



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052524
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/32 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/04 (2006.01) C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 1/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7011273
(22) 출원일자(국제) 2015년06월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/066713
(87) 국제공개번호 WO 2016/035407
국제공개일자 2016년03월10일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-181187 2014년09월05일 일본(JP)

(71) 출원인
니폰샤신인사츠가부시키키가이샤
일본국교토부교토시나카교구미부하나이정3번지
(72) 발명자
오비 나오코
일본국 교토후 교토시 나카교구 미부 하나이초 3
번지 니폰샤신인사츠가부시키키가이샤 내
오니시 아쓰시
일본국 교토후 교토시 나카교구 미부 하나이초 3
번지 니폰샤신인사츠가부시키키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박종화

전체 청구항 수 : 총 7 항

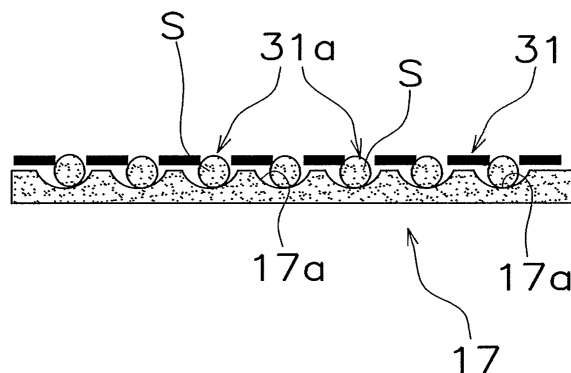
(54) 발명의 명칭 배양용기

(57) 요약

(과제)본 발명은, 배양용기에서 스페로이드를 안정적으로 형성한다.

(해결수단)배양용기는, 용기본체(3)와, 막상부재(31)를 구비하고 있다. 용기본체(3)는, 세포배양액(C)을 수용하기 위한 복수의 마이크로웰(17a)이 바닥부(17)에 형성된 오목부(7)를 구비한다. 막상부재(31)는, 오목부(7) 내에서 복수의 마이크로웰(17a)의 상방에 배치되고, 마이크로웰(17a) 내에서 성장한 스페로이드(S)가 당해 마이크로웰(17a)로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하기 위한 부재이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12M 23/24 (2013.01)

C12M 23/58 (2013.01)

C12M 25/04 (2013.01)

C12M 3/00 (2013.01)

(72) 발명자

야마구치 요이치

일본국 교토후 교토시 나카교쿠 미부 하나이초 3반
치 니폰샤신인사츠가부시키키가이샤 내

야마모토 히로미

일본국 교토후 교토시 나카교쿠 미부 하나이초 3반
치 니폰샤신인사츠가부시키키가이샤 내

나카야마 데쓰야

일본국 교토후 교토시 나카교쿠 미부 하나이초 3반
치 니폰샤신인사츠가부시키키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

배양액(培養液)을 수용하기 위한 복수의 마이크로웰(microwell)이 바닥면에 형성된 오목부를 구비하는 용기본체(容器本體)와,

상기 오목부 내에서 상기 복수의 마이크로웰의 상방에 배치되고, 상기 마이크로웰 내에서 성장(成長)한 것이 상기 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하기 위한 막상부재(膜狀部材)를

구비한 배양용기(培養容器).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 막상부재는, 상기 배양액이 통과할 수 있는 형상 또는 성질을 구비하고 있는 배양용기.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 막상부재는 메쉬구조(mesh構造)를 구비하고 있는 배양용기.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 막상부재의 하면에는 세포 비접착처리(細胞 非接着處理)가 실시되어 있는 배양용기.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 막상부재는 가용성(可溶性)인 배양용기.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 오목부 내에 삽입 가능하고, 상기 막상부재가 바닥부에 설치된 통상부재(筒狀部材)를 더 구비하고 있는 배양용기.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 바닥면과 상기 막상부재의 하면의 사이에는 간극이 확보되어 있고, 그것에 의하여 상기 배양

액이 각 마이크로웰의 내외(内外)에서 이동할 수 있는 배양용기.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 배양용기(培養容器) 특히 스페로이드(spheroid)를 형성하기 위한 배양액(培養液)을 수용하는 배양용기에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의학 및 생물의 분야에 있어서, 세포(細胞)나 균(菌)의 배양이 폭넓게 이루어지고 있다. 또한 목적에 맞는 용기를 사용하여 배양을 하기 위하여 여러 가지 형상 및 사이즈의 배양용기가 개발되고 있다.

[0003] 특히 최근에는, 세포가 원래 구비하는 기능을 충분히 발휘시키는 것을 목적으로 하여, 종래의 평면적인 세포배양과는 달리 3차원으로 배양함으로써 작성되는 세포 스페로이드(이하, 스페로이드라고 한다)가 주목받고 있다. 스페로이드는, 세포가 구비하는 세포접착기능을 이용하여 세포 상호간이 접촉됨으로써 형성되는 3차원의 구조체이다.

[0004] 스페로이드를 형성하는 방법으로서, 복수의 오목부를 구비하는 배양용기에 세포의 현탁액(懸濁液)을 주입하여 각 오목부에서 스페로이드를 형성하는 기술이 알려져 있다(예를 들면 특허문헌1을 참조).

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌1 : 일본국 공개특허 특개2010-88347호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 특허문헌1에 기재되어 있는 세포배양용기에서는, 스페로이드의 형성은 세포가 현탁액 내를 부유(浮遊)하고 있는 상태에서 이루어지고 있다. 이 방법에서는, 현탁액의 대류(對流)에 의하여 스페로이드가 오목부로부터 튀어나가는 경우가 있었다. 현탁액의 대류가 발생하는 원인은, 예를 들면 스페로이드를 관찰하기 위하여 현미경까지 용기를 운반할 때의 흔들림이나, 현탁액을 교환하기 위하여 현탁액을 출납하거나 하는 경우이다. 오목부에서 튀어나간 스페로이드는 서로 접촉하여 버리고, 그 때문에 스페로이드의 크기가 불균일한 경우가 있다. 또한 오목부에서 튀어나간 스페로이드는 현탁액과 함께 흡인되어 버리는 경우가 있다.

[0007] 본 발명의 과제는, 배양용기에서 스페로이드를 안정적으로 형성하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 이하, 과제의 해결 수단으로서 복수의 태양을 설명한다. 이들 태양은 필요에 따라 임의로 조합할 수 있다.

[0009] 본 발명의 하나의 견지(見地)에 관한 배양용기는, 용기본체와, 막상부재를 구비하고 있다. 용기본체는, 배양액을 수용하기 위한 복수의 마이크로웰이 바닥면에 형성된 오목부를 구비한다. 막상부재는, 오목부 내에서 복수의 마이크로웰의 상방에 배치되고, 마이크로웰 내에서 성장한 스페로이드가 당해 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하기 위한 부재이다.

- [0010] 이 배양용기에서는, 막상부재가, 오목부 내에서 복수의 마이크로웰의 상방에 배치되고, 마이크로웰 내에서 성장한 스페로이드가 당해 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하고 있다. 따라서 배양용기에서 스페로이드가 안정적으로 형성된다.
- [0011] 막상부재는, 배양액이 통과할 수 있는 형상 또는 성질을 구비하고 있더라도 좋다.
- [0012] 이 경우에 복수의 마이크로웰 내의 배양액을 용이하게 교환할 수 있다.
- [0013] 막상부재는 메쉬구조를 구비하고 있더라도 좋다.
- [0014] 이 경우에 막상부재의 어느 곳의 장소에서도 배양액이 통과할 수 있기 때문에, 복수의 마이크로웰 내의 배양액을 효율적으로 교환할 수 있다.
- [0015] 막상부재의 하면에는 세포 비접촉처리가 실시되어 있더라도 좋다.
- [0016] 이 경우에 스페로이드가 막상부재의 하면에 접촉되기 어렵게 되고, 그 결과 스페로이드가 막상부재의 하면에 접촉되기 어렵다.
- [0017] 막상부재는 가용성이더라도 좋다.
- [0018] 이 경우에 스페로이드가 형성된 후에 막상부재가 녹지 않게 된다. 그 때문에 막상부재를 제거하는 작업이 불필요하게 된다. 즉 스페로이드를 꺼내는 것이 용이하게 된다.
- [0019] 배양용기는 오목부 내에 삽입 가능하고, 막상부재가 바닥부에 설치된 통상부재를 더 구비하고 있더라도 좋다.
- [0020] 이 경우에 통상부재를 오목부에 출납함으로써 막상부재의 설치 및 제거를 할 수 있다. 그 결과 작업성이 향상된다.
- [0021] 바닥면과 막상부재의 하면의 사이에는 간극이 확보되어 있고, 그에 따라 배양액이 각 마이크로웰의 내외에서 이동할 수 있더라도 좋다.
- [0022] 이 경우에 막상부재에 배양액이 통과하는 것을 이용하지 않고 있는 경우에도, 복수의 마이크로웰 내의 배양액을 교환할 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 관한 배양용기에서는 스페로이드가 안정적으로 형성된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도1은, 세포배양용기의 용기본체의 사시도이다.
- 도2는, 세포배양용기의 가압부재 부착판의 사시도이다.
- 도3은, 세포배양용기의 가압부재 부착판의 사시도이다.
- 도4는, 세포배양용기의 단면도이다.
- 도5는, 세포배양용기의 단면도이다.
- 도6은, 막상부재의 평면도이다.
- 도7는, 스페로이드 작성을 설명하기 위한 모식도이다.
- 도8은, 스페로이드 작성을 설명하기 위한 모식도이다.
- 도9는, 스페로이드 작성을 설명하기 위한 모식도이다.
- 도10은, 막상부재의 평면도(제2실시형태)이다.
- 도11은, 막상부재의 평면도(제3실시형태)이다.

도12는, 막상부재의 평면도(제4실시형태)이다.
 도13은, 세포배양용기의 단면도(제5실시형태)이다.
 도14는, 세포배양용기의 단면도(제6실시형태)이다.
 도15는, 세포배양용기의 단면도(제7실시형태)이다.
 도16은, 세포배양용기의 단면도이다.
 도17은, 세포배양용기의 단면도이다.
 도18은, 세포배양용기의 단면도이다.
 도19는, 가압부재의 평면도이다.
 도20은, 가압부재의 평면도(제8실시형태)이다.
 도21은, 세포배양용기의 단면도(제9실시형태)이다.
 도22는, 세포배양용기의 단면도(제10실시형태)이다.
 도23은, 세포배양용기의 단면도(제11실시형태)이다.
 도24는, 세포배양용기의 단면도(제13실시형태)이다.
 도25는, 세포배양용기의 단면도(제14실시형태)이다.
 도26은, 세포배양용기의 용기본체의 사시도(제15실시형태)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 1. 제1실시형태
- [0026] (1) 전체구조
- [0027] 도1~도3을 사용하여, 본 발명의 1실시형태로서의 배양용기(培養容器)인 세포배양용기(細胞培養容器)(1)를 설명한다.
- [0028] 도1은 세포배양용기의 용기본체(容器本體)의 사시도이다. 도2 및 도3은 세포배양용기의 가압부재 부착판(加壓部材 附着板)의 사시도이다.
- [0029] 도면에 나타내는 바와 같이 세포배양용기(1)는, 용기본체(3)와, 가압부재 부착판(5)을 구비하고 있다. 용기본체(3)는, 평면에서 볼 때에 직4각형 모양이고, 배양액(培養液)으로서의 세포배양액(C)을 수용하기 위한 세포배양셀(細胞培養cell)로서의 복수의 오목부(웰(well))(7)를 구비한다. 용기본체(3)는, 두께는 얇고, 투명성의 부재이며, 예를 들면 투명 플라스틱으로 제작된 것이다. 용기본체(3)는, 공지의 것으로서 예를 들면 일반적인 웰 플레이트(well plate)이다.
- [0030] 가압부재 부착판(5)은, 용기본체(3)에 대응하는 직4각형 형상이고, 오목부(7)에 대응하는 복수의 가압부재(9)를 구비하고 있다. 가압부재 부착판(5)은, 두께는 얇고, 투명성의 부재이며 예를 들면 투명 플라스틱으로 제작된 것이다. 가압부재 부착판(5)은, 평판모양의 본체(5a)와, 그 외주면에 형성된 프레임(frame)(5b)을 구비하고 있다. 가압부재 부착판(5)의 본체(5a)에는 복수의 가압부재(9)가 형성되어 있다. 가압부재(9)는, 오목부(7)의 상측으로 패어낼 수 있도록 끼워지는 부재이다.
- [0031] 또 도2에 나타내는 가압부재 부착판(5)은 6×4 합계 24개의 가압부재(9)를 구비하고 있고, 도3에 나타내는 가압부재 부착판(5A)은 6×1 합계 6개의 가압부재(9)를 구비하고 있다. 도3에 나타내는 가압부재 부착판(5A)은, 도1에 나타내는 용기본체(3)에 대해서는 4개가 사용된다.
- [0032] 도4는 세포배양용기의 단면도이다. 도4에 나타내는 바와 같이 가압부재 부착판(5)이 용기본체(3)에 끼워진 상태에서는, 복수의 가압부재(9)가 복수의 오목부(7) 내에 각각 삽입되어 있다.
- [0033] 또 도면에 나타내지 않았지만 세포배양 중에는, 세포배양용기(1)의 상방으로부터(즉 가압부재 부착판(5)의 상방으로부터) 뚜껑이 덮인다. 뚜껑은 용기본체(3) 및 가압부재 부착판(5)의 상부를 덮는다. 이에 따라 세포배양액에 대한 콘테미네이션(contamination)이 방지된다.

- [0034] (2)상세구조
- [0035] 다음에 도5 및 도6을 사용하여 오목부(7)와 가압부재(9)의 구조 및 양자의 관계를 상세하게 설명한다. 도5는 세포배양용기의 단면도이고, 도6은 막상부재(膜狀部材)의 평면도이다.
- [0036] 오목부(7)는, 바닥부(17)와, 통상부(筒狀部)(19)를 구비하고 있다. 통상부(19)의 내주면(19a)은, 종단면에 있어서 대략 연직으로 연장되어 있다. 이 바닥부(17)의 상면은 세포 비접착성(細胞非接着性)이다. 세포 비접착성이라는 것은, 부착성 세포가 부착되기 어려운 성질을 말한다. 세포 비접착성을 실현시키기 위해서는, 예를 들면 친수성(親水性)이 높은 물질로서 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트(polyhydroxyethyl methacrylate), 에틸렌비닐알코올 공중합체(ethylenevinylalcohol 共重合體)를 사용하더라도 좋다. 또한 바닥부(17)의 상면에 친수성을 부여하기 위하여 계면활성제(界面活性劑)나 인지질(磷脂質)에 의하여 코팅(coating)하더라도 좋고 또는 플라즈마처리(plasma 處理) 등의 표면처리를 하더라도 좋다.
- [0037] 바닥부(17)의 상면에는 복수의 마이크로웰(microwell)(17a)이 형성되어 있다. 마이크로웰(17a)은, 스페로이드(spheroid)를 형성하기 위한 미소 오목부이다. 마이크로웰(17a)의 지름은 예를 들면 30~1500 μm 이며, 바람직하게는 50~300 μm 이다. 마이크로웰(17a)의 깊이는 예를 들면 30~1500 μm 이며, 바람직하게는 50~300 μm 이다.
- [0038] 가압부재(9)는, 주로 통상부(25)와, 막상부재(膜狀部材)(31)를 구비하고 있다. 통상부(25)는, 오목부(7)의 통상부(19) 내에 약간의 간극을 두고 끼워져 있다. 즉 통상부(25)의 외주면(25a)은, 통상부(19)의 내주면(19a)에 근접한 상태에서 대향(對向)하고 있다. 통상부(25)의 하단(下端)에는 막상부재(31)의 외주 가장자리가 고정되어 있다. 막상부재(31)는 통상부(25)에 일체로 성형되어 있더라도 좋다.
- [0039] 막상부재(31)는, 오목부(7) 내에서 상기 마이크로웰(17a)의 상방에 배치되어, 마이크로웰(17a) 내에서 성장(成長)한 것이 당해 마이크로웰(17a)로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하기 위한 부재이다. 이 실시형태에서는 막상부재(31)는, 세포배양액이 통과할 수 있는 형상 또는 성질을 구비하고 있다. 구체적으로는 도6에 나타내는 바와 같이 막상부재(31)는 원형의 메쉬부재(mesh部材)이다. 막상부재(31)는 메쉬부재이기 때문에, 전체에 걸쳐서 세포배양액이 양측으로 이동할 수 있다.
- [0040] 이 실시형태에서는, 막상부재(31)의 하면에는 세포 비접착처리가 실시되어 있다. 세포 비접착처리라는 것은 예를 들면 상기한 것과 동일하다. 이 처리에 의하여, 후술하는 바와 같이 스페로이드(S)는 막상부재(31)에 접촉되기 어렵다. 또 세포 비접착처리는 반드시 실시되지 않더라도 좋다.
- [0041] 이 실시형태에서는 막상부재(31)는 가용성(可溶性)이다. 막상부재(31)는 예를 들면 1주일간 용해된다. 막상부재(31)는 예를 들면 가교(架橋)한 젤라틴(gelatine), 전분(澱粉), PVA이다. 이에 따라 후술하는 바와 같이 스페로이드(S)를 꺼내는 것이 쉬워진다. 또 막상부재(31)는 반드시 가용성이 아니어도 좋다. 그 경우에는, 막상부재(31)는 예를 들면 나일론, PE, PP, 카본, PEEK, 테플론(등록상표), PET, 금속으로 이루어진다.
- [0042] 막상부재(31)에 있어서 메쉬 간극의 치수는 예를 들면 30~1500 μm 이다. 막상부재(31)와 바닥부(17)의 상면 사이의 치수는 예를 들면 50~300 μm 이다. 또 스페로이드의 치수는 30~1500 μm 이며, 그 사이에 따라 메쉬 간극의 치수는 조정된다.
- [0043] 또 상기 실시형태에서는 메쉬 간극의 치수는, 종세포(種細胞)(c)가 통과할 수 있도록 설정되어 있었지만, 종세포(c)가 통과할 수 없도록 설정되더라도 좋다. 이 경우에는, 종세포(c)는 막상부재(31)의 고정 전에 마이크로웰(17a)에 파종(播種)된다.
- [0044] 가압부재(9)는 플랜지부(flange部)(27)를 더 구비하고 있다. 이 실시형태에서는 설명의 편의를 위하여 플랜지부(27)는 가압부재 부착관(5)의 본체(5a)에 고정된 부재로서 설명하고 있지만, 본체(5a)와 일체로 형성되어 있더라도 좋다. 플랜지부(27)는 통상부(25)로부터 외주측으로 연장되어 있고, 오목부(7)에 있어서 통상부(19)의 상면에 착좌(着座)되어 있다. 이와 같이 가압부재(9)에 플랜지부(27)가 형성되어 있기 때문에, 가압부재(9)를 오목부(7)로부터 떼어내는 것이 용이하게 되어 있다.
- [0045] (3)스페로이드 작성공정
- [0046] 도7~도9를 사용하여 스페로이드(S)를 작성하는 공정을 설명한다. 도7~도9는 스페로이드 작성을 설명

하기 위한 모식도이다.

- [0047] 최초로 종세포(c)의 파종을 한다. 구체적으로는, 도7에 나타내는 바와 같이 세포배양액을 오목부(7) 내에 주입한다. 세포배양액은, 액체인 배지(培地)와, 배지에 균일하게 확산된 종세포(c)로 이루어지는 현탁액(懸濁液)이다. 종세포(c)는, 부착성을 구비하고 있고 예를 들면 사람의 골육종세포(骨肉腫細胞) 등의 암세포(癌細胞)나 간세포(肝細胞)이다. 배지는 부착성 세포의 배양에 적합한 공지의 것이 사용된다. 이상의 경우에, 개개의 종세포(c)가 막상부재(31)의 간극(31a)을 통하여 마이크로웰(17a)까지 강하되어 착상(着床)된다.
- [0048] 그리고 도8에 나타내는 바와 같이 마이크로웰(17a) 내에서, 복수의 종세포(c)가 응집됨으로써 스페로이드(S)를 형성한다. 이 세포배양용기(1)에서는, 막상부재(31)가 오목부(7) 내에서 복수의 마이크로웰(17a)의 상부에 배치되어, 마이크로웰(17a) 내에서 성장한 스페로이드(S)가 당해 마이크로웰(17a)로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하고 있다. 따라서 세포배양용기(1)에 있어서 스페로이드(S)가 안정적으로 형성된다.
- [0049] 도면에 나타내지 않은 관(管) 및 펌프(pump)를 사용하여, 오목부(7) 내부로 배지를 공급하고 배출하는 장치를 설치하더라도 좋다. 이에 따라 유입구(流入口)를 통하여 새로운 배지를 오목부(7) 내로 주입하고 또한 유출구(流出口)를 통하여 스페로이드 배양용기 내의 배지를 배출할 수 있다. 즉 종세포(c)가 마이크로웰(17a)에 있어서 스페로이드(S)를 형성하고 있을 때에 오목부(7) 내의 배지교환이 이루어진다.
- [0050] 상기의 배지교환에 있어서, 오목부(7) 내에서 배지의 흐름이 발생하지만, 이 때에 막상부재(31)에 의하여 스페로이드(S)를 가압하고 있기 때문에, 스페로이드(S)가 마이크로웰(17a)로부터 튀어나가지 않는다. 따라서 스페로이드(S)의 유출이 방지되고 있다.
- [0051] 상기한 배지교환에 의하여, 배지순환에 의하여 배양 중에도 세포에 영양분 및 산소가 공급되어 세포가 건강하게 성장한다. 그 결과 비교적 긴 배양기간을 요하는 큰 스페로이드(S)를 형성할 수 있고 또한 형성된 스페로이드(S)를 장기간 보존할 수 있다. 또한 배지교환에 의하여 스페로이드(S)로 되지 않은 세포 쓰레기 및 노폐물이 제거된다.
- [0052] 또한 도9에 나타내는 바와 같이 스페로이드(S)가 형성된 후에, 막상부재(31)가 녹음으로써 스페로이드(S)가 노출된다. 이에 따라 스페로이드(S)를 꺼내는 것이 용이하게 된다. 또 막상부재(31)가 가용성이 아닌 경우에는, 막상부재를 제거함으로써 도9의 상태를 얻는다.
- [0053] 2. 제2실시형태
- [0054] 막상부재는, 세포배양액이 통과할 수 있는 형상을 구비하고 있는 것으로서는 메쉬부재에 한정되지 않는다.
- [0055] 도10에 나타내는 바와 같이 막상부재(31A)는, 복수의 미소 구멍(31b)이 전체에 형성된 원형의 필름(film)이다.
- [0056] 막상부재(31A)는 예를 들면 글라스(glass), 플라스틱 필름(plastic film), 플라스틱 판(plastic 板)으로 이루어진다. 복수의 미소 구멍(31b)은 예를 들면 레이저(laser)에 의하여 형성된다.
- [0057] 3. 제3실시형태
- [0058] 막상부재는, 세포배양액이 통과할 수 있는 형상을 구비하고 있는 것으로서는 메쉬부재에 한정되지 않는다.
- [0059] 도11에 나타내는 바와 같이 막상부재(31B)는 복수의 소공(小孔)(31c)이 형성된 원형의 부재이다. 막상부재(31B)는 막상부재(31A)와 동일한 재료이다. 이 실시형태에서는, 복수의 소공(31c)은 외주측에 있어서 고리모양으로 배치되어 있다. 구멍의 형상, 위치, 개수는 특별하게 한정되지 않는다. 다만 도11과 같이 복수의 소공이 막상부재의 외주측에만 형성되어 있는 경우에는, 막상부재의 중심부 및 중간부에 대응하는 마이크로웰에 있어서 스페로이드(S)의 관찰 정밀도가 향상된다.
- [0060] 4. 제4실시형태
- [0061] 막상부재(31)는, 세포배양액이 통과할 수 있는 성질을 구비하고 있는 것으로서는 제1실시형태 및 제

2실시형태의 것에 한정되지 않는다.

[0062] 도12에 나타내는 바와 같이 막상부재(31C)는 하이드로겔(hydrogel)로 구성되어 있다. 하이드로겔이라는 것은, 수분을 다량으로 포함함으로써 팽윤(膨潤)되는 성질을 구비하는 고분자 재료이다. 하이드로겔은 예를 들면 아크릴아미드(acrylamide), 실리콘(silicon), 아가로오스(agarose), 젤라틴(gelatine)으로 이루어진다. 이에 따라 세포배양액은 막상부재(31C)를 통과할 수 있다. 또 하이드로겔에서는 단백질(1~20nm 정도)의 순환이 가능한 구조이면 좋다.

[0063] 이 경우에 세포의 파종은 막상부재(31C)의 설치 전에 이루어진다. 그 이유는, 막상부재(31C)는 배지는 통과하지만, 세포는 통과하지 않기 때문이다. 또 막상부재로서 세포배양액이 통과할 수 있는 성질을 구비하고 있는 것은 하이드로겔에 한정되지 않는다.

[0064] 5. 제5실시형태

[0065] 제1~제4실시형태에서는 막상부재는 세포배양액이 통과할 수 있는 형상 또는 성질을 구비하고 있었지만, 막상부재는 마이크로웰 내에서 성장한 것이 당해 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한할 수 있으면 좋기 때문에, 상기의 것에 한정되지 않는다. 예를 들면 막상부재는 세포배양액이 통과할 수 없는 형상 또는 성질을 구비하고 있더라도 좋다.

[0066] 도13을 사용하여 상기의 내용을 설명한다. 도13은 세포배양용기의 단면도이다.

[0067] 도면에 나타내는 바와 같이 막상부재(35)는, 오목부(7)의 바닥부(17)의 상면에 근접하는 위치에 배치되어 있다. 막상부재(35)는 세포배양액이 통과할 수 없는 성질을 구비하고 있다. 막상부재(35)의 외주 가장자리와, 통상부(19)의 내주면(19a)의 하부 사이에는, 고리모양의 간극(35a)이 확보되어 있다.

[0068] 막상부재(35)와 오목부(7)의 바닥부(17)의 상면의 간극은, 세포 1개는 통과할 수 있지만, 스페로이드는 통과할 수 없는 치수이다. 예를 들면 간극은 10 μm 이상이고 또한 100 μm 이하이다. 또 스페로이드의 치수는 30~1500 μm 이고, 그 사이즈에 따라 간극의 치수는 조정된다.

[0069] 막상부재(35)는 복수의 고정핀(固定pin)(37)에 의하여 바닥부(17)에 고정되어 있다. 고정핀(37)은 막상부재(35)의 외주부에 장착되어 있고, 선단이 바닥부(17)의 부착구멍(17b)에 삽입되어 있다.

[0070] 막상부재(35)는 투명필름이다. 막상부재(35)는 예를 들면 나일론(nylon), PE, PP, 카본(carbon), PEEK, 테플론(등록상표), PET로 이루어진다.

[0071] 이 실시형태에서는 막상부재(35)의 외주부에 있어서, 세포배양액이 간극(35a)을 통하여 막상부재(35)와 바닥부(17) 사이의 공간(즉 마이크로웰(17a)에 있어서 스페로이드(S)가 형성되는 공간)의 내외를 서로 이동할 수 있다. 즉 막상부재(35)에 의하여 스페로이드(S)를 가압하면서 배지교환이 가능하다. 배지교환에 의하여, 배양 중에도 세포에 영양분 및 산소가 공급되어 세포가 건강하게 성장한다. 또한 배지교환에 의하여, 스페로이드(S)로 되지 않은 세포 쓰레기 및 노폐물이 제거된다.

[0072] 이 실시형태에서는 제1~제4실시형태와 동일한 효과가 얻어진다. 또한 각 실시형태의 변형에도 본 실시형태에 적합하게 적용할 수 있다.

[0073] 또한 막상부재(35)가 투명하기 때문에 스페로이드(S)를 현미경으로 관찰할 수 있다.

[0074] 6. 제6실시형태

[0075] 막상부재를 바닥부의 근방에 부착하는 구조는 제5실시형태의 것에 한정되지 않는다.

[0076] 도14를 사용하여 그러한 실시형태를 설명한다. 도14는 세포배양기의 단면도이다.

[0077] 도면에 나타내는 바와 같이 막상부재(39)는, 오목부(7)의 바닥부(17)의 상면에 근접하는 위치에 배치되어 있다. 막상부재(39)는 배양액이 통과할 수 없는 형상 또는 성질을 구비하고 있다.

[0078] 막상부재(39)는, 외주 가장자리가 통상부(19)의 내주면(19a)의 하부에 고정되어 있다. 또한 막상부재(39)의 외주에는 복수의 구멍(39a)이 형성되어 있다.

[0079] 이 실시형태에서는 막상부재(35)의 외주부에 있어서, 세포배양액이 복수의 구멍(39a)을 통하여 막상부재(35)와 바닥부(17) 사이의 공간(즉 마이크로웰(17a)에 있어서 스페로이드(S)가 형성되는 공간)의 내외를 서로 이동할 수 있다.

- [0080] 7. 제7실시형태
- [0081] 제1~제6실시형태에서는 바닥부에 마이크로웰을 형성한 용기를 사용하였지만, 마이크로웰이 형성되는 부재는 상기의 구성에 한정되지 않는다.
- [0082] 도15~도18을 사용하여 스페로이드 형성용의 세포배양용기를 설명한다. 도15~도18은 세포배양용기의 단면도이다. 도19는 가압부재의 평면도이다.
- [0083] 도15는 세포배양용기의 용기본체(103)를 나타내고 있다. 용기본체(103)는, 상측이 개구된 오목부(107)를 구비하는 용기이며, 세포배양액(C)을 지지하고 있다. 세포배양액(C)은 다수의 종세포(c)를 포함하고 있다.
- [0084] 오목부(107)의 바닥부(117)에는 마이크로웰 부재(131)가 설치되어 있다. 마이크로웰 부재(131)는 복수의 마이크로웰(131a)을 상면에 구비하는 부재이다.
- [0085] 이 실시형태에서는, 마이크로웰 부재(131)는 바닥부(117)의 중심에 설치되고, 그 상면은 바닥부(117)로부터 비교적 떨어진 상방에 배치되어 있다. 그 때문에, 바닥부(117)에 있어서 마이크로웰 부재(131)의 외주측은 마이크로웰 부재(131)의 상면보다 낮은 면으로 되어 있다.
- [0086] 도16에 나타내는 바와 같이 가압부재(109)가 용기본체(103)의 오목부(107) 내에 삽입된다. 가압부재(109)는, 도16 및 도19에 나타내는 바와 같이 막상부재로서의 원판모양의 하면부(下面部)(123)를 구비하고 있다. 하면부(123)는, 마이크로웰 부재(131)의 상면(마이크로웰(131a)이 형성된 부분)에 근접하게 배치된다. 또한 하면부(123)에 있어서, 마이크로웰 부재(131)보다 더 외주측의 부분에는 복수의 기포 방출부(氣泡放出部)(123b)가 형성되어 있다. 즉 기포 방출부(123b)는, 바닥부(117)에 있어서 복수의 마이크로웰(131a)이 형성되어 있지 않은 부분에 대응하여 형성되어 있다. 기포 방출부(123b)는 점모양의 관통구멍이다. 따라서 하면부(123)보다 하방의 공간(예를 들면 복수의 마이크로웰(131a), 마이크로웰 부재(131)의 주위)에 있어서의 기포는 용이하게 외부로 배출된다.
- [0087] 상기의 상태에서 세포를 배양하면, 도17에 나타내는 바와 같이 마이크로웰(131a) 내에서 스페로이드(S)가 형성된다. 여기에서 하면부(123)는 마이크로웰(131a)에 근접하게 배치되어 있기 때문에, 성장한 스페로이드(S)는 마이크로웰(131a)에서 외부로 나갈 수 없다. 따라서 안전하고 또한 확실하게 스페로이드(S)를 형성할 수 있다.
- [0088] 도18에 나타내는 바와 같이 세포배양액(C)을 감소시켜서 하면부(123)보다 상측에 세포배양액(C)이 존재하지 않도록 한 후에, 용기본체(103)의 하방에서 스페로이드(S)를 관찰한다. 이 때에 하면부(123)의 하면(123a)이 세포배양액(C)의 상면에 접촉함으로써 메니스커스(meniscus)가 해소된다. 이 결과 용기본체(103)에 있어서 스페로이드(S)를 정확하게 관찰할 수 있다.
- [0089] 8. 제8실시형태
- [0090] 제7실시형태에서는 기포 방출부는 복수의 구멍이었지만, 기포 방출부의 형태는 그것에 한정되지 않는다.
- [0091] 도20을 사용하여 가압부재의 다른 실시형태를 설명한다. 도20은 가압부재의 평면도이다. 하면부(123)에 있어서, 마이크로웰 부재(131)보다 더 외주측의 부분에는 복수의 기포 방출부(123c)가 형성되어 있다. 기포 방출부(123c)는 원주방향으로 연장되는 원호모양의 관통홈이다.
- [0092] 하면부에 형성되는 기포 방출부로서의 관통구멍의 형상, 개수, 위치는 특별하게 한정되지 않는다.
- [0093] 또한 기포 방출부는 하면부에 형성되는 관통구멍에 한정되지 않는다. 기포 방출부는, 가압부재(109)의 통상부(125)와 용기본체(103)의 통상부(119) 사이에 형성된 노치(notch), 슬릿(slit), 관통구멍이더라도 좋다.
- [0094] 9. 제9실시형태
- [0095] 제7실시형태에서는 가압부재의 하면부는 평탄한 형상이었지만, 하면부의 형상은 특별하게 한정되지 않는다.
- [0096] 도21을 사용하여 가압부재(109)의 다른 실시형태를 설명한다. 도21은 세포배양용기의 단면도이다.

- [0097] 도면에 나타내는 바와 같이 가압부재(109)는, 평탄한 하면부(123A)와, 고리모양의 돌출부(突出部)(123B)를 구비하고 있다. 하면부(123A)는 마이크로웰 부재(131)의 상면에 근접하게 배치되어 있다. 고리모양의 돌출부(123B)는, 하면부(123A)의 외주 가장자리에 형성되며 하방으로 연장되어 있다. 즉 돌출부(123B)는 마이크로웰 부재(131)의 외주측을 둘러싸도록 배치되어 있다. 돌출부(123B)의 바닥면에는 복수의 기포 방출부(123b)가 형성되어 있다. 기포 방출부(123b)의 형상은 점모양 또는 원호모양의 관통구멍 또는 그들의 조합이다.
- [0098] 10. 제10실시형태
- [0099] 제1~제9실시형태에서는 가압부재의 하면부와 그 하방의 부재 사이의 치수를 정확하게 관리하는 것이 요구된다. 그러나 가압부재는 배양용기의 배지에 압입하여 사용되기 때문에, 부력(浮力)에 의하여 가압부재가 떠 버린다는 문제가 생각된다.
- [0100] 그래서 도22를 사용하여 그러한 과제를 해결하기 위한 구조를 설명한다. 도22는 세포배양용기의 단면도이다.
- [0101] 도면에 나타내는 바와 같이 가압부재 부착판(5)의 상방에는 뚜껑(11)이 배치되어 있다. 뚜껑(11)은 가압부재 부착판(5)의 상측 전체를 덮고 있다. 뚜껑(11)은, 평탄한 본체(11a)와, 그 외주 가장자리로부터 하방으로 연장되는 통상부(11b)를 구비하고 있다. 뚜껑(11)의 본체(11a)와 가압부재 부착판(5)의 사이에는, 쿠션부재(cushion部材)(12)가 배치되어 있다. 쿠션부재(12)는 스프링(spring), 고무, 스펀지(sponge) 등의 탄성부재(彈性部材)이다.
- [0102] 쿠션부재(12)는, 가압부재 부착판(5)과 뚜껑(11)의 사이에서 압축됨으로써 탄성력을 발생시킨다. 이에 따라 가압부재 부착판(5)이 부상(浮上)하는 것이 방지되어, 용기본체(3) 내에 고정할 수 있다. 이에 따라 예를 들면 스페로이드를 형성하는 것과 같은 경우에, 마이크로웰과 메쉬 사이의 간극을 정확하게 확보할 수 있고, 그에 따라 스페로이드 고정효과가 확실하게 얻어진다.
- [0103] 11. 제11실시형태
- [0104] 제10실시형태에서는, 뚜껑은 자체 중량만에 의하여 탄성부재를 압축하고 있었지만, 다른 구조에 의하여 탄성부재를 압축하더라도 좋다.
- [0105] 그래서 도23을 사용하여 그러한 과제를 해결하기 위한 구조를 설명한다. 도23은 세포배양용기의 단면도이다.
- [0106] 기본적인 구조는 제10실시형태와 동일하다.
- [0107] 이 실시형태에서는, 용기본체(3)의 외주부에 제1결합부(15)가 형성되어 있고 또한 뚜껑(11)의 통상부(11b)에 제2결합부(16)가 형성되어 있다. 제1결합부(15)와 제2결합부(16)는 서로 결합되어 있고, 그에 따라 뚜껑(11)이 용기본체(3)로부터 떨어지지 않도록 되어 있다.
- [0108] 이 실시형태에서는, 쿠션부재(12)는 가압부재 부착판(5)과 뚜껑(11)의 사이에서 압축됨으로써 탄성력을 발생시킨다. 이에 따라 가압부재 부착판(5)이 부상하는 것이 방지되어, 용기본체(3) 내에 고정할 수 있다. 이에 따라 예를 들면 스페로이드를 형성하는 것과 같은 경우에도 마이크로웰과 메쉬 사이의 간극을 충분히 좁게 할 수 있고, 그에 따라 스페로이드 고정효과가 확실하게 얻어진다.
- [0109] 12. 제12실시형태
- [0110] 제10실시형태 및 제11실시형태에서는, 뚜껑 및 쿠션부재를 사용함으로써 가압부재 부착판(5)의 부상을 방지하고 있었지만, 다른 수단에 의해서도 부상방지는 가능하다. 예를 들면 가압부재 부착판(5)의 중량을 증가시킴으로써 부력에 의한 부상을 방지할 수 있다. 구체적으로는 금속제(金屬製) 재료를 일부에 사용함으로써 가압부재 부착판(5) 자체를 무겁게 한다. 또는 가압부재 부착판(5)의 일부에 추(錘)를 부착한다.
- [0111] 13. 제13실시형태
- [0112] 도24를 사용하여 통상부(19)에 고정된 막상부재(31)의 위치결정을 정확하게 하기 위한 구조를 설명한다. 도24는 세포배양용기의 단면도이다.
- [0113] 가압부재 부착판(5)의 플랜지부(27)의 하면에는 핀부재(pin部材)(41)가 고정되어 있다. 핀부재(41)의 하

단은, 용기본체(3)의 통상부(19)의 상면에 형성된 구멍(43) 내에 삽입되어 있다.

[0114] 이와 같이 핀과 구멍에 의하여, 가압부재(9)와 오목부(7)의 상하방향의 위치결정이 정확하게 이루어지고 있다. 따라서 막상부재(31)와 바닥부(17)의 상면 사이의 간극이 정확하게 확보된다.

[0115] 또 상기한 핀과 구멍에 의한 위치결정구조는 개수, 형상, 위치가 특별하게 한정되지 않는다.

[0116] 14. 제14실시형태

[0117] 도25를 사용하여 통상부(19)에 고정된 막상부재(31)의 위치결정을 정확하게 하기 위한 구조를 설명한다. 도25는 세포배양용기의 단면도이다.

[0118] 통상부(19)의 하단에는 복수의 돌기(45)가 형성되어 있다. 돌기(45)는 막상부재(31)보다 더 하방으로 연장되어 있다. 돌기(45)의 하단은, 바닥부(17)의 상면에 형성된 부착구멍(17b) 내에 삽입되어 있다.

[0119] 이와 같이 돌기와 구멍에 의하여, 가압부재(9)와 오목부(7)의 상하방향의 위치결정이 정확하게 이루어지고 있다. 따라서 막상부재(31)와 바닥부(17)의 상면 사이의 간극이 정확하게 확보된다.

[0120] 또 상기의 돌기와 구멍에 의한 위치결정구조는 개수, 형상, 위치가 특별하게 한정되지 않는다. 또한 통상부의 하부와 바닥부 사이의 위치결정은 상기 실시형태에 한정되지 않는다. 예를 들면 통상부의 하부가 바닥부에 형성된 수용부에 의하여 지지되더라도 좋다.

[0121] 15. 제15실시형태

[0122] 복수의 가압부재가 복수의 오목부에 원활하게 끼워지도록 양자의 위치결정구조를 설명한다.

[0123] 그러한 실시형태를 도26을 사용하여 설명한다. 도26은 세포배양용기의 용기본체의 사시도이다.

[0124] 또 기본적인 구조는 제1~제15실시형태와 동일하다. 이하, 다른 점을 중심으로 설명한다.

[0125] 용기본체(3)의 상측의 모퉁이에는, 복수의 핀(71)이 세워져 형성되어 있다. 구체적으로는 핀(71)은, 용기본체(3)의 오목부(7)가 형성된 본체부분의 외측부분의 네 모퉁이에 배치되어 있다.

[0126] 가압부재 부착판(5)에는, 핀(71)에 대응하는 위치에 구멍(73)이 형성되어 있다. 구체적으로는 구멍(73)은 프레임(5b)의 네 모퉁이에 형성되어 있다.

[0127] 가압부재 부착판(5)을 용기본체(3)에 끼울 때에, 핀(71)과 구멍(73)에 의하여 위치결정함으로써 복수의 가압부재(9)가 오목부(7)에 원활하게 끼워진다.

[0128] 또 핀과 구멍의 수는 상기 실시형태에 한정되지 않는다. 또한 용기본체(3)와 가압부재 부착판(5)의 위치결정구조는 핀과 구멍에 한정되지 않는다.

[0129] 16. 실시형태의 공통점

[0130] 제1~제15실시형태는 하기의 점이 공통이다.

[0131] 배양용기(예를 들면 세포배양용기(1))는, 용기본체(예를 들면 용기본체(3))와, 막상부재(예를 들면 막상부재(31), 막상부재(31A), 막상부재(31B), 막상부재(31C), 막상부재(35), 막상부재(39), 하면부(123), 하면부(123A))를 구비하고 있다. 용기본체(3)는, 배양액(예를 들면 세포배양액(C))을 수용하기 위한 복수의 마이크로웰(예를 들면 복수의 마이크로웰(17a), 마이크로웰(131a))이 바닥면(예를 들면 바닥부(17)의 상면, 마이크로웰 부재(131)의 상면)에 형성된 오목부(예를 들면 오목부(7), 오목부(107))에 구비된다. 막상부재는, 오목부 내에서 복수의 마이크로웰의 상방에 배치되어, 마이크로웰 내에서 성장한 스페로이드(예를 들면 스페로이드(S))가 당해 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하기 위한 부재이다.

[0132] 이 배양용기에서는 막상부재가, 오목부 내에서 복수의 마이크로웰의 상방에 배치되어, 마이크로웰 내에서 성장한 스페로이드가 당해 마이크로웰로부터 이탈하지 않도록 이동을 제한하고 있다(예를 들면 도8, 도17을 참조). 따라서 배양용기에 있어서 스페로이드가 안정적으로 형성된다.

[0133] 17. 다른 실시예

[0134] 이상, 본 발명의 복수의 실시형태에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 상기 실시형태에 한정되는 것이 아니라 발명의 요지를 이탈하지 않는 범위에서 여러 가지의 변경이 가능하다. 특히 본 명세서에 기재된 복수의 실시형태 및 변형에는 필요에 따라 임의로 조합할 수 있다.

- [0135] 상기 실시형태에서는 스페로이드의 배양을 설명하였지만, 본 발명은 그것에 한정되지 않는다. 본 발명은 예를 들면 배양체(胚樣體)의 배양에도 적용할 수 있다. 배양체는 초기 배와 닮은 구조를 구비하는, ES 세포나 iPS 세포 등으로 이루어지는 세포 덩어리(細胞塊)이다.
- [0136] 상기 실시형태에서는 스페로이드 형성 중에 배지교환을 하고 있었지만, 배지교환은 반드시 하지 않아도 좋다.
- [0137] 오목부 및 가압부재를 평면에서 볼 때의 형상 및 그들의 조합은 상기 실시형태에 한정되지 않는다.
- [0138] 오목부 및 가압부재의 개수는 상기 실시형태에 한정되지 않는다.
- [0139] 상기 실시형태에서는 배양용기의 일례로서 세포배양액을 사용한 세포배양용기를 설명하였다. 그러나 본 발명에 관한 배양용기에서는 예를 들면 동물세포, 식물세포, 균, 세균도 배양할 수 있다.

산업상 이용가능성

- [0140] 본 발명은, 현미경 관찰에 사용되는 배양액을 수용하는 배양용기에 널리 적용할 수 있다.

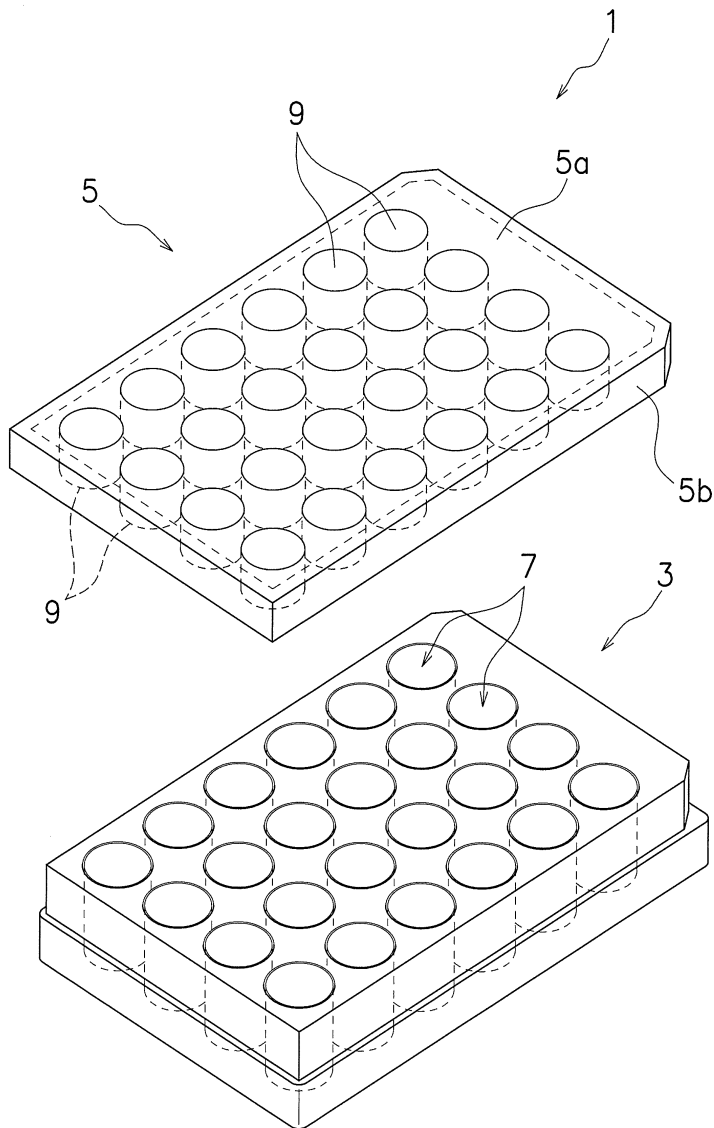
부호의 설명

- [0141]
- 1 : 세포배양용기
 - 3 : 용기본체
 - 5 : 가압부재 부착판
 - 5A : 가압부재 부착판
 - 5a : 본체
 - 5b : 프레임
 - 7 : 오목부
 - 9 : 가압부재
 - 17 : 바닥부
 - 17a : 마이크로웰
 - 17b : 부착구멍
 - 19 : 통상부
 - 19a : 내주면
 - 25 : 통상부
 - 25a : 외주면
 - 27 : 플랜지부
 - 31 : 막상부재
 - 31A : 막상부재
 - 31B : 막상부재
 - 31C : 막상부재
 - 31a : 간극
 - 31b : 미소 구멍

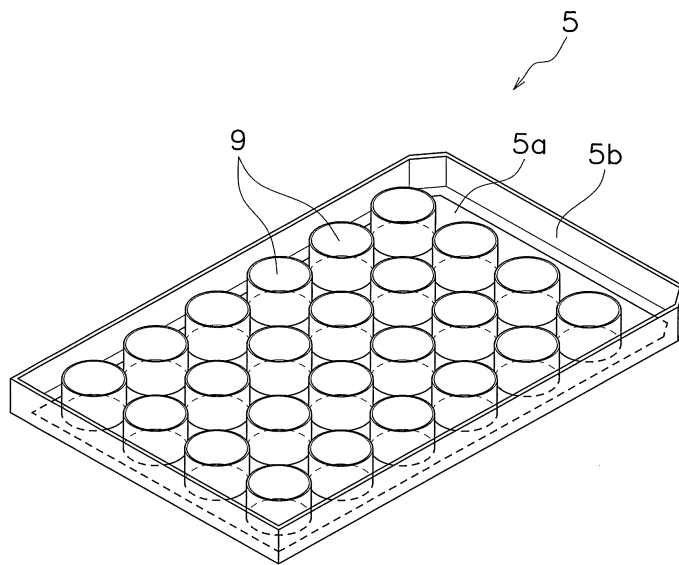
31c : 소공
 35 : 막상부재
 39 : 막상부재
 123 : 하면부
 123A : 하면부
 123a : 하면
 C : 세포배양액
 c : 종세포
 S : 스페로이드

도면

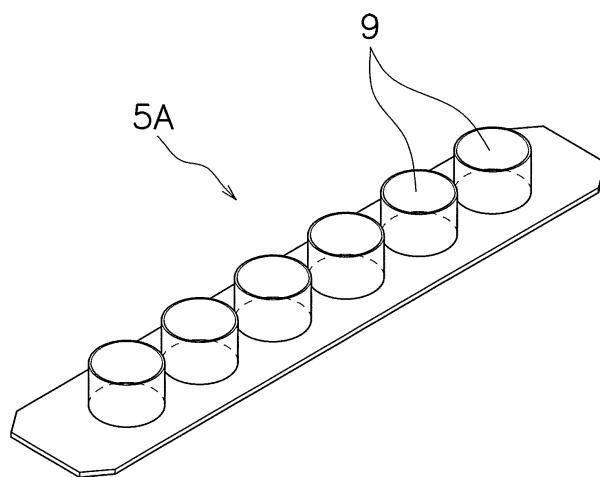
도면1



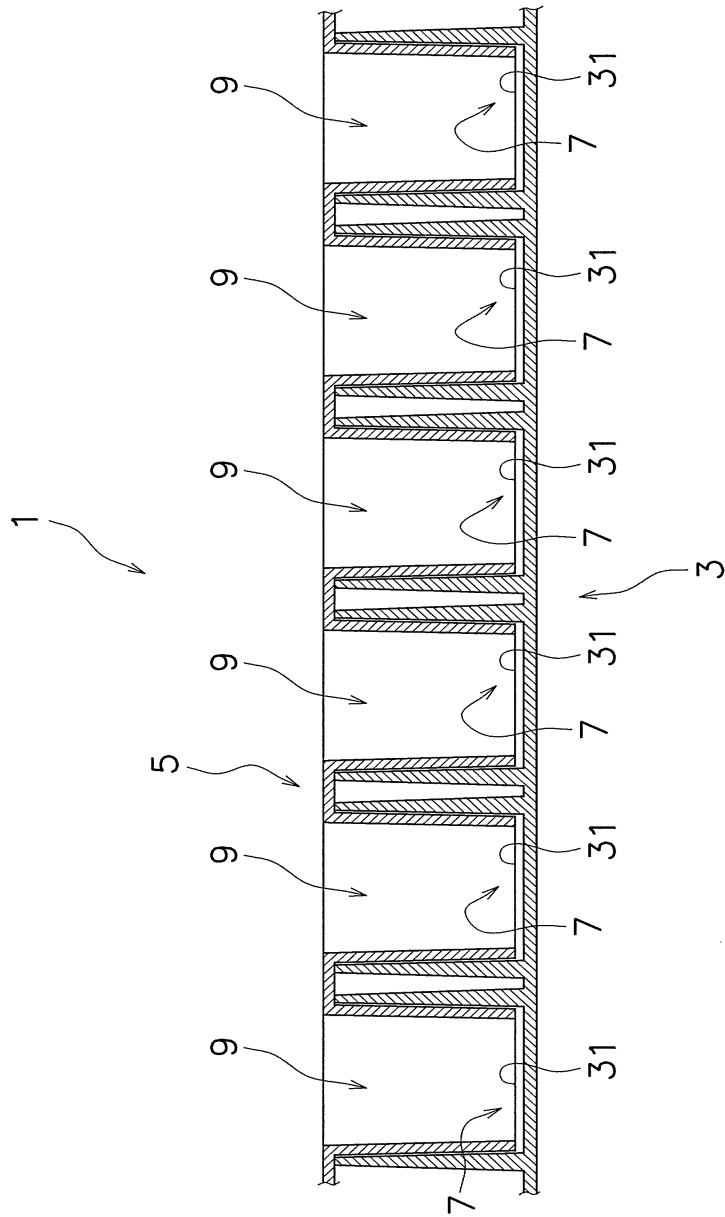
도면2



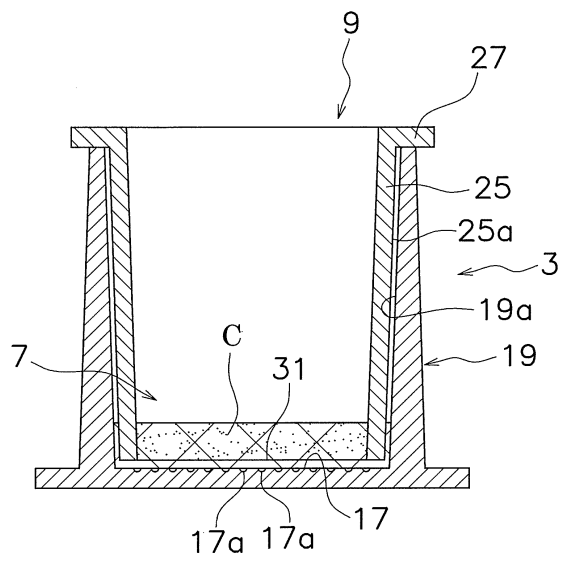
도면3



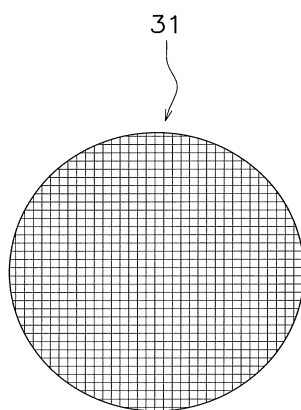
도면4



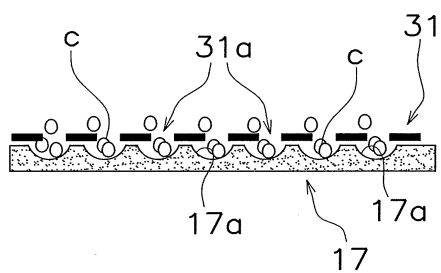
도면5



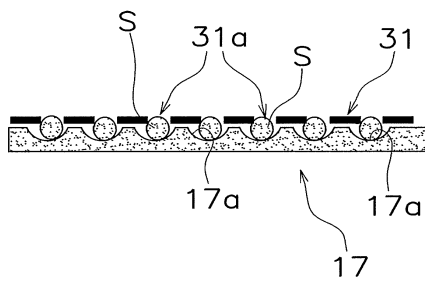
도면6



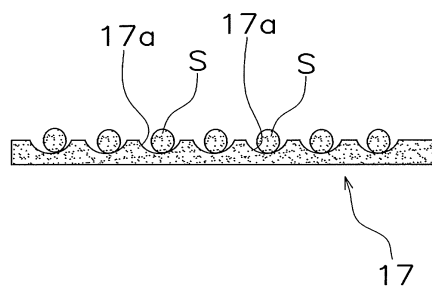
도면7



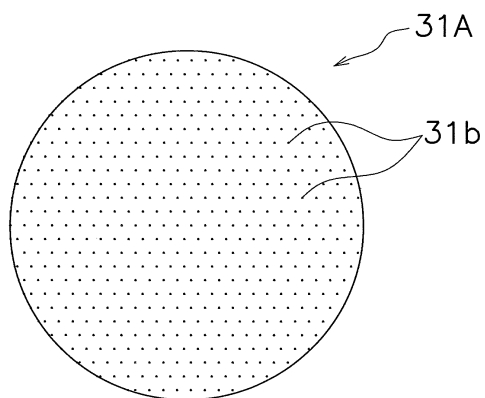
도면8



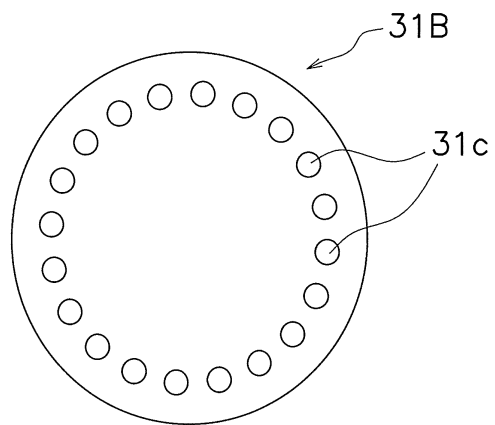
도면9



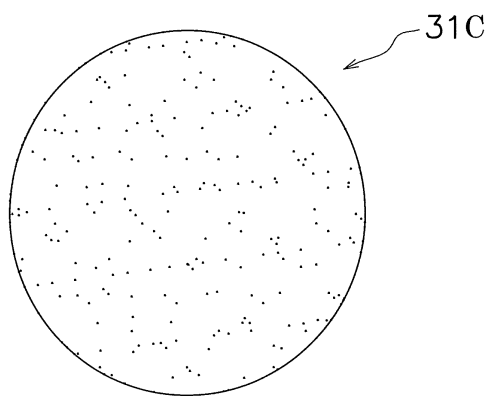
도면10



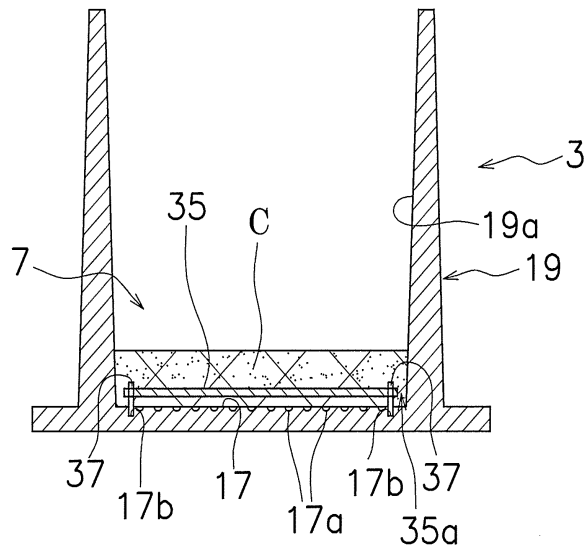
도면11



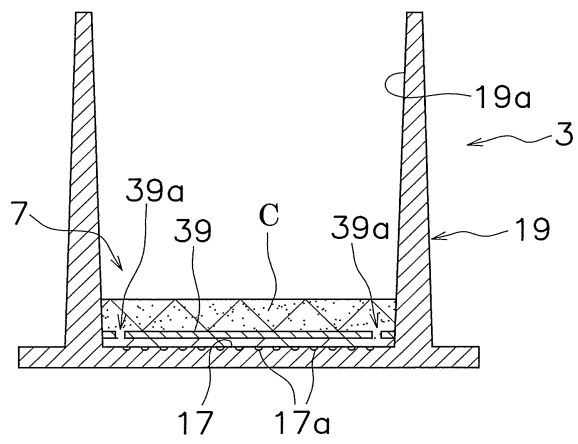
도면12



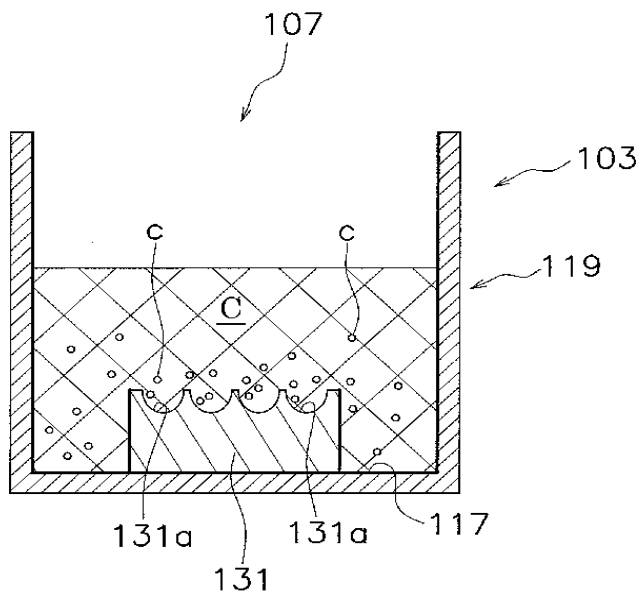
도면13



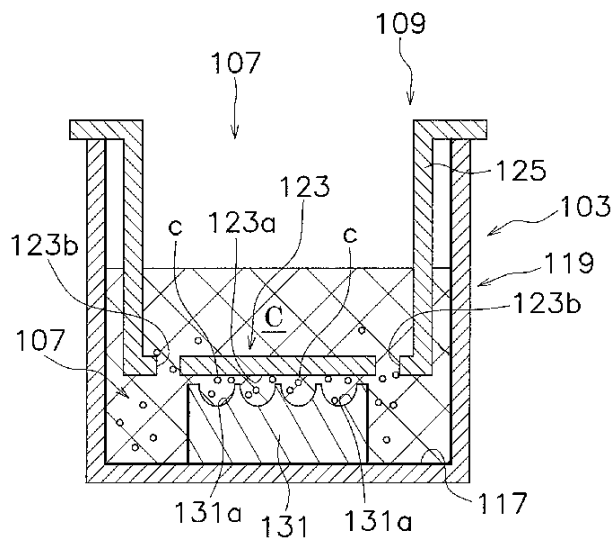
도면14



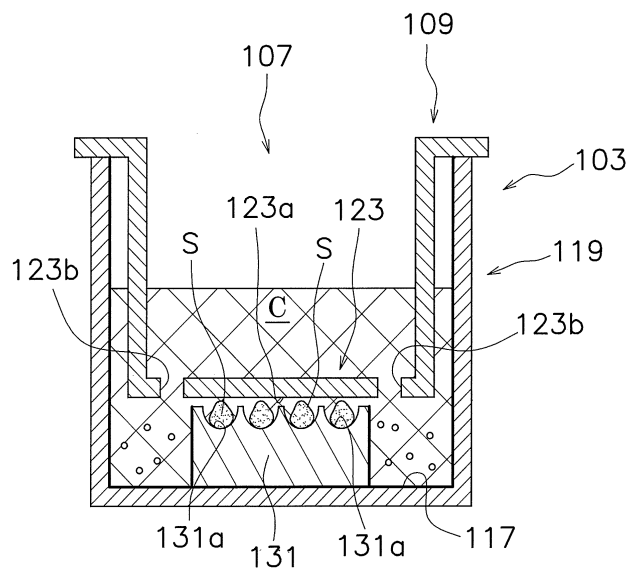
도면15



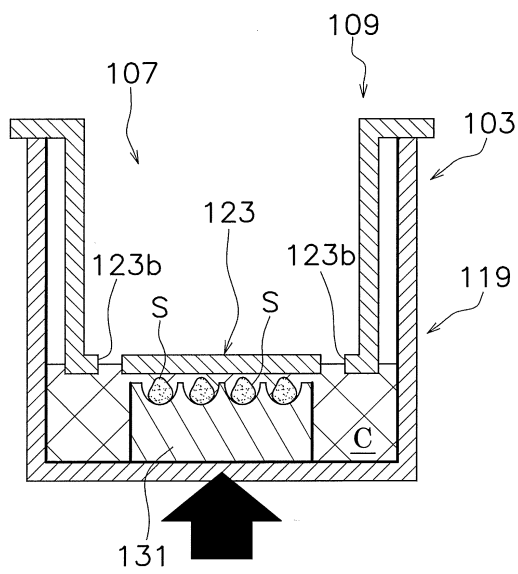
도면16



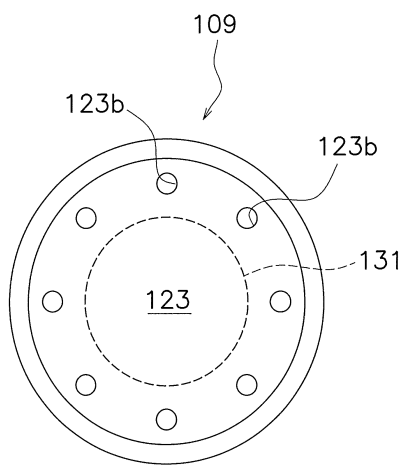
도면17



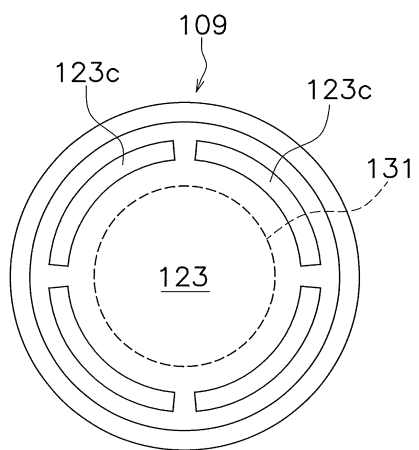
도면18



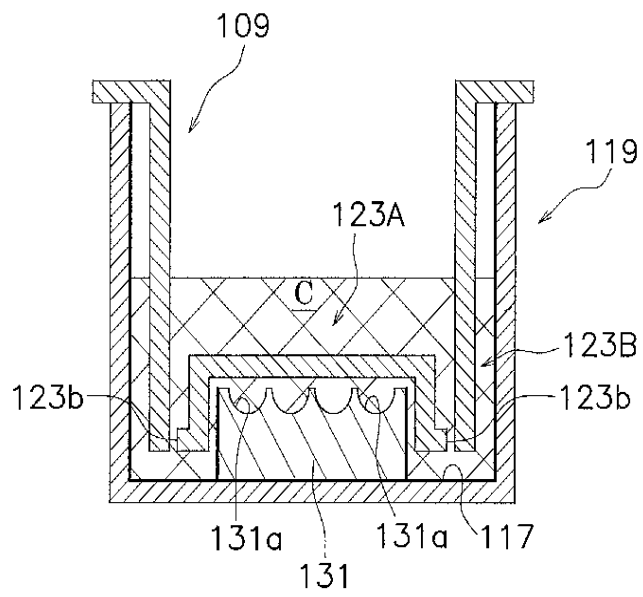
도면19



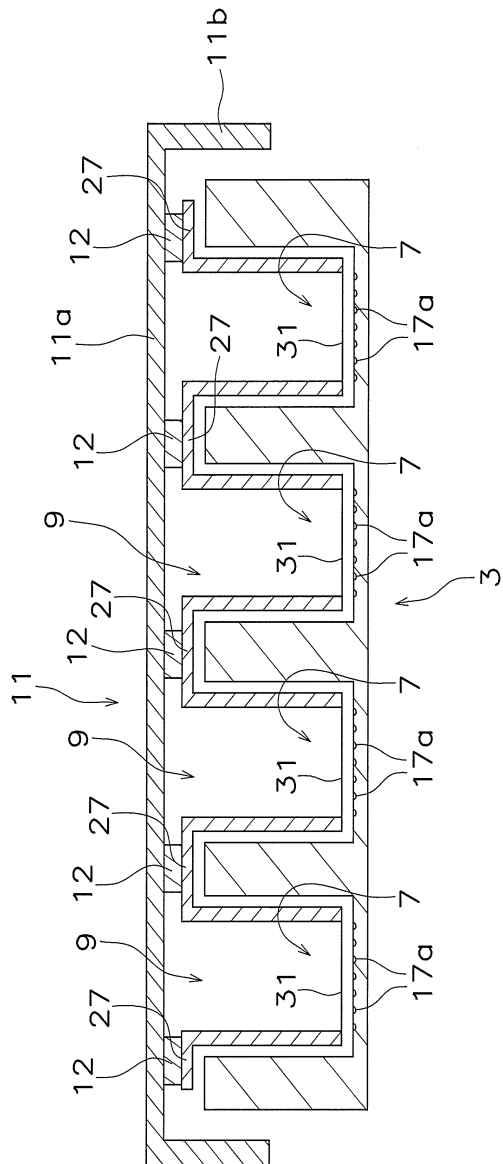
도면20



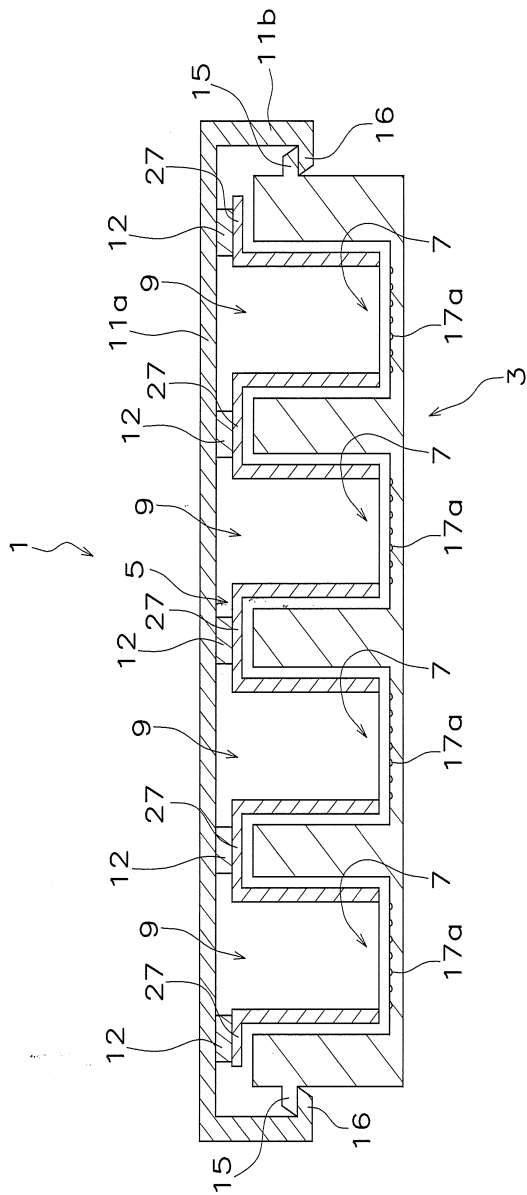
도면21



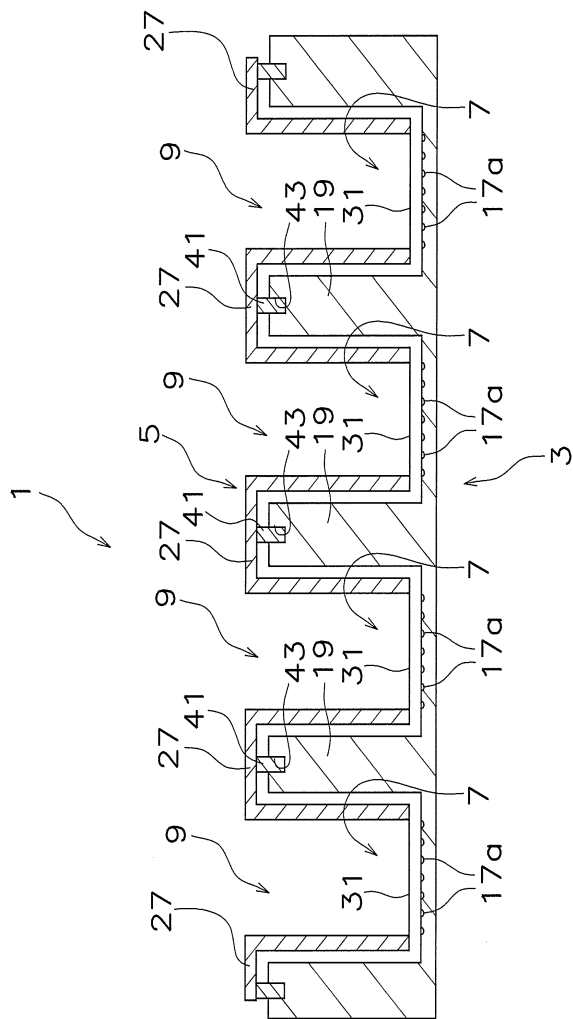
도면22



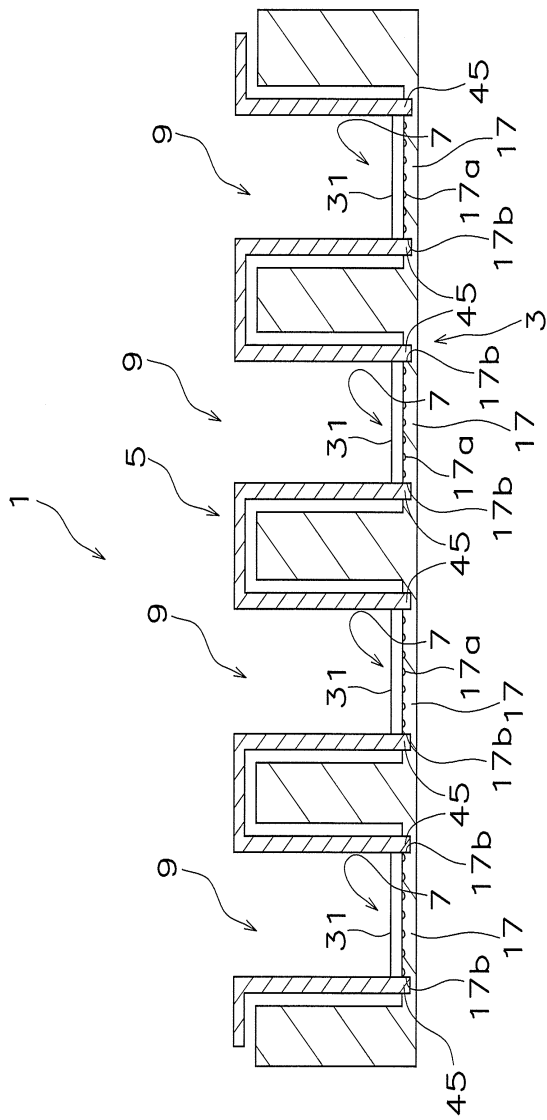
도면23



도면24



도면25



도면26

