

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第6090891号
(P6090891)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	1/00	(2006.01)	C 1 2 N	1/00	N
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/42	(2006.01)	C 1 2 M	1/42	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	

請求項の数 9 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-522839 (P2016-522839)	(73) 特許権者	598072179
(86) (22) 出願日	平成28年3月25日 (2016. 3. 25)		株式会社片岡製作所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/059769		京都府京都市南区久世築山町140番地
審査請求日	平成28年6月21日 (2016. 6. 21)	(73) 特許権者	301021533
(31) 優先権主張番号	特願2015-111759 (P2015-111759)		国立研究開発法人産業技術総合研究所
(32) 優先日	平成27年6月1日 (2015. 6. 1)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100085338
早期審査対象出願			弁理士 赤澤 一博
		(72) 発明者	鈴木 正美
			京都府京都市南区久世築山町204-1
			株式会社片岡製作所内
		(72) 発明者	西 則男
			京都府京都市南区久世築山町204-1
			株式会社片岡製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞処理方法、レーザー加工機、細胞培養容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

容器本体にレーザー光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材料を含む層である被照射層が設けられた細胞培養容器の被照射層の表面上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させる方法であって、
前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所にレーザー光を照射する細胞処理方法。

【請求項2】

前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死せずある程度の時間が経過した後には致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザー光を照射する請求項1記載の細胞処理方法。

【請求項3】

前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザー光を複数回照射する請求項1記載の細胞処理方法。

【請求項4】

前記細胞培養容器で培養した細胞群を複数の部分に分割するための方法であり、
前記被照射層における、培養した細胞をある部分と他の部分とに切り分ける境界線の直下の箇所にレーザー光を照射する請求項1、2または3記載の細胞処理方法。

【請求項5】

容器本体にレーザー光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材

10

20

料を含む層である被照射層が設けられた細胞培養容器の被照射層の表面上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させるレーザ加工機であって、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所にレーザ光を照射するレーザ加工機。

【請求項 6】

前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死せずある程度の時間が経過した後に致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザ光を照射する請求項 5 記載の細胞処理方法。

【請求項 7】

前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザ光を複数回照射する請求項 5 記載の細胞処理方法。

10

【請求項 8】

前記細胞培養容器で培養した細胞群を複数の部分に分割するためのものであり、前記被照射層における、培養した細胞をある部分と他の部分とに切り分ける境界線の直下の箇所にレーザ光を照射する請求項 5、6 または 7 記載のレーザ加工機。

【請求項 9】

請求項 1、2、3 または 4 記載の細胞処理方法の実施のために、あるいは請求項 5、6、7 または 8 記載のレーザ加工機とともに用いられるものであって、

容器本体にレーザ光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材料を含む層である被照射層が設けられ、その被照射層の表面上で細胞が培養される細胞培養容器。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養容器上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させる方法、並びにその方法の実施に使用されるレーザ加工機及び細胞培養容器に関する。

【背景技術】

【0002】

近時、体性幹細胞や胚性幹細胞、人工多様性幹細胞人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells) を用いた再生医療技術及び創薬の研究開発が勃興している。この種の研究開発においては、必要となる目的細胞や組織を効率よく量産できることが極めて重要となる。

30

【0003】

細胞培養の過程では、培地で増殖した細胞集合体 (コロニー) の一部をクランプとして切り出し、そのクランプを新しい培地に移して再び培養する継代培養を行うことが通例である。現状、増殖した細胞を複数のクランプに分割する作業は専ら人の手によってなされているが、これには手間を要する上、クランプの大きさが不揃いとなって継代後の細胞の生育状態にばらつきを生ずる原因ともなる。

【0004】

また、患者の傷ついた組織や臓器を補う再生医療の目的で患者に移植する細胞または組織中に、分化に失敗した不要細胞が残存していると、腫瘍化その他の患者の健康に悪影響を及ぼすリスクを招く。不要細胞が混入している培養容器を丸ごと廃棄することは、目的細胞または組織の収率 (歩留まり) の低下につながり、再生医療のコストを高騰させる。目的細胞または組織の収率を改善するためには、培養容器内に存在する不要細胞を死滅させまたは除去して、残りの細胞を無駄にせず利用することが望ましい。

40

【0005】

下記特許文献 1 には、培養容器内の不要細胞を選択的に死滅させる方法が開示されている。即ち、可視光や紫外線、赤外線、放射線といった活性エネルギー線の照射を受けて酸性物質を生じる光酸発生剤を予め培養容器の表面に塗布しておき、この培養容器上で培養した細胞のうち死滅させるべき細胞の存在する箇所に活性エネルギー線を 10 秒ないし 10 分

50

間程度照射することにより、酸性物質を発生させて対象の細胞を死に至らしめる。活性エネルギー線を照射する領域の制御には、DMD (digital micromirror device)、液晶シャッタアレイ、光空間変調素子、フォトマスク等を使用する。

【0006】

下記特許文献1に開示された方法は、対象の細胞を死滅させるために活性エネルギー線を照射する時間が長く、来たるべき再生医療用細胞の大量生産の実現に向けてなお改善の余地があるといえる。加えて、DMD等を使用するマイクロプロジェクションシステムでは、活性エネルギー源(光源)から供給されるエネルギーの大部分を無為に捨ててしまう。しかも、光酸発生剤に照射する活性エネルギー線の強度分布を均一に保つことも難しい。

【0007】

不要細胞の死滅処理の高速化を企図して、高エネルギーのパルスレーザのような活性エネルギー線を直接不要細胞に照射することも考えられる。しかしながら、照射する活性エネルギー線を細胞核に命中させなくてはならず、対象の細胞に対して複数回の照射を実行しないと当該細胞の確実な死滅が見込めない。さらには、活性エネルギー線の直射を受ける不要細胞の周辺にある目的細胞への熱影響が避けがたいという本質的な問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2011/125615号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、高速かつ短時間のレーザ照射処理を通じて、培養容器上で培養された細胞のうち特定の細胞を致死させることを所期の目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明に係る細胞処理方法は、容器本体にレーザ光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材料を含む層である被照射層が設けられた細胞培養容器の被照射層の表面上で培養された細胞のうち特定の細胞を致死させる方法であって、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所にレーザ光を照射するものである。

【0011】

致死させる細胞以外の細胞への熱影響を最小限に抑制するためには、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死せずある程度の時間が経過した後致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザ光を照射することが好ましい。

【0012】

または、致死させる細胞以外の細胞への熱影響を最小限に抑制するために、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザ光を複数回照射することも好ましい。さすれば、レーザ光の照射から対象の細胞の死滅までに要する時間を短縮することができる。

【0013】

本発明に係る細胞処理方法は、前記細胞培養容器で培養した細胞群(複数個の細胞からなる)を複数の部分に分割する目的で用いることができる。その場合、前記被照射層における、培養した細胞をある部分と他の部分とに切り分ける境界線の直下の箇所にレーザ光を照射する。

【0014】

本発明に係るレーザ加工機は、容器本体にレーザ光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材料を含む層である被照射層が設けられた細胞培養容器の被照射層の表面上で培養された細胞のうち特定の細胞を致死させるものであり、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所にレーザ光を照射する。

【0015】

10

20

30

40

50

特に、前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死せずある程度の時間が経過した後に致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザー光を照射するレーザー加工機を構成することが好ましい。

【0016】

前記被照射層における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザー光を複数回照射するレーザー加工機を構成することも好ましい。

【0017】

本発明に係るレーザー加工機は、前記細胞培養容器で培養した細胞群を複数の部分に分割する目的で用いることができる。その場合、前記被照射層における、培養した細胞をある部分と他の部分とに切り分ける境界線の直下の箇所にレーザー光を照射するものとする。

10

【0018】

本発明に係る細胞培養容器は、容器本体にレーザー光の照射を受けてこれを吸収し細胞を死に至らしめる熱を生じさせる材料を含む層である被照射層が設けられているものであり、その被照射層の表面上で細胞が培養される。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、高速かつ短時間のレーザー照射処理を通じて、培養容器上で培養された細胞のうち特定の細胞を致死させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

20

【0020】

【図1】本発明の一実施形態におけるレーザー加工機の概要を示す斜視図。

【図2】同レーザー加工機のハードウェア資源構成を示す図。

【図3】同レーザー加工機の機能ブロック構成図。

【図4】同実施形態の細胞処理方法を説明する側断面図。

【図5】細胞培養容器の容器本体及び被照射部のそれぞれの光透過率及び光吸収率を示すグラフ。

【図6】被照射部の有無による細胞の死滅/生存の結果の違いを示す写真画像。

【図7】細胞がレーザー照射時に即死せずある程度の時間が経過した後に死に至ることを示す写真画像。

30

【図8】レーザーの出力及び単位面積あたりのエネルギー量と細胞の死滅/生存の結果との関係を示す写真画像。

【図9】レーザーの走査速度及びレーザー出力の好適値を概念的に示すグラフ。

【図10】同実施形態の細胞処理方法により細胞コロニーを複数の部分に分割した結果を示す写真画像。

【図11】同実施形態の細胞処理方法により細胞コロニーを複数の部分に分割した結果を示す写真画像。

【図12】レーザー光を一回照射した場合の細胞の死滅/生存の結果を示す写真画像。

【図13】レーザー光を二回照射した場合の細胞の死滅/生存の結果を示す写真画像。

【図14】レーザー光を四回照射した場合の細胞の死滅/生存の結果を示す写真画像。

40

【図15】レーザー光を六回照射した場合の細胞の死滅/生存の結果を示す写真画像。

【図16】ビーム径を20 μm に絞ったレーザーの照射によっても細胞が死に至ることを示す写真画像。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の一実施形態を、図面を参照して説明する。本実施形態のレーザー加工機は、細胞培養容器1上で培養された細胞のうち特定の細胞を致死させるレーザー照射処理を実行するものである。図1に示すように、本レーザー加工機は、一または複数の細胞培養容器1を支持する支持体2と、支持体2に支持させた細胞培養容器1にレーザービームLを照射するレーザー照射装置3と、細胞培養容器1に対するレーザービームLの照射位置を操作する変位

50

機構 4 と、レーザ照射装置 3 及び変位機構 4 を制御する制御部 5 とを主要な構成要素とする。

【 0 0 2 2 】

細胞培養容器 1 及び支持体 2 は、CO₂ インキュベータ（図示せず）内に配置されることが好ましい。CO₂ インキュベータは、その内部の雰囲気中の CO₂ 濃度及び温度を調節することのできる周知のものであり、レーザ照射処理中における細胞の培養環境、例えば細胞培養容器 1 に充填されている培地の pH 等を好適な状態に維持する役割を担う。

【 0 0 2 3 】

レーザ照射装置 3 は、レーザ光源 3 1 と、レーザ光源 3 1 から供給されたレーザ光 L を細胞培養容器 1 に向けて出射させる加工ノズル 3 3 と、レーザ光源 3 1 と加工ノズル 3 3 との間を介してレーザ光源 3 1 が出力するレーザ光 L を加工ノズル 3 3 へと導く光学系 3 2 とを備える。

10

【 0 0 2 4 】

レーザ光源 3 1 は、連続波レーザまたはパルスレーザ（連続波に近い、パルス幅の長い高周波レーザでもよい）L を発振する装置である。使用するレーザ L の波長は一意に限定されず、例えば 405 nm、450 nm、520 nm、532 nm、808 nm 等の可視光レーザや赤外線レーザを採用することができる。尤も、後述する細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 がそのレーザ L のエネルギーを吸収できるような波長を選択する必要がある。また、波長が 380 nm 以下の紫外線レーザは、DNA やタンパク質に吸収される可能性があり細胞への影響が懸念される。故に、レーザ L の波長は 380 nm よりも長いことが好ましい。本実施形態では、レーザ光源 3 1 として、波長が 405 nm 近傍にある最大出力 5 W の連続波ダイオードレーザを想定している。

20

【 0 0 2 5 】

加工ノズル 3 3 は、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に照射するべきレーザ光 L を集光するためのレンズや、レーザ光 L の出射の ON/OFF を切り替えるためのシャッタまたはミラー等を内蔵する。加工ノズル 3 3 は、支持体 2 に支持される細胞培養容器 1 の下方に位置し、上方に向かってレーザ L を出射させる。加工ノズル 3 3 から出射するレーザビーム L の光軸は、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に対して略直交する。

【 0 0 2 6 】

レーザ光源 3 1 から加工ノズル 3 3 に向けてレーザ L を伝搬させる光学系 3 2 は、光ファイバ、ミラー、レンズ等の任意の光学要素を用いて構成できる。

30

【 0 0 2 7 】

変位機構 4 は、支持体 2 に支持させた細胞培養容器 1 に対してレーザ照射装置 3 の加工ノズル 3 3 を相対的に変位させる XY ステージを主体とする。XY ステージ 4 は、リニアモータ台車等を介して対象物を X 軸方向（左右方向）及び Y 軸方向（前後方向）に沿って高速かつ精密に移動させ得る既知のものである。本実施形態では、加工ノズル 3 3 を XY ステージ 4 に支持させ、加工ノズル 3 3 を支持体 2 及び細胞培養容器 1 に対して移動させることとしている。だが、支持体 2 を XY ステージ 4 に支持させ、支持体 2 及び細胞培養容器 1 を加工ノズル 3 3 に対して移動させるようにしても構わない。何れにせよ、変位機構 4 により、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 とレーザビーム L の光軸とが交わる角度を略一定に保ちながら、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に対するレーザ L の照射位置を変位させることができる。

40

【 0 0 2 8 】

図 2 に示すように、制御部 5 は、プロセッサ 5 a、メインメモリ 5 b、補助記憶デバイス 5 c、操作入力デバイス 5 d、I/O インタフェース 5 e 等を有し、これらがコントローラ（システムコントローラや I/O コントローラ等）によって制御されて連携動作するものである。補助記憶デバイス 5 c は、フラッシュメモリ、ハードディスクドライブ、その他である。操作入力デバイス 5 d は、手指で操作可能なタッチパネル、トラックパッド、マウス等のポインティングデバイスや、キーボード、押下ボタン等である。I/O インタフェース 5 e は、サーボドライバ（サーボコントローラ）を含むことがある。また、制

50

御部 5 は、汎用的なパーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、ワークステーション等により構成されることがある。

【 0 0 2 9 】

制御部 5 が実行すべきプログラムは、補助記憶デバイス 5 c に記憶されており、プログラム実行の際に、メインメモリ 5 b に読み込まれ、プロセッサ 5 a によって解読される。そして、制御部 5 は、プログラムに従い、図 3 に示す照射位置座標取得部 5 1、出力制御部 5 2 及び機構操作部 5 3 としての機能を発揮する。

【 0 0 3 0 】

照射位置座標取得部 5 1 は、細胞培養容器 1 に対するレーザ光 L の照射位置を指し示す一または複数の X Y 座標を取得する。ここに言う X Y 座標とは即ち、細胞培養容器 1 内に存在している培養細胞のうちの致死させるべき細胞の位置を指し示す座標である。致死させるべき細胞とは、例えば、培養したい細胞または組織に混入した不要細胞や、継代培養の目的で細胞培養容器 1 内の細胞コロニーを複数の細胞クランプに分割する際の複数のクランプの境界線上にある細胞等である。レーザ光 L の照射位置の座標は、予めメインメモリ 5 b または補助記憶デバイス 5 c に格納されていることもあれば、ユーザの手によって指定されることもある。照射位置座標取得部 5 1 は、メインメモリ 5 b または補助記憶デバイス 5 c に格納されている照射位置の座標を読み出すか、ユーザによる照射位置の座標の指定を操作入力デバイス 5 d を介して受け付ける。

10

【 0 0 3 1 】

細胞培養容器 1 内の細胞コロニーを CCD や CMOS 等のカメラセンサを用いて撮影し、得られた画像を解析して不要細胞その他の致死させるべき細胞の位置を特定するという形で、レーザ光 L の照射位置の座標を得ることもできる。画像解析を通じた致死させるべき細胞の位置の検出、即ちレーザ光 L の照射位置の座標の決定は、制御部 5 自身が実行してもよく、制御部 5 と通信可能に接続している外部の装置またはコンピュータ（図示せず）により実行してもよい。前者の場合、照射位置座標取得部 5 1 は、カメラセンサが撮影した画像を I/O インタフェース 5 e を介して取得し、その画像を解析して照射位置の座標を取得する。後者の場合、照射位置座標取得部 5 1 は、外部の装置またはコンピュータからもたらされる照射位置の座標を I/O インタフェース 5 e を介して受信することにより、照射位置の座標を取得する。

20

【 0 0 3 2 】

出力制御部 5 2 は、加工ノズル 3 3 から細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に向けたレーザ L の出射の ON/OFF、及び被照射層 1 2 に照射するレーザ L の出力強度つまりはレーザ L の持つエネルギー量を制御する。具体的には、加工ノズル 3 3 からのレーザ L の出射の ON/OFF を指令する信号を I/O インタフェース 5 e を介して加工ノズル 3 3 に与えるとともに、レーザ L の出力を制御する信号を I/O インタフェース 5 e を介して加工ノズル 3 3 またはレーザ光源 3 1 に与える。

30

【 0 0 3 3 】

機構操作部 5 3 は、加工ノズル 3 3 を支持している X Y ステージ 4 を操作することで、加工ノズル 3 3 を照射位置座標取得部 5 1 において取得した照射位置の座標に向けて移動させ、加工ノズル 3 3 から出射するレーザビーム L の光軸を当該照射位置の座標に位置づける。具体的には、照射位置座標取得部 5 1 において取得した照射位置の座標に対応する指令の信号を、I/O インタフェース 5 e を介して X Y ステージ 4 に与える。加工ノズル 3 3 から連続波レーザ L または連続波に近い高周波数パルスレーザ L を出射させつつ、照射位置の座標の時系列に従って加工ノズル 3 3 ひいてはレーザビーム L を移動させれば、レーザ L を細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に照射しながらその照射位置を連続的に移動させる走査を実行することができる。

40

【 0 0 3 4 】

なお、細胞培養容器 1（の被照射層 1 2）における一定の領域を加工ノズル 3 3 の光軸によってラスタスキャンするように、加工ノズル 3 3 を細胞培養容器 1 に対して相対的に移動させながら、加工ノズル 3 3 の光軸が死滅させるべき細胞の直下に到達するタイミン

50

グで、加工ノズル 33 からレーザー L を出射させるようにしてもよい。

【0035】

図 4 に示すように、本実施形態の細胞培養容器 1 は、加工ノズル 33 から出射するレーザー光 L を透過させる容器本体 11 に、レーザー光 L の照射を受けて熱及び/または酸を発生させる光応答性材料を含む層である被照射層 12 を設けたものである。

【0036】

容器本体 11 は、加工ノズル 33 から出射するレーザー L が属する波長帯の光を透過させる透明性または透光性を有する、プラスチックやガラス等の材料により構成する。プラスチックの例としては、ポリスチレン系ポリマー、アクリル系ポリマー（ポリメタクリル酸メチル（PMMA）等）、ポリビニルピリジン系ポリマー（ポリ（4-ビニルピリジン）
10、4-ビニルピリジン-スチレン共重合体等）、シリコン系ポリマー（ポリジメチルシロキサン等）、ポリオレフィン系ポリマー（ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン等）、ポリエステルポリマー（ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレンナフタレート（PEN）等）、ポリカーボネート系ポリマー、エポキシ系ポリマー等を挙げることができる。既製の培養容器を、そのまま容器本体 11 として用いてもよい。容器本体 11 の形状は、既製の培養容器と同様、ディッシュ（シャーレ）形、マルチディッシュ形、フラスコ形等とすることができる。

【0037】

図 5 に、ポリスチレン系樹脂を用いて作製した、ある大きさ及び形状の容器本体 11 の光透過率を実線で表している。当該容器本体 11 の光透過率は、光波長約 380 nm 以上
20 では 85% 以上と非常に高い。一方で、光波長約 380 nm 以下では、光波長が短くなるほど光透過率が低下、即ち容器本体 11 による光の吸収が増大してゆく。これは、ポリスチレン材料に含まれる不純物に起因するものと思われる。

【0038】

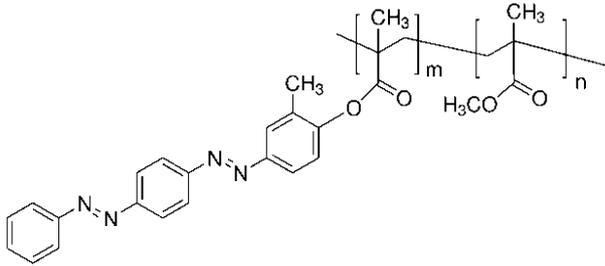
被照射層 12 は、加工ノズル 33 から出射するレーザー L が属する波長帯の光を吸収する色素構造（発色団）を含んだポリマー（高分子）により構成することが好ましい。このような材料は、容器本体 11 へのコーティングが容易であり、必要な細胞の接着性を確保でき、かつ細胞への移行も起こりにくいものとなるからである。レーザー光 L を吸収する色素構造の例としては、アゾベンゼン、ジアリールエテン、スピロピラン、スピロオキサジン、フルギド、ロイコ色素、インジゴ、カロチノイド（カロテン等）、フラボノイド（アントシアニン等）、キノイド（アントラキノン等）等といった有機化合物の誘導体を挙げ
30 ることができる。並びに、ポリマーを構成する骨格の例としては、アクリル系ポリマー、ポリスチレン系ポリマー、ポリオレフィン系ポリマー、ポリ酢酸ビニルやポリ塩化ビニル、ポリオレフィン系ポリマー、ポリカーボネート系ポリマー、エポキシ系ポリマー等を挙げることができる。

【0039】

被照射層 12 の材料となる色素構造含有ポリマーの一具体例として、ポリ[メチルメタクリレート-co-(ジスパースイエロー 7 メタクリレート)]（化 1、 $(C_5H_8O_2)_m(C_{23}H_{20}N_4O_2)_n$ ）を示す。但し、このアゾポリマーにおけるアゾベンゼンの構造については、無置換のアゾベンゼンの他、ニトロ基やアミノ基、メチル基等
40 で修飾した様々なバリエーションが考えられる。

【0040】

【化 1】



【0041】

10

上述の色素構造含有ポリマーを含む原料液、または当該色素構造含有ポリマーを溶剤（1，2 - ジクロロエタン、メタノール等）に溶解させた原料液を、スピンコート法やキャスト法等により容器本体 11 の上向面即ちウェル 10 の底に塗布して硬化させれば、レーザ光 L の照射を受けて熱を生じさせる被照射層 12 を形成することができる。なお、レーザ光 L を吸収する色素を容器本体 11 の構成材料に含有させることで、または色素構造含有ポリマーを材料として容器本体 11 を作製することにより、レーザ光 L の照射を受けて熱を生じさせる被照射層 12 を形成しても構わない。

【0042】

図 5 に、色素構造としてアゾベンゼンを有するポリマーを容器本体 11 にコーティングして構成した、所定の厚みを有する被照射層 12 の光透過率及び光吸収率を破線で表している。当該被照射層 12 の光吸収率は、光波長が約 360 nm のときにピークとなり、光波長が約 360 nm から長くなるほど低下してゆく。この被照射層 12 の光吸収率は、光波長が約 425 nm 以上の領域で 20% を切る。だが、光波長が長くなってもある程度以上の光吸収性が存在しており、405 nm、450 nm、520 nm または 532 nm の波長のレーザ光 L を当該被照射層 12 に十分に吸収させることが可能である。

20

【0043】

被照射層 12 の材料として、上述の色素構造含有ポリマーとともに、またはこれに代えて、レーザ光 L の照射を受けて酸性物質を発生させる光酸発生剤を用いることも考えられる。上掲の特許文献 1 にも開示されている通り、光酸発生剤は、加工ノズル 33 から出射するレーザ L が属する波長帯の光を吸収する色素構造（発色団）と、分解後に酸性物質となる酸前駆体とを備えた構造を有するものとするのが好ましい。スルホン酸誘導体、カルボン酸エステル類、オニウム塩類、ニトロベンズアルデヒド構造を有する光酸発生基等は、このような光酸発生剤に該当する。

30

【0044】

特に、光酸発生剤となるスルホン酸誘導体の例として、チオキサントン系スルホン酸誘導体（スルホン酸 1，3，6 - トリオキソ - 3，6 - ジヒドロ - 1H - 11 - チア - アザシクロペンタ [a] アントラセン - 2 - イルエステル等）及びナフタレンイミド系スルホン酸誘導体（スルホン酸 1，8 - ナフタレンイミド等）を挙げることができる。これら以外に、ジスルホン類、ジスルホニルジアゾメタン類、ジスルホニルメタン類、スルホニルベンゾイルメタン類、イミドスルホネート類、ベンゾインスルホネート類等のスルホン酸誘導体も採用することが可能である。

40

【0045】

また、カルボン酸エステルの例として、1，8 - ナフタレンジカルボン酸イミドメチルスルホネートや 1，8 - ナフタレンジカルボン酸イミドトシルスルホネート等を挙げることができ、オニウム塩の例として、テトラフルオロボレート（ BF_4^- ）、ヘキサフルオロホスフェート（ PF_6^- ）、ヘキサフルオロアンチモネート（ SbF_6^- ）等のアニオンを有するスルホニウム塩またはヨードニウム塩を挙げることができる。

【0046】

上述の光酸発生剤をプラスチック（特に、PMMA のようなアクリル系ポリマーやポリスチレン系ポリマー等）に含ませた原料液、または当該光酸発生剤を溶剤（1，2 - ジク

50

ロコエタン、メタノール等)に溶解させた原料液を、スピンコート法やキャスト法等により容器本体11の上向面即ちウェル10の底に塗布して硬化させれば、レーザ光Lの照射を受けて熱とともに酸を生じさせる被照射層12を形成することができる。なお、光酸発生剤を容器本体11の構成材料に含有させることにより、レーザ光Lの照射を受けて熱及び酸を生じさせる被照射層12を形成しても構わない。

【0047】

図5に、色素構造としてチオキサントン骨格を有し、酸前駆体としてスルホン酸類を有するチオキサントン系スルホン酸誘導体を含んだポリマーを容器本体11にコーティングして構成した、所定の厚みを有する被照射層12の光透過率及び光吸収率を鎖線で表している。当該被照射層12の光吸収率は、光波長が約375nmから約460nmの範囲に亘って分布する。この範囲外の波長の光を当該被照射層12が吸収することはできない。従って、405nmまたは450nmの波長のレーザ光Lであれば、当該被照射層12に吸収させることが可能である。尤も、当該被照射層12の光吸収率は、色素構造としてアゾベンゼンを有するポリマーを用いて構成した被照射層12の光吸収率(破線)よりは小さくなる。即ち、この被照射層12の光吸収率は、光波長が約400nmから約700nmの可視光領域で20%(さらに言えば、10%)を切る。

【0048】

被照射層12は、レーザ光Lの照射を受けて蛍光を発しない材料を用いて構成することが好ましい。また、被照射層12の厚みは、10 μ m以下とすることが好ましい。

【0049】

なお、細胞培養容器1の被照射層12の表面に、細胞の接着性を高めるための材料、例えばラミニンやマトリゲル等のECM(extracellular matrix)をコーティングしてもよい。

【0050】

細胞を培養する際には、細胞培養容器1の容器本体11に成形されているウェル10内に培地(特に、液体培地)13を充填する。その培地13は、ウェル10の底に敷設されている被照射層12の直上に所在することとなる。そして、培養される細胞は、当該被照射層12の表面に接着しつつ増殖して細胞コロニーを形成する。

【0051】

図4に示すように、細胞培養容器1のウェル10内に存在している細胞のうちの不要細胞のみを致死させるレーザ照射処理では、レーザ照射装置3の加工ノズル33から出射するレーザ光Lを、支持体2に支持させた細胞培養容器1の被照射層12における、致死させるべき細胞の直下の箇所(図4参照)に照射する。本実施形態では、加工ノズル33を細胞培養容器1の下方に配置しており、加工ノズル33から打ち上げたレーザ光Lを容器本体11を透過させた上、被照射層12に裏面側から照射する。加工ノズル33に内蔵されているレンズは、加工ノズル33から出射するレーザ光Lの焦点を細胞培養容器1の被照射層12に合わせる。被照射層12におけるレーザ光Lの照射を受けた箇所は、レーザ光Lのエネルギーを吸収して熱及び/または酸を生じ、その熱によって当該箇所の直上に存在する不要細胞を死に至らしめる。

【0052】

図6は、細胞培養容器1の容器本体11の上向面即ちウェル10の底に被照射層12を敷設する領域R1と敷設しない領域R2とを設け、そのウェル10内でMDCK細胞(Madin-Darby canine kidney cell)を培養し、そのウェル10の底に向けてレーザ照射装置3の加工ノズル33から連続波レーザLを照射して、しかる後(数時間経過後)トリパンブルー溶液による死細胞の染色を行った結果である。使用したレーザLの波長は405nm、レーザL出力は5.08W、レーザビームL径は50 μ mであり、連続波レーザLを出射する加工ノズル33即ちレーザビームLを細胞培養容器1に対して500mm/秒の速さで直線的に移動させる走査を一回実行している。レーザ光Lの照射箇所においてレーザ光Lが与える単位面積あたりのエネルギー量(エネルギー密度)は、約25.9J/cm²となる。被照射層12の構成材料は、色素構造としてア

10

20

30

40

50

ゾベンゼンを有しているポリマーである。

【 0 0 5 3 】

図 6 から明らかな通り、被照射層 1 2 を敷設した領域 R 1 内では、レーザ光 L の照射箇所直上に存在していた細胞が死滅している。これに対し、被照射層 1 2 を敷設していない領域 R 2 内では、容器本体 1 1 を透過したレーザ光 L の直射を受けたにもかかわらず細胞が生存している。

【 0 0 5 4 】

さらに、被照射層 1 2 の構成材料に光酸発生剤を用いているならば、被照射層 1 2 におけるレーザ光 L の照射を受けた箇所で酸性物質が発生し、その酸性物質が当該箇所の直上に存在する不要細胞の死または被照射層 1 2 からの剥離を促す。光酸発生剤がスルホン酸誘導体である場合、発生する酸性物質はスルホン酸類である。

【 0 0 5 5 】

上記のように、レーザ光 L の波長、出力及びエネルギー量を、細胞に直射しても細胞が死に至らないような大きさに設定したとしても、被照射層 1 2 の働きにより、不要な細胞を的確に死に至らしめることができる。

【 0 0 5 6 】

その上で、致死させるべき不要細胞以外の細胞への熱影響を最小限に抑えるためには、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 に照射するレーザ光 L の波長、出力及びエネルギー量を、不要細胞が即死せずレーザ光 L の照射からある程度の時間が経過した後（例えば、数十分後、一時間後ないし数時間後）に致死するような大きさに調整することが好ましい。

【 0 0 5 7 】

図 7 は、被照射層 1 2 を敷設した細胞培養容器 1 のウェル 1 0 内で M D C K 細胞を培養し、そのウェル 1 0 の底にある被照射層 1 2 に向けて加工ノズル 3 3 から連続波レーザ L を照射した後、所定の時間の経過を待ってトリパンブルー溶液による死細胞の染色を行った結果である。使用したレーザ L の波長は 4 0 5 n m、レーザ L 出力は 5 W、レーザビーム L 径は 5 0 μ m である。この図示例では、0 . 5 m m 間隔で互いに平行な四本の筋を描画するように、レーザビーム L を細胞培養容器 1 に対して 1 5 0 0 m m / 秒の速さで直線的に移動させる走査を、各筋毎に一回実行している。レーザ光 L の照射箇所においてレーザ光 L が与える単位面積あたりのエネルギー量は、約 8 . 7 J / c m ² となる。被照射層 1 2 の構成材料は、色素構造としてアゾベンゼンを有しているポリマーである。図 7 (A) はレーザ L の照射から 3 分経過後にトリパンブルー染色したもの、図 7 (B) はレーザ L の照射から 5 6 分経過後にトリパンブルー染色したもの、図 7 (C) はレーザ L の照射から 1 2 2 分経過後にトリパンブルー染色したものである。これらの図から明らかな通り、照射から 3 分後の時点ではレーザ光 L の照射箇所の直上に存在する細胞が生存しているが、5 6 分経過後にはレーザ光 L の照射箇所の直上に存在する細胞の少なくとも一部が死滅し、1 2 2 分経過後にはレーザ光 L の照射箇所の直上に存在する細胞の殆どまたは全てが死滅していることが分かる。このように、レーザ光 L の照射直後は不要細胞が生存しており、その照射からある程度の時間が経過した後に不要細胞が死滅するという状況を作り出すことは可能である。そして、これにより、致死させるべき不要細胞以外の細胞、換言すれば不要細胞の周辺にある目的細胞または組織への熱影響を最小限に抑制することができるのである。

【 0 0 5 8 】

図 8 は、被照射層 1 2 を敷設した細胞培養容器 1 のウェル 1 0 内で M D C K 細胞を培養し、そのウェル 1 0 の底にある被照射層 1 2 に向けて加工ノズル 3 3 から連続波レーザ L を照射して、所定時間が経過した後トリパンブルー溶液による死細胞の染色を行った結果である。使用したレーザ L の波長は 4 0 5 n m、レーザビーム L 径は 5 0 μ m で統一しているが、レーザ L 出力及びレーザビーム L を細胞培養容器 1 に対して移動させる走査の速度の条件は、以下のように様々に変化させている：

(I) 出力 5 W、走査速度 2 0 0 0 m m / 秒、エネルギー密度約 6 . 5 J / c m ²

(II) 出力 3 . 8 6 W、走査速度 1 6 0 0 m m / 秒、エネルギー密度約 6 . 1 J / c m ²

10

20

30

40

50

- (III) 出力 2.44 W、走査速度 1000 mm/秒、エネルギー密度約 6.2 J/cm²
 (IV) 出力 1.89 W、走査速度 800 mm/秒、エネルギー密度約 6.0 J/cm²
 (V) 出力 1.6 W、走査速度 640 mm/秒、エネルギー密度約 6.4 J/cm²
 (VI) 出力 1.11 W、走査速度 400 mm/秒、エネルギー密度約 7.1 J/cm²
 (VII) 出力 0.86 W、走査速度 320 mm/秒、エネルギー密度約 6.8 J/cm²
 (VIII) 出力 0.4 W、走査速度 200 mm/秒、エネルギー密度約 5.1 J/cm²
 (IX) 出力 0.6 W、走査速度 50 mm/秒、エネルギー密度約 30.6 J/cm²
 (X) 出力 0.4 W、走査速度 50 mm/秒、エネルギー密度約 20.4 J/cm²
 (XI) 出力 0.4 W、走査速度 50 mm/秒、エネルギー密度約 20.4 J/cm²
 (XII) 出力 0.4 W、走査速度 50 mm/秒、エネルギー密度約 20.4 J/cm²

10

レーザービーム L による走査は、それぞれ一回ずつ実行している。被照射層 12 の構成材料は、色素構造としてアゾベンゼンを有しているポリマーである。

【0059】

レーザー光 L の照射箇所においてレーザー光 L が与える単位面積あたりのエネルギー量は、レーザー出力が大きいほど大きくなり、また走査速度が遅いほど大きくなる。レーザー出力が小さくとも、走査速度が遅ければ、つまりはレーザー光 L の照射箇所においてレーザー光 L を照射する時間が長ければ、当該照射箇所における被照射層 12 が吸収するエネルギーの量は大きくなる。だが、図 8 の (VII) 及び (VIII) から明らかな通り、レーザー出力が小さいと、たとえ照射箇所に与えられるエネルギーの量が一定以上あったとしても、当該照射箇所

20

【0060】

に所在する細胞は殆どまたは全く死滅しない。出力の小さいレーザーを用いて不要細胞を確実に死滅させるためには、図 8 の (IX) ないし (XII) に示されるように、レーザービーム L による走査の速度を十分に遅くして、照射箇所に与えられるエネルギーの量をより大きくしなければならない。逆に、レーザー出力が大きければ、走査速度を高速化しても、照射箇所に所在する細胞を死滅させることができる。

【0061】

加えて、図 8 の (IX) と (X) ないし (XII) との比較から明らかな通り、レーザーの出力または単位面積あたりのエネルギー量の調整を通じて、致死させる細胞の幅または範囲の大きさを拡縮させることも可能である。即ち、レーザーの出力及び/または単位面積あたりのエネルギー量が大きいほど、細胞が死滅する幅または範囲が拡大する。

30

【0062】

図 9 に、細胞が死滅する幅または範囲がある一定の大きさとなるような、レーザービーム L の走査速度とレーザーの出力との関係を概念的に示している。図 9 に示している線よりもレーザーの走査速度を速め、またはレーザーの出力を弱めると、細胞が死滅する幅または範囲が狭まる。レーザーの走査速度が極端に速いか、レーザーの出力が極端に小さくなれば、細胞は死ななくなる。逆に、図 9 に示している線よりもレーザーの走査速度を遅め、またはレーザーの出力を強めると、細胞が死滅する幅または範囲が広がる。即ち、不要細胞に隣接する目的細胞または組織が受ける熱影響が大きくなる。

40

【0063】

また、レーザーの照射から不要細胞が死に至るまでの所要時間も、レーザーの出力及び/または単位面積あたりのエネルギー量が大きいほど短くなると考えられる。

レーザー照射処理に用いるレーザーの出力及び/または単位面積あたりのエネルギー量の最適な条件は、細胞培養容器 1 に設ける被照射層 12 の構成材料や厚み等の影響を受ける。レーザー光 L の照射を受けた被照射層 12 がレーザー光 L のエネルギーを吸収して発生させる単位面積あたりの熱量は、被照射層 12 に照射されるレーザー光 L の持つ単位面積あたりエネルギー量に、単位面積の被照射層 12 が当該レーザー光 L のエネルギーを吸収して利用できる割合である光利用率を乗じたものとなる。この光利用率は、被照射層 12 の構成材料の性質即ち光吸収率に依存するのは勿論のこと、レーザー光 L を吸収して熱を発する光熱反応に寄与する材料が被照射層 12 の単位面積あたりどれくらいの量存在しているかによっても変化する。容器本体 11 に被照射層 12 を形成するために塗布する構成材料の塗布厚みを増

50

せば、光熱反応に寄与する材料の量が増加して、単位面積の被照射層 1 2 の光利用率も増大する。従って、被照射層 1 2 において発生する単位面積あたりの熱量が増し、その分細胞が死に至りやすくなる。よって、細胞培養容器 1 に設ける被照射層 1 2 の光利用率に応じて、不要細胞の死滅処理に適したレーザー L の出力及び / または単位面積あたりのエネルギー量を実験的に求める必要がある。

【 0 0 6 4 】

本実施形態のレーザー加工機及び細胞培養容器 1 は、培養した細胞コロニーを複数の部分に分割する作業に好適に利用できる。図 1 0 及び図 1 1 に、ECM の一種であるマトリゲルを被照射層 1 2 にコートした細胞培養容器 1 上でフィーダーレス培養したヒト i P S 細胞をレーザー照射処理により多数の細胞クランプに分割し、得られた細胞クランプを新しい培地に移して再び培養する継代培養実験の結果を示す。使用したレーザー L の波長は 4 0 5 nm (実測されたスペクトル分布は 3 9 9 nm から 4 0 3 nm)、レーザー出力は 5 W、レーザービーム L 径は 5 0 μ m である。図 1 0 例では、レーザービーム L を細胞培養容器 1 に対して格子を描くように移動させる走査を行い、被照射層 1 2 における、レーザー L の照射を受ける格子の部分の直上に存在する不要細胞を死滅させることにより、格子目の部分に存在する不要細胞以外の細胞の塊をクランプとして取り出そうとしている。つまり、細胞培養容器 1 上で培養した細胞コロニーを、格子に沿って切断している。レーザー L の照射を受ける格子の部分は、あるクランプと他のクランプとを隔てる境界線に相当する。

【 0 0 6 5 】

図 1 0 に示している例では、0.4 mm 間隔で上記の格子の要素となる互いに平行な多数の筋を描画するように、レーザービーム L を細胞培養容器 1 に対して 1 0 0 0 mm / 秒の速さで直線的に移動させる走査を、各筋毎に一回実行している。被照射層 1 2 の構成材料は、色素構造としてアゾベンゼンを有しているポリマーである。そして、このポリマーを 7 μ g / cm^2 の密度で容器本体 1 1 の上向面即ちウェル 1 0 の底に塗布することで、平均の厚みが 7 0 nm の被照射層 1 2 をウェル 1 0 の底に敷設している。図 1 0 (A) は、レーザー L の照射から不要細胞の死滅に要する時間が経過した後、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 の表面に接着する細胞をその表面から剥離させるための酵素をウェル 1 0 内に注入したものである。図 1 0 (B) は、図 1 0 (A) の拡大である。生細胞である細胞クランプは、細胞培養容器 1 から剥離して丸まっている。図 1 0 (C) は、レーザー照射処理を通じて得られた細胞クランプである。並びに、図 1 0 (D) は、その細胞クランプを新しい培地に移して一日が経過した後の状態である。図 1 0 (D) からは、元の細胞培養容器 1 から切り出した細胞クランプが順調に成長を始めていることが見て取れる。

【 0 0 6 6 】

図 1 0 (A) 及び (B) において格子状をなしている細胞群は、レーザー照射処理により死滅した細胞である。図 1 0 に示した例では、レーザー L の出力及び / または単位面積あたりのエネルギー量が最適値よりも大きかった可能性があり、レーザー L の出力及び / または単位面積あたりのエネルギー量をさらに低減させても適切に細胞クランプの切り出しを遂行できるものと思われる。

【 0 0 6 7 】

図 1 1 に示している例では、0.4 mm 間隔で上記の格子の要素となる互いに平行な多数の筋を描画するように、レーザービーム L を細胞培養容器 1 に対して 5 0 0 mm / 秒の速さで直線的に移動させる走査を、各筋毎に一回実行している。被照射層 1 2 の構成材料は、色素構造としてチオキサントン骨格を有し、酸前駆体としてスルホン酸類を有するチオキサントン系スルホン酸誘導体を含んだポリマーである。そして、このポリマーを 2 0 0 μ g / cm^2 の密度で容器本体 1 1 のウェル 1 0 の底に塗布することで、平均の厚みが 2 μ m の被照射層 1 2 をウェル 1 0 の底に敷設している。図 1 1 (A) は、レーザー L の照射から不要細胞の死滅に要する時間が経過した後、細胞培養容器 1 の被照射層 1 2 の表面に接着する細胞をその表面から剥離させるための酵素をウェル 1 0 内に注入したものである。図 1 1 (B) は、図 1 1 (A) の拡大である。生細胞である細胞クランプは、細胞培養容器 1 から剥離して丸まる。図 1 1 (C) は、レーザー照射処理を通じて得られた細胞クランプ

ンプである。並びに、図11(D)は、その細胞クランプを新しい培地に移して一日が経過した後の状態である。図11(D)からは、元の細胞培養容器1から切り出した細胞クランプが順調に成長を始めていることが見て取れる。

【0068】

図10(A)及び(B)と比べて、図11(A)及び(B)では、レーザー照射処理により死滅した細胞を明確に視認できない。また、一部の細胞クランプ同士が完全に切断されずに繋がっているようにも見受けられる。図11に示した例では、レーザーLの出力及び/または単位面積あたりのエネルギー量が最適値よりも小さかった可能性があり、レーザーLの出力及び/または単位面積あたりのエネルギー量をより増大させることでさらによい結果を得られる余地があるように思われる。

10

【0069】

本実施形態の細胞処理方法は、容器本体11にレーザー光Lの照射を受けてこれを吸収する材料を含む層である被照射層12が設けられた細胞培養容器1の被照射層12の表面上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させる方法であって、前記被照射層12における致死させるべき細胞の直下の箇所にレーザー光Lを照射するものである。

【0070】

本細胞処理方法、並びに本実施形態のレーザー加工機及び細胞培養容器1によれば、高速かつ短時間のレーザー照射処理を通じて、細胞培養容器1上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させることが可能である。細胞培養容器1上の細胞コロニーのうち、所望の細胞に分化しなかった不要細胞のみをピンポイントで死滅させることができるだけでなく、細胞培養容器1(の被照射層12)における一定の領域をレーザービームLによりラスターキャンすることで、当該領域に所在する細胞をおしなべて死滅させることもできる。

20

【0071】

また、細胞培養容器1で培養した細胞群をある部分と他の部分とに切り分ける境界線の直下にあたる被照射層12にレーザーLを照射すれば、培養した細胞をある部分と他の部分とに分割することができる。これは、継代培養のために均一な大きさの細胞クランプを簡便に抽出するために有効である。

【0072】

上掲の特許文献1に開示されている方法では、対象の細胞を死滅させるために活性エネルギー線を照射する時間が長い。例えば、直径35mmの培養容器たるディッシュの全域を処理しようとするれば、約8時間かかる計算となる。これに対し、本実施形態の細胞処理方法では、レーザービームLを細胞培養容器1に対して500mm/秒以上の速度で走査しても不要細胞を的確に死滅させることができるため、レーザービームL径が50 μ mであれば直径35mmのディッシュ形の細胞培養容器1の全域を処理するのに約2.7分しかかからない。レーザービームLの走査速度を1500mm/秒とすれば、所要時間は1分を切る。本実施形態によれば、一定時間内に多数個の細胞処理容器に対してレーザー照射を実行し、当該処理容器内に存在する不要細胞を致死させる高速処理を実現でき、来たるべき再生医療用細胞の大量生産の実現に大きく寄与する。

30

【0073】

細胞培養容器1に照射するレーザービームLの径は50 μ m以下に絞ることが可能であり、一個の細胞の寸法が20 μ m以下であるヒトiPS細胞のような小形の細胞に対しても的確に処理を施すことができる。

40

【0074】

さらに、細胞培養容器1の被照射層12における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が即死せずある程度の時間が経過した後に致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザー光Lを照射するようすれば、致死させるべき細胞以外の細胞への熱影響を最小限に抑制でき、目的細胞または組織の収率をより一層向上させることができる。

【0075】

なお、本発明は以上に詳述した実施形態に限られるものではない。上記実施形態では、細胞培養容器1の被照射層12における致死させるべき細胞の直下の箇所に、当該細胞が

50

即死せず（レーザー光Lの照射から数分程度では死に至らず）ある程度以上の時間が経過した後、致死するような出力またはエネルギー量を持つレーザー光Lを一回照射することで、対象の細胞を死滅させていた。これに対し、致死させる細胞以外の細胞への熱影響を最小限に抑制しながら、対象の細胞が死に至るまでの所要時間を短縮したいのであれば、上記実施形態と同様のレーザー加工機及び細胞培養容器1を用いて、細胞培養容器1の被照射層12における致死させるべき細胞の直下の箇所、一回照射しただけでは当該細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザー光Lを複数回照射すればよい。

【0076】

図12ないし図15は、レーザー光Lの照射を受けて熱を生じさせる被照射層12を敷設した細胞培養容器1のウェル10内でiPS細胞を培養し、そのウェル10の底にある被照射層12に向けて加工ノズル33から連続波レーザーLを照射した後、できるだけ間を置かず（実際には、染色作業のために数分ないし十数分程度を要する）トリパンブルー溶液による死細胞の染色を行った結果である。なお、トリパンブルー染色前の洗浄及びトリパンブルー染色時に、一部細胞がウェル10から剥がれ落ちている。使用したレーザーLの波長は405nm、レーザー出力は1W、レーザービームL径は50 μ mである。被照射層12の構成材料は、色素構造としてアゾベンゼンを有しているポリマーである。図示例では、0.2mm間隔で互いに平行な複数本の筋を描画するように、レーザービームLを細胞培養容器1に対して100mm/秒の速さで直線的に移動させる走査を、各筋毎に一回ないし複数回実行している。レーザービームLによる走査回数、即ちレーザー光Lの照射回数に関して、図12は対象の細胞の直下の箇所に一回照射後すぐにトリパンブルー染色を実施した結果を示し、図13は対象の細胞の直下の箇所に二回照射後すぐにトリパンブルー染色を実施した結果を示している。並びに、図14は対象の細胞の直下の箇所に四回照射後すぐにトリパンブルー染色を実施した結果を示し、図15は対象の細胞の直下の箇所に六回照射後すぐにトリパンブルー染色を実施した結果を示している。

【0077】

図12では、細胞が殆ど染色されていない。これは、レーザー光Lを一回照射してから数分ないし十数分後の時点では、照射箇所の直上に存在する細胞が生存していることを示している。これに対し、図13ないし図15では、細胞が染色されている。即ち、レーザー光Lの照射回数を二回以上に増やすことで、その照射から短い時間しか経過していかなくとも、照射箇所の直上に存在する細胞が死に至るといえることが分かる。また、レーザー光Lの照射回数を二回から四回に増やすことで、レーザーLの照射直後の時期におけるトリパンブルー染色の強度が増している。つまり、レーザー光Lの照射回数を増やすほど細胞が短時間で死滅する、特にレーザー光Lを四回照射することで照射箇所の直上に存在する細胞がほぼ即死状態となることが明らかとなる。その一方で、図13ないし図15において、染色された細胞の幅はレーザービームLの径である50 μ m程度に抑えられている。このように、細胞が即死しないような出力またはエネルギー量を持つレーザー光を複数回照射する手法により、細胞が死に至るまでの所要時間を短縮しながら、致死させるべき細胞の周辺にある細胞への熱影響を最小限に抑制することが可能である。

【0078】

しかして、図14と図15とを比較すると、レーザー光Lの照射回数を五回以上に増やしても、対象の細胞を短時間で死滅させる効果に違いは生じないことが分かる。

【0079】

不要細胞を致死させるためのレーザー照射処理に使用するレーザーLの波長は、405nmに限定されないことは言うまでもない。他の波長のレーザーLを採用する場合には、その波長の光を吸収することができる色素構造を含んだ材料（特に、ポリマー）を用いて細胞培養容器1の被照射層12を構成することが求められる。例えば、波長が808nmや1064nm等の近赤外線レーザーLを使用するのであれば、フタロシアニン類（フタロシアニン誘導体、フタロシアニン系近赤外線吸収色素）を材料として用いることが一案である。但し、その場合には、細胞に移行しないよう、ポリマーの側鎖に化学結合により固定されることが望ましい。また、配位錯体は、金属イオンが遊離することから、ポリマー化する

10

20

30

40

50

ものでも避けた方がよいと思われる。

【0080】

レーザービームLの径を、50 μm よりもさらに小さく絞ってもよい。例えば、コア径の小さい光ファイバを加工ノズル33に接続し、レーザー光源31から供給されるレーザー光Lをこの光ファイバを通じて加工ノズル33に入力するようにすれば、加工ノズル33から出射するレーザービームLの径を25 μm 以下に絞ることができ、その分単位面積あたりのレーザーLのエネルギー量(エネルギー密度)が増す。これにより、レーザー光源31の最大出力が大きくなるとも、レーザーLの照射箇所即ち不要細胞の存在する箇所に多量のエネルギーをピンポイントに与えることが可能となる。

【0081】

図16は、レーザー光Lの照射を受けて熱を生じさせる被照射層12を敷設した細胞培養容器1のウェル10内でiPS細胞を培養し、そのウェル10の底にある被照射層12に向けて加工ノズル33から連続波レーザーLを一回照射した後、一時間半経過後にトリパンブルー溶液による死細胞の染色を行った結果である。使用したレーザーLの波長は405 nm、レーザー出力は0.18 W、レーザービームL径は20 μm である。被照射層12の構成材料は、色素構造としてアゾベンゼンを有しているポリマーである。図示例では、0.2 mm間隔で互いに平行な複数本の筋を描画するように、レーザービームLを細胞培養容器1に対して300 mm/秒の速さで直線的に移動させる走査を、各筋毎に一回実行している。

【0082】

図16において、染色された細胞の幅はレーザービームLの径である20 μm ないし25 μm 程度に抑えられている。これは、致死させるべき細胞の周辺にある細胞への熱影響を最小限に抑制できていることを示している。因みに、この幅は、iPS細胞約二個分に相当する。レーザー光Lのビーム径を絞ることで、細胞の致死範囲が狭まり、収率の向上を期待できる。図16に示す例では、レーザー光Lを一回だけ照射して一時間半経過後の細胞の死滅を確認しているが、ビーム径を25 μm ないし20 μm 以下に絞ったレーザー光Lであっても同一箇所に複数回照射すれば、当然、対象の細胞が死滅するまでの所要時間をより短縮できると考えられる。

【0083】

レーザービームLを被照射層12に照射したときの投影形状は、点状または円形状には限られない。レーザービームLの投影形状を、所定方向に引き延ばした棒状のラインビームに成形しても構わない。ラインビームを用いれば、細胞培養容器1(の被照射層12)における一定の領域をラスタスキャンするのに要する時間をより短縮できる。

【0084】

上記実施形態では、継代培養のための細胞クランプを切り出す目的で、レーザービームLを細胞培養容器1に対して格子を描くように移動させる走査を行っていたが、レーザービームLによる走査の軌跡は格子状には限定されない。例えば、被照射層12に複数の正六角形が隙間なく配列された六角網状(または、ハニカム構造)を描くように、即ち六角網状に細胞を死滅させるように、レーザービームLを細胞培養容器1に対して移動させる走査を実行することが考えられる。その場合、六角形の内に残る生細胞が細胞クランプとなる。

【0085】

上記実施形態では、支持体2に支持させた細胞培養容器1に向けてレーザーLを照射する加工ノズル33をXYステージ4に搭載し、加工ノズル33をX軸方向及びY軸方向に移動させるようにしていたが、細胞培養容器1を支持する支持体2をXYステージ等の変位機構4に搭載して、細胞培養容器1をX軸方向及びY軸方向に移動させるようにしても構わない。あるいは、加工ノズル33と支持体2とのうち一方をX軸方向に走行可能なリニアモータ台車等に搭載し、他方をY軸方向に走行可能なリニアモータ台車等に搭載することにより、加工ノズル33から出射するレーザービームLを細胞培養容器1の被照射層12に対して相対的にX軸方向及びY軸方向の両方向に変位させ得るようにすることも考えられる。

10

20

30

40

50

【0086】

細胞培養容器1の被照射層12に対するレーザーLの照射位置を変位させるための変位機構4として、ガルバノスキャナを採用してもよい。周知の通り、ガルバノスキャナは、レーザー光源31から供給されるレーザー光Lを反射するミラーをサーボモータやステップモータ等によって回動させるもので、ミラーを介してレーザーLの光軸を高速に変化させることが可能である。尤も、ガルバノスキャナを採用する場合、細胞培養容器1の被照射層12に対してレーザー光Lの光軸が交わる角度を厳密には一定に保つことができない。また、レーザー光源が半導体レーザー等であり、当該レーザー光源が発振するレーザーを光ファイバ等を用いてガルバノスキャナまで伝送する場合、被照射層12に照射されるレーザービームLの径若しくは投影形状の寸法を極小に絞ることも容易でない。レーザービームLの径若しくは投影形状の寸法を極小に絞ってエネルギー密度を高めるためには、XYステージ4やリニアモータ台車のような、レーザービームLの光軸を細胞培養容器1の被照射層12に対して相対的に平行移動させ得る機構を用いることが好ましい。但し、ファイバーレーザーをレーザー光源として採用することにより、被照射層12に照射されるレーザービームLの径若しくは投影形状の寸法を極小に絞ることができるようになる。

10

【0087】

細胞培養容器1内の細胞を撮影するカメラセンサを、加工ノズル33に付設することも考えられる。

【0088】

細胞培養容器1内の細胞を撮影する際の照明光源として、加工ノズル33から出射するレーザー光Lを利用することも考えられる。無論、その場合に加工ノズル33から細胞培養容器1に照射するレーザーLの出力は、不要細胞を死滅させるために細胞培養容器1に照射するレーザーLの出力よりも十分に弱める必要がある。

20

【0089】

上記実施形態では、細胞培養容器1の容器本体11に成形されているウェル10の底に被照射層12の材料となるポリマーを塗布して被照射層12を構成していた。だが、複数のウェルを包有するマルチディッシュ形の容器本体に、スピコート等によりポリマーを塗布して被照射層を形成することは困難を伴う。そこで、レーザー光Lの照射を受けて熱を生じさせる材料を含有する板状体を作製し、この板状体を容器本体の各ウェルの底に設置または接着することにより、細胞培養容器の被照射層を構成するようにすることが考えられる。板状体は、レーザー光Lを透過させる透明性または透光性を有するプラスチックやガラス等の材料により構成した薄板にレーザー光Lを吸収する色素を塗布したものであってもよく、そのような薄板の構成材料にレーザー光Lを吸収する色素を含有させたものであってもよい。上記実施形態において述べた色素構造含有ポリマーや光酸発生剤を、レーザー光Lを吸収する色素として用いることも当然に可能である。

30

【0090】

上記実施形態では、レーザー光Lを細胞培養容器1の下方から容器本体11を透過させた上で被照射層12に照射していたが、レーザー光Lを上方即ち被照射層12の表面側から(容器本体11を透過させずに)被照射層12に直接照射することも考えられる。この場合、容器本体11がレーザー光Lを透過させる透明性または透光性を有している必要はない。照射するレーザー光Lの焦点は、被照射層12の上にある細胞に合わせるのではなく、被照射層12に合わせることを好ましい。

40

【0091】

細胞培養容器1を用いてiPS細胞その他の細胞を培養する場合に、フィーダー細胞を併用してもよい。本発明に係るレーザー加工機は、細胞培養容器1内の不要となったフィーダー細胞を死滅処理するためにも利用できる。

【0092】

その他、各部の具体的構成は、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形が可能である。

【産業上の利用可能性】

50

【0093】

本発明は、細胞培養容器上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させる処理に用いることができる。

【符号の説明】

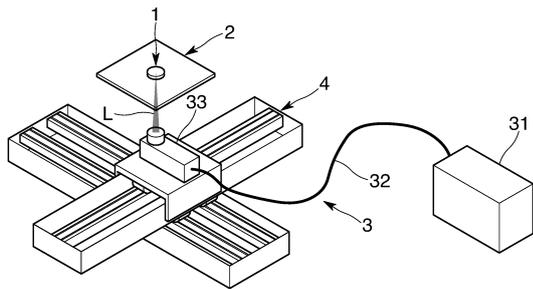
【0094】

- 1 ... 培養容器
- 1 1 ... 容器本体
- 1 2 ... 被照射層
- 3 ... レーザ照射装置
- 3 3 ... 加工ノズル
- 4 ... 変位機構（XYステージ）
- 5 ... 制御部
- L ... レーザ光

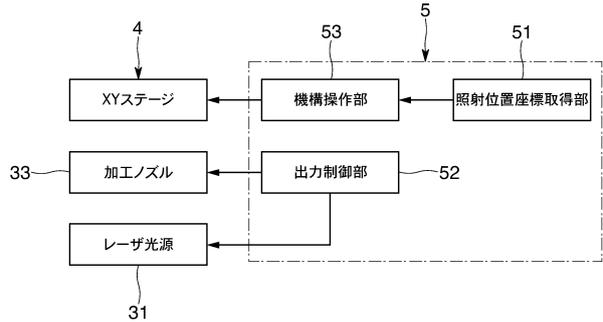
【要約】

高速かつ短時間のレーザー照射処理を通じて、培養容器上で培養された細胞のうちの特定の細胞を致死させるべく、容器本体にレーザー光の照射を受けてこれを吸収する材料を含む層である被照射層が設けられた培養容器の被照射層の表面上で細胞を培養するとともに、当該被照射層における、致死させるべき特定の細胞の直下の箇所にレーザー光を照射するようにした。

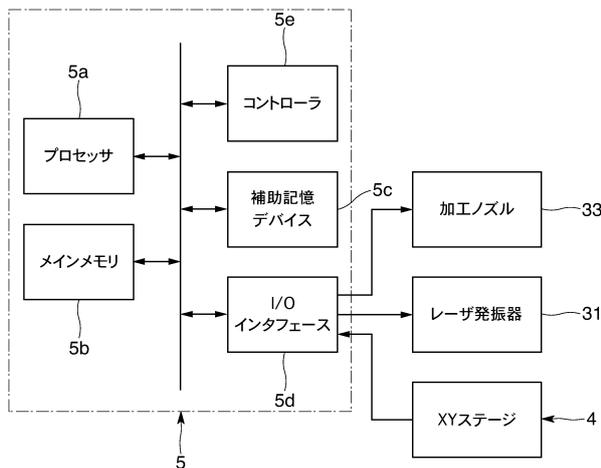
【図1】



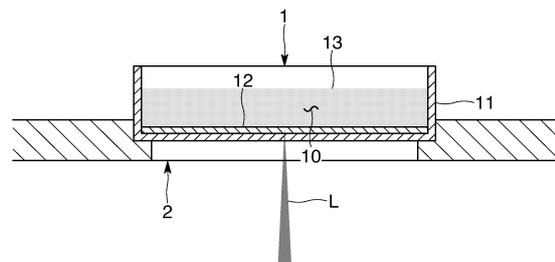
【図3】



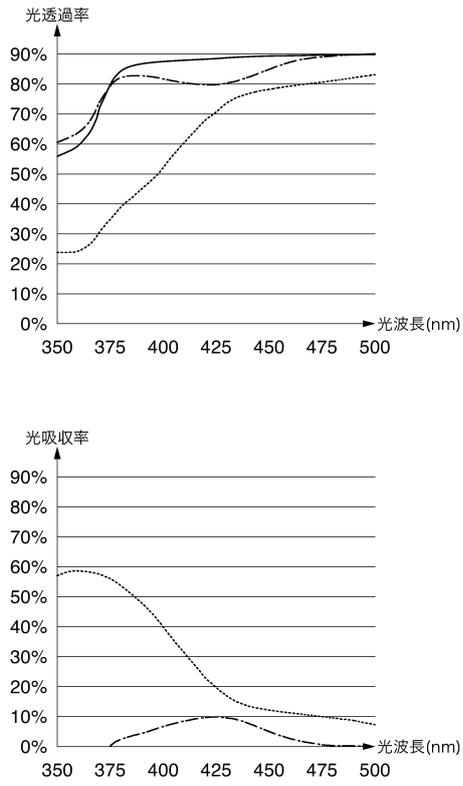
【図2】



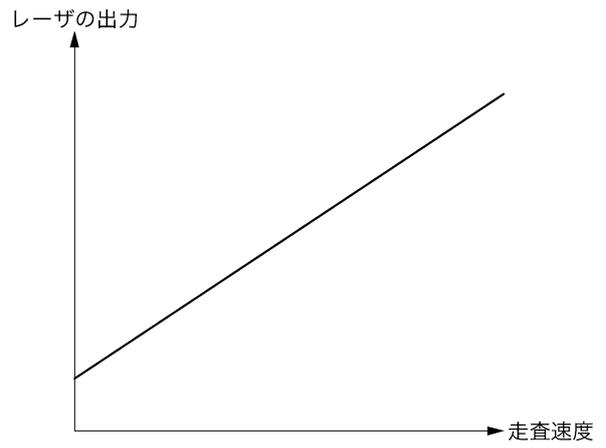
【図4】



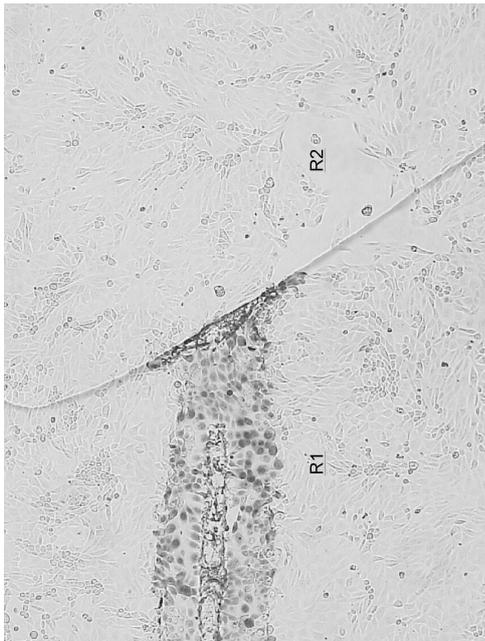
【図5】



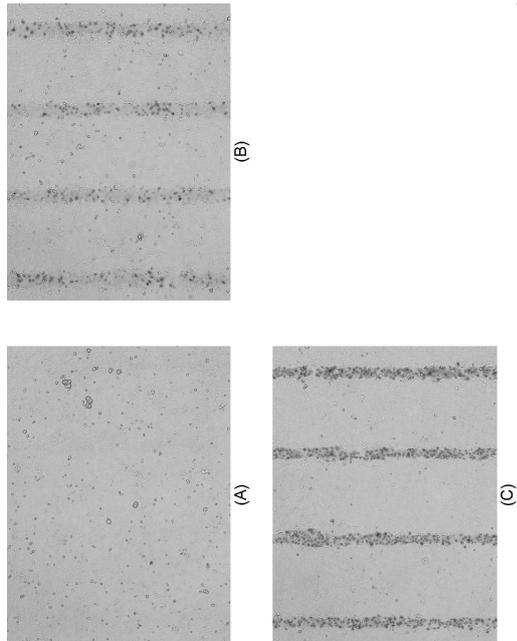
【図9】



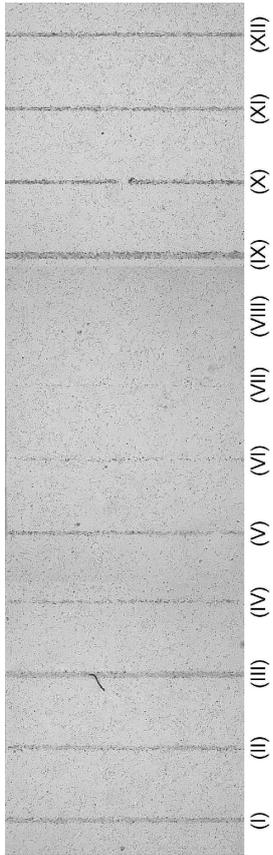
【図6】



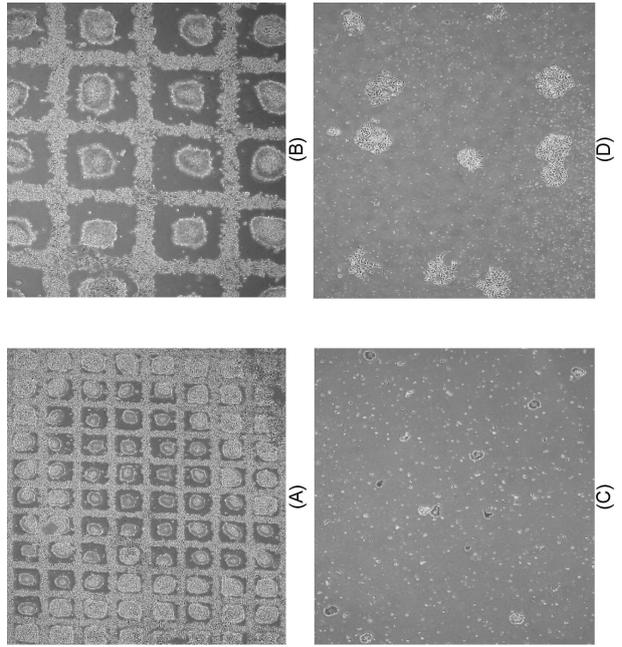
【図7】



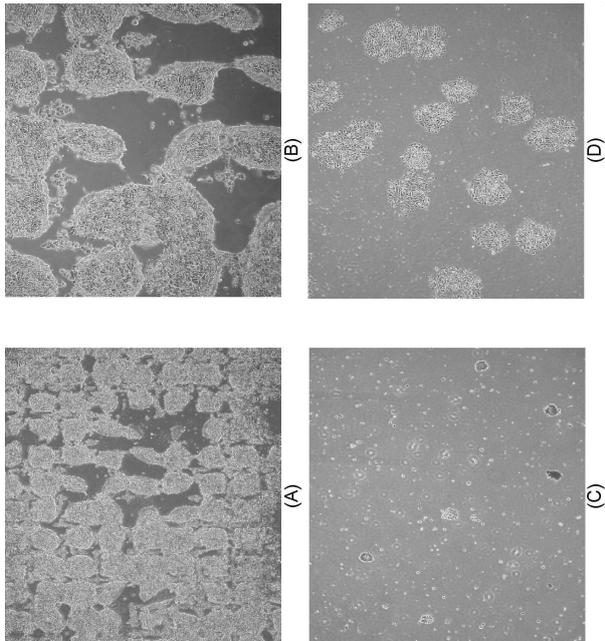
【 図 8 】



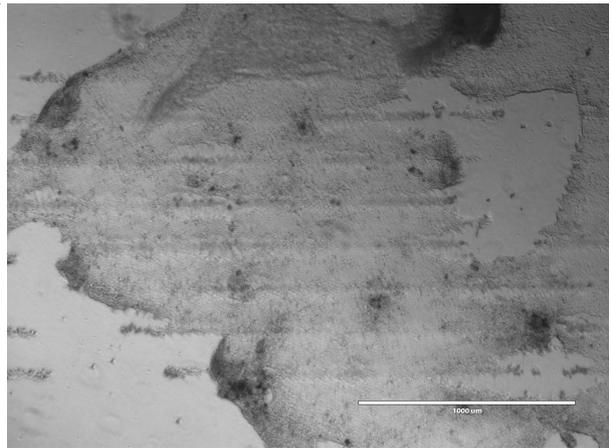
【 図 10 】



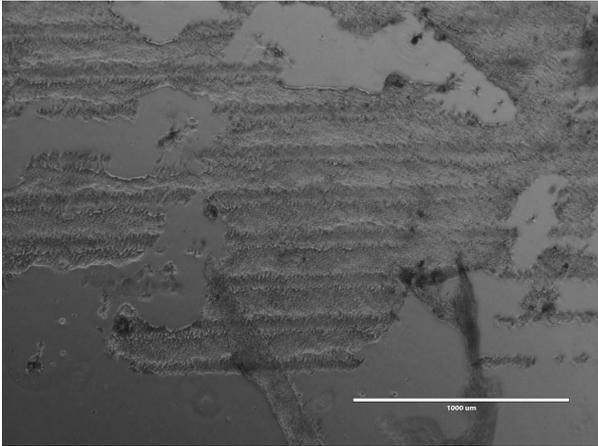
【 図 11 】



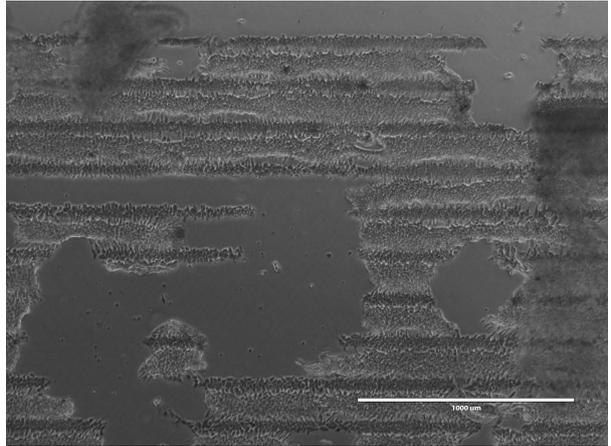
【 図 12 】



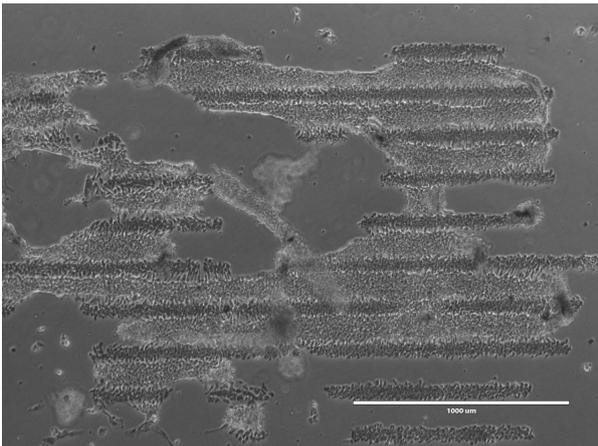
【 1 3】



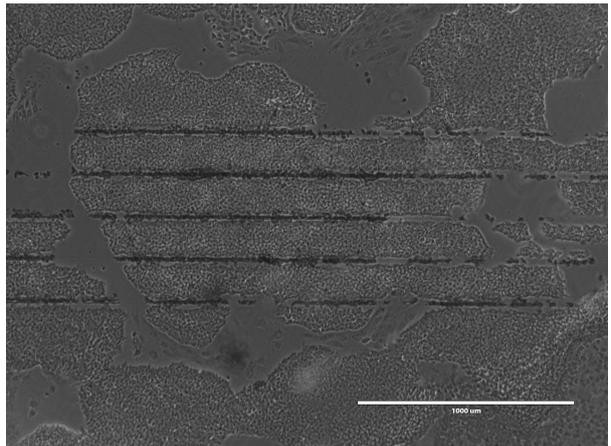
【 1 4】



【 1 5】



【 1 6】



フロントページの続き

(72)発明者 松本 潤一

京都府京都市南区久世築山町204-1 株式会社片岡製作所内

(72)発明者 須丸 公雄

茨城県つくば市東1-1-1 国立研究開発法人産業総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 金森 敏幸

茨城県つくば市東1-1-1 国立研究開発法人産業総合研究所つくばセンター内

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 国際公開第2011/125615(WO, A1)

特開2012-023970(JP, A)

特開2005-333889(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

C12M