

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6439115号
(P6439115)

(45) 発行日 平成30年12月19日(2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 N	5/076	(2010.01)	C 1 2 N	5/076	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	C

請求項の数 4 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2014-119858 (P2014-119858)	(73) 特許権者	801000049 一般財団法人生産技術研究奨励会 東京都目黒区駒場四丁目6番1号
(22) 出願日	平成26年6月10日(2014.6.10)	(73) 特許権者	000125369 学校法人東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号
(65) 公開番号	特開2015-231354 (P2015-231354A)	(73) 特許権者	505155528 公立大学法人横浜市立大学 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号
(43) 公開日	平成27年12月24日(2015.12.24)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成29年5月19日(2017.5.19)	(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織片の機能を発現・維持する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数種の構造体を含む、器官の機能を発現し得る組織片の前記機能を発現させ維持する方法であって、

前記組織片が精巢組織片であり、

前記組織片を培養室に收容し、前記培養室と隔離材を介して接する流路に培養液を流通させる工程を有し、

前記隔離材が、多孔質膜、または相互に間隔をあけて配置された複数の壁材から構成されるスリット部であり、

前記培養室が、前記隔離材から400μm以下の領域内に設けられていることを特徴とする方法。 10

【請求項2】

下記組織片培養デバイスを用いる、請求項1に記載の方法。

器官の機能を発現し得る組織片を收容する培養室と、

培養液を流通させる流路と、

隔離材と、

を備え、

前記隔離材が、多孔質膜、または相互に間隔をあけて配置された複数の壁材から構成されるスリット部であり、

前記培養室と前記流路とが、前記隔離材を介して接しており、 20

前記培養室が、前記隔離材から400 μm以下の領域内に設けられている組織片培養デバイス。

【請求項3】

前記組織片培養デバイスが、透明基板と、培養室形成用の切欠き部が設けられた第一の層と、前記多孔質膜と、流路形成用の溝が設けられた第二の層とがこの順で積層したデバイス本体を備え、

前記多孔質膜は、前記切欠き部と前記溝とを区画するように配置され、

前記透明基板と前記切欠き部と前記多孔質膜とで囲まれた空間が前記培養室とされ、前記多孔質膜または前記第二の層と前記溝とによって囲まれた空間が前記流路とされている、請求項2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記デバイス本体は、前記透明基板側を下側にして配置され、

前記第二の層に、前記流路に培養液を供給する培養液導入路と、前記流路から培養液を排出する培養液排出路とが形成され、

前記培養液導入路および前記培養液排出路がそれぞれ前記デバイス本体の上面に開口し、

前記培養液導入路の開口に、培養液を収容するタンクが取り付けられ、前記培養液排出路の開口に吸引ポンプが接続されている、請求項3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、器官の機能を発現し得る組織片の機能を発現させ維持する方法、および該方法に用いられる組織片培養デバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、生体から取り出した組織片を器官培養法により培養することが行われている。例えば器官培養法による*in vitro*精子形成の試みは、器官培養法の草創期からなされており、1937年には新生仔マウス精巣組織片を凝血塊上で培養して、減数分裂パキテン期までの分化が進行したとの報告がある。

器官培養法としては主に、気層液層境界部培養法(*Gas-liquid interface*法)と旋回培養法の2つが知られている。これらの方法は、1950~1960年代に開発され、応用されてきた。

30

しかし、従来の器官培養法は、生体から切り出した組織片の形態や機能を維持できる期間が短く、数日からせいぜい2~3週間である。また、組織片の機能の発現も充分とはいえない。例えば前記のような新生仔マウス精巣組織片の培養を気層液層境界部培養法で行った場合、精子形成の進行はやはりパキテン期までであった。

【0003】

非特許文献1には、気層液層境界部培養法を応用した*in vitro*での精子形成の促進に有効な方法として、培養液に半分程度浸漬したアガロースゲルの台の上に新生仔マウス精巣組織片を載せて培養すること、その際、培養液に、従来頻用されている牛胎仔血清(FBS)の代わりにKnockOut(登録商標) Serum Replacement(KSR)を添加すること、が提案されている。この方法によれば、新生仔マウス精巣組織片から精子を産生させ、顕微授精で産仔を得ることに成功したことが報告されている。また、精子形成を1~2か月維持できたことも報告されている。

40

【0004】

一方、1990年代からMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いてマイクロ流体デバイスという流路系をもった培養システムが工学分野において開発されている。

非特許文献2や特許文献1では、マイクロメーターオーダーの微細な流路を作製し、該流路上に細胞を培養する空間を設け、該流路と該空間との間に細胞の足場となる多孔質膜

50

を配置したデバイスが提案されている。該流路に2種以上の培養液を多層流として流通させると、各培養液が多孔質膜を介して流路上の空間内に供給され、該空間内の物質分布を時間的にも空間的にも制御し、細胞の分化等を制御できるとされている。しかし、組織片の培養については検討されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】T. Sato, K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota, T. Ogawa, "In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes", Nature, VOL 471, pp. 504 - 508, 24 MARCH 2011

10

【非特許文献2】J. Kawada, H. Kimura, H. Akutsu, Y. Sakai, T. Fujii, "Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation", Lab on a Chip, vol. 12, no. 21, pp. 4508 - 4515, 2012

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2011-147387号公報

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

細胞培養法と器官培養法とは性質が大きく異なっており、意義や応用方法もおのずと異なっている。

器官培養法と細胞培養法と比べた場合、器官培養法は、臨床応用に際して幾つかの強みがある。例えば、精巣生検で得られる検体をそのまま器官培養に供することができる。すなわち、生検検体から精子や精子幹細胞を取り分ける操作が省略できる。臨床現場においてはこの簡便さが強みになると考えられる。しかし、器官培養法は、前記のとおり、短時間しか組織片の機能を維持できないという弱点がある。

30

【0008】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、培養条件下で組織片の機能を長期間維持できる方法および組織片培養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】

【0009】

本発明は以下の態様を有する。

[1] 器官の機能を発現し得る組織片の前記機能を発現させ維持する方法であって、前記組織片を培養室に収容し、前記培養室と隔離材を介して接する流路に培養液を流通させる工程を有し、

前記隔離材が、多孔質膜、または相互に間隔をあけて配置された複数の壁材から構成されるスリット部であり、

40

前記培養室が、前記隔離材から400 μ m以下の領域内に設けられていることを特徴とする方法。

[2] [1]に記載の方法に用いられる組織片培養デバイスであって、

器官の機能を発現し得る組織片を収容する培養室と、

培養液を流通させる流路と、

隔離材と、

を備え、

前記隔離材が、多孔質膜、または相互に間隔をあけて配置された複数の壁材から構成されるスリット部であり、

50

前記培養室と前記流路とが、前記隔離材を介して接しており、
前記培養室が、前記隔離材から400 μm以下の領域内に設けられている組織片培養デバイス。

[3] 透明基板と、培養室形成用の切欠き部が設けられた第一の層と、前記多孔質膜と、流路形成用の溝が設けられた第二の層とがこの順で積層したデバイス本体を備え、
前記多孔質膜は、前記切欠き部と前記溝とを区画するように配置され、
前記透明基板と前記切欠き部と前記多孔質膜とで囲まれた空間が前記培養室とされ、前記多孔質膜または前記第二の層と前記溝とによって囲まれた空間が前記流路とされている、[2]に記載の組織片培養デバイス。

[4] 前記デバイス本体は、前記透明基板側を下側にして配置され、
前記第二の層に、前記流路に培養液を供給する培養液導入路と、前記流路から培養液を排出する培養液排出路とが形成され、

前記培養液導入路および前記培養液排出路がそれぞれ前記デバイス本体の上面に開口し、
前記培養液導入路の開口に、培養液を収容するタンクが取り付けられ、前記培養液排出路の開口に吸引ポンプが接続されている、[3]に記載の組織片培養デバイス。

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法によれば、培養条件下で組織片の機能を長期間維持できる方法および組織片培養デバイスを提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の第一実施形態のデバイス100の上面図である。

【図2】デバイス100使用時における、図1のII-II断面図である。

【図3】図2中の点線丸印で囲んだ部分の拡大図である。

【図4】図1のIV-IV断面の一部を示す部分断面図である。

【図5】本発明の第二実施形態のデバイス200の側面図である。

【図6】デバイス200を構成する層53の上面図である。

【図7】図6のVII-VII断面の一部を示す部分断面図である。

【図8】デバイス200のスリット部61を溝5側から見た部分断面図である。

【図9】デバイス100の変形例を説明する部分断面図である。

【図10】試験例1で培養した組織片の培養28日目の時点の倒立顕微鏡像である。

【図11】比較例1にてアガロースゲル上で培養した精巢組織片のGFP Grade G1~G6それぞれの段階の蛍光顕微鏡像である。

【図12】実施例1および比較例1の結果を示すグラフである。

【図13】比較例2で作製したポリマー層の貫通孔73周辺の部分上面図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の方法は、器官の機能を発現し得る組織片の前記機能を発現させ維持する方法であって、

前記組織片を培養室に収容し、前記培養室と多孔質膜を介して接する流路に培養液を流通させる工程を有し、

前記培養室が、前記多孔質膜から400 μm以下の領域内に設けられていることを特徴とする。

【0013】

培養室に組織片を収容し、流路に培養液を流通させると、流路と培養室との間で、多孔質膜を介して物質交換が行われる。すなわち、流路を流通する培養液中の成分(栄養素、酸素等)が培養室内へ供給され、培養室内の組織片からの老廃物が流路側へ排出される。これにより、培養室内の組織片の培養が行われる。

【0014】

10

20

30

40

50

本発明において、「機能を発現させ維持する」とは、培養室に収容する時点で既に機能を発現している組織片に、その状態（機能が発現している状態）を維持させること、および培養室に収容する時点では機能を発現していない組織片に、機能を発現させ、その状態を維持させること、の両方を包含する。

【0015】

「器官」とは、動物、植物等の多細胞生物の体を構成し、一定の形態と生理機能を営むものの総称である。

「器官の機能」とは、器官が本来備えている働きを意味する。例えば器官が精巣である場合、器官の機能には、精子を形成する働きが含まれる。

【0016】

「器官の機能を発現し得る組織片」は、器官の機能を発現するために必要な構造単位を含む。構造単位は、典型的には、複数種の構造体を含む。構造単位を構成する構造体の種類および数は器官によって異なる。例えば精巣の場合、構造単位は、精細管と間質とを含む。精細管のみでは、培養条件下で精子形成能を長期間維持することは困難である。精巣において間質は、複数の精細管の間を埋めている。間質には血管（動脈、静脈、毛細血管）や複数種の細胞が存在し、精子形成をサポートしている。

【0017】

本発明の方法は、例えば、以下の組織片培養デバイス（以下、単にデバイスともいう。）を用いて行うことができる。該デバイスの培養室に組織片を収容し、流路に培養液を流通させることにより本発明の方法を実施できる。

器官の機能を発現し得る組織片を収容する培養室と、
培養液を流通させる流路と、
多孔質膜と、
を備え、

前記培養室と前記流路とが、前記多孔質膜を介して接しており、
前記培養室が、前記多孔質膜から400 μm以下の領域内に設けられているデバイス。

【0018】

以下、本発明の方法およびデバイスについて、添付の図面を用い、実施形態を示して説明する。ただし本発明は以下の実施形態に限定されない。

【0019】

第一実施形態

<第一実施形態のデバイス>

図1～4を用いて、本発明の第一実施形態のデバイス100を説明する。

図1は、デバイス100の上面図である。図2は、デバイス100使用時における、図1のII-II断面図である。図3は、図2中の点線丸印で囲んだ部分の拡大図である。図4は、図1のIV-IV断面の一部を示す部分断面図である。

【0020】

デバイス100は、デバイス本体1と、培養液を収容するタンク9と、管35と、チューブ25と、図示しない吸引ポンプとを備える。

デバイス本体1は、透明基板11と、第一の層13と、多孔質膜7と、第二の層15とがこの順に積層したものである。

【0021】

第一の層13は、矩形形状の切欠き部3を有している。切欠き部3は、W1の幅でIV-IV方向に延在している。

第二の層15は、第一の層13側に、溝5を有している。溝5は、W2の幅でII-II方向に延在している。

溝5の中間部と切欠き部3の一端側は平面視で重なる位置とされている。

多孔質膜7は、切欠き部3と溝5とを区画するように配置されている。

多孔質膜7は、第一の層13上の、デバイス100を積層方向から観察した時に溝5と重なる部分とその周辺を覆うように配置されており、第一の層13の一部は、第二の層1

10

20

30

40

50

5と直接接している。

【0022】

したがって、デバイス本体1内には、透明基板11と切欠き部3と多孔質膜7とで囲まれた空間と、多孔質膜7または第二の層15と溝5とによって囲まれた空間とが形成されている。

デバイス本体1においては、透明基板11と切欠き部3と多孔質膜7とで囲まれた空間のうち、溝5の下側の部分(デバイス100を積層方向から観察した時に溝5と重なる部分)が培養室S1とされ、残りの部分が、培養室S1に組織片を導入するための組織片導入路S2とされている。また、多孔質膜7または第二の層15と溝5とによって囲まれた空間が、培養液を流通させる流路S3とされている。

10

図3には、培養室S1に組織片31が導入された状態を示している。

【0023】

第二の層15の、溝5の両端上の位置にはそれぞれ、デバイス本体1の上面に開口する貫通孔21、23が設けられている。貫通孔21、23はそれぞれ、流路S3に培養液を供給する培養液導入路、流路S3から培養液を排出する培養液排出路とされている。

貫通孔21の開口には、培養液を収容するタンク9が取り付けられ、貫通孔23の開口には、チューブ25を介して、図示しない吸引ポンプが接続されている。これにより、吸引ポンプを作動させたときに、タンク9内に収容された培養液を貫通孔21から流路S3に導入し、流路S3を流通させ、貫通孔23から排出できるようになっている。

20

【0024】

第二の層15の、切欠き部3の組織片導入路S2側(培養室S1とは反対側)の末端上の位置には、デバイス本体1の上面に開口する貫通孔33が設けられている。貫通孔33の開口には、円筒状の管35が取り付けられている。

管35は必須ではないが、管35を設けることにより、管35、貫通孔33および組織片導入路S2を介して、または必要に応じて管35、貫通孔33および組織片導入路S2内に挿入されるチューブ等の器具を介して、培養室S1に組織片を導入(または培養室S1から組織片を回収)することが容易になっている。

管35の上端は、キャップ等により封止できるようになっている。通常、管35の上端を封止した状態で培養が行われる。培養中、必要に応じて、管35の上端を開放し、組織片を追加することもできる。

30

管35は、培養時に組織片の足場または固定材として、コラーゲンゲル、マトリゲル、アガロースゲル等を培養室S1内に供給するためにも利用できる。

管35は、組織片の導入前、組織片の導入と同時に、組織片の導入後等において、培養室S1内に、各種細胞や、成長因子などの液性因子の徐放剤を投入するためにも利用できる。

【0025】

(培養室)

培養室S1は、多孔質膜7から400 μ m以下の領域内に設けられる。すなわち、培養室S1の高さD1は、400 μ m以下である。培養室S1が設けられるのは、多孔質膜7から400 μ m以下の領域内が好ましく、300 μ m以下の領域内がより好ましく、200 μ m以下の領域内がさらに好ましい。

40

培養室S1を前記の領域内に設けることにより、培養室S1内で培養する組織片の機能を長期間維持することができる。一方、前記の領域外にある組織片の機能を長期間維持することは難しく、後述する試験例1に示すように、短期間で壊死に陥る懸念がある。

【0026】

機能維持の観点では、培養室S1の高さD1は低いほど好ましいが、高さD1が低くなると、培養室S1内に収容する組織片が薄くなる。組織片が薄くなると、組織片が機能を十分に発現しないおそれがある。

培養室S1の高さD1の下限値は、培養する組織片の最小構造単位に依存するので一概には言えないが、精巣組織片の場合は、精細管の直径が最小でも100 μ mであるため、

50

培養室 S 1 の高さ D 1 は、100 μ m 以上が好ましく、150 μ m 以上がより好ましい。

【0027】

培養室 S 1 は、溝 5 と切欠き部 3 とが平面視で重なる位置に設けられており、I I - I I 方向における培養室 S 1 の長さは切欠き部 3 の幅 W 1 であり、I V - I V 方向における培養室 S 1 の長さは溝 5 の幅 W 2 である。

幅 W 1、幅 W 2 はそれぞれ、培養室 S 1 に収容する組織片が収容可能な大きさであればよく、組織片の大きさに応じて適宜設定できる。

培養室 S 1 の体積は、培養室 S 1 に収容される組織片の体積に対し、100 ~ 200 体積% が好ましく、100 ~ 150 体積% がより好ましい。培養室の体積が前記範囲の下限值以上であると、組織片への空間的圧迫がなく物理的な条件が良好で、前記範囲の上限値以下であると、自己分泌した増殖因子の拡散を抑制することができることから化学的な条件が良好である。

【0028】

(流路)

流路 S 3 の高さ D 2、つまり溝 5 の深さは、特に限定されないが、50 ~ 1000 μ m が好ましく、100 ~ 500 μ m がより好ましい。流路 S 3 の高さ D 2 が前記範囲の下限值以上であると必要十分な栄養素の供給や代謝物の除去が良好で、前記範囲の上限値以下であると余剰な培養液の削減ができる。

流路 S 3 の幅は、溝 5 の幅、すなわち W 2 である。

【0029】

(多孔質膜)

「多孔質膜」とは、当該膜を貫通する細孔を多数有する固体の膜である。

多孔質膜 7 の孔径(細孔の孔径)は、0.4 ~ 50 μ m が好ましく、1 ~ 30 μ m がより好ましく、5 ~ 20 μ m がさらに好ましく、10 ~ 20 μ m が特に好ましい。多孔質膜 7 の孔径が前記範囲の下限值以上であると、多孔質膜 7 を介した物質交換が良好に行われる。多孔質膜 7 の孔径が前記範囲の上限値以下であると、多孔質膜 7 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。

多孔質膜 7 の孔径は、電子顕微鏡(SEM)、レーザー顕微鏡等により測定できる。

【0030】

多孔質膜 7 の空隙率は、1 ~ 15% が好ましく、5 ~ 10% がより好ましい。多孔質膜 7 の空隙率が前記範囲の下限值以上であると、多孔質膜 7 を介した物質交換が良好に行われる。多孔質膜 7 の空隙率が前記範囲の上限値以下であると、多孔質膜 7 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。

【0031】

多孔質膜 7 の厚さは、1 ~ 200 μ m が好ましく、5 ~ 30 μ m がより好ましい。多孔質膜 7 の厚さが前記範囲の上限値以下であると、物質交換が良好に行われる。多孔質膜 7 の厚さが前記範囲の下限值以上であると、多孔質膜 7 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。

【0032】

多孔質膜 7 の材質としては特に限定されず、従来、多孔質膜 7 の材料として用いられているものと同様であってよい。具体的には、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン(以下、PTFE という)等が挙げられる。

多孔質膜 7 としては、Whatman 社等から販売されている市販品を利用できる。

【0033】

(透明基板)

透明基板 11 を構成する材料は、透明材料であれば特に限定されない。

透明材料は可視光を透過する材料である。透明材料としては、例えばポリジメチルシロキサン(以下、PDMS という)等のシリコーンゴム、ポリスチレン、アクリル樹脂等の透明樹脂材料、ガラス、ゲル(コラーゲンやゼラチンなど)等が挙げられる。

10

20

30

40

50

透明基板 11 は、デバイス 100 の使用時に組織片と接触することから、組織片の機能発現および維持に影響しない材料を用いることが好ましい。

培養室 S1 内の観察のしやすさ、デバイスの強度、汚れにくさ等の観点では、透明基板 11 を構成する材料としては、ガラスが好ましい。

デバイス 100 外の大気中の酸素を培養室 S1 内に供給する観点では、透明基板 11 を構成する材料としては、酸素透過性を有する材料が好ましい。酸素透過性を有する材料については後で詳しく説明する。

透明基板 11 の厚さは特に限定されず、強度、透明性等のバランスを考慮して適宜設定できる。透明基板 11 がガラス板の場合、その厚さは 0.1 ~ 2.0 mm 程度が好ましく、高倍率かつ NA の高い対物レンズを利用する共焦点顕微鏡などを用いて詳細な組織片画像を取得するためには 0.15 ~ 0.20 mm 程度がより好ましい。

【0034】

(第一の層)

第一の層 13 を構成する材料としては、前述の形状に加工可能な材料であれば特に限定されず、例えばマイクロ流路構造の形成等に用いられている公知の材料のなかから適宜選択できる。

第一の層 13 を構成する材料は、透明材料でもよく、それ以外の材料でもよい。培養室 S1 内を観察しやすい点で、透明材料が好ましい。透明材料としては前記と同様のものが挙げられる。透明材料以外の材料としては金属、Si 等が挙げられる。

第一の層 13 を構成する材料は、透明基板 11 と同様に、組織片の機能発現および維持に影響しない材料が好ましい。また、デバイス 100 外の大気中の酸素を培養室 S1 内に供給する観点では、酸素透過性を有する材料が好ましい。

酸素透過性を有する材料としては、既知の任意の酸素透過性材料が使用可能であり、例えば、酸素透過性コンタクトレンズなどに用いられている生体適合性の酸素透過性材料等が挙げられる。生体適合性の酸素透過性材料として具体的には、シリコーンゴムが挙げられる。特に、生体適合性を有するとともに、透明性および酸素透過性を有し、さらに安価な材料であることから、PDMS が好ましい。

第一の層 13 の厚さは、培養室 S1 の高さ D1 と同じである。

【0035】

(第二の層)

第二の層 15 を構成する材料としては、第一の層 13 を構成する材料と同様のものが挙げられる。好ましい態様も同様である。

【0036】

(デバイスの製造方法)

デバイス 100 は、透明基板 11 と第一の層 13 と多孔質膜 7 と第二の層 15 とをこの順に積層してデバイス本体 1 を作製し、得られたデバイス本体 1 の貫通孔 21 にタンク 9 を取り付け、貫通孔 23 にチューブ 25 を介して吸引ポンプを接続し、必要に応じて貫通孔 33 に管 35 を取り付けることにより製造できる。

第一の層 13、第二の層 15 はそれぞれ、従来、マイクロリアクター等の流路構造を有するマイクロデバイスの製造に用いられている方法など、公知の微細加工法を利用して製造できる。該微細加工法としては、例えばリソグラフィー法、エッチング法、切削、射出成型、3Dプリンティング等が挙げられる。

【0037】

リソグラフィー法を用いた製造方法の一例を挙げると、以下の工程(1)~(5)を行うことにより第一の層 13 を作製できる。

(1) まず、基板上に、スピニングによりフォトレジストを塗布してフォトレジスト層を形成する。

(2) フォトレジスト層に対し、切欠き部 3 (培養室 S1 および組織片導入路 S2) に対応するパターンのマスクを介して露光し、現像することにより、フォトレジスト層をパターニングする。

10

20

30

40

50

(3) パターニングされたフォトリソ層(鋳型)上に、UV硬化型または熱硬化型ポリマーのプレポリマーを塗布してプレポリマー層を形成する。

(4) プレポリマー層にUVを照射または加熱して硬化させてポリマー層とする。

(5) ポリマー層を剥離する。

工程(2)では、パターニングにより、フォトリソ層の一部が除去され、基板上に、切欠き部3に対応する形状のフォトリソ層が残る。そのため、次の工程(3)で形成するプレポリマー層の厚さを、フォトリソ層の厚さと同じかそれよりも薄くした場合、工程(5)で得られるポリマー層は、切欠き部3を有しており、そのまま第一の層13として使用できる。

【0038】

前記の工程(2)にて溝5に対応するパターンのマスクを使用し、工程(3)にて形成するプレポリマー層の厚さを、フォトリソ層の厚さよりも厚くする以外は前記と同様にして工程(1)~(5)を行うと、片面に溝5が形成されたポリマー層が得られる。そのため、このようにしてポリマー層を得た後、さらに、該ポリマー層に、貫通孔21、23、33を開けることにより、第二の層15を作製できる。

【0039】

透明基板11と第一の層13と多孔質膜7と第二の層15との積層は、プラズマボンディング法、溶着、圧着、治具を利用した保定法等により行うことができる。

なお、培養室S1および組織片導入路S2に対応する凹部が片面に形成されたポリマー層を第二の層15と同様にして作製し、透明基板11および第一の層13を一体成形してもよい。

また、第二の層15は、溝5に対応する切欠き部および貫通孔33に対応する貫通孔を有する層と、貫通孔21、23、33それぞれに対応する貫通孔を有する層とを貼り合わせて作製してもよい。この場合、溝5に対応する切欠き部および貫通孔33に対応する貫通孔を有する層は、第一の層13と同様にして、溝5に対応する切欠き部を有する層を作製し、貫通孔をあけることにより作製できる。

【0040】

<第一実施形態の方法>

本発明の第一実施形態の方法は、前記のデバイス100を使用して行われる。

本発明の第一実施形態の方法は、例えば以下の工程(Ia)~(Ib)を含む。

(Ia) デバイス100のタンク9内および流路S3内に培養液を満たし、培養室S1内に組織片を導入する工程、

(Ib) 貫通孔23にチューブ25を介して接続した図示しない吸引ポンプを作動させることによりタンク9内の培養液を流路S3に流通させ、培養室S1内の組織片を培養する工程。

【0041】

工程(Ia)：

組織片は、動物、植物等の多細胞生物の器官の機能を発現し得るものであれば特に限定されない。再生医療や薬物応答・毒性試験への応用を考慮した場合には、動物の器官の機能を発現し得る組織片が好ましく、哺乳動物の器官の機能を発現し得る組織片が好ましい。哺乳動物としては、ヒト、マウス、ウシ、ブタ等が挙げられる。

器官としては、精巣、卵巣、副腎、下垂体、皮膚、乳腺、唾液腺、甲状腺、副甲状腺、胸腺、脳、神経組織、リンパ節、心臓、肺、骨、肝臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸、腎臓、前立腺、膀胱、精嚢、子宮、膣、卵管、胎盤等が挙げられる。これらの中では、配偶子産生というその機能が明確である点で、精巣、卵巣等が好ましい。

組織片は、生体から器官の一部または全部を採取して得られたものであってもよく、iPS細胞(人工多能性幹細胞)等から再構成されたものであってもよい。

組織片の体積は、器官の機能を発現し得る限り特に限定されないが、組織片の大きさが大きいほど、機能を長期間維持しやすい傾向がある。例えば精巣組織片の場合、その大きさは、少なくとも $100\mu\text{m} \times 500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0042】

組織片の培養室S1への導入は、管35、貫通孔33および組織片導入路S2から行われる。このとき、組織片とともに培養液を導入してもよい。

組織片は、管35、貫通孔33および組織片導入路S2に直接導入してもよく、管35、貫通孔33および組織片導入路S2内にチューブやシリンジ等の器具を挿入し、該器具を用いて導入してもよい。

組織片の導入後は、通常、管35の上端をキャップ等により封止し、その状態で培養が行われる。培養途中に組織片を追加することも可能である。

組織片の導入前、組織片の導入と同時、組織片の導入後等において、組織片の足場または固定材として、コラーゲンゲル、マトリゲル、アガロースゲル等を培養室S1内に供給してもよい。

10

組織片の導入前、組織片の導入と同時、組織片の導入後等において、培養室S1内に、各種細胞や、成長因子などの液性因子の徐放剤を投入してもよい。

【0043】

培養液の組成は、培養する組織片の種類等に応じて適宜設定できる。

組織片が精巣組織片である場合、培養液としては、MEM(alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium)等の標準的な培養液にKnockOut(登録商標) Serum Replacement(KSR)、もしくはアルブミン製剤であるAlbuMAX(登録商標)を添加したものが好ましい。KSRやAlbuMAXを添加した培養液を用いることで、in vitroでの完全な精子形成が可能となる。

20

【0044】

工程(Ib)：

デバイス本体1の貫通孔23に接続した吸引ポンプを作動させると、タンク9内の培養液が貫通孔21から流路S3に供給され、流路S3を流通し、貫通孔23から排出される。

培養液の流通時、培養室S1内は培養液(組織片の収容時に組織片とともに供給された培養液や多孔質膜7を通過して流入した培養液)で満たされており、拡散によって、流路S3内の培養液中の成分(栄養素、酸素等)が培養室S1内に供給され、また、培養室S1内の培養液中の成分(組織片からの老廃物等)が流路S3側に排出される。

30

そのため、流路S3に培養液を流通させることで、組織片を培養できる。また、このように組織片の培養を行うことで、組織片の機能を長期間維持できる。

培養温度、流路S3内での培養液の流速等の培養条件は、培養する組織片の種類、大きさ等に応じて適宜設定できる。

【0045】

工程(Ib)中、必要に応じて、培養室S1内の組織片の観察を行ってもよい。例えば倒立顕微鏡を用いて、デバイス本体1の透明基板11側から組織片の状態(形態、壊死の有無等)を観察できる。組織片が精巣組織片である場合、共焦点顕微鏡等によって、より詳細な精子形成の進行状態を観察できる。

【0046】

(作用効果)

以上説明した本発明の第一実施形態の方法においては、前記のように組織片の培養を行うことにより、組織片の機能を、従来よりも長期間維持できる。

例えば精巣組織片の場合、一般的な気層液層境界部培養法では、気層と培養液との境界部に組織片を置くことで栄養素と酸素の供給を図っているが、数日から2~3週間で精子形成能が失われる。その改良法である非特許文献1の方法でも1~2か月しか機能を維持できない。対して本発明の第一実施形態の方法によれば、それよりも長く、例えば4か月以上、さらには6か月以上にわたり、精子形成能を維持できる。

40

これは、多孔質膜から所定の領域内では、生体内の血流に対応するような培養液の送液効果が得られ、生体内での毛細血管と間質液との間での物質交換(栄養素や酸素の供給、

50

老廃物の排出)に類似した物質交換が行われること、培養室S1と流路S3とが多孔質膜7によって区画されているため、組織片が、培養液の流れによるせん断応力などの機械的な刺激を受けにくいこと、等が影響していると考えられる。

実際、本発明者らは、精巢組織片を流路内に配置した状態(培養液の流れにさらされる状態)で培養を行うと、機能が短時間で低下することを確認している(後述の比較例2)。

【0047】

なお、ミクロン単位の流体操作を目指したデバイスとして、マイクロメーターオーダーの流路が設けられたマイクロ流体デバイスが知られており、マイクロ流体デバイスの細胞培養への応用はこれまで試みられている。例えば前述の非特許文献2や特許文献1では、10

微細な流路と、その上に多孔質膜を介して配置された空間とを備えるデバイスを用い、前記空間内で細胞を培養することが提案されている。

しかし、このようなデバイスの組織片培養(器官培養)への応用については想定されていなかった。これは、従来、組織片培養の場合、細胞培養とは異なり、形態や機能を維持できる期間が大幅に短いことが知られていること、組織片の形態や機能の維持には生体内の様々なメカニズムが関与しており *in vitro* での再現は難しいと考えられていること、組織片培養で培養される組織片の大きさがミリ単位以上になること、等によるためであった。

したがって、組織片を、培養液の流路と多孔質膜で分けた空間に置くだけで、組織片の機能を前述のように長期間維持できるとの効果は、予想外の驚くべき効果といえる。20

【0048】

デバイス100にあっては、デバイス本体1の培養室S1の下側は透明基板11である。すなわちデバイス本体1の培養室S1の下側は透明である。そのため、組織片の培養時に、デバイス本体1の下側から培養室S1内を観察しやすい。例えば倒立顕微鏡で観察する場合に、鮮明な像が得られやすい。

第二の層15および多孔質膜7が透明である場合、デバイス本体1の上側から培養室S1内を観察することが可能であり、この場合は、培養室S1の下側が透明でなくてもよい。しかし、デバイス本体1の上側から観察する場合、間に多孔質膜7が介在すること、デバイス本体1の上面にタンク9が配置されていること等から、倒立顕微鏡から培養室S1までの距離が長く、鮮明な像が得られにくい。そのため、デバイス本体1の培養室S1の30

【0049】

デバイス100にあっては、貫通孔21にタンク9を設置し、貫通孔23に接続した吸引ポンプによってタンク9内の培養液を流路S3に流通させるように構成されているため、組織片の培養を長期間継続しやすい。

従来、マイクロ流路デバイスを用いた灌流培養では一般的に、培養液を収容したタンクから、ペリスタティックポンプ等の送液ポンプを使用して、マイクロ流路デバイス内に培養液を供給している。この場合、送液時に培養液に気泡が混入しやすい。マイクロ流路デバイスの上流側にバブルトラップを設ける等の対策はとられているが、気泡を完全には防止できない。培養液に気泡が混入すると、流れが阻害されたり、組織と気泡が直接接触した部位での培養液の供給が滞り、組織片へのダメージ等の問題が生じやすい。40

デバイス100のように流路S3の下流側に配置された吸引ポンプを使用して培養液を流通させると、前記のような問題が生じにくい。また、タンクに培養液を補充する際に気泡が混入しても容易に脱気できる。そのため、長期間の組織培養を良好に行うことができる。

【0050】

第二実施形態

<第二実施形態のデバイス>

図5~7を用いて、本発明の第二実施形態のデバイス200を説明する。なお、以下に示す実施形態において、第一実施形態に対応する構成要素には同一の符号を付してその詳50

細な説明を省略する。

図5は、デバイス200の側面図である。図6は、デバイス200を構成する第一の層53の上面図である。図7は、図6のV I I - V I I断面の一部を示す部分断面図である。図8は、デバイス200のスリット部61を溝5側から見た部分断面図である。

デバイス200は、流路S3の横に培養室S1を設け、それらの間をスリット部で区画したものである。

【0051】

デバイス200は、デバイス本体2と、培養液を収容するタンク9と、管35と、チューブ25と、図示しない吸引ポンプとを備える。

デバイス本体2は、透明基板11と、層53とが積層したものである。

10

【0052】

層53は、透明基板11側に、流路形成用の溝5と、組織片導入路および培養部の形成用の広幅の溝63とを有する。溝63の一端の一部は溝5の中間部に合流している。溝5と溝63との合流部分にスリット部61が設けられており、スリット部61によって溝5と溝63とが区画されている。

【0053】

したがって、デバイス本体2内には、透明基板11と溝5とスリット部61とで囲まれた空間と、透明基板11と溝63とスリット部61とで囲まれた空間とが形成されている。

デバイス本体2においては、透明基板11と溝5とスリット部61とで囲まれた空間が、培養液を流通させる流路S3とされている。また、透明基板11と溝63とスリット部61とで囲まれた空間のうち、スリット部61からの距離が400 μ m以内の領域が培養室S1とされ、残りの領域が、培養室S1に組織片を導入するための組織片導入路S2とされている。

20

【0054】

層53の、溝5の両端の位置にはそれぞれ、デバイス本体2の上面に開口する貫通孔21、23が設けられている。貫通孔21、23はそれぞれ、流路S3に培養液を供給する培養液導入路、流路S3から培養液を排出する培養液排出路とされている。

貫通孔21の開口には、培養液を収容するタンク9が取り付けられ、貫通孔23の開口には、チューブ25を介して、図示しない吸引ポンプが接続されている。

30

層53の、溝63のスリット部61側とは反対側の末端の位置には、デバイス本体2の上面に開口する貫通孔33が設けられている。貫通孔33の開口には、円筒状の管35が取り付けられている。

【0055】

培養室S1が設けられる領域の好ましい範囲は第一実施形態と同様である。

溝63の深さD3は、培養室S1の高さとなる。前記のとおり、培養室S1の高さの下限値は、培養する組織片の最小構造単位に依存するので一概には言えないが、精巢組織片の場合は、精細管の直径が最小でも100 μ mであるため、溝63の深さD3は、100 μ m以上が好ましく、150 μ m以上がより好ましい。

溝63の深さD3の上限は、組織片の機能の発現および維持の観点では特に限定されず、培養する組織片の大きさに応じて適宜設定できる。ただし、溝63を深くして培養室S1を大きくしようとすると、スリット部61を介して培養室S1に接する流路S3の高さ、つまり溝5の深さも深くなる。溝5が深くなると、培養液の使用量が多くなる。そのため、培養液量節約の観点では、溝63の深さD3は、1000 μ m以下が好ましく、500 μ m以下がより好ましい。

40

溝63の、溝5との合流部分の幅W3は、培養室S1に収容する組織片が収容可能な大きさであればよく、組織片の大きさに応じて適宜設定できる。

【0056】

溝5の幅W4の好ましい範囲は、第一実施形態の溝5の深さ(流路S3の深さD2)の好ましい範囲と同様である。

50

溝 5 の深さは、溝 6 3 の深さ D 3 と同じである。

なお、溝 6 3 の深さ D 3 と溝 5 の深さとが異なってもよい。例えば後述の製造例 1 の手順を応用すれば、溝 6 3 と溝 5 をそれぞれ異なる深さで形成することができる。この場合、物質交換の観点から、溝 6 3 の深さ D 3 が、溝 5 の深さよりも浅いことが好ましい。溝 6 3 の深さ D 3 が溝 5 の深さよりも浅い場合、培養液量節約の観点から、溝 6 3 の深さ D 3 と、溝 5 の深さとの差が少ないほど好ましい。

層 5 3 を構成する材料としては、第一の層 1 3 を構成する材料と同様のものが挙げられる。好ましい態様も同様である。

【 0 0 5 7 】

(スリット部)

図 8 に、デバイス 2 0 0 のスリット部 6 1 を溝 5 側から見た部分断面図を示す。

図 8 に示すように、層 5 3 の溝 5 が溝 6 3 に合流する位置では、層 5 3 の透明基板 1 1 側に、溝 5 と溝 6 3 とを連通させる複数の溝 6 7 が等間隔で形成されている。これら複数の溝 6 7 に挟まれた部分が、相互に間隔をあけて配置された複数の壁材 6 1 a となっている。

【 0 0 5 8 】

溝 6 7 の深さ D 4 は、溝 6 3 の深さ D 3 と同じである。

また、溝 6 7 の深さ D 4 は、壁材 6 1 a の幅 W 6 より大きくされている。そのため、溝 6 7 は、培養液の流通方向（溝 5 の延在方向）と直交する状態で交差するスリットとなっている。

【 0 0 5 9 】

溝 6 7 の幅（隣り合う壁材 6 1 a の間の間隔）W 7 は、 $0.4 \sim 50 \mu\text{m}$ が好ましく、 $1 \sim 30 \mu\text{m}$ がより好ましく、 $5 \sim 25 \mu\text{m}$ がさらに好ましく、 $10 \sim 20 \mu\text{m}$ が特に好ましい。幅 W 7 が前記範囲の下限値以上であると、スリット部 6 1 を介した物質交換が良好に行われる。幅 W 7 が前記範囲の上限値以下であると、スリット部 6 1 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。

【 0 0 6 0 】

壁材 6 1 a の幅（隣り合う溝 6 7 の間の間隔）W 6 は、 $5 \sim 400 \mu\text{m}$ が好ましく、 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ がより好ましく、 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ が特に好ましい。幅 W 6、つまりスリット間の距離が前記範囲の下限値以上であると、スリット部 6 1 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。幅 W 6 が前記範囲の上限値以下であると、スリット部 6 1 を介した物質交換が良好に行われる。

幅 W 6 と幅 W 7 との比（W 6 : W 7）は、良好な物質交換と組織片へのダメージの抑制の観点から、 $100 : 1 \sim 1 : 1$ の範囲内であることが好ましく、 $20 : 1 \sim 2 : 1$ の範囲内がより好ましい。

【 0 0 6 1 】

スリット部 6 1 の厚さ（溝 5 の延在方向に対して直交する方向における壁材 6 1 a および溝 6 7 の幅）W 5 は、 $1 \sim 200 \mu\text{m}$ が好ましく、 $3 \sim 50 \mu\text{m}$ がより好ましく、 $5 \sim 30 \mu\text{m}$ が特に好ましい。スリット部 6 1 の厚さ W 5 が前記範囲の上限値以下であると、物質交換が良好に行われる。スリット部 6 1 の厚さ W 5 が前記範囲の下限値以上であると、スリット部 6 1 を通過した培養液の流れによる組織片のダメージが生じにくく、組織片の機能を維持しやすい。

【 0 0 6 2 】

(デバイスの製造方法)

デバイス 2 0 0 は、透明基板 1 1 と層 5 3 とを積層してデバイス本体 2 を作製し、得られたデバイス本体 1 の貫通孔 2 1 にタンク 9 を取り付け、貫通孔 2 3 にチューブ 2 5 を介して吸引ポンプを接続し、必要に応じて貫通孔 3 3 に管 3 5 を取り付けることにより製造できる。

層 5 3 は、従来、マイクロリアクター等の流路構造を有するマイクロデバイスの製造に用いられている方法など、公知の微細加工法を利用して製造できる。該微細加工法として

10

20

30

40

50

は、例えばリソグラフィー法、エッチング法、切削、射出成型、3Dプリンティング等が挙げられる。例えば、前記の工程(2)にて溝5、溝63および溝67に対応するパターンのマスクを使用する以外は第二の層15の作製と同様の操作で層53を作製できる。

なお、上記に列記した方法を用いれば、必要に応じて、溝5、溝63および溝67をそれぞれ独立して所望の深さで形成することができる。

透明基板11と層53との積層は、プラズマボンディング法、溶着、圧着、治具を利用した保定法等により行うことができる。

【0063】

<第二実施形態の方法>

本発明の第二実施形態の方法は、前記のデバイス200を使用して行われる。

本発明の第二実施形態の方法は、例えば以下の工程(IIa)~(IIb)を含む。

(IIa)デバイス200のタンク9内および流路S3内に培養液を満たし、培養室S1内に組織片を導入する工程、

(IIb)貫通孔23にチューブ25を介して接続した図示しない吸引ポンプを作動させることによりタンク9内の培養液を流路S3に流通させ、培養室S1内の組織片を培養する工程。

【0064】

工程(IIa)、工程(IIb)はそれぞれ、デバイス100の代わりにデバイス200を用いる以外は、工程(Ia)、(Ib)と同様にして行うことができる。

【0065】

以上、本発明の方法およびデバイスについて、第一実施形態~第二実施形態を示して説明したが、本発明は上記実施形態に限定されない。上記実施形態における各構成およびそれらの組み合わせ等は一例であり、本発明の趣旨を逸脱しない範囲内で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。

【0066】

例えば、第一実施形態では、培養室S1を4つ設けているが、デバイス本体1内の培養室は1~3つでもよく5つ以上でもよい。第二実施形態においても同様である。

多孔質膜7として四角形状のものを示したが、多孔質膜7は少なくとも切欠き部3と溝5とが重なる部分の全体を覆うものであれば、その形状や大きさは特に限定されない。

透明基板11および第一の層13を別々に作製する例を示したが、透明基板11および第一の層13を一体成形してもよい。

培養室S1の上側に多孔質膜7および流路S3が配置された例を示したが、培養室S1の下側に多孔質膜および流路が配置されてもよい。また、培養室S1の上側および下側の両方にそれぞれ多孔質膜および流路が配置されてもよい。

【0067】

図9に、デバイス100の変形例を示す。この例のデバイス110は、培養室S1の上側および下側の両方にそれぞれ多孔質膜および流路が配置されたものである。図9は、培養室S1の位置におけるデバイス110のIV-IV断面の一部を示す部分断面図である。

デバイス110は、第三の層17と多孔質膜7Aと第一の層13と多孔質膜7と第二の層15とがこの順に積層したものである。

第三の層17は、第一の層13側の表面に、流路形成用の溝5Aを有する。

多孔質膜7Aは、多孔質膜7と同様である。

【0068】

デバイス本体1Aにおいては、多孔質膜7Aと第一の層13の切欠き部3と多孔質膜7とで囲まれた空間が、培養室S1および組織片導入路S2とされている。また、多孔質膜7または第一の層13と溝5とで囲まれた空間が流路S3とされているほか、多孔質膜7Aまたは第一の層13と溝5Aとで囲まれた空間が流路S4とされている。

【0069】

デバイス110において、第一の層13の厚さ、すなわち培養室S1の高さD5は、培

10

20

30

40

50

養室 S 1 の上側および下側の両方にそれぞれ多孔質膜および流路が配置されていることから、800 μm 以下である。すなわち、培養室 S 1 は、多孔質膜から 400 μm 以下の領域内に設けられていればよいため、培養室 S 1 の上側および下側の両方に多孔質膜が配置されているこの例においては、培養室 S 1 の高さを 800 μm (400 μm × 2) までとることができる。

【0070】

第二実施形態において、培養室の左右に、隔離材を介して流路を配置してもよい。この場合、左右の隔離材の間の距離を 800 μm 以下とすると、左右の隔離材の間を全て培養室として利用できる。

流路の左右に、隔離材を介して培養室を配置してもよい。

10

培養室の上側および下側のいずれか一方または両方に、隔離材を介して流路を配置してもよい。

【0071】

複数の隔離材を備える場合、複数の隔離材はそれぞれ同じでもよく異なってもよい。

例えば複数の隔離材の一部を多孔質膜とし、残りをスリット部としてもよい。

また、デバイス 110 のように、多孔質膜を介して培養室に接する流路を複数備える場合、各流路と培養室とを区画する多孔質膜はそれぞれ同じでも異なってもよい。例えば孔径等が異なってもよい。

また、スリット部を介して培養室に接する流路を複数備える場合、各流路と培養室とを区画するスリット部はそれぞれ同じでも異なってもよい。例えば壁材の幅や間隔が異なっ

20

ていてもよい。

隔離材を介して培養室に接する流路を複数備える場合、各流路に流通させる培養液の組成や流速は同じでも異なってもよい。

【実施例】

【0072】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。ただし本発明は該実施例に限定されるものではない。

【0073】

< 製造例 1 >

図 1 ~ 4 に示す構成のデバイス 100 を以下の手順で製造した。

30

まず、シリコン基板を用意し、該シリコン基板上に、スピニングによりフォトレジスト (商品名「SU-8 2100」; マイクロケム社製) を塗布し、バークしてフォトレジスト層を形成した。次いで、切欠き部 3 (培養室 S 1 および組織片導入路 S 2) のパターンのマスクを介して露光、現像を行い、フォトレジスト層にマスクのパターンを転写した。該フォトレジスト層 (鋳型) 上に、未硬化の PDMS を塗布してポリマー層を形成し、UV 照射により硬化させた。硬化後、ポリマー層を剥離して、切欠き部 3 を有する第一の層 13 (外径: 長径 × 短径 × 厚さ = 76 mm × 32 mm × 160 μm、培養室 S 1: 幅 W1 × 幅 W2 × 高さ = 2 mm × 4 mm × 160 μm、組織片導入路 S 2: 幅 × 長さ × 高さ = 4 mm × 8 mm × 160 μm) を得た。

【0074】

40

マスクを溝 5 (流路 S 3) のパターンのものに変更した以外は前記と同じ操作を行い、片面に溝 5 を形成したポリマー層を得た。該ポリマー層に貫通孔 21、23、33 を開けて第二の層 15 (外径: 長径 76 mm × 短径 32 mm × 厚さ 2 mm、流路 S 3 (溝 5): 幅 × 長さ × 深さ = 2 mm × 20 mm × 300 μm) を得た。

【0075】

孔径 10 μm、空隙率 7.6%、厚さ 10 μm の多孔質膜 (whatman 社製「track etch membrane」、材質: ポリカーボネート) にアミノシランでコーティングした。これを多孔質膜 7 とした。

透明基板 11 として、ガラス板 (厚さ 1.2 mm スライドガラス) を用意した。

第一の層 13、第二の層 15、多孔質膜 7 および透明基板 11 それぞれの表面を O₂ プ

50

ラズマ処理した。その後、透明基板 1 1 と第一の層 1 3 と多孔質膜 7 と第二の層 1 5 とをこの順に配置し、プラズマボンディング法による共有結合で接着してデバイス本体 1 を得た。

得られたデバイス本体 1 の貫通孔 2 1 にタンクを取り付け、貫通孔 2 3 にチューブ 2 5 を介して吸引ポンプを接続し、貫通孔 3 3 に管 3 5 を取り付けてデバイス 1 0 0 を作製した。

【 0 0 7 6 】

< 試験例 1 >

本試験は、多孔質膜からの距離が組織片に与える影響を評価する目的で実施した。

【 0 0 7 7 】

(試験方法)

デバイス :

図 5 ~ 8 に示す構成のデバイス 2 0 0 を以下の手順で製造した。

まず、製造例 1 における第二の層 1 5 の作製条件のうち、マスクを変更した以外は同じ操作を行い、片面に溝 5、溝 6 3 および溝 6 7 を形成したポリマー層を得た。該ポリマー層の所定の位置に 3 つの貫通孔 2 1、2 3、3 3 を設けて層 5 3 を得た。

この例では、溝 5 の幅 W_4 × 深さは $500 \mu\text{m} \times 140 \mu\text{m}$ とし、溝 6 3 の幅 × 深さ D_3 は $3 \sim 7 \text{mm} \times 140 \mu\text{m}$ とし、溝 6 7 の深さ D_4 × 幅 W_7 × 厚さ W_5 は $140 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ とし、溝 6 間の間隔 (壁材 6 1 a の幅) W_6 は $50 \mu\text{m}$ とした。溝 5 と溝 6 3 との合流部分の幅 W_3 は 5mm とした。

次に、透明基板 1 1 として、ガラス板 (厚さ 1.2mm スライドガラス) を用意した。

層 5 3 および透明基板 1 1 それぞれの表面を O_2 プラズマ処理した。その後、透明基板 1 1 と層 5 3 とをこの順に配置し、プラズマボンディング法による共有結合で接着してデバイス本体 2 を得た。

得られたデバイス本体 2 の貫通孔 2 1 にタンクを取り付け、貫通孔 2 3 にチューブを介して吸引ポンプを接続し、貫通孔 3 3 に管 3 5 を取り付けてデバイス 2 0 0 を作製した。

【 0 0 7 8 】

組織片の調製 : 生後 3 . 5 日齢マウスの生体から精巣および精巣上体を一塊のまま摘出した。白膜をはがして精巣上体はずし、精巣のみとした。精巣を $1 \text{mm} \times 1 \text{mm}$ 程度の大きさに分割して精巣組織片を得た。

【 0 0 7 9 】

培養方法 : 作製したデバイス 2 0 0 のタンク 9 に培養液を入れ、流路 S_3 (透明基板 1 1 と溝 5 とで囲まれた空間) を培養液で満たした。また、得られた組織片を、管 3 5 から、透明基板 1 と溝 6 3 とで囲まれた空間内に導入し、スリット部 6 1 に接するまで押し込んだ。

次に、デバイス 2 0 0 のデバイス本体 2 をタンク 9 ごと 3 4 のインキュベーター内に入れた。吸引ポンプはインキュベーターの外部に配置した。続いて吸引ポンプを作動させ、流路 S_3 に培養液を緩徐に流通させながら組織片の培養を行った。

培養液としては MEM + 4 % AlbuMAX を使用した。

流路 S_3 内での培養液の流速は $0.05 \mu\text{L} / \text{分}$ とした。

培養期間中、数日ごとにデバイスをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡によりデバイス本体 2 の下側からデバイス本体 2 内の組織片を観察した。

【 0 0 8 0 】

(試験結果および考察)

培養開始から 2 8 日間経過した時点それぞれにおけるデバイス本体 2 内の組織片の顕微鏡像を図 1 0 に示す。図 1 0 中の矢印は、培養液用の流路に流通させた培養液の流れを示し、双方向矢印は、スリットから $400 \mu\text{m}$ の距離を示す。

図 1 0 に示すとおり、組織片のうち、スリットの位置から $400 \mu\text{m}$ 以内にある部分は、精巣組織の構造が維持されていたが、スリットからの距離が $400 \mu\text{m}$ を超えている部分は壊死に陥っていた。

10

20

30

40

50

【0081】

<実施例1>

新生仔期(0.5日齢)のAcr-GFPトランスジェニックマウスの生体から精巢および精巢上体を一塊のまま摘出した。白膜をはがして精巢上体はせずし、精巢のみとした。この日齢のマウスの精巢は十分に小さいため分割せずにそのまま培養に供した。

Acr-GFPトランスジェニックマウスは、精子形成の途中の生殖細胞においてGFP遺伝子が発現し、そのGFPタンパク質が精子の先体部分に集簇して発色するマウスであり、筑波理研・バイオリソースセンターより入手した。

組織片(精巢)の培養は、製造例1で製造したデバイス100を用いて、以下の手順で行った。

10

【0082】

製造例1で作製したデバイス100のタンク9に培養液を入れ、流路S3を培養液で満たした。また、得られた組織片を、管35から組織片導入路S2に導入し、培養室S1に送り込んだ。

次に、デバイス100のデバイス本体1をタンク9ごと34のインキュベーター内に入れた。吸引ポンプはインキュベーターの外部に配置した。続いて吸引ポンプを作動させ、流路S3に培養液を緩徐に流通させながら組織片の培養を行った。

培養液としてはMEM+4%AlbuMAXを使用した。

流路S3内での培養液の流速は0.05μL/分とした。

【0083】

20

培養期間中、数日ごとにデバイスをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡によりデバイス本体1の下側から培養室S1内の組織片を観察した。また、精子形成の進行具合の指標であるGFP Gradeを、蛍光顕微鏡により測定した。

【0084】

<比較例1>

新生仔期(0.5日週齢)のAcr-GFPトランスジェニックマウスの生体から精巢および精巢上体を一塊のまま摘出した。白膜をはがして精巢上体はせずし、精巢のみとした。精巢が小さいため分割せずにそのまま培養液に半分程度浸漬したアガロースゲルの台の上にのせて培養した。培養液としては、実施例1で用いたのと同じものを使用した。

培養期間中、数日ごとにデバイスをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡により組織片(精巢)を観察した。また、精子形成の進行具合の指標であるGFP Gradeを前記と同様にして測定した。

30

【0085】

GFP Gradeは、培養している精巢組織内において精子形成を生じている部分の全体における比率(蛍光顕微鏡像において蛍光が観察される部分(=精子形成が生じている部分)の面積が占める割合(%))を以下の基準で6段階に分けて半定量化した指標である。

G1:精子形成が生じている部分の比率が10%以下。

G2:精子形成が生じている部分の比率が10%超30%以下。

G3:精子形成が生じている部分の比率が30%超50%以下。

G4:精子形成が生じている部分の比率が50%超70%以下。

G5:精子形成が生じている部分の比率が70%超90%以下。

G6:精子形成が生じている部分の比率が90%超。

40

ただし、比較例1のように組織片をアガロースゲルに乗せて培養する際には、組織の中央部には酸素・栄養素の供給および老廃物の排除が不十分なために精子形成は期待できない。そのため比較例1では、組織片の辺縁から400μm以内の部分に限定して評価を行った。

図11に、比較例1にてアガロースゲル上で培養した精巢組織片のGFP GradeのG1~G6それぞれの段階の蛍光顕微鏡像を示す。

【0086】

50

実施例 1 および比較例 1 における G F P Grade の測定結果から、横軸に培養日数 (日)、縦軸に G F P Grade の値をとったグラフを作成した。該グラフを図 1 2 に示す。図 1 2 中の点線は実施例 1 の結果、実線は比較例 1 の結果を示す。

図 1 2 に示すとおり、比較例 1 では、培養期間が 2 か月を超えた頃から G F P Grade の値が低下し、86 日経過時点でほぼゼロになった。

対して実施例 1 では、培養期間が 1 か月を超えた頃から G F P Grade の値が比較例 1 を上回り、6 か月経過時点でも G F P Grade が高い値を示しており、精巣臓器の機能を発現・維持する能力が極めて高いことが確認できた。

【0087】

< 比較例 2 >

まず、製造例 1 における第二の層 1 5 の作製条件のうち、マスクを変更した以外は同じ操作を行い、片面に溝を有し、3 つの貫通孔を有するポリマー層を得た。

図 1 3 に、該ポリマー層の溝の周辺の部分上面図を示す。該ポリマー層においては、直線状の溝 7 1 (幅 × 高さ (深さ) = 1 mm × 500 μm) の中間部の 2 ヶ所にそれぞれスリット部 7 5 が形成されている。スリット部 7 5 は、高さが 150 μm、培養液の流通方向に対して直交する方向における幅が 200 μm、培養液の流通方向における幅が 1000 μm の壁材が、200 μm の間隔をあけて配列した構造とした。2 ヶ所のスリット部 7 5 の間に円形の貫通孔 7 3 (直径 2 mm × 2 mm) が設けられている。また、溝 7 1 の上流側末端および下流側末端のそれぞれに図示しない貫通孔が設けられている。

【0088】

次に、ガラス板 (厚さ 1.2 mm スライドガラス) を用意した。ポリマー層およびガラス板それぞれの表面を O₂ プラズマ処理した。その後、ポリマー層の、溝が設けられている側の面にガラス板を重ね、プラズマボンディング法により接着してデバイス本体を得た。

得られたデバイス本体の、溝 7 1 の上流側末端の貫通孔にタンクを取り付け、下流側末端の貫通孔にチューブを介して吸引ポンプを接続してデバイスを作製した。

該デバイスにおいては、ガラス板と溝 7 1 または貫通孔 7 3 とで囲まれた空間が流路とされ、流路の一部 (ガラス板と貫通孔 7 3 とで囲まれた部分) が培養部を兼ねている。

【0089】

得られたデバイスを用い、実施例 1 と同様にして得た組織片 (精巣) を培養した。培養は、以下の手順で行った。

作製したデバイスのタンクに培養液を入れ、流路を培養液で満たした。また、貫通孔 7 3 から組織片を流路内に導入し、貫通孔 7 3 の開口を、ガラス板で塞いだ。

次に、デバイスのデバイス本体をタンクごと 34 のインキュベーター内に入れた。吸引ポンプはインキュベーターの外部に配置した。続いて吸引ポンプを作動させ、流路に培養液を緩徐に流通させながら組織片の培養を行った。

培養液としては MEM + 4% AlbuMAX を使用した。

流路のうち、ガラス板と溝 7 1 とで囲まれた部分での培養液の流速は 0.05 μL / 分とした。

【0090】

培養期間中、数日ごとにデバイスをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡によりデバイス本体の下側から流路内の組織片を観察した。また、精子形成の進行具合の指標である G F P Grade を、蛍光顕微鏡により測定した。

その結果、G F P の発現は限局して弱く (G F P Grade 1 ~ 2)、培養期間が 50 日間を超えた頃には G F P Grade がほぼゼロになった。

【産業上の利用可能性】

【0091】

上記のように組織片の機能を長期間維持できることから、本発明の方法は、様々な用途に応用できる。応用例として、例えば以下の例が挙げられる。

・ 精巣生検から得た精巣組織片を用いた、精子形成不全の患者の病態診断や治療 (精子

10

20

30

40

50

産生)。

- ・ 卵巣生検から得た卵巣組織片を用いた、体外での成熟卵の産生。
- ・ 組織片を用いた、新薬開発の際の毒性試験。
- ・ がん細胞を含む組織片を用いた、抗がん剤の効果判定。

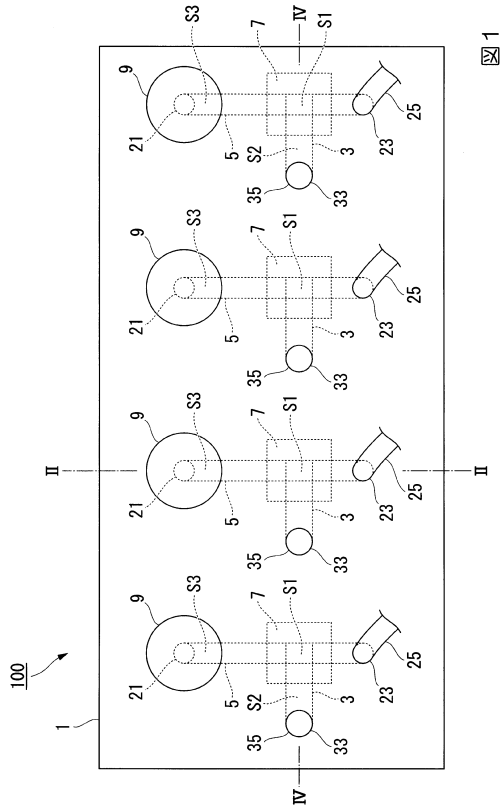
また、本発明のデバイスは、精巣組織片等の様々な組織片の培養に利用でき、実験器具として汎用性がある。

【符号の説明】

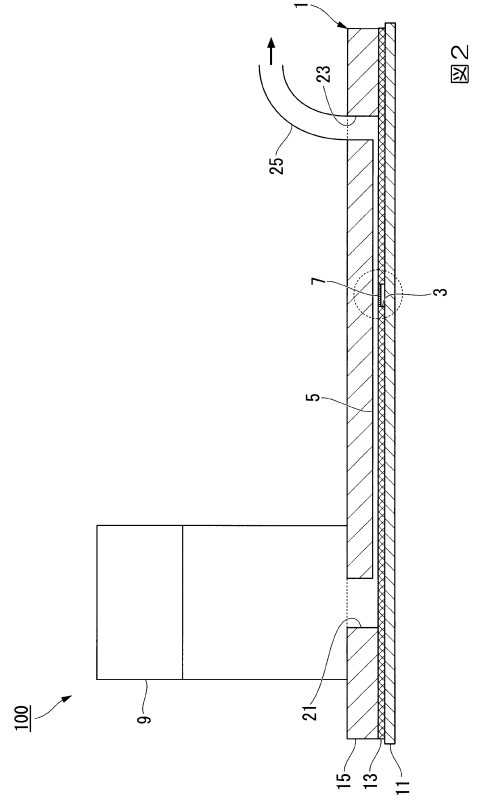
【 0 0 9 2 】

1	デバイス本体	
2	デバイス本体	10
3	切欠き部	
5	溝	
7	多孔質膜	
9	タンク	
1 1	透明基板	
1 3	第一の層	
1 5	第二の層	
1 7	第三の層	
2 1	貫通孔	
2 3	貫通孔	20
2 5	チューブ	
3 1	組織片	
3 3	貫通孔	
3 5	管	
5 3	層	
6 1	スリット部	
6 1 a	壁材	
6 3	溝	
6 7	溝	
1 0 0	デバイス	30
1 1 0	デバイス	
2 0 0	デバイス	
S 1	培養室	
S 2	組織片導入路	
S 3	流路	

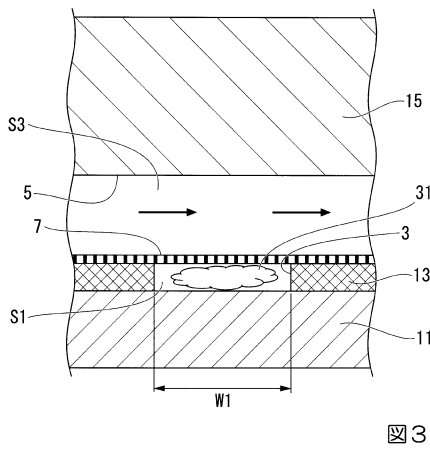
【図1】



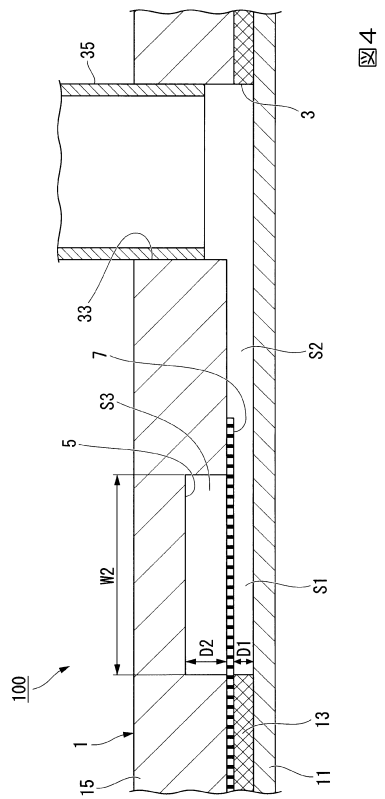
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

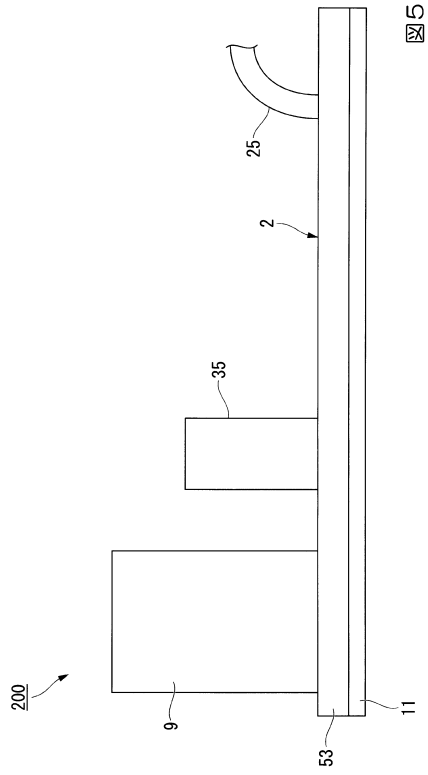


図5

【図6】

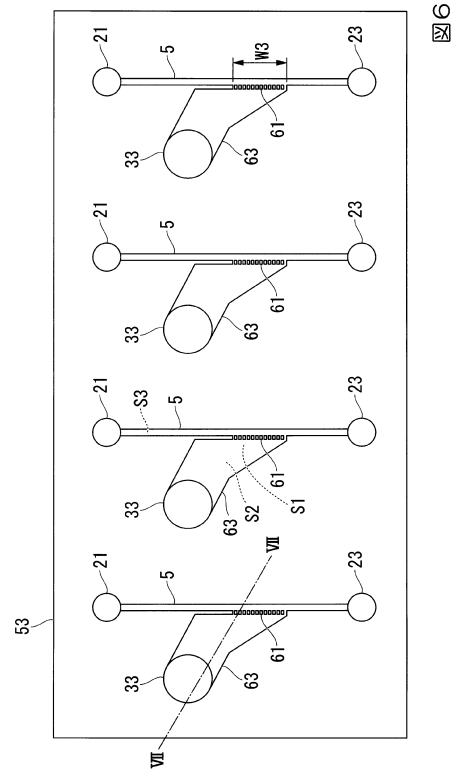


図6

【図7】

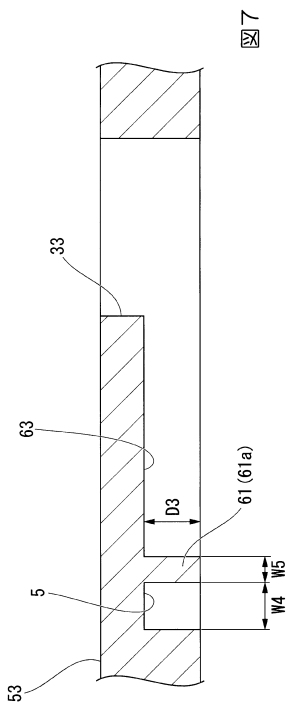


図7

【図8】

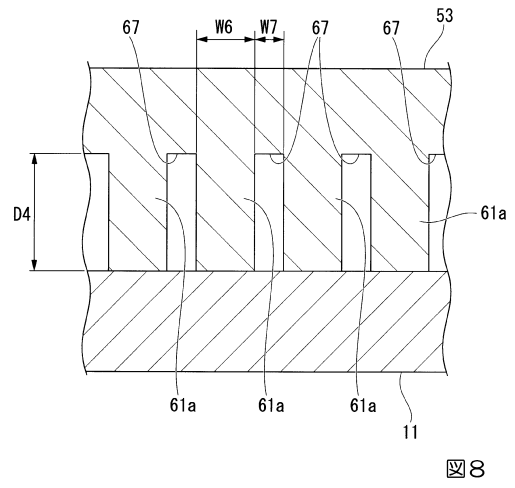
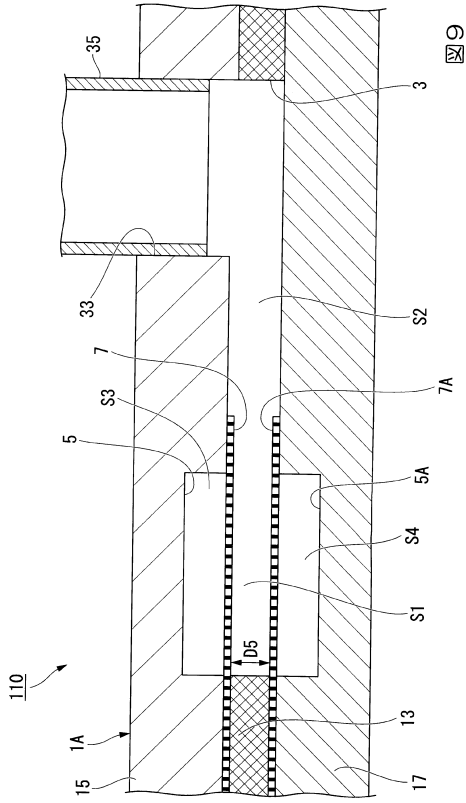
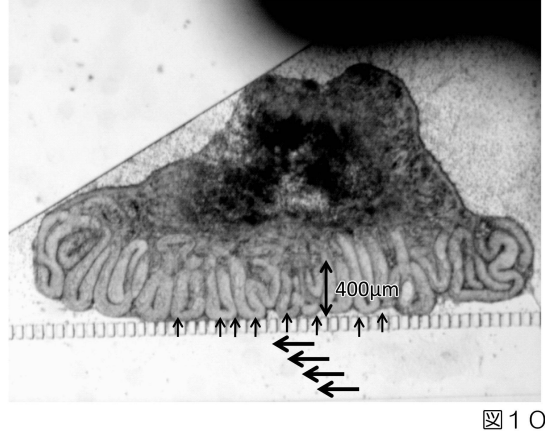


図8

【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

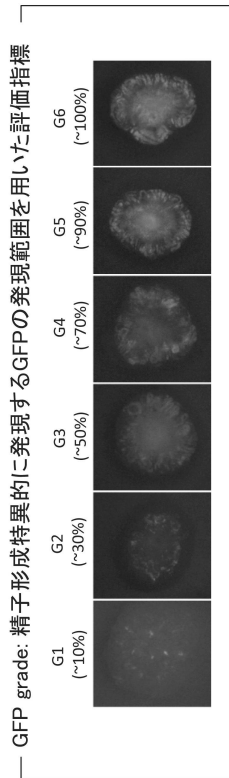


図 11

【 図 12 】

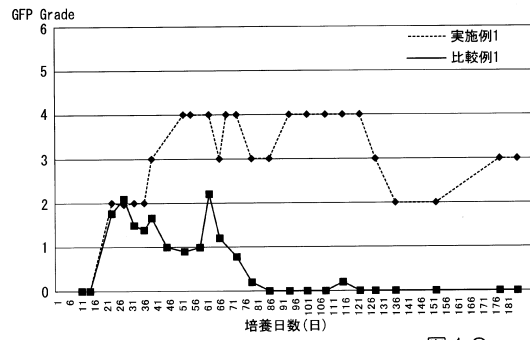


図 12

【 図 13 】

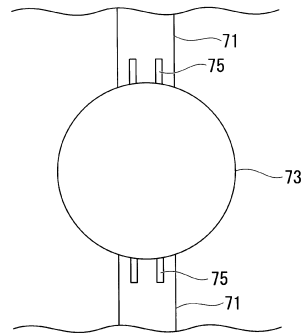


図 13

フロントページの続き

- (74)代理人 100094400
弁理士 鈴木 三義
- (74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
- (72)発明者 藤井 輝夫
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 木村 啓志
神奈川県平塚市北金目四丁目1番1号 東海大学内
- (72)発明者 小川 毅彦
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 横浜市立大学医学部内
- (72)発明者 古目谷 暢
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 横浜市立大学医学部内

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特表2010-536348(JP,A)
国際公開第2014/048637(WO,A1)
特開2010-207143(JP,A)
国際公開第2013/131088(WO,A1)
特開2006-246720(JP,A)
国際公開第2008/028241(WO,A1)
米国特許出願公開第2006/0199260(US,A1)
Kawada, J., et al., Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation, Lab on a Chip, 2012年, 12, 4508-4515

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

C12N 1/00

C12M

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)