

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6156933号
(P6156933)

(45) 発行日 平成29年7月5日(2017.7.5)

(24) 登録日 平成29年6月16日(2017.6.16)

(51) Int. Cl. F 1
C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 A
C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 C

請求項の数 13 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-9737 (P2014-9737) (22) 出願日 平成26年1月22日 (2014.1.22) (65) 公開番号 特開2015-136318 (P2015-136318A) (43) 公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30) 審査請求日 平成29年1月18日 (2017.1.18)</p> <p>(出願人による申告) 平成25年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(先端的低炭素化技術開発)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1</p> <p>(74) 代理人 100088155 弁理士 長谷川 芳樹</p> <p>(74) 代理人 100128381 弁理士 清水 義憲</p> <p>(74) 代理人 100126653 弁理士 木元 克輔</p> <p>(74) 代理人 100140888 弁理士 渡辺 欣乃</p> <p>(72) 発明者 野村 暢彦 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養用デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

片側に複数の凹部が配置された基板と、
 前記複数の凹部に充填されたゲル状培地と
 を備える細胞培養用デバイスであって、
 前記複数の凹部の内表面を除いた前記基板の前記片側の表面の少なくとも一部の、J I S 3 2 5 7 (1 9 9 9) に従って測定した接触角が50°以上であり、
 前記基板の前記凹部が配置された領域において、前記凹部の単位面積当たりの数が、1
, 0 0 0 個 / c m ² ~ 1 0 , 0 0 0 個 / c m ²であり、
 前記基板の前記片側に、さらにカバー部材を備え、前記カバー部材は前記基板に接して
 いない、細胞培養用デバイス。 10

【請求項2】

前記凹部の容積が1 p l ~ 1 m l である、請求項1に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項3】

前記凹部の開口部の径が10 μ m ~ 5 0 0 μ m であり、前記凹部の高さが10 μ m ~ 5 0 0 μ m である、請求項1又は2に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項4】

前記複数の凹部同士の間、互いに少なくとも1 μ m の間隔がある、請求項1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項5】

前記複数の凹部が、前記基板の前記凹部が配置された領域において、同じ大きさを有し、かつ、等間隔に配置されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 6】

前記ゲル状培地が、ゲル化材料及び培地成分を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 7】

前記ゲル化材料が、寒天、アガロース、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン、セルロース及び Matrigel (登録商標) からなる群より選択される、請求項 6 に記載の細胞培養用デバイス。

10

【請求項 8】

前記基板の一部は、ガラス、樹脂、金属、セラミックス及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 9】

前記接触角が 50° 以上である表面が、シランカップリング剤又はフッ素樹脂によって表面処理された表面である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 10】

前記カバー部材と前記基板との間に 10 μm ~ 100 mm の距離がある、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

20

【請求項 11】

前記カバー部材と前記基板とが周縁部において密封されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 12】

前記カバー部材は、ガラス、樹脂、金属、セラミックス及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されている、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

【請求項 13】

前記複数の凹部同士の間、表面以外の任意の位置に凹部同士を連通する連通孔をさらに備える、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の細胞培養用デバイス。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養用デバイスに関し、特に片側に複数の凹部が配置された基板と、複数の凹部に充填されたゲル状培地とを備える細胞培養用デバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

現在有用微生物細胞の探索に際し、まず自然界から微生物細胞を含むサンプルを採取し、次に十分に希釈したサンプルを例えば 100 ~ 1000 菌 / シャーレで蒔き、培養し、コロニーを形成させ、コロニーを採取し単離する。さらに、単離したコロニーについて、例えば 12 ~ 394 菌 / プレートで増殖してから、種々の分析や選別が行われている。

40

【0003】

この方法では、微生物を単離するための培養と、分析するための培養との少なくとも 2 回の培養を必要とし、菌の移し替えや増殖に時間と手間がかかるうえ、一回で分析・選別できる微生物の数は多くて数百菌株程度と限られている。さらにこの方法では、増殖の遅い微生物の単離・分析・選別は困難である。

【0004】

一方、アレイ状に配置した油中に含まれる培地液滴を用い、細胞を培養しつつ分析する技術が報告されている (非特許文献 1)。しかしながら、この技術では、培地の液量が少なく、蒸発などで液体が徐々に減るため、数時間の培養しかできない。また、上記技術は

50

、油中液滴内で培養しているため、代謝物等が油中に分散してしまい、代謝物等を高濃度に蓄積させることが困難である。さらに、代謝物を分析するための試薬を予め培地に添加しておく必要があり、分析方法が制限されてしまうという問題点がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Ryota Iinoら、「A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter droplet array」, Lab on a Chip 12.20 (2012): 3923 - 3929

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記従来技術の問題点を鑑みて、一度に例えば数万株以上の多数の細胞を容易に分離・培養すると共に、分析・選別もその場で (in-situ) できる新規な細胞培養用デバイス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】

【0007】

本発明者らは、ゲル状培地が充填された複数の微小孔を有し、表面がはっ水処理されたアレイ状基板を用いることで、一度に数万規模の細胞を容易に分離・培養できると共に、代謝物等の分析や細胞株の選別も容易にその場で (in-situ) できることを見出し、本発明の完成に至った。

20

【0008】

ちなみに、本発明は、片側に複数の凹部が配置された基板と、複数の凹部に充填されたゲル状培地とを備える細胞培養用デバイスであって、複数の凹部の内表面を除いた基板の片側の表面の少なくとも一部は、JIS 3257 (1999) に従って測定した接触角が50°以上である表面である、細胞培養用デバイスを提供するものである。

【0009】

上記凹部の開口部の径が10 μ m ~ 500 μ mであり、上記凹部の高さが10 μ m ~ 500 μ mであることが好ましい。上記凹部の容積が1 μ l ~ 125 μ lであることが好ましい。

30

【0010】

上記基板の前記凹部が配置された領域において、凹部の単位面積当たりの数が、10個/cm²以上であることが好ましい。上記複数の凹部同士の間、互いに少なくとも1 μ mの間隔があることが好ましい。上記複数の凹部が、基板の前記凹部が配置された領域において、同じ大きさを有し、かつ、等間隔に配置されていることが好ましい。

【0011】

上記ゲル状培地が、ゲル化材料及び培地成分を含むことが好ましく、該ゲル化材料が、寒天、アガロース、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン、セルロース及びMatrigel (登録商標) からなる群より選択されることが好ましい。

40

【0012】

上記基板の一部は、ガラス、樹脂、金属、セラミックス、及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されていることが好ましい。

【0013】

上記接触角が50°以上である表面が、シランカップリング剤又はフッ素樹脂によって表面処理された表面であることが好ましい。

【0014】

上記基板の上記片側に、さらにカバー部材を備え、カバー部材は基板に接していないことが好ましい。上記カバー部材と基板との間に10 μ m ~ 100 μ mの距離があることが好ましい。上記カバー部材と基板とが周縁部において密封されていることが好ましい。上

50

記カバー部材は、ガラス、樹脂、金属、セラミックス及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されていることが好ましい。

【0015】

上記複数の凹部同士の間、表面以外の任意の位置に凹部同士を連通する連通孔をさらに備えることが好ましい。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、一度に例えば数万細胞株以上の多数の細胞を容易に分離・培養すると共に、分析・選別もその場で (*in-situ*) できる。特に、培地をゲル状培地とすることで、培地が容易に蒸発しないため、長時間の培養や保存が可能となる。また凹部に充填されたゲル状培地の容積が小さいため、冷凍しても体積の変化が少なく細胞を保持したままの冷凍も可能となる。また、細胞の代謝物や分泌物等はゲル状培地に容易に高濃度で蓄積することも可能となり、その場で (*in-situ*) の分析・選別を可能とする。さらに、複数の凹部の内表面を除いた基板の片側の表面が所定の接触角を有することで、ある程度の撥水性を発揮し、上記表面にゲル状培地の残留を低減できる。それによって、異なる凹部に存在する細胞の独立性が保たれ、異なる凹部同士の汚染 (クロスコンタミネーション) を抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明に係る細胞培養用デバイスの一実施形態を示す平面図である。

【図2】本発明に係る細胞培養用デバイスの一実施形態を示す断面図である。

【図3】実施例2の培養の顕微鏡写真を画像処理した結果を示すグラフである。

【図4】実施例2の培養を分析した結果を示すグラフである。(A)は各ゲルの菌量の分布を示し、(B)は各ゲルの菌の増殖曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明に係る細胞培養用デバイスの一実施形態の細胞培養用デバイス1の一部分を図1に示す。片側に複数の凹部2が配置された基板3と、複数の凹部に充填されたゲル状培地4とを備える細胞培養用デバイス1であって、細胞培養用デバイス1の、複数の凹部2の開口部側における、複数の凹部の内表面を除いた基板の片側の表面3aの少なくとも一部は、JIS 3257(1999)に従って測定した接触角が50°以上である表面である、細胞培養用デバイスである。

【0019】

複数の凹部(穴)は、基板の片側に位置し、基板を貫通せず、互いに隣接し、かつ、独立したものである。その形状は特に限定されず、例えば開口部が長方形又は正方形の直方体又は立方体、開口部が円形や楕円形の円柱体、開口部が三角形や六角形の多角柱体等が挙げられ、また底面が平らでなくてもよく、凹部内壁は平滑面でなく一定の粗さを持つ粗面であってもよい。凹部の開口部の径が10 μ m~50mmであり、凹部の高さが10 μ m~50mmであることが好ましい。なお、径は凹部の開口部の最も長い径をいい、開口部の形状によるが、例えば、長方形又は正方形は対角線の長さをいい、円形は直径をいい、楕円形は長軸の長さをいう。また、高さは、基板の最表面から凹部の底面までの垂直的な最長距離をいう。径が10 μ m~50mmであれば、細胞培養用デバイスに細胞を含有するサンプルを加えるときに、細胞の種類によるが、一つの凹部に一つ又は多くても数個の細胞しか入らず、細胞の単離、及びその後の分析・選別を容易にすることができる。さらに、高さが10 μ m~50mmであれば、細胞を培養するための培地の量を十分に確保できる。凹部の開口部の形状、径及び高さは、培養対象及び培養目的によって適宜に変更し得る。径が10 μ m~5mm、又は30 μ m~1mm、さらに50 μ m~500 μ mであることが好ましく、高さが10 μ m~5mm、又は30 μ m~1mm、さらに50 μ m~500 μ mであることが好ましい。

【0020】

凹部の容積は、細胞を培養するための必要なゲル状培地の量を考慮し、1 p l ~ 1 0 0 m l であることが好ましく、1 0 p l ~ 5 0 m l がより好ましく、1 0 0 p l ~ 1 0 m l 、さらに3 0 0 p l ~ 1 m l であることが特に好ましい。ゲル状培地は、凹部の全体を満たしてもよく、凹部の下部のみに充填されていてもよい。ゲル状培地の体積は、1 p l ~ 1 0 0 m l であることが好ましく、1 0 p l ~ 5 0 m l がより好ましく、1 0 0 p l ~ 1 0 m l 、さらに3 0 0 p l ~ 1 m l であることが特に好ましい。

【0021】

基板における凹部の単位面積当たりの個数は、必要に応じ適宜に設定することができ、例えば、基板の凹部が配置された領域において、凹部の単位面積当たりの数が、1 0 個 / c m ² 以上であることが好ましく、1 0 0 個 / c m ² ~ 1 0 0 , 0 0 0 個 / c m ² がより好ましく、1 0 0 0 個 / c m ² ~ 1 0 , 0 0 0 個 / c m ² が特に好ましい。このような基板を有する細胞培養用デバイスを用いることで、一度に容易に例えば数千個 ~ 数十万個の細胞を培養・分析・選別することができる。

10

【0022】

複数の凹部の間の距離（間隔又はピッチ）は、独立性が保たれていれば特に限定しないが、クロスコンタミネーションの低減の観点から、複数の凹部同士の間互いに少なくとも1 μ m の間隔があることが好ましい。細胞の種類、及び分析又は選別の条件若しくは要求される精度によって、上記間隔を適宜に設定でき、例えば、1 0 μ m 以上、5 0 μ m 以上、1 0 0 μ m 以上とすることができる。また、上記間隔は、凹部の開口部の径の0 . 5 倍 ~ 1 0 倍とすることが好ましく、1 倍 ~ 5 倍がより好ましく、1 . 5 倍 ~ 3 倍が特に好ましい。一例では、径が7 0 μ m ~ 9 0 μ m の凹部を1 0 0 μ m ~ 2 1 0 μ m ピッチで配置することができ、別の例では、径が3 0 μ m ~ 5 0 μ m の凹部を6 0 μ m ~ 9 0 μ m ピッチで配置することができ、更なる例では径が3 1 0 μ m ~ 3 3 0 μ m の凹部を μ m ~ 9 3 0 μ m ピッチで配置することができる。

20

【0023】

基板において、複数の凹部がランダムに配置されていてもよく、等間隔（アレイ状）に配置されていてもよい。複数の凹部は同じ大きさでもよく、必要に応じて異なる大きさとしてもよい。好ましくは複数の凹部が、基板の凹部が配置された領域において、同じ大きさを有し、かつ、等間隔に配置されている。また、一の基板において、凹部が配置された領域が一つでもよく、複数でもよい。例えば一の基板を複数の領域に分け、異なる領域における凹部を異なる大きさのものとすることもできる。さらに、異なる凹部に位置する細胞の相互作用を検出するために、複数の凹部同士の間互いに凹部同士を連通する連通孔を設けることもできる。この連通孔は、凹部の表面以外の任意の位置に設けることができる。これによって異なる凹部のゲル状培地を連通することで、ゲル状培地に蓄積された細胞の代謝物等を別の凹部に位置する細胞に作用させることができ、細胞同士の相互作用を容易に分析することができる。

30

【0024】

ゲル状培地は、ゲル化材料及び培地成分を含むことが好ましい。該ゲル化材料は、培地をゲル状にでき、かつ、細胞の培養に使用し得るものであればよく、例えば、寒天、アガロース、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン、セルロース及びM a t r i g e l（登録商標）が好ましく使用される。これらのゲル化材料の添加濃度は、培地をゲル状にすることができればよく、当業者が必要に応じて適宜に設定できるものである。ゲル状培地は、細胞の培養又は保存条件においてゲル状であればよく、例えば - 8 0 ~ 1 0 0 の温度範囲内の任意の温度においてゲル状であることが好ましい。

40

【0025】

ゲル状培地に含まれる培地成分は、細胞を培養するための培地成分であれば特に限定されないが、例えば、イーストペプトン、イーストエクストラクト、p H 調節剤、塩、アミノ酸、肉エキス、金属イオン、糖、でんぷん、植物抽出物、抗生物質、又は化学分析用の試薬が含まれる。また、例えばL B 寒天培地、ダイゴ（登録商標；和光純薬）などの市販の既製培地を使用してもよい。これらの培地成分の濃度は、細胞の種類、及び培養、分析

50

又は選別の条件によって異なり得るが、当業者が必要に応じて適宜に設定できるものである。ゲル状培地は、既知な方法、例えばLB培地構成成分を蒸留水で溶解し、さらに精製寒天粉末を添加し65以上に加熱することによって作製することができ、作製したゲル状培地をオートクレーブ滅菌等によって滅菌処理してもよい。

【0026】

片側に複数の凹部が配置された基板は、その形状は特に限定されず、長方形や正方形等の多角形、円形又は楕円形などが挙げられる。厚みは、凹部の高さより大きければよく、例えば凹部の高さより10 μ m~500 μ m大きい厚みを有することが好ましい。基板全体の厚みは、例えば200 μ m~1000 μ m、200 μ m~500 μ m、又は300 μ m~500 μ mの範囲とすることができる。

10

【0027】

基板の材質は、特に限定されないが、基板の一部、例えば、接触角が50°以上である表面（以下、「所定表面」ということがある）以外の部分は、ガラス、シリコン、アクリル樹脂、シクロオレフィンポリマー、ポリジメチルシロキサン、もしくはポリエチレンテレフタレート等樹脂、金もしくは白金等金属、セラミックス、及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されていることが好ましく、そのうち、密閉性、コスト、加工性の観点から、ガラス、シリコン、アクリル樹脂、シクロオレフィンポリマー、又はポリエチレンテレフタレートであることが特に好ましい。また、基板は、単一の材料によって一体成型された単一の層を有してもよく、単一の材料又は複数の材料からなる複数層を有してもよい。

20

【0028】

複数の凹部の内表面を除いた基板の片側の表面（図1の3a）の少なくとも一部は、JIS 3257（1999）に従って測定した接触角が50°以上である表面（所定表面）である。所定表面は、少なくとも複数の凹部の間に位置することが好ましい。

【0029】

ここで、接触角がJIS 3257（1999）に従って測定したものを指すが、JIS 3257（1999）に準じた方法で測定したものも含む。JIS 3257（1999）の方法は、要約すると、1~4 μ L程度の蒸留水の液滴を基板面に静置し、静止液体の自由表面が、固体壁に接する場所で、液面と固体面とのなす角（液の内部にある角をとる）を測定する方法である。接触角を測定する装置は、当業者が使用し得るものであれば特に限定しないが、例えばDM-901（協和界面科学株式会社）等の全自動接触角計等によって測定することはできる。接触角が50°以上であれば、ある程度の撥水性を発揮し、凹部以外の基板表面におけるゲル状培地の残留が十分に少なく、細胞同士のクロスコンタミネーションを抑えることができる。上記接触角が大きければ大きいほど、撥水性が高く、基板表面におけるゲル状培地の残留が少ないため、接触角が好ましく60°以上、70°以上、80°以上、90°以上、又は100°以上である。

30

【0030】

前記接触角が50°以上である表面（所定表面）は、基板の材質によって表面処理しなくてもよいが、表面処理され表面であることが好ましい。所定表面は、任意の表面処理剤、例えば、シランカップリング剤又はフッ素樹脂によって表面処理された表面であることが好ましい。シランカップリング剤としては、一般的に使用されるものであればよく、例えばフッ素系シランカップリングが挙げられる。フッ素樹脂としては、例えばポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオライド、ポリビニルフルオライド、テトラフルオロエチレンとヘキサフルオロプロピレンの共重合体、テトラフルオロエチレンとエチレン共重合体、テトラフルオロエチレンとパーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体、クロロトリフルオロエチレンとエチレンの共重合体などが挙げられる。また、市販の疎水処理コート剤も好ましく使用され、そのうち、摩擦等の機械ストレスに対する耐久性の観点から、サイトップ（登録商標）、フロロサーフ（登録商標）等が特に好ましい。

40

【0031】

50

基板の凹部が配置された片側に、さらに基板に接していないカバー部材を備えることが好ましい。カバー部材によって、ゲル状培地や基板への汚染を防ぐことができ、また、ゲル状培地の蒸発を防止することもできる。カバー部材は、基板との間に例えば、 $10\ \mu\text{m}$ ~ $100\ \text{mm}$ の距離があることが好ましい。カバー部材と基板との距離とは、カバー部材の基板に面する側の面から、基板の凹部が配置された片側の表面までの距離をいう。カバー部材と基板との間に所定の距離をおくことで、培養温度において、微量に蒸発した培地中の水分が水滴を形成することなく、所定の湿度を維持することができる。この距離は、水蒸気が十分対流する空間の確保の観点から、 $30\ \mu\text{m}$ ~ $50\ \text{mm}$ であることがより好ましく、 $50\ \mu\text{m}$ ~ $10\ \text{mm}$ であることが特に好ましい。

【0032】

さらに、カバー部材と基板とは周縁部において密封されていることが好ましい。周縁部は、カバー部材の周縁部、基板の周縁部、又はカバー部材と基板の両方の周縁部を含む。密封することにより、密封しないものに比べ、ゲル状培地の蒸発をより効果的に防止することができ、細胞培養用デバイス内の培養微環境を容易に維持することもできる。さらに、製品の長期的な保管や、細胞を保持したままの長期的な保存も可能となる。

【0033】

カバー部材の形状は特に限定されないが、基板とほぼ同じ形状及びほぼ同じ大きさであることが好ましい。また、所定の距離を設けるために、カバー部材と基板との間に、好ましくは周縁部において、リング等の樹脂製パッキン、シリコンゴムなどの緩衝材等の部材を配置することができる。また、カバー部材の周縁部の形状を所定の高さに合わせて設計してもよい。密封方法は特に限定されないが、例えば、接着剤等の充填剤、粘着テープ、又はパラフィンフィルムによって密封することができる。

【0034】

カバー部材の材質は特に限定されないが、ガラス、アクリル樹脂、シクロオレフィンポリマー、ポリジメチルシロキサン、もしくはポリエチレンテレフタレート等樹脂、金もしくは白金等金属、セラミックス及び耐水紙からなる群より選択される材料から構成されていることが好ましい。

【0035】

細胞培養用デバイスは、任意の方法、例えば、フォトリソグラフィーによる光造形法、ウェットエッチング、ドライエッチング、サンドブラスト加工、射出成型、又はインプリンティング等の方法によって作製することができる。

【0036】

光造形法では、例えばまず基板の片側に感光性樹脂を塗布し、次に上記樹脂面に所定の光のパターンを照射し、露光した部分の樹脂を変質させ、加熱処理等の後、対応する適切な現像液によって現像し、所定のパターンを有する樹脂層を形成する。この方法に使用する材料はネガティブフォトレジストであり、光パターンを照射するための機器はフォトマスクのセットされた露光機、もしくはレーザー描画装置、又はマスクレス露光機である。この方法によれば、微小なパターンを比較的安価に作製できる。これによって得られた細胞培養用デバイスは、デバイスの設計変更がすばやくできるため、パターン検討の簡便さの利点を有し、研究開発に適している。

【0037】

ドライエッチング法では、まず上述したようにフォトリソグラフィーにより樹脂パターンを形成した基板を用意し、次にプラズマ等で樹脂面と樹脂パターンが形成されていない基板面とを同時にエッチングする、最後に樹脂を取り除く。この方法に使用できる材料はSi、ガラス、金属等であり、機器はアクティブイオンエッチング装置等である。この方法によれば、凹部構造を基板と同じ材質で作製できるため、機械的・化学的な強度を確保しやすい。これによって得られた細胞培養用デバイスは、高い耐久性を有し、繰り返し再現性や再利用可能性の利点を有し、低コストの運用に適している。

【0038】

本発明の細胞培養用デバイスは、その場 (*in-situ*) で細胞の培養・分離・分析

10

20

30

40

50

・選別に使用することができるため様々な分野に利用され得る。細胞の種類はゲル状培地で培養できる細胞であればよく、植物細胞、動物細胞又は微生物細胞が好ましく、特に微生物細胞が好ましい。微生物細胞として、例えば大腸菌、緑膿菌、及びニトロソモナスユーロピア等が列挙される。本発明の細胞培養用デバイスは、様々な分離・分析・選別の目的に対応でき、特に特定代謝能を持つ細胞又は代謝能の高い細胞のスクリーニングに好適に使用できる。例えばアンモニア硝化能を持つニトロソモナスユーロピアは、排水処理に利用されているため、より高い処理能を有するニトロソモナスユーロピアの選別に好ましく利用される。本発明の細胞培養用デバイスはまた、植物細胞や動物細胞の分化の研究やスクリーニング、シグナル物質作用の影響の研究等の用途にも活用できる。

【0039】

また、本発明の細胞培養用デバイスは、サンプル中に含まれる複数種類の細胞株の多様性を維持したままに保存することもできる。例えば、本発明の細胞培養用デバイスに細胞を含むサンプルより植付け、サンプルの性質に応じた一定時間の培養を行った後、冷凍機や低温保存機器等で冷凍保存か冷蔵保存する。この場合の利点は、増殖速度が異なるか互いに生育を阻害しあう細胞がサンプル中に含まれていても、凹部で隔離され独立性が保たれており、細胞同士が影響を及ぼしあわず、多様性が維持できること、及び高密度に多種の細胞株を保存できることである。

【0040】

さらに、本発明の細胞培養用デバイスは、細胞の放出するシグナル物質の作用の研に使用することもできる。例えば、隣接する二つ以上の凹部をつなぐゲル状培地で充填された連通孔(図2の5)を形成することで、別々の凹部の細胞同士が交わらないまま、ある凹部にある細胞の放出した物質は拡散により別の凹部に移動できるため、別の凹部にある細胞に対する作用を観察・分析することができる。これにより、偶然隣接した細胞同士の相互作用を検討することができる。本発明の細胞培養用デバイスの利点は、通常1つの組み合わせの作製に通常複数回の操作が必要であったのに対して、一度に10,000通りの組み合わせを可能とすること、及び、ゲル状培地の体積が小さいため、拡散によるシグナル物質の輸送が早く、観察・分析を短時間にできることである。

【0041】

本発明の細胞培養用デバイスは、他の分析装置、測定装置、又は細胞ピックアップ装置と併用することで、さらに効率よく細胞の分析・選別・単離を容易にすることができる。

【実施例】

【0042】

以下、実施例を挙げて本発明の実施形態をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0043】

(実施例1 細胞培養用デバイスの作製)

直径が3インチ(76.2mm)、厚みが500 μ mのガラスウェハを沸騰させた後、29%NH₄OH:31%H₂O₂:純水=1:1:4の比で混合した溶液中で15分間洗浄した。沸騰した純水中で15分間ずつ2回洗浄したのち、自然乾燥させ、基板の土台とした。

【0044】

上記土台ガラスウェハの上に、厚膜フォトレジスト(NANO^TM SU-8 Negative Tone Photoresist Formulations 2-25; Micro CHEM)を0.04g/cm²で、全部で0.8g滴下した。続いて2,000rpm、15秒スピコートした。65 $^{\circ}$ Cで2分間、95 $^{\circ}$ Cで20分間プリベークを行った。SU-8用フォトマスクを使用し、60秒間、UV光(8w/cm²)に露光した。65 $^{\circ}$ Cで15分、ポストベークを行った。SU-8用現像液で現像し、純水ですすいだ後、乾燥させ、基板を得た。該基板は、80 μ m角の立方体の凹部を有し、凹部同士の幅(ピッチ)は160 μ mであり、3906個凹部/cm²の区画(1cm \times 1cm)を24個有し、凹部を全部で93744個/基板有するものであった。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

その後、超撥水コート剤フコロサーフFS-1060（フコロテクノロジー社製）をスピコートし、100℃で1時間ベークし、表面処理を行い、凹部の内表面はスピコート処理によってコーティングされないため、基板の凹部の内表面以外の表面において疎水性層（SU-8層）を成膜した。接触角は、JIS 3257（1999）にしたがって、蛍光顕微鏡（VB-7010、KEYENCE）を用いて表面処理前及び処理後の水に対する接触角を測定した。表面処理前の表面の接触角は約50°であったのに対して、表面処理後の表面は約120°となった。

【 0 0 4 6 】

ゲル状培地は、蒸留水1Lあたり、トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10g、精製寒天15gを加え、121℃で15分オートクレーブ処理を行うと同時に溶解させることによって作製した。

【 0 0 4 7 】

上記得られた基板をエタノールに浸漬することで基板を滅菌し、ホットプレート上に置き、続いて70℃で溶融した上記得られたゲル状培地を、基板を満たすように加え、常温にて冷却し、ゲル状に固めた。その後、ヘラを用い、基板上の余分のゲルを表層から除去した。表面処理した基板は、ゲル状培地がほぼ完全に除去され、基板表面への培地の残留は観察されなかった。一方で、表面処理されていない基板の表面には、ゲル状培地の残留が認められ、全体としては10%程度の凹部が隣接する凹部とゲル状培地でつながった状態となり、独立したチャンバーとして使えないものとなった。しかしながら、このようなデバイスであっても、高い精度が求められない大量スクリーニングには使用できるものである。

【 0 0 4 8 】

これによってウェハ状細胞培養用デバイスを形成した。SU-8層の膜厚は約100μmであった。得られた細胞培養用デバイスに対し、外形3インチ（76.2mm）、幅7mm、厚さ50μmのシリコーンゴムからなるリングを介し基板と同サイズ、厚さ500μmのガラス製のカバーを被せ封止を行い、使用されるまで冷蔵庫で保存した。

【 0 0 4 9 】

（実施例2 細胞の分離及び分析・選別）

大腸菌E. coli K-12 eGFP発現菌、及びDsRED発現菌の二種類の菌がそれぞれフルグロースした培養液を、1:1で混合し、 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9 / \text{ml}$ の混合菌液とした。混合菌液8mlが入ったシャーレに実施例1で得られた滅菌したデバイスの基板部を10秒浸漬した後、デバイスを取り出し、エアブローで表面に残った液滴を除去した。デバイスに再度カバーし、パラフィンフィルムで密封してから、37℃、18時間で培養した。

【 0 0 5 0 】

18時間後、デバイスを蛍光顕微鏡（オリンパス社製）にて観察した。蛍光顕微鏡で経時観察した結果、本デバイスで単一の菌がゲル内で増殖していく様子が観察できた（図示せず）。また隣接するゲル間での菌の移動は観察されず微小なゲルがそれぞれ独立した培養器として機能していることが示された。本デバイスで大腸菌の数万オーダーの単離培養、及び18時間以上の培養が可能であることが確認された。

【 0 0 5 1 】

また、顕微鏡写真を画像分析した結果を図3に示した。実線はeGFP発現菌を示し、破線はDsRED発現菌を示す。各ゲル位置に相当する画像の上方の数字は蛍光強度の平均値より菌の量を推定した数値である。静止画像（図3）より各ゲルの菌量の分布（図4（A））、及び各菌の増殖曲線（図4（B））が一括して得られ、増殖能に優れるまたは劣る菌株の検出が可能であることが分かった。さらに、顕微鏡の電動ステージに固定したニードルを用いることで、特定のゲルのピックアップにも成功した。なお、この画像分析には自家製の画像解析ソフトウェアを使用した。このソフトウェアはデバイス上で蛍光を示すゲルを検出し、その座標・蛍光強度を取得することが可能であり、蛍光試薬を用いた

10

20

30

40

50

ゲル中の細胞の代謝物のアッセイ・分析にもそのまま使用することができる。

【 0 0 5 2 】

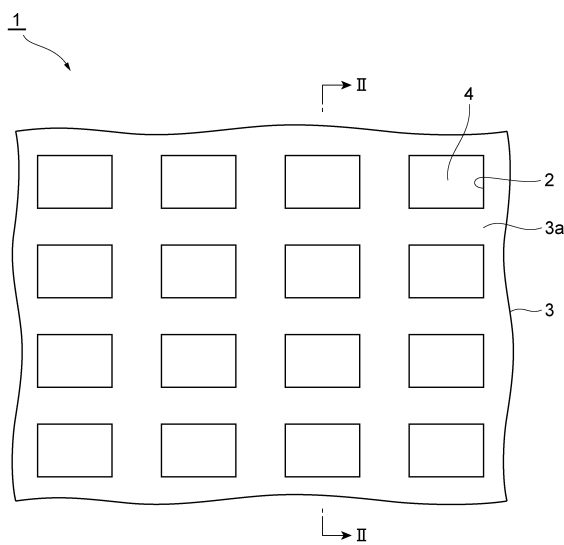
実施例 2 から分かるように、本デバイスでは 1 0 , 0 0 0 個オーダーの大腸菌株を単離し、1 8 時間以上にわたる同時培養に成功、培養時の画像を解析することで、増殖能に優れた菌株を特定、培養後の任意のゲルを選別可能である。本発明の細胞培養用デバイスは、スループットに優れ、これによれば、大規模スクリーニングを容易にできる。

【 符号の説明 】

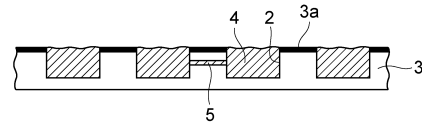
【 0 0 5 3 】

1 ... 細胞培養用デバイス、2 ... 凹部、3 ... 基板、3 a ... 複数の凹部の内表面を除いた表面、4 ... ゲル状培地、5 ... 凹部同士を連通する連通孔。

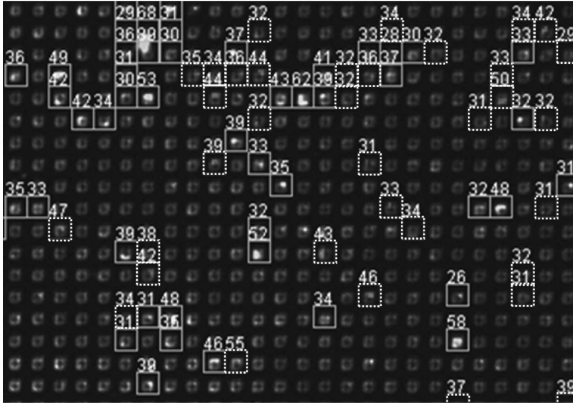
【 図 1 】



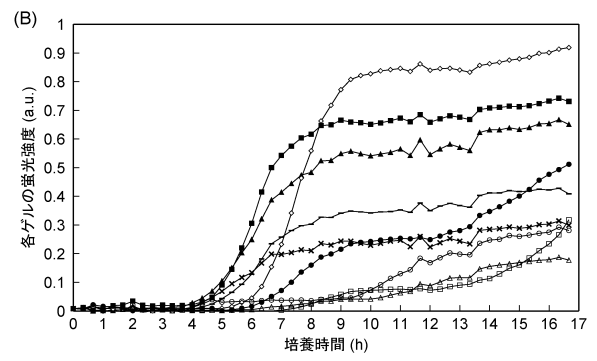
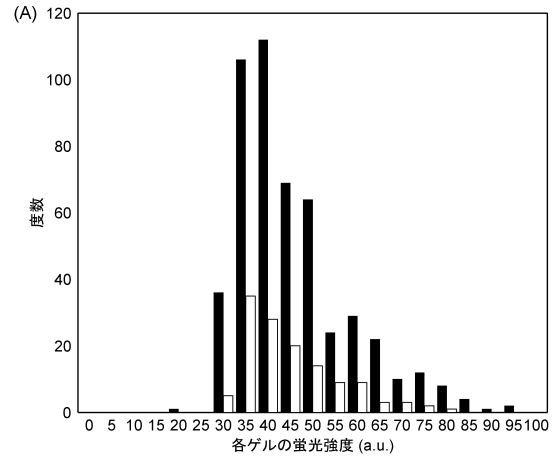
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 鈴木 博章
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 佐々 文洋
茨城県つくば市天久保3-9-1-302
- (72)発明者 清川 達則
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 横川 雅俊
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 豊福 雅典
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 尾花 望
茨城県つくば市吾妻1-17-1-403-1302
- (72)発明者 濱田 将風
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 稲葉 知大
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 特表2001-522242(JP,A)
国際公開第2009/034927(WO,A1)
特表2004-508842(JP,A)
特開平10-337178(JP,A)
国際公開第2006/028274(WO,A1)
国際公開第2005/028612(WO,A1)
特開2005-261285(JP,A)
特開2013-066393(JP,A)
国際公開第2012/057064(WO,A1)
国際公開第2005/083056(WO,A1)
特開2006-115723(JP,A)
特開2000-097844(JP,A)
特開2011-000131(JP,A)
特開2009-022276(JP,A)
国際公開第2012/061086(WO,A1)
Lab on a Chip, 2012年, Vol.12, pp.1487-1494
Chemical Sensors, 2009年, Vol.25, Supplement B, pp.64-66

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS(STN)