

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6811024号
(P6811024)

(45) 発行日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34 D
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48 M
G O 1 N	33/483	(2006.01)	G O 1 N 33/483 C

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2016-70163 (P2016-70163)	(73) 特許権者	000237271
(22) 出願日	平成28年3月31日 (2016. 3. 31)		株式会社 F U J I
(65) 公開番号	特開2017-176073 (P2017-176073A)		愛知県知立市山町茶碓山 1 9 番地
(43) 公開日	平成29年10月5日 (2017. 10. 5)	(74) 代理人	100130188
審査請求日	平成31年2月21日 (2019. 2. 21)		弁理士 山本 喜一
		(74) 代理人	100089082
			弁理士 小林 脩
		(74) 代理人	100190333
			弁理士 木村 群司
		(72) 発明者	神藤 高広
			愛知県知立市山町茶碓山 1 9 番地 富士機
			械製造株式会社内
		(72) 発明者	廣田 重元
			愛知県知立市山町茶碓山 1 9 番地 富士機
			械製造株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養用ウェルプレート及び当該細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プレート上面に、底の形状がU型の丸底形状であって開口面を有する複数のウェルを具備し、前記プレート上面に、前記ウェルの開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない凸状の堤部を具備する細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する方法であって、

前記方法は、

前記細胞培養用ウェルプレートを配置する配置部と、

前記細胞培養用ウェルプレートに前記培養液を追加する培養液導入部と、

前記ウェルの開口面側から細胞を観測する撮影手段と、

所望の細胞を吸着させ又は吸引して搬送する搬送手段と、

前記細胞の観測結果から、所望の細胞が存在するウェルを特定する判断手段を有し、前記細胞の観測結果から、所望の細胞の中心に前記搬送手段を合致させる制御部と、

を備えた細胞搬送システムにより行われるものであり、

液高が前記プレート上面を超えるまで前記培養液導入部により前記培養液を加えた後に、前記細胞を前記撮影手段により観測することを特徴とする観測方法。

【請求項 2】

前記細胞培養用ウェルプレートが前記堤部を複数具備するものである請求項 1 に記載の観測方法。

【請求項 3】

プレート上面に、底の形状がU型の丸底形状であって開口面を有する複数のウェルと、前記ウェルの開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない凸状の堤部とを具備し、かつ、前記ウェル内部に培養液及び培養された細胞が存在する細胞培養用ウェルプレートを配置する配置部と、

前記細胞培養用ウェルプレートに培養液を追加する培養液導入部と、

前記ウェルの開口面側から細胞を観測する撮影手段と、

所望の細胞を吸着させ又は吸引して搬送する搬送手段と、

前記細胞の観測結果から、所望の細胞が存在するウェルを特定する判断手段を有し、前記細胞の観測結果から、所望の細胞の中心に搬送手段を合致させる制御部と、
を備えた細胞搬送システム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養用ウェルプレート及び当該細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、細胞培養用ウェルプレートを用いて、ウェル内部の培養液中で、各種の生物の細胞を培養することが行われている。特に近年、哺乳動物の細胞培養、中でもヒトのES細胞やiPS細胞などの多能性の幹細胞、上皮細胞、癌細胞についての培養が盛んに行われており、そして、培養された細胞は、医薬品の開発や再生医療の分野で活用されている。

20

【0003】

細胞培養に関し、ウェルを複数具備する細胞培養用ウェルプレートを用いることで、同じ培養液又は異なる種類の培養液を用いた細胞の培養を、同一の保管条件下で行うことが可能となっている。ここで、細胞培養用ウェルプレートを用いる場合には、各ウェル間でのコンタミネーションが生じないように、各ウェルの内部空間を超えない量の培養液を各ウェル内に分注ピペットで分注するのが一般的であり、かつ技術常識である。

【0004】

さて、研究者や作業員においては、細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する必要がある。ただし、培養液とウェルの側壁表面との相互作用に因り、ウェル内部の培養液の液面には、凹状又は凸状の屈曲、いわゆるメニスカスが生じていた。メニスカスが生じた状態で培養液中の細胞を、ウェルの開口面側から観測すると、メニスカスの影響で、細胞の正しい大きさや形状などが正確に観測できない場合があった。

30

【0005】

かかる事態を解決するため、特許文献1には、ウェルの下方から、規則的な歪み検出用パターンを有する透明材料からなるステージを介して、ウェルに対して光を照射すること、及び、歪み検出用パターンの像に出現した歪みに基づき、ウェル内部の細胞を観測した像の歪みを補正する技術が開示されている。

40

【0006】

特許文献2には、測定装置によって検知された、ウェル内部の細胞に由来する積分信号(光源からの光照射により、ウェル内部の細胞で観測される蛍光、ルミネセンス、吸光度、又はインピーダンスを意味する。)と、大きな開口絞りを介して照射された照明によって観察されたウェル内の細胞の像とを、比較する技術が開示されており、かかる技術により、細胞の定量的かつ定性的な観測を一度に行うことができること、及び、大きな開口絞りを介して照射された照明に因り、従来の小さな開口絞りをを用いる手法よりも、メニスカスによる輝度の減少を軽減できることが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【0007】

【特許文献1】特開2013-170861号公報

【特許文献2】特開2013-190428号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述のとおり、メスニカスの影響を排除するために、特許文献1に開示の技術においては、規則的な歪み検出用パターンを有する透明材料からなるステージが必要であり、かつ、ウェル自体も透明材料で構成されることが必要であるし、さらに、像の歪みを計算するための特別な手段も必要である。

10

【0009】

また、特許文献2に開示の技術においては、メスニカスによる輝度の減少を軽減できることは開示されているものの、かかる技術の構成からみて、メスニカスから生じる細胞像の歪みが是正されるとはいえない。

【0010】

本発明は、かかる事情に鑑みて為されたものであり、細胞の観測時において、メスニカスの影響を排除するための新たな技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、観測装置自体の改良を指向するのではなく、培養液とウェルの側壁表面との相互作用を減少又は消失させて、メスニカス自体を低減又は消失させることを想起した。具体的には、プレート上面に開口面を有するウェルを具備する細胞培養用ウェルプレートにおいて、ウェルの内部空間を超える量の培養液を注入してウェル内部の培養液中の細胞を観測すること、換言すれば、培養液の液高が前記プレート上面を超えるまで培養液を加えて、培養液とウェルの側壁表面との相互作用が培養液の液面に影響しない状態にした後、ウェル内部の培養液中の細胞を観測することを想起した。かかる発想に基づき、本発明者は本発明を完成させた。

20

【0012】

本発明の細胞培養用ウェルプレートは、プレート上面に、開口面を有するウェルを具備する細胞培養用ウェルプレートであって、前記プレート上面に、前記ウェルの開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない凸状の堤部を具備することを特徴とする。

30

【0013】

また、本発明の観測方法は、本発明の細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する方法であって、液高が前記プレート上面を超えるまで培養液を加えた後に、前記細胞を観測することを特徴とする。

【発明の効果】

【0014】

本発明の細胞培養用ウェルプレートは凸状の堤部を具備する。それにより、細胞の観測時に、メスニカスの影響が排除されるまで培養液を追加することができる。本発明の観測方法によれば、メスニカスの影響を排除した状態で、細胞の観測が可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実施例1の細胞培養用ウェルプレートの斜視図である。

【図2】細胞培養状態における、実施例1の細胞培養用ウェルプレートの断面図である。

【図3】細胞観測状態における、実施例1の細胞培養用ウェルプレートの断面図である。

【図4】実施例2の細胞培養用ウェルプレートの斜視図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下に、本発明を実施するための最良の形態を説明する。

本発明の細胞培養用ウェルプレートは、プレート上面に、開口面を有するウェルを具備

50

する細胞培養用ウェルプレートであって、前記プレート上面に、前記ウェルの開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない凸状の堤部を具備することを特徴とする。

【0017】

培養される細胞としては、いかなる生物の細胞であってもよい。ヒトを含む哺乳動物の細胞としては、ES細胞やiPS細胞などの多能性の幹細胞、上皮細胞、癌細胞を例示できる。その他の具体的な細胞として、CHO細胞、HEK293細胞、HL-60細胞、HeLa細胞、MDCk細胞、NIH3T3細胞、PC12細胞、S2細胞、Sf9細胞、Vero細胞を例示できる。また、例えば、iPS細胞を特定の条件下で分化させた網膜細胞、角膜細胞、神経細胞、視神経細胞、NKT細胞、造血幹細胞、心筋細胞などを例示できる。

10

【0018】

本明細書において、細胞培養とは、細胞を増殖させることに加えて、iPS細胞などの多能性の幹細胞を特定の条件下で特定の細胞に分化させた上で、当該細胞を増殖させることも包含する。

【0019】

ウェルプレートとは、プレート上面に、開口面を有するウェルを具備するものであって、マイクロプレートやマイクロタイタープレートなどと称されるものを包含する。ウェルとは窪みを意味し、そして、ウェルは細胞を培養するための場となる。ウェルプレートは、ウェル自体が自立用の脚としての機能を有するものでもよいし、また、自立用の脚としての機能を有する側壁面が、プレート上面の周縁に、プレート上面に対して垂直方向に存在するものでもよい。

20

【0020】

ウェルプレートの材料は公知のものでよく、ガラス、石英などの無機材料や、アクリル樹脂、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどの有機材料を例示できる。ウェルプレートの材料は、細胞及び培養液の特性に応じて、適宜適切に選択すれば良い。ウェルプレートの色としては、透明、半透明、白色、又は黒色を例示できる。ウェルプレートの色は、細胞及び培養液の色などに応じて、適宜適切に選択すれば良い。

【0021】

本発明の細胞培養用ウェルプレートにおいて、ウェルの数は、特に限定されない。ウェルの具体的な数として、4、6、8、12、16、24、96、384、1536、又は9600を例示できる。

30

【0022】

ウェルの開口面の形状は、特に限定されない。開口面の形状として、円形、矩形、又は正方形を例示できる。また、ウェルの底の形状も特に限定されない。底の形状として、U型の丸底形状、平板状の平底形状、又は、平底であるがウェルの側壁との接合部周縁が曲面を有する形状を例示できる。ウェル自体の形状も特に限定されず、円柱、直方体、立方体、円錐、四角錐、円錐台、又は四角錐台を例示できる。

【0023】

ウェルの表面は、各種の表面処理が為されていてもよい。具体的な処理として、疎水性処理、親水性処理、疎水性処理とイオン性処理を組み合わせた処理を挙げることができる。

40

【0024】

凸状の堤部は、プレート上面に、ウェルの開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない状態で存在する。堤部の存在に因り、細胞の観測時に、メスニカスの影響が排除されるまで培養液を追加することができる。

【0025】

堤部はウェルの開口面と接しないため、細胞の観測時に培養液と堤部との相互作用が生じたとしても、その相互作用がウェルの開口面にまで実質的に影響を与えることは想定されない。仮に、上記相互作用がウェルの開口面にまで影響したとしても、少なくとも培養液とウェルの側壁表面との相互作用よりも軽微なものに留まることは明白である。

50

【0026】

本発明の細胞培養用ウェルプレートには、1つの堤部を具備していてもよいし、複数の堤部を具備していてもよい。例えば、ウェルの数が96である96ウェルの場合、96個のウェル全ての開口面の周縁を、1つの堤部が囲うものであってもよいし、又は、48個のウェルの開口面の周縁を第一の堤部が囲い、24個のウェルの開口面の周縁を第二の堤部が囲い、残り24個のウェルの開口面の周縁を第三の堤部が囲うものであってもよい。また、特に、ウェルの数が比較的少ない場合、例えば、ウェルの数が6である6ウェルの場合、ウェルそれぞれの開口面の周縁を、それぞれ1つの堤部が囲うものであってもよい。この場合は、堤部の数が6になる。

【0027】

複数の堤部を有する本発明の細胞培養用ウェルプレートを用いることにより、堤部ごとに異なる培養系での細胞培養を行うことができるため、他の培養系とのコンタミネーションの心配をすることなく、細胞培養や細胞の観測を行うことができる。

【0028】

堤部の材料としては、ガラス、石英などの無機材料や、アクリル樹脂、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどの有機材料を例示できる。堤部の材料は、ウェルプレートの材料と同じものでもよいし、異なるものでもよい。

【0029】

堤部は、ウェルプレートとともに一体成型法で形成されてもよいし、ウェルプレートとは別個に製造した上で、堤部とウェルプレートとを接着させて形成させてもよい。また、堤部は着脱可能であってもよい。着脱可能な堤部であれば、本発明の細胞培養用ウェルプレートにおける堤部の数を、細胞の培養系の数に応じて適切に決定することができる。着脱可能な堤部を具備する本発明の細胞培養用ウェルプレートの一態様としては、例えば、堤部に雄部を設け、プレート上部に雌部を設けて、雄部と雌部とを嵌合させたものを挙げることができる。

【0030】

堤部の高さには特に制限が無いが、好適な高さとして、3～15mm、4～10mm、又は5～8mmの範囲を例示できる。

【0031】

本発明の観測方法は、本発明の細胞培養用ウェルプレートにおけるウェル内部の培養液中の細胞を観測する方法であって、液高が前記プレート上面を超えるまで培養液を加えた後に、前記細胞を観測することを特徴とする。追加する培養液は、ウェル内部の培養液と同じものを採用するのが好ましい。

【0032】

本発明の観測方法に因り、メスニカスの影響を排除又は軽減できるため、細胞の正しい大きさや形状などが正確に観測できる。

【0033】

本発明の観測方法においては、カメラなどの撮影手段を用いて観測することが好ましい。

また、本発明の観測方法を応用すれば、ウェル毎に、細胞の有無の判断、細胞が所望の大きさ及び形状に成長しているか否かの判断、又は、細胞が所望の数に増殖しているか否かの判断を行うことができる。さらに、本発明の観測方法を応用すれば、所望の細胞のみ選択して、ウェル外に搬送すること（以下、搬送手段ということがある。）もできる。加えて、上記判断を行う制御部及び上記搬送手段を備えた細胞搬送システム（以下、本発明の細胞搬送システムという。）を把握することもできる。

【0034】

本発明の細胞搬送システムの一態様を以下に例示する。

本発明の細胞培養用ウェルプレートを配置する配置部と、

本発明の細胞培養用ウェルプレートに培養液を追加する培養液導入部と、

ウェルの開口面側から細胞を観測する撮影手段と、

10

20

30

40

50

細胞の観測結果から、所望の細胞が存在するウェルを特定する判断手段を有する制御部と、

所望の細胞を吸着させ又は吸引して搬送する搬送手段と、を備えた細胞搬送システム。

【0035】

本発明の細胞搬送システムには、ウェル内部を照らす照明部が備えられているのが好ましい。制御部においては、細胞の観測結果から、ウェル毎に搬送手段の適切な位置を指示すること、例えば所望の細胞の中心に搬送手段を合致させることを指示することが好ましい。搬送手段は、ウェルプレートに対して、X軸、Y軸及びZ軸方向の3次元に移動可能である。搬送手段としては、シリンジ状やノズル状のものを例示できる。

【0036】

本発明の細胞搬送システムは、培養液導入部を介して本発明の細胞培養用ウェルプレートに培養液を追加することにより、メスニカスの影響を排除又は軽減した条件下で撮影手段を稼働できるため、細胞の正しい大きさや形状などを正確に観測することができる。そして、本発明の細胞搬送システムは、撮影手段による観測結果に基づき、制御部及び搬送手段が稼働するため、所望の条件を満足する細胞のみを選択的に且つ正確にウェル外部へ搬送することができる。

【実施例】

【0037】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。これら実施例は本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲はこれら実施例に限定されない。本発明の要旨を逸脱しない範囲において、当業者が行い得る変更、改良等を施した種々の形態にて実施することができる。

【0038】

(実施例1)

実施例1の細胞培養用ウェルプレート1の斜視図を図1に示す。

実施例1の細胞培養用ウェルプレート1には、長方形のプレート上面2に、円形の開口面を有するウェル3が96個具備されており、かつ、自立用の脚としての機能を有する側壁面5が、プレート上面2の長方形の4辺と辺を共有しつつ、プレート上面2に対して垂直方向に存在する。そして、実施例1の細胞培養用ウェルプレート1には、96個すべてのウェル3の開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない状態で、凸状の堤部4が一つ存在する。

【0039】

なお、ウェル3の形状は円柱状であり、そして、ウェル3の底の形状はU型の丸底形状である。また、実施例1の細胞培養用ウェルプレート1はポリスチレン製であり、プレート上面2、ウェル3、堤部4及び側壁面5のすべては、成形型を用いて、同時に一体成型されたものである。

【0040】

図2に、実施例1の細胞培養用ウェルプレート1を用いた、細胞培養状態の断面図を示す。各ウェル31~38には、培養液6中で細胞7が培養されている。培養液6と各ウェル31~38の側壁表面とが相互作用する結果、各ウェル内の培養液6の液面には、メスニカスが生じている。そのため、培養液6中の細胞7を、ウェルの開口面側から観測する場合には、メスニカスの影響で、細胞7の正しい大きさや形状を正確に把握できない。

【0041】

図3に、実施例1の細胞培養用ウェルプレート1を用いた、細胞観測状態の断面図を示す。図3は、図2の状態の各ウェル31~38に対して、培養液6の液高がプレート上面2を超えるまで培養液6を追加した状態である。培養液6で生じるメスニカスは堤部4との界面近傍に留まり、各ウェル31~38の開口面には及ばない。そのため、培養液6中の細胞7をウェルの開口面側から観測する場合において、メスニカスの影響が排除されて、細胞7の正しい大きさや形状が正確に把握できる。例えば、ウェル32、ウェル33、ウェル35、ウェル37及びウェル38で培養された細胞7は、所望の大きさ及び形状と

10

20

30

40

50

なっていることが確認できる。他方、ウェル 3 1 の細胞 7 は所望の大きさに及ばない 2 つの細胞からなること、ウェル 3 4 の細胞 7 は所望の大きさに及ばないこと、及び、ウェル 3 6 には細胞 7 が存在しないことが、明確に確認できる。

【 0 0 4 2 】

(実施例 2)

実施例 2 の細胞培養用ウェルプレート 1 の斜視図を図 4 に示す。

実施例 2 の細胞培養用ウェルプレート 1 には、長方形のプレート上面 2 に、円形の開口面を有するウェル 3 が 6 個具備されており、かつ、自立用の脚としての機能を有する側壁面 5 が、プレート上面 2 の長方形の 4 辺と辺を共有しつつ、プレート上面 2 に対して垂直方向に存在する。そして、実施例 2 の細胞培養用ウェルプレート 1 には、2 個のウェル 3 の開口面の周縁を囲いつつ、当該開口面と接しない状態で、凸状の第一堤部 4 1、凸状の第二堤部 4 2 及び凸状の第三堤部 4 3 が存在する。第一堤部 4 1 及び第二堤部 4 2 は互いに堤部の一部を共有しており、第二堤部 4 2 及び第三堤部 4 3 も互いに堤部の一部を共有している。

10

【 0 0 4 3 】

なお、ウェル 3 の形状は円柱状であり、そして、ウェル 3 の底の形状は平板状の平底形状である。かかる平底形状は、網膜細胞などの膜状の細胞の培養に適している。

【 0 0 4 4 】

また、実施例 2 の細胞培養用ウェルプレート 1 はポリプロピレン製であり、プレート上面 2、ウェル 3、堤部 4 1 ~ 4 3 及び側壁面 5 のすべては、成形型を用いて、同時に一体成型されたものである。

20

【 0 0 4 5 】

実施例 2 の細胞培養用ウェルプレート 1 は、3 つの堤部 4 1 ~ 4 3 を有するため、各堤部ごとに異なる培養系での細胞培養及び細胞観測を、コンタミネーションの心配をすることなく行うことができる。例えば、培養する細胞は同一の種類とし、培養液を別個のものとすることで、培養液の違いによる細胞の増殖の変化を、同一のウェルプレートを用いて観測できる。

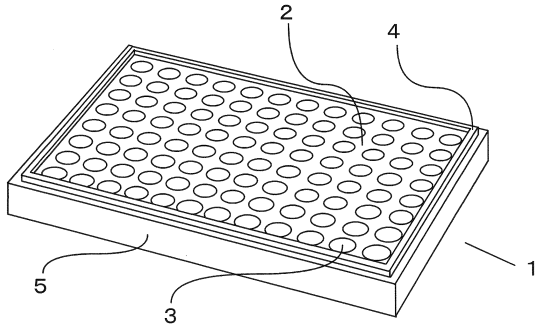
【 符号の説明 】

【 0 0 4 6 】

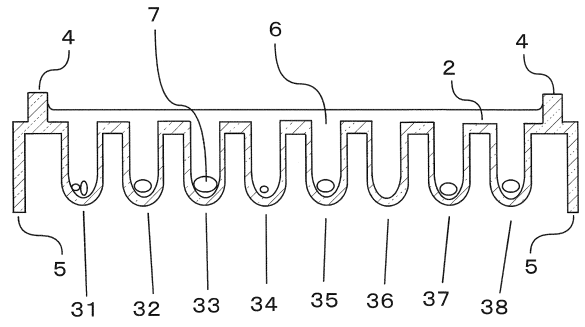
1 は細胞培養用ウェルプレート、2 はプレート上面、3、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8 はウェル、4、4 1、4 2、4 3 は堤部、5 は側壁面、6 は培養液、7 は細胞を示す。

30

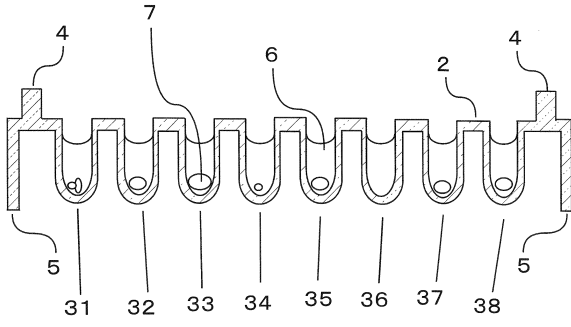
【図1】



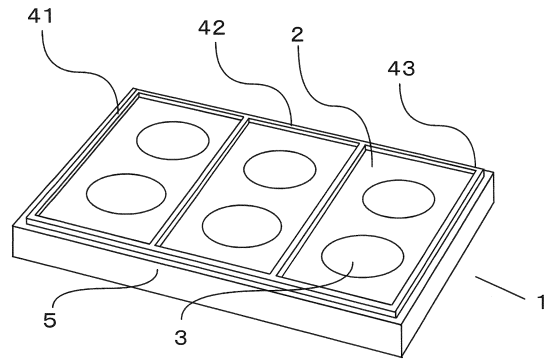
【図3】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

- (72)発明者 山下 泰弘
愛知県知立市山町茶碓山19番地 富士機械製造株式会社内
- (72)発明者 平野 篤規
愛知県知立市山町茶碓山19番地 富士機械製造株式会社内
- (72)発明者 矢頭 真也
愛知県知立市山町茶碓山19番地 富士機械製造株式会社内

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 特表2007-510429(JP,A)
特開昭62-051977(JP,A)
特開2008-152044(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C12M 1/00 - 3/10
 - C12Q 1/00 - 3/00
 - CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 - PubMed