(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7565033号
(P7565033)

(45)発行日　令和6年10月10日(2024.10.10)

(24)登録日　令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類
Ｃ１２Ｍ　3/00 (2006.01)

ＦＩ
Ｃ１２Ｍ　3/00　Ｚ

請求項の数　6　（全13頁）

(21)出願番号　特願2021-171186(P2021-171186)
(22)出願日　令和3年10月19日(2021.10.19)
(65)公開番号　特開2023-61281(P2023-61281A)
(43)公開日　令和5年5月1日(2023.5.1)
審査請求日　令和5年4月3日(2023.4.3)

(73)特許権者　597095957
株式会社アクアテック
大阪府大東市大野２丁目１番１３号
(73)特許権者　504132272
国立大学法人京都大学
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(74)代理人　100084375
弁理士　板谷 康夫
(74)代理人　100125221
弁理士　水田 愼一
(74)代理人　100142077
弁理士　板谷 真之
(72)発明者　佐藤 剛士
大阪府大東市大野２丁目１番１３号 株式会社アクアテック内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　培養液循環装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

複数のウェルが設けられたマルチウェルプレートにおいて、各々のウェルを密閉する密閉蓋と、

ウェルの密閉性を維持した状態で前記密閉蓋を貫通して設けられ、複数のウェル間で培養液を直列ループ状に循環させるための流路と、

前記流路の途中に設けられ培養液の吸い上げと送液をする１つの送液ポンプと、を備えたことを特徴とする培養液循環装置。

【請求項２】

前記密閉蓋は、円盤状に形成された円盤部と、前記円盤部の上端に設けられたフランジと、前記円盤部に周回され弾性部材から成るＯリングと、を有し、

前記フランジがウェルの上縁に当接するまで前記円盤部をウェルに嵌め込んだときに、前記Ｏリングが弾性変形してウェルの内壁に密着することで、ウェルの密閉性が確保されることを特徴とする請求項１に記載の培養液循環装置。

【請求項３】

前記密閉蓋は、前記円盤部が拡がる方向に直交して設けられた複数の貫通孔を有し、前記円盤部の上面を介して流路形成体に溶着され、

前記流路形成体は、共に平板状に形成された上方流路形成体及び下方流路形成体を互いに溶着して構成され、

前記下方流路形成体は、前記上方流路形成体に対向する面に前記貫通孔と連通した溝を

有し、
　前記流路は、前記貫通孔及び溝により構成されていることを特徴とする請求項２に記載の培養液循環装置。
【請求項４】
ウェル内にセルカルチャーインサートを更に有し、
　前記密閉蓋は、ウェル及びセルカルチャーインサートの両方を密閉し、
　前記流路は、ウェル及びセルカルチャーインサートの各々に対して独立に形成されていることを特徴とする請求項１乃至請求項３のいずれか一項に記載の培養液循環装置。
【請求項５】
前記密閉蓋は、ウェルを塞ぐようにしてウェルの上縁に固着された板材により構成されていることを特徴とする請求項１に記載の培養液循環装置。
【請求項６】
　前記流路は、前記密閉蓋を貫通して固着されたパイプと、前記パイプの上端に接続されたチューブと、により構成されていることを特徴とする請求項５に記載の培養液循環装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
　本発明は、複数のウェルが設けられたマルチウェルプレートにおいて、ウェル間で培養液を循環させる培養液循環装置に関する。
【背景技術】
【０００２】
　近年、培養した細胞や組織を基にした創薬研究が盛んになってきている。特に、ｉＰＳ細胞が創出されてからは組織や臓器の細胞が比較的容易に作製できるようになり、これらの組織や臓器を用いて薬剤等の効果や副作用が検証されている。従来、このような検証は、１つの組織や臓器を対象として行われてきたが、組織や臓器は、生体内において単独で機能しているのではなく、他の組織や臓器とコミュニケーションを取りながら機能している。そのため、１つの組織や臓器を検証対象とするだけでは、生体全体に対する影響を十分に理解することはできない。
【０００３】
　そのため、最近では、マイクロ流体デバイスを使用した「ｏｒｇａｎ　ｏｎ　ａ　ｃｈｉｐ」と呼ばれるチップ上に複数の組織や臓器を配置して、これら組織や臓器間でのコミュニケーションを可能とした上で薬剤等の効果を検証する技術が開発されている（例えば、特許文献１参照）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【文献】特表２０１９－５０５２１４号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
　しかしながら、上述したようなチップでは、組織や臓器の組み合わせ変更や流路変更の際、その都度マイクロチップの設計変更及び作製が必要となる。そのため、チップの汎用性が低く、高コスト化を引き起こし得る。
【０００６】
　また、組織や臓器を培養するための培養液は、二酸化炭素（CO_2）を放出しやすい性質を有しており、外気と接触するとCO_2を放出してアルカリ性化する。このような培養液のアルカリ性化は、組織や臓器の性状変化や死滅を引き起こしうる。そのため、組織や臓器の培養は、通常、CO_2濃度が５％に維持されたCO_2インキュベータやグローブボックス内においてCO_2を強制添加した状態で行う必要があり、これにより、実験操作に大きな制限がかかり、操作性が良いとは言えない。

【０００７】
本発明は、上記課題を解決するものであって、複数の組織や臓器間でのコミュニケーションを検証するにあたって、高い汎用性と低コスト化を実現すると共に、CO_2インキュベータやグローブボックスを不要として操作性を向上させることができる培養液循環装置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】
【０００８】
本発明の培養液循環装置は、複数のウェルが設けられたマルチウェルプレートにおいて、各々のウェルを密閉する密閉蓋と、ウェルの密閉性を維持した状態で前記密閉蓋を貫通して設けられ、複数のウェル間で培養液を直列ループ状に循環させるための流路と、前記流路の途中に設けられ培養液の吸い上げと送液をする１つの送液ポンプと、を備えたことを特徴とする。
【０００９】
前記密閉蓋は、円盤状に形成された円盤部と、前記円盤部の上端に設けられたフランジと、前記円盤部に周回され弾性部材から成るＯリングと、を有し、前記フランジがウェルの上縁に当接するまで前記円盤部をウェルに嵌め込んだときに、前記Ｏリングが弾性変形してウェルの内壁に密着することで、ウェルの密閉性が確保されることが好ましい。
【００１０】
前記密閉蓋は、前記円盤部が拡がる方向に直交して設けられた複数の貫通孔を有し、前記円盤部の上面を介して流路形成体に溶着され、前記流路形成体は、共に平板状に形成された上方流路形成体及び下方流路形成体を互いに溶着して構成され、前記下方流路形成体は、前記上方流路形成体に対向する面に前記貫通孔と連通した溝を有し、前記流路は、前記貫通孔及び溝により構成されていることが好ましい。
【００１２】
本発明の培養液循環装置は、ウェル内にセルカルチャーインサートを更に有し、前記密閉蓋は、ウェル及びセルカルチャーインサートの両方を密閉し、前記流路は、ウェル及びセルカルチャーインサートの各々に対して独立に形成されていることが好ましい。
【００１３】
前記密閉蓋は、ウェルを塞ぐようにしてウェルの上縁に固着された板材により構成されていることが好ましい。
【００１４】
前記流路は、前記密着蓋を貫通して固着されたパイプと、前記パイプの上端に接続されたチューブと、により構成されていることが好ましい。
【発明の効果】
【００１５】
本発明の培養液循環装置によれば、複数の組織や臓器間でのコミュニケーションを検証するにあたって、特殊なチップ等を必要とせず、市販のマルチウェルプレートを利用することができるので、高い汎用性と低コスト化を実現することができる。また、ウェルを密閉蓋により密閉することで、外気と接触することによる培養液からのCO_2放出が抑制されるので、CO_2インキュベータやグローブボックスを不要として操作性を向上させることができる。また、ウェル内の培養液の蒸発を抑制することができ、更に、複数サンプル間のコンタミネーションを防ぐことができる。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】本発明の実施形態に係る培養液循環装置の側断面図。
【図２】上記培養液循環装置において更にセルカルチャーインサートを設置したウェルの側断面図。
【図３】本発明の第１実施例に係る培養液循環装置の側断面図。
【図４】本発明の第２実施例に係る培養液循環装置を利用した密閉型細胞実験装置の斜視図。

【図５】上記第２実施例に係る培養液循環装置の分解斜視図。
【図６】（ａ）は、上記第２実施例に係る培養液循環装置の側断面図、（ｂ）は、（ａ）のＩ－Ｉ線断面図。
【図７】（ａ）は、上記第２実施例に係る培養液循環装置を構成する密閉蓋の分解斜視図、（ｂ）は、同密閉蓋の斜視図、（ｃ）は、同密閉蓋の変形例を示す斜視図。
【図８】（ａ）（ｂ）は、上記密閉蓋のウェルへの取り付けを示す側断面図。
【図９】上記第２実施例に係る培養液循環装置を構成する送液ポンプの分解斜視図。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
本発明の実施形態に係る培養液循環装置について図１及び図２を参照して説明する。図１に示すように、培養液循環装置１は、複数のウェルWが設けられたマルチウェルプレートＰにおいて、各々のウェルWを密閉する密閉蓋２と、ウェルWの密閉性を維持した状態で密閉蓋２を貫通して設けられ複数のウェルW間で培養液Ｍを直列ループ状に循環させるための流路３と、流路３の途中に設けられ培養液Ｍを送液する１つの送液ポンプ４と、を備える。流路３及び送液ポンプ４は、共に高い密閉性及びガスバリア性を有し、培養液Ｍが外気と接触しないように構成されている。
【００１８】
また、図例では、培養液循環装置１は、マルチウェルプレートＰと送液ポンプ４との間の流路３に、培養液Ｍのリザーバ５を更に備える。リザーバ５は、ウェルWよりも大容量の培養液Ｍを貯留することができる試薬瓶等により構成され、密閉蓋５１により密閉される。流路３は、リザーバ５の密閉性を維持した状態で、密閉蓋５１を貫通して設けられている。個々のウェルWは、例えば、有底の略円筒形状の容器であり、上面開口に密閉蓋２が装着される。
【００１９】
密閉蓋２は、透明な材料により構成され、密閉蓋２をウェルWに取り付けることで密閉蓋２とウェルWの内壁とにより囲まれた気密層Ａが形成される。ウェルWは図例では４つ設けられ、以下の説明では図１の左側から順にウェルＷ１、Ｗ２、Ｗ３、Ｗ４とする。流路３は、培養液Ｍが流通可能な管状に形成され、ウェルＷ１、Ｗ２を互いに接続する流路３ａと、ウェルＷ２、Ｗ３を互いに接続する流路３ｂと、ウェルＷ３、Ｗ４を互いに接続する流路３ｃと、ウェルＷ４とリザーバ５とを互いに接続する流路３ｄと、送液ポンプ４を介してリザーバ５とウェルＷ１とを互いに接続する流路３ｅと、により構成されている。
【００２０】
流路３ａは、一端にウェルＷ１から培養液Ｍを排出するためのアウトレット３１を有し、他端にウェルＷ２に培養液Ｍを供給するためのインレット３２を有する。流路３ｂ、３ｃも、流路３ａと同様に構成されている。流路３ｄは、一端にウェルＷ４から培養液Ｍを排出するためのアウトレット３１を有し、他端にリザーバ５に培養液Ｍを供給するためのインレット３２を有する。流路３ｅは、一端にリザーバ５から培養液Ｍを排出するためのアウトレット３１を有し、他端にウェルＷ１に培養液Ｍを供給するためのインレット３２を有する。アウトレット３１は、インレット３２よりも下方に配置されている。送液ポンプ４は、一方向に培養液Ｍを送液し、図例ではリザーバ５からウェルＷ１に向かう方向に培養液Ｍを送液する。
【００２１】
次に、培養液循環装置１の使用方法について説明する。ウェルＷ１－Ｗ４にはそれぞれ互いに異なる細胞を含んだ培養液Ｍが接種され、例えば、ウェルＷ１には小腸細胞、ウェルＷ２には肝細胞、ウェルＷ３には心筋細胞、ウェルＷ４には脳細胞を含んだ培養液Ｍが接種される。培養液Ｍを接種した後、各々のウェルWは、密閉蓋２により密閉される。また、リザーバ５には細胞を含まない培養液Ｍ（培地）が加えられ、密閉蓋５１により密閉される。このとき、各ウェルW及びリザーバ５において、アウトレット３１が培養液Ｍに浸るようにすることが好ましい。
【００２２】

この状態で送液ポンプ４を動作させると、まず、送液ポンプ４が流路３ｅのアウトレット３１からリザーバ５の培養液Ｍを吸い上げ、リザーバ５の培養液Ｍの量が減る。そうすると、リザーバ５は密閉蓋５１により密閉されているのでリザーバ５の内圧が低下し、この内圧の低下を補うためにウェルＷ４の培養液Ｍが流路３ｄを介してリザーバ５に流れ込む。そうすると今度は、ウェルＷ４の培養液Ｍの量が減ることによって、密閉蓋２により密閉されたウェルＷ４の内圧が低下し、この内圧の低下を補うためにウェルＷ３の培養液Ｍが流路３ｃを介してウェルＷ４に流れ込む。以下、同様にして、ウェルＷ３にウェルＷ２の培養液Ｍが流路３ｂを介して流れ込み、ウェルＷ２にウェルＷ１の培養液Ｍが流路３ａを介して流れ込む。ウェルＷ１には、リザーバ５から吸い上げた培養液Ｍが、流路３ｅを介して送液ポンプ４により送液されて流れ込む。

【００２３】

このように、各々のウェルW及びリザーバ５を密閉状態とすることで、送液ポンプ４からの吸引圧力が各ウェルW及びリザーバ５に伝達され、直列ループ状に接続されたウェルWとリザーバ５に均等な吸引圧が生まれる。これにより、送液ポンプ４から送液された培養液Ｍは、ウェルＷ１－Ｗ４及びリザーバ５を介して送液ポンプ４に戻って循環することになる。このとき、ウェルＷ１－Ｗ４及びリザーバ５において培養液Ｍの液面レベルは、アウトレット３１の高さに維持される。

【００２４】

このように培養液Ｍを循環させることで、例えば、ウェルＷ１に薬剤を加えたとすると、その薬剤は他のウェルＷ２－Ｗ４にも行き渡り、全てのウェルＷ１－Ｗ４において薬剤の影響を調べることができる。このとき、仮に薬剤に応答して特定のウェルWの細胞からホルモンや生理活性物質が分泌されたとすると、そのようなホルモンや生理活性物質も他のウェルWに広がることになるので、生体内における異なる組織や臓器間のコミュニケーションを模倣することができる。

【００２５】

上記のように構成された培養液循環装置１によれば、複数の組織や臓器間でのコミュニケーションを検証するにあたって、市販のマルチウェルプレートＰを利用することができる。そのため、特殊なマイクロ流体デバイスチップや特別設計のマルチウェルプレート等を用意する必要が無く、高い汎用性及び低コスト化を実現することができる。また、１つの送液ポンプ４を用いて培養液Ｍを循環させるので、例えば、ウェル毎に送液ポンプを配置した従来技術に比べて構成が簡単になり、設置及びメンテナンスが容易になる。更に、密閉蓋２が透明な材料により構成されているので、密閉蓋２を通して上方から細胞を顕微鏡観察することができる。

【００２６】

また、ウェルWを密閉蓋２により密閉し、流路３及び送液ポンプ４も培養液Ｍが外気と接触しないように構成されているので、外気と接触することによる培養液ＭからのCO_2放出が抑制される。そのため、培養液Ｍのアルカリ性化が抑えられるので、CO_2インキュベータやグローブボックスを用いた培養液ＭへのCO_2の強制添加が不要となる。これにより、通常大気中で細胞を培養しても培養液Ｍのアルカリ性化が起こらないと共に、密閉により培養液の蒸発を抑制できるので、実験の正確性と操作性を大きく向上させることができる。

【００２７】

なお、図２に示すように、ウェルW内に更にセルカルチャーインサート（内ウェル）Ｃを設けてもよい。セルカルチャーインサートＣは、例えば、半透膜により構成された底面Ｃ１と、プラスチックにより構成された周壁Ｃ２と、を有し、上方が開放したコップ状に形成される。底面Ｃ１は、例えば、細胞は通過させないが、薬剤、ホルモン、生理活性物質等の小分子は通過させる大きさの孔を有する。

【００２８】

セルカルチャーインサートＣを設けた場合、密閉蓋２は、ウェルW及びセルカルチャーインサートＣの両方を密閉する。これにより、密閉蓋２とウェルWの内壁とセルカルチャ

ーインサートＣの外壁とにより囲まれた第１気密層Ａ１と、密閉蓋２とセルカルチャーインサートＣの内壁とにより囲まれた第２気密層Ａ２と、が形成される。流路３は、図１で説明したものと同様のものが、ウェルW及びセルカルチャーインサートＣの各々に対して独立に形成される。

【００２９】

このようなセルカルチャーインサートＣを設けることで、例えば、第１気密層Ａ１と第２気密層Ａ２にそれぞれ異なる細胞を接種し、それら細胞間のコミュニケーションを可能としながら培養液Ｍを循環させることができる。

【００３０】

次に、本発明の第１実施例に係る培養液循環装置について図３を参照して説明する。培養液循環装置１ａは、上述した培養液循環装置１において密閉蓋２及び流路３を具現化したものである。

【００３１】

培養液循環装置１ａの密閉蓋２は、複数のウェルWを一括して塞ぐようにしてウェルWの上縁に固着された透明な板材により構成され、例えば、ウェルWの上縁に両面テープで固着された透明アクリル板により構成される。また、流路３は、密着蓋２を上下方向に貫通して固着されたパイプ３３と、パイプ３３の上端に接続されたチューブ３４と、により構成されている。パイプ３３及びチューブ３４は、例えば、それぞれ銅パイプ及びＰＴＦＥチューブにより構成される。パイプ３３は、例えば、紫外線硬化接着剤により密着蓋２に固着される。

【００３２】

次に、本発明の第２実施例に係る培養液循環装置について図４乃至図９を参照して説明する。図４に示す密閉型細胞実験装置において、培養液循環装置１ｂは、複数の密閉蓋２、流路３及び送液ポンプ４のペリスタポンプ（登録商標）４１が一体化されたモジュール構造となっている。図例では、４行６列の２４穴プレートＰにおいて、行毎に１つの培養液循環装置１ｂが配置され、合計４つまでの培養液循環装置１ｂが同時に配置可能となっている。

【００３３】

２４穴プレートＰは、透明ガラスによって矩形平板状に形成された基盤６の上に載置されている。基盤６は、例えば、透明ガラスヒータ（不図示）を内蔵し、２４穴プレートＰを３７度の恒温状態に保つ。これにより、恒温槽を不要とすることができると共に、下方から倒立顕微鏡等による細胞のモニタ観測が可能となる。

【００３４】

基盤６の側方には、ペリスタポンプ４１を駆動するための駆動部４２が配置されている。駆動部４２は、ペリスタポンプ４１と容易に分離可能とされ、図例では、２４穴プレートＰの１、３行目に配置される培養液循環装置１ｂの駆動部４２が２４穴プレートＰの左側に配置され、２４穴プレートＰの２、４行目に配置される培養液循環装置１ｂの駆動部４２が２４穴プレートＰの右側に配置されている。駆動部４２がペリスタポンプ４１と分離可能となっているので、分離培養液循環装置１ｂのディスポーザブル性を高めることができる。

【００３５】

図５及び図６に示すように、培養液循環装置１ｂは、２４穴プレートＰの１行を成すウェルW毎に設けられた複数の密閉蓋２と、これら密閉蓋２を一括して保持すると共に流路が形成された流路形成体７と、流路形成体７の流路とペリスタポンプ４１とを互いに接続する接続管８と、を備える。接続管８は、流路形成体７の流路からペリスタポンプ４１へと培養液を送液するための帰液管８１と、ペリスタポンプ４１から流路形成体７の流路へと培養液を送液するための出液管８２と、により構成されている。

【００３６】

図７及び図８に示すように、密閉蓋２は、円盤状に形成された第１円盤部２１と、第１円盤部２１の上端に設けられたフランジ２２と、第１円盤部２２に周回され弾性部材から

成るＯリング２３と、を有する。また、密閉蓋２は、第１円盤部２１と同軸で第１円盤部２１の下面に取り付けられた第２円盤部２４と、第２円盤部２４に周回され弾性部材から成るＯリング２５と、を有する。

【００３７】

第２円盤部２４の直径は、第１円盤部２１の直径よりも小さく、有底円筒状に形成されたセルカルチャーインサートＣの内径と略等しくなるように構成されている。第２円盤部２４をセルカルチャーインサートＣの上部開口に嵌め込むようにして密閉蓋２をセルカルチャーインサートＣに取り付けると、Ｏリング２５が弾性変形してセルカルチャーインサートＣの内壁に密着する。これにより、密着蓋２がセルカルチャーインサートＣに対して着脱可能に取り付けられると共に、セルカルチャーインサートＣの密閉性が確保されて第２気密層Ａ２が形成される（図８（ｂ）参照）。

【００３８】

また、密閉蓋２は、第１円盤部２１が拡がる方向に直交して設けられ第１円盤部２１のみを貫通した一対の第１貫通孔２６ａ、２６ｂと、第１貫通孔２６ａ、２６ｂと同方向に伸び第１円盤部２１及び第２円盤部２４の両方を貫通した一対の第２貫通孔２７ａ、２７ｂと、を有する。これら貫通孔２６ａ、２６ｂ、２７ａ、２７ｂは、後述するように流路３の一部を成し、貫通孔２６ａ、２７ａの下端がインレット３２として機能し、貫通孔２６ｂ、２７ｂの下端がアウトレット３１として機能する。

【００３９】

更に、密閉蓋２は、第１貫通孔２６ａ、２６ｂと連続して第１円盤部２１の上面から円筒状に突出した第１円筒部２８ａ、２８ｂと、第２貫通孔２７ａ、２７ｂと連続して第１円盤部２１の上面から円筒状に突出した第２円筒部２９ａ、２９ｂと、を有する。なお、セルカルチャーインサートＣを利用しない場合には、第１貫通孔２６ａ、２６ｂ及び第１円筒部２８ａ、２８ｂのみを設け、第２貫通孔２７ａ、２７ｂ及び第２円筒部２９ａ、２９ｂを設けない密閉蓋２としてもよい（図７（ｃ）参照）。

【００４０】

第１円盤部２１の直径は、嵌め合うためにウェルＷの内径より、少し小さくなっている（図８（ａ）（ｂ）参照）。密閉蓋２をウェルＷに取り付けるには、フランジ２２がウェルＷの上縁に当接するまで第１円盤部２１及び第２円盤部２４をウェルＷに嵌め込む。そうすると、Ｏリング２３が弾性変形してウェルＷの内壁に密着することで、密着蓋２がウェルＷに対して着脱可能に取り付けられると共に、ウェルＷの密閉性が確保されて第１気密層Ａ１が形成される（図８（ｂ）参照）。なお、図例では第２円盤部２４にセルカルチャーインサートＣが取り付けられているが、セルカルチャーインサートＣが取り付けられていない場合も、密着蓋２のウェルＷへの取り付け操作は同じである。

【００４１】

上記のように構成された密閉蓋２は、図５及び図６に示したように、２４穴プレートＰにおいて２行目の左から１－４番目及び６番目のウェルＷに取り付けられるように５つ設けられる。なお、ここでは、左から順に密閉蓋２ａ、２ｂ、２ｃ、２ｄ、２ｅとする。密閉蓋２ａ、２ｂ、２ｃ、２ｅは、それぞれ第１円筒部２８ａ、２８ｂのみを有し、密閉蓋２ｄは、第１円筒部２８ａ、２８ｂ及び第２円筒部２９ａ、２９ｂの両方を有する（図５参照）。

【００４２】

流路形成体７は、密閉蓋２ａ－２ｅの並びに沿って伸びる長尺な矩形平板状に形成され、共に平板状に形成された上方流路形成体７１及び下方流路形成体７２により構成されている。上方流路形成体７１は、帰液管８１の流路形成体７側の端部８１ａが嵌まり込み上下方向に上方流路形成体７１を貫通した孔７１ａと、出液管８２の流路形成体７側の端部８２ａが嵌まり込み上下方向に上方流路形成体７１を貫通した孔７１ｂと、を有する。帰液管８１のペリスタポンプ４１側の端部８１ｂは、流路形成体７の流路からペリスタポンプ４１に培養液を帰液するための帰液口４３に接続され、出液管８２のペリスタポンプ４１側の端部８２ｂは、ペリスタポンプ４１から流路形成体７の流路に培養液を出液するた

めの出液口４４に接続されている。

【００４３】

下方流路形成体７２は、密着蓋２ａの第１円筒部２８ａ、２８ｂが嵌まり込み上下方向に下方流路形成体７２を貫通した孔７２ａ、７２ｂを有する。同様に、下方流路形成体７２は、密着蓋２ｂの第１円筒部２８ａ、２８ｂが嵌まり込む孔７２ｃ、７２ｄと、密着蓋２ｃの第１円筒部２８ａ、２８ｂが嵌まり込む孔７２ｅ、７２ｆと、密着蓋２ｄの第１円筒部２８ａ、２８ｂ及び第２円筒部２９ａ、２９ｂが嵌まり込む孔７２ｇ、７２ｈ、７２ｉ、７２ｊと、密着蓋２ｅの第１円筒部２８ａ、２８ｂが嵌まり込む孔７２ｋ、７２ｌと、を有する。

【００４４】

また、下方流路形成体７２は、上方流路形成体７１に対向する面（図例では上面）に、所定のパターンで孔７３ａ－７３ｌを互いに接続する溝７３を有する。溝７３は、図例では孔７２ｂ、７２ｃを互いに接続する溝７３ａと、孔７２ｄ、７２ｅを互いに接続する溝７３ｂと、孔７２ｆ、７２ｇを互いに接続する溝７３ｃと、孔７２ｈから上方流路形成体７１の孔７１ａの直下位置７２ｍまで伸びる溝７３ｄと、上方流路形成体７１の孔７１ｂの直下位置７２ｎから孔７２ａまで伸びる溝７３ｅと、により構成されている。孔７２ｉ－ｌは、図例では溝７３の形成に関与していない。

【００４５】

密閉蓋２ａ－２ｅは、各々の第１円筒部２８ａ、２８ｂ及び第２円筒部２９ａ、２９ｂが孔７３ａ－ｌに嵌まり込んだ状態で、第１円盤部２１の上面を介して下方流路形成体７２の下面に密閉溶着される。また、上方流路形成体７１と下方流路形成体７２とは、溝７３を埋めないようにして互いに密閉溶着されることで、溝７３は、その上方を上方流路形成体７１により塞がれた管状となる。これらの溶着により、密閉蓋２ａ－２ｅの第１円筒部２８ａ、２８ｂと溝７３とは、互いに連通して流路３を構成する。なお、このような密閉溶着は、例えば、高周波溶着（高周波誘電加熱方式）により行われる。

【００４６】

高周波溶着は、電子レンジに使用される波長に近い電磁波（４０ＭＨｚ）を電極間に印加する事で、誘電率の高い材料が加熱される現象を利用した溶着方法である。電極間に電界と磁界が速い周期で交番しながら伝わると、電極間に挟まれた物質（誘電体）内部で電気的な平衡状態がひずみ、電荷の分離が起こる。高周波による早い周期になると、それぞれの分極が電界の変化に追いつけない異常分散という急激な変化が起こり、誘電体を構成する各分子が回転、衝突、振動、摩擦等の激しい運動を起こして、そのエネルギーが熱となり、誘電体の内部発熱が起こる。この現象を利用して、被溶着材料の間に誘電率の高い材料をバインダーとして挟み、電極間で溶着物に対して、圧力を加えて挟んだ状態で高周波を印加して発熱溶解させ、その後、圧力を加えたまま高周波を停止して冷却を行なうことで、バインダーが固着し、溶着が完了する。この高周波溶着によれば、溝７３をバインダーで塞ぐこと無く、上方流路形成体７１と下方流路形成体７２とを接合することができる。

【００４７】

上記のように構成することで、送液ポンプ４の駆動により培養液が、送液ポンプ４－出液管８２－溝７３ｅ－密閉蓋２ａの第１貫通孔２６ａ－密閉蓋２ａの第１貫通孔２６ｂ－溝７３ａ－密閉蓋２ｂの第１貫通孔２６ａ－密閉蓋２ｂの第１貫通孔２６ｂ－溝７３ｂ－密閉蓋２ｃの第１貫通孔２６ａ－密閉蓋２ｃの第１貫通孔２６ｂ－溝７３ｃ－密閉蓋２ｄの第１貫通孔２６ａ－密閉蓋２ｄの第１貫通孔２６ｂ－溝７３ｄ－帰液管８１を経て送液ポンプ４に戻って循環する。

【００４８】

図９に示すように、送液ポンプ４は、磁力により回転駆動されるペリスタポンプ４１と、ペリスタポンプ４１を非接触で回転駆動するための磁石を有する駆動部４２と、ペリスタポンプ４１を構成する軟質性チューブ（不図示）を覆って軟質性チューブを外気から遮断する外殻体４５と、を有する。外殻体４５は、例えば、ガスバリア性の高い樹脂により

構成され、溶着に依ってペリスタポンプ４１が構成される。

【００４９】

このような外殻体４５を設けることで、軟質性チューブのガスバリア性が低い場合であっても、軟質性チューブを流れる培養液と外気との接触を抑制し、培養液からのCO_2放出を抑えることができる。なお、外殻体４５とペリスタポンプ４１との間の隙間は、外気の混入を更に抑制するために真空とされてもよいし、窒素やアルゴン等の不活性ガス又は液体で満たされてもよい。

【００５０】

なお、本発明は、上記実施形態に限らず、種々の変形が可能である。上記の第１実施例及び第２実施例は、いずれも市販のマルチウェルプレートＰを利用することができ、第２実施例では、流路形成体７を専用品として用いているが、１つのマルチウェルプレートＰにおいて、第１実施例と第２実施例とを両方用いることもできる。また、図２に示した密閉蓋２をより具体化したものが、図７に示した密閉蓋２であり、図１に示した培養液循環装置１の構成例において、より具体化された密閉蓋２が適用され得ることは、言うまでもない。

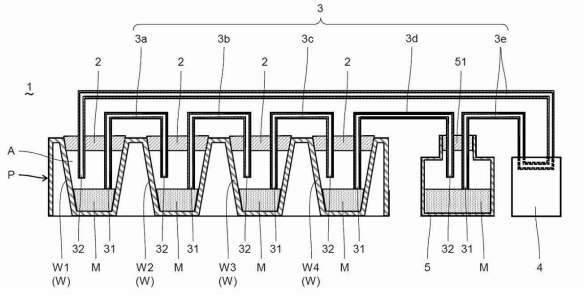
【符号の説明】

【００５１】

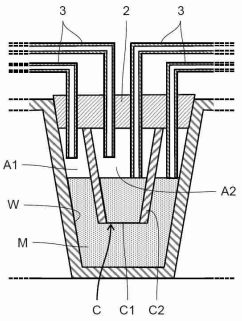
１、１ａ、１ｂ　培養液循環装置
２、２ａ－２ｅ　密閉蓋
２１　（第１）円盤部
２２　フランジ
２３　Ｏリング
２６ａ、２６ｂ　（第１）貫通孔
２７ａ、２７ｂ　（第２）貫通孔
３、３ａ－３ｅ　流路
３３　パイプ
３４　チューブ
４　送液ポンプ
４１　ペリスタポンプ
４５　外殻体
７　流路形成体
７１　上方流路形成体
７２　下方流路形成体
７３、７３ａ－７３ｅ　溝
Ｃ　セルカルチャーインサート
Ｐ　マルチウェルプレート
Ｗ、Ｗ１－Ｗ４　ウェル

【図面】

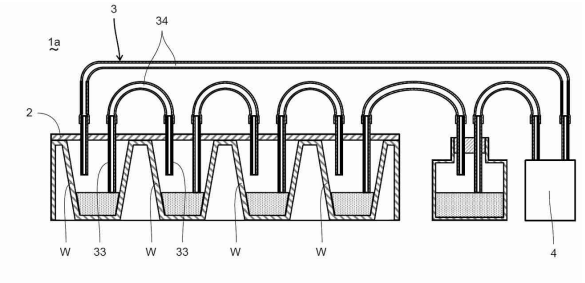
【図１】


3
3a
3b
3c
3d
3e
2
51
1
A
P
32
31
W1
(W)
M
W2
W3
W4
5
4

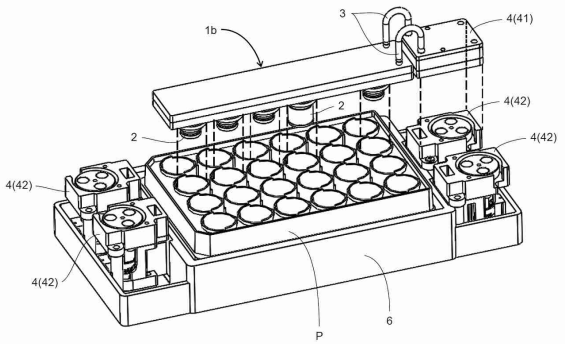
【図２】


3
2
A1
A2
W
M
C
C1
C2

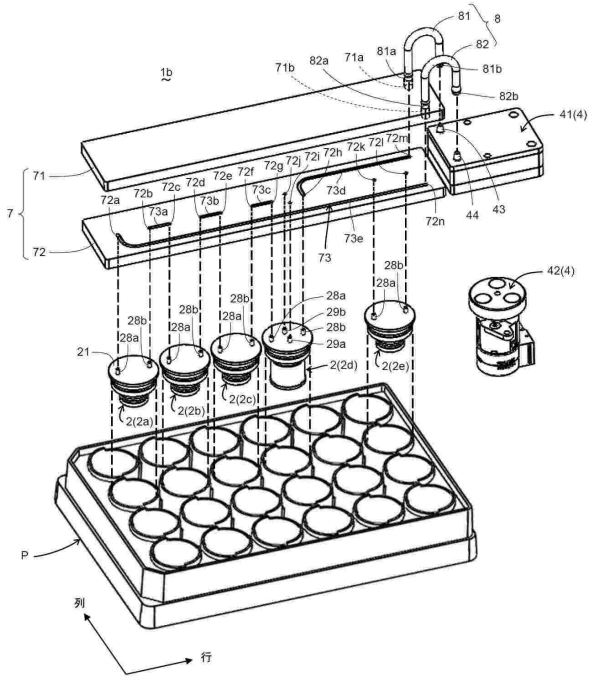
【図３】


3
34
1a
2
W
33
4

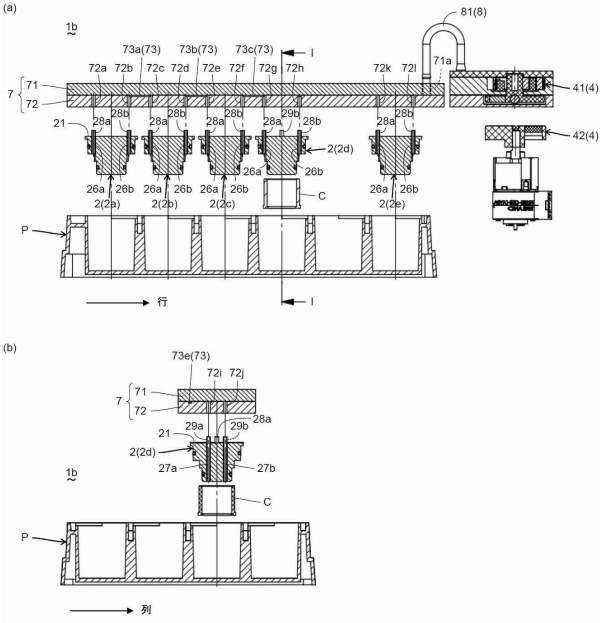
【図４】


3
4(41)
1b
4(42)
2
P
6

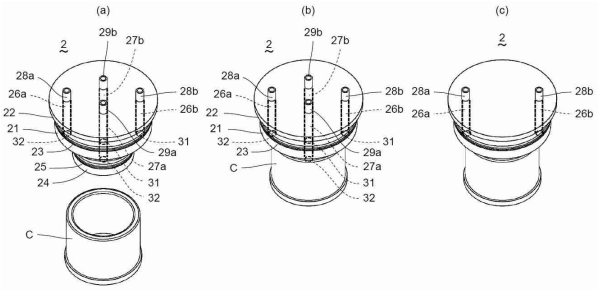
【図５】


1b
81
8
82
81b
82b
71b
82a
71a
81a
41(4)
71
72
7
72a
72b
72c
72d
72e
72f
73c
72g
72j
72h
72k
72l
72m
73a
73b
73d
73e
73
72n
44
43
42(4)
28b
28a
29b
29a
21
2(2d)
2(2e)
2(2a)
2(2b)
2(2c)
P
列
行

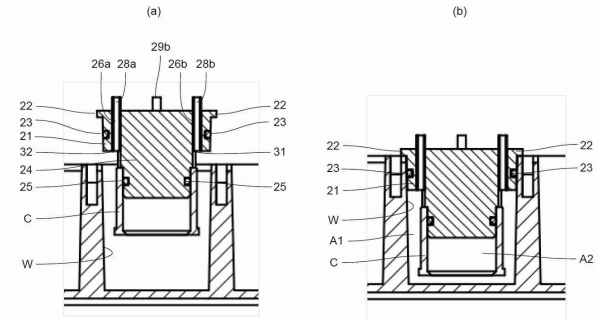
【図６】


(a)
1b
81(8)
73a(73)
73b(73)
73c(73)
I
72a
72b
72c
72d
72e
72f
72g
72h
72k
72l
71a
41(4)
42(4)
71
72
7
21
28a
28b
29b
2(2d)
26a
26b
C
2(2a)
2(2b)
2(2c)
2(2e)
P
行
(b)
73e(73)
72i
72j
29a
27a
27b
列

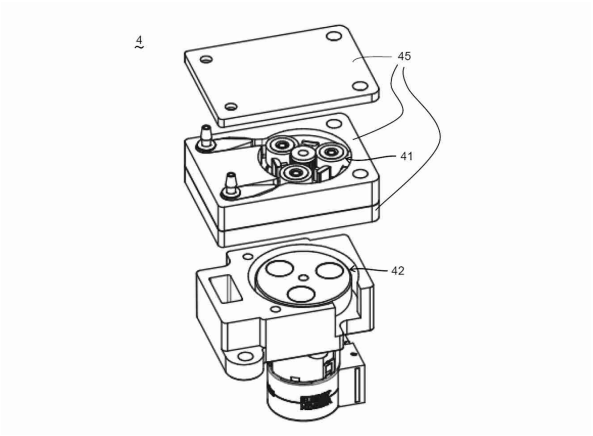
【図７】


(a)
(b)
(c)
2
29b
27b
28a
28b
26a
26b
22
21
32
23
31
29a
25
27a
24
C

【図８】


(a)
(b)
29b
26a
28a
26b
28b
22
23
21
32
31
24
25
C
W
A1
A2

【図９】



フロントページの続き

(72)発明者　中本 浩
大阪府大東市大野２丁目１番１３号 株式会社アクアテック内
(72)発明者　井上 広昭
大阪府大東市大野２丁目１番１３号 株式会社アクアテック内
(72)発明者　▲高▼嶋 誠
大阪府大東市大野２丁目１番１３号 株式会社アクアテック内
(72)発明者　亀井 謙一郎
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(72)発明者　今村 聡
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(72)発明者　吉川 あゆみ
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
審査官　小倉 梢
(56)参考文献　米国特許出願公開第２０２１／００５５２８３（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０２１／１６６２２７（WO，Ａ１）
特表２００６－５２４３２２（ＪＰ，Ａ）
特表２０２２－５０１００３（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　１／００ － ３／１０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）