



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298303 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180021885.1

(22) 申请日 2021.04.01

(30) 优先权数据

2020-067519 2020.04.03 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/014208 2021.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/201243 JA 2021.10.07

(71) 申请人 JSR株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 末政大地 林英治

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 舒艳君

(51) Int.Cl.

*G12N 5/02* (2006.01)

*G12M 3/00* (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

含有细胞细胞外基质的制造方法、细胞培养方法、含有细胞细胞外基质制造装置及控制程序

(57) 摘要

含有细胞细胞外基质的制造方法包括：在具有前端开口部的移液管的内部准备含有(i)细胞外基质前体以及(ii)细胞或者细胞团的细胞外基质溶液；排出上述细胞外基质溶液，在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴；使上述移液管的前端开口部接近细胞培养容器的培养面，按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式将上述液滴载置于上述培养面上；使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离，将上述液滴与上述移液管的前端开口部分离；以及使上述细胞外基质溶液凝胶化，形成含有细胞细胞外基质。

1. 一种含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,包括:

在具有前端开口部的移液管的内部准备含有(i)细胞外基质前体以及(ii)细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;

排出上述细胞外基质溶液,在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴;

使上述移液管的前端开口部接近细胞培养容器的培养面,按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式将上述液滴载置于上述培养面上;

使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离,将上述液滴与上述移液管的前端开口部分离;以及

使上述细胞外基质溶液凝胶化,形成含有细胞细胞外基质。

2. 根据权利要求1所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述培养面的25°C时的与水的接触角为40°~120°。

3. 根据权利要求1或者2所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

在形成上述含有细胞细胞外基质时,上述培养面的温度为20°C~60°C。

4. 根据权利要求1~3中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述细胞外基质溶液的温度为0°C~10°C。

5. 根据权利要求1~4中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述移液管的前端开口部的开口面积为0.05mm<sup>2</sup>~0.4mm<sup>2</sup>。

6. 根据权利要求1~5中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述液滴的水平方向的长度的最大值相对于铅垂方向的长度的最大值之比、即水平方向的长度的最大值/铅垂方向的长度的最大值为0.5~5。

7. 根据权利要求1~6中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述液滴的铅垂方向的长度的最大值为100μm~5000μm。

8. 根据权利要求1~7中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

上述细胞培养容器为孔板。

9. 根据权利要求1~8中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法,其中,

在准备上述细胞外基质溶液时,在维持上述移液管的前端开口部在上述细胞外基质溶液的液面之下的状态的同时,将上述细胞外基质溶液吸引到上述移液管的内部。

10. 一种细胞培养方法,其中,包括:

使培养基与通过权利要求1~9中任意一项所述的含有细胞细胞外基质的制造方法形成的含有细胞细胞外基质接触并培养细胞。

11. 一种含有细胞细胞外基质制造装置,其中,具备:

收容槽,收容含有(i)细胞外基质前体以及(ii)细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;

移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴的孔给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及

工作台,保持细胞培养容器。

12. 一种含有细胞细胞外基质制造装置控制程序,通过含有细胞细胞外基质制造装置在细胞培养容器的培养面形成含有细胞细胞外基质,上述含有细胞细胞外基质制造装置具

备:

收容槽,收容含有(i)细胞外基质前体以及(ii)细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;

移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及

工作台,保持细胞培养容器,

其中,

上述含有细胞细胞外基质制造装置控制程序使在上述收容槽收容有含有(i)细胞外基质前体以及(ii)细胞或者细胞团的细胞外基质溶液、且在上述喷嘴安装有具有前端开口部的移液管、且在上述工作台载置有细胞培养容器的上述含有细胞细胞外基质制造装置进行以下动作:

使上述控制部控制上述移送部,来使安装于上述喷嘴的上述移液管的前端移动到收容于上述收容槽的上述细胞外基质溶液的液面之下;

使上述控制部控制上述泵,来使上述细胞外基质溶液吸引到上述移液管的内部;

使上述控制部控制上述移送部,来使吸引有上述细胞外基质溶液的上述移液管移动到上述细胞培养容器的上部;

使上述控制部控制上述泵,来使上述移液管的内部的上述细胞外基质溶液排出,并在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴;

使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部接近上述细胞培养容器的培养面,并按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式使上述液滴载置于上述培养面上;以及

使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离,使上述液滴与上述移液管的前端开口部分离,并且之后使上述细胞外基质溶液凝胶化,来形成含有细胞细胞外基质。

## 含有细胞细胞外基质的制造方法、细胞培养方法、含有细胞细胞外基质制造装置及控制程序

### 技术领域

[0001] 本发明涉及含有细胞细胞外基质的制造方法、细胞培养方法、含有细胞细胞外基质制造装置以及控制程序。本申请主张于2020年4月3日在日本申请的日本特愿2020-067519号的优先权,并在此引用其内容。

### 背景技术

[0002] 在细胞培养中,已知根据操作者的手法的差异,即使利用相同的实验方案进行细胞培养,也不能得到相同的结果的情况较多。例如,通过使用了移液管的人的手工作业,制成多个大致同一尺寸以及形状的含有细胞的细胞外基质几乎接近不可能。

[0003] 而且,已知若使用尺寸以及形状有偏差的细胞外基质进行细胞培养,则供给至各细胞外基质内的细胞的氧或二氧化碳、来自培养基的营养成分产生偏差,所以在各细胞外基质内的细胞间增殖、分化不同(例如,参照非专利文献1~4。)

[0004] 另外,若减小细胞外基质的尺寸,则能够将氧或二氧化碳、来自培养基的营养成分充分地供给至细胞外基质的内部,能够抑制偏差。然而,通过操作者的手法制成小的细胞外基质是非常困难的。

[0005] 非专利文献1:Wang Y.,et al.,Three-dimensional biomimetic scaffolds for hepatic differentiation of size-controlled embryoid bodies,J Mater Res.,34(8),1371-1380,2019.

[0006] 非专利文献2:Vernon R.B.,et al.,Adhesion,shape,proliferation,and gene expression of mouse Leydig cells are influenced by extracellular matrix in vitro,Biol Reprod.,44(1),157-170,1991.

[0007] 非专利文献3:Huet C.,et al.,Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival,proliferation and steroidogenesis:relationships between cell shape and function,J Endocrinol.,169(2),347-360,2001.

[0008] 非专利文献4:Kumar G.,Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape,Biomaterials.,33(16),4022-4030,2012.

### 发明内容

[0009] 为了使细胞培养工业化,需要消除这样的操作者的手法的差异。为此,需要细胞培养的机械自动化。本发明的目的在于提供适合于机械自动化的含有细胞细胞外基质的制造方法。

[0010] 本发明包括以下的实施方式。

[0011] [1]一种含有细胞细胞外基质的制造方法,包括:在具有前端开口部的移液管的内部,准备在细胞外基质前体含有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;排出上述细胞外基质

溶液,在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴;使上述移液管的前端开口部接近细胞培养容器的培养面,按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式将上述液滴载置于上述培养面上;使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离,将上述液滴与上述移液管的前端开口部分离;以及使上述细胞外基质溶液凝胶化,形成含有细胞细胞外基质。

[0012] [2]根据[1]所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述培养面的25℃时的与水的接触角为40°~120°。

[0013] [3]根据[1]或者[2]所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,在形成上述含有细胞细胞外基质时,上述培养面的温度为20℃~60℃。

[0014] [4]根据[1]~[3]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述细胞外基质溶液的温度为0℃~10℃。

[0015] [5]根据[1]~[4]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述移液管的前端开口部的开口面积为0.05mm<sup>2</sup>~0.4mm<sup>2</sup>。

[0016] [6]根据[1]~[5]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述液滴的水平方向的长度的最大值相对于铅垂方向的长度的最大值之比(水平方向的长度的最大值/铅垂方向的长度的最大值)为0.5~5。

[0017] [7]根据[1]~[6]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述液滴的铅垂方向的长度的最大值为100μm~5000μm。

[0018] [8]根据[1]~[7]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,上述细胞培养容器为孔板。

[0019] [9]根据[1]~[8]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法,在准备上述细胞外基质溶液时,在维持上述移液管的前端开口部在上述细胞外基质溶液的液面之下的状态的同时,将上述细胞外基质溶液吸引到上述移液管的内部。

[0020] [10]一种细胞培养方法,具有:使培养基与通过[1]~[9]中的任意一个所记载的含有细胞细胞外基质的制造方法形成的含有细胞细胞外基质接触并培养细胞。

[0021] [11]一种含有细胞细胞外基质制造装置,具备:收容槽,收容在细胞外基质前体含有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及工作台,保持细胞培养容器。

[0022] [12]一种含有细胞细胞外基质制造装置控制程序,通过含有细胞细胞外基质制造装置在细胞培养容器的培养面形成含有细胞细胞外基质,上述含有细胞细胞外基质制造装置具备:收容槽,收容在细胞外基质前体含有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及工作台,保持细胞培养容器,上述含有细胞细胞外基质制造装置控制程序使在上述收容槽收容有悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液、且在上述喷嘴安装有具有前端开口部的移液管、且在上述工作台载置有细胞培养容器的上述含有细胞细胞外基质制造装置进行以下动作:使上述控制部控制上述移送部,来使安装于上述喷嘴的上述移液管的前端移动到收容于上述收容槽的上述细胞外基质溶液的液面之下;使上述控制部控制上述泵,来使上述

细胞外基质溶液吸引到上述移液管的内部;使上述控制部控制上述移送部,来使吸引有上述细胞外基质溶液的上述移液管移动到上述细胞培养容器的上部;使上述控制部控制上述泵,来使上述移液管的内部的上述细胞外基质溶液排出,并在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴;使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部接近上述细胞培养容器的培养面,并按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式使上述液滴载置于上述培养面上;以及使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离,使上述液滴与上述移液管的前端开口部分离,并且之后使上述细胞外基质溶液凝胶化,来形成含有细胞细胞外基质。

[0023] 根据本实施方式,能够提供适合于机械自动化的含有细胞细胞外基质的制造方法。

### 附图说明

[0024] 图1是说明含有细胞细胞外基质制造装置的一个例子的俯视图。

[0025] 图2的(a)以及图2的(b)是说明移液管架的一个例子的侧视图。

[0026] 图3是表示控制部的构成的框图。

[0027] 图4的(a)是表示通过操作者的手法,将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。图4的(b)是表示使用含有细胞细胞外基质制造装置将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。

[0028] 图5的(a)是表示在移液管的前端开口部形成了细胞外基质溶液的液滴的状态的照片。图5的(b)是表示在移液管的前端开口部形成了细胞外基质溶液的液滴的状态的示意图。

[0029] 图6的(a)是表示通过操作者的手法,将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。图6的(b)是表示使用含有细胞细胞外基质制造装置将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。图6的(c)是表示虽然使用含有细胞细胞外基质制造装置,但在移液管的前端开口部不形成含有细胞细胞外基质溶液的液滴,而在六孔板的孔附近排出含有细胞细胞外基质溶液,将液滴载置于孔中的结果的照片。

### 具体实施方式

[0030] 以下,对本发明的实施方式进行详细说明,但本发明并不限于以下的实施方式。另外,在附图中,对相同或者相当的部分附加相同或者对应的附图标记,并省略重复的说明。此外,各图中的尺寸比有为了说明而进行夸张的部分,并不一定与实际的尺寸比一致。说明书中的数值表示标准状态下的数值。在本说明书中,标准状态是指温度大约为25℃,大气压在绝对压力下约为101kPa的状态。

[0031] [含有细胞细胞外基质的制造方法]

[0032] 一实施方式的含有细胞细胞外基质的制造方法包括:在具有前端开口部的移液管的内部,准备在细胞外基质前体含有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;排出上述细胞外基质溶液,在上述移液管的前端开口部形成上述细胞外基质溶液的液滴;使上述移液管的前端开口部接近细胞培养容器的培养面,按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式将上述液滴载置于上述培养面上;使上述移液管的前端开口部从上述培养面远

离,将上述液滴与上述移液管的前端开口部分离;以及使上述细胞外基质溶液凝胶化,形成含有细胞细胞外基质。

[0033] 本实施方式的制造方法适合于自动化,其结果是,能够制造多个尺寸以及形状均一的含有细胞细胞外基质。优选使用后述的本实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置实施本实施方式的制造方法。通过使用本实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置,与通过操作者的手动作业制造含有细胞细胞外基质的情况相比,容易更快且更高精度地制造多个尺寸以及形状均一的含有细胞细胞外基质。

[0034] 细胞外基质是指在细胞培养中,成为细胞支架的凝胶。在本说明书中,细胞外基质溶液是指在细胞外基质前体包含细胞或者细胞团的溶液。细胞外基质溶液优选为在细胞外基质前体中悬浮有细胞或者细胞团的溶液。细胞外基质溶液为溶胶。作为细胞外基质前体的出售品,例如能够列举基底胶(Matrigel)(康宁公司产品名)、人层粘连蛋白(SIGMA公司产品名)、以及产品名“Mebiol Gel”(Mebiol株式会社制)。

[0035] 细胞外基质前体是指包含通过光、热等的刺激而交联的成分(以下,称为“细胞外基质成分”)、和液体介质的溶胶。作为液体介质,例如能够列举生理盐水、缓冲液。细胞外基质前体凝胶化后的物质为细胞外基质。

[0036] 作为细胞外基质成分,例如能够列举基底膜所包含的成分、在细胞间隙存在的糖蛋白。作为基底膜所包含的成分,例如能够列举IV型胶原蛋白、层粘连蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、以及巢蛋白。作为在细胞间隙存在的糖蛋白,能够列举胶原蛋白、层粘连蛋白、巢蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白原、以及肝素硫酸盐等。

[0037] 作为细胞外基质成分,也能够列举人工的水溶性高分子。作为人工的水溶性高分子,例如能够列举羧甲基纤维素、含有偶氮苯基和环糊精基的聚合物、以及海藻酸钙。

[0038] 细胞团表示2~100个范围内的细胞进行细胞粘附后的团。细胞团所包含的细胞既可以来自单一细胞类型,也可以来自多种细胞类型。

[0039] 以下,对本实施方式的制造方法的详细进行说明。在具有前端开口部的移液管的内部准备、优选吸引在细胞外基质前体含有细胞或者细胞凝集块(以下,也称为“细胞等”)的细胞外基质溶液。另外,维持为细胞外基质溶液不凝胶化的条件。因此,吸引到移液管的内部的细胞外基质溶液的温度通常为0℃~10℃。在本说明书中,移液管表示一方的前端侧的内径与另一方的内径相比较小的管。

[0040] 优选在吸引细胞外基质溶液时,在维持移液管的前端开口部在细胞外基质溶液的液面之下的状态的同时,将细胞外基质溶液吸引到移液管的内部。通过像这样吸引,能够防止气泡混入移液管内。

[0041] 若气泡混入移液管内,则形成由于气泡而缺损的含有细胞细胞外基质。通过在维持移液管的前端开口部在细胞外基质溶液的液面之下的状态的同时,将细胞外基质溶液吸引到移液管的内部,能够抑制气泡混入移液管内。其结果是,能够制造没有缺损的含有细胞细胞外基质。

[0042] 接着,从移液管排出细胞外基质溶液,在移液管的前端开口部形成细胞外基质溶液的液滴。通过细胞外基质溶液的表面张力形成液滴。图5的(a)是表示在移液管141的前端开口部141a形成了细胞外基质溶液的液滴500的状态的照片。图5的(b)是表示在移液管141的前端开口部141a形成了细胞外基质溶液的液滴500的状态的示意图。如图5的(a)以及(b)

所示,液滴500保持于前端开口部141a。

[0043] 在手法中,通常,为了在细胞培养容器的培养面的规定的位置形成细胞外基质,而在排出吸引到移液管内的细胞外基质溶液的同时,将排出的细胞外基质溶液载置于细胞培养容器的培养面,来形成细胞外基质。在该方法中,难以将得到的细胞外基质的形状形成圆顶状。发明者们推测其原因是因为细胞外基质溶液的表面张力不能承受排出的力量,而细胞外基质溶液在培养面上扩散。

[0044] 与此相对,发明者们发现了通过一次在移液管的前端开口部形成细胞外基质溶液的液滴,接着将形成的液滴载置于细胞培养容器的培养面,能够制造圆顶状的含有细胞细胞外基质。

[0045] 优选液滴的铅垂方向的长度为 $10\mu\text{m}\sim 5000\mu\text{m}$ 。另外,液滴的水平方向的长度的最大值相对于铅垂方向的长度的最大值之比(水平方向的长度的最大值/铅垂方向的长度的最大值)为 $0.5\sim 5$ ,优选为 $0.6\sim 2$ 。若液滴为上述的尺寸以及形状,则能够得到优选的尺寸以及形状的含有细胞细胞外基质。移液管的前端开口部的开口面积优选为 $0.05\text{mm}^2\sim 0.4\text{mm}^2$ 。若移液管的前端开口部的开口面积为上述的范围,则能够形成上述的尺寸以及形状的液滴。

[0046] 接着,使移液管的前端开口部接近细胞培养容器的培养面,按照使移液管的前端开口部不与培养面接触的方式将液滴载置于培养面上。接着,使移液管的前端开口部从培养面远离,将液滴与移液管的前端开口部分离。

[0047] 优选细胞培养容器的培养面的 $25^\circ\text{C}$ 时的与水的接触角为 $40^\circ\sim 120^\circ$ 。若在上述范围内,则细胞外基质溶液在培养面不扩散,容易载置为圆顶状。

[0048] 接着,使细胞外基质溶液凝胶化,形成含有细胞细胞外基质。通常利用加热或者照射光等操作进行细胞外基质溶液的凝胶化。

[0049] 在将液滴载置于细胞培养容器的培养面时,细胞培养容器的培养面的温度优选为 $20^\circ\text{C}\sim 60^\circ\text{C}$ ,更优选为 $20^\circ\text{C}\sim 40^\circ\text{C}$ 。若在上述范围内,则在细胞外基质溶液载置后,能够在细胞外基质溶液所含有的细胞等沉降之前迅速地使细胞外基质溶液凝胶化,其结果是,能够得到细胞等在细胞外基质的内部均一地分散的含有细胞细胞外基质。

[0050] 含有细胞细胞外基质的形状优选为将培养容器的培养面作为底面的圆顶状。圆顶状表示半球形状或者接近半球的形状。另外,含有细胞细胞外基质的体积通常为 $1\mu\text{L}\sim 30\mu\text{L}$ ,优选为 $5\mu\text{L}\sim 20\mu\text{L}$ 。在假定与含有细胞细胞外基质同体积的半球形状的情况下,该半球的直径通常为 $2\text{mm}\sim 6\text{mm}$ ,优选为 $2.5\text{mm}\sim 5\text{mm}$ 。

[0051] 通过使含有细胞细胞外基质的尺寸为上述的范围,能够充分地将氧或二氧化碳、来自培养基的营养成分供给至细胞外基质的内部,能够良好地进行细胞的增殖、分化。

[0052] 作为细胞培养容器,能够列举孔板。作为孔板,例如能够列举六孔板、十二孔板、二十四孔板、四十八孔板、九十六孔板等。在细胞培养容器为孔板的情况下,孔的底面成为培养面。作为孔的底面的形状,能够列举U字形状、V字形状、平面形状。其中也优选为平面形状。另外,细胞培养器的培养面能够利用2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱聚合物等实施细胞非粘附性处理或者压纹加工。

[0053] 在本实施方式的制造方法之后,能够使培养基与形成的含有细胞细胞外基质接触。该情况下,本实施方式为细胞培养方法。能够根据目的适当地选择培养基。在细胞培养



容器为孔板的情况下,通过将培养基放入孔内,能够使培养基与含有细胞细胞外基质接触。

[0054] 本实施方式的制造方法能够在将细胞外基质溶液吸引到具有前端开口部的移液管的内部之前,使细胞等悬浮。能够通过反复进行将包含细胞等的细胞外基质溶液吸引到具有前端开口部的移液管的内部并排出的操作,来进行细胞等的悬浮。

[0055] 此时,优选将移液管的前端开口部保持于收容有细胞外基质溶液的容器的底部。而且,根据抑制向移液管内的空气的混入的观点,优选在维持移液管的前端开口部在细胞外基质溶液的液面之下的状态的同时,将细胞外基质溶液吸引到移液管的内部并排出。

[0056] 在使细胞悬浮时使用的细胞悬浮用移液管、和在形成细胞外基质溶液的液滴并载置于细胞培养容器的培养面上时使用的液滴形成用移液管,既可以相同,也可以不同。

[0057] [含有细胞细胞外基质制造装置]

[0058] 一实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置具备:收容槽,收容悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴内给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及工作台,保持细胞培养容器。

[0059] 图1是本实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置100的俯视图。含有细胞细胞外基质制造装置100具备:收容槽110,收容悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;移液管控制部120,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴121、对喷嘴121给予正压或者负压的泵122、移送喷嘴121的移送部、以及控制喷嘴121、泵122以及移送部的动作的控制部126;以及工作台130,保持细胞培养容器131。移送部具备上下移送部123、前后移送部124以及左右移送部125。

[0060] 在以后的说明中,将图1中的前后方向称为“X轴”,将左右方向称为“Y轴”,将与X轴以及Y轴正交的含有细胞细胞外基质制造装置100的高度方向称为“Z轴”。

[0061] 作为收容槽110的具体的例子,能够列举收容于收容槽架111的塑料管。在细胞外基质溶液为对温度进行响应而凝胶化的溶液的情况下,收容槽架111具备温度调节功能,从而能够将收容于收容槽的细胞外基质溶液的温度维持为不凝胶化的温度、例如0℃~10℃。

[0062] 在图1的例子中,存在多个的收容槽110中的一个收容有悬浮有细胞等的细胞外基质溶液110a。如图1所示,移液管控制部120具备喷嘴121、泵122、上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125、以及控制部126。如图1所示,含有细胞细胞外基质制造装置100还能够具备废弃使用完毕的移液管的垃圾部150。

[0063] 喷嘴121能够拆装具有前端开口部的移液管141或者142。在图1的例子中,移液管架140收容有移液管141以及142。在图1的例子中,移液管141是细胞悬浮用移液管,移液管142是液滴形成用移液管。

[0064] 图2的(a)、(b)是移液管架140的侧视图。如图2的(a)、(b)所示,若移液管控制部120的喷嘴121从移液管141的正上方开始下降,则在喷嘴121的下端安装移液管141。然后,喷嘴121上升,从而从移液管架140拔出移液管141。喷嘴121具有孔121a,以使能够从喷嘴121的下端吸引以及排出液体。

[0065] 喷嘴121具备马达,能够构成为基于来自控制部126的信号,使安装于喷嘴121的移液管141或者142脱离。

[0066] 泵122经由管122a与喷嘴121的孔121a连接。泵122基于来自控制部126的信号,对

喷嘴121的孔121a给予正压以及负压,经由安装于喷嘴121的下端的移液管141或者142吸引以及排出细胞外基质溶液110a。

[0067] 上下移送部123具备沿着Z轴延伸的导轨123a和马达。上下移送部123基于来自控制部126的信号,驱动马达,沿着导轨123a在Z轴方向上移送喷嘴121。

[0068] 前后移送部124具备沿着X轴延伸的导轨124a和马达。前后移送部124基于来自控制部126的信号,驱动马达,沿着导轨124a在X轴方向上移送上下移送部123。

[0069] 左右移送部125具备沿着Y轴延伸的导轨125a和马达。左右移送部125基于来自控制部126的信号,驱动马达,沿着导轨125a在Y轴方向上移送前后移送部124。

[0070] 这样一来,喷嘴121通过上下移送部123、前后移送部124以及左右移送部125,能够在含有细胞细胞外基质制造装置100的内部沿着XYZ轴移动。

[0071] 图3是表示控制部126的构成的框图。如图3所示,控制部126是具备CPU(Central Processing Unit:中央处理器)310、存储器320、存储部330、以及输入输出控制部340的能够执行程序装置(计算机)。通过执行规定的程序,作为多个功能块发挥作用。此外,能够通过专用的逻辑电路等构成控制部126的至少一部分的功能。

[0072] 存储部330是存储上述的程序、需要的数据的非易失性的记录介质。存储部330例如由ROM、硬盘等构成。记录于存储部330的程序被读入到存储器320上,并由CPU310执行。

[0073] 输入输出控制部340基于CPU310的指示,生成针对喷嘴121、泵122、上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125的控制信号等。

[0074] 收容收容槽110的收容槽架111能够具备加热器以及冷却器等的温度调节功能。收容槽架111能够还具备温度传感器。另外,保持细胞培养容器131的工作台130能够具备加热器以及冷却器等的温度调节功能。工作台130能够还具备温度传感器。

[0075] 而且,输入输出控制部340能够构成为接受来自上述各温度传感器的数据。并且,输入输出控制部340能够构成为基于CPU310的指示,生成针对加热器以及冷却器的控制信号。由此,能够将收容于收容槽110的含有细胞细胞外基质溶液的温度、保持于工作台130的细胞培养容器131的培养面的温度控制为规定的温度。

[0076] [含有细胞细胞外基质制造装置控制程序]

[0077] 本实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置控制程序通过含有细胞细胞外基质制造装置在细胞培养容器的培养面形成含有细胞细胞外基质,上述含有细胞细胞外基质制造装置具备:收容槽,收容悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液;移液管控制部,具备供具有前端开口部的移液管安装的喷嘴、对上述喷嘴给予正压或者负压的泵、移送上述喷嘴的移送部、以及控制上述喷嘴、上述泵以及上述移送部的动作的控制部;以及工作台,保持细胞培养容器,上述含有细胞细胞外基质制造装置控制程序使在上述收容槽收容有悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液、且在上述喷嘴安装有具有前端开口部的移液管、且在上述工作台载置有细胞培养容器的上述含有细胞细胞外基质制造装置进行以下动作:使上述控制部控制上述移送部,来使安装于上述喷嘴的上述移液管的前端移动到收容于上述收容槽的上述细胞外基质溶液的液面之下;使上述控制部控制上述泵,来使上述细胞外基质溶液吸引到上述移液管的内部;使上述控制部控制上述移送部,来使吸引有上述细胞外基质溶液的上述移液管移动到上述细胞培养容器的上部;使上述控制部控制上述泵,来使上述移液管的内部的上述细胞外基质溶液排出,并在上述移液管的前端开口部形成上述细

胞外基质溶液的液滴;使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部接近上述细胞培养容器的培养面,并按照使上述移液管的前端开口部不与上述培养面接触的方式使上述液滴载置于上述培养面上;以及使上述控制部控制上述移送部,来使上述移液管的前端开口部从上述培养面远离,使上述液滴与上述移液管的前端开口部分离,并且之后使上述细胞外基质溶液凝胶化,来形成含有细胞细胞外基质。

[0078] 通过本实施方式的程序,能够使上述的含有细胞细胞外基质制造装置100制造含有细胞细胞外基质。以下,对通过本实施方式的程序,控制含有细胞细胞外基质制造装置100来制造含有细胞细胞外基质的各工序进行说明。

[0079] 在上述的含有细胞细胞外基质制造装置100的收容槽110收容悬浮有细胞或者细胞团的细胞外基质溶液。另外,在上述工作台130载置细胞培养容器131。也可以通过操作者的手动作业进行这些操作。

[0080] 接着,在喷嘴121安装移液管141。向喷嘴121的移液管141的安装既可以通过操作者的手动作业进行,也可以使含有细胞细胞外基质制造装置的控制部126进行。该情况下,首先,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,使移液管控制部120的喷嘴121移动到移液管架140。接着,使喷嘴121从移液管141的正上方开始下降。其结果是,将移液管141安装于喷嘴121的下端。接着,使喷嘴121上升,从移液管架140拔出移液管141。

[0081] 能够根据需要,使收容于收容槽110的上述细胞外基质溶液悬浮。控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,使安装于喷嘴121的移液管141的前端移动至收容槽110的上部。

[0082] 使安装于喷嘴121的移液管141的前端下降,并移动到收容于收容槽110的上述细胞外基质溶液的液面之下。控制部126控制泵122,反复进行多次将细胞外基质溶液110a吸引到移液管141的内部并排出。通过该操作,使收容于收容槽110的上述细胞外基质溶液中的细胞或者细胞团悬浮。

[0083] 接着,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,使安装于喷嘴121的移液管141移动至垃圾部150的上部。

[0084] 控制部126控制喷嘴121,使安装于喷嘴121的移液管141脱离,将使用完毕的移液管141收容到垃圾部150。

[0085] 接着,使细胞外基质溶液110a吸引到移液管142的内部。首先,将移液管142安装于喷嘴121。这里,向喷嘴121的移液管142的安装既可以通过操作者的手动作业进行,也可以使含有细胞细胞外基质制造装置的控制部126进行。该情况下,首先,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,将移液管控制部120的喷嘴121移动至移液管架140。接着,使喷嘴121从移液管142的正上方开始下降。其结果是,将移液管142安装于喷嘴121的下端。接着,使喷嘴121上升,从移液管架140拔出移液管142。

[0086] 控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,将移液管控制部120的喷嘴121移动到收容槽110的上部。

[0087] 使安装于喷嘴121的移液管142的前端下降,并移动到收容于收容槽110的上述细胞外基质溶液的液面之下。接着,控制部126控制泵122,将细胞外基质溶液110a吸引到移液管142的内部。

[0088] 此时,在细胞培养容器131被盖覆盖的情况下,取下盖。既可以通过操作者的手动作业取下盖,也可以使含有细胞细胞外基质制造装置的控制部126取下盖。在使控制部126取下盖的情况下,例如能够构成为在喷嘴121的旁边配置把持盖的臂,使上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125控制该臂的位置,使控制部126控制基于该臂的盖的把持以及解放。

[0089] 接着,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,将安装于喷嘴121并吸引有细胞外基质溶液110a的移液管142移动到细胞培养容器131的上部。

[0090] 接着,控制部126控制泵122,排出移液管142的内部的细胞外基质溶液110a,在移液管142的前端开口部形成细胞外基质溶液110a的液滴。

[0091] 接着,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,使移液管142的前端开口部接近细胞培养容器131的培养面,按照使移液管142的前端开口部不与培养面接触的方式将液滴载置于培养面上。

[0092] 接着,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,使移液管142的前端开口部从培养面远离,将液滴与移液管142的前端开口部分离。通过根据使用的细胞外基质溶液110a的特性,加热或者照射光等,从而使细胞外基质溶液110a凝胶化,形成含有细胞细胞外基质。

[0093] 通过以需要的次数反复进行上述的移动移液管142、形成液滴、将液滴载置于培养面上、以及使液滴与移液管142的前端开口部分离,能够在细胞培养容器131的培养面上形成多个尺寸以及形状均一的含有细胞细胞外基质。

[0094] 接着,控制部126控制上下移送部123、前后移送部124、左右移送部125,将安装于喷嘴121的移液管142移动到垃圾部150的上部。

[0095] 控制部126控制喷嘴121,使安装于喷嘴121的移液管142脱离,将使用完毕的移液管142收容到垃圾部150。

[0096] 接着,根据需要,反复进行上述的将移液管141安装于喷嘴121、使收容于收容槽110的上述细胞外基质溶液悬浮、将移液管141收容于垃圾部150、在喷嘴121安装移液管142、将细胞外基质溶液110a吸引到移液管142的内部、移动移液管142、形成液滴、将液滴载置于培养面上、以及将液滴与移液管142的前端开口部分离,来制造需要数量的含有细胞细胞外基质。

[0097] 也可以通过将上述的实施方式中的程序记录于计算机能够读取的记录介质,使计算机系统读入并执行记录于该记录介质的程序来实现。此外,这里所说的“计算机系统”包含OS或者周边设备等硬件。另外,“计算机能够读取的记录介质”是指软盘、光磁盘、ROM、CD-ROM等便携式介质、内置于计算机系统的硬盘等存储装置。并且“计算机能够读取的记录介质”也可以也包含如经由因特网等网络、电话线路等通信线路发送程序的情况下的通信线那样,在短时间的期间动态地保持程序的记录介质、如该情况下的成为服务器或者客户端的计算机系统内部的易失性存储器那样,保持程序恒定时间的记录介质。另外,上述程序也可以是用于实现上述的功能的一部分的程序,并且也可以是能够通过已经记录于计算机系统的程序的组合来实现上述的功能的程序,也可以是使用FPGA(Field Programmable Gate Array:现场可编程门阵列)等可编程逻辑器件实现的程序。

[0098] 实施例

[0099] 以下,基于实施例对本实施方式进行更具体的说明,但本实施方式并不限定于这些实施例。

[0100] [实验例1]

[0101] 使用实施方式的含有细胞细胞外基质制造装置制造含有细胞细胞外基质。另外,通过操作者的手法制造含有细胞细胞外基质并进行比较。

[0102] 作为含有细胞细胞外基质制造装置,使用了对实验室自动化系统(产品名“Biomek i5”,贝克曼库尔特公司)进行编程后的装置。

[0103] 作为细胞外基质溶液,使用了以 $2 \times 10^5$ 个/mL的细胞密度悬浮有人iPS细胞来源肠道上皮细胞的基底胶(康宁社)。收容于收容槽的细胞外基质溶液的温度维持为6。

[0104] 作为细胞培养容器,使用六孔板(Greiner Bio-One公司)。该六孔板的培养面的 $25^\circ\text{C}$ 时的与水的接触角为 $53^\circ$ 。细胞培养容器的培养面的温度维持为 $37^\circ\text{C}$ 。

[0105] 作为液滴形成用移液管,使用AP96 P250吸头(贝克曼库尔特公司)。液滴形成用移液管的前端开口部的开口面积为 $0.28\text{mm}^2$ 。

[0106] 图4的(a)以及图6的(a)是表示通过操作者的手法,将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。图4的(b)以及图6的(b)是表示使用含有细胞细胞外基质制造装置将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果的照片。操作者的手法表示熟练者使用与细胞外基质制造装置相同的细胞培养容器以及相同的液滴形成用移液管,并以与细胞外基质制造装置相同的速度形成含有细胞细胞外基质的方法。

[0107] 载置于培养面的含有细胞细胞外基质溶液之后凝胶化,得到与含有细胞细胞外基质溶液的液滴同体积的含有细胞细胞外基质。

[0108] 如图4的(a)或者图6的(a)所示,通过操作者的手法将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果是能够以大约31秒/孔来载置细胞外基质溶液的液滴。另外,每一孔的液滴的数量大约为30个,但多个凝胶连结。另外,在大小中确认出明显的偏差。

[0109] 通过操作者的手法在移液管的前端开口部形成的液滴的水平方向的长度的最大值相对于铅垂方向的长度的最大值之比(水平方向的长度的最大值/铅垂方向的长度的最大值)为2.45。另外,液滴的铅垂方向的长度的最大值为1.29mm。另外,在假定与每一个含有细胞细胞外基质溶液的液滴同体积的半球形状的情况下,该半球的直径为2.85mm。

[0110] 另一方面,如图4的(b)或者图6的(b)所示,使用含有细胞细胞外基质制造装置将含有细胞细胞外基质溶液的液滴载置于六孔板的孔中的结果是能够以大约25秒/孔来载置细胞外基质溶液的液滴。另外,每一孔的液滴的数量为27个,且大小均一。

[0111] 通过含有细胞细胞外基质制造装置在移液管的前端开口部形成的液滴的水平方向的长度的最大值相对于铅垂方向的长度的最大值之比(水平方向的长度的最大值/铅垂方向的长度的最大值)为2。另外,液滴的铅垂方向的长度的最大值为1.44mm。另外,在假定与每一个含有细胞细胞外基质溶液的液滴同体积的半球形状的情况下,该半球的直径为3.05mm。

[0112] 图6的(c)是表示虽然使用含有细胞细胞外基质制造装置,但在移液管的前端开口部不形成含有细胞细胞外基质溶液的液滴,而在六孔板的孔附近排出含有细胞细胞外基质溶液,将液滴载置于孔中的结果的照片。能够以大约25秒/孔来载置细胞外基质溶液,另外,每一孔的液滴的数量为27个,但与相邻的液滴结合的液滴有四个。

[0113] 在下述表1中示出在图6的(a)~图6的(c)中,载置于孔中的液滴的数量(在表1中,表示为“孔的液滴的数量”)、与相邻的液滴结合的液滴的数量(在表1中,表示为“结合液滴的数量”)、将液滴视为半球状的情况下的液滴的底面的直径的平均值(在表1中,表示为“液滴的平均直径”)及其标准偏差。

[0114] [实验例2]

[0115] 将培养基放入在图6的(a)~图6的(c)示出照片的孔中,并以37℃培养七天,得到培养细胞。作为培养基,使用在基础培养基(产品名“Advanced DMEM/F12”,Thermo Fisher SCIENTIFIC公司制)添加了Wnt3a等生态位(niche)因子的培养基。之后,测量所得到的培养细胞的平均尺寸。在下述表1中示出测量出的培养细胞的平均尺寸。

[0116] [表1]

项目	图6的(a)	图6的(b)	图6的(c)
孔的液滴的数量(个)	33	27	27
结合液滴的数量(个)	8	0	4
液滴的平均直径(mm)	3.4	4.1	4.3
标准偏差	0.4	0.1	0.2
培养细胞的平均尺寸( $\mu\text{m}^3$ )	257,988	644,844	244,844

[0118] 产业上的可利用性

[0119] 根据本实施方式,能够通过仅改变现有的移液装置的程序,来制造多个尺寸、形状均一的细胞外基质。由此,根据本实施方式,能够提供适合于机械自动化的含有细胞细胞外基质的制造方法。

[0120] 附图标记说明:100…含有细胞细胞外基质制造装置,110…收容槽,110a…细胞外基质溶液,111…收容槽架,120…移液管控制部,121…喷嘴,121a…孔,122…泵,122a…管,123…上下移送部,124…前后移送部,125…左右移送部,123a、124a、125a…导轨,126…控制部,130…工作台,131…细胞培养容器,140…移液管架,141、142…移液管,141a…移液管的前端开口部,150…垃圾部,320…存储器,330…存储部,340…输入输出控制部,500…液滴。

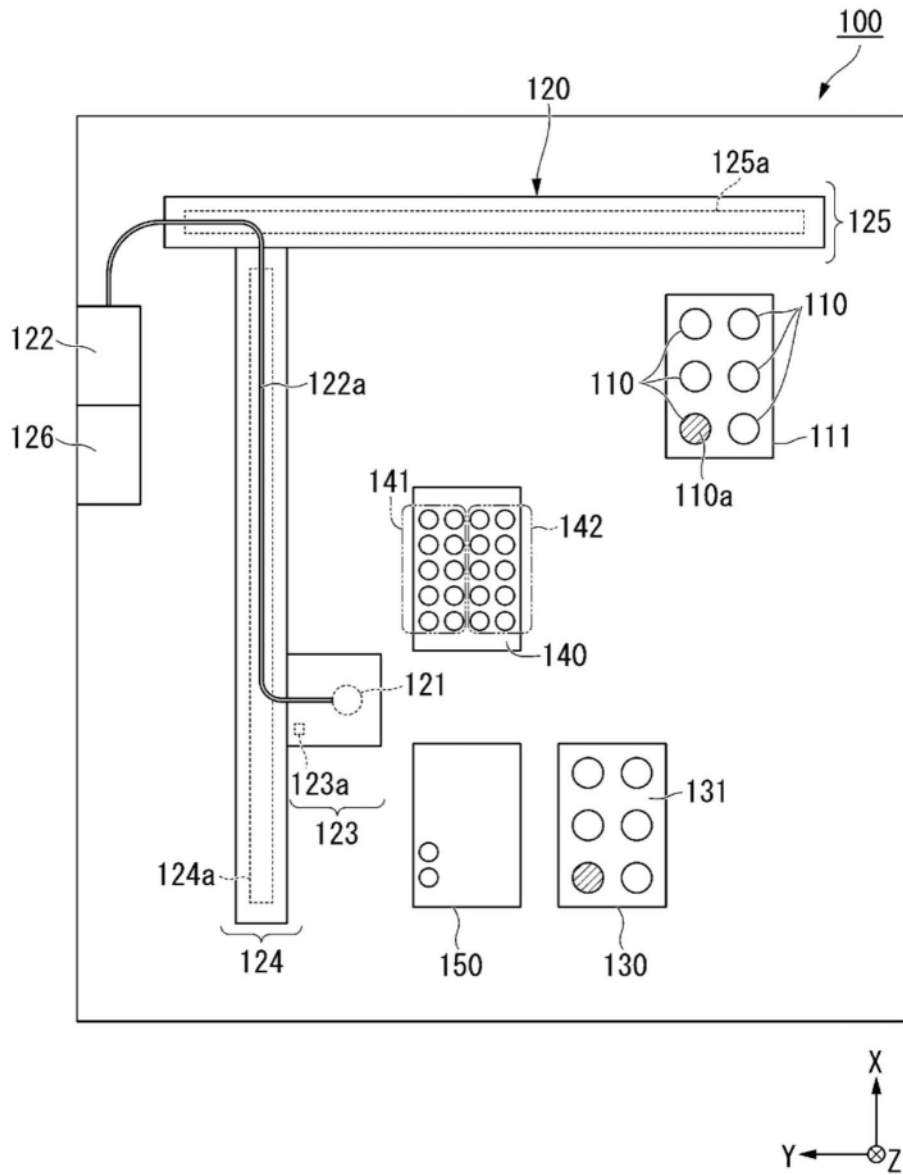


图1

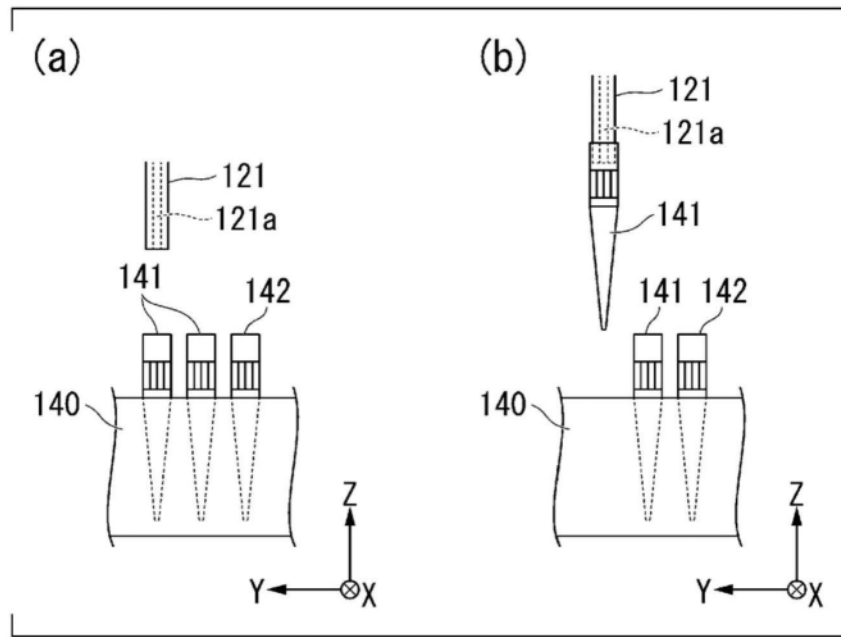


图2

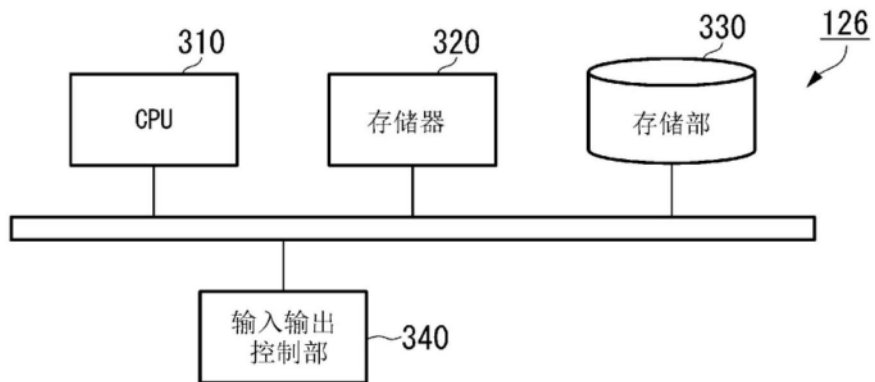


图3



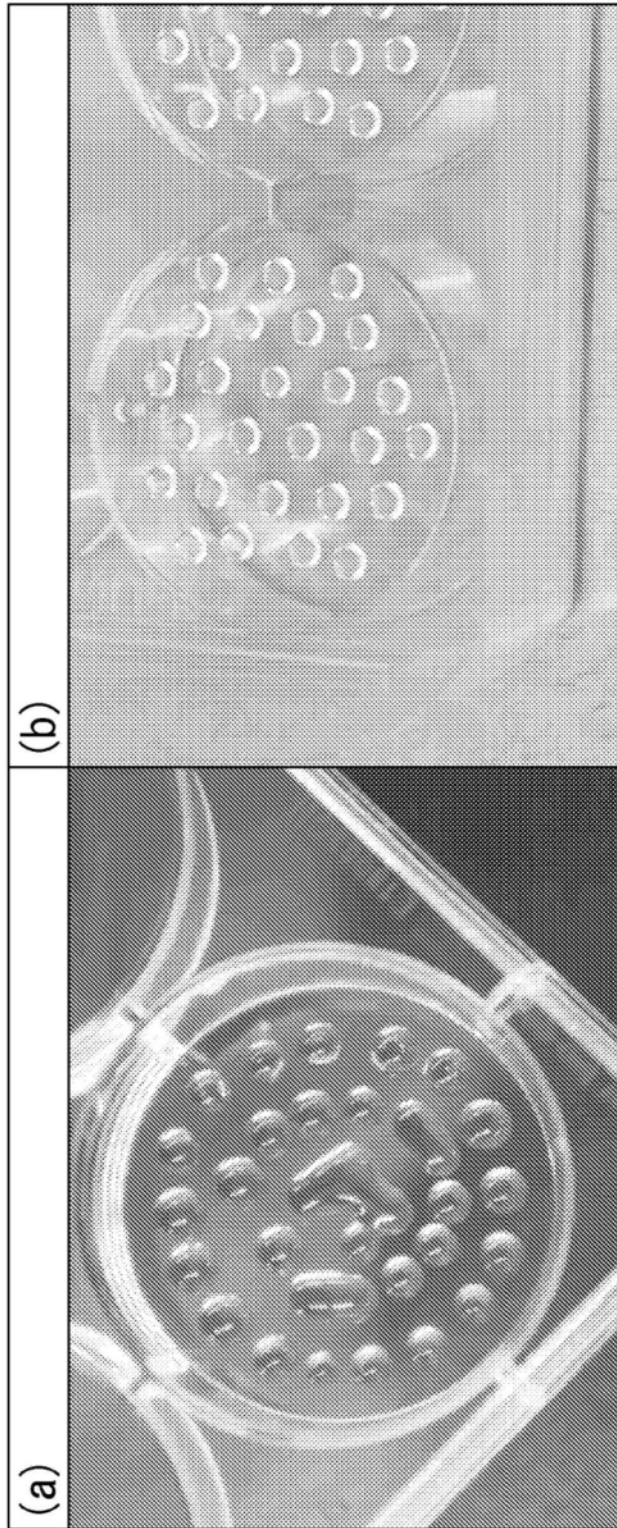


图4

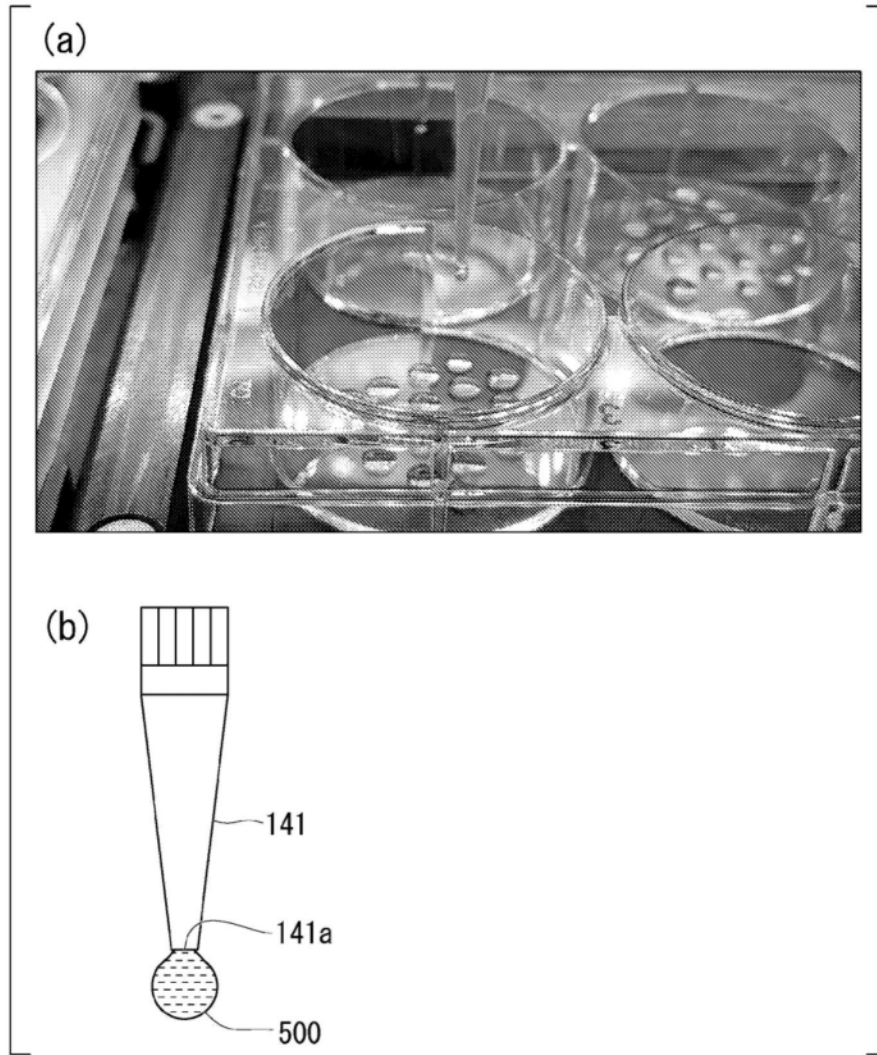


图5

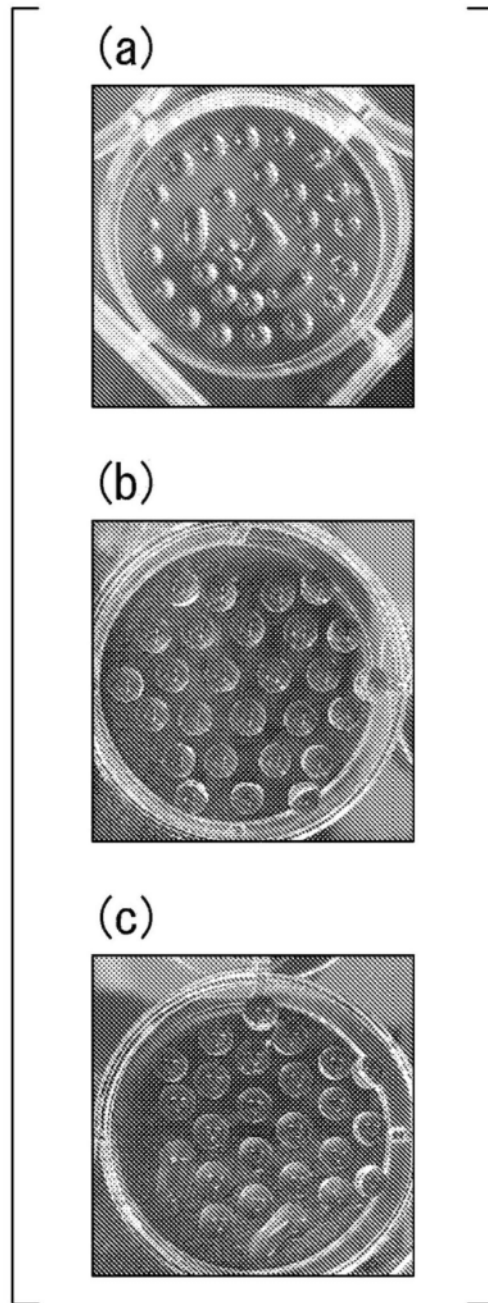


图6