔（14d）が設けられた前記細胞培養室としてのプレート（14）と、

前記細胞培養室カバーとして、前記膜保持具（18）が内部に設置された状態の前記貫通孔（14d）を覆うように前記プレート（14）に設置される平板状の2枚のプレートカバー（15）と、

平板状の押出板（17a）の片面に、複数の前記貫通孔（14d）に対してそれぞれ同時に内挿される複数の押出部（17c）が垂直に立設された押出具（17）と、を備えていることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養装置。

[請求項6]

前記プレート（14）は、前記基部（14a）の両面に前記貫通孔（14d）と連通する第1の突出部（14b）及び第2の突出部（14c）が前記基部（14a）を平面視して前記貫通孔（14d）を囲むようにそれぞれ設けられ、

前記プレートカバー（15）は、複数の前記第1の突出部（14b）及び前記第2の突出部（14c）に対してそれぞれ同時に嵌合する複数の第1の筒体（15b）が片面に設けられ、

前記押出具（17）は、前記押出部（17c）よりも短く、複数の前記第1の突出部（14b）及び前記第2の突出部（14c）に対し

てそれぞれ同時に嵌合する複数の第2の筒体（17b）が前記押出部（17c）をそれぞれ囲むように前記押出板（17a）の片面に設けられていることを特徴とする請求項5に記載の細胞培養装置。

[請求項7]

前記多孔質膜（3）によって一端が閉塞され、前記内壁として用いられる第4内壁（1e）を備えて前記細胞培養室として用いられる細胞培養インサート（1）と、

上部が開口し、前記内壁として用いられるとともに前記細胞培養インサート（1）が内挿される複数の貫通孔（11b）が底板（11a）に設けられて前記細胞培養室として用いられる細胞培養ケース（11）と、

この細胞培養ケース（11）の複数の前記貫通孔（11b）に対して複数の前記細胞培養インサート（1）をそれぞれ同時に内挿可能な状態で保持するインサート保持手段（10、12）と、

前記細胞培養ケース（11）の前記上部に前記細胞培養室カバーとして覆設されるケース用蓋（13）と、を備えることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養装置。

[請求項8]

両面が生体材料を定着可能に形成された多孔質膜（3）によって、筒状に形成される内壁が上下に分画された複数対の細胞培養室を用いて血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトからなる3層構造のBBBモデルを作製する細胞培養方法であって、

前記多孔質膜（3）において上方を向いている第1の面に前記アストロサイトを播種する工程と、

前記アストロサイトを培養する工程と、

複数対の前記細胞培養室の上端開口部を同時に閉塞する工程と、

複数対の前記細胞培養室を同時に反転して前記多孔質膜（3）の第2の面に前記ペリサイトを播種する工程と、

前記ペリサイトを培養する工程と、

前記多孔質膜（3）の前記第2の面上にシート状の前記血管内皮細胞

胞を敷設する工程と、

前記血管内皮細胞を培養する工程と、を備えていることを特徴とする細胞培養方法。

[請求項9]

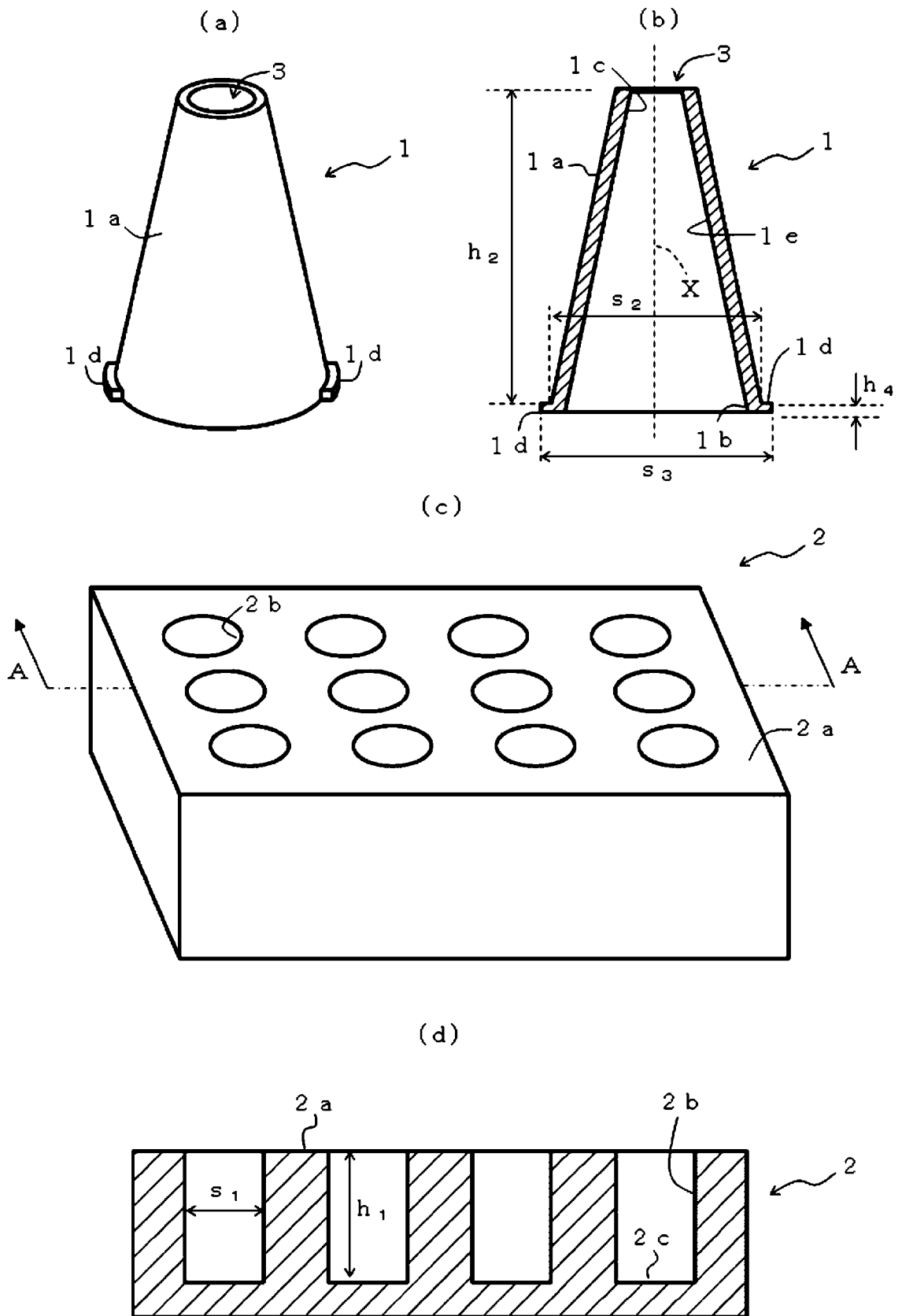
前記血管内皮細胞が温度感受性を有して所望の温度で細胞増殖が停止するとともに、

前記多孔質膜（3）の前記第2の面上にシート状の前記血管内皮細胞を敷設する工程に代えて、

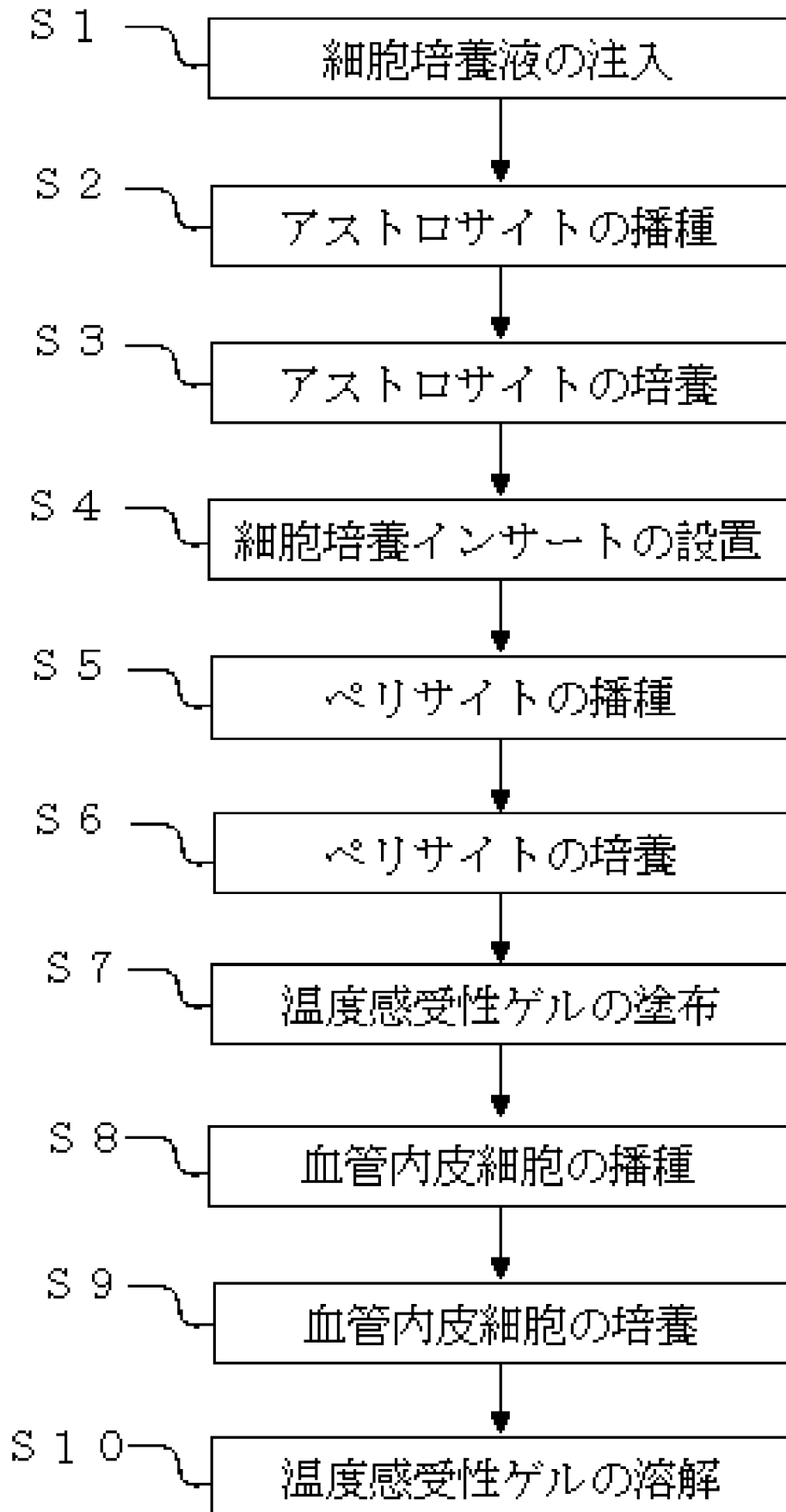
温度感受性ゲルに前記血管内皮細胞を包埋した状態で前記多孔質膜（3）の前記第2の面上に播種する工程を備えるとともに、

前記血管内皮細胞を培養する工程の後に前記温度感受性ゲルを溶解させる工程を備えていることを特徴とする請求項8に記載の細胞培養方法。

[図1]

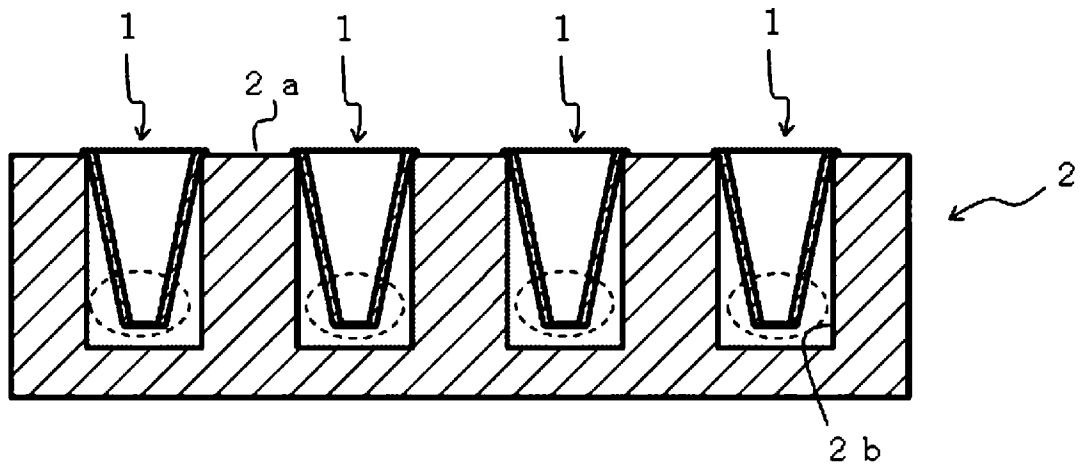


[図2]

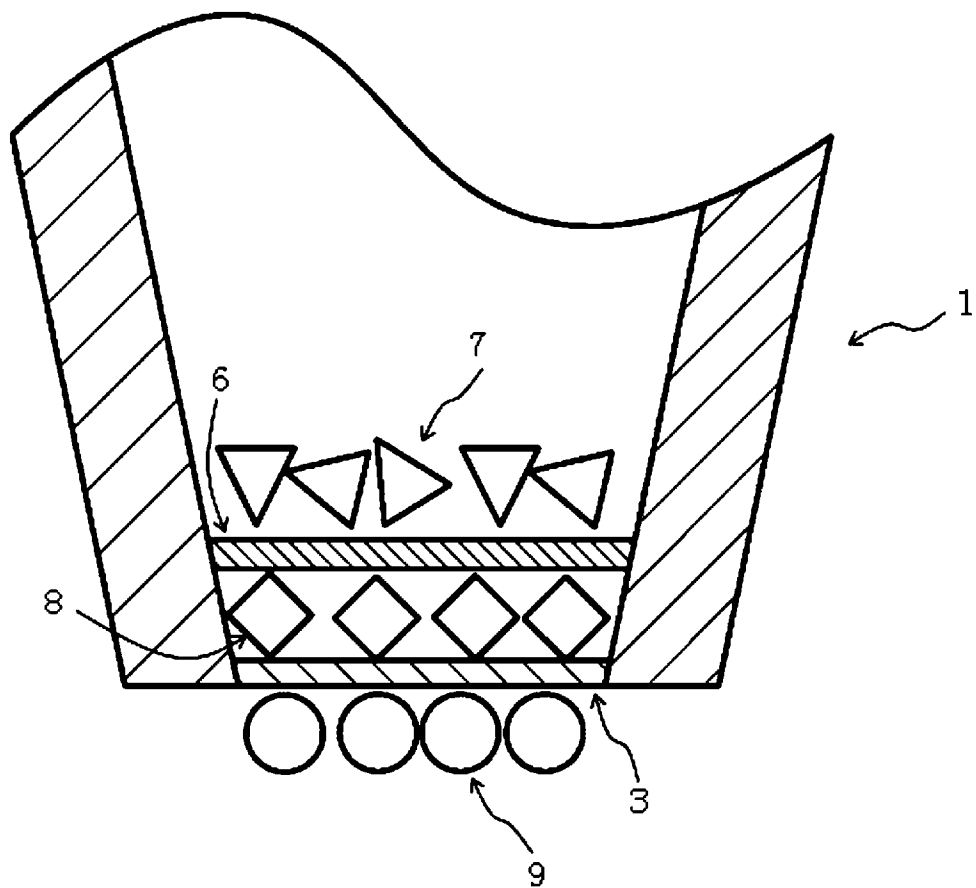


[図4]

(a)

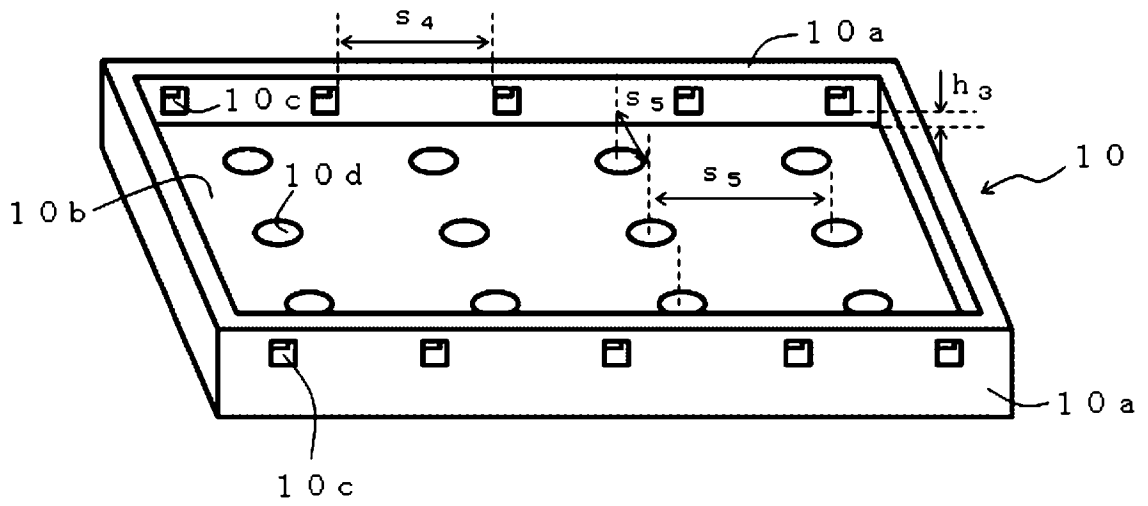


(b)

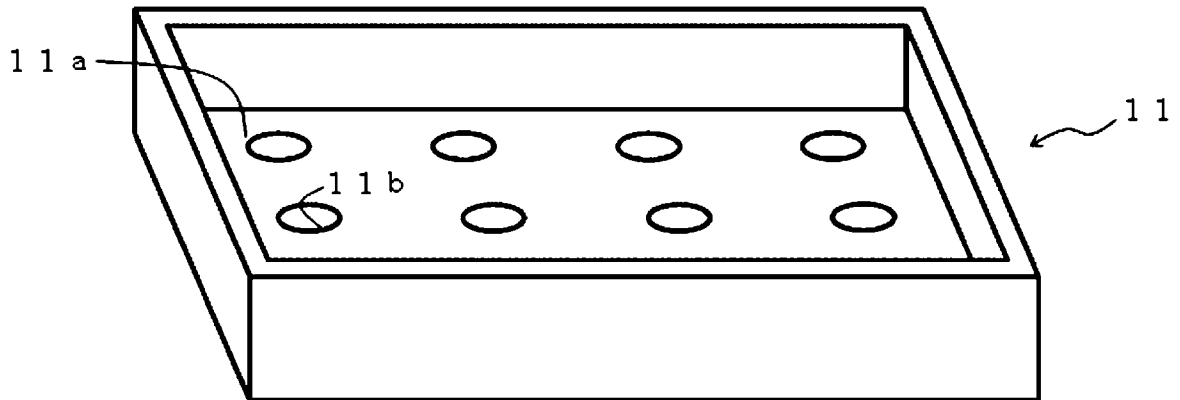


[図5]

(a)

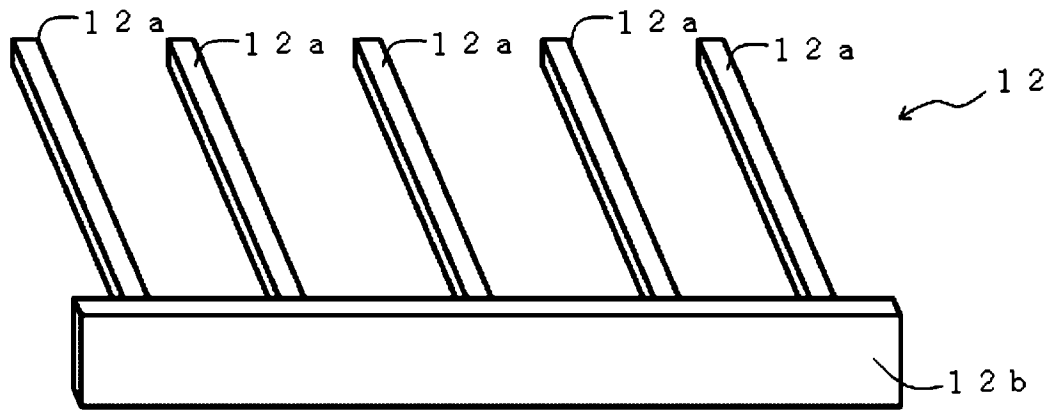


(b)

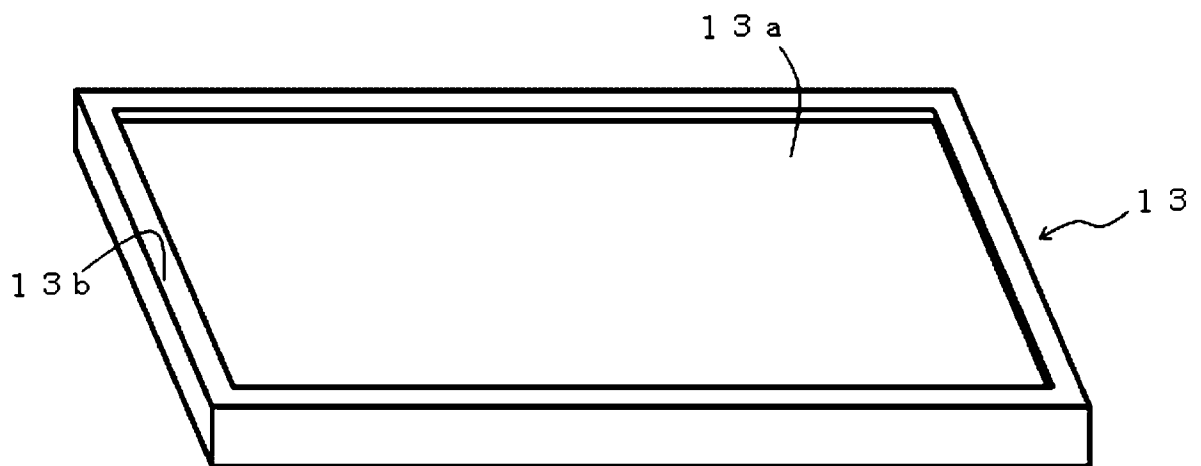


[図6]

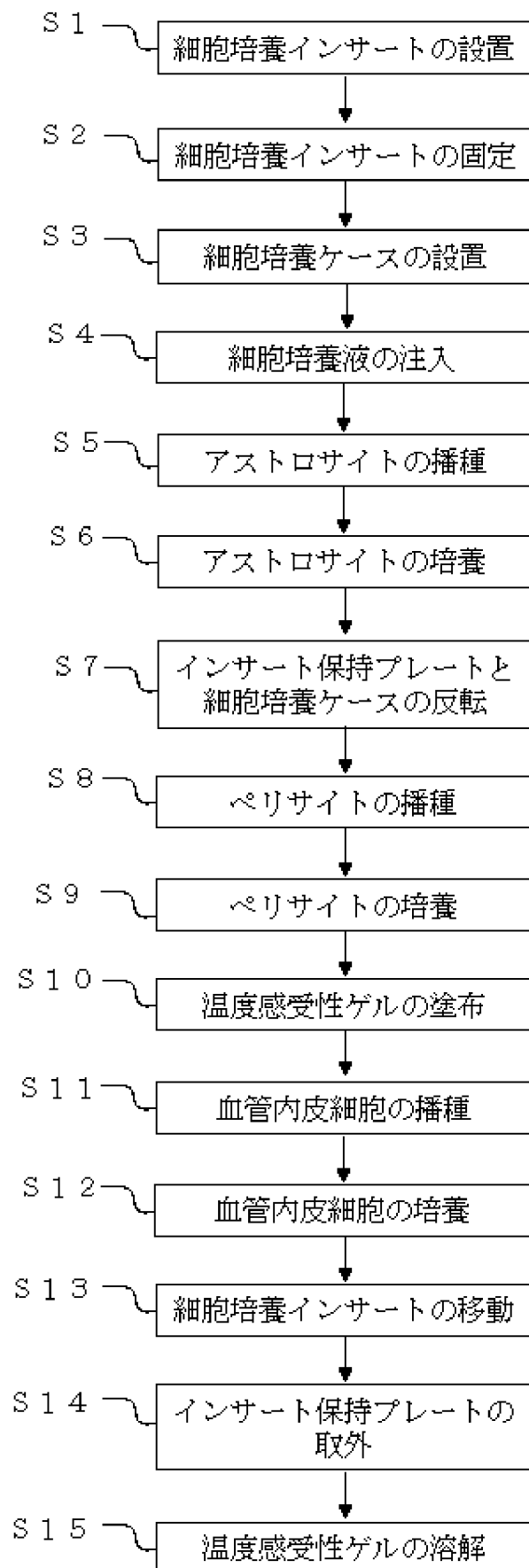
(a)



(b)

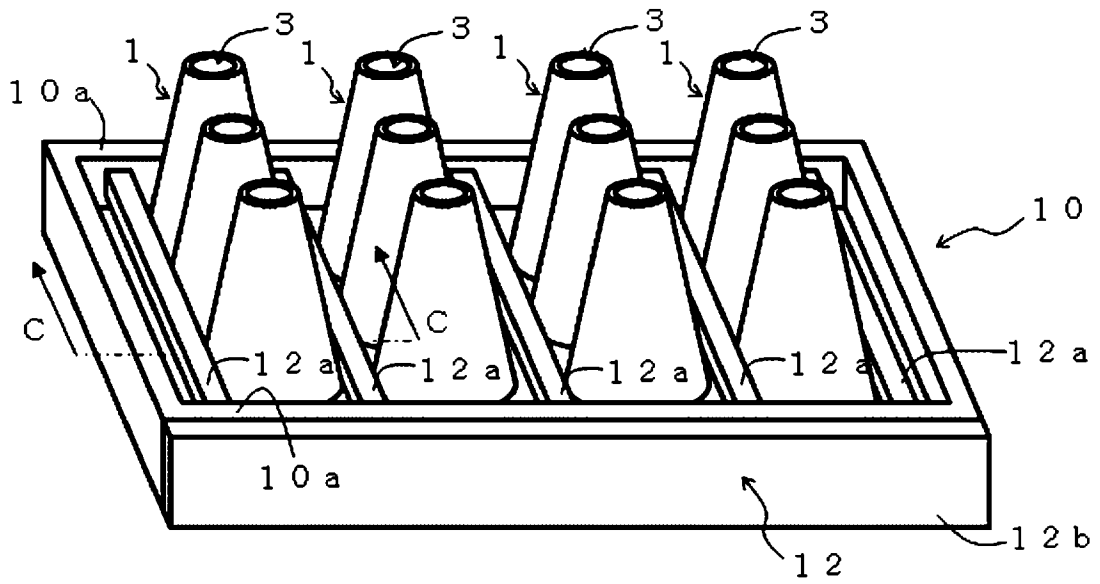


[図7]

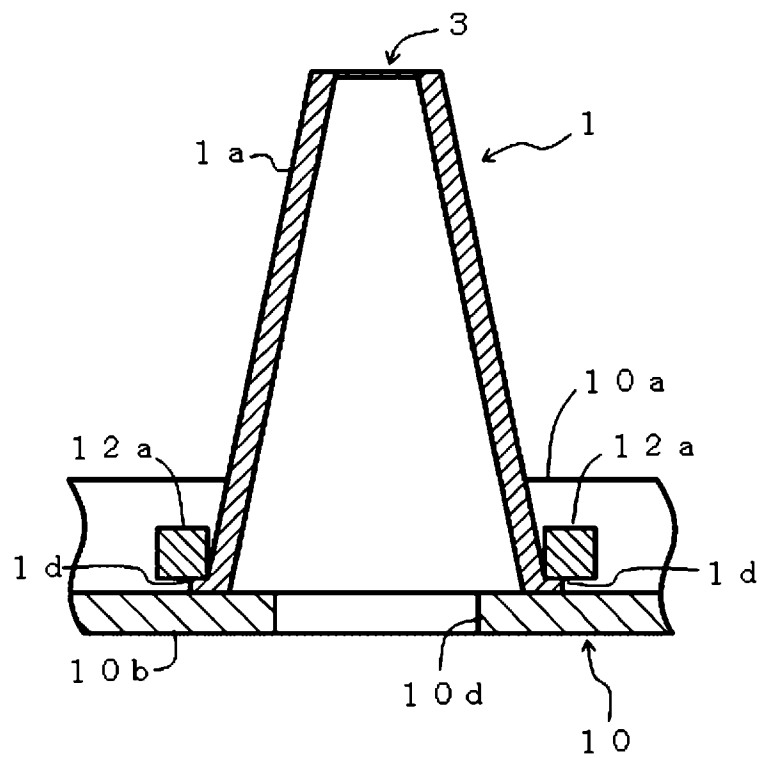


[図8]

(a)

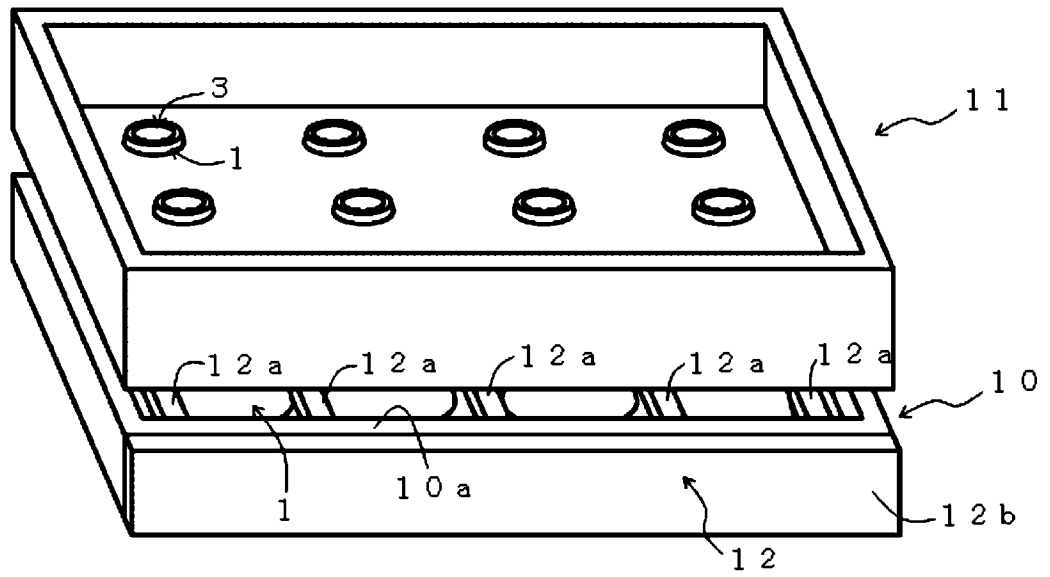


(b)

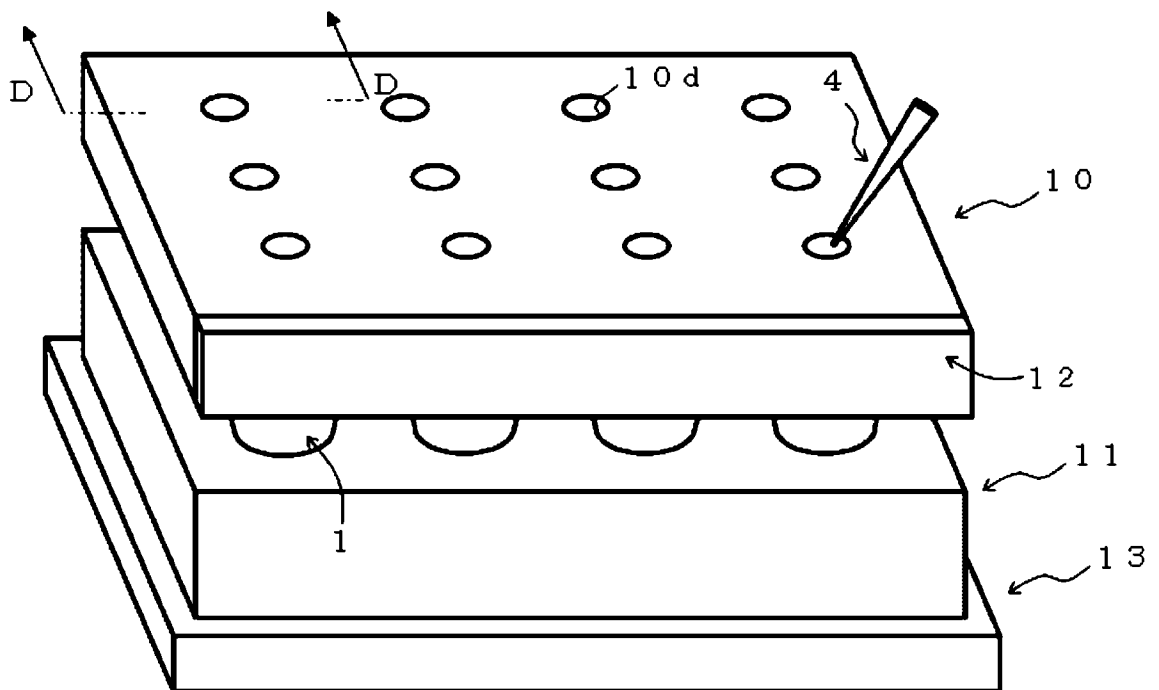


[図9]

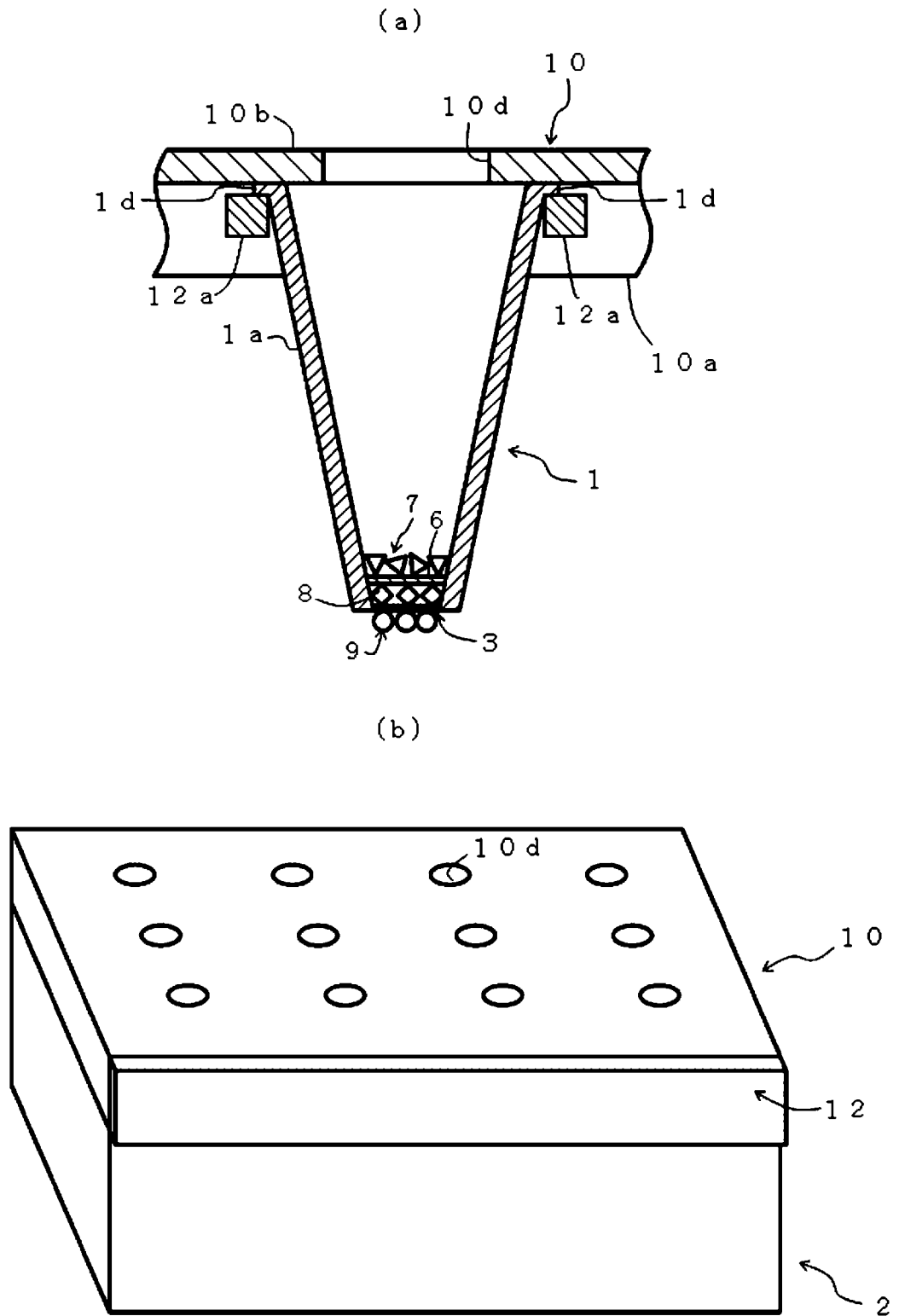
(a)



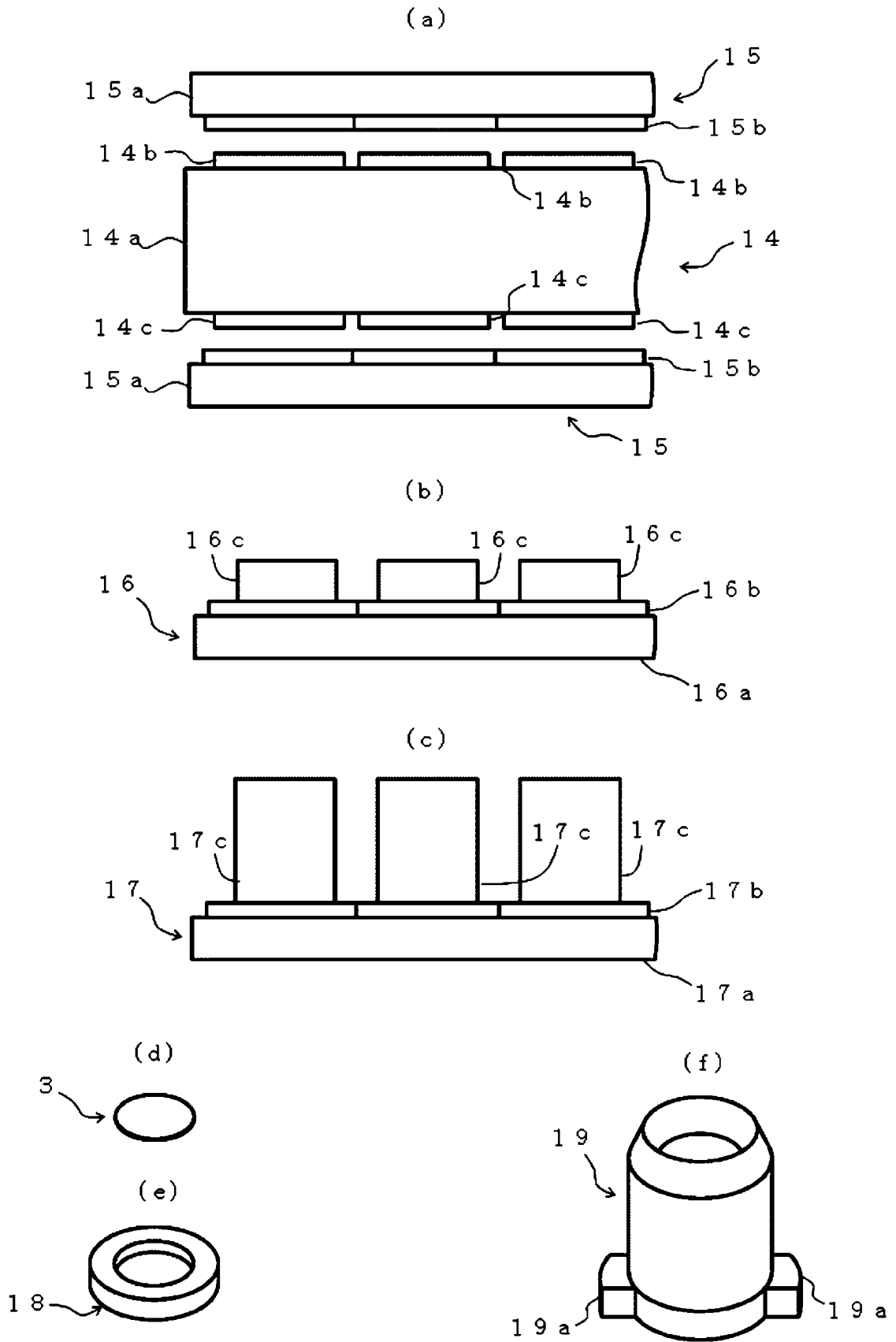
(b)



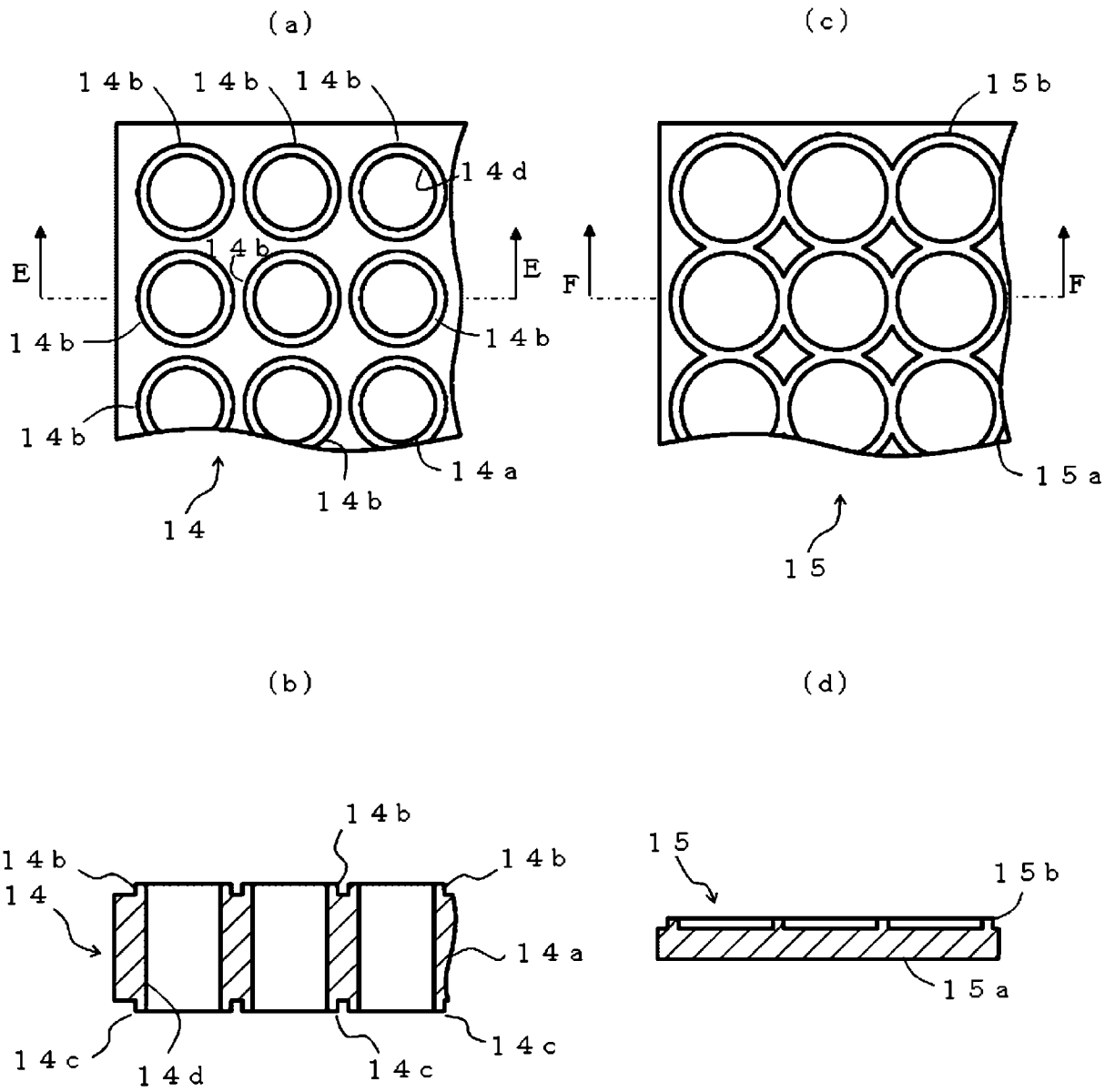
[図10]



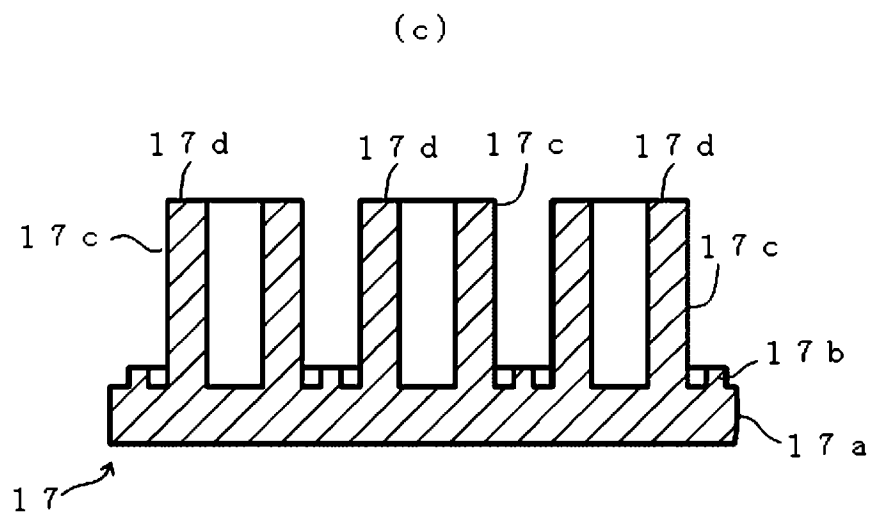
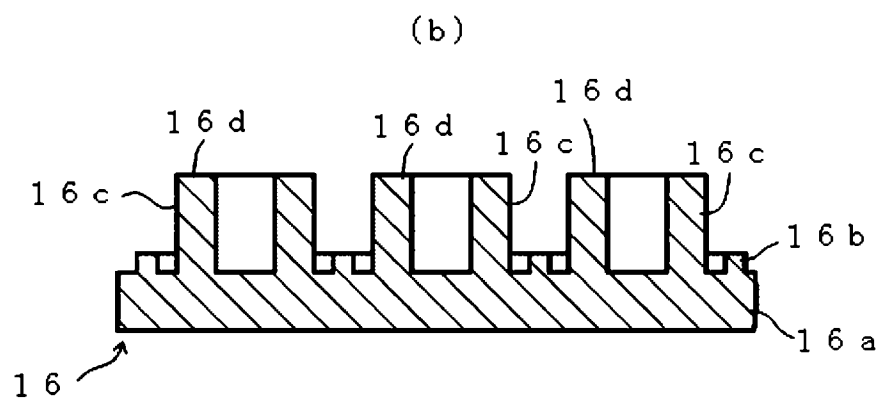
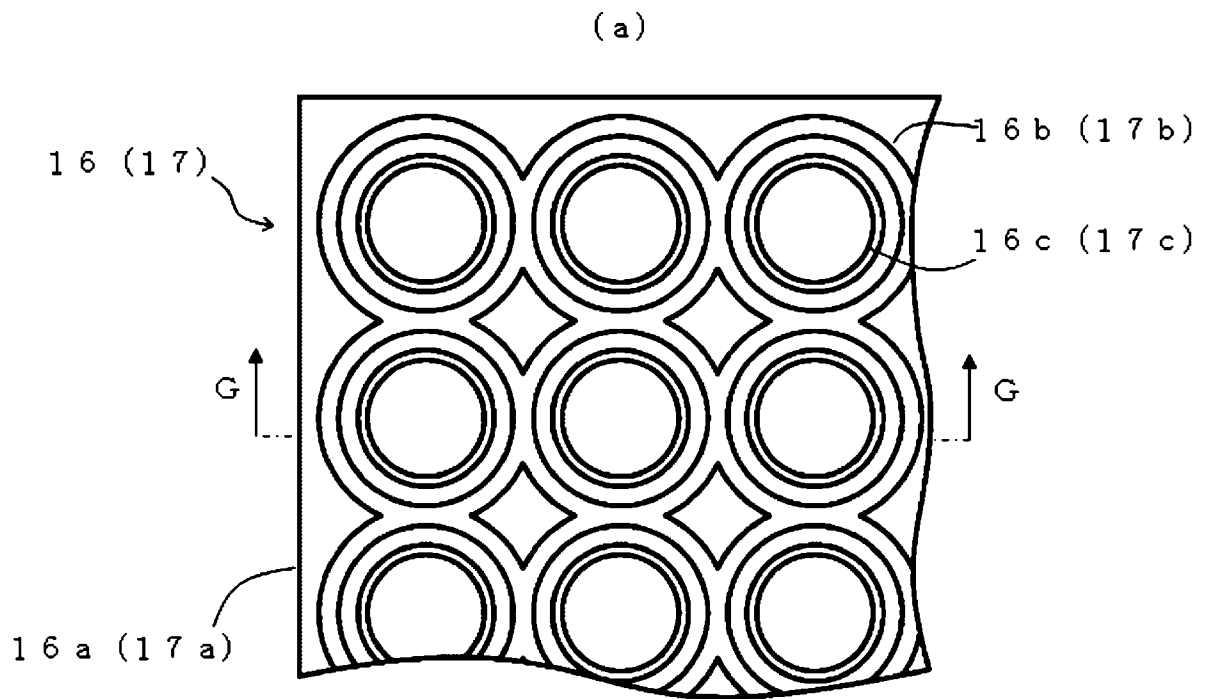
[図11]



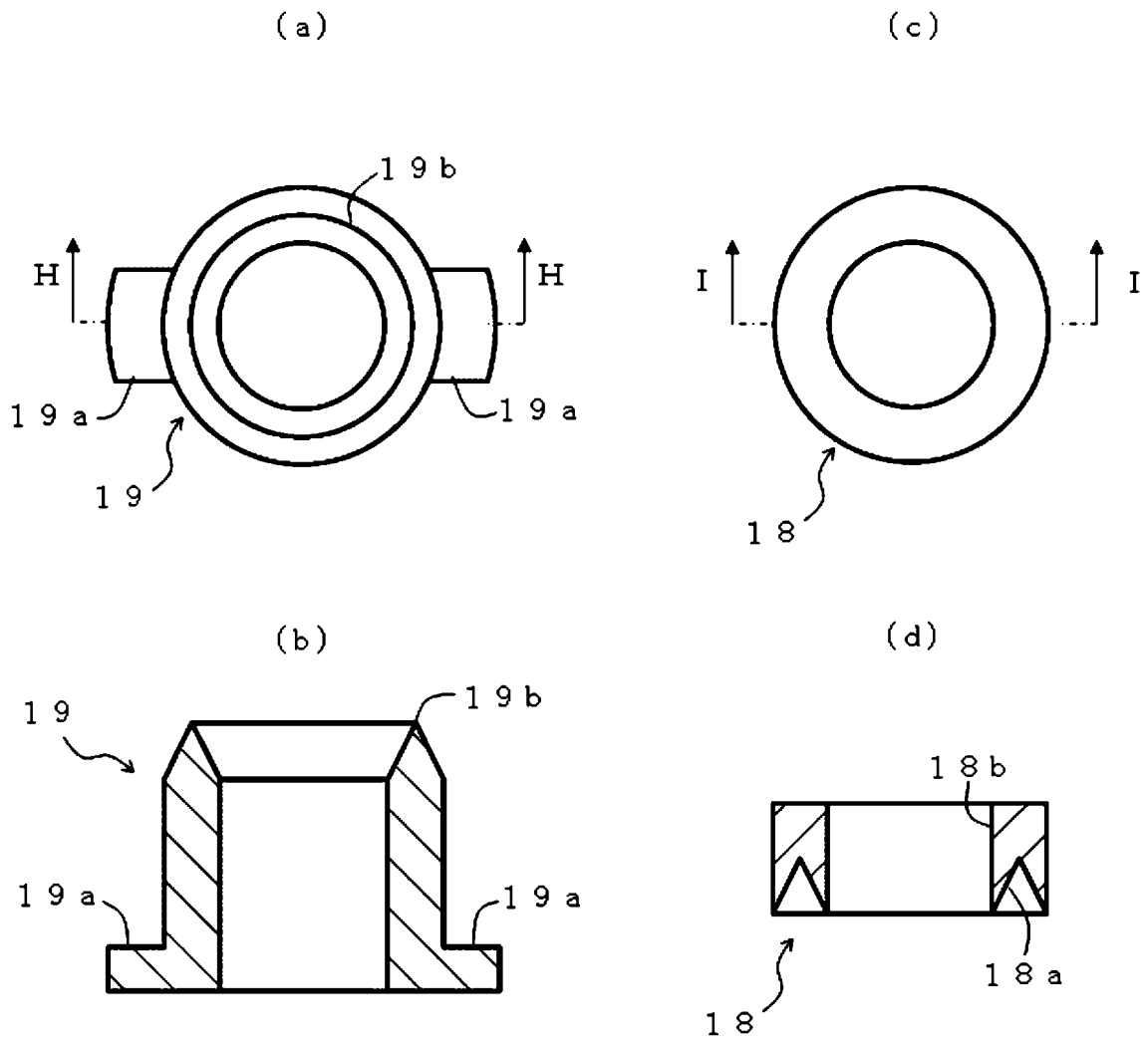
[図12]



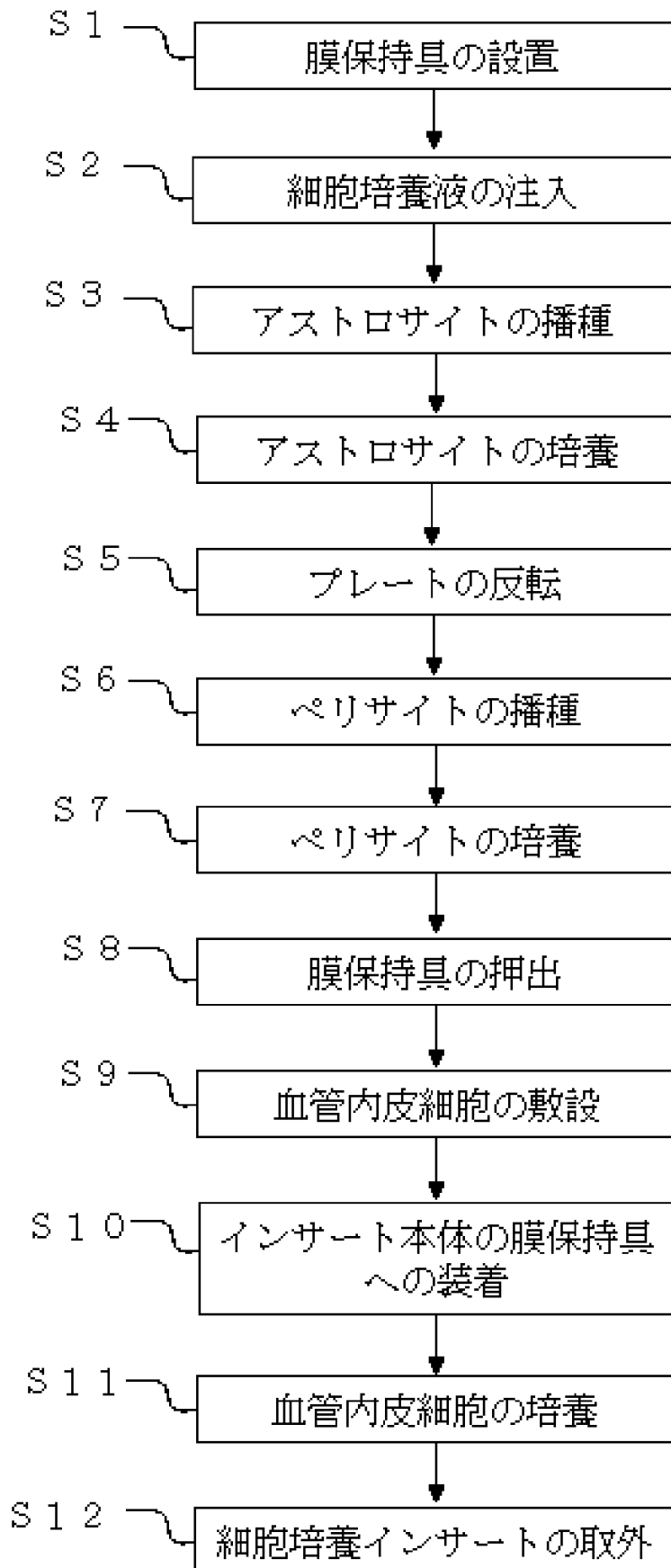
[図13]



[図14]

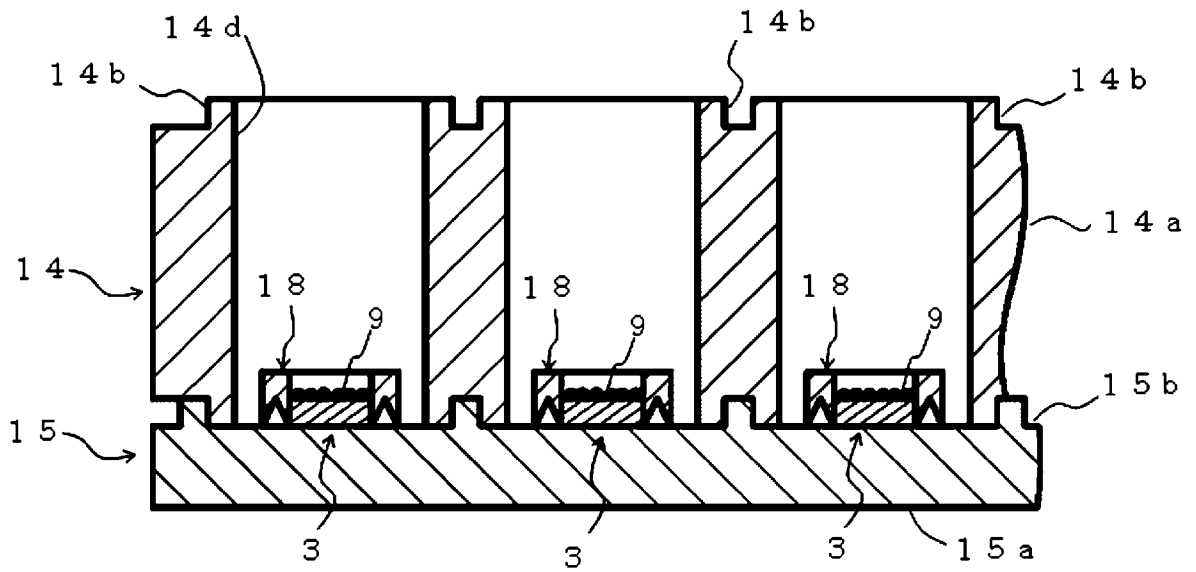


[図15]

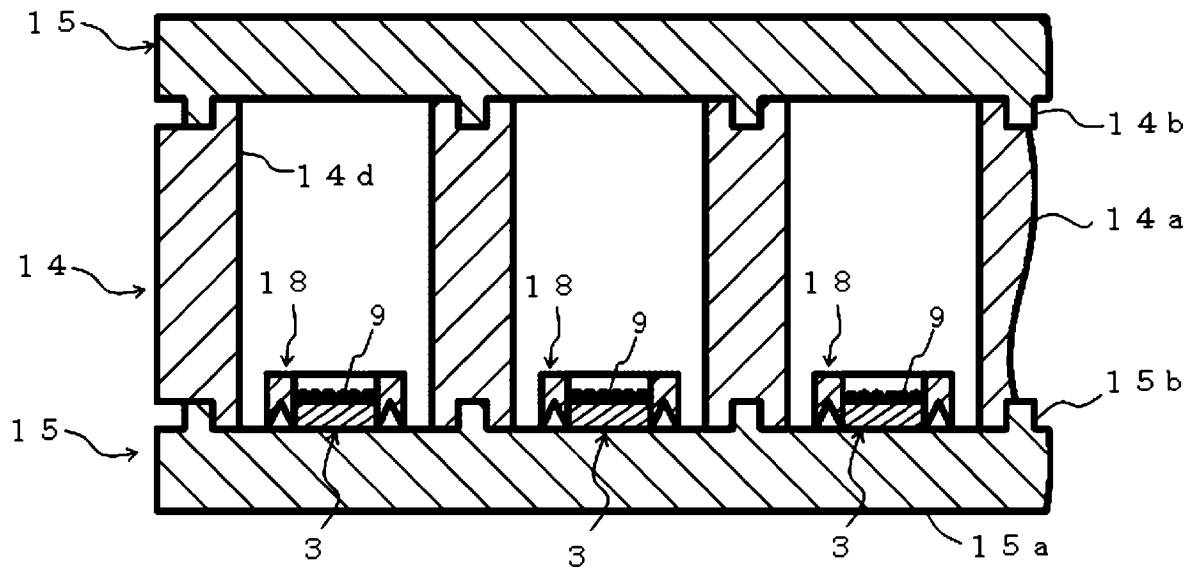


[図16]

(a)

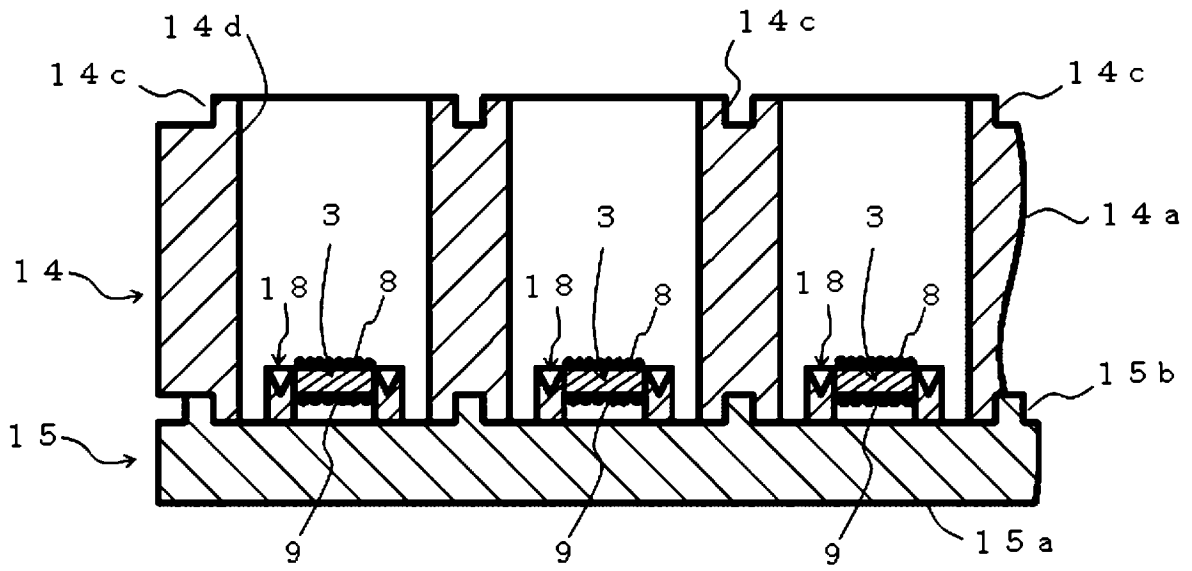


(b)

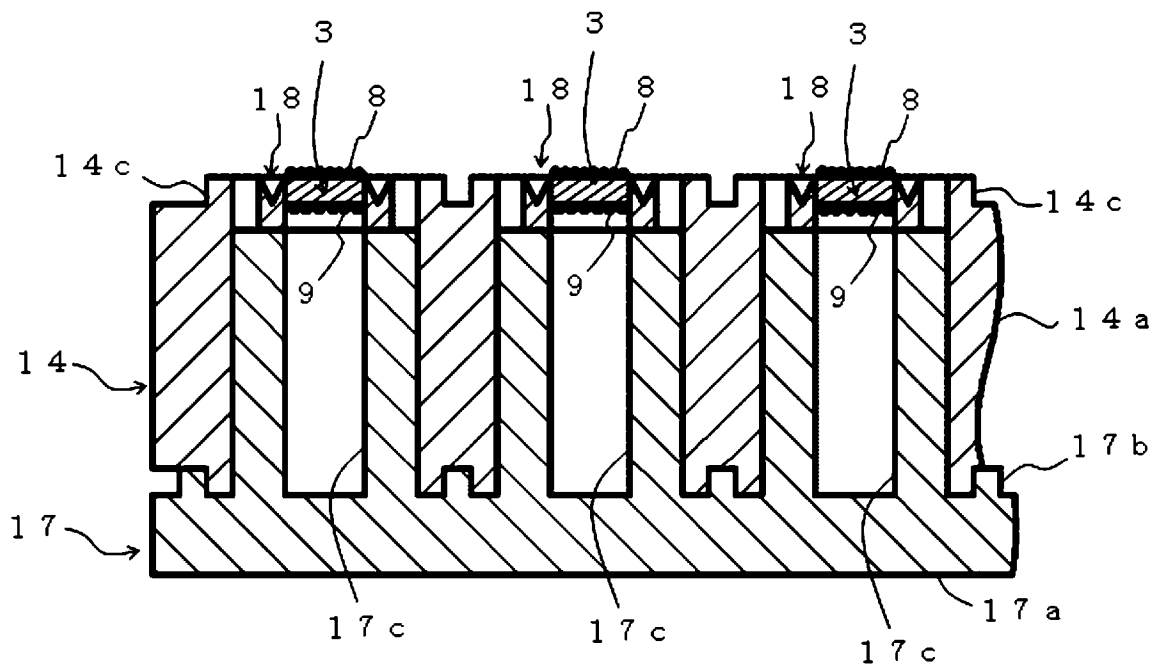


[図17]

(a)

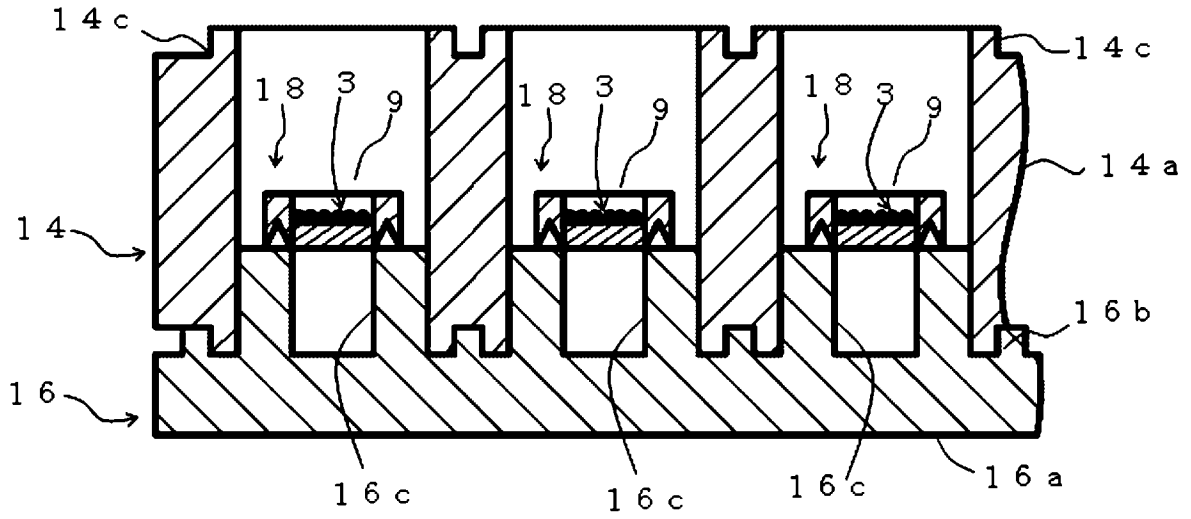


(b)

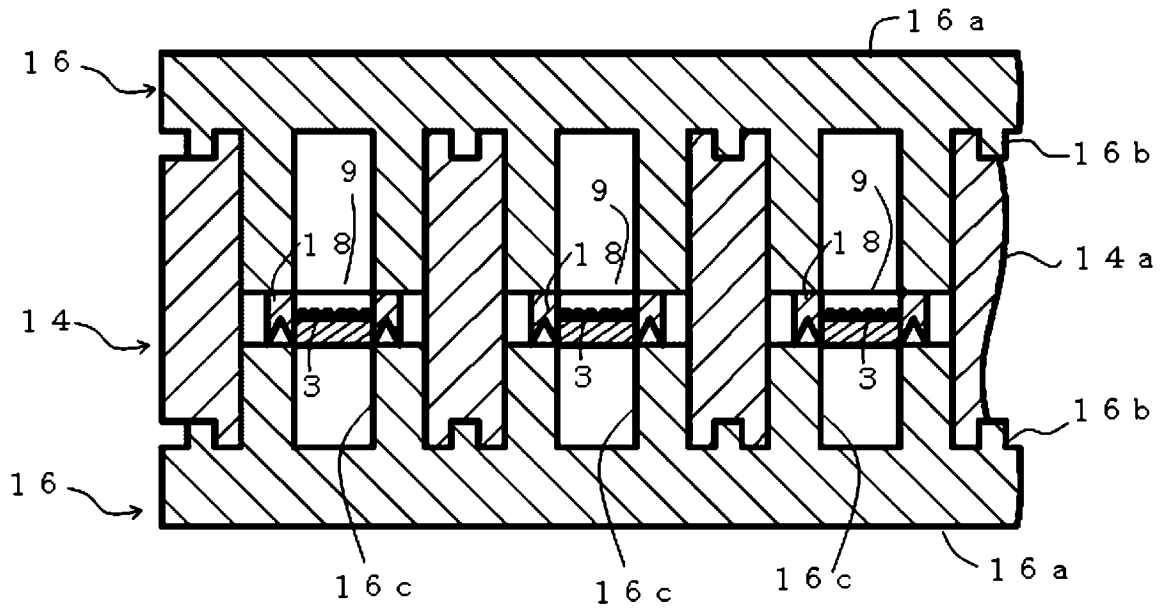


[図19]

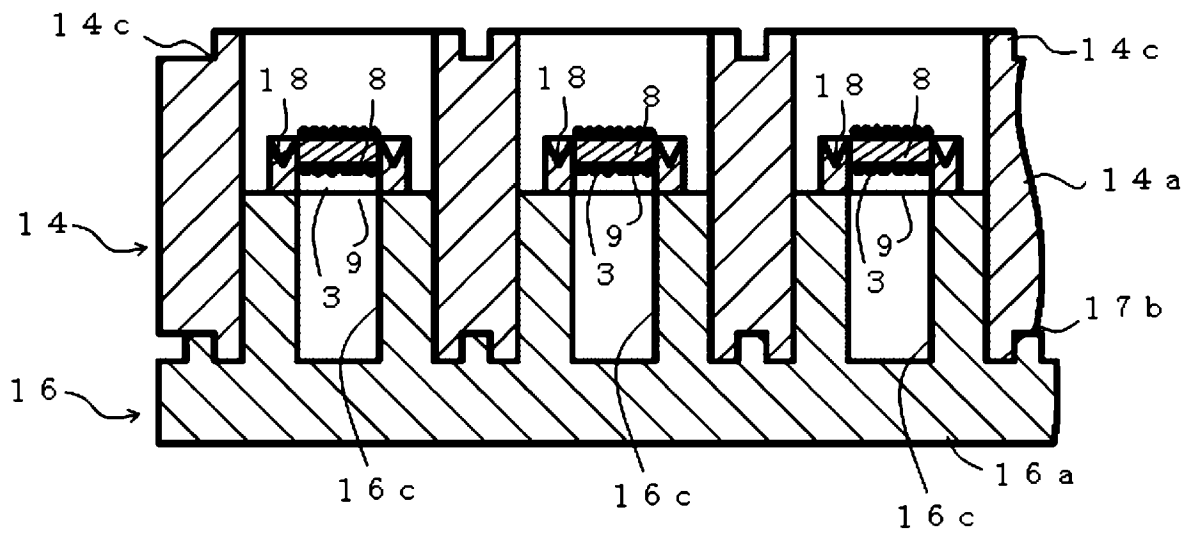
(a)



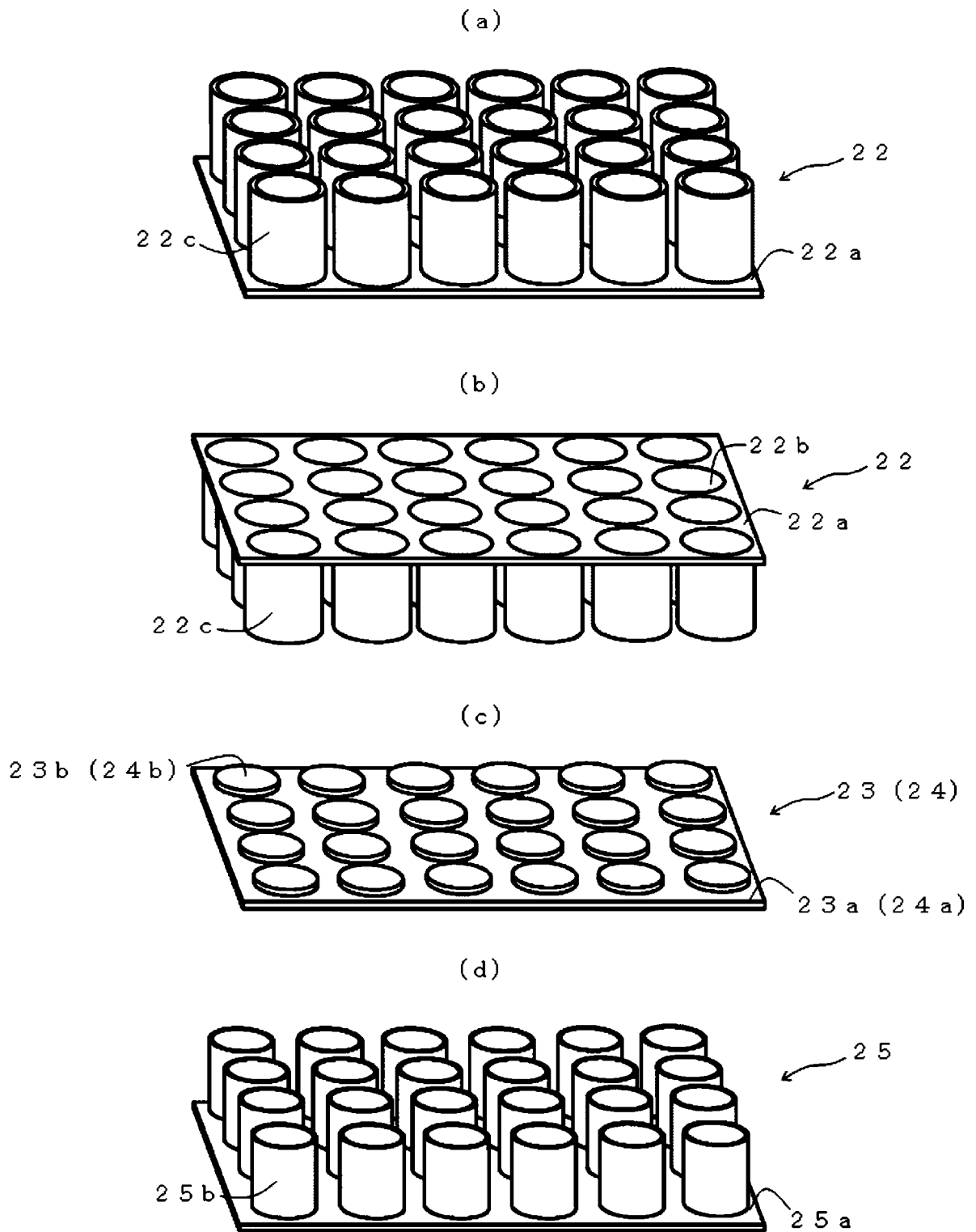
(b)



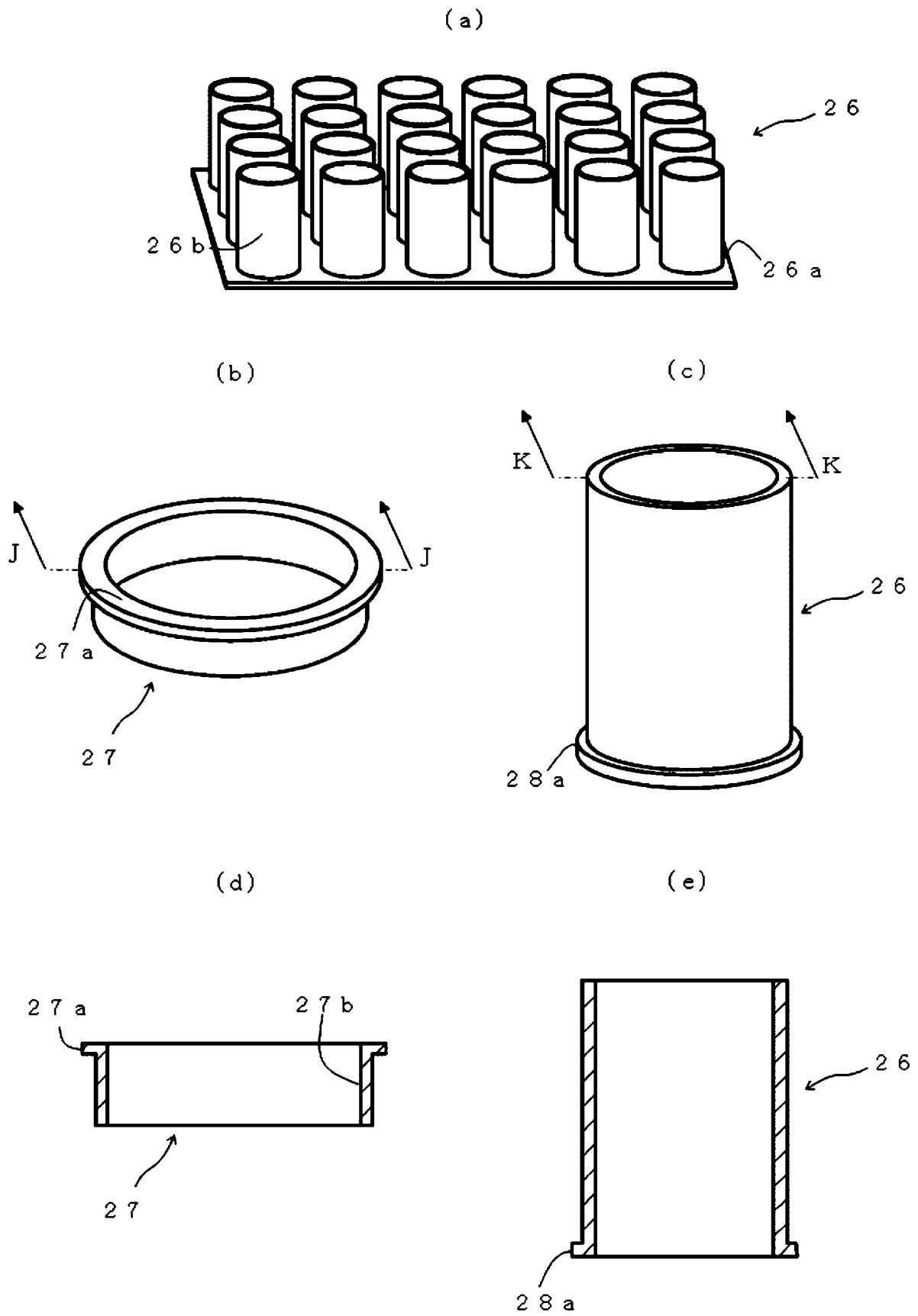
[図20]



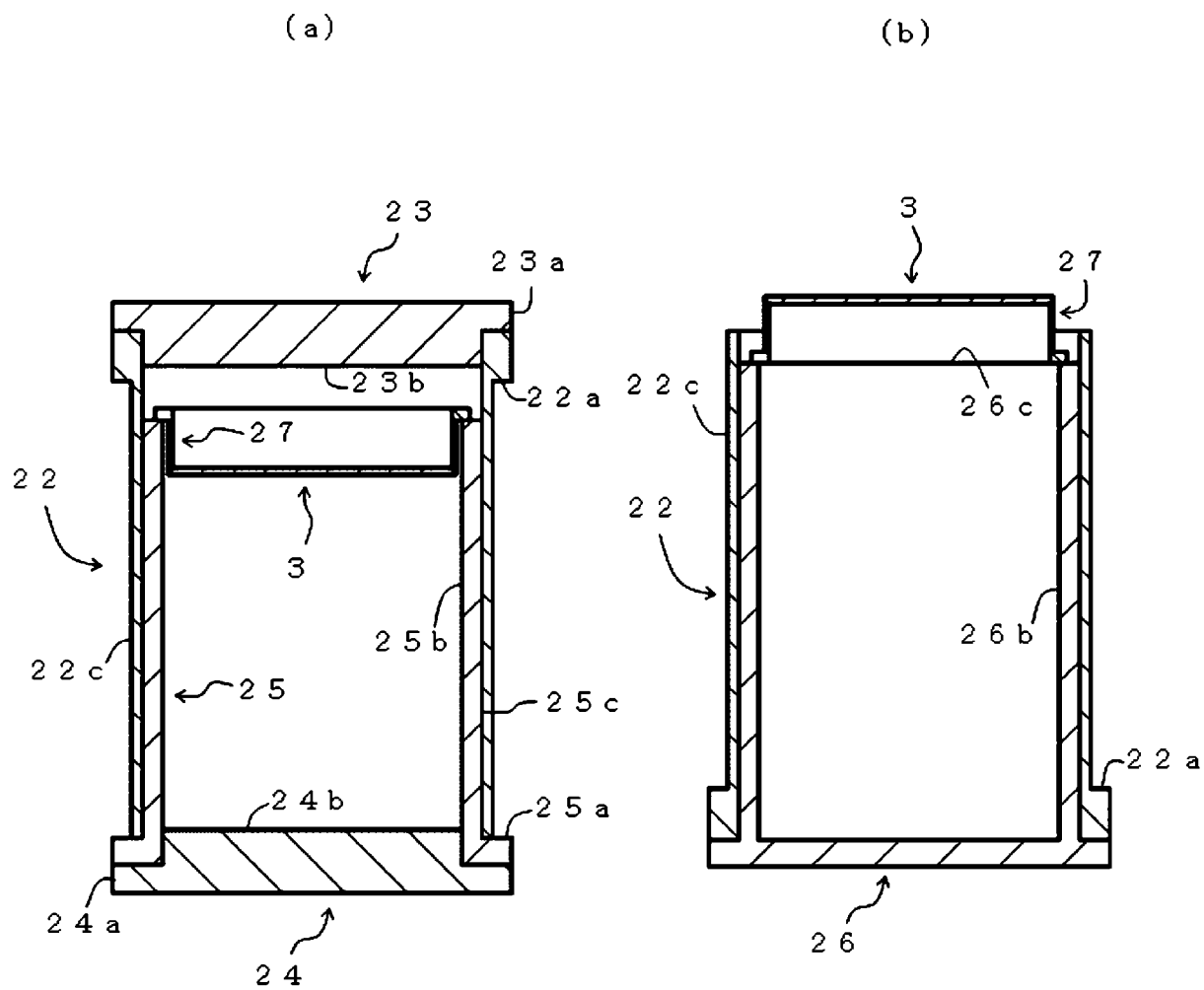
[図21]



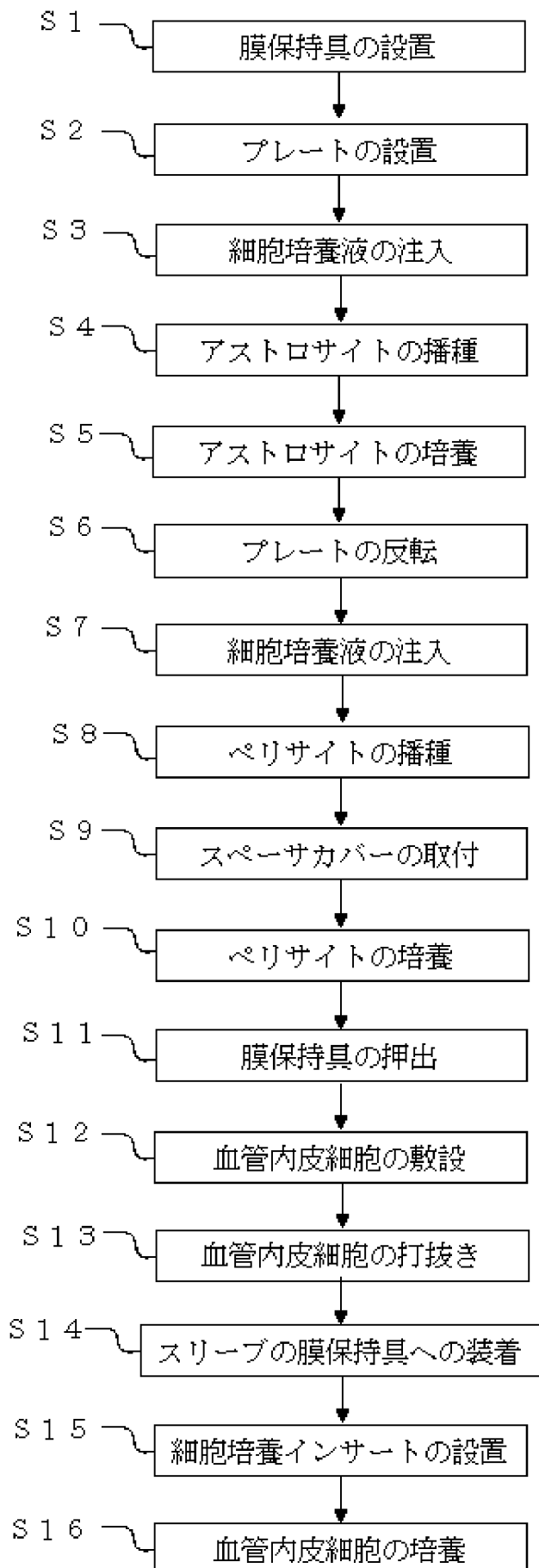
[図22]



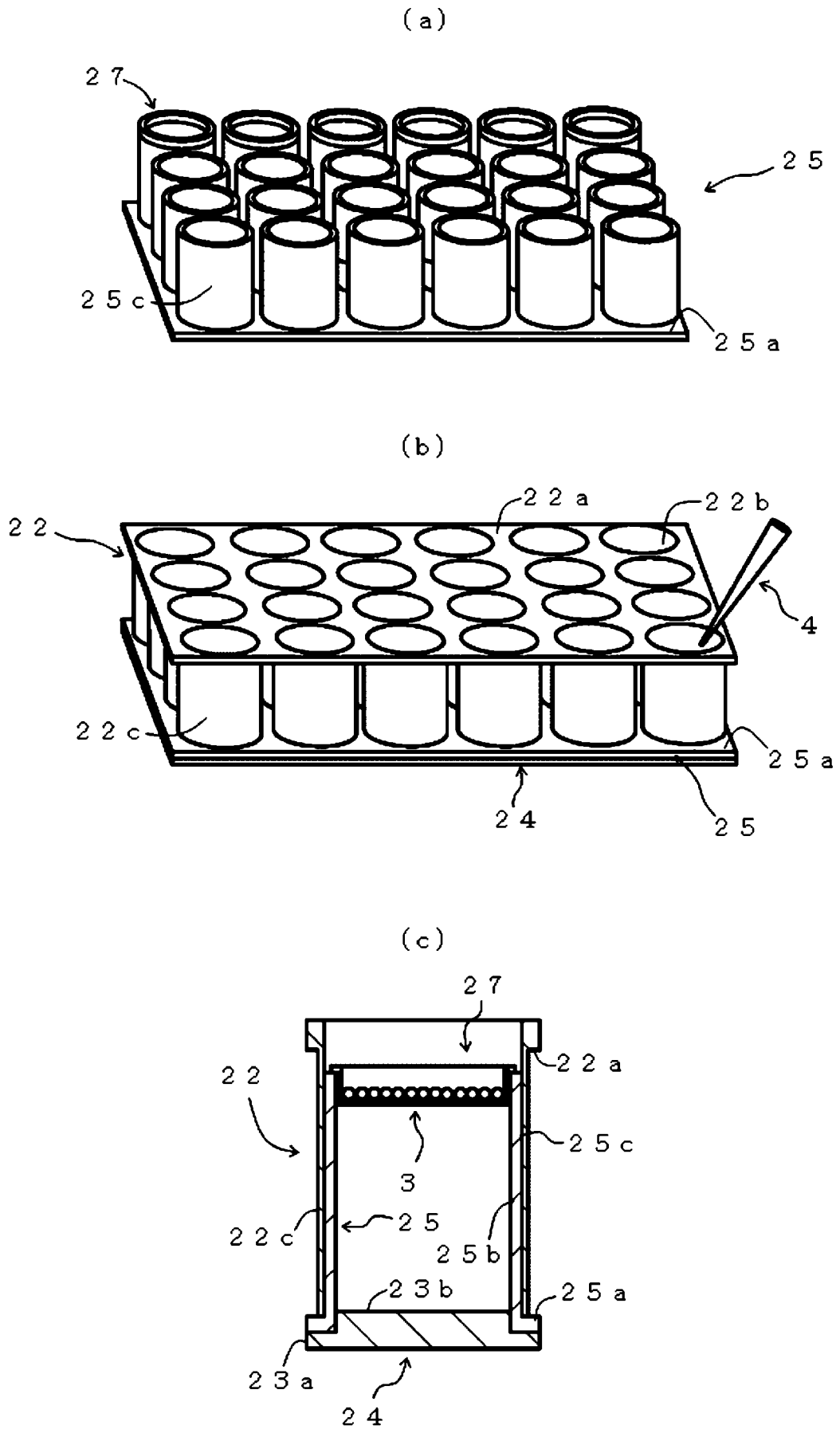
[図23]



[図24]

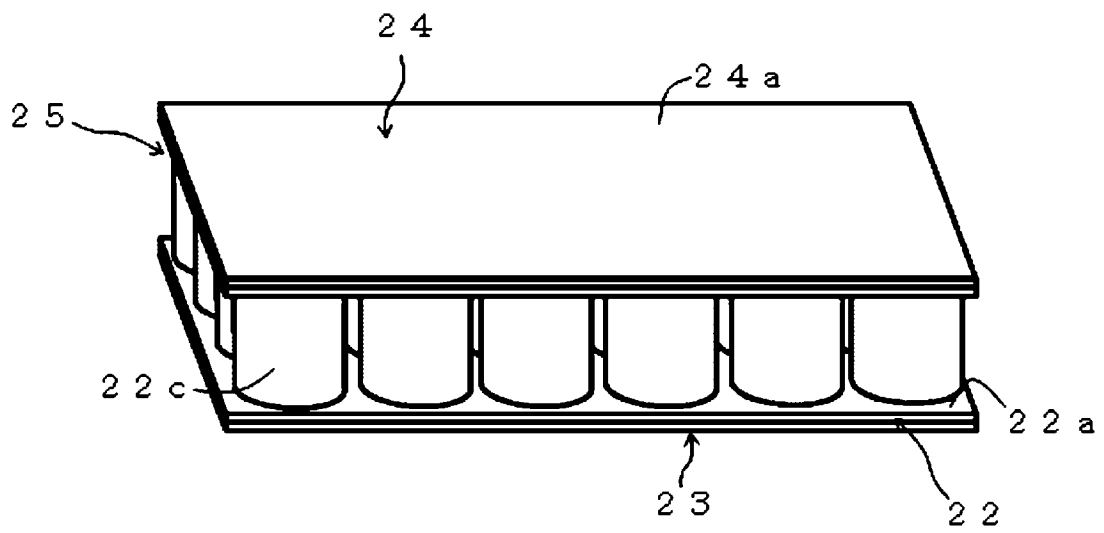


[図25]

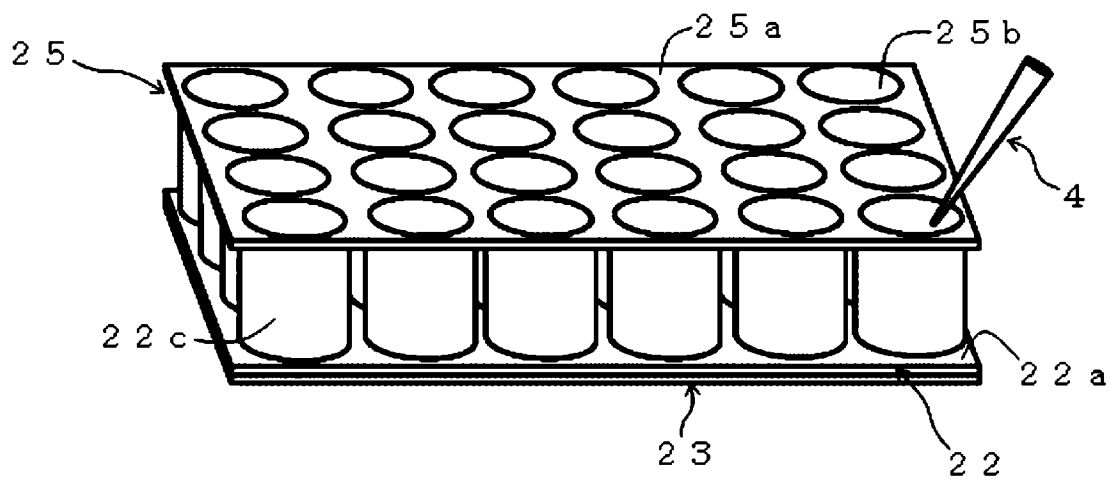


[図26]

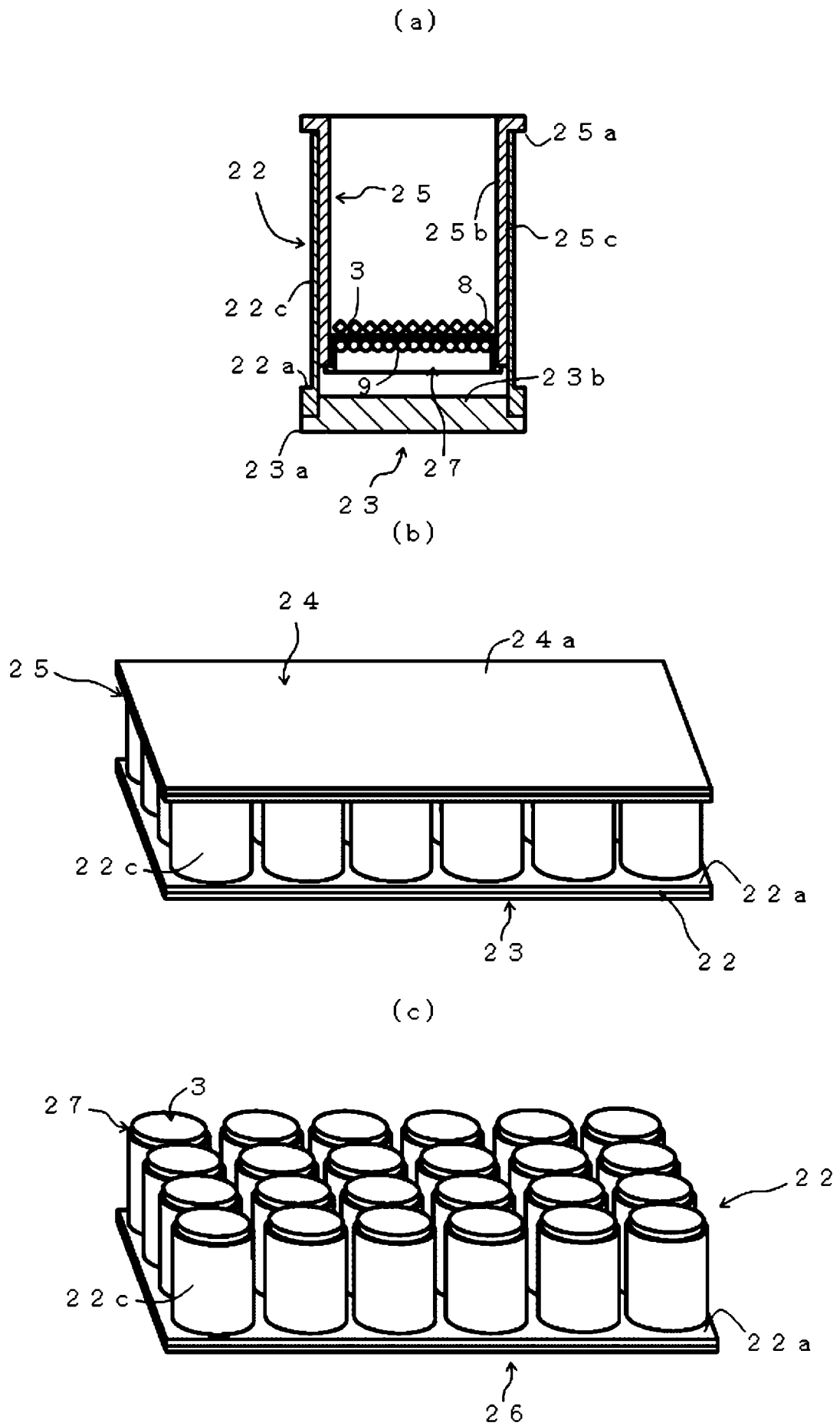
(a)



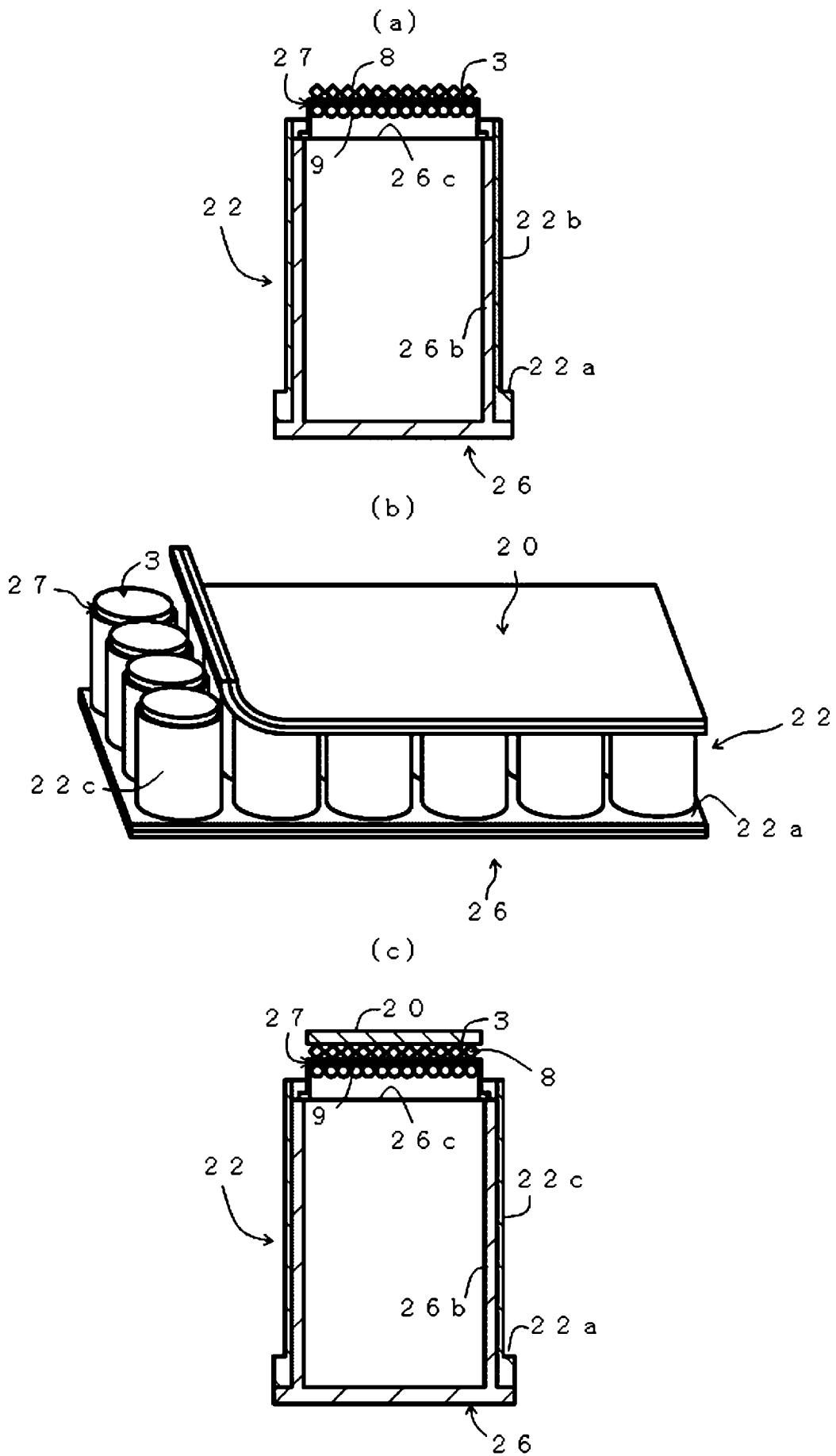
(b)



[図27]

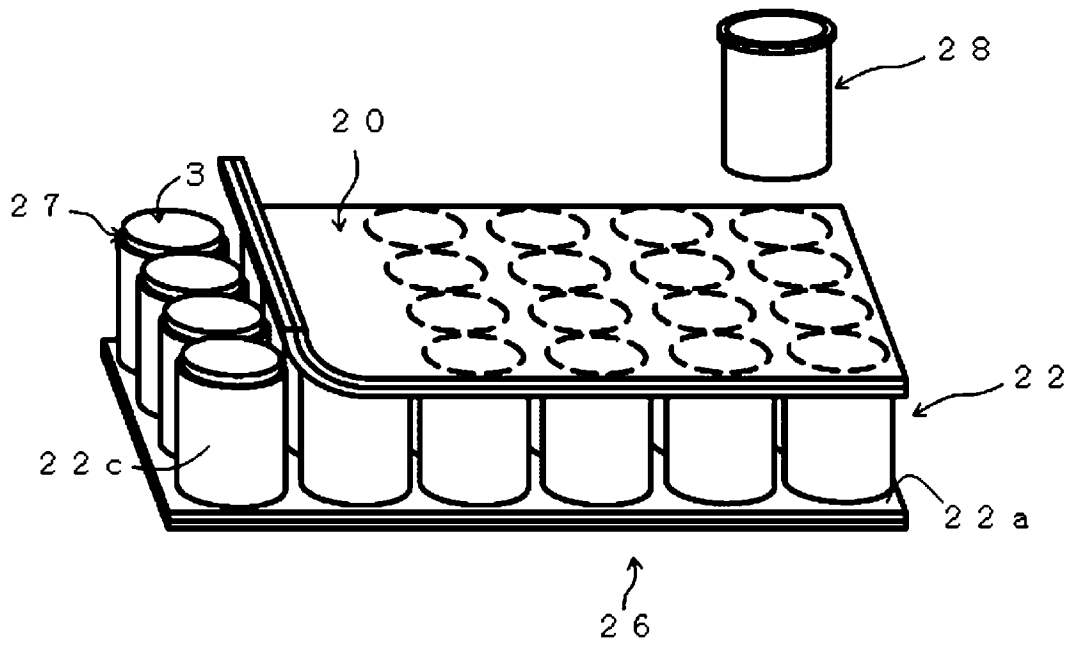


[図28]

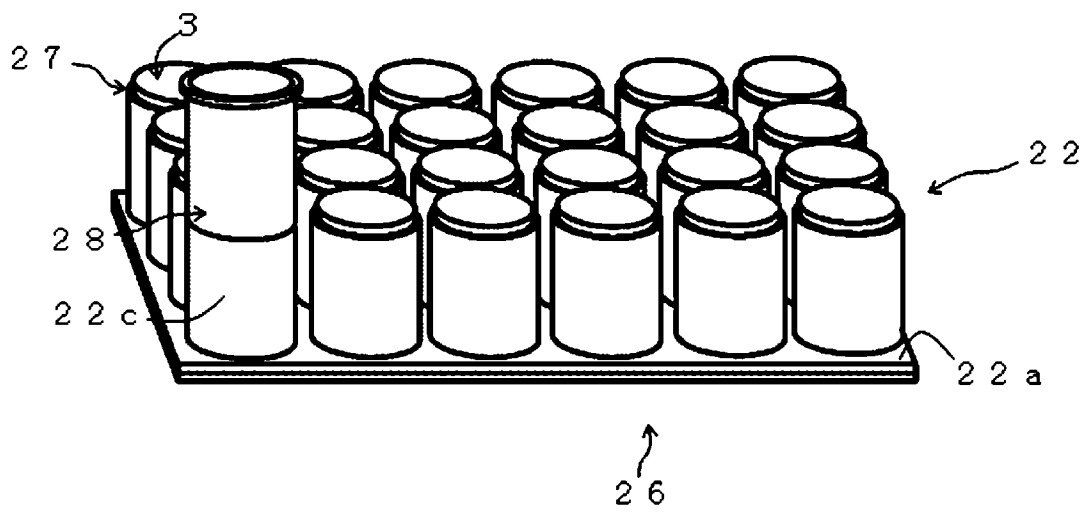


[図29]

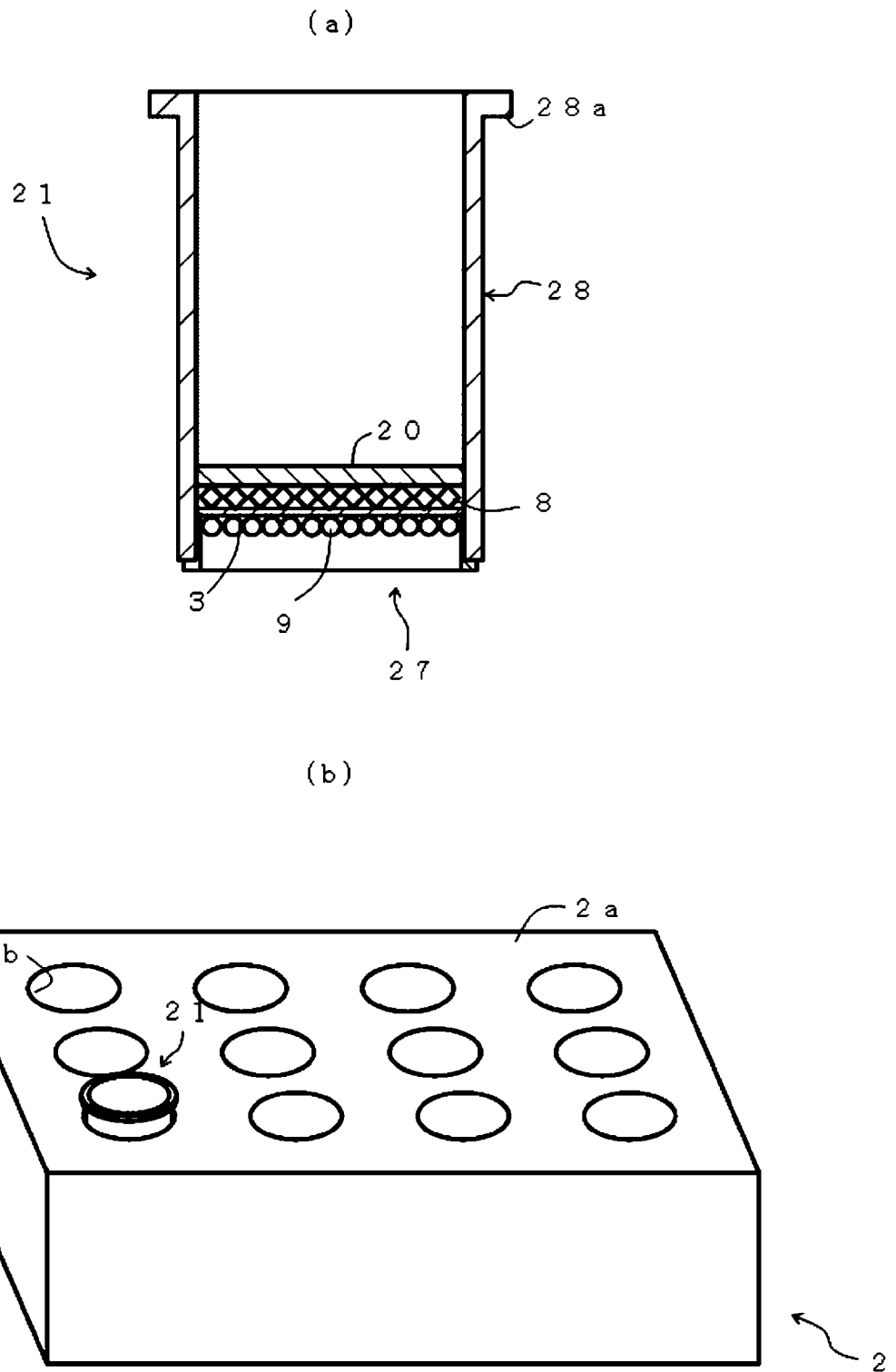
(a)



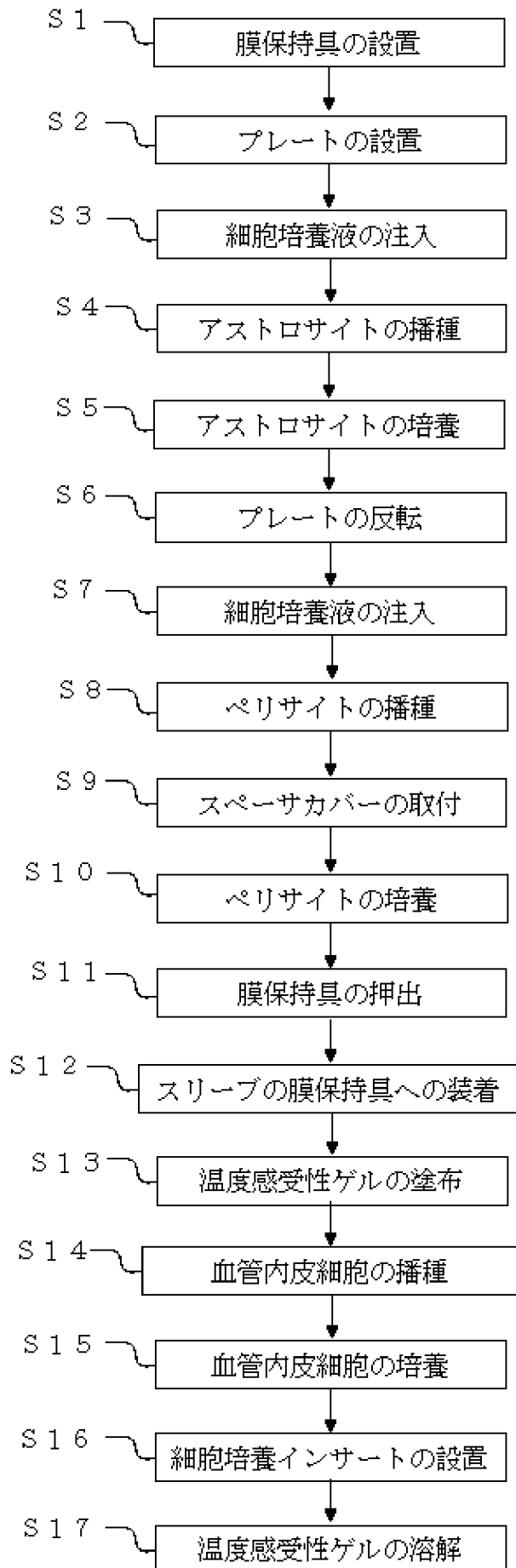
(b)



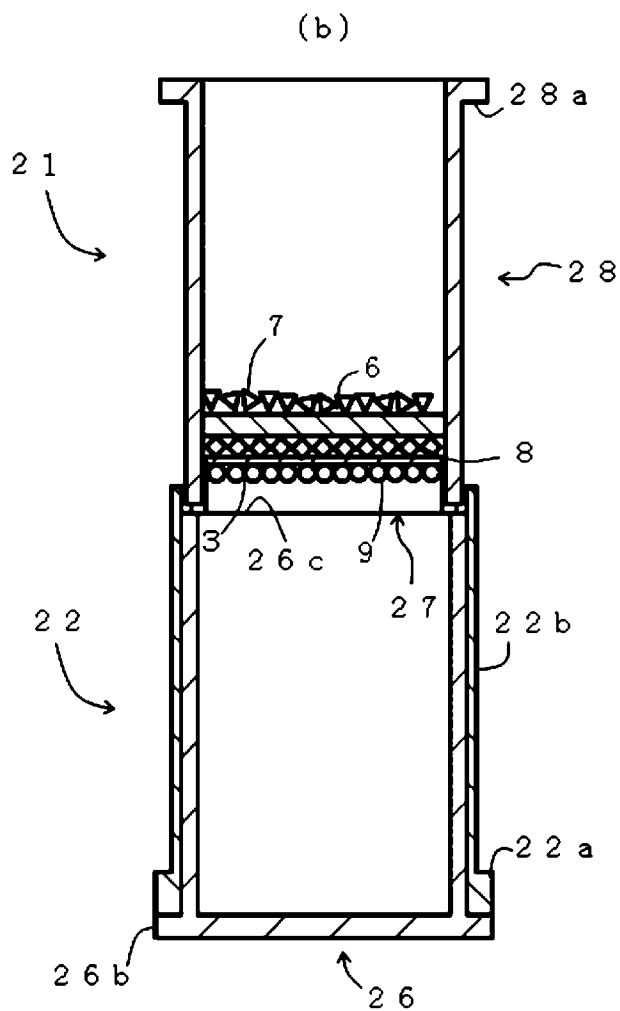
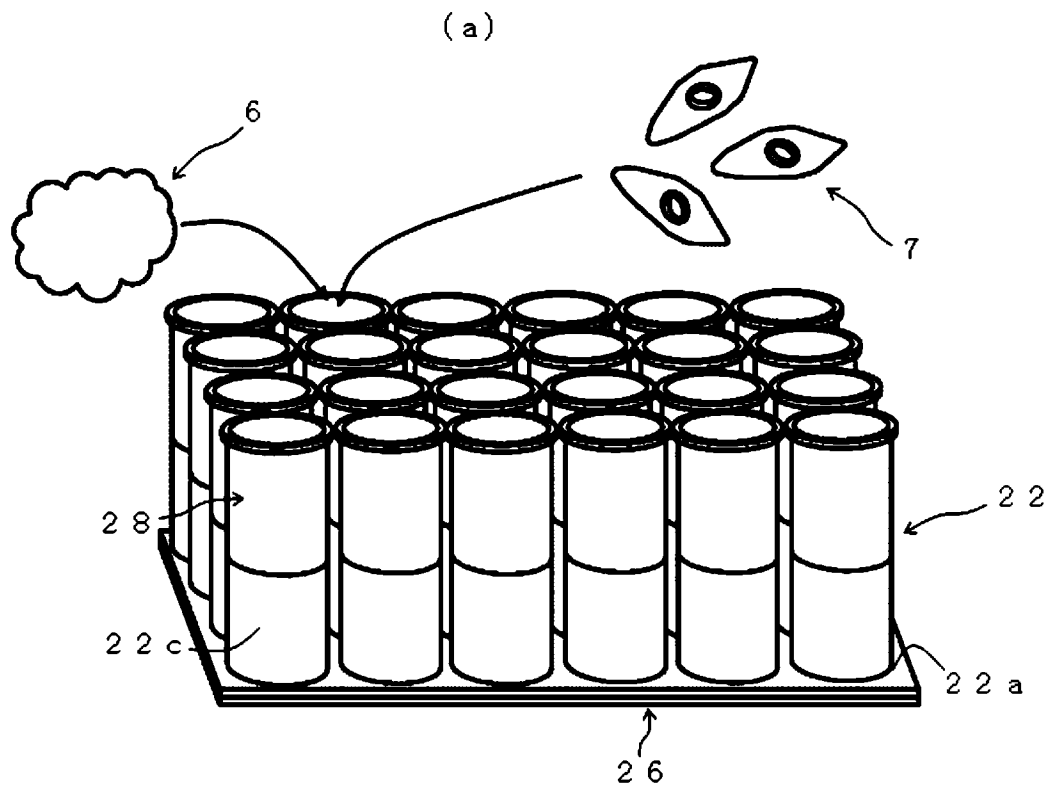
[図30]



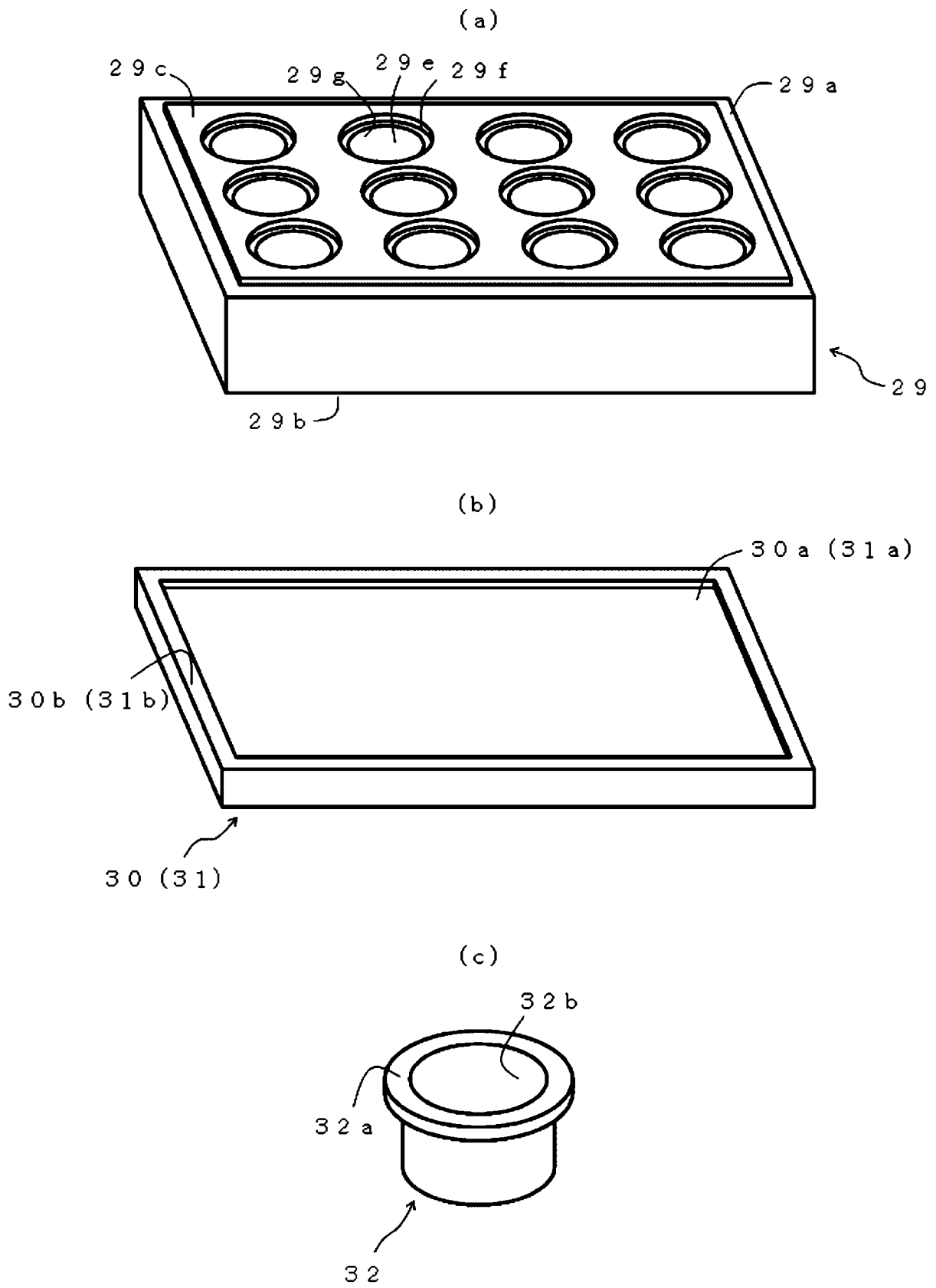
[図31]



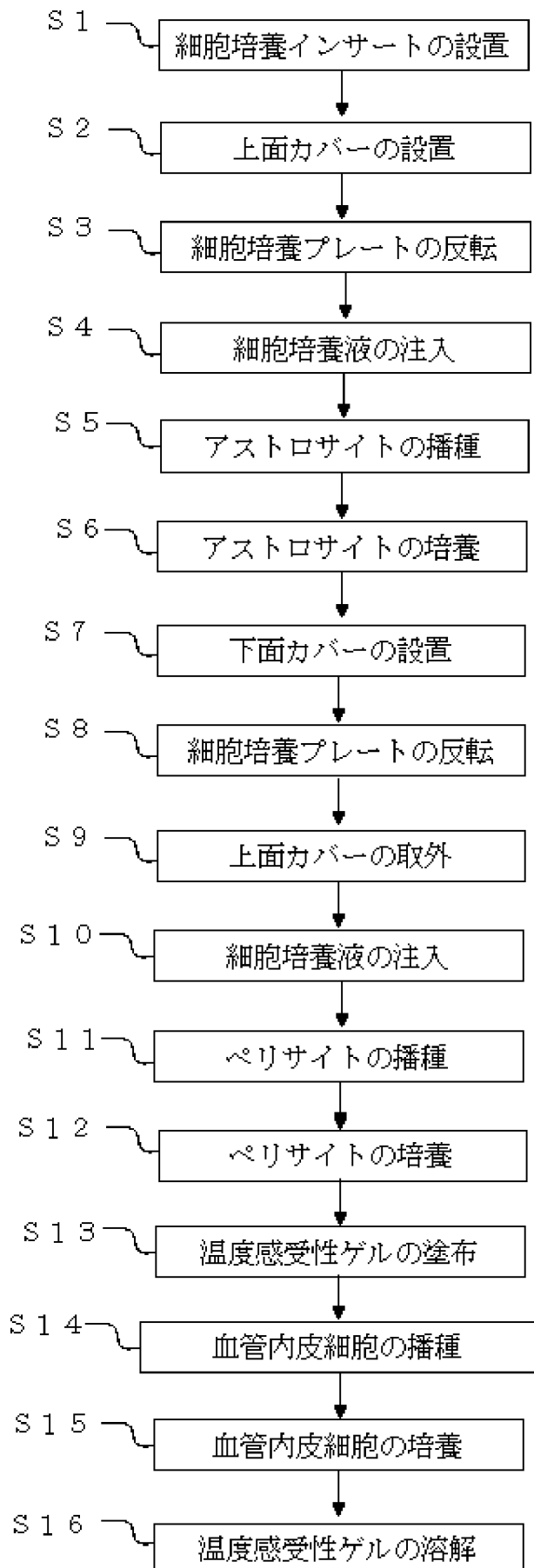
[図32]



[図33]

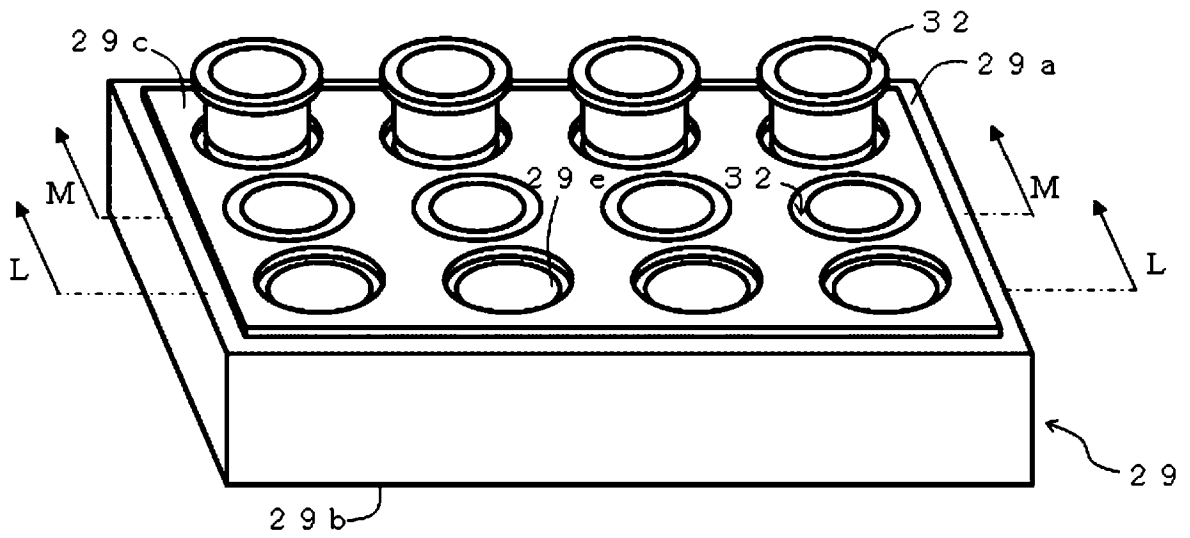


[図34]

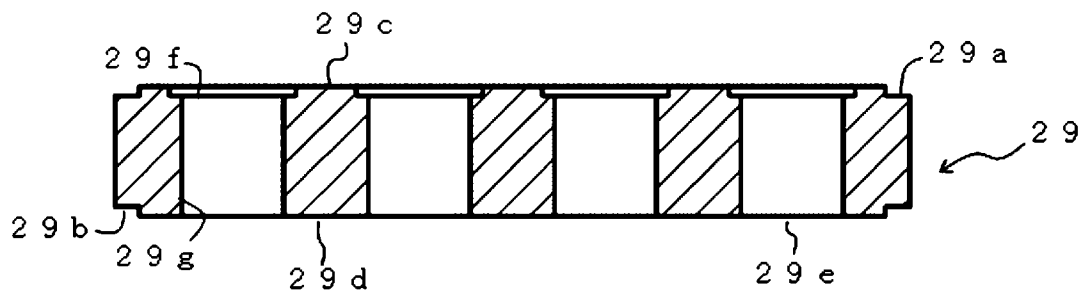


[図35]

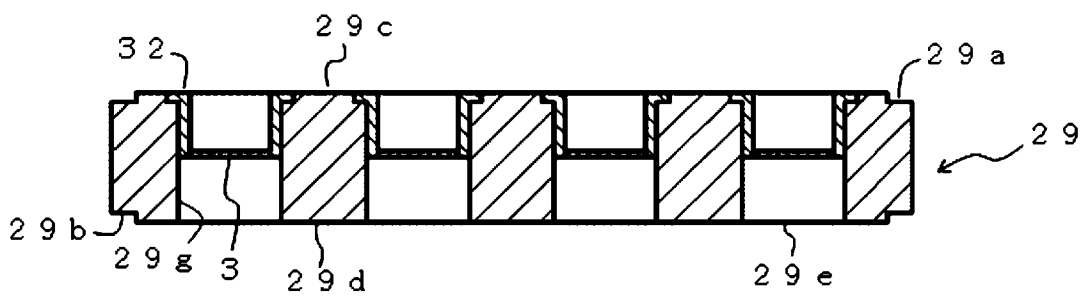
(a)



(b)

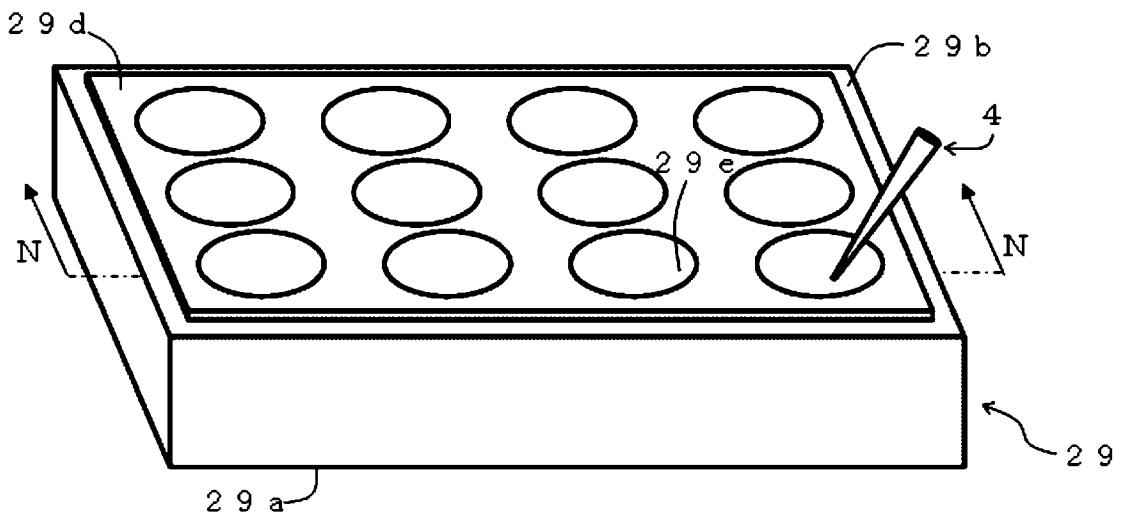


(c)

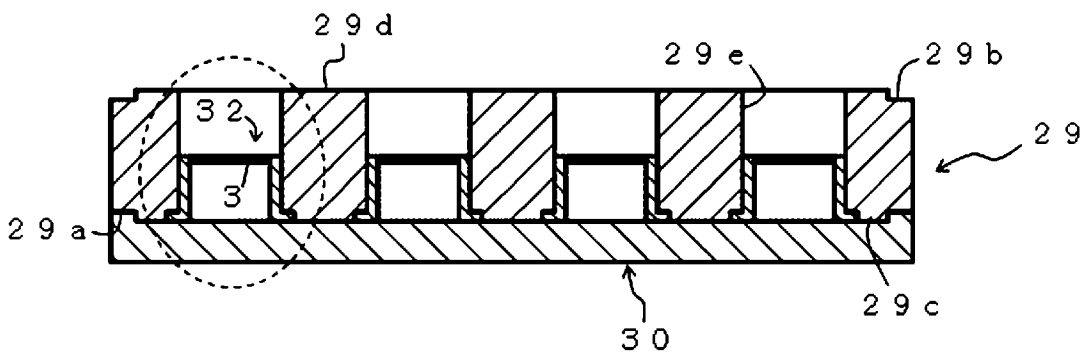


[図36]

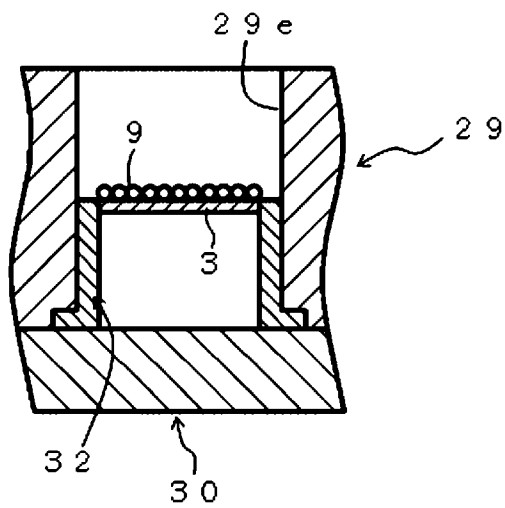
(a)



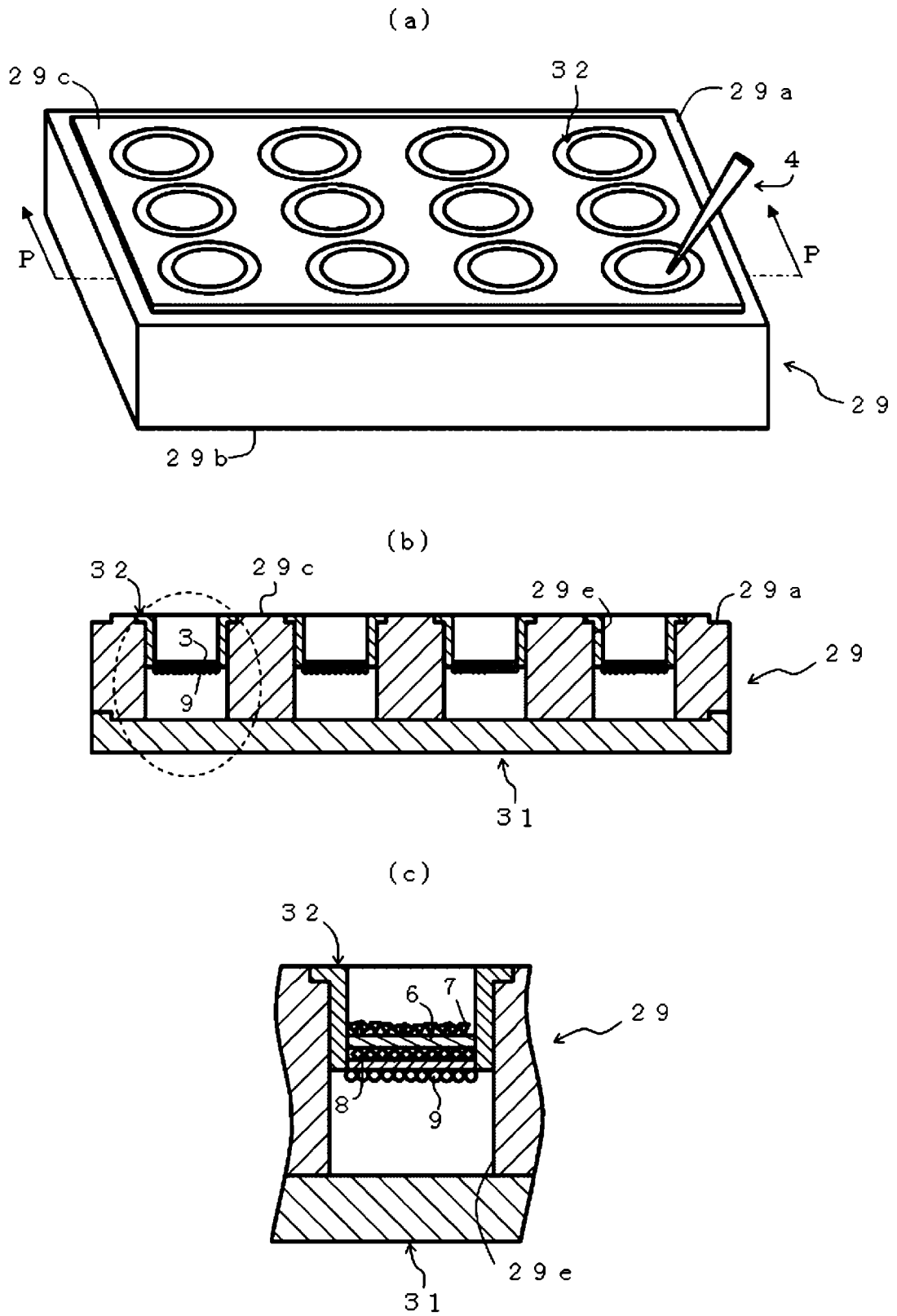
(b)



(c)

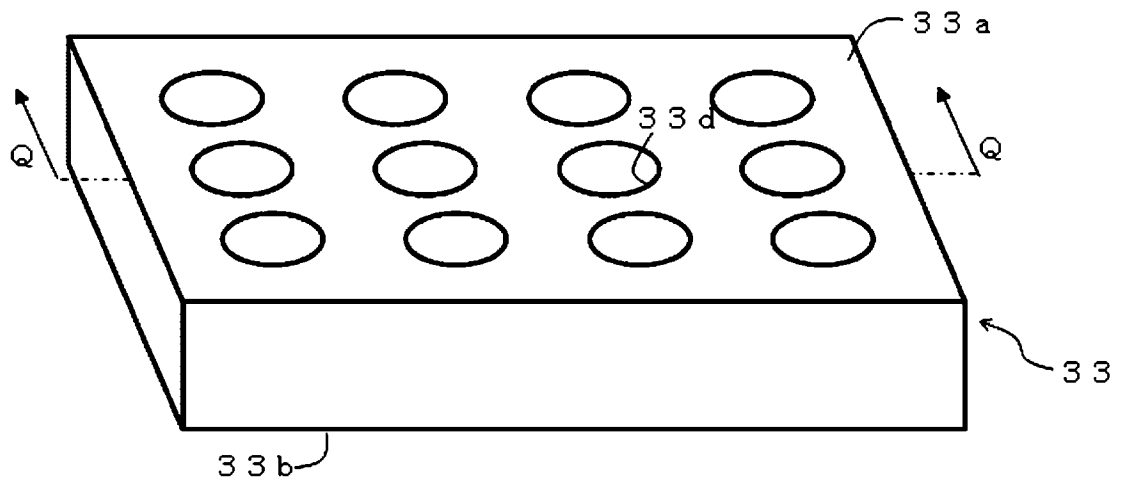


[図37]

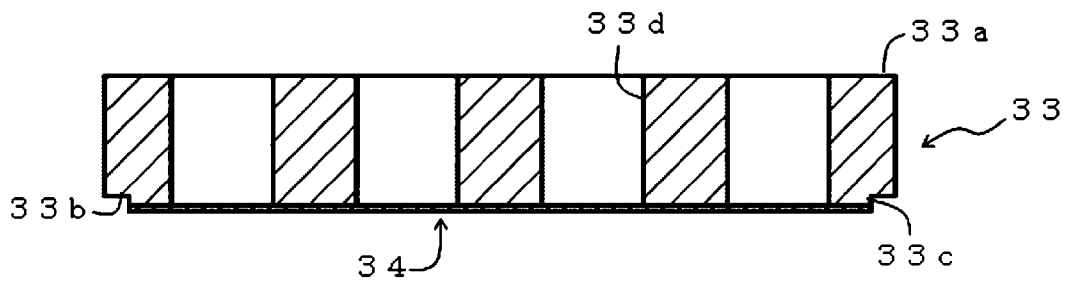


[図38]

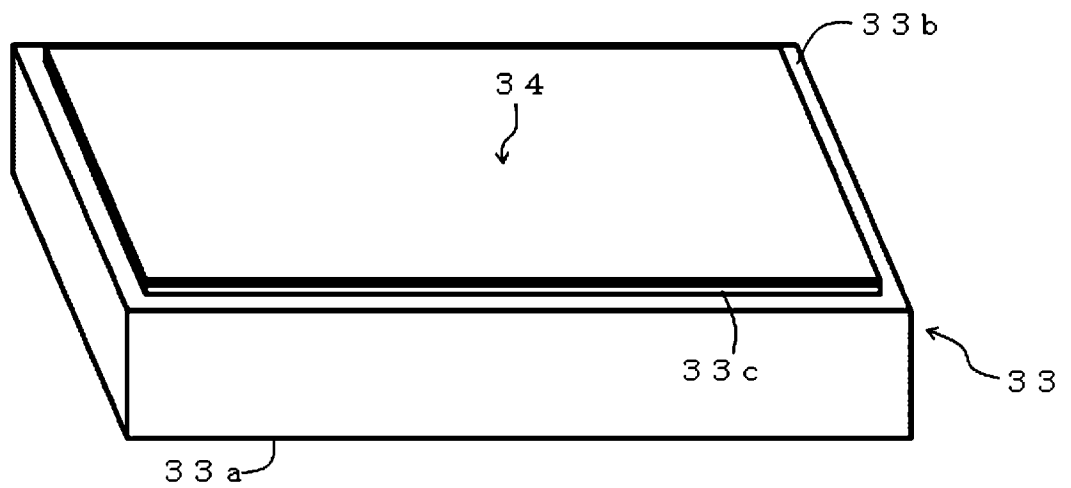
(a)



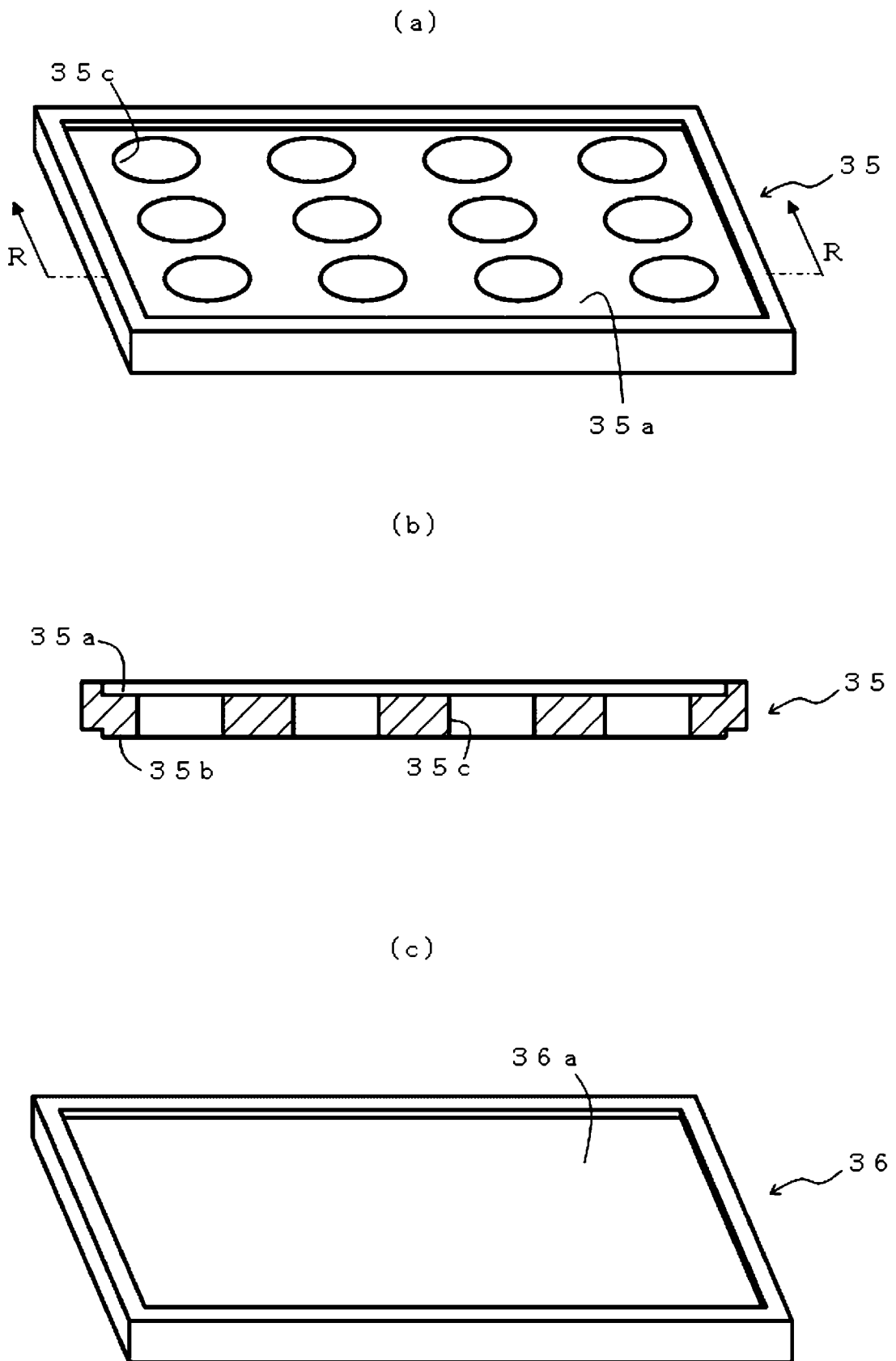
(b)



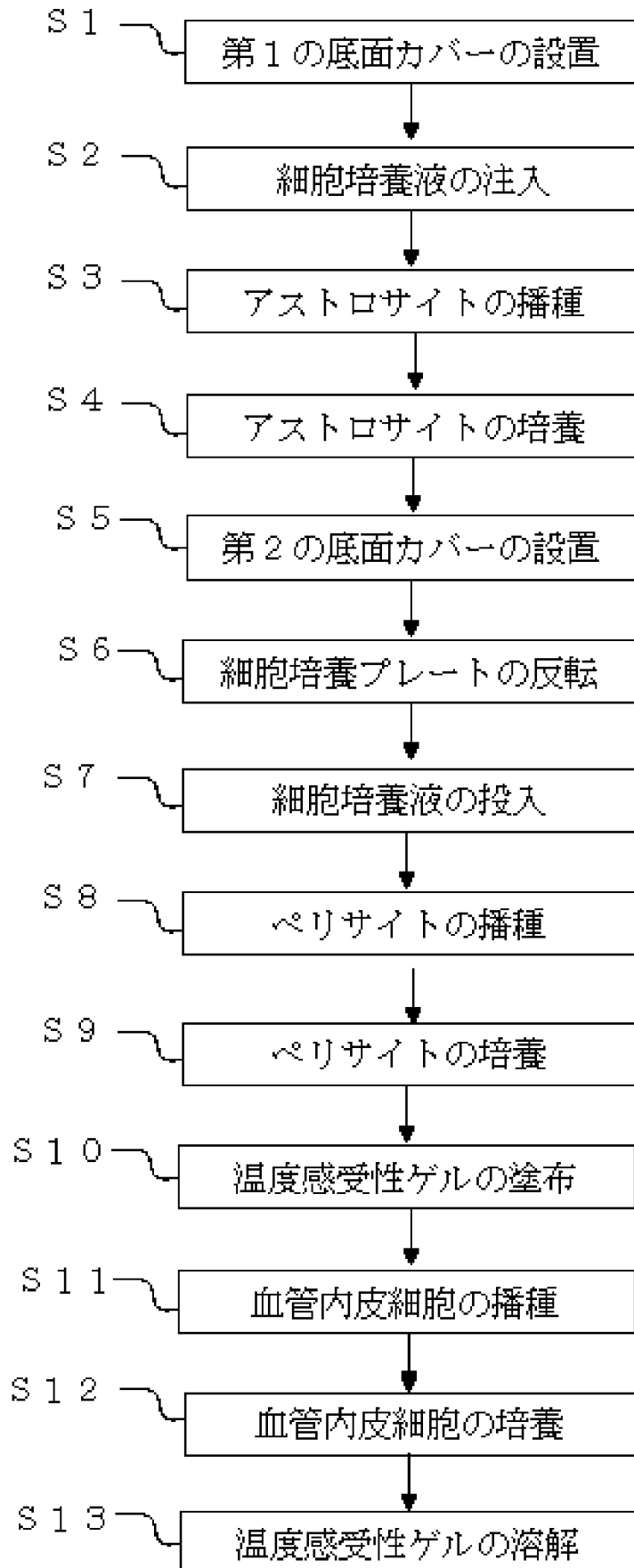
(c)



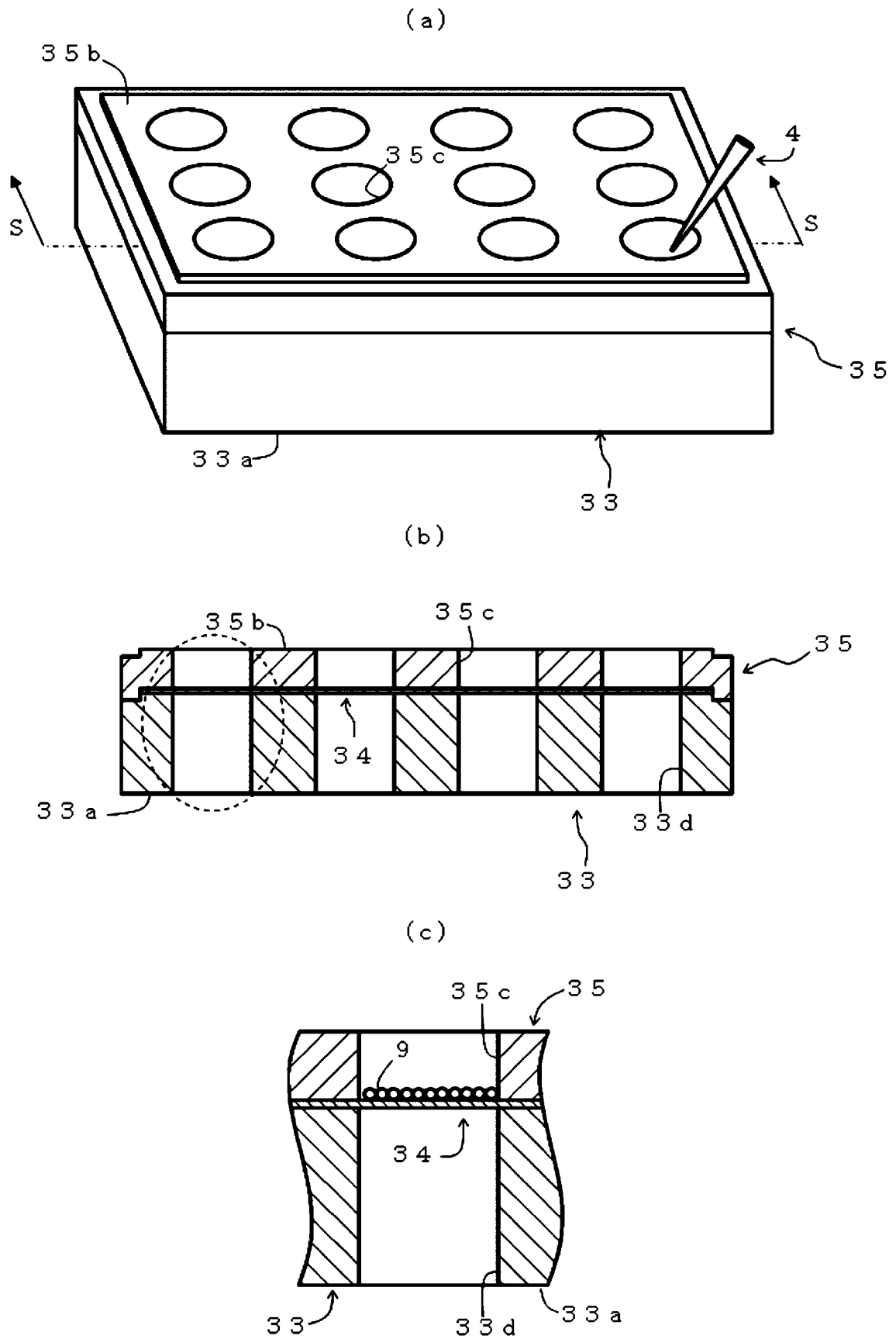
[図39]



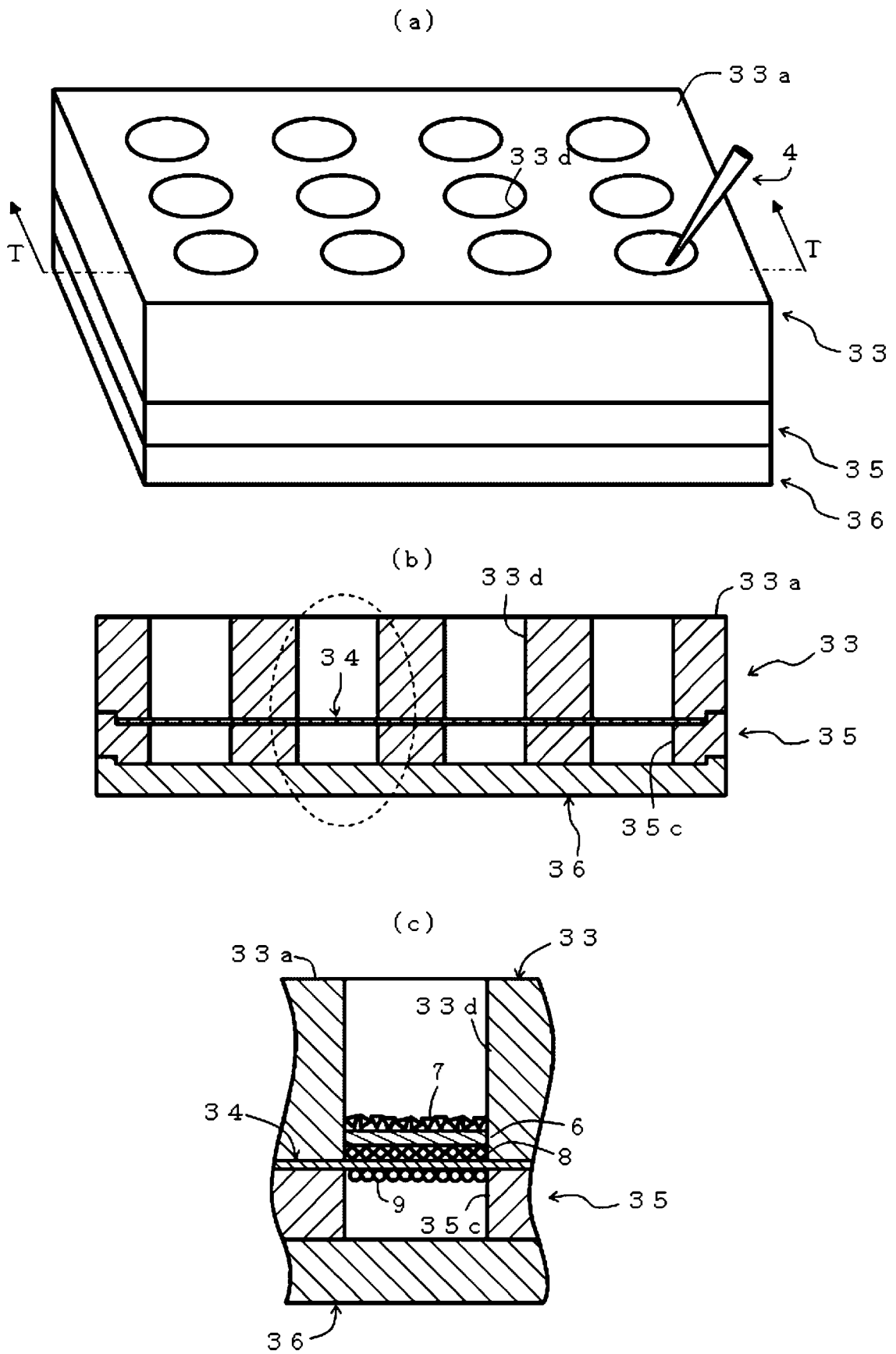
[図40]



[図41]



[図42]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/079</i> (2010.01)i FI: C12M1/00 A; C12N5/071; C12N5/079		
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) C12M1/00-3/10; C12N5/00-5/28		
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 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/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 A	JP 2007-306925 A (BECTON DICKINSON & CO) 29 November 2007 (2007-11-29) claim 1, paragraphs [0011]-[0012], [0016], fig. 4-6	1, 3, 8 2, 4-7, 9
Y A	US 5665596 A (MUSSI, Edward F.) 09 September 1997 (1997-09-09) column 4, line 50 to column 5, line 19, fig. 2	1, 3, 8 2, 4-7, 9
Y A	WO 2017/179375 A1 (UNIV YAMAGUCHI) 19 October 2017 (2017-10-19) claim 1, examples	8 1-7, 9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 20 December 2021		Date of mailing of the international search report 28 December 2021
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/JP2021/039014

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2007-306925	A	29 November 2007	US	2007/0269850	A1	
					claim 1, paragraphs [0018]-[0019], [0023]-[0024], fig. 4-6		
				EP	1857540	A1	
				AT	473269	T	
				ES	2348559	T	
US	5665596	A	09 September 1997	EP	757097	A2	
WO	2017/179375	A1	19 October 2017	US	2019/0144832	A1	
					claim 1, examples		

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/079(2010.01)i FI: C12M1/00 A; C12N5/071; C12N5/079		
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）） C12M1/00-3/10; C12N5/00-5/28 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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021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), CPlus/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 A	JP 2007-306925 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 29.11.2007 (2007-11-29) 請求項1、[0011] - [0012]、[0016]、図4-6	1, 3, 8 2, 4-7, 9
Y A	US 5665596 A (MUSSI, Edward F.) 09.09.1997 (1997-09-09) 第4欄第50行-第5欄第19行、図2	1, 3, 8 2, 4-7, 9
Y A	WO 2017/179375 A1 (国立大学法人山口大学) 19.10.2017 (2017-10-19) 請求項1、実施例	8 1-7, 9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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 20.12.2021	国際調査報告の発送日 28.12.2021	
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） 西 賢二 4N 5803 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/JP2021/039014

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2007-306925	A	29.11.2007	US	2007/0269850	A1	
					請求項1、[0018] - [0019]、[0023] - [0024]、図4 - 6		
				EP	1857540	A1	
				AT	473269	T	
				ES	2348559	T	
US	5665596	A	09.09.1997	EP	757097	A2	
WO	2017/179375	A1	19.10.2017	US	2019/0144832	A1	
					請求項1、実施例		