

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/094451

発行日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)

(43) 国際公開日 平成29年6月8日 (2017. 6. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/16 (2006.01)	C 1 2 M 1/16	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

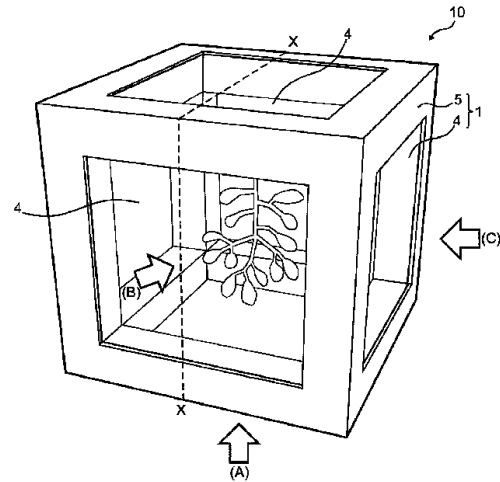
出願番号 特願2017-553730 (P2017-553730)	(71) 出願人 505127721 公立大学法人大阪府立大学 大阪府堺市中央区学園町1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/082979	
(22) 国際出願日 平成28年11月7日 (2016. 11. 7)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-237526 (P2015-237526)	(71) 出願人 504174135 国立大学法人九州工業大学 福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号
(32) 優先日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100065248 弁理士 野河 信太郎
	(74) 代理人 100159385 弁理士 甲斐 伸二
	(74) 代理人 100163407 弁理士 金子 裕輔
	(74) 代理人 100166936 弁理士 稲本 潔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養容器及び観察用試料セル

(57) 【要約】

本発明は、様々な角度から三次元培養した細胞を観察することができる細胞培養容器/観察用試料セルを提供する。本発明の細胞培養容器/観察用試料セルは、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第1容器とを備え、前記培養ゲルは、第1容器内のスペースを満たし、第1容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第 1 容器とを備え、前記培養ゲルは、第 1 容器内のスペースを満たし、第 1 容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする細胞培養容器。

【請求項 2】

前記窓部は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含む請求項 1 に記載の細胞培養容器。

【請求項 3】

前記窓部は、 $50 \text{ g} / \text{cm}^2$ 以上 $10000 \text{ g} / \text{cm}^2$ 以下のゲル強度を有する請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養容器。

【請求項 4】

第 1 容器の形状は、立方体又は直方体であり、第 1 容器は、各面に前記窓部を有する請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の細胞培養容器。

【請求項 5】

第 1 容器は、前記窓部を囲む枠部を有する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の細胞培養容器。

【請求項 6】

液体培地を溜める第 2 容器をさらに備え、第 1 容器は、前記液体培地中に配置される請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の細胞培養容器。

【請求項 7】

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第 1 容器とを備え、前記培養ゲルは、第 1 容器内のスペースを満たし、第 1 容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする観察用試料セル。

【請求項 8】

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルが充填される内部空間を有する第 1 容器を備え、第 1 容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする細胞培養容器。

【請求項 9】

第 1 容器の形状は、立方体又は直方体であり、第 1 容器は、各側面に前記窓部を有する請求項 8 に記載の細胞培養容器。

【請求項 10】

ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有する第 1 容器の開口から第 1 容器の内部空間に培養ゲル及び細胞又は細胞組織を充填する工程を備える細胞培養容器の製造方法。

【請求項 11】

前記内部空間が培養ゲル及び細胞又は細胞組織で充填された後に、前記開口にハイドロゲルからなる透光性の窓部を形成する工程を備える請求項 10 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養容器及び観察用試料セルに関し、特に三次元培養した細胞の観察可能な細胞培養容器に関する。

【背景技術】

【0002】

培養ゲル中で細胞組織を三次元培養することにより血管組織、気管支組織などを形成する研究が行われている（例えば、特許文献 1 ~ 3 参照）。これらの研究では、通常、ディ

10

20

30

40

50

ッシュ中又はウェル中に厚い培養ゲル層を形成し、この培養ゲル層に細胞又は細胞組織を包埋して細胞組織を培養している。培養した細胞組織の観察手法としては、倒立型顕微鏡又は正立型顕微鏡で培養ゲル層の下側又は上側から細胞組織を観察する手法が取られている。また、培養した細胞組織の三次元画像の取得には、レーザー顕微鏡が用いられている（例えば、非特許文献1参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2009-213716号公報

【特許文献2】W02004/084967A

【特許文献3】W02012/147878A

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Science 13 August 2004 vol. 305 pp 1007-1009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、従来、細胞組織を三次元培養する研究では、上側又は下側からの細胞組織の明視野像しか得ることができないため、明視野像での細胞組織の三次元構造の認識が困難である。また高さ方向の厚みがある細胞組織の場合、細胞密度の濃い部分を光が透過しないため細胞組織の観察が困難である。また、レーザー顕微鏡による観察では、レーザーが細胞組織にダメージを与えるため長時間のライブ観察が難しいという問題がある。また、レーザー顕微鏡は高価である。さらにレーザー顕微鏡による三次元画像取得ではz軸方向の解像度に限界がある。

本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、様々な角度から三次元培養した細胞を観察することができる細胞培養容器/観察用試料セルを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第1容器とを備え、前記培養ゲルは、第1容器内のスペースを満たし、第1容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする細胞培養容器を提供する。

また、本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第1容器とを備え、前記培養ゲルは、第1容器内のスペースを満たし、第1容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする観察用試料セルを提供する。

さらに、本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルが充填される内部空間を有する第1容器を備え、第1容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする細胞培養容器も提供する。

【発明の効果】

【0007】

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルは細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを備えるため、培養ゲル中で細胞組織を三次元培養することができる。

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルは培養ゲルを内包する第1容器を備え、培養ゲルは第1容器内のスペースを満たすため、第1容器中に培養ゲル及び細胞組織を閉じ込めることができ、第1容器内で培養ゲルが流動すること及び細胞組織の相対位置がずれることを抑制することができる。このことにより、細胞組織の相対位置がずれることを抑制して第1容器を水平方向、鉛直方向又は斜め方向に回転させることができる。

第1容器は、透光性を有する窓部を有するため、第1容器内部の細胞組織を窓部から顕微鏡などにより観察することができる。また、細胞組織の相対位置がずれることを抑制して第1容器を回転させることができるため、様々な角度から細胞組織を観察することができ、細胞組織の三次元的な立体形状を容易に明らかにすることができる。また、レーザー

10

20

30

40

50

顕微鏡を用いて様々な角度から細胞組織を観察することが可能になるため、x軸方向、y軸方向、z軸方向のすべてで解像度の高い細胞組織の三次元画像を取得することが可能になる。

第1容器の窓部はハイドロゲルからなるため、第1容器の外部の液体培地から培養に必要なタンパク質(分子量:数万~数十万)などを窓部を介して培養ゲル及び細胞組織に供給することができる。このことにより、第1容器の内部の細胞組織の活性を長期間維持することが可能になる。また、培養ゲルが液体培地を吸収し膨潤することを抑制することができる。細胞組織の相対位置がずれることを抑制することができる。

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルは、例えば、生物学、医学、薬学などに関する研究、再生医療、創薬などに利用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本発明の第1実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図である。

【図2】図1の破線X-Xにおける細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。

【図3】本発明の第2実施形態の細胞培養容器の概略断面図である。

【図4】本発明の第3実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。

【図5】(a)~(c)は、それぞれ本発明の第4~第6実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図である。

【図6】実験で作製した細胞培養容器/観察用試料セルの写真である。

【図7】実験で作製した細胞培養容器/観察用試料セルの下面から撮影した細胞組織の写真である。

20

【図8】実験で作製した細胞培養容器/観察用試料セルの前面から撮影した細胞組織の写真である。

【図9】実験で作製した細胞培養容器/観察用試料セルの右面から撮影した細胞組織の写真である。

【図10】本発明の一実施形態の細胞培養容器の概略斜視図である。

【図11】図10の破線Y-Yにおける細胞培養容器の概略断面図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルは、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルと、前記培養ゲルを内包する第1容器とを備え、前記培養ゲルは、第1容器内のスペースを満たし、第1容器は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部を有することを特徴とする。

30

【0010】

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルに含まれる窓部は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことが好ましい。

このことにより、窓部が透光性を有することができる。また、第1容器外部の液体培地に含まれるタンパク質などの栄養が窓部を透過することができ、培養ゲル及び細胞組織に栄養を供給することができる。また、第1容器を回転させた場合でも窓部が変形することを抑制することができる。

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルに含まれる第1容器の形状は立方体をはじめとする直方体であることが好ましく、第1容器は各面に窓部を有することが好ましい。

40

このことにより、上下左右前後の6面から第1容器内部の細胞組織を観察することができ、三次元培養した細胞組織の三次元構造を把握することができる。また、顕微鏡のステージに第1容器を容易に設置することができ、細胞組織を容易に観察することができる。

【0011】

本発明の細胞培養容器/観察用試料セルに含まれる第1容器は、窓部を囲む枠部を有することが好ましい。

このことにより、第1容器の強度を大きくすることができ、細胞培養容器/観察用試料セルの取り扱いが容易になる。また、窓部が傷つくことを抑制することができる。

本発明の細胞培養容器は液体培地を溜める第2容器をさらに備えることが好ましく、第

50

1 容器は液体培地中に配置されることが好ましい。

このことにより、第2容器に溜めた液体培地に含まれるタンパク質などの栄養を窓部を介して培養ゲル及び細胞組織に供給することができる。このことにより、第1容器の内部の細胞組織の活性を長期間維持することが可能になる。また、第1容器を第2容器から容易に取り出すことができ、第1容器の外部容器を容易に交換することができる。このことにより、培養時と観察時で外部容器を変えることが可能になり、それぞれに適した外部容器を使用することが可能になる。

【0012】

以下、本発明の一実施形態を図面を用いて説明する。図面や以下の記述中で示す構成は、例示であって、本発明の範囲は、図面や以下の記述中で示すものに限定されない。

10

【0013】

図1は第1実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図であり、図2は図1の破線X-Xにおける細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。図3は、第2実施形態の細胞培養容器の概略断面図である。図4は、第3実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。図5(a)~(c)は、それぞれ第4~第6実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図である。なお、本実施形態の細胞培養容器は、第1~第6実施形態の細胞培養容器を含む。

本実施形態の細胞培養容器10/観察用試料セル10は、細胞7又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6と、培養ゲル6を内包する第1容器1とを備え、培養ゲル6は、第1容器1内のスペースを満たし、第1容器1は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部4を有することを特徴とする。

20

また、本実施形態の細胞培養容器10は、細胞組織を三次元培養するための容器である。また、本実施形態の細胞培養容器10は、細胞培養容器としての機能と観察用試料セルとしての機能の両方を有することができる。

なお、細胞7又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6とは、細胞7又は細胞組織7を埋め込んだ培養ゲル6をいう。

【0014】

本実施形態の細胞培養容器10は、培養ゲルに包埋した細胞7又は細胞組織7を含むことができる。また、細胞組織7は、生細胞であってもよく、パラホルムアルデヒドなどで固定したものであってもよく、透過処理を施したものであってもよい。

30

また、本実施形態の細胞培養容器10は、図3に示した第2実施形態の細胞培養容器10のように第2容器2を有してもよい。

本実施形態の細胞培養容器10は、観察用試料セル10であってもよい。この場合、細胞培養容器10(観察用試料セル)を顕微鏡にセットして、顕微鏡により培養ゲル6で培養した細胞組織7を観察することができる。細胞組織7を観察する顕微鏡は、光学顕微鏡であってもよく、レーザー顕微鏡であってもよい。

本実施形態の細胞培養容器10は、細胞7又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6が充填される内部空間13を有する第1容器1を備え、第1容器1は、ハイドロゲルからなる透光性の窓部4を有するものであってもよい。この場合、細胞培養容器10に培養ゲル6及び細胞7又は細胞組織7を充填した後に、細胞7などを培養し、観察することができる。また、この細胞培養容器10は、第1容器1の内部空間13に培養ゲル6などを注入するための開口12を有することができる。この開口12には、第1容器1の内部空間13に培養ゲル6などを注入した後、ハイドロゲルからなる透光性の窓部4を形成することができる。細胞培養容器10は、例えば、図10、11に示したような構成を有することができる。

40

以下、本実施形態の細胞培養容器10/観察用試料セル10について説明する。

【0015】

1. 培養ゲル

培養ゲル6は、培養ゲル6に包埋された細胞7又は細胞組織7を培養するためのゲルである。培養ゲル6に包埋する細胞は、一定のパターンで集合した構造を有する細胞組織で

50

あってもよく、このような組織構造を有さない細胞であってもよい。また、組織構造を有さない細胞 7 を培養することにより、細胞組織 7 が成長してもよい。

細胞 7 又は細胞組織 7 を培養ゲル 6 に包埋することにより、培養ゲル 6 を介して細胞 7 又は細胞組織 7 に栄養を供給することができる。また、培養ゲル 6 が細胞組織 7 の足場になることができ、細胞組織 7 が三次元的に成長することができる。

培養ゲル 6 は、例えば、コラーゲン、ラミニン、エンタクチン、プロテオグリカンなどを含むことができる。また、培養ゲル 6 は、TGF- β 、線維芽細胞増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子などを含むことができる。さらに、培養ゲル 6 には、例えば、マトリゲル（登録商標）を用いることができる。

培養ゲル 6 は、第 1 容器 1 に内包され、外部の液体培地に直接接触しないため、培養ゲル 6 が液体培地を吸収し膨潤することにより細胞組織 7 の相対位置がずれることを抑制することができる。

【0016】

2. 第 1 容器

第 1 容器 1 は、培養ゲル 6 を内包するように設けられる。また、細胞組織 7 を包埋した培養ゲル 6 が第 1 容器 1 内のスペースを満たす。このことにより、第 1 容器 1 中に培養ゲル 6 及び細胞組織 7 を閉じ込めることができ、第 1 容器 1 内で培養ゲル 6 が流動すること及び細胞組織 7 の相対位置がずれることを抑制することができる。また、細胞組織 7 の相対位置がずれることを抑制して第 1 容器 1 を水平方向、鉛直方向又は斜め方向に回転させることができる。さらに、第 1 容器 1 を設けることにより、細胞組織 7 を包埋した培養ゲル 6 の取り扱いが容易になる。このことにより、第 1 容器 1 を入れる外部容器を容易に交換することができる。例えば、多数のウェルを有するプラスチック材質のウェルプレート中に第 1 容器 1 を入れて細胞組織 7 を培養し、組織細胞 7 の蛍光画像などを取得する場合には、第 1 容器 1 をウェルプレートから取り出し、光透過性の高いガラス底面の外部容器に入れることができる。このことにより、明瞭な蛍光画像などを取得することができる。なお、プラスチック材質のウェルプレートは、光透過性の点から蛍光画像取得には適していない。また、撮影後は、第 1 容器 1 をウェルプレートに戻すことができる。

【0017】

第 1 容器 1 は、第 1 容器 1 を回転させても形状が変わらない強度を有することができる。また、第 1 容器 1 は閉鎖構造を有することができ、その内部のスペースを培養ゲル 6 及び細胞組織 7 が満たすことができる。

第 1 容器 1 の形状は、例えば、多面体であってもよい。このことにより、第 1 容器 1 が基準となる面を有することができ、細胞組織 7 の観察面を特定することが可能になる。このことにより、細胞組織 7 の三次元構造を特定する座標系を定めることができる。例えば 3 次元直交座標を定める場合、例えば、多面体における 1 つの平面を基準面とし、その平面に沿って X - Y 座標を取り、当該平面に垂直に Z 座標をとることができる。また、多角形が互いに直交する 3 つの平面を持つ場合、その 3 つの平面を基準面として 3 次元直交座標系を定め定めてもよい。

第 1 容器 1 の形状は、図 1 ~ 4 に示した第 1 容器 1 のように立方体であってもよく、図 5 (a) に示したように直方体であってもよく、図 5 (b) に示したように六角柱であってもよい。また、第 1 容器 1 の形状は、図 5 (c) に示したように円柱であってもよい。

また、第 1 容器 1 の形状は、4 面体（三角錐）、5 面体（三角柱、4 角錐など）であってもよく、直方体以外の 6 面体（平行 6 面体、双三角錐など）、7 面体（5 角柱、6 角錐など）、8 面体（双四角錐など）であってもよい。また、10 面体（双五角錐など）12 面体（正 12 面体、菱形 12 面体、立方 12 面体など）であってもよい。第 1 容器 1 における面の数はさらに多くてもよいが、各窓部 4 の面積を広く確保する観点から面の数はあまり多過ぎない方がよく、4 面体、5 面体、6 面体、7 面体、8 面体が好ましい。特に 6 面体の場合は 3 方向に面積の大きな窓が面するので、3 次元観察に適している。

第 1 容器 1 は、例えば、各辺の長さが 1 mm 以上 5 cm 以下となる大きさにすることができる。また、第 1 容器 1 の容量は、例えば、1 μ L 以上 10 mL 以下とすることができる。

10

20

30

40

50

る。

【0018】

第1容器1は、透光性の窓部4を有する。このため、第1容器1内部の細胞組織7を窓部4から顕微鏡などにより観察することができる。また、第1容器1の形状が図1~4、図5(a)、(b)のように多面体である場合、窓部4は第1容器1の各面に設けることができる。このことにより、第1容器1内部の細胞組織7を第1容器1の各面からそれぞれ観察することができる。例えば、図1~4のように、窓部4は、第1容器1の各面に設けることができる。なお、窓部4から細胞組織7を観察する際、第1容器1を光透過性の高いガラス容器に入れて細胞組織7を観察することができる。このことにより、液体培地などが顕微鏡に付着することを防止することができる。

10

例えば、窓部4の形状は、膜状であってもよい。また、窓部4の形状は、平板状であってもよい。窓部4の厚みは厚くしてもよいが、このように膜状あるいは平板状にして、その厚みを小さく設定することにより、窓部4の透光性やタンパク質透過性を向上させることができる。

また、第1容器1は、細胞組織7の相対位置がずれることを抑制して回転させることができるため、第1容器1の窓部4を設けた各面が観察用試料セル10の観察面となるように第1容器1を回転させることができる。特に、第1容器1の上面と下面とが入れ替わるように第1容器1を回転させることや、第1容器1を横倒しにするように回転させることが可能になる。従って、第1容器1の各面から内部の細胞組織7を観察することが可能になり、細胞組織7の三次元的な立体形状を容易に明らかにすることができる。なお、細胞組織7の観察に用いる顕微鏡は、光学顕微鏡であってもよく、レーザー顕微鏡であってもよい。

20

第1容器1の形状が図5(c)のように円柱である場合、窓部4は円柱の側面に設けることができる。このことにより、レーザー顕微鏡を用いて細胞組織7の三次元画像を取得することができる。また、窓部4は、円柱の上面および下面にも設けることができる。このことにより、上面及び下面からも細胞組織7を観察することができ、三次元画像の解像度を向上させることができる。

【0019】

第1容器1の窓部4はハイドロゲルからなる。このことにより、第1容器1の外部の液体培地などから培養に必要なタンパク質(分子量:数万~数十万)などを窓部4を介して培養ゲル6及び細胞組織7に供給することができる。また、細胞培養容器10は、液体培地9を溜める第2容器2を備えることができ、第1容器1を液体培地9中に配置することができる。例えば、図3に示した第2実施形態の細胞培養容器10のように第2容器2を備えることができる。このことにより、第2容器2に溜めた液体培地9に含まれるタンパク質などの栄養を窓部4を介して培養ゲル6及び細胞組織7に供給することができる。このことにより、第1容器1の内部の細胞組織7の活性を長期間維持することが可能になる。また、培養ゲル6が液体培地9と直接接触しないため、培養ゲル6が液体培地9を吸収し膨潤することを抑制することができる。細胞組織7の相対位置がずれることを抑制することができる。例えば、第2容器2は、複数のウェルを有するウェルプレートとすることができる。このことにより、複数の第1容器1をそれぞれ異なるウェル中に入れて培養することができ、多数の細胞組織7を培養することが可能になる。

30

40

【0020】

第2容器2に溜めた液体培地9は定期的に入れ替えてもよい。また、細胞培養容器10が新たな液体培地を溜めた第3容器を備え、第2容器2内で第1容器1内の細胞組織を一定期間培養した後、第1容器1を第2容器2から取り出し、第1容器1を第3容器に溜めた液体培地中に入れてもよい。また、第2容器2は複数のウェルを備えてもよい。1つのウェル内で第1容器1内の細胞組織7を一定期間培養した後、第1容器1をウェルから取り出し、第1容器1を異なるウェルに入れてもよい。このことにより、第1容器1の周りの液体培地の栄養分が低下することを抑制することができ、細胞組織7の活性を長期間維持することができる。

50

【0021】

窓部4を構成するハイドロゲルは、タンパク質を通し、かつ、自立できるだけの硬さがあれば特に限定されない。ハイドロゲルとは、水中の分散質が繋がってネットワークを形成し系全体として固体状になったものである。

例えば、窓部4の強度並びにタンパク質透過性は、窓部4に用いられているハイドロゲルのネットワークを形成する分散質の濃度を調整することによって調整することができる。

ネットワークを形成する分散質の濃度が高いほど窓部4の強度が高くなる。窓部4の強度としては 50 g/cm^2 以上のゲル強度を有することが好ましく、このことにより、第1容器1の内部の培養ゲル6の重さにより窓部4が変形することを抑制することができる。

一方、分散質の濃度が高すぎると、タンパク質透過性が低下するので、タンパク質透過性を確保する上で、窓部4の強度が 10000 g/cm^2 以下となるように分散質の濃度に抑えることが好ましい。

従って、窓部4の強度としては 50 g/cm^2 以上 10000 g/cm^2 以下が好ましい。なお、このようなゲル強度を得るための分散質の適切な濃度は、分散質の種類により異なる。

例えば、窓部4は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことができる。このことにより、窓部4が透光性を有することができる。また、第2容器2に溜めた液体培地9に含まれるタンパク質などの栄養が窓部4を透過することができ、培養ゲル6及び細胞組織7に栄養を供給することができる。また、窓部4がアガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことにより、第1容器1を回転させた場合でも窓部4が変形することを抑制することができる。窓部4は、好ましくは、アガロースゲル又はポリアクリルアミドゲルである。このことにより、窓部4の硬さを容易に調整することができる。また、細胞培養容器10の製造コストを低減することができる。

窓部4がアガロースゲルの場合、アガロースの濃度は、例えば、 $0.5\sim 4.0\%$ とすることができる。また、窓部4がポリアクリルアミドゲルの場合、ポリアクリルアミドの濃度は、例えば、 $3\sim 20\%$ とすることができる。窓部4がアルギン酸ナトリウムを含む場合、窓部4は、アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを加えてゲル化することにより形成することができる。窓部4がコラーゲンゲルの場合、高濃度のコラーゲンゲルで窓部4を形成することができる。このことにより窓部4が十分な強度を有することができる。

【0022】

第1容器1は、窓部4を囲む枠部5を有することができる。このことにより、第1容器1の強度を大きくすることができ、細胞培養容器10/観察用試料セル10の取り扱いが容易になる。また、窓部4が傷つくことを抑制することができる。例えば、図1~3に示した第1容器1のように、第1容器1を枠部5と窓部4から構成することができる。枠部5の材料は、生体適合性を有する樹脂とすることができる。また、枠部5の材料は、例えば、ポリカーボネートとすることができる。

図1、2に示したような細胞培養容器10/観察用試料セル10は、次のように作製することができる。まず、6面にそれぞれ開口を有する立方体の枠部5を準備し、窓部4用のゾルを枠部5の開口に流し込みゲル化させハイドロゲルからなる膜状又はシート状の窓部5を形成する。このようにして、枠部5の5面にそれぞれ窓部5を形成した後、ゲル化前の培養ゲルおよび細胞組織を枠部5の立方体中に注入して培養ゲルをゲル化させる。その後、窓部4用のゾルを残り1つの枠部5の開口に流し込みゲル化させ膜状又はシート状の窓部4を形成する。このようにして細胞組織7と培養ゲル6を内包した第1容器1を形成することができる。

【0023】

第1容器1は、枠部5を有さず窓部4を形成するハイドロゲルから構成されてもよい。

このことにより、窓部 4 から細胞組織を観察する際に死角が生じることを抑制することができる。特に、第 1 容器 1 のサイズが十分に小さい場合（例えば、5 mm 以下）に第 1 容器 1 を枠部 5 を有さない構成にすることができる。例えば、図 4 に示した第 1 容器 1 のように、第 1 容器 1 は枠部 5 を有さなくてもよい。

図 4 に示したような細胞培養容器 10 / 観察用試料セル 10 は、次のように作製することができる。まず、窓部 4 用のゾルを型に流し込みゲル化させて、1 つの面に開口を有する中空の立方体ゲルを形成する。その後、ゲル化前の培養ゲルおよび細胞組織を立方体ゲル中に注入して培養ゲルをゲル化させる。その後、立方体ゲルの開口に窓部 4 用のゾルを流し込みゲル化させ窓部 5 を形成する。このようにして細胞組織 7 と培養ゲル 6 を内包した第 1 容器 1 を形成することができる。

10

【0024】

細胞培養実験及び細胞観察実験

図 1、2 に示したような気管支組織を内包した第 1 容器を作成し、図 3 に示したように、第 1 容器を液体培地中に配置して気管支組織を培養した。まず、一辺 1 cm のポリカーボネート製の立方体の枠部を準備し、1.5% アガロースゲルで窓部を形成した。その後、立方体内部に培養ゲルであるマトリゲル（登録商標）と気管支組織を注入しゲル化した後、残りの開口に 1.5% アガロースゲルで窓部を形成することにより、第 1 容器を作製した。この第 1 容器を液体培地中に配置して、気管支組織を 10 日間三次元培養した。その後、培養した気管支組織を光学顕微鏡を用いて観察した。

なお、細胞培養実験では、第 1 容器中の培養ゲルの膨潤や細胞活性の劣化は観察されなかった。

20

【0025】

図 6 は、培養後の第 1 容器の写真である。図 7 は、第 1 容器の下面の窓部から気管支組織を撮影した写真（図 1、2 の（A）方向からの写真）であり、図 8 は、第 1 容器の前面の窓部から気管支組織を撮影した写真（図 1、2 の（B）方向からの写真）であり、図 9 は、第 1 容器の右面の窓部から気管支組織を撮影した写真（図 1 の（C）方向からの写真）である。

【0026】

図 7 の下面の窓部からの写真では、気管支組織の中心部が暗くなった。これは、気管支組織が上下方向に成長したため、試料に照射した光が気管支組織を透過できなかったためである。図 7 の写真では、気管支組織の中心部から側面に向かって成長した気管支組織の二次元形状を把握することができた。また、図示していないが、上面の窓部からの写真からも気管支組織の中心部から側面に向かって成長した気管支組織の二次元形状を把握することができた。

30

図 8 の前面の窓部からの写真及び図 9 の右面の窓部からの写真では、上下方向に成長した気管支組織の二次元形状を把握することができた。また、図示していないが、後面の窓部からの写真及び左面の窓部からの写真からも気管支組織の二次元形状を把握することができた。

これらのすべての窓部からの気管支組織の二次元画像を照合することにより、三次元培養した気管支組織の三次元構造を把握することができる。

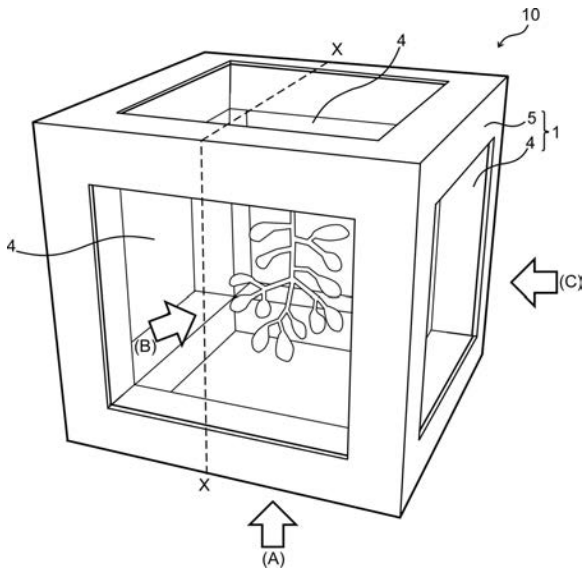
40

【符号の説明】

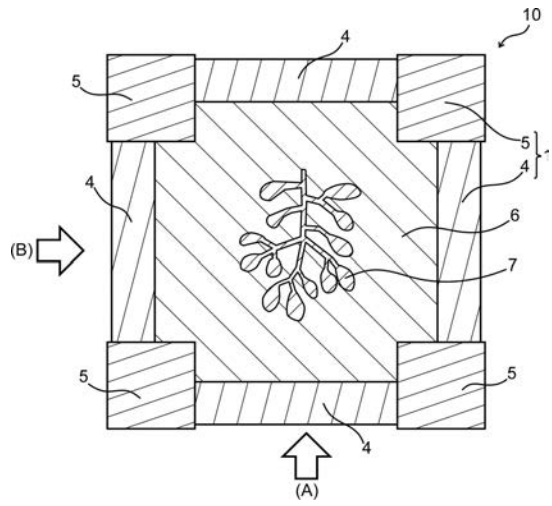
【0027】

1 : 第 1 容器 2 : 第 2 容器 4 : 窓部 5 : 枠部 6 : 培養ゲル 7 :
細胞組織（細胞） 9 : 液体培地 10 : 細胞培養容器又は観察用試料セル 12
: 開口 13 : 内部空間

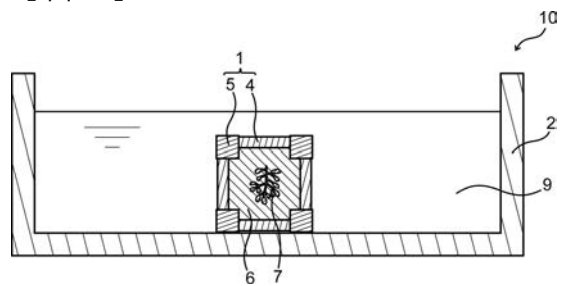
【図1】



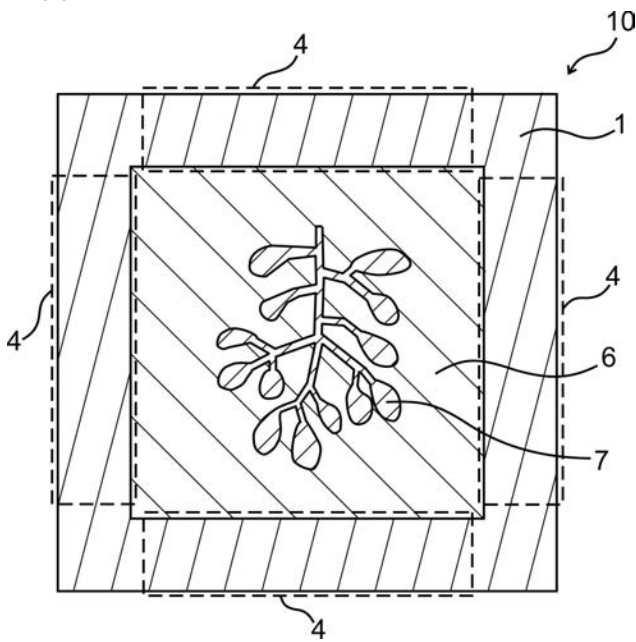
【図2】



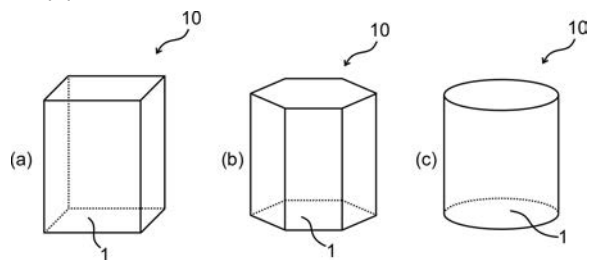
【図3】



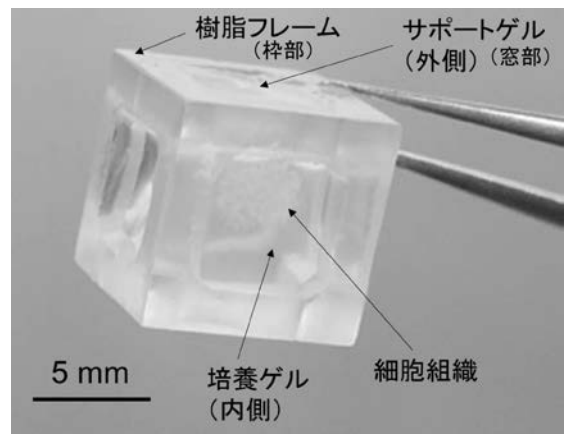
【図4】



【図5】

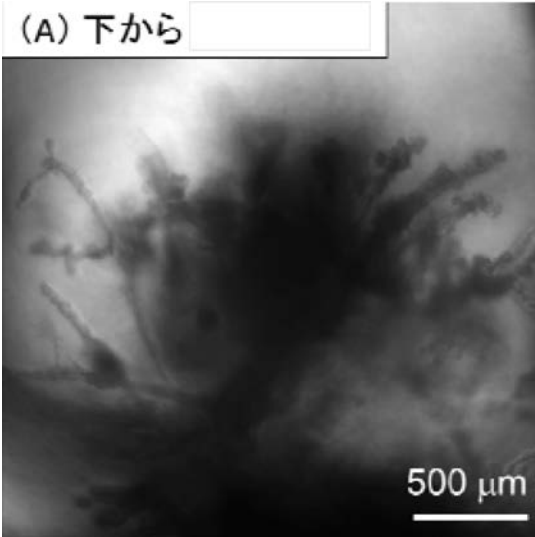


【図6】



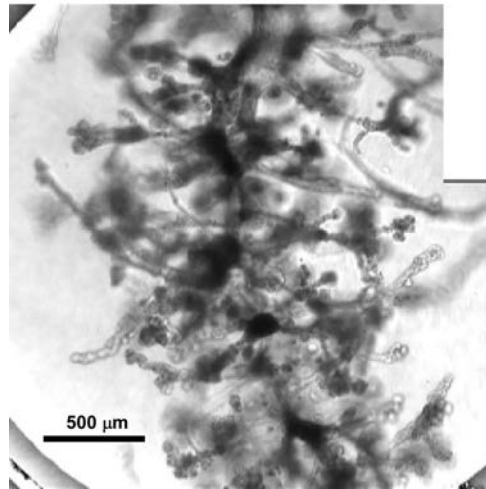
【図 7】

(A) 下から



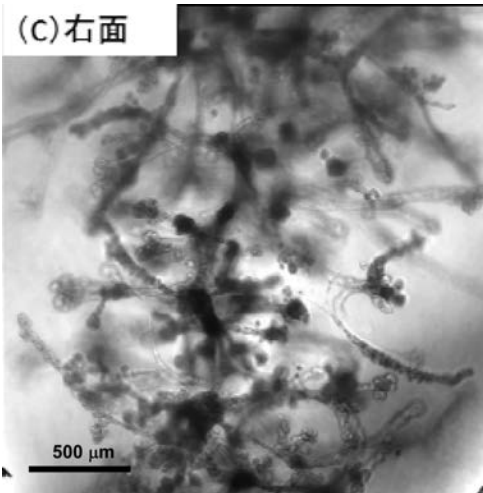
【図 8】

(B) 前面

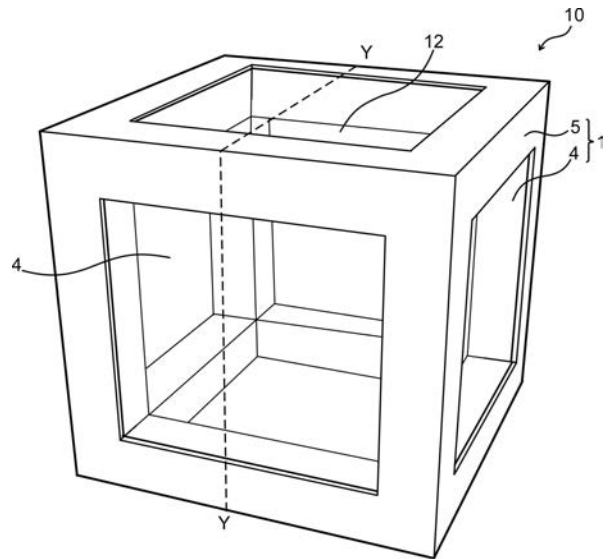


【図 9】

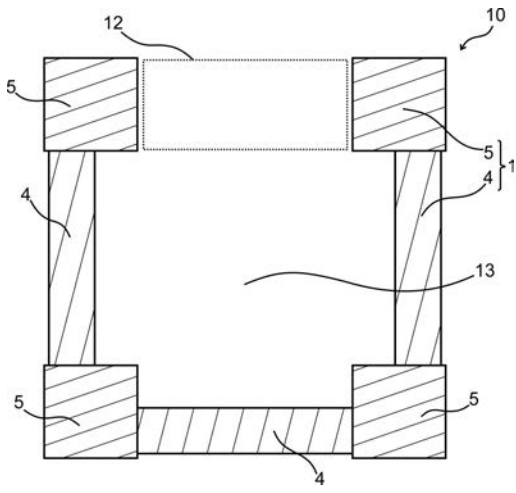
(c) 右面



【図 10】



【 図 1 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/082979
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M3/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)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) C12M1/00-3/10 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.
A	JP 2012-213390 A (Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute), 08 November 2012 (08.11.2012), claims; paragraphs [0031] to [0033], [0043] to [0050], [0054]; fig. 1 to 4 (Family: none)	1-11
A	JP 2010-161979 A (Gakko Hojin Kimigafuchi Gakuen Sojo University), 29 July 2010 (29.07.2010), claims; paragraphs [0052] to [0055]; fig. 1 (Family: none)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 20 December 2016 (20.12.16)		Date of mailing of the international search report 10 January 2017 (10.01.17)
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/JP2016/082979

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-333879 A (Sanmei Electric Co., Ltd.), 08 December 2005 (08.12.2005), claims; paragraphs [0001], [0037], [0038], [0040]; fig. 1 (Family: none)	1-11
A	JP 2007-330192 A (Stanley Electric Co., Ltd.), 27 December 2007 (27.12.2007), claims; fig. 2, 4 (Family: none)	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 2 9 7 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)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 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00-3/10			
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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	
A	JP 2012-213390 A (地方独立行政法人 東京都立産業技術研究センター) 2012. 11. 08, 特許請求の範囲, 【0031】 - 【0033】, 【0043】 - 【0050】, 【0054】, 図 1-4 (ファミリーなし)	1-11	
A	JP 2010-161979 A (学校法人 君が淵学園 崇城大学) 2010. 07. 29, 特許請求の範囲, 【0052】 - 【0055】, 図 1 (ファミリーなし)	1-11	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 20. 12. 2016		国際調査報告の発送日 10. 01. 2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 中村 勇介	4 B 4 8 7 2
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 2 9 7 9
C (続き) . 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
A	JP 2005-333879 A (三 明 電 機 株 式 会 社) 2005. 12. 08, 特許請求の範囲, 【0001】 , 【0037】 , 【0038】 , 【0040】 , 図 1 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2007-330192 A (ス タ ン レ ー 電 気 株 式 会 社) 2007. 12. 27, 特許請求の範囲, 図 2, 4 (ファミリーなし)	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, 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, KW, 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

(72)発明者 萩原 将也

大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内

(72)発明者 川原 知洋

福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 九州工業大学内

Fターム(参考) 4B029 AA03 AA08 AA21 BB11 CC02 CC03 CC10 DF10 EA20 FA01
FA15 GA08 GB06

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。