

(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
2016年10月6日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/158233 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057107
- (22) 国際出願日: 2016年3月8日(08.03.2016)
- (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 2015-077196 2015年4月3日(03.04.2015) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所
(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 杉浦 慎治(SUGIURA Shinji); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 佐藤 琢(SATO Taku); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 金森 敏幸(KANAMORI Toshiyuki); 〒3058565 茨城県つくば

市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 進 和美(SHIN Kazumi); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

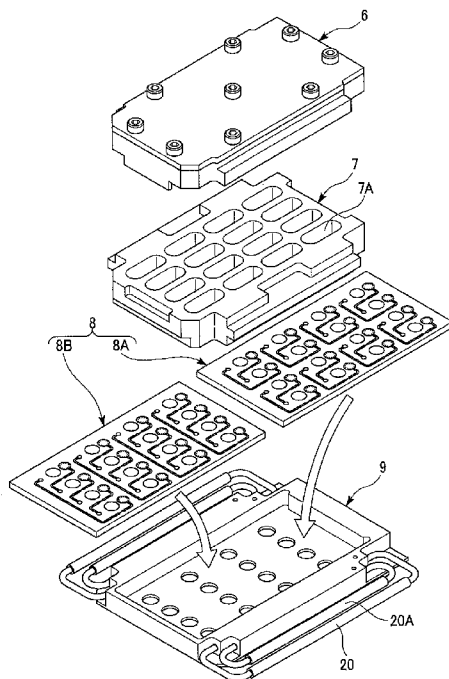
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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

[続葉有]

(54) Title: CELL CULTURE APPARATUS AND CELL CULTURE METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養装置および細胞培養方法



(57) Abstract: A cell culture apparatus comprising: a connected culture vessel that has cell holding parts in which inoculated cells are held, an m number of culture chambers, each having said cell holding part, storing a liquid culture medium, and disposed in parallel in a first direction, and at least one communication flow passage allowing the m number of culture chambers to communicate with each other, wherein a unit is constituted from the m number of culture chambers and the communication flow passage, and an n number of said units are disposed in parallel in a second direction different from the first direction; and a plurality of pneumatic pipes which, in the connected culture vessel, allow the culture chambers disposed in the same row in the second direction to communicate with each other, can simultaneously pressurize the culture chambers disposed in the same row or can simultaneously open the culture chambers to atmospheric pressure between the culture chambers, and can supply the liquid culture medium to the m number of culture chambers through the communication flow passage using pressure differences in the m number of culture chambers, where m is an integer of 2 or more and n is an integer of 2 or more.

(57) 要約: 細胞培養装置であって、播種された細胞が保持される細胞保持部と、それぞれに前記細胞保持部を有し、かつ、液体培地が貯留され、第1方向に沿って並列配置されたm個の培養チャンパーと、前記m個の培養チャンパー間を互いに連通する1以上の連絡用流路と、を有し、前記m個の培養チャンパーと前記連絡用流路とからユニットが構成され、n個の前記ユニットが前記第1方向とは異なる方向である第2方向に沿って並列配置された連結培養容器と、前記連結培養容器において、前記第2方向に沿って同列に配置された同列配置培養チャンパー間を連通し、前記同列配置培養チャンパー間に同時に加圧可能または同時に大気圧開放可能であり、前記m個の培養チャンパー内の圧力差により前記連絡用流路を通して前記液体培地を、前記m個の培養チャンパーの間で液送可能な複数の空圧配管と、を備え、前記mは2以上の整数であり、前記nは2以上の整数である。

WO 2016/158233 A1



ロツパ (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:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：細胞培養装置および細胞培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、医薬品や化成品の分析技術に関わるものであって、医薬品や化成品の薬効や毒性、および吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態を、培養細胞を用いて分析するための細胞培養装置および細胞培養方法に関する。

本願は、2015年4月3日に日本に出願された特願2015-077196号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年の医薬品開発コストの増大は著しく、Pammolliらが2011年に発表した非特許文献1によると、医薬品候補化合物が第二相および第三相臨床試験においてドロップアウトする確率が大きく上昇していることが大きな原因の一つであると指摘されている。開発成功率低下の原因が何であるかは議論のあるところだが、前臨床試験において有望とされた候補化合物が臨床試験でドロップアウトするのを防ぐためには、臨床試験と相関の良いデータを前臨床試験の段階で得ることが重要である。

前臨床試験においては、薬効・薬物動態・毒性の評価に培養細胞を用いた試験が利用されることが多い。培養細胞を用いた試験では、培養環境が生体内の環境と大きく異なることが臨床試験との相関の悪さの原因とされている。また、一種類の培養細胞で薬効・薬物動態・毒性を評価しても生体内で複数の臓器が関わる現象を評価することが難しく、これが培養細胞を用いた試験と臨床試験との相関性の悪さの一つの原因と考えられる。動物試験においては種の違いに起因する生物機能の差が試験結果の相関の悪さの大きな原因とされている。

Body-on-a-chipシステムは、培養細胞を臓器モデルとして用い、複数の臓器モデルを連結して培養することで、複数の臓器が関わる生体内の現象を生体外で再構成する方法である。Body-on-a-chip

pシステムは、通常動物実験を必要とする薬物動態解析を *in vitro* で実施できる動物実験代替法としての可能性を秘めているとされ、近年急速に注目を集めている（非特許文献2、3参照）。特にヒト由来の培養細胞で薬物動態解析を *in vitro* で評価することができれば、臨床試験と相関の良いデータが取得できると期待される。

しかしながら、これらの研究の多くは2、3種類の臓器モデルを用いて検証の行いやすいモデル化合物を評価する原理検証研究に留まっており（非特許文献4～6参照）、Body-on-a-chipシステムと動物実験・臨床試験との相関性の評価は定まっていない。この *vivo/vitro* 相関を明らかにするためには様々な臓器モデルやモデル化合物を用いてBody-on-a-chipシステムの有効性を検証する必要がある。さらに、Body-on-a-chipシステムを動物実験代替法として創薬に利用していくためにも、多種類の化合物を同時に評価するハイスループットスクリーニングが必要であるが、この点は上述の原理検証研究においては未解決となっている。

[0003] 本発明者等は、既に、これまでの研究で多数の薬剤溶液を簡便に取り扱える「圧力駆動型の灌流培養マイクロチャンバーアレイ」を開発（非特許文献7、8参照）し、その後、使い勝手の良いプラットフォームを備えた循環培養システムを開発し、実用化のためのユーザー評価を実施するに至っている（非特許文献9、特許文献1参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：日本国特開2015-73468号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：F.Pammolli, et al., Nat. Rev. Drug Discov, 10, 428 (2011)

非特許文献2：S.N.Bhatia and D.E.Ingber, Nat. Biotechnol., 32, 760(2014)

非特許文献3 : C.Y.Chan, et al., Lab Chip, 13, 4697(2013)

非特許文献4 : J.H.Sung, et al., Lab Chip, 10, 446(2010)

非特許文献5 : I.Wagner, et al., Lab Chip, 13, 3538(2013)

非特許文献6 : J.H.Sung, et al., Lab Chip, 13, 1201 (2013)

非特許文献7 : S.Sugiura, et al., Anal.Chem., 82, 8278 (2010)

非特許文献8 : S.Sugiura, et al., Biotechnol.Bioeng., 100, 1156 (2008)

非特許文献9 : K.Hattori, et al., J.Biosci.Bioeng., 118, 327 (2014)

非特許文献10 : C.Zhang, et al., Lab Chip, 9, 3185 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] B o d y - o n - a - c h i p システムを動物実験代替法として創薬に利用していくためには、多種類の化合物を同時に評価するハイスループットスクリーニングが必要であるが、この点は現在のところ実現できていない。

そこで、本発明が解決しようとする課題は、本発明者等が既に蓄積してきた「圧力駆動型の灌流培養マイクロチャンバーアレイ」に関する知見をベースとし、これをさらに発展させて多種類の化合物を同時に評価するハイスループットスクリーニングが実現可能な「圧力駆動型 B o d y - o n - a - c h i p システム」を開発し、様々な臓器連結モデルとモデル化合物を用いた評価を可能とすることにある。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するために、本発明の一態様に係る細胞培養装置は、培養チャンバーをマイクロ流路で連結し、各培養チャンバーに圧力を分配する圧力配管ラインを接続し、圧力駆動で複数の培養チャンバー内の液体培地を同時に送液することで、多種類の化合物の同時評価を可能としたものである。

[0008] 本発明の第一態様に係る細胞培養装置は、播種された細胞が保持される細胞保持部と、それぞれに前記細胞保持部を有し、かつ、液体培地が貯留され、第1方向に沿って並列配置されたm個の培養チャンバーと、前記m個の培養チャンバー間を互いに連通する1以上の連絡用流路と、を有し、前記m個

の培養チャンバーと前記連絡用流路とからユニットが構成され、 n 個の前記ユニットが前記第 1 方向とは異なる方向である第 2 方向に沿って並列配置された連結培養容器と、前記連結培養容器において、前記第 2 方向に沿って同列に配置された同列配置培養チャンバー間を連通し、前記同列配置培養チャンバー間に同時に加圧可能または同時に大気圧開放可能であり、前記 m 個の培養チャンバー内の圧力差により前記連絡用流路を通して前記液体培地を、前記 m 個の培養チャンバーの間で液送可能な複数の空圧配管と、を備え、前記 m は 2 以上の整数であり、前記 n は 2 以上の整数である。

[0009] 前記連絡用流路から前記 m 個の培養チャンバーへの流れの方向を制御可能な逆流防止機構を前記連絡用流路の末端もしくは内部に備えていてもよい。

[0010] 前記 m 個の培養チャンバーは、前記 m 個の培養チャンバーのそれぞれに、液体培地を貯留する容器状の槽本体と、前記槽本体の開口を開閉自在かつ気密に閉止する蓋部と、を有していてもよい。

[0011] 前記蓋部を前記槽本体に向けて押さえつけるように保持可能な蓋部押圧部をさらに備え、前記蓋部押圧部は、前記槽本体を支持する基体部と、前記基体部に支持された前記槽本体に向けて前記蓋部を押圧する押圧部材と、を有していてもよい。

[0012] 前記槽本体が壁部と、連絡用流路を備えた底部プレートとを有していてもよい。

[0013] 前記壁部を前記底部プレートに向けて押さえつけて保持する壁部押圧部をさらに備え、前記壁部押圧部は、前記基体部と前記基体部に支持された前記底部プレートに向けて前記壁部を押圧する押圧部材を有していてもよい。

[0014] 前記空圧配管を通して前記各培養チャンバーに予め設定されたスケジュールに従って、順次加圧あるいは大気圧開放可能な加圧装置を備えていてもよい。

[0015] 前記培養チャンバーから前記連絡用流路に接続する部位に界面張力によって空気の流入を防止可能なラプラス弁を備えていてもよい。

[0016] 前記ラプラス弁を構成するマイクロ流路の幅が w_L であり、前記マイクロ流

路の深さが h_L であり、前記界面張力が γ であり、前記ラプラス弁のラプラス圧が ΔP_{Lap} であるとき、前記ラプラス圧が $\Delta P_{Lap} = 2\gamma (1/w_L + 1/h_L)$ の式で表され、前記ラプラス圧 ΔP_{Lap} が前記連結培養容器に加圧される圧力よりも大きくなるように、前記マイクロ流路が構成されていてもよい。

[0017] 前記連絡用流路の一部に流量を調節するために、前記連絡用流路の流路断面積に対して、流路断面積が $1/10$ 以下である抵抗流路部位を備えていてもよい。

[0018] 前記逆流防止機構が逆止弁であってもよい。

[0019] 前記逆流防止機構がラプラス弁であってもよい。

[0020] 本発明の第二態様に係る細胞培養方法は、 m および n が2以上の整数であるとき、 m 個の培養チャンバーを1以上の連絡用流路で互いに連通し、前記 m 個の培養チャンバーのそれぞれが第1方向に沿って並列配置された1ユニットの連結培養容器を n ユニット備え、前記 n ユニットの前記連結培養容器が前記第1方向とは異なる方向である第2方向に沿って並列配置された細胞培養装置を準備し、前記連結培養容器の蓋を開き、前記細胞培養装置の各培養チャンバー内に細胞を播種して接着させる第1工程と、前記細胞培養装置において、前記第2方向に沿って同列に配置された前記第1方向における1列目の培養チャンバーに液体培地を満たし、前記蓋を閉じる第2工程と、前記1列目の培養チャンバー内を加圧し、前記第2方向に沿って同列に配置された前記第1方向における2列目の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて前記1列目の培養チャンバーから前記2列目の培養チャンバーに送液する第3工程と、前記第1方向における列番号を順次1つずつ増やして加圧と大気圧開放を行うことにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて、前記第1方向における $m-1$ 列目の培養チャンバーから m 番目の培養チャンバーに送液する第4工程と、前記 m 列目の位置の培養チャンバー内を加圧し、かつ、前記1列目の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じ

て前記m列目の位置の培養チャンバーから前記1列目の位置の培養チャンバーに送液する第5工程と、前記第3工程から前記第5工程を繰り返すことにより前記細胞培養装置の前記各培養チャンバー内に前記液体培地を循環させる第6工程と、を含む。

[0021] 本発明の第三態様に係る評価システムは、上記態様に係る細胞培養装置に細胞を導入している。

[0022] 本発明の他の態様は、液体培地を貯留するためのm個の培養チャンバーと、各培養チャンバーには播種した細胞を保持するための細胞保持部が設けられ、前記m個の培養チャンバーを1または複数の連絡用流路で互いに連通して1ユニットの連結培養容器を構成し、さらに、当該連結培養容器をnユニット備えた細胞培養装置であって、ただし、mおよびnは2以上の整数、各ユニットの連結培養容器の同位置の培養チャンバーを連通する空圧配管を設け、当該空圧配管を用いて加圧または大気圧開放することにより、各ユニットの連結培養容器の同位置の培養チャンバーに対して同時に圧力をかけ、あるいは同時に大気圧開放し、培養チャンバー内の圧力差により前記連絡用流路を通して液体培地の液送をすることを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記連絡用流路から前記培養チャンバーへの流れの方向を制御する逆止弁を前記連絡用流路の末端もしくは内部に備えていることを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記培養チャンバーは液体培地を貯留する容器状の槽本体と、前記槽本体の開口を開閉自在かつ気密に閉止する蓋部とを有することを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記蓋部を前記槽本体に向けて押さえつけて保持する蓋部押圧部をさらに備え、前記蓋部押圧部は、前記槽本体を支持する基体部と、基体部に支持された前記槽本体に向けて前記蓋部を押圧する押圧部材を有することを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記槽本体が壁部と、連絡用流路を備えた底部プレートとを有することを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記壁部を前記底部プレートに向けて押さえつけて保持する壁部押圧部をさらに備え、前記壁部押圧部は、前記基体部と前記基体部に支持された前記底部プレートに向けて前記壁部を押圧する押圧部材を有することを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記空圧配管を通して前記各培養チャンバーに予め設定されたスケジュールに従って、順次加圧あるいは大気圧開放する加圧装置を備えたことを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記培養チャンバーから前記連絡用流路に接続する部位に界面張力によって空気の流入を防止するラプラス弁を備えたことを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、上記細胞培養装置において、前記連絡用流路の一部に流量を調節するために流路断面積が $1/10$ 以下となっている抵抗流路部位を備えたことを特徴とする。

また、本発明の他の態様は、 m 個の培養チャンバーと、前記 m 個の培養チャンバーを 1 または複数の連絡用流路で互いに連通して 1 ユニットの連結培養容器を構成し、さらに、当該連結培養容器を n ユニット備えた細胞培養装置を用い、ただし、 m および n は 2 以上の整数、

前記連結培養容器の蓋を開き、各ユニットの連結培養容器の各培養チャンバー内に細胞を播種して接着させる工程 1 と、

各ユニットの 1 番目の位置の培養チャンバーに液体培地を満たし、前記蓋を閉じる工程 2 と、

各ユニットの 1 番目の位置の培養チャンバー内を加圧し、かつ、2 番目の位置の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて 1 番目の位置の培養チャンバーから 2 番目の位置の培養チャンバーに送液する工程 3 と、

以下前記工程 3 を培養チャンバーの位置の番数を順次 1 つずつ増やして加圧と大気圧開放を行うことにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて $m-1$ 番目の位置の培養チャンバーから m 番目の位置の培養チャンバーに送

液するまでに至る工程 4 と

各ユニットの m 番目の位置の培養チャンバー内を加圧し、かつ、1 番目の位置の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて m 番目の位置の培養チャンバーから 1 番目の位置の培養チャンバーに送液する工程 5 と、

前記工程 3 から工程 5 を繰り返すことにより各ユニットの m 個の培養チャンバー内に液体培地を循環させる工程 6 と、
を備えたことを特徴とする細胞培養方法である。

発明の効果

[0023] 例えば、上記非特許文献 3～5 では、それぞれ、容器を傾けて重力を利用する方法、ペリスタポンプを内蔵したデバイス、外部のシリンジポンプを用いて送液する方法が採用されているが、これらの方法では、装置が複雑になるため、多数の化合物を同時に評価することは難しかった。また、上記非特許文献 3、5 では、1 種類の化合物しか評価できず、非特許文献 4 では、2 種類の化合物の評価のみが可能であった。

しかしながら、本発明者等が先に出願した特許文献 1 の圧力駆動型の灌流培養システムをベースに、更に発展させた本発明による Body-on-a-chip システムでは、多数の薬剤の効果を複数の臓器の連結モデルで評価できるようになる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1A]図 1 A は、本発明の第 1 実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一作製例である。

[図1B]図 1 B は、本発明の第 1 実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一作製例における 2 連培養チャンバー（Body-on-a-Chip ユニット）の拡大図である。

[図2A]図 2 A は、本発明の第 1 実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一例の全体構成図である。

[図2B]図 2 B は、本発明の第 1 実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一

例の全体構成図（培養装置組み立て後の斜視図）である。

[図2C]図2Cは、本発明の第1実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置において、ホルダー中にマイクロ流路プレート（底部プレート）を収納した状態を示す斜視図である。

[図3]図3は、図2Aに示した圧力駆動型細胞培養装置のマイクロ流路プレートの流路構成図（上面図）であり、2連培養チャンバー型の8ユニットシステム用（2臓器×8連プレート）の例である。

[図4]図4は、図3の1ユニットの流路構成図である。

[図5]図5は、図2Aに示した圧力駆動型細胞培養装置のマイクロ流路プレートの流路構成図であり、4連培養チャンバー型の4ユニットシステム用（4臓器×4連プレート）の例である。

[図6]図6は、図5の1ユニットの流路構成図である。

[図7]図7は、2連培養チャンバー型のマルチユニットシステムを、肝臓やがんの細胞を臓器モデルとして利用し、かつ、2臓器連結モデルとして使用した例を示す。

[図8]図8は、4連培養チャンバー型のマルチユニットシステムを、肺、肝臓、腎臓、脂肪の細胞を導入して4臓器連結モデルとして使用した例を示す。

[図9A]図9Aは、2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

[図9B]図9Bは、図9Aに示した2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図9C]図9Cは、図9Aに示した2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図9D]図9Dは、図9Aに示した2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図9E]図9Eは、図9Aに示した2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10A]図10Aは、4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

[図10B]図10Bは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10C]図10Cは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10D]図10Dは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10E]図10Eは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10F]図10Fは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図10G]図10Gは、図10Aに示した4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図11A]図11Aは、ラプラス弁を説明した図である。

[図11B]図11Bは、ラプラス弁を説明した図である。

[図11C]図11Cは、ラプラス弁を説明した図である。

[図12A]図12Aは、本発明の第1実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一例における組み立て前の正面断面図と、組み立て後の正面断面図と、を示す図である。

[図12B]図12Bは、本発明の第1実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一例の組み立て前の側面断面図と、組み立て後の側面断面図と、を示す図である。

[図12C]図12Cは、本発明の第1実施形態に係る圧力駆動型細胞培養装置の一例の上面図を示す図である。

[図13A]図13Aは、本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と2連培養チャンバ

一系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

[図13B]図13Bは、図13Aに示した本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図13C]図13Cは、図13Aに示した本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図13D]図13Dは、図13Aに示した本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図13E]図13Eは、図13Aに示した本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における2連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と使用方法を説明した図である。

[図13F]図13Fは、本発明の第2実施形態に係る細胞培養装置における4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの構成を説明した図である。

[図14]図14は、本発明の第3実施形態における細胞培養装置における4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

[図15]図15は、本発明の第3実施形態における細胞培養装置における4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

[図16A]図16Aは、実施例における肝癌細胞HepG2（肝臓モデル）および大腸癌細胞HCT116（大腸癌細胞）の培養プレート内の配置図である。

[図16B]図16Bは、実施例における肝癌細胞HepG2（肝臓モデル）および大腸癌細胞HCT116（大腸癌細胞）の培養スケジュールを示す図である。

[図17A]図17Aは、実施例における循環培養を開始する直前（Day1）の

HepG2の細胞の写真である。

[図17B]図17Bは、実施例における循環培養を開始する直前（Day1）のHCT116の細胞の写真である。

[図17C]図17Cは、実施例における循環培養を48時間行った後のHepG2の細胞の写真である。

[図17D]図17Dは、実施例における循環培養を48時間行った後のHCT116の細胞の写真である。

発明を実施するための形態

[0025] 図1Aおよび図1Bに示した8種の化合物を2種類の臓器の連結モデルで評価するシステムを例として、本発明の第1実施形態に係る細胞培養装置（Body-on-a-Chipユニット）1を説明する。図1Aおよび図1Bの例では、図1Bに示すような臓器モデルとなる培養チャンバー2が2つ連結された2連培養チャンバー（2臓器連結モデル）3Aを1ユニットとして、全8ユニットで構成されている。1ユニットを構成する培養チャンバー2同士はマイクロ流路4で接続されている。図1Aの右側に接続されている空圧配管（加圧ライン）5により順次加圧することで、各臓器モデル培養チャンバー2間で培養液を循環させることができる。

[0026] 図2Aは、図1Aおよび図1Bにおけるシステムをより詳細に示した本実施形態に係る細胞培養装置1の全体構成図であって、蓋（加圧蓋）6・貫通孔板7・マイクロ流路プレート8・ホルダー（基体部）9の4点のパーツで構成されている。臓器数や培地流量等のデザインに応じてマイクロ流路プレート（底部プレート）8を設計することで様々な臓器連結モデルに適用できる構成である。図2Aの例では、2臓器連結モデル3Aを8ユニット搭載したマイクロ流路プレート8Aを用いることもでき、4臓器連結モデル3Bを4ユニット搭載したマイクロ流路プレート8Bを用いることもできる。本実施形態に係る細胞培養装置1は、マイクロ流路プレート8を交換するだけで、様々な臓器連結モデルに対応できる構成である。

図2Aのシステムは、蓋6、貫通孔板7、マイクロ流路プレート8、ホル

ダー（基体部） 9 の各パーツを重ね合わせることでシステムが構成される。各パーツの詳細は後述する。蓋 6 は側面に加工された穴（図 2 では図示せず、図 1 2 A ～ C の空圧配管 5、5 A ～ 5 D の導入孔を参照）に接続され、空圧配管 5 より導入される圧力を各培養チャンバー 2 に分配する役割を果たす。貫通孔板 7 は培養チャンバー 2 の壁面（壁部） 7 A を構成する。

ホルダー 9 は蓋 6、貫通孔板 7、およびマイクロ流路プレート 8 を固定する。この際に、蓋 6 と貫通孔板 7 との間にシリコン樹脂シートやＯリングなどの柔軟性のある部品（封止剤 2 1）を配置することで、蓋 6 と貫通孔板 7 との隙間からの圧力漏れを防ぐことが可能となる。また、マイクロ流路プレート 8 もシリコン樹脂製等、柔軟性のある部品を使用することで、マイクロ流路プレート 8 と貫通孔板 7 との間およびマイクロ流路プレート 8 とホルダー 9 との間からの、圧力漏れおよび液漏れを防止することが可能となる。また、培養液を循環させるために、貫通孔板 7 に逆止弁 1 1 を設置することもできる。2 臓器連結モデル 3 A では、逆止弁 1 1 の設置は必須ではない。

なお、図 2 A には、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 が別々に形成されている例を示している。

図 2 A、および、後に示す図 1 2 A ～図 1 2 C に示すように、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 が別々に形成されてもよいし、後に示す図 9 A ～図 9 E および図 1 0 A ～図 1 0 G に示すように、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 を一体形成してもよい。

なお、図 9 A ～図 9 E においては、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 を一体形成した部材を本体（槽本体） 1 A として示し、図 1 0 A ～図 1 0 G においては、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 を一体形成した部材を本体（槽本体） 1 0 1 A として示している。

[0027] 図 2 B は、図 2 A において示した蓋 6、貫通孔板 7、マイクロ流路プレート 8、およびホルダー 9 を組み立てた状態における培養装置の組み立て後の

斜視図である。

図 2 C は、ホルダー 9 中にマイクロ流路プレート 8 A を収納した状態の一例を示す斜視図である。

図 2 C に示すように、例えばマイクロ流路プレート 8 A をホルダー 9 に収納し、さらにホルダー 9 に収納されたマイクロ流路プレート 8 A の上に貫通孔板 7 を載せる。図 2 B に示すように、蓋 6 を貫通孔板 7 に取り付け、第 1 の留め金 20 で蓋 6 を固定することができる。この際、第 1 の留め金（蓋部押圧部、押圧部材）20 によって、蓋 6 を槽本体 1 A に向けて押さえつけるように保持することができる。

また、図 2 B に示すように、第 2 の留め金（壁部押圧部、押圧部材）20 A によって、貫通孔板 7 をマイクロ流路プレート（底部プレート）8 に向けて押さえつけて保持することができる。

[0028] 図 3 は、2 連培養チャンバー 3 A 型の 8 ユニットシステムにおけるマイクロ流路プレート（2 臓器×8 連プレート）8 A の流路構成図（上面図）であり、図 4 は 2 臓器×8 連プレート 8 A のうちの 1 ユニットの流路構成（2 連培養チャンバー）3 A を詳細に説明した図である。

図 4 の破線は各培養チャンバー 2 の内壁 7 A を示しており、第 1 の培養チャンバー 2 A および第 2 の培養チャンバー 2 B は、それぞれ、上流口 12、ウェル 13、下流口 14 を備えている。第 1 の培養チャンバー 2 A の第 1 の下流口 14 A と第 2 の培養チャンバー 2 B の上流口 12 B とが第 1 の連絡流路 15 A で連結されている。第 2 の培養チャンバー 2 B の第 2 の下流口 14 B と第 1 の培養チャンバー 2 A の上流口 12 A とが第 2 の連絡流路 15 B で連結されている。各連絡流路 15（15 A、15 B）の途中には流量を調整するための抵抗流路 16（16 A、16 B）が設けてあり、抵抗流路 16 の断面積は、好ましくは連絡流路 15 の断面積の $1/10$ 以下であり、抵抗流路 16 の断面積は連絡流路 15 の断面積と比較して著しく小さい。そのため、連絡流路 15 を流れる液の流量は抵抗流路 16 の断面積および長さと同圧配管 5 より導入する圧力により、簡便に計算することができる。各培養チャ

ンバー 2 (2 A、2 B) のウェル 1 3 (1 3 A、1 3 B) は凹部から構成される細胞保持部であるが、細胞保持部は細胞を保持できればウェルに限定されず、保持シート、ゲルなどであってもよい。

また、各培養チャンバー 2 (2 A、2 B) の上流口 1 2 (1 2 A、1 2 B) には逆止弁 1 1、下流口 1 4 (1 4 A、1 4 B) にはラプラス弁 1 7 (後述の「ラプラス弁の説明」の項、および、「ラプラス弁の設計について」の項を参照) を設けることが望ましい。図 4 において、ウェル 1 3 (1 3 A、1 3 B) は直径 6 mm×深さ 2 mm に形成し、連絡流路 1 5 (1 5 A、1 5 B) を幅 1 mm×深さ 0.5 mm に形成し、抵抗流路 1 6 (1 6 A、1 6 B) は幅 0.2 mm×深さ 0.1 mm、ラプラス弁 1 7 (1 7 A、1 7 B) は幅 0.1 mm×深さ 0.016 mm のマイクロ流路 36 本で構成されている (この数値は図 1 A および図 1 B の作製例の数値を例示したものであり、これに限定されるものではない)。

[0029] 図 5 は、4 連培養チャンバー型の 4 ユニットシステムにおけるマイクロ流路プレート 8 B の流路構成図である。図 6 は図 5 のマイクロ流路プレート 8 B のうち 1 ユニット (4 連培養チャンバー) 3 B の流路構成を詳細に説明した図である。図 6 において、図 4 と同様にウェル 1 1 3 (1 1 3 A、1 1 3 B、1 1 3 C、1 1 3 D) は直径 6 mm×深さ 2 mm、連絡流路 1 1 5 (1 1 5 A、1 1 5 B、1 1 5 C、1 1 5 D) を幅 1 mm×深さ 0.5 mm、抵抗流路 1 1 6 (1 1 6 A、1 1 6 B、1 1 6 C、1 1 6 D) は幅 0.2 mm×深さ 0.1 mm、ラプラス弁 1 1 7 (1 1 7 A、1 1 7 B、1 1 7 C、1 1 7 D) は幅 0.1 mm×深さ 0.016 mm のマイクロ流路 36 本で構成されている (この数値は図 1 A および図 1 B の作製例の数値を例示したものであり、これに限定されるものではない)。第 1～第 4 の培養チャンバー 1 0 2 A、1 0 2 B、1 0 2 C、1 0 2 D は、それぞれ、第 1～第 4 の上流口 1 1 2 (1 1 2 A、1 1 2 B、1 1 2 C、1 1 2 D)、第 1～第 4 のウェル 1 1 3 (1 1 3 A、1 1 3 B、1 1 3 C、1 1 3 D)、第 1～第 4 の下流口 1 1 4 (1 1 4 A、1 1 4 B、1 1 4 C、1 1 4 D) を備えている。上流側の培養チ

チャンバー（第1の培養チャンバー）102Aの下流口（第1の下流口）114Aと下流側の培養チャンバー（第2の培養チャンバー）102Bの上流口（第2の上流口）112Bとが連絡流路（第1の連絡流路）115Aで接続されている。最下流側の培養チャンバー（第4の培養チャンバー）102Dの下流口（第4の下流口）114Dと最上流側の培養チャンバー（第1の培養チャンバー）102Aの上流口（第1の上流口）112Aとが連絡流路（第4の連絡流路）115Dで接続されている。なお、臓器モデルによっては、途中の培養チャンバー（例えば、第2の培養チャンバー102B、第3の培養チャンバー102C）の下流口（第2の下流口114B、第3の下流口114C）から連絡流路を分岐させて上流側の培養チャンバーの上流口に接続させることもできる。

各培養チャンバー102A、102B、102C、102Dのウェル113（1113A、113B、113C、113D）には様々な培養細胞を臓器モデルとして搭載することができる。

図7は2連培養チャンバー型の8ユニットシステム8Aを、肝臓19Aやがん19Bの細胞を臓器モデルとして利用して2臓器連結モデル3Aとして使用した例で、ある。

図8は4連培養チャンバー型の4ユニットシステム8Bを、肺19C、肝臓19A、腎臓19D、脂肪19Eの細胞を導入して4臓器連結モデル3Bとして使用した例である。

[0030]（2連培養チャンバー3A系のマルチユニットシステムの動作原理）

図9A～図9Eは、2連培養チャンバー3A系のマルチユニットシステムの動作原理を説明するための図である。

マイクロ流路プレートは図3に示す2連培養チャンバー3A型の8ユニットシステム（2臓器×8連プレート）のマイクロ流路プレート8Aを使用する。

図9Aに示すような構成で、下からホルダー9、マイクロ流路プレート8A、貫通孔板7および蓋6を重ねて留め金（蓋部押圧部、壁部押圧部）20

、20Aで固定して、2臓器連結培養用の培養容器（培養装置）1を形成する。

なお、図9Aに示す構成では、ホルダー9、マイクロ流路プレート8A、貫通孔板7が一体形成された部材の一例を示しており、当該部材を本体（槽本体）1Aと呼ぶ。図9Aに示す例では、逆止弁11A、11Bを設置し、培養液を循環させることのできる構成である。

また、図9Aに示すような一体形成型の構成では、本体（槽本体）1Aに、蓋6の押圧部（蓋部押圧部）として第1の留め金20（図2A、図2B、図2C、および図12A～図12Cを参照、図9A～図9Eでは不図示）が設けられていればよい。第1の留め金20を外すことにより、蓋6は開閉可能、または、着脱可能である。

なお、図2A、図2B、図2C、および図12A～図12Cに示すように、ホルダー9、マイクロ流路プレート8A、貫通孔板7が個別に設けられる場合（一体形成型でない場合）には、ホルダー9には留め金が、第1の留め金（蓋部押圧部）20と第2の留め金（壁部押圧部）20Aとの2組設置されており、第2の留め金20Aによりマイクロ流路プレート8Aと貫通孔板7を固定した状態（本体（槽本体）1A）で、蓋6のみを開閉することができる。

蓋6を閉じたときはOリング等の封止材21で蓋と本体1Aとの間の気密性を確保する。なお、以下の工程は、全てのユニットで同時に同じ工程が行われる。

以下、図9B～図9Eを用いて培地循環の工程を説明する。なお、図9B～9Eは、図9Aの2連培養チャンバー3Aの構成に対応した図であり、培地の流れを説明する図である。

（1）第1工程（図9Bを参照）

培養容器1の蓋6を開き、貫通孔板7によってマイクロ流路プレート8A上に形成される第1のウェル13Aおよび第2のウェル13B内に細胞19を播種して接着させる。

(2) 第2工程 (図9Cを参照)

第1の培養チャンバー2Aに培地31を満たし、培養プレートの蓋6を閉じる。

(3) 第3工程 (図9Dを参照)

第1の培養チャンバー2A内を第1のエアフィルター22Aを介して加圧し、第2の培養チャンバー2Bを第2のエアフィルター22Bを介して大気圧開放する。第1の逆止弁(チェックバルブ1)11Aが閉塞状態になり、第2の逆止弁(チェックバルブ2)11Bが開放状態になるため、培地は第1の下流口14Aから第1の連絡流路15Aを通じて第2の培養チャンバー2Bに送液される。第1のウェル13Aは第1下流口14Aよりも低い位置にあるため、第1の培養チャンバー2A内を加圧し続けた場合でも第1のウェル13A内の培地は枯渇せず残留する。このように、ウェルを含む細胞保持部が培養チャンバー内に設けられることにより、培地が枯渇せず、細胞は死滅しない。

また、下流口14Aに近い位置には、ラプラス弁17(17A)が設けられているので、後述する「ラプラス弁」の機能により、培地送液後に第1の培養チャンバー2A内を加圧しても第1の連絡流路15Aに空気が流入することはない。なお、送液流量は圧力およびマイクロ流路プレート8A上の第1の連絡流路15Aの途中に設けた抵抗流路16Aの抵抗により調整される。

(4) 第4工程 (図9Eを参照)

第2の培養チャンバー2B内を加圧し、第1の培養チャンバー2A内を大気圧開放する。第3工程と同様の過程で第2の培養チャンバー2B内の培地は第1の培養チャンバー2Aに送液される。

(5) 培地循環

第3工程と第4工程とを繰り返すことにより、2つの培養チャンバー内において(第1の培養チャンバーと第2の培養チャンバーとの間において)培地を循環させる。

[0031] (4 連培養チャンバー 3 B 系のマルチユニットシステムの動作原理)

図 10 A～図 10 G は、4 連培養チャンバー 3 B 系のマルチユニットシステムの動作原理を説明するための図である。

マイクロ流路プレートは図 5 に示す 4 連培養チャンバー 3 B 型の 4 ユニットシステム (4 臓器×4 連プレート) のマイクロ流路プレート 8 B を使用する。図 10 A に示す構成で、下からホルダー 9、マイクロ流路プレート 8、貫通孔板 7 および蓋 6 を重ねて留め金 (蓋部押圧部、壁部押圧部) 20、20 A (図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 12 A～図 12 C 参照) で固定して、4 臓器連結培養用の培養容器 101 を形成する。

なお、図 10 A に示す構成では、ホルダー 9、マイクロ流路プレート 8 B、貫通孔板 7 が一体形成された部材の一例を示しており、当該部材を本体 (槽本体) 101 A と呼ぶ。図 10 A に示す例では、第 1～第 4 の逆止弁 111 A、111 B、111 C、111 D を設置し、培養液を循環させることのできる構成となっている。

また、図 10 A に示すような一体形成型の構成では、本体 (槽本体) 101 A に、蓋 6 の押圧部 (蓋部押圧部) として第 1 の留め金 20 (図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 12 A～図 12 C を参照、図 10 A～図 10 G では不図示) が設けられていればよい。第 1 の留め金 20 を外すことにより、蓋 6 は開閉可能、または、着脱可能である。

なお、図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 12 A～図 12 C に示すように、ホルダー 9、マイクロ流路プレート 8 A、貫通孔板 7 が個別に設けられる場合 (一体形成型でない場合) には、ホルダー 9 には、第 1 の留め金 (蓋部押圧部) 20 と第 2 の留め金 (壁部押圧部) との 2 組設置されており、第 2 の留め金 20 A によりマイクロ流路プレート 8 B と貫通孔板 7 を固定した状態 (以下本体 (槽本体) 101 A と呼ぶ) で、第 1 の留め金 20 を外すことにより、蓋 6 のみを開閉することができる。蓋 6 を閉じたときは O リング等の封止材 21 で蓋 6 と本体 101 A との間の気密性を確保する。また、図 6 に対応するように、図 12 A～図 12 C の 4 連培養チャンバーには、第 1～

第4の上流口112A～112D、および、第1～第4のラプラス弁117A～117Dが設けられている。なお、以下の工程は、全てのユニットで同時に同じ工程が行われる。

以下、図10B～図10Gを用いて培地循環の工程を説明する。なお、図10B～10Eは、図10Aの4連培養チャンバー3Bの構成に対応した図であり、培地の流れを説明する図である。

(1) 第1工程 (図10Bを参照)

培養容器101の蓋6を開き、第1のウェル113A、第2のウェル113B、第3のウェル113C、第4のウェル113D内に細胞19を播種して接着させる。

(2) 第2工程 (図10Cを参照)

第1の培養チャンバー102Aに培地31を満たし、培養容器(プレート)101の蓋6を閉じる。

(3) 第3工程 (図10Dを参照)

第1の培養チャンバー102A内を第1のエアフィルター122Aを介して加圧し、第2の培養チャンバー102B内を第2のエアフィルター122Bを介して大気圧開放する。第1の逆止弁(チェックバルブ1)111Aが閉塞状態になり、第2の逆止弁(チェックバルブ2)111Bが開放状態になるため、培地31は第1の下流口114Aから第1の連絡流路114Aを通じて第2の培養チャンバー102Bに送液される。第1のウェル113Aは第1の下流口114Aよりも低い位置にあるため、第1の培養チャンバー102A内を加圧し続けた場合でも第1のウェル113A内の培地は枯渇せず残留する。このように、ウェルを含む細胞保持部が培養チャンバー内に設けられることにより、培地が枯渇せず、細胞は死滅しない。

また、第1の下流口114Aに近い位置には、ラプラス弁117(第1のラプラス弁117A)が設けられているので、後述する「ラプラス弁」の機能により、培地送液後に第1の培養チャンバー102A内を加圧しても第1の連絡流路115Aに空気が流入することはない。なお、送液流量は圧力お

よび連絡流路 1 1 5 A の途中に設けた第 1 の抵抗流路 1 1 6 A の抵抗により調整される。

(4) 第 4 工程 (図 1 0 E を参照)

第 2 の培養チャンバー 1 0 2 B 内を第 2 のエアフィルター 1 2 2 B を介して加圧し、第 3 の培養チャンバー 1 0 2 C 内を第 3 のエアフィルター 1 2 2 C を介して大気圧開放する。第 3 工程と同様の過程で第 2 の培養チャンバー 1 0 2 B 内の培地は第 3 の培養チャンバー 1 0 2 C に送液される。

(5) 第 5 工程 (図 1 0 F を参照)

第 3 の培養チャンバー 1 0 2 C 内を第 3 のエアフィルター 1 2 2 C を介して加圧し、第 4 の培養チャンバー 1 0 2 D 内を第 4 のエアフィルター 1 2 2 D を介して大気圧開放する。第 4 工程と同様の過程で第 3 の培養チャンバー 1 0 2 C 内の培地は第 4 の培養チャンバー 1 0 2 D に送液される。

(6) 第 6 工程 (図 1 0 G を参照)

第 4 の培養チャンバー 1 0 2 D 内を第 4 のエアフィルター 1 2 2 D を介して加圧し、第 1 の培養チャンバー 1 0 2 A 内を第 1 のエアフィルター 1 2 2 A を介して大気圧開放する。第 5 工程と同様の過程で第 4 の培養チャンバー 1 0 2 D 内の培地は第 1 の培養チャンバー 1 0 2 A に送液される。

(7) 培地循環

第 3 工程から第 6 工程を繰り返すことにより、第 1 ～第 4 の 4 つの培養チャンバー内に培地を循環させる。

[0032] (ラプラス弁の説明)

ラプラス弁 1 7 の構造と機能を、図 1 1 A ～図 1 1 C を用いて説明する。図 1 1 A は、ラプラス弁 1 7 が設けられた培養チャンバー 2 の部分拡大図を示す。図 1 1 B は、ラプラス弁 1 7 を介して下流口 1 4 から連絡流路 1 5 に培地 3 1 が流入する場合の模式図を示す。図 1 1 C は、下流口 1 4 に空気が流入した際に、ラプラス弁 1 7 が機能している際の模式図を示す。図 1 1 C に示すように、微細な流路内において、培地 3 1 と空気との間には界面張力による圧力差、すなわちラプラス圧が発生する。流路の表面が液体培地で濡

れている場合は、ラプラス圧未満の空気圧条件下において培地が満たされた微細流路に空気は流入しえない。このような条件下で微細流路は受動的な空気流入防止機構として扱うことができる。本明細書において、当該微細流路で構成される空気流入防止機構を「ラプラス弁」と呼称する。図3、4、5、および6に図示したマイクロ流路プレート8A、8Bでは、各培養チャンバー2A、2B、102A、102B、102C、102Dの下流口14、114と連絡流路15、115との間に36個の「ラプラス弁」が放射状に設けられている。

[0033] (ラプラス弁の設計について)

上述したラプラス弁17の設計について、以下に説明する。

ラプラス弁に空気が流入してしまう圧力（ラプラス圧、限界圧力）（ ΔP_{Lap} ）は界面張力（ γ ）およびラプラス弁を構成するマイクロ流路の幅（ w_L ）および深さ（ h_L ）によって以下の式（1）で計算できる。

$$\Delta P_{Lap} = 2\gamma (1/w_L + 1/h_L) \quad (1)$$

本実施形態および以下に示す実施形態に係る培養装置1を駆動するための現実的な圧力範囲は市販の圧力制御装置で調整可能な圧力範囲および細胞の耐圧性によって決定され则认为られる。

仮に細胞の耐圧性を生体内の血圧の上限程度（ $30\text{ kPa} = 225\text{ mmHg}$ ）とすると、本実施形態および以下に示す実施形態に係る培養装置1を駆動するために現実的な圧力範囲は $1\text{ kPa} \sim 30\text{ kPa}$ 程度となる。培養液の界面張力は 60 mN/m 程度であり、ラプラス弁17を構成するマイクロ流路の断面が正方形の場合、つまり $w_L = h_L$ の場合、 30 kPa で空気が流入するマイクロ流路の寸法は上記式（1）より $w_L = h_L = 8\text{ }\mu\text{m}$ 程度、 1 kPa で空気が流入するマイクロ流路の寸法は $w_L = h_L = 240\text{ }\mu\text{m}$ 程度と推算される。

ラプラス弁17を構成するマイクロ流路の寸法を上記寸法（ 30 kPa のときの $w_L = h_L = 8\text{ }\mu\text{m}$ 、 1 kPa のときの $w_L = h_L = 240\text{ }\mu\text{m}$ ）よりも小さくすることで、想定する圧力で運用した際にラプラス弁17に空気が流

入してしまうことを防ぐことができる。

すなわち、ラプラス弁 17 が機能するための限界の圧力であるラプラス圧 ΔP_{Lap} が、培養装置 1 で使用する圧力範囲よりも大きくなるように、ラプラス弁 17 を構成するマイクロ流路を形成すれば、ラプラス弁 17 に空気が流入してしまうことを防ぐことができる。

なお、 w_L と h_L の比率が 1 : 1 でない場合も同様に式 (1) に基づいて流路の寸法を設計することが可能である。

以下に示す実施例では、マイクロ流路の幅及び深さを $200\ \mu\text{m}$ および $25\ \mu\text{m}$ と設計し、ラプラス圧が $5.4\ \text{kPa}$ と推算して本装置をこの圧力以下で運用した。

[0034] (抵抗流路の設計について)

断面が矩形のマイクロ流路を流れる液体の流量 (Q) と圧力損失 (ΔP) には以下の関係がある (F. M. White, Viscous Fluid Flow, McGraw-Hill Companies, Inc, Boston, 2006 を参照)。

[0035] [数1]

$$\Delta P = R \times Q \quad (2)$$

[0036] [数2]

$$R = \frac{12\mu l}{wh^3} \left\{ 1 - \frac{h}{w} \left[\frac{192}{\pi^5} \sum_{i=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{i^5} \tanh\left(\frac{i\pi w}{2h}\right) \right] \right\}^{-1} \quad (3)$$

上記式 (2) および式 (3) において、 ΔP はマイクロ流路の入口と出口の圧力差、 R は流路抵抗、 μ は流体の粘度、 l はマイクロ流路の長さ、 w はマイクロ流路の幅、 h はマイクロ流路の深さである。当該式 (2) および式 (3) は $w > h$ の条件で成立する。

例えば、本実施形態および以下に示す実施形態に係る細胞培養装置は、前記連絡用流路の一部に流量を調節するために流路断面積が $1/10$ 以下となっている抵抗流路部位を備えていてもよい。

この時、連絡用流路の抵抗流路部位と、連絡用流路の抵抗流路以外の部位と、の長さが等しい場合を考える。この時、抵抗流路の断面積が連絡用流路の $1/10$ となると、幅 w 、深さ h が $1/10^{0.5}$ となり、式（３）の抵抗流路の流路抵抗 R が、連絡用流路の抵抗流路以外の部位の流路抵抗 R の 100 倍となる。

式（２）より、圧力損失についても抵抗流路の圧力損失が、連絡用流路の抵抗流路以外の部位の圧力損失の 100 倍となる。この時、流路全体を流れる流量を推算する際に、抵抗流路の抵抗と流路全体にかかる圧力のみを考慮して流量を推算した場合の推算誤差が $1/100$ となり、これは許容できる誤差と言える。

すなわち、連絡用流路の一部に流量を調節するために流路断面積が $1/10$ 以下となっている抵抗流路部位が設けられた場合には、抵抗流路の圧力損失のみを考慮して流路設計をすることで流路網の設計が容易になるという利点がある。

[0037] 図 12A～図 12C は、図 2 および図 3 で示した細胞培養装置 1 における 2 連培養チャンバー 3A 型の 8 ユニットシステム 8A としての詳細な細胞培養装置 1 の組み立て図である。

図 12A において細胞培養装置 1 における正面断面図（組み立て前）を符号 201A1 で示し、図 12B において細胞培養装置 1 における側面断面図（組み立て前）を符号 201B1 で示す。

また、図 12A において、細胞培養装置 1 における正面断面図（組み立て後）を符号 201A2 で示し、図 12B において細胞培養装置 1 における側面断面図（組み立て後）を符号 201B2 で示す。

さらに、図 12C において、組み立て後の細胞培養装置 1 における上面図を符号 201C で示す。

図 12C において、蓋 6 に設けられた 4 本の空圧配管（加圧ライン） 5A、5B、5C、5D について説明すると、上面図 201C における一番上の空圧配管（第 1 の空圧配管） 5A が貫通孔板 7 に設けた一番上に並んだ（同

列に配置された) 4つの培養チャンバー(縦方向(第1方向)における第1列目の培養チャンバー群) 2A1、2A2、2A3、2A4に連通している。

当該4つの培養チャンバー2A1、2A2、2A3、2A4を同時に加圧すること、または、当該4つの培養チャンバー2A1、2A2、2A3、2A4を同時に大気圧開放することができる構成となっている。

他の3本の空圧配管(第2～第4の空圧配管) 5B、5C、5Dも、当該第1の空圧配管5Aと同様の構成となっている。

なお、2連培養チャンバー3A型であるので、横方向(第2方向)における第1列目の培養チャンバー2A1と培養チャンバー2B1とは連通している。

同様に、横方向の第1列目における培養チャンバー2C1と2D1とは連通している。

他の、培養チャンバーも図12Cの上面図201Cに示すように、同様の構造を有する。

なお、図12A～図12Cにおける符号135(135A～135D)は、空圧配管に接続するフィルターを示している。

ここでは、空圧配管に接続するフィルター135(135A～135D)として示したが、フィルター135が各培養チャンバーに予め設定されたスケジュールに従って、順次加圧あるいは大気圧開放可能な加圧装置であってもよい。

したがって、例えば、「2連培養チャンバー3A系のマルチユニットシステムの動作原理」の項に示した2連培養チャンバー3A系のマルチユニットシステムの第3工程では、図12Cの上面図201Cにおける上から1番目の空圧配管(第1の空圧配管) 5Aおよび3番目の空圧配管(第3の空圧配管) 5Cを加圧し、2番目の空圧配管(第2の空圧配管) 5Bおよび4番目の空圧配管(第4の空圧配管) 5Dを大気圧開放すればよい。また、次の第4工程では、1番目の空圧配管(第1の空圧配管) 5Aおよび3番目の空圧

配管（第3の空圧配管）5Cを大気圧開放し、2番目の空圧配管（第2の空圧配管）5Bおよび4番目の空圧配管（第4の空圧配管）5Dを加圧すればよい。

なお、マイクロ流路プレートを入れ替えて4連培養チャンバー型の4ユニットシステム8Bとした場合における「4連培養チャンバー3B系のマルチユニットシステムの動作原理」に記載の第3工程では、上から1番目の空圧配管（第1の空圧配管）5Aを加圧し、2番目の空圧配管（第2の空圧配管）5Bを大気圧開放すればよい。

次の第4工程では、上から2番目の空圧配管（第2の空圧配管）5Bを加圧し、3番目の空圧配管（第3の空圧配管）5Cを大気圧開放すればよい。

次の第5工程では、上から3番目の空圧配管（第3の空圧配管）5Cを加圧し、4番目の空圧配管（第4の空圧配管）5Dを大気圧開放すればよい。

次の第6工程では、上から4番目の空圧配管（第4の空圧配管）5Dを加圧し、1番目の空圧配管（第1の空圧配管）5Aを大気圧開放すればよい。

[0038] 上記説明では、2連培養チャンバー3A型の8ユニットシステムと4連培養チャンバー3B型の4ユニットシステムとの兼用タイプの細胞培養装置1で説明したが、これら上述の例に限らず、 m 連培養チャンバー型の n ユニットシステム（ここで、 m および n は2以上の整数）として、細胞培養装置を実現できる。

すなわち、本実施形態における細胞培養装置は、例えば、図12Cにおける縦方向（第1の方向、2A1、2B1、2C1、2D1）に沿って m 個の培養チャンバーが並列配置された m 連培養チャンバーが設けられ、当該縦方向に略垂直に配置される横方向（第2の方向）に沿って n ユニットの m 連培養チャンバーが並列に配置された構成を有することができる。

本実施形態における細胞培養装置においては、空圧配管が第2方向に沿って同列に配置された n 個の培養チャンバーから構成される同列配置培養チャンバー（例えば、図12Cにおける培養チャンバー2A1、2A2、2A3、2A4）間を連通し、 n 個の培養チャンバーから構成される同列配置培養

チャンバー間に同時に加圧可能または同時に大気圧開放可能な構成を有している。

そのため、本実施形態における細胞培養装置は空圧配管の存在により、 m 個の培養チャンバー内の圧力差によって、連絡用流路を通して m 個の培養チャンバーの間で液体培地を液送可能に構成されている。

ユニット毎に異なる医薬品等の液体培地を用いれば、 n 種類の医薬品の薬効等が一度に分析でき、同じ液体培地を用いれば同一の条件下で n 回の分析が一度にできる。

また、圧力駆動に用いる気体は、細胞培養に適した二酸化炭素および酸素の含有量に調整すると好ましい。

上述の実施形態においては、逆止弁 11 を用いる例を示したが、培地等の液の逆流を防止できる機構であれば（逆流防止機構が設けられていれば）、逆止弁に限定されない。

例えば、逆止弁 11 に代えて、逆流を防ぐために逆流を防ぎたい側の培養チャンバーを加圧することによっても逆流を防止することもできる。

また、逆止弁 11 に代えて、ラプラス弁を用いてもよい。

[0039] 以下、本発明の第 2 実施形態に係る細胞培養装置を、図面に基づいて説明する。

[0040] 図 13A～13E は、本実施形態における細胞培養装置における 2 連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と 2 連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

本実施形態において上述した第 1 実施形態と異なるのは、上述の第 1 実施形態における逆止弁 11 に代えて、ラプラス弁（逆流防止ラプラス弁）317（317A、317B）を逆流防止機構として用いた点であり、逆流防止機構以外の対応する構成に関しては、第 1 実施形態と同様であるため、その説明を省略する。

[0041] 図 13A は、連結した 2 連培養チャンバー 303A の断面図である。

図 13B～13E は、図 13A の構成に対応した図であり、培地の流れを

説明する図である。

連結した2連培養チャンバー303Aは、第1の培養チャンバー302A1と、第2の培養チャンバー302A2とを有する。

当該第1の培養チャンバー302A1の底部は、第1の仕切り部330Aにより、第1の流路導入口311Aが設けられた部位（第1CV部）350A1と、第1のラプラス弁317Aおよび第1のウェル313Aが設けられた部位（第1LV部）350A2とに分けられている。

同様に、当該第2の培養チャンバー302A2の底部は、第2の仕切り部330Bにより、第2の流路導入口311Bが設けられた部位（第2CV部）350B1と、第2のラプラス弁317Bおよび第2のウェル313Bが設けられた部位（第2LV部）350B2とに分けられている。

また、第1の培養チャンバー302A1における第1の流路導入口311Aと、第2の培養チャンバー302A2における第2のラプラス弁317Bと、は第1流路315Aで接続されている。

また、第1の培養チャンバー302A1における第1のラプラス弁317Aと、第2の培養チャンバー302A2における第2の流路導入口311Bと、は第2流路315Bで接続されている。

図13Aにおいては、第1流路315Aにおける第1の流路導入口311Aから第1のラプラス弁317Bまでの間の部位、および、第2のウェル313Bに、第1培地331Aが満たされている状態を示す。

また、図13Aにおいては、第2流路315B、第1のラプラス弁および第1のウェル313Aが設けられた第1LV部350A2から第2の流路導入口311Bが設けられた第2CV部350B1まで第2培地331Bが満たされている状態を示す。

図13Aに示すように、第1培地331Aおよび第2培地331Bのいずれも、培地の表面が第1の仕切り部330Aよりも低い位置にある場合には、第1培地331Aおよび第2培地331Bのいずれも第1の仕切り部330Aを超えて移動することはできない。図13Aに示すように、仕切り部3

30Aが所定の高さを有することにより、逆止弁を設けずとも、ラプラス弁317Bの機能により、培地の逆流が防止される。

なお、本実施形態に係る逆流防止機構においては、例えば、仕切り部330Aを用いずとも連絡流路（第1流路）315Aの出口（第1の流路導入口311A）がもう一方の連絡流路（第2流路）315Bの入り口（第1のラプラス弁317A）よりも高い位置に配置することでも機能し、培地の逆流を防止することができる。

[0042] 図13Bに、第1の培養チャンバー302A1を加圧した場合の図を示す。

第1の培養チャンバー302A1を加圧すると、第1の流路導入口311Aから第2のラプラス弁317Bに第1培地331Aが送液される。

同様に、第1の培養チャンバー302A1を加圧することにより、第1のラプラス弁317Aから第2の流路導入口311Bに第2培地331Bが送液される。

図13Bにおいては、第1の流路導入口311A（第1CV部350A1）に存在した第1培地331Aは、全て第2のラプラス弁317B側（第2LV部350B2）に送液される。

このとき、第1の流路導入口311A、第1流路315A、第2のラプラス弁317Bの容量の合計の一例は、20 μ L未満である。第1の培養チャンバー302A1の容量に比べて、第1の流路導入口311A、第1流路315A、第2のラプラス弁317Bの合計の容量に特段の制限はない。一方、第1の培養チャンバー302A1の容量に比べて、第1の流路導入口311A、第1流路315A、第2のラプラス弁317Bの合計の容量が少なければ、第1の培養チャンバー302A1のウェル（第1のウェル）313Aに存在する細胞と接触した培地がより多く第2の培養チャンバー302A2に流入するため、第1の培養チャンバー302A1に存在する細胞より分泌された物質を効率的に第2の培養チャンバー302A2に存在する細胞に作用させることが可能となる。従って、第1の流路導入口311A、第1流路

3 1 5 A、および第2のラプラス弁3 1 7 Bの合計の容量は、第1の培養チャンバーの容量の同程度以下が好ましく、2分の1以下がより好ましく、10分の1以下がさらに好ましい。

[0043] 図1 3 Cにおいては、第1の培養チャンバー3 0 2 A 1において、第1 L V部3 5 0 A 2に存在する第2培地3 3 1 Bは、第1の培養チャンバー3 0 2 A 1の第1のラプラス弁3 1 7 Aに空気が到達するまで、第2の培養チャンバー3 0 2 A 2に送液される。

ラプラス弁3 1 7 Aに空気が到達した場合には、ラプラス弁の機能が働き、第2培地3 3 1 Bの送液が停止する。

このような培地の移動により、第1培地3 3 1 Aと第2培地3 3 1 Bとは混合され、混合培地3 3 1 Cが形成される。

[0044] 図1 3 Dおよび図1 3 Eに示すように、第2の培養チャンバー3 0 2 A 2を加圧すると、上述の図1 3 B、図1 3 Cに係る説明で示した機構と、同様の機構により、第2の培養チャンバー3 0 2 A 2から第1の培養チャンバー3 0 2 A 1に混合培地3 3 1 Cが送液される。

以降、図1 3 Bに示す操作から図1 3 Dに示す操作までを繰り返すことにより混合培地3 3 1 Cは循環し、混合培地3 3 1 Cをより均一に混合することができる（均一な混合培地3 3 1 Cを形成できる）。

[0045] なお、図1 3 A～1 3 Eにおいては、2連培養チャンバー3 0 3 Aを用いた例を示しているが、第1実施形態に示したように、第2実施形態においても4連培養チャンバー式を用いることが可能である。

4連培養チャンバー式を用いた場合にも、2連培養チャンバー3 0 3 Aの例と同様に、ラプラス弁（逆流防止ラプラス弁）を逆流防止機構として用いることにより、第1実施形態に示したような逆止弁を設けずとも、培地の逆流を防止しつつ、各培養チャンバー間における培地の移動が可能であり、各培地の混合が可能である。

すなわち、4連培養チャンバーにおいても、各培養チャンバーを順次加圧することにより、培地循環が可能となる。

[0046] 図13Fは、本実施形態における4連培養チャンバー303Bの一例を示す断面図である。

連結した4連培養チャンバー303Bは、第1の培養チャンバー1302A1、第2の培養チャンバー1302A2、第3の培養チャンバー1302A3、および第4の培養チャンバー1302A4を有する。

当該第1の培養チャンバー1302A1の底部は、第1の仕切り部1330Aにより、第1の流路導入口1311Aが設けられた部位（第1CV部）1350A1と、第1のラプラス弁1317Aおよび第1のウェル1313Aが設けられた部位（第1LV部）1350A2とに分けられている。

同様に、当該第2の培養チャンバー1302A2の底部は、第2の仕切り部1330Bにより、第2の流路導入口1311Bが設けられた部位（第2CV部）1350B1と、第2のラプラス弁1317Bおよび第2のウェル1313Bが設けられた部位（第2LV部）1350B2とに分けられている。

同様に、当該第3の培養チャンバー1302A3の底部は、第3の仕切り部1330Cにより、第3の流路導入口1311Cが設けられた部位（第3CV部）1350C1と、第3のラプラス弁1317Cおよび第3のウェル1313Cが設けられた部位（第3LV部）1350C2とに分けられている。

さらに、当該第4の培養チャンバー1302A4の底部は、第4の仕切り部1330Dにより、第4の流路導入口1311Dが設けられた部位（第4CV部）1350D1と、第4のラプラス弁1317Dおよび第4のウェル1313Dが設けられた部位（第4LV部）1350D2とに分けられている。

また、第1の培養チャンバー1302A1における第1の流路導入口1311Aと、第2の培養チャンバー1302A2における第2のラプラス弁1317Bと、は第1流路1315Aで接続されている。

また、第2の培養チャンバー1302A2における第2の流路導入口13

1 1 Bと、第3の培養チャンバー1 3 0 2 A 3における第3のラプラス弁1 3 1 7 Cと、は第2流路1 3 1 5 Bで接続されている。

また、第3の培養チャンバー1 3 0 2 A 3における第3の流路導入口1 3 1 1 Cと、第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 4における第4のラプラス弁1 3 1 7 Dと、は第3流路1 3 1 5 Cで接続されている。

さらに、第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 4における第4の流路導入口1 3 1 1 Dと、第1の培養チャンバー1 3 0 2 A 1における第1のラプラス弁1 3 1 7 Aと、は第4流路1 3 1 5 Dで接続されている。

[0047] 上述のように構成された本実施形態における4連培養チャンバー3 0 3 Bにおいて、第1～第4のウェル1 3 1 3 A～1 3 1 3 Dのそれぞれに細胞を播種し、第1～第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 1～1 3 0 2 A 4のそれぞれに培地を加える。そして、2連培養チャンバー3 0 3 Aの例と同様に、第1～第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 1～1 3 0 2 A 4のそれぞれを順次加圧することにより、培地の逆流を防止しつつ、第1～第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 1～1 3 0 2 A 4間における培地の移動が可能であり、各培地の混合が可能である。

本実施形態に係る4連培養チャンバー3 0 3 Bを用いることにより、例えば、第1のチャンバー1 3 0 2 A 1に存在する細胞より分泌された物質を効率的に、第2の培養チャンバー1 3 0 2 A 2に存在する細胞に作用させることが可能となる。さらに、第2の培養チャンバー1 3 0 2 A 2に存在する細胞より分泌された物質を効率的に、第3の培養チャンバー1 3 0 2 A 3に存在する細胞に作用させることが可能となる。加えて、第3の培養チャンバー1 3 0 2 A 3に存在する細胞より分泌された物質を効率的に、第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 4に存在する細胞に作用させることが可能となる。そして、第4の培養チャンバー1 3 0 2 A 4に存在する細胞より分泌された物質を効率的に、第1の培養チャンバー1 3 0 2 A 1に存在する細胞に作用させることが可能となる。

このように、本実施形態に係る4連培養チャンバー3 0 3 Bを用いること

により、第1～第4の培養チャンバー1302A1～1302A4の間において、それぞれ配置された細胞より分泌された物質を順次サイクルさせることができる。

本実施形態に係る4連培養チャンバー303Bによれば、例えば、第1実施形態に係る図8において示した4連培養チャンバー型の4ユニットシステム8Bのように、肺19C、肝臓19A、腎臓19D、脂肪19Eのモデルとなるような細胞を導入して4臓器連結モデル3Bと同様に、細胞間の影響を評価することができる。

[0048] 本実施形態に係る4連培養チャンバー303Bにおける第1～第4の培養チャンバー1302A1～1302A4、第1～第4のラプラス弁1317A～1317D、第1～第4の流路導入口1311A～1311D、および第1～第4流路1315A～1315Dなどの各構成要素の容量、寸法等は、本実施形態の2連培養チャンバー303Aにおいて説明した上述の例と同様であってよい。

本実施形態においては、2連培養チャンバーおよび4連培養チャンバーの例について言及したが、2つ以上の培養チャンバーを有していればよく、培養チャンバーの数はこれらに限定されない。

[0049] 以下、本発明の第3実施形態に係る細胞培養装置を、図面に基づいて説明する。

[0050] 図14および図15は、本実施形態における細胞培養装置における4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの動作原理と4連培養チャンバー系のマルチユニットシステムの使用方法を説明した図である。

本実施形態において上述した第1実施形態と異なるのは、(1) 上述の第1実施形態における逆止弁11に代えて、ラプラス弁（逆流防止ラプラス弁）417を逆流防止機構として用いた点、および、(2) 図14に示すような4連培養チャンバーを用いている点であり、当該(1)および(2)以外の対応する構成に関しては、第1実施形態と同様であるため、その説明を省略する。

図 1 4 および図 1 5 に示す本実施形態に係る空気圧駆動型の培地循環方式の細胞培養装置について、以下に説明する。

[0051] 図 1 4 は、上から (1) 本実施形態に係る 4 連培養チャンバー 4 0 3 の流路を示す上面図、(2) 4 連培養チャンバー 4 0 3 の構成要素の結合を単純化した図、および (3) 4 連培養チャンバー 4 0 3 の断面模式図である。

図 1 5 は、本実施形態に係る 4 連培養チャンバー 4 0 3 を用いた場合における空気圧駆動型の培地循環方式の細胞培養装置の動作概念図である。

[0052] 図 1 5 (A) に示すように、4 連培養チャンバー 4 0 3 には、第 1 ～第 4 の培養チャンバー 4 0 2 A ～ 4 0 2 D が設けられている。

また、第 1 ～第 4 の培養チャンバー 4 0 2 A ～ 4 0 2 D には、それぞれ第 1 ～第 4 のウェル 4 1 3 A ～ 4 1 3 D が設けられている。

まず、図 1 5 (A) に示すように、第 1 ～第 4 のウェル 4 1 3 A ～ 4 1 3 D の各ウェルに細胞 4 1 9 を播種して接着させる。

[0053] 次に、図 1 5 (B) に示すように、第 2 のウェル 4 1 3 B に培地 4 3 1 を注ぐ。

[0054] 次に、図 1 5 (C) に示すように、第 1 の培養チャンバー 4 0 2 A、第 2 の培養チャンバー 4 0 2 B、および第 4 の培養チャンバー 4 0 2 D を加圧する。

なお、この際加圧する圧力は、第 1 ～第 4 の培養チャンバー 4 0 2 A ～ 4 0 2 D 間において略等圧であり、4 連培養チャンバー 4 0 3 に設けたラプラス弁 4 1 7 におけるラプラス圧よりも低い圧力である。

このとき、図 1 5 (C) に示すように、第 1 の培養チャンバー 4 0 2 A および第 4 の培養チャンバーに存在する培地の培地表面は、ラプラス弁が設けられた位置よりも低い位置にあるため、培地の流出は生じない。

また、ラプラス圧よりも低い圧力による加圧を行っているため、ラプラス弁 4 1 7 が機能して、流路 4 1 5 への空気の流入も生じない。

さらに、第 1 の培養チャンバー 4 0 2 A と第 2 の培養チャンバー 4 0 2 B とは等圧で加圧されているため、第 2 の培養チャンバー 4 0 2 B から第 1 の

培養チャンバー４０２Ａへの培地の移送は生じない。

図１５（Ｃ）に示すように、第２の培養チャンバー４０２Ｂに注いだ培地４３１は、大気開放されている第３の培養チャンバー４０２Ｃのみに移送される。

[0055] 次に、図１５（Ｄ）に示すように、図１５（Ｃ）に示したような培養チャンバーの加圧操作を繰り返すことにより、培地の片道循環を行うことができる。

当該培養チャンバーの加圧操作および培地の片道循環を繰り返すことにより、各チャンバーにおける培地の混合を促進することができる。

本実施形態では、第１～第４の培養チャンバー４０２Ａ～４０２Ｄを設けた例を示したが、３つ以上の培養チャンバーがあれば、同様の操作が可能である。

本実施形態に係る培養チャンバーは、３つ以上の培養チャンバーを有していればよく、４連培養チャンバーに限定されない。

実施例

[0056] 次に、本発明の上記実施形態に係る細胞培養装置１について、実施例を示して詳細に説明する。なお、下記の実施例は、本発明が適用された具体的な一例であり、本発明を何ら限定しない。

[0057] 肝臓と癌組織の共培養モデルとして肝癌細胞ＨｅｐＧ２（肝臓モデル）および大腸癌細胞ＨＣＴ１１６（大腸癌細胞）の培養を２臓器×８連の培養システム（細胞培養装置）を用いて行った。培養プレート内の各細胞の配置を図１６Ａに示す。なお、図１６Ａに示す図は、図７の２臓器連結モデル３Ａに対応している。

図１６Ａに示すように、細胞培養装置の横方向に沿って配置され、かつ、縦方向における第１列目の培養チャンバー群に肝癌細胞ＨｅｐＧ２（肝臓モデル）を配置した。

細胞培養装置の横方向に沿って配置され、かつ、縦方向における第２列目の培養チャンバー群に大腸癌細胞ＨＣＴ１１６を配置した。

また、細胞培養装置の横方向に沿って配置され、かつ、縦方向における第3列目の培養チャンバー群に肝癌細胞HepG2（肝臓モデル）を配置した。

細胞培養装置の横方向に沿って配置され、かつ、縦方向における第4列目の培養チャンバー群に大腸癌細胞HCT116を配置した。

また、肝癌細胞HepG2（肝臓モデル）および大腸癌細胞HCT116（大腸癌細胞）の培養スケジュールを図16Bに示す。

HepG2を培養するウェルをCollagen Type I（Cell Matrix、新田ゼラチン）でメーカーの提供するプロトコルに従ってコートした。

大腸癌細胞HCT116を培養するウェルはFibronectin溶液（28.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）50 μl でコートした。

Fibronectin溶液によるコート後、各ウェルを培養培地で洗浄し、細胞を播種した。この際に、HepG2細胞は100万cells/ ml の濃度でWilliam's E培地中に懸濁させ、HCT116は10万cells/ ml の濃度でMEM培地中に懸濁させ、各ウェル50 ml 液量で添加した。

細胞を播種して3時間後に各ウェルの存在する培養チャンバー毎に300 ml ずつの培養培地を添加した。この際に、HepG2を含むチャンバーにはWilliam's E培地を添加し、HCT116を含むチャンバーにはMEM培地を添加した。

オーバーナイトで静置培養した後に各チャンバーの培地をWilliam's E培地300 ml に置換し、循環培養を行った。

循環培養はHepG2を添加したチャンバーとHCT116を添加したチャンバーに対して4 kPaの加圧を10分おきに繰り返すことによって行った。

循環培養を開始する直前（Day 1）のHepG2の細胞の写真を図17Aに示す。

循環培養を開始する直前（D a y 1）のH C T 1 1 6の細胞の写真を図 1 7 B に示す。

循環培養を48時間行った後のH e p G 2の細胞の写真を図 1 7 C に示す。

循環培養を48時間行った後のH C T 1 1 6の細胞の写真を図 1 7 D に示す。

H e p G 2およびH C T 1 1 6の両細胞ともに循環培養の間、ウェルの底面に接着している様子が観察され、H C T 1 1 6細胞は増殖している様子が観察された。

なお、循環培養を行う際に使用する培地（W i l l i a m' S E培地300ml）にモデル化合物を添加することで、モデル化合物の肝臓と癌への影響を同時に評価すること、および、臓器間相互作用をリアルタイムに反映した状態で評価することが可能となる。

産業上の利用可能性

[0058] 本発明の細胞培養装置および細胞培養方法を利用すれば、医薬品や化成品の薬効や毒性、および吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態を、培養細胞を用いて分析することが可能となる。また、本発明は、動物実験代替法として、医薬品や化成品の分析に利用することができる。

符号の説明

- [0059] 1、101 細胞培養装置（B o d y - o n - a - C h i pユニット）
- 1A、101A 本体（槽本体）
- 2、2A、2A1～2A4、2B、2B1～2B4、2C1～2C4、2D1～2D4、102A～102D、302A1、302A2、402A～402D、1302A1～1302A4 培養チャンバー（臓器モデル培養チャンバー）
- 3A、303A 2連培養チャンバー（2臓器連結モデル、2連培養チャンバー型PDMSプレート）
- 3B、303B、403 4連培養チャンバー（4臓器連結モデル、4連

培養チャンバー型PDMSプレート)

4、15、15A、15B、115、115A～115D、315A、315B、415 連絡流路（マイクロ流路、臓器連結マイクロ流路）

5、5A～5D 空圧配管（加圧ライン、圧力配管ライン）

6 蓋（加圧蓋）

7 貫通孔板

7A 壁面（壁部、培養チャンバーの壁面、貫通孔板およびチャンバーの内壁）

8 マイクロ流路プレート

8A 2臓器×8連プレート（2連培養チャンバー型の8ユニットシステム、底部プレート）

8B 4臓器×4連プレート（4連培養チャンバー型の4ユニットシステム、底部プレート）

9 ホルダー（基体部）

11、11A、11B、111A～111D 逆止弁（チェックバルブ）

12、12A、12B、112 上流口

13、13A、13B、113、113A～113D、313A、313B、413A～413D、1313A～1313D ウェル

14、14A、14B、114、114A～114D 下流口

16、16A、16B、116 抵抗流路

17、17A、17B、317、317A、317B、417、417A～417D、1317A～1317D ラプラス弁

19A 肝臓

19B がん

19C 肺

19D 腎臓

19E 脂肪

20 第1の留め金（蓋部押圧部、押圧部材）

20A 第2の留め金（壁部押圧部、押圧部材）

21 封止材

22A、22B、122A～122D エアフィルター

135、135A～135D フィルター（加圧装置）

201A1 細胞培養装置の正面断面図（組み立て前）

201B1 細胞培養装置の側面断面図（組み立て前）

201A2 細胞培養装置の正面断面図（組み立て後）

201B2 細胞培養装置の側面断面図（組み立て後）

201C 細胞培養装置の上面図

311A、311B、1311A～1311D 流路導入口

330A、330B、1330A～1330D 仕切り部

331A、331B、431 培地

331C 混合培地

350A1、350B1、1350A1～1350D1 CV部（流路導入口が設けられた部位）

350A2、350B2、1350A2～1350D2 LV部（ラプラス弁およびウェルが設けられた部位）

419 細胞

請求の範囲

[請求項1]

細胞培養装置であって、

播種された細胞が保持される細胞保持部と、それぞれに前記細胞保持部を有し、かつ、液体培地が貯留され、第1方向に沿って並列配置された m 個の培養チャンバーと、前記 m 個の培養チャンバー間を互いに連通する1以上の連絡用流路と、を有し、前記 m 個の培養チャンバーと前記連絡用流路とからユニットが構成され、 n 個の前記ユニットが前記第1方向とは異なる方向である第2方向に沿って並列配置された連結培養容器と、

前記連結培養容器において、前記第2方向に沿って同列に配置された同列配置培養チャンバー間を連通し、前記同列配置培養チャンバー間に同時に加圧可能または同時に大気圧開放可能であり、前記 m 個の培養チャンバー内の圧力差により前記連絡用流路を通して前記液体培地を、前記 m 個の培養チャンバーの間で液送可能な複数の空圧配管と、

を備え、

前記 m は2以上の整数であり、前記 n は2以上の整数である

細胞培養装置。

[請求項2]

前記連絡用流路から前記 m 個の培養チャンバーへの流れの方向を制御可能な逆流防止機構を前記連絡用流路の末端もしくは内部に備える請求項1に記載の細胞培養装置。

[請求項3]

前記 m 個の培養チャンバーは、前記 m 個の培養チャンバーのそれぞれに、液体培地を貯留する容器状の槽本体と、前記槽本体の開口を開閉自在かつ気密に閉止する蓋部と、を有する請求項1または2に記載の細胞培養装置。

[請求項4]

前記蓋部を前記槽本体に向けて押さえつけるように保持可能な蓋部押圧部をさらに備え、

前記蓋部押圧部は、前記槽本体を支持する基体部と、前記基体部に

支持された前記槽本体に向けて前記蓋部を押圧する押圧部材と、を有する請求項 3 に記載の細胞培養装置。

[請求項5] 前記槽本体が壁部と、連絡用流路を備えた底部プレートとを有する請求項 4 に記載の細胞培養装置。

[請求項6] 前記壁部を前記底部プレートに向けて押さえつけて保持する壁部押圧部をさらに備え、

前記壁部押圧部は、前記基体部と前記基体部とに支持された前記底部プレートに向けて前記壁部を押圧する押圧部材を有する請求項 5 に記載の細胞培養装置。

[請求項7] 前記空圧配管を通して前記各培養チャンバーに予め設定されたスケジュールに従って、順次加圧あるいは大気圧開放可能な加圧装置を備える請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[請求項8] 前記培養チャンバーから前記連絡用流路に接続する部位に界面張力によって空気の流入を防止可能なラプラス弁を備える請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[請求項9] 前記ラプラス弁を構成するマイクロ流路の幅が w_L であり、前記マイクロ流路の深さが h_L であり、前記界面張力が γ であり、前記ラプラス弁のラプラス圧が ΔP_{Lap} であるとき、

前記ラプラス圧が $\Delta P_{Lap} = 2\gamma (1/w_L + 1/h_L)$ の式で表され、

前記ラプラス圧 ΔP_{Lap} が前記連結培養容器に加圧される圧力よりも大きくなるように、前記マイクロ流路が構成された請求項 8 に記載の細胞培養装置。

[請求項10] 前記連絡用流路の一部に流量を調節するために、前記連絡用流路の流路断面積に対して、流路断面積が $1/10$ 以下である抵抗流路部位を備えた請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[請求項11] 前記逆流防止機構が逆止弁である請求項 2 に記載の細胞培養装置。

[請求項12] 前記逆流防止機構として、逆流防止ラプラス弁を備える請求項 2 に

記載の細胞培養装置。

[請求項13]

細胞培養方法であって、

mおよびnが2以上の整数であるとき、m個の培養チャンバーを1以上の連絡用流路で互いに連通し、前記m個の培養チャンバーのそれぞれが第1方向に沿って並列配置された1ユニットの連結培養容器をnユニット備え、前記nユニットの前記連結培養容器が前記第1方向とは異なる方向である第2方向に沿って並列配置された細胞培養装置を準備し、

前記連結培養容器の蓋を開き、前記細胞培養装置の各培養チャンバー内に細胞を播種して接着させる第1工程と、

前記細胞培養装置において、前記第2方向に沿って同列に配置された前記第1方向における1列目の培養チャンバーに液体培地を満たし、前記蓋を閉じる第2工程と、

前記1列目の培養チャンバー内を加圧し、前記第2方向に沿って同列に配置された前記第1方向における2列目の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて前記1列目の培養チャンバーから前記2列目の培養チャンバーに送液する第3工程と、

前記第1方向における列番号を順次1つずつ増やして加圧と大気圧開放を行うことにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて、前記第1方向におけるm-1列目の培養チャンバーからm番目の培養チャンバーに送液する第4工程と、

前記m列目の位置の培養チャンバー内を加圧し、かつ、前記1列目の培養チャンバー内を大気圧開放することにより、前記液体培地を前記連絡用流路を通じて前記m列目の位置の培養チャンバーから前記1列目の位置の培養チャンバーに送液する第5工程と、

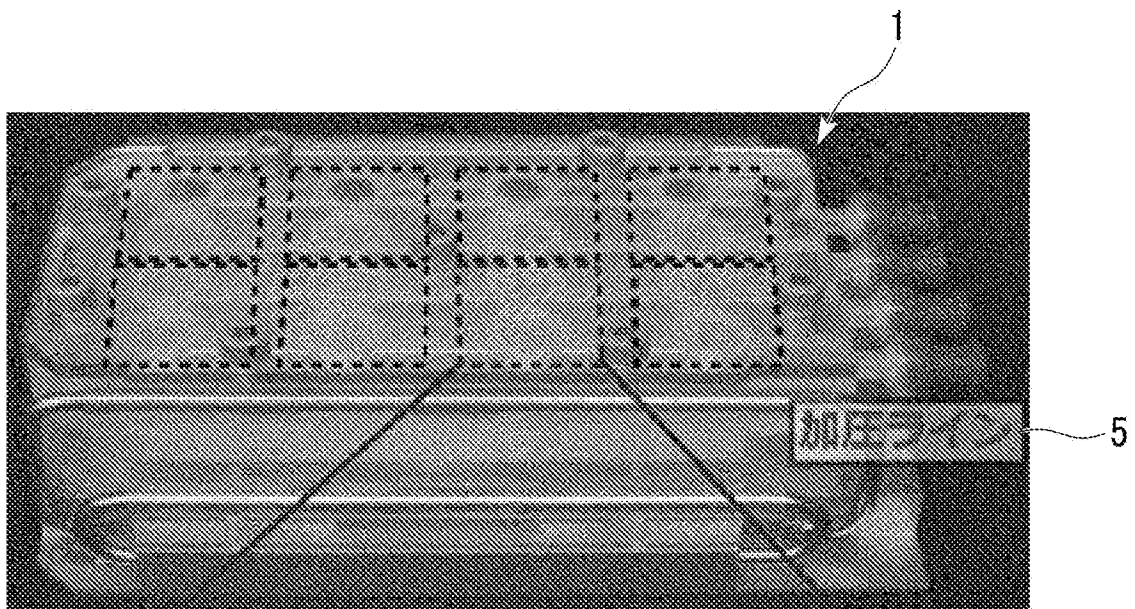
前記第3工程から前記第5工程を繰り返すことにより前記細胞培養装置の前記各培養チャンバー内に前記液体培地を循環させる第6工程

と、

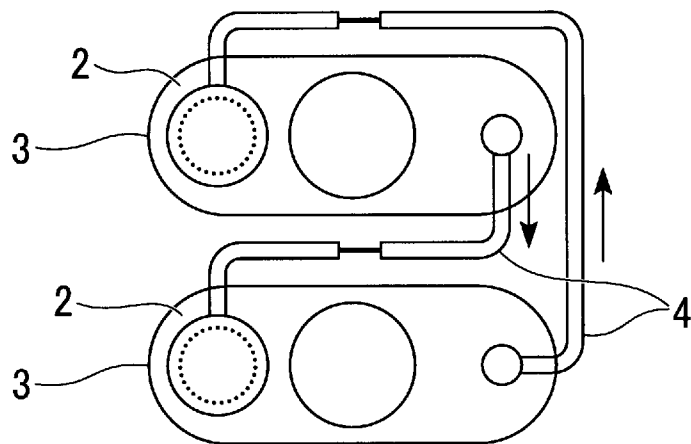
を含む細胞培養方法。

[請求項14] 請求項1～12のいずれか1項に記載の細胞培養装置に細胞を入れた評価システム。

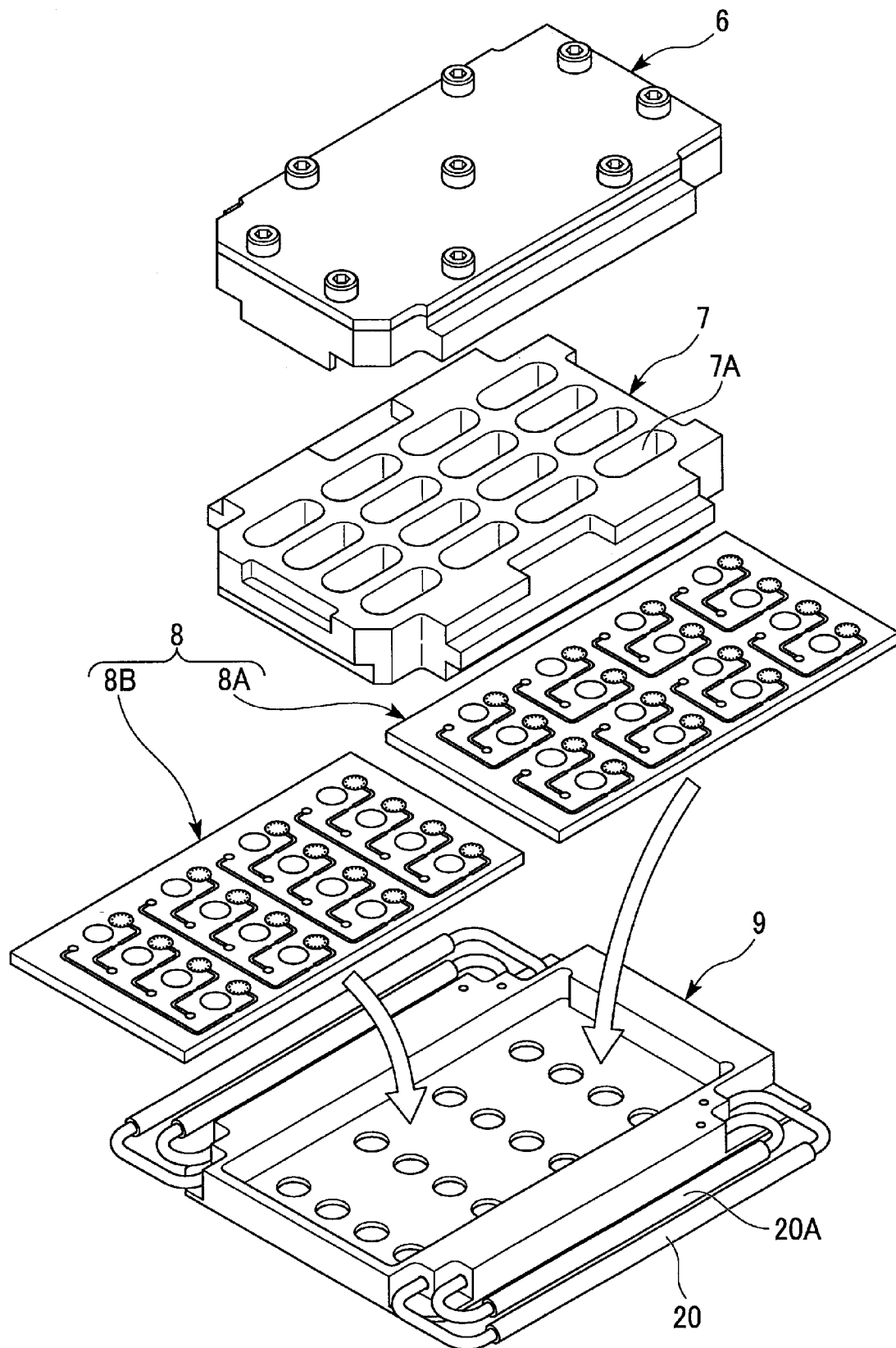
[図1A]



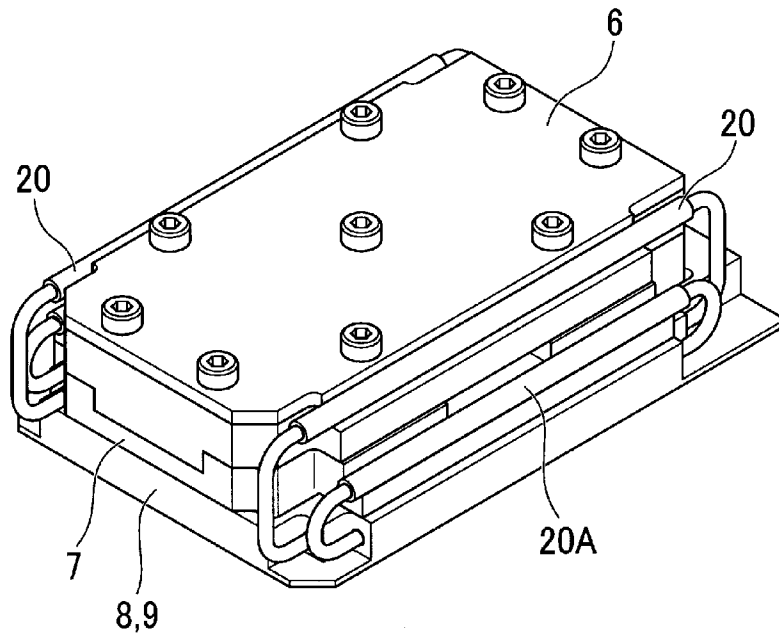
[図1B]



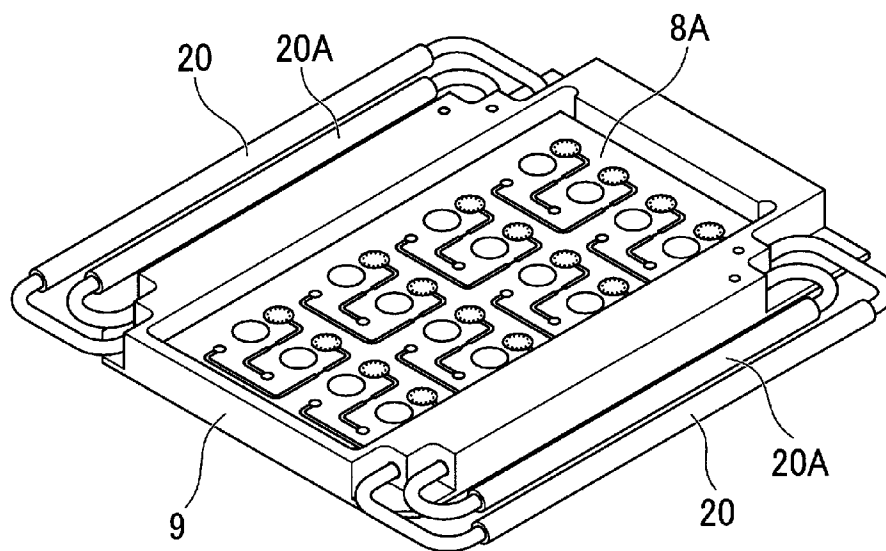
[図2A]



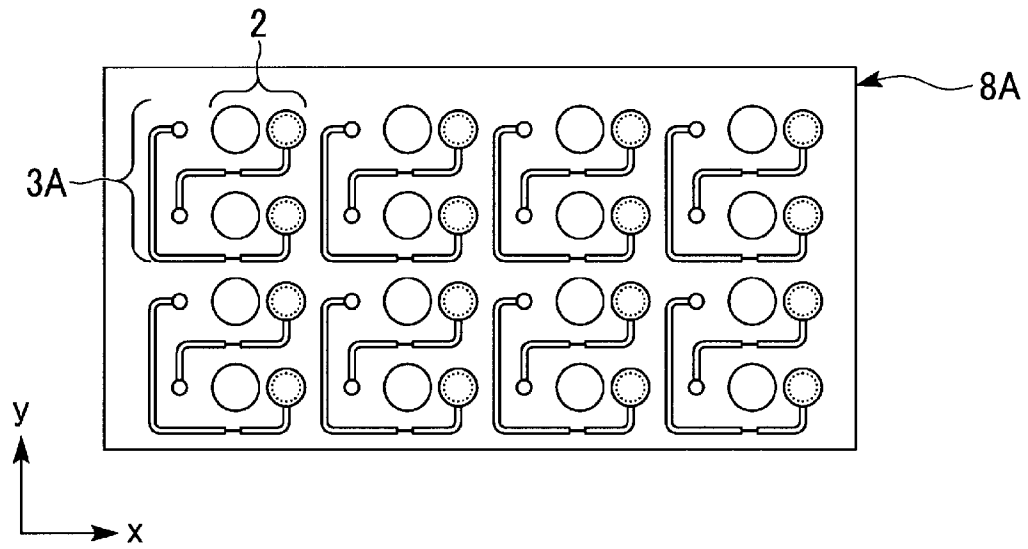
[図2B]



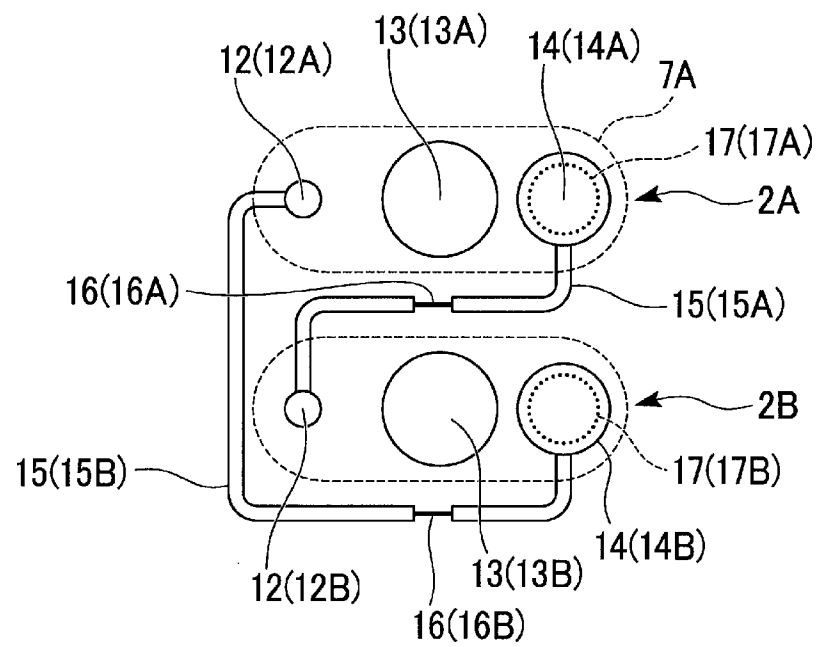
[図2C]



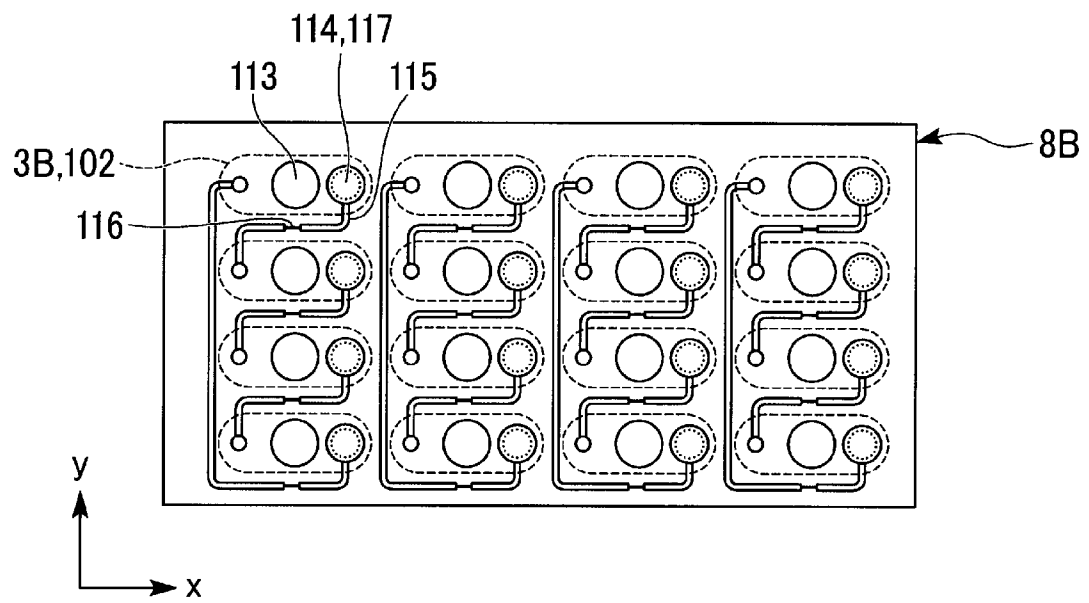
[図3]



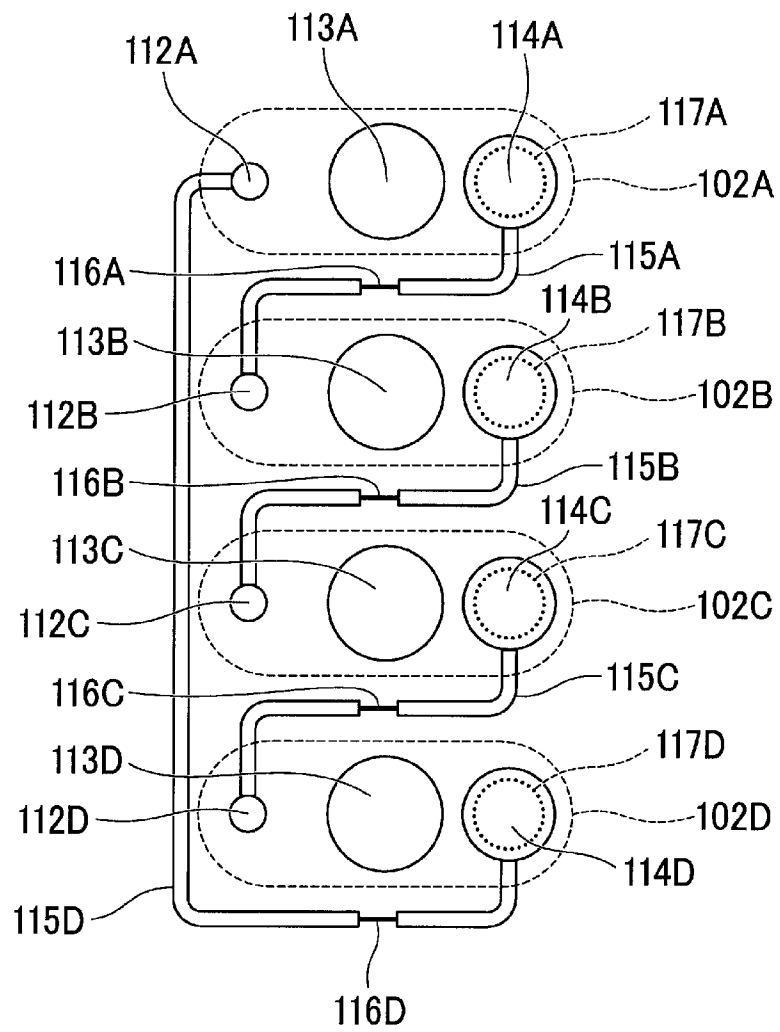
[図4]



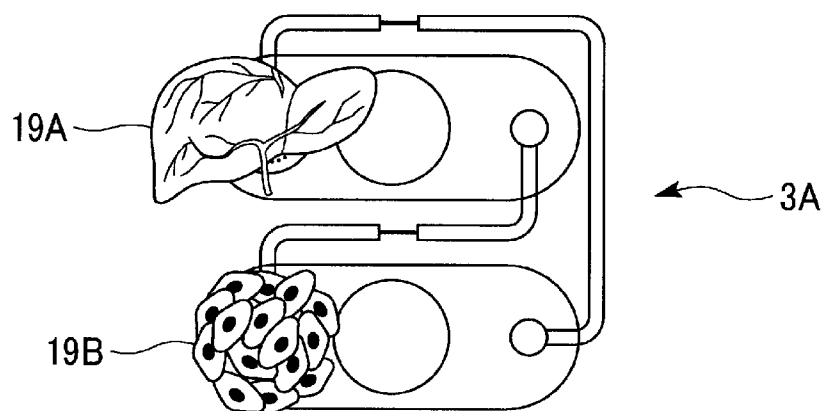
[図5]



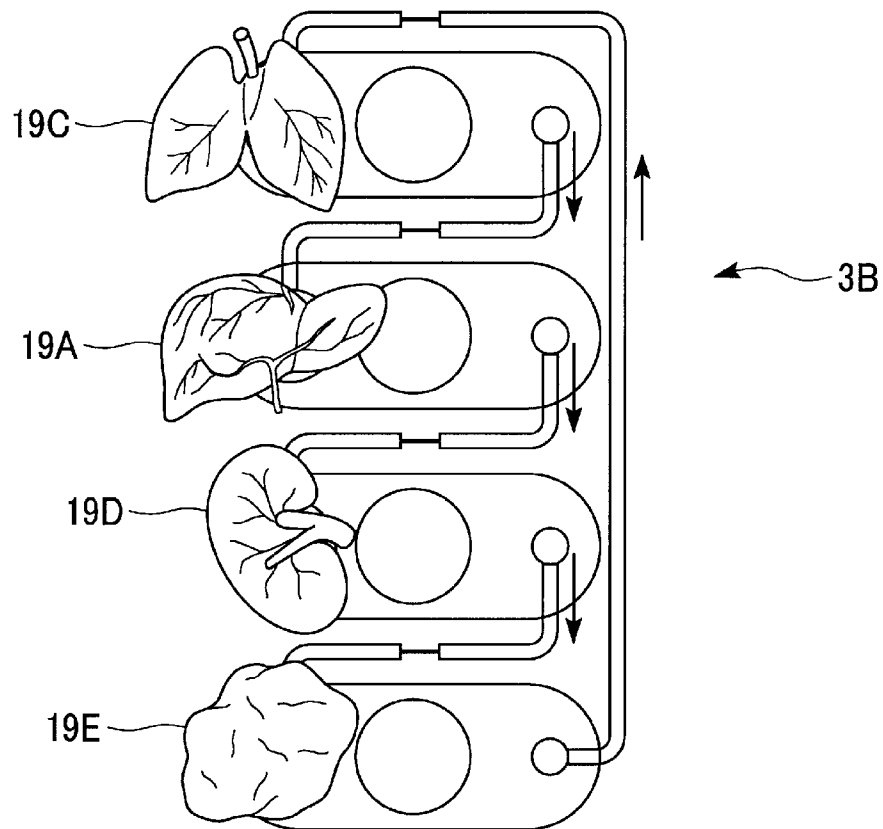
[図6]



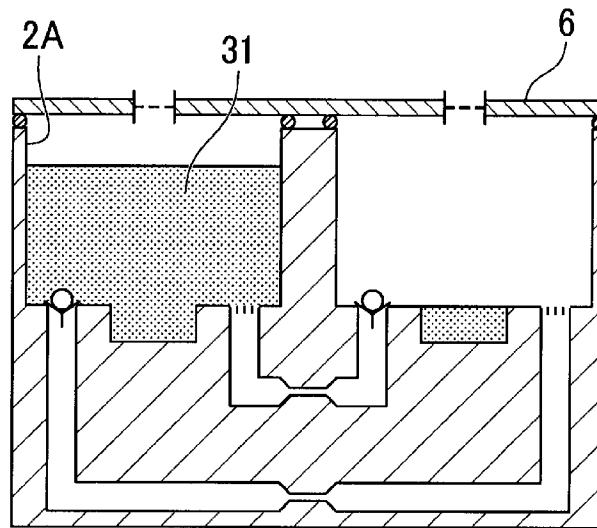
[図7]



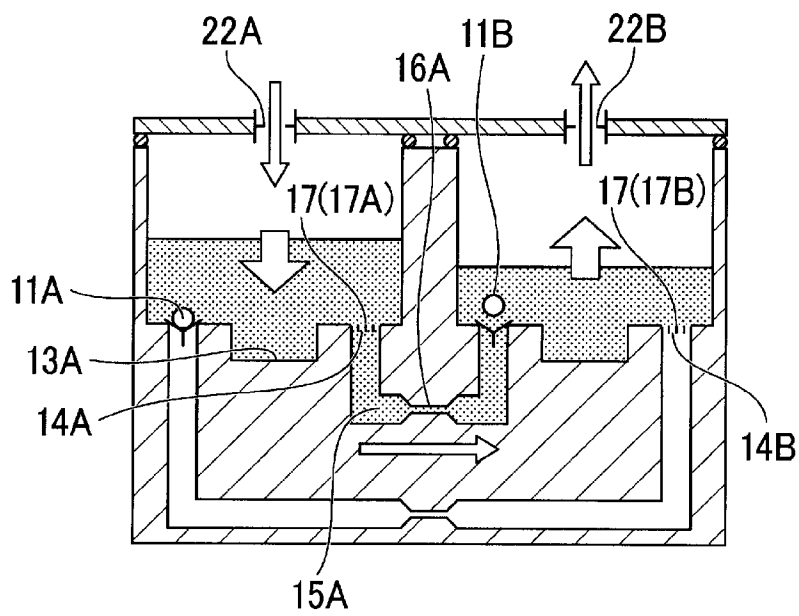
[図8]



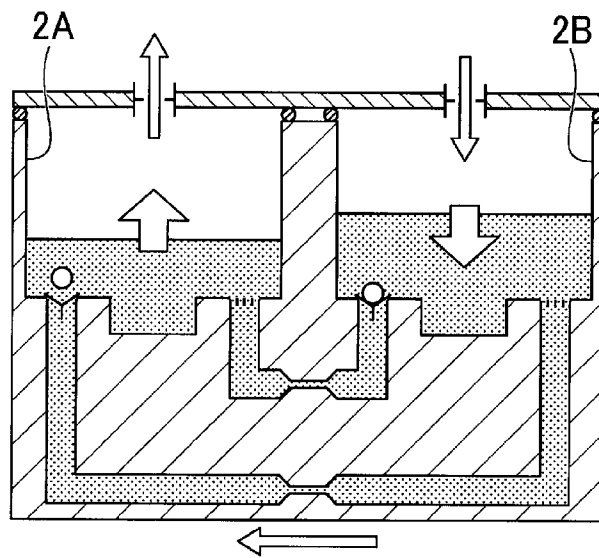
[図9C]



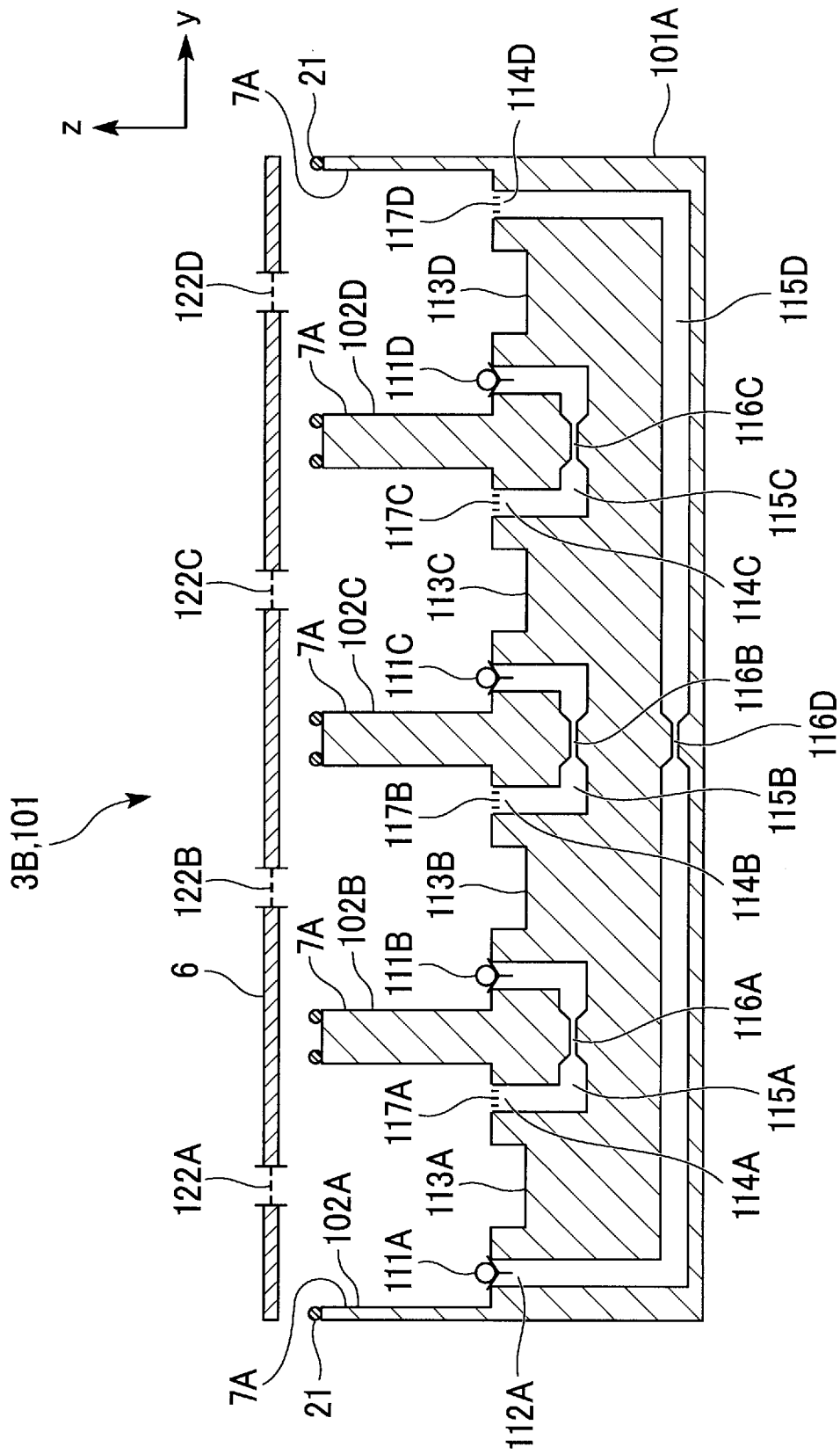
[図9D]



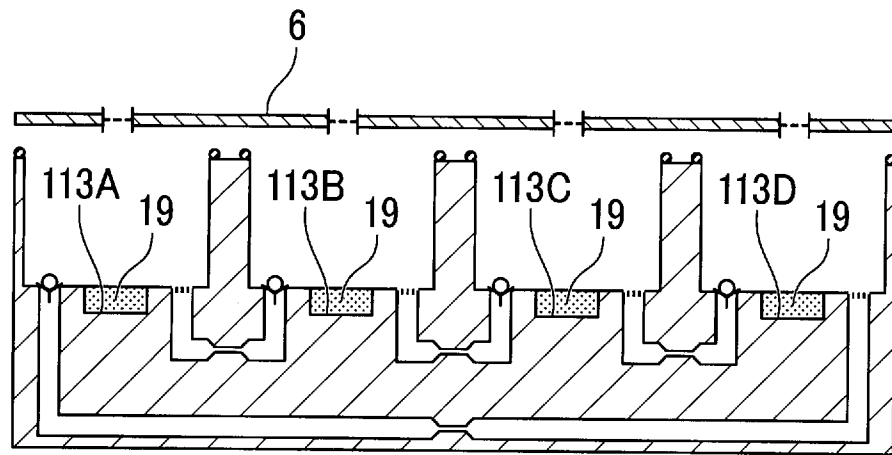
[図9E]



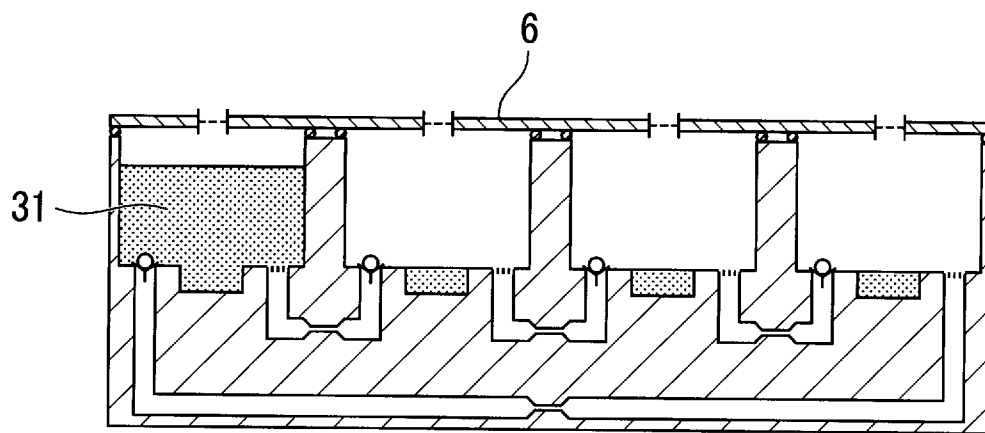
[図10A]



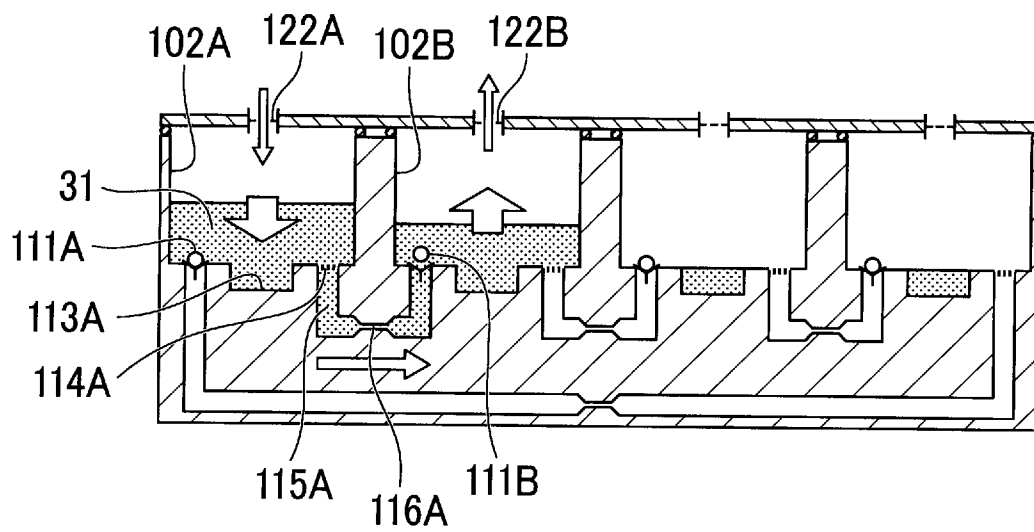
[図10B]



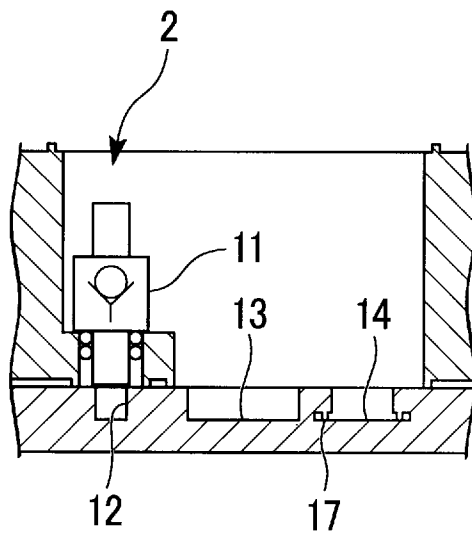
[図10C]



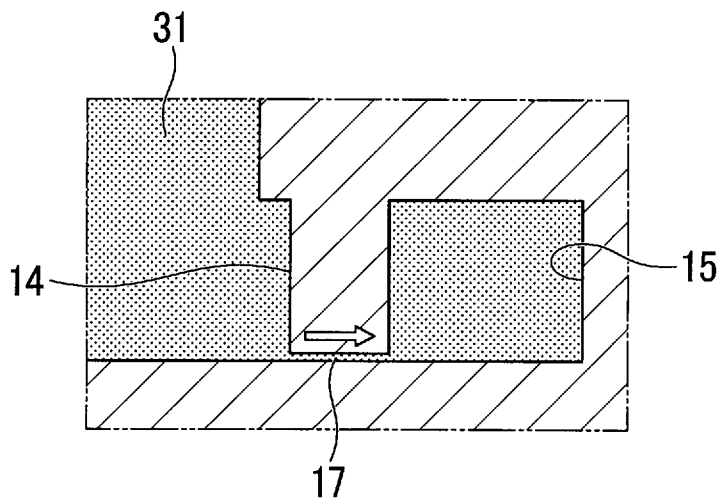
[図10D]



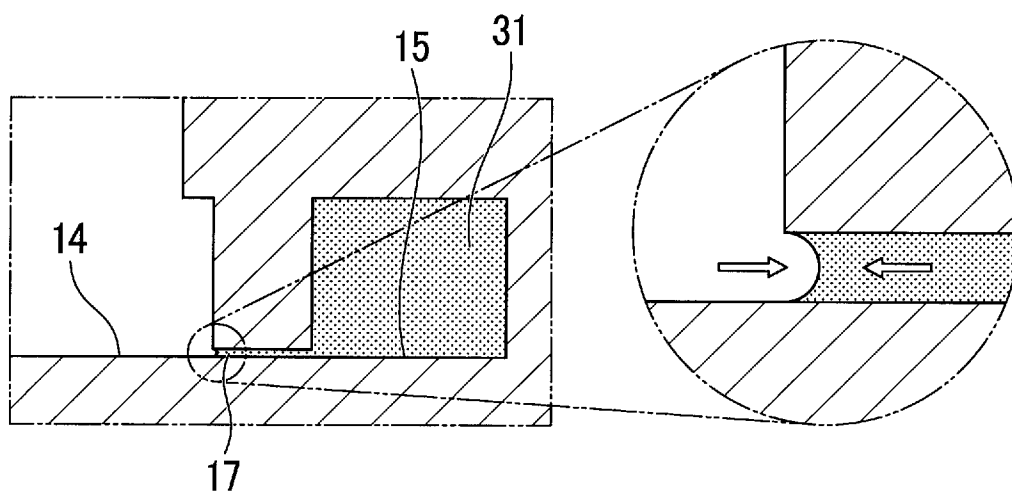
[図11A]



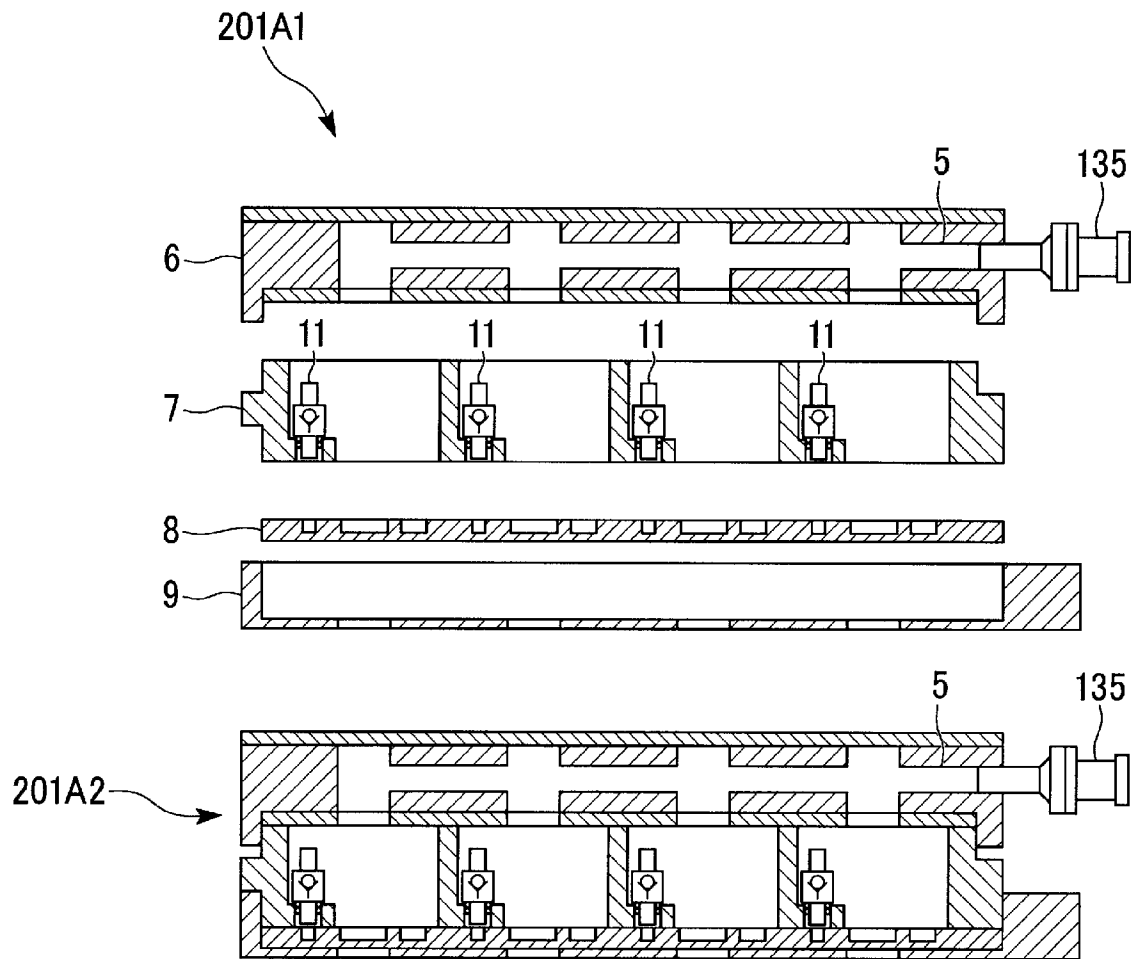
[図11B]



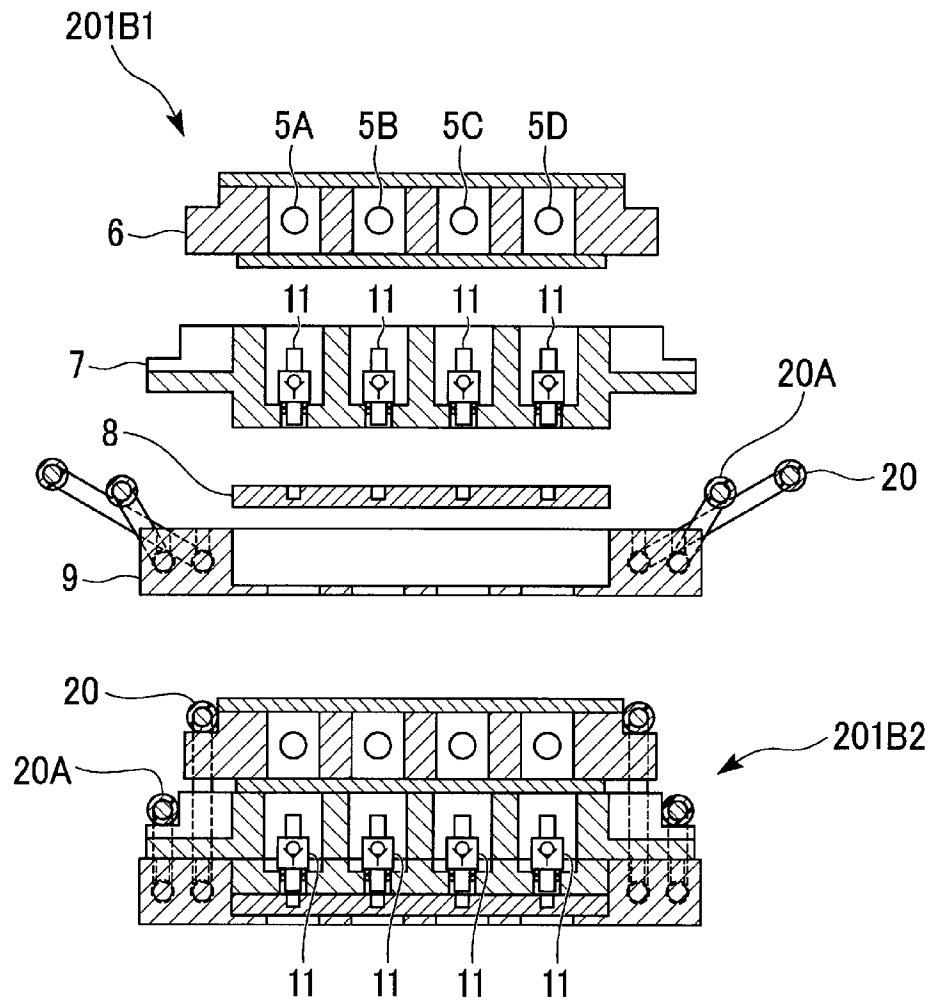
[図11C]



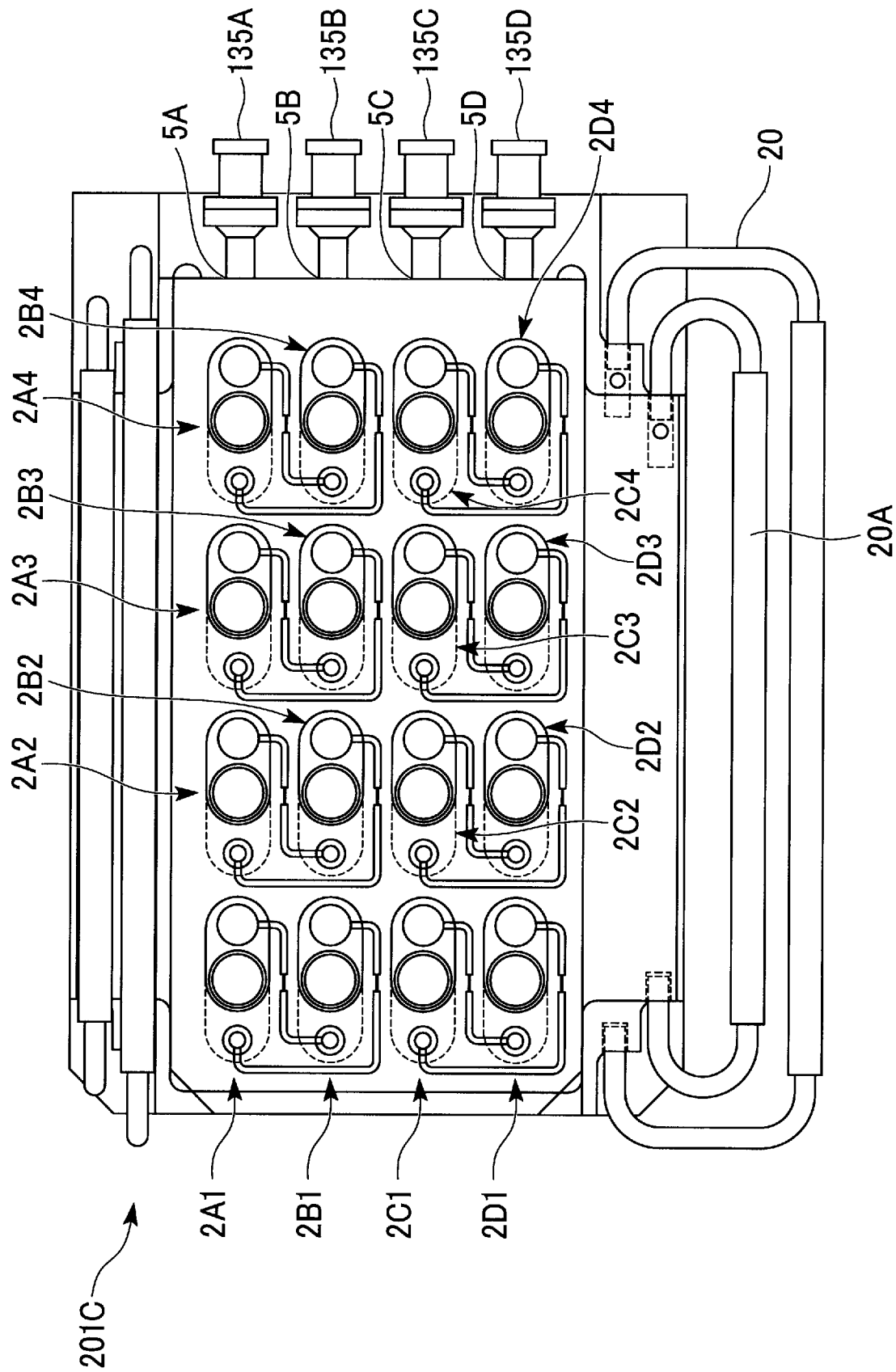
[図12A]



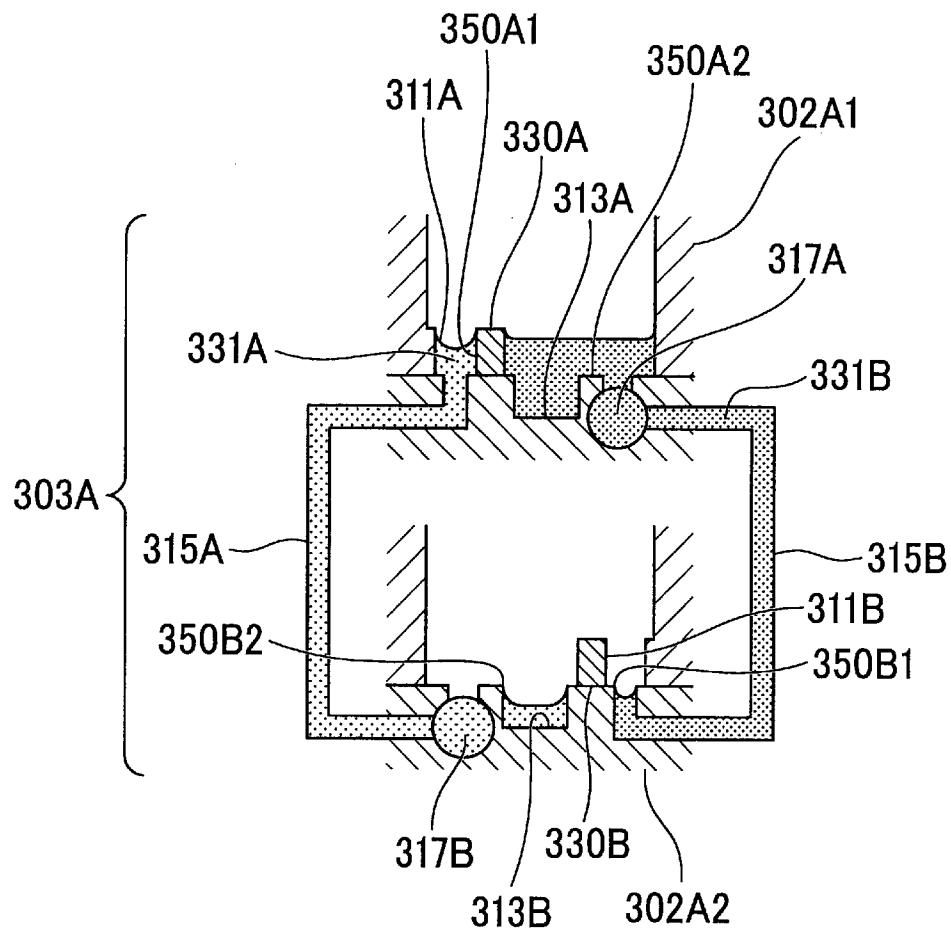
[図12B]



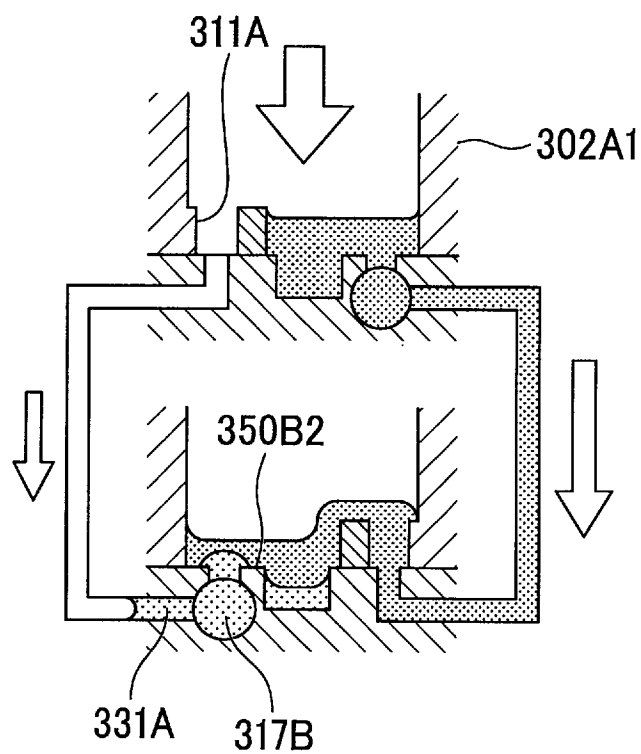
[図12C]



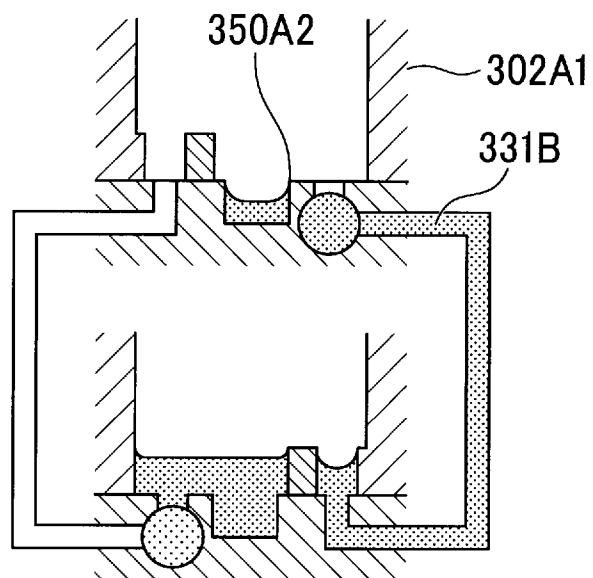
[図13A]



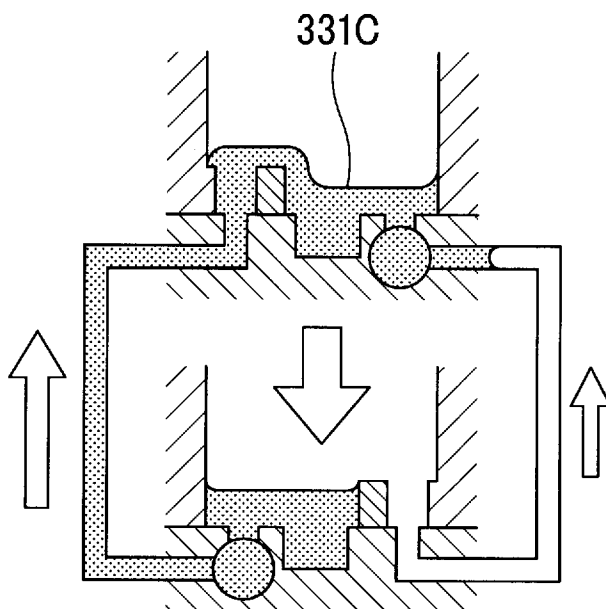
[図13B]



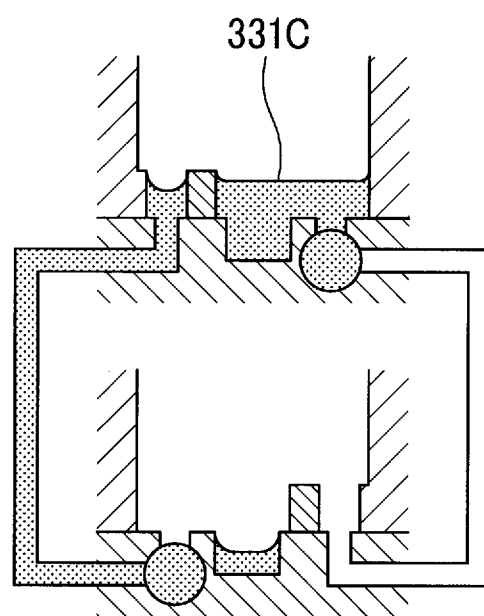
[図13C]



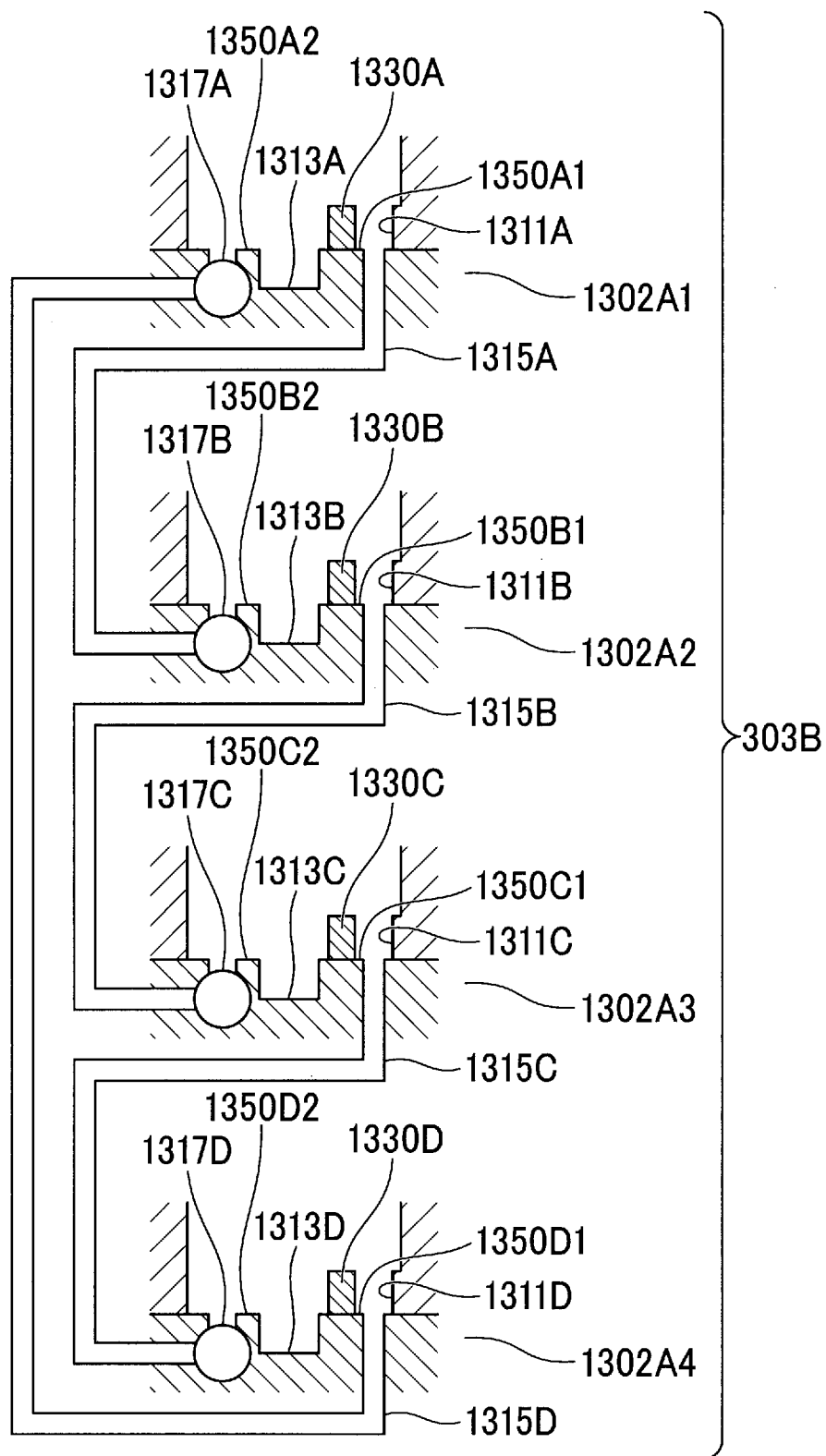
[図13D]



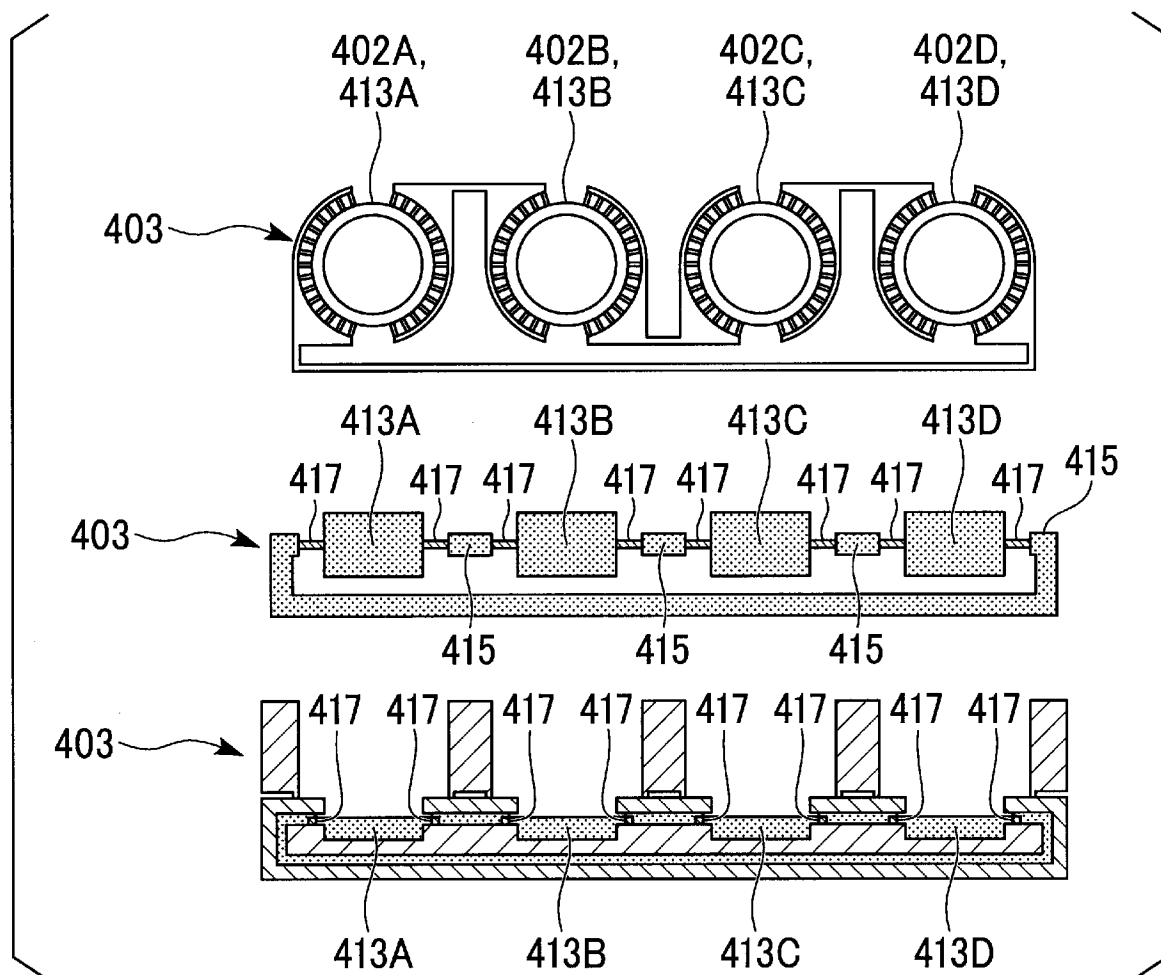
[図13E]



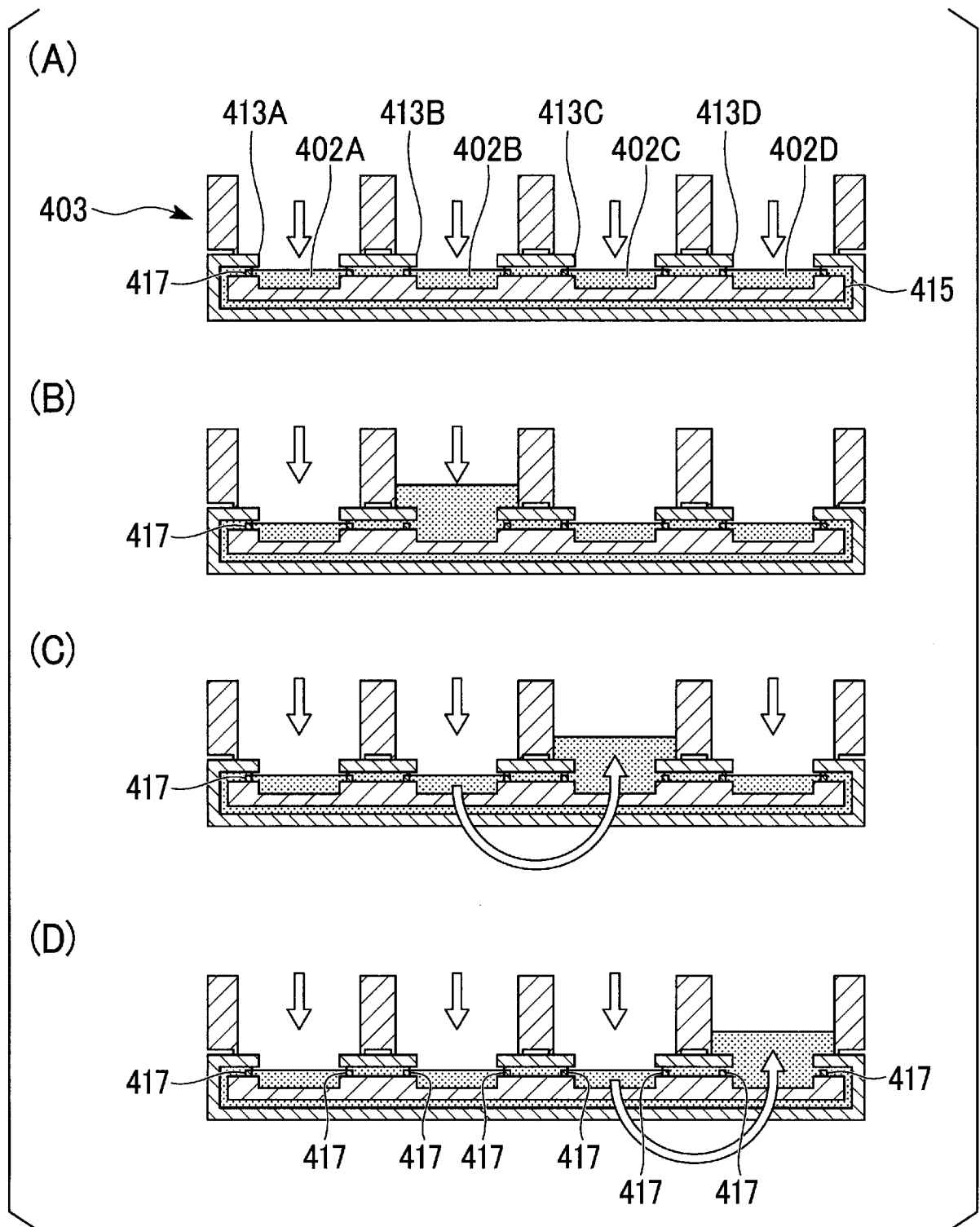
[図13F]



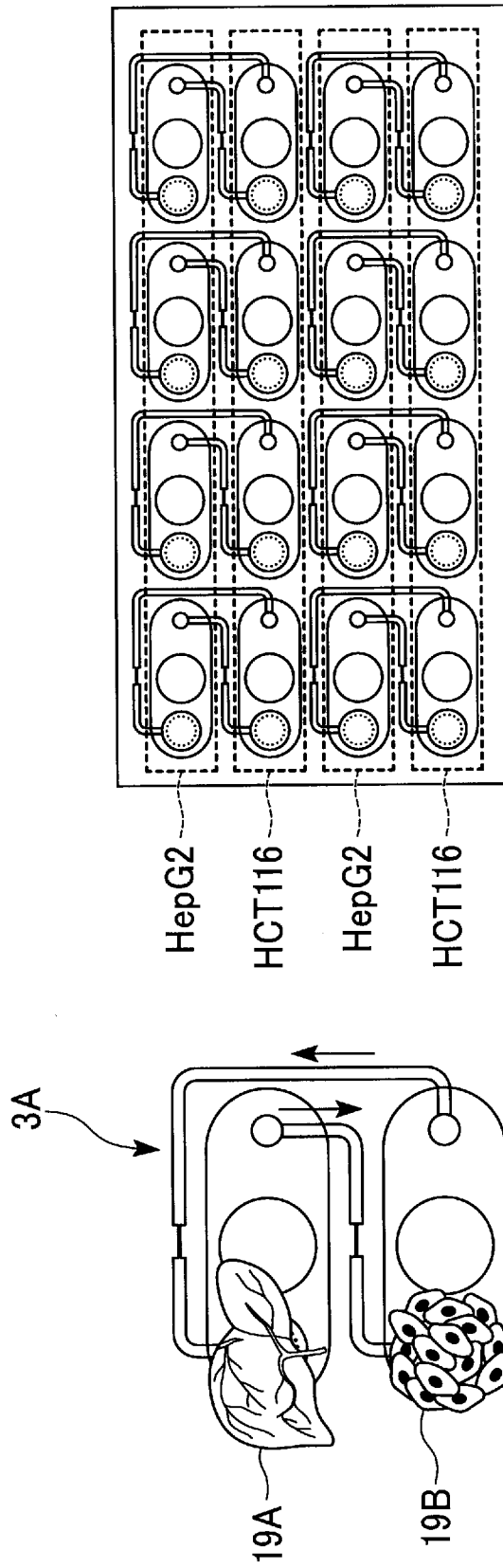
[図14]



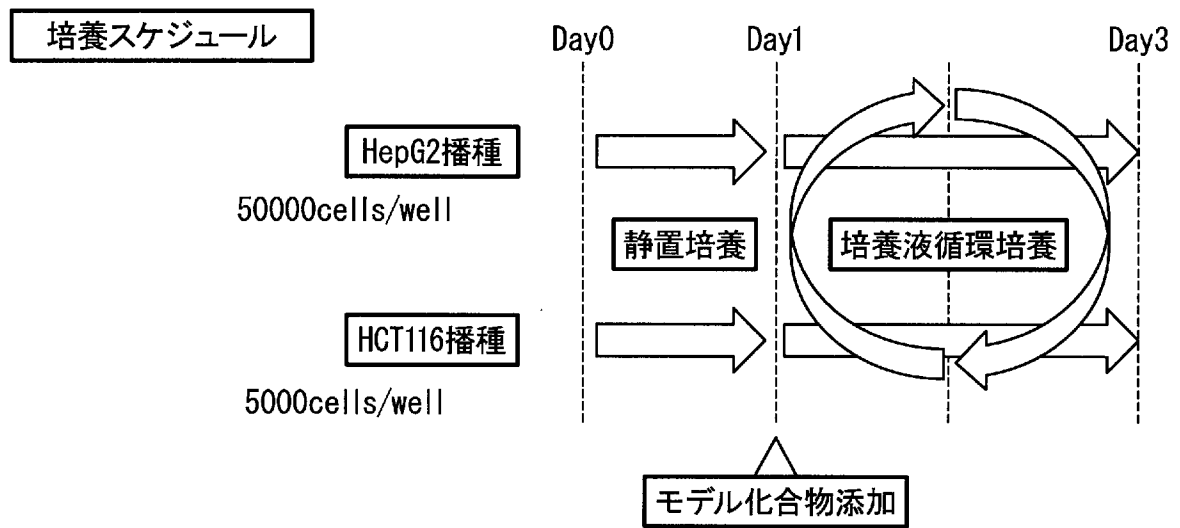
[図15]



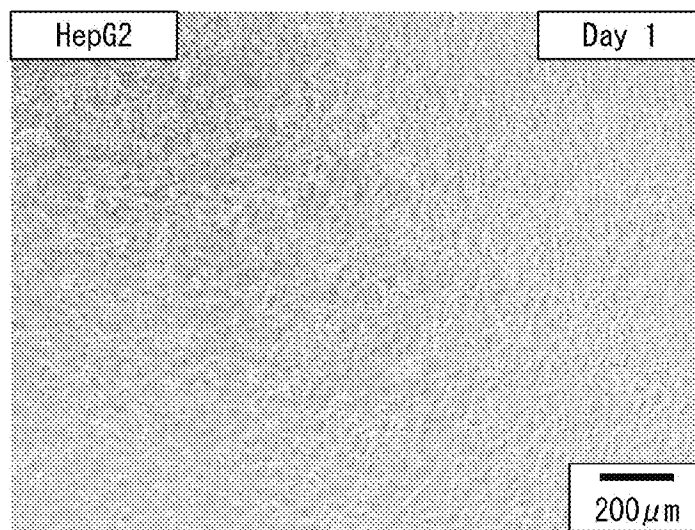
[図16A]



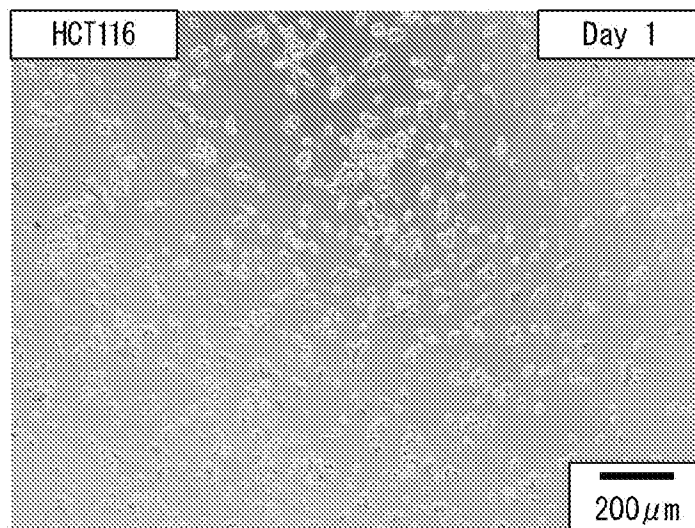
[図16B]



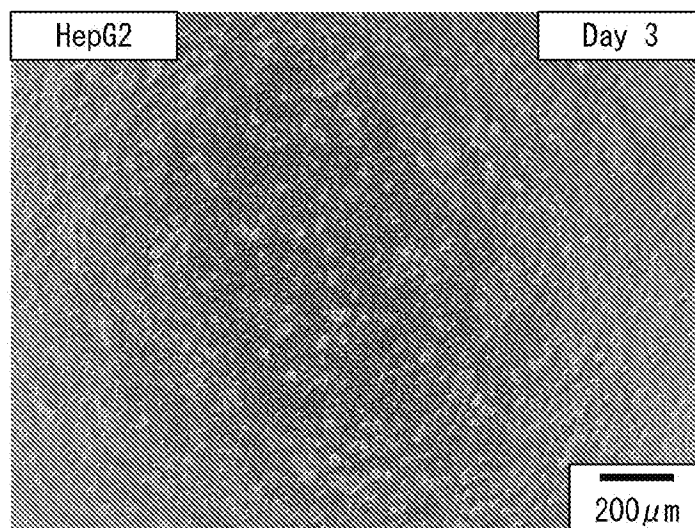
[図17A]



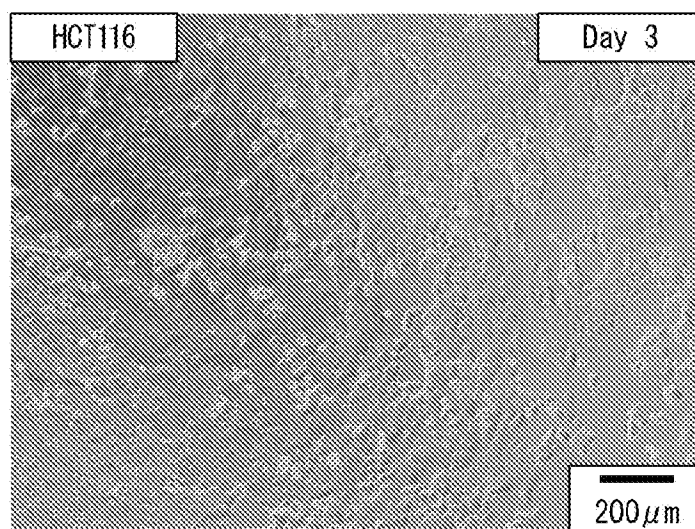
[図17B]



[図17C]



[図17D]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

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)

C12M3/00, C12M1/00, C12N5/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAN C. Y. et al., Accelerating drug discovery via organs-on-chips, Lab on a Chip, 2013, Vol.13, pp.4697-4710	1-14
Y	SUGIURA S. et al., Pressure-Driven Perfusion Culture Microchamber Array for a Paralle Drug Cytotoxicity Assay, Biotechnology and Bioengineering, 2008.08.15, Vol.100, No.6, pp.1156-1165	1-14
Y	JP 2011-257238 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 22 December 2011 (22.12.2011), claims (Family: none)	8,9,12



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 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

12 May 2016 (12.05.16)

Date of mailing of the international search report

24 May 2016 (24.05.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057107

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-527225 A (Bioprocessors Corp.), 30 July 2009 (30.07.2009), claims & US 2007/0217964 A1 claims & WO 2007/098027 A2 & EP 1991655 A & CA 2637613 A	2, 11, 12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00, C12M1/00, C12N5/07

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)

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	CHAN C. Y. et al., Accelerating drug discovery via organs-on-chips, Lab on a Chip, 2013, Vol.13, pp.4697-4710	1-14
Y	SUGIURA S. et al., Pressure-Driven Perfusion Culture Microchamber Array for a Paralle Drug Cytotoxicity Assay, Biotechnology and Bioengineering, 2008.08.15, Vol.100, No.6, pp.1156-1165	1-14

☒ 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

1 2 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

松岡 徹

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 3 4 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	JP 2011-257238 A (積水化学工業株式会社) 2011. 12. 22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	8, 9, 12
Y	JP 2009-527225 A (バイオプロセッサーズ コーポレーション) 2009. 07. 30, 特許請求の範囲 & US 2007/0217964 A1, claims & WO 2007/098027 A2 & EP 1991655 A & CA 2637613 A	2, 11, 12