

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

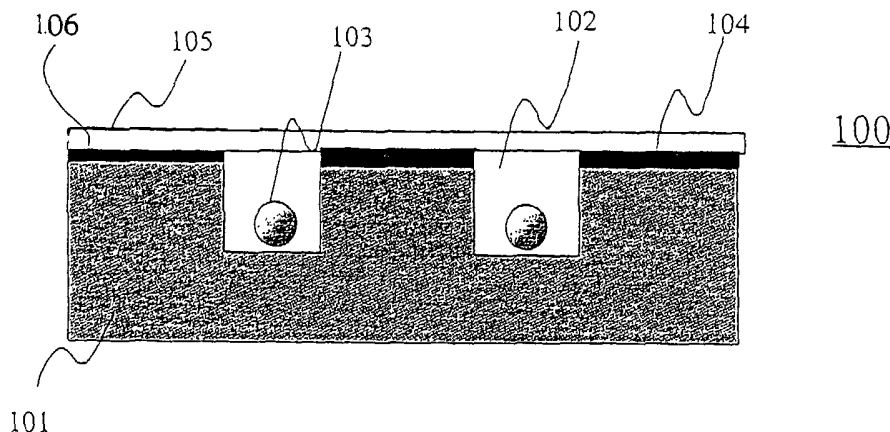
(10) 国際公開番号
WO 2004/018618 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 3/00 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010763 (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 安田 賢二 (YASUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒135-0052 東京都 江東区 潮見 2-8-1 4-1 0 1 4 Tokyo (JP).
(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003) (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 6 丁目 11 番 1 号 スリーエフ南青山ビルディング 7F Tokyo (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, US.
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願 2002-245899 2002 年 8 月 26 日 (26.08.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: CELL-CULTIVATION MICROCHAMBER WITH SEMIPERMEABLE MEMBRANE

(54) 発明の名称: 半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー



(57) Abstract: On a substrate (101), which does not absorb at least a light having a specific wavelength within the visible region, is transparent, and has plural cavities arranged therein as incubators (102) in each of which at least a single cell can be cultured, a thin film (106) which makes a silane coupling is provided, and the surface of the thin film (106) is covered with a semipermeable membrane (105) via a binding biosubstance to form a microchamber (100). A plastic, a resin or another arbitrary material which is capable of constituting a substrate can be used for the microchamber, and such a cell-cultivation microchamber can be simply and easily manufactured at a low cost.

(57) 要約: 少なくとも特定の可視領域の波長の光に対して吸収を持たず、透明性であって、少なくとも1細胞単位での細胞培養が可能とされ穴が培養容器102として複数配置された基板101上に、シランカップリングする薄膜106が配設され、この薄膜106の表面には結合性生体物質を介して半透膜105が被覆されているマイクロチャンバー100とし、プラスチックや樹脂やその他の基板を構成できる任意の素材を用いることができ、しかも簡便に、安価に製造することのできる細胞培養マイクロチャンバーとする。



WO 2004/018618 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー

技術分野

この出願の本発明は、微生物や細胞を用いたバイオテクノロジーの研究分野において、特定の細胞の状態を顕微鏡観察しながら、1細胞単位で培養するための細胞培養マイクロチャンバーに関するものである。

背景技術

従来の生物学、医学、薬学の分野では、細胞の状態の変化、あるいは細胞の薬物等に対する応答を観察するのに、細胞集団の値の平均値をあたかも一細胞の特性であるかの様に観察してきた。しかし、実際には細胞は集団の中で細胞周期が同調しているものはまれであり、各々の細胞が異なった周期でタンパク質を発現している。これらの問題を解決するべく、この出願の発明者らは、新たに特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養し、これを観察し、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御すること、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察することを特願2000-356827の発明として提案した。

この発明で提案したマイクロチャンバーは、ガラス微細加工技術等を用いてマイクロチャンバーの形状を作成し、その形状を利用して細胞を培養することを可能としている。

しかしながら、このマイクロチャンバの場合には、基板の素材表面にビオチンあるいはアビジンなどの生体物質を固定するためには、アミノ基、カルボキシル基、SH基などの反応残基を持つ基板素材あるいは、ガラスやシリコン基板のようなシラノール基と共有結合する素材を用いる必要があった。また上記基板素材は、その表面に加工を施すため

に、露光やエッチング等の複数の工程が必要であり、製作単価が高くなるという問題があった。このようなことから、これまでのマイクロチャンバーの構成においては基板素材の選択には制約があり、加工プロセスも面倒なものとなっていた。

そこで、この出願の発明は、これまでの発明者らの検討を踏まえ、1細胞単位での細胞培養を可能とするマイクロチャンバーについて、プラスチックや樹脂やその他の基板を構成できる任意の素材を用いることができ、しかも簡便に、安価に製造することのできる、新しい細胞培養マイクロチャンバーを提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、少なくとも特定の可視領域の波長の光に対して吸収を持たず、透明性であって、少なくとも1細胞単位での細胞培養が可能とされる培養容器としての穴が複数配置された基板上に、シランカップリングする薄膜が配設され、この薄膜の表面には結合性生体物質を介して半透膜が被覆されていることを特徴とする半透膜付き細胞培養マイクロチャンバーを提供する。

また、この出願の発明は、第2には、前記基板の融点は90℃以上400℃未満であるマイクロチャンバーを、第3には、前記薄膜の厚さは、20オングストローム以上であるマイクロチャンバーを、第4には、薄膜の素材が、シリコン、塩化シリコン、クロム、アルミニウム、鉄、およびチタンのうちの少なくとも1種であるマイクロチャンバーを、第5には、前記の生体物質が、アピジンとビオチンであるマイクロチャンバーを提供する。

そして、より具体的には、この出願の発明においては、たとえば、マイクロチャンバを構成する基板表面にシラノール基と共有結合する素材の前記薄膜を配設し、片端にシラノール基を持ち、他端にアミノ基あるいはカルボキシル基あるいはSH基を持つ二価性試薬等によって上

記薄膜の表面にアミノ基あるいはカルボキシル基あるいはS H基を導入する。また、アミノ基あるいはカルボキシル基あるいはS H基を導入した表面にビオチンあるいはアビジン等の他の生体物質と強く結合する生体物質を固定する。そして、この生体物質と強く結合するように別途生体物質で修飾した半透膜を固定する。

このようにして被覆配設された半透膜は、培養液の交換を行うことを可能としている。

また、この出願の発明では、基板素材として、たとえば100℃～150℃程度の温度で変形する素材を用いることで、鋳型を用いて簡便に安価にマイクロチャンバーを製作する。

図面の簡単な説明

図1は、この出願の発明の基本構成の一例を示す模式図である。

図2は、図1で示した培養マイクロチャンバーの作成手順を示す模式図である。

なお、図中の符号は次のものを示す。

- 100 マイクロチャンバー
- 101、201 基板
- 102、204 細胞培養容器
- 103 細胞
- 104、202 薄膜
- 105 半透膜
- 203 鋳型

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

まず、この本発明の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバーの基本構

成の一例を図1の実施例を用いて説明する。この発明の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー100は、光学的に透明な基板101に複数の細胞培養容器102が構成されており、各容器102中に、細胞103を入れて培養することができるようにしている。この基板101の上面にはシリコン、あるいは酸化シリコン、あるいはクロム、あるいはアルミニウム、あるいは鉄、あるいはチタン等の、シラノール基とシランカップリングする素材の薄膜106が蒸着あるいはスパッタリングされている。この薄膜106の厚さは20オングストローム以上あればよい。20オングストローム未満の場合には、基板との結合性やその上に被覆する半透膜との結合性が必ずしも充分でないことがある。より実際的には20オングストローム以上200オングストローム以下程度が考慮される。この薄膜106の表面に、たとえば、片端にシラノール基を持ち、他端にアミノ基あるいはカルボキシル基あるいはSH基を持つ二価性試薬等によってアミノ基あるいはカルボキシル基あるいはSH基を導入し、次に、このアミノ基あるいはカルボキシル基あるいはSH基を導入した薄膜106表面に、たとえばビオチンを共有結合させ、次に、アビジン修飾した半透膜105を結合させることで基板101上面に半透膜105をシールする。なお、この実施例では、基板101の薄膜106の表面にビオチンを、半透膜105にアビジンを結合させたが、その反対であってもよい。

図2は、図1で示したマイクロチャンバー100を実際に作成する手順の一例を示したものである。ここでは、例えば基板201にPET等の120℃程度の熱で容易に形状が変化する光学的に透明な素材を用いる。前記基板201を用いた場合、加熱した鋳型を基板表面に当てることで簡単にマイクロストラクチャを形成することができる。以下に加工手順を説明する。まず、基板201を用意する。次に基板201の上面に薄膜を蒸着あるいはスパッタリングして、たとえば酸化シリコン(SiO_2)の薄膜202を形成する。ここで薄膜202は、先に述べたよ

うにシリコン、あるいはクロム、あるいはアルミニウム、あるいは鉄、あるいはチタン等の、シラノール基とシランカップリングする素材であればよい。次に、あらかじめ作成していたマイクロ形状をかたどった鑄型 203 を百数十度に加熱しながら基板 201 に押し付けマイクロ形状を基板 201 に形成する。鑄型を取り除くと、マイクロ形状を簡単に作成することができる。この後、図 1 の説明で述べたように、シランカップリングによって薄膜 202 表面に生体物質を固定して前記の半透膜 105 を表面に固定する。

なお、以上の実施例では単一の素材から構成される基板 201 を示したが、異なる素材が複合化されていてもよいし、層状に積み上げられた基板であってもよい。たとえば、ガラス基板上に、高分子を層状に積層したものについて、この高分子層は、上記実施例で述べた手順と全く同様な手順で扱うことができる。

そして、基板については、マイクロ形状の形成方法や、その一つの方法としての鑄型の使用の場合の温度等によっても異なるが、取扱いの観点からは、一般的に基板の融点は、90℃以上400℃未満とすることが好適である。さらには100℃～150℃の温度で変形するものがその一例として挙げられる。

もちろん、この出願の発明は以上の例示に限定されることはない。その細部について様々な形状が可能であることは言うまでもない。

産業上の利用可能性

以上記述したように、この出願の発明により、加工工程が大幅に簡素化された安価なマイクロチャンバアレイを作成することが可能となる。

請求の範囲

1. 少なくとも特定の可視領域の波長の光に対して吸収を持たず、少なくとも1細胞単位での細胞培養は可能とされる培養容器としての穴が複数配置された基板上に、シランカップリングする薄膜が配設され、この薄膜の表面には結合性生体物質を介して半透膜が被覆されていることを特徴とする半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー。
2. 前記基板の融点は、90℃以上400℃未満であることを特徴とする請求項1の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー。
3. 前記薄膜の厚さは、20オングストローム以上であることを特徴とする請求項1の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー。
4. 前記薄膜は、その素材が、シリコン、酸化シリコン、クロム、アルミニウム、鉄、およびチタンのうちの少なくとも1種ことを特徴とする請求項1の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー。
5. 前記生体物質が、アビジンとビオチンであることを特徴とする請求項1記載の半透膜付き細胞培養マイクロチャンバー。

図 1

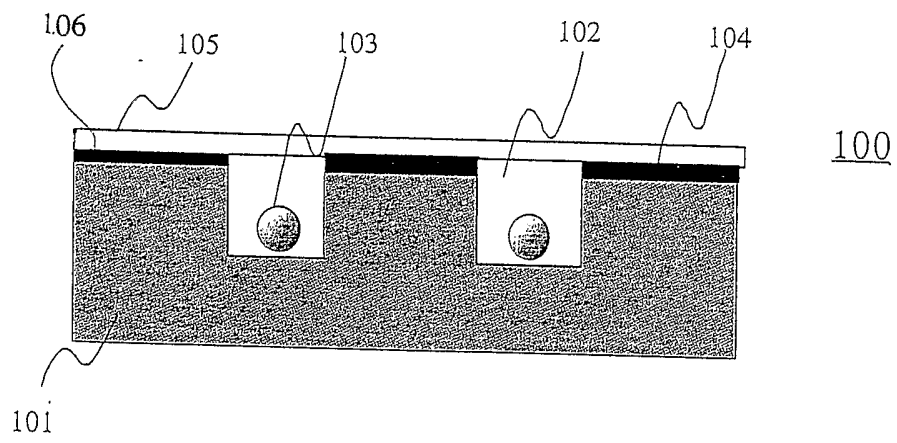
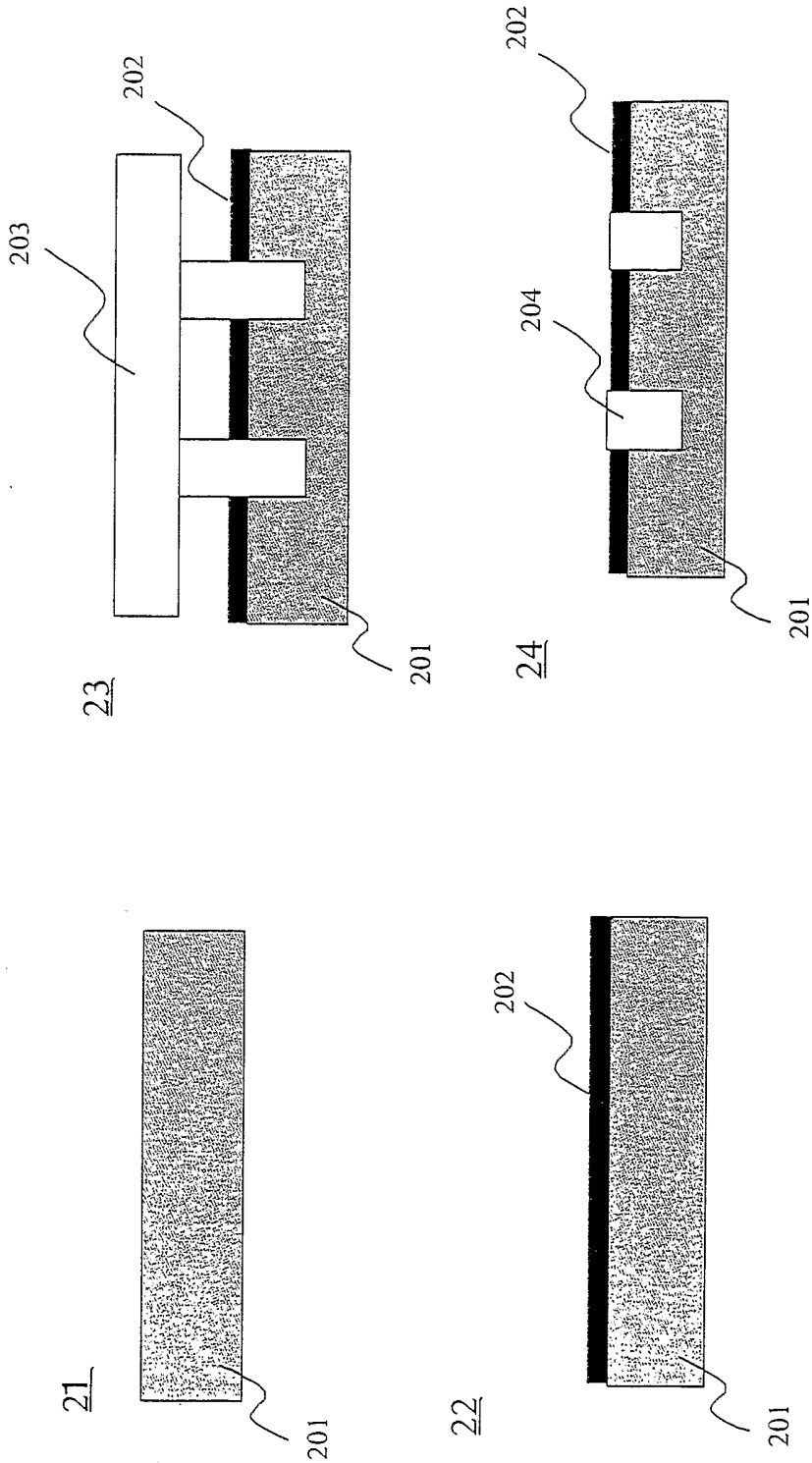


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12M3/00		
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) Int.Cl ⁷ C12M1/00, 3/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/42411 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 30 May, 2002 (30.05.02), & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-5
Y	WO 01/71031 A2 (KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA), 27 September, 2001 (27.09.01), & EP 1136570 A2 & US 2002-48758 A1 & JP 2001-333786 A	1-5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 21 October, 2003 (21.10.03)		Date of mailing of the international search report 04 November, 2003 (04.11.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M3/00

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))

Int. Cl⁷ C12M1/00, 3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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)

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 請求の範囲の番号
Y	WO 02/42411 A1 (科学技術振興事業団) 2002.05.30 & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-5
Y	WO 01/71031 A2 (KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA) 2001.09.27 & EP 1136570 A2 & US 2002-48758 A1 & JP 2001-333786 A	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、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

21.10.03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448