

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-155471
(P2014-155471A)

(43) 公開日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 J	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2013-28809 (P2013-28809)
(22) 出願日 平成25年2月18日 (2013.2.18)

(71) 出願人 504137912
国立大学法人 東京大学
東京都文京区本郷七丁目3番1号
(74) 代理人 110000154
特許業務法人はるか国際特許事務所
(72) 発明者 大場 隆之
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
Fターム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC02 DA08
4B065 AA93X BC03 BC21 CA44

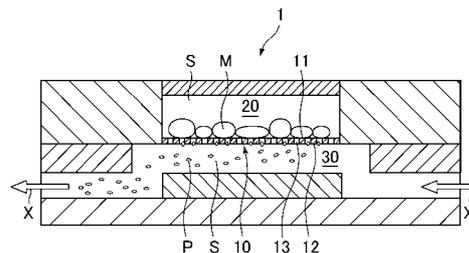
(54) 【発明の名称】 血小板産生流路装置及び血小板産生方法

(57) 【要約】

【課題】体外において巨核球から血小板を効果的に大量産生する血小板産生流路装置及び血小板産生方法を提供する。

【解決手段】本発明に係る血小板産生流路装置は、制御された形状及び配置で複数の微小孔(13)が形成され、その一方側の表面(11)に巨核球(M)が配置される多孔薄膜(10)と、前記多孔薄膜の前記一方側に設けられ、前記巨核球が培養される培養室(20)と、前記多孔薄膜の他方側に設けられ、前記培養室内で前記巨核球が培養される間、培養液(S)が流れる微小流路(30)と、を備える。

【選択図】 図1



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
 制御された形状及び配置で複数の微小孔が形成され、その一方側の表面に巨核球が配置される多孔薄膜と、
 前記多孔薄膜の前記一方側に設けられ、前記巨核球が培養される培養室と、
 前記多孔薄膜の他方側に設けられ、前記培養室内で前記巨核球が培養される間、培養液が流れる微小流路と、
 を備える
 ことを特徴とする血小板産生流路装置。 10
- 【請求項 2】
 前記複数の微小孔の各々の孔径は、 $2 \sim 15 \mu\text{m}$ である
 ことを特徴とする請求項 1 に記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 3】
 前記複数の微小孔の平均孔径は、 $2 \sim 15 \mu\text{m}$ である
 ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 4】
 前記複数の微小孔は、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で形成されている
 ことを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 5】
 前記多孔薄膜の厚さは、 $5 \sim 40 \mu\text{m}$ である 20
 ことを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 6】
 前記複数の微小孔の開口率は、 $4 \sim 45\%$ である
 ことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 7】
 前記微小流路は、前記培養液を $1 \sim 100 \text{ mm} / \text{秒}$ の流速で流すことができるよう形成されている
 ことを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 8】
 前記多孔薄膜近傍の温度を制御する温度制御部をさらに備える 30
 ことを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 9】
 前記温度制御部は、前記温度を $30 \sim 40$ に制御する
 ことを特徴とする請求項 8 に記載の血小板産生流路装置。
- 【請求項 10】
 制御された形状及び配置で複数の微小孔が形成された多孔薄膜と、前記多孔薄膜の一方側に設けられた培養室と、前記多孔薄膜の他方側に設けられた微小流路と、を備えた血小板産生流路装置を準備すること、
 前記培養室内において前記多孔薄膜の前記一方側の表面に巨核球を配置すること、
 前記微小流路に培養液を流しながら前記培養室内で前記巨核球を培養して血小板を産生 40
 すること、及び
 前記微小孔を介して前記微小流路内の前記培養液中に放出された前記血小板を回収すること、
 を含む
 ことを特徴とする血小板産生方法。
- 【請求項 11】
 前記微小流路に $1 \sim 100 \text{ mm} / \text{秒}$ の流速で前記培養液を流す
 ことを特徴とする請求項 10 に記載の血小板産生方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】 50

【0001】

本発明は、血小板産生流路装置及び血小板産生方法に関し、特に、体外において巨核球から血小板を大量産生するための流路装置に関する。

【背景技術】

【0002】

血小板は、体内において、骨髄中で造血前駆細胞が巨核球へと分化し、さらに当該巨核球の細胞質が断片化して、血液中に放出されることにより産生される。また、近年、iPS細胞(induced Pluripotent Stem cell)を用いて、体外において巨核球から血小板を産生することも報告されている。

【0003】

しかしながら、血小板は、凍結保存ができないため、当該血小板を含む血液を採取してから、あるいはiPS細胞に由来する巨核球を用いて産生されてから、数日程度しか保存できない。一方、造血前駆細胞は、凍結保存が可能である。

【0004】

そこで、特許文献1では、不織布等の支持多孔膜と有機高分子の多孔薄膜とを積層して作製された複合膜を培養液中に浸漬し、当該多孔薄膜で仕切られた2つの領域のうち、当該支持多孔膜側の領域に血小板前駆細胞を配置し、当該多孔薄膜側の領域でスターラーを用いて培養液の回転流を生じさせることにより当該多孔薄膜にシェアストレスを与え、当該血小板前駆細胞より血小板を産生する方法が提案されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2009-297023号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記特許文献1に記載の方法では、例えば、回転流によってシェアストレスを発生させるため、多孔薄膜の表面内で培養液の流速に分布が生じ、当該表面の全体に均一なシェアストレスを与えることができないといった問題や、不織布等の支持多孔膜に血小板前駆細胞を配置するため、当該血小板前駆細胞の配置を直接的に制御できないといった問題があった。

【0007】

本発明は、上記課題に鑑みて為されたものであり、体外において巨核球から血小板を効果的に大量産生する血小板産生流路装置及び血小板産生方法を提供することをその目的の一つとする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するための本発明の一実施形態に係る血小板産生流路装置は、制御された形状及び配置で複数の微小孔が形成され、その一方側の表面に巨核球が配置される多孔薄膜と、前記多孔薄膜の前記一方側に設けられ、前記巨核球が培養される培養室と、前記多孔薄膜の他方側に設けられ、前記培養室内で前記巨核球が培養される間、培養液が流れる微小流路と、を備えることを特徴とする。本発明によれば、体外において巨核球から血小板を効果的に大量産生する血小板産生流路装置を提供することができる。

【0009】

また、前記複数の微小孔の各々の孔径は、2~15 μm であることとしてもよい。また、前記複数の微小孔の平均孔径は、2~15 μm であることとしてもよい。また、前記複数の微小孔は、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で形成されていることとしてもよい。また、前記多孔薄膜の厚さは、5~40 μm であることとしてもよい。また、前記複数の微小孔の開口率は、4~45%であることとしてもよい。また、前記微小流路は、前記培養液を1~100mm/秒の流速で流すことができるよう形成されていることとしてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

また、前記血小板産生流路装置は、前記多孔薄膜近傍の温度を制御する温度制御部をさらに備えることとしてもよい。この場合、前記温度制御部は、前記温度を30～40に制御することとしてもよい。

【 0 0 1 1 】

上記課題を解決するための本発明の一実施形態に係る血小板産生方法は、制御された形状及び配置で複数の微小孔が形成された多孔薄膜と、前記多孔薄膜の一方側に設けられた培養室と、前記多孔薄膜の他方側に設けられた微小流路と、を備えた血小板産生流路装置を準備すること、前記培養室内において前記多孔薄膜の前記一方側の表面に巨核球を配置すること、前記微小流路に培養液を流しながら前記培養室内で前記巨核球を培養して血小板を産生すること、及び前記微小孔を介して前記微小流路内の前記培養液中に放出された前記血小板を回収すること、を含むことを特徴とする。本発明によれば、体外において巨核球から血小板を効果的に大量産生する血小板産生方法を提供することができる。

10

【 0 0 1 2 】

また、前記血小板産生方法において、前記微小流路に1～100mm/秒の流速で前記培養液を流すこととしてもよい。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、体外において巨核球から血小板を効果的に大量産生する血小板産生流路装置及び血小板産生方法を提供することができる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】本発明の一実施形態に係る血小板産生流路装置の一例の基本構造、及び当該装置を使用して巨核球から血小板を産生する様子を概略的に示す説明図である。

【 図 2 A 】本発明の一実施形態に係る実施例において使用された血小板産生流路装置の断面を示す説明図である。

【 図 2 B 】本発明の一実施形態に係る実施例において使用された血小板産生流路装置を平面視で示す説明図である。

【 図 3 】本発明の一実施形態に係る実施例において形成された多孔薄膜を平面視で示す説明図である。

30

【 図 4 A 】本発明の一実施形態に係る多孔薄膜における微小孔の配置パターンの一例を示す説明図である。

【 図 4 B 】本発明の一実施形態に係る多孔薄膜における微小孔の配置パターンの他の例を示す説明図である。

【 図 5 A 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程の一つを示す説明図である。

【 図 5 B 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程の他の一つを示す説明図である。

【 図 5 C 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

40

【 図 5 D 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【 図 5 E 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【 図 5 F 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【 図 5 G 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【 図 5 H 】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

50

【図 5 I】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【図 5 J】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【図 5 K】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【図 5 L】本発明の一実施形態に係る実施例における多孔薄膜の形成に含まれる複数の工程のさらに他の一つを示す説明図である。

【図 6】本発明の一実施形態に係る実施例において多孔薄膜に配置された巨核球を観察した結果の一例を示す説明図である。

【図 7】本発明の一実施形態に係る実施例において巨核球からの血小板の産生を評価した結果の一例を示す説明図である。

【図 8】本発明の一実施形態に係る血小板産生流路装置の他の例の基本構造を概略的に示す説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下に、本発明の一実施形態について説明する。なお、本発明は、本実施形態に限られるものではない。

【0016】

本実施形態に係る血小板産生流路装置（以下、「本装置」という。）は、体外において巨核球 M から血小板 P を産生する装置である。本実施形態に係る血小板産生方法（以下、「本方法」という。）は、体外において巨核球 M から血小板 P を産生する方法である。

【0017】

図 1 には、本装置 1 の一例の基本構造、及び本方法により本装置 1 を使用して巨核球 M から血小板 P を産生する様子を概略的に示す。図 1 に示すように、本装置 1 は、制御された形状及び配置で複数の微小孔 13 が形成され、その一方側の表面 11 に巨核球 M を配置する多孔薄膜 10 と、当該多孔薄膜 10 の当該一方側に設けられ、当該巨核球 M を培養する培養室 20 と、当該多孔薄膜 10 の他方側に設けられ、当該培養室 20 内で当該巨核球 M を培養して血小板 P を産生する間、培養液 S が流れる微小流路 30 と、を備える。

【0018】

また、本方法は、制御された形状及び配置で複数の微小孔 13 が形成された多孔薄膜 10 と、当該多孔薄膜 10 の一方側に設けられた培養室 20 と、当該多孔薄膜 10 の他方側に設けられた微小流路 30 と、を備えた血小板産生流路装置（本装置 1）を準備すること、当該培養室 20 内において当該多孔薄膜 10 の当該一方側の表面 11 に巨核球 M を配置すること、当該微小流路 30 に培養液 S を流しながら当該培養室 20 内で当該巨核球 M を培養して血小板 P を産生すること、及び当該微小孔 13 を介して当該微小流路 30 内の当該培養液 S 中に放出された当該血小板 P を回収すること、を含む。

【0019】

多孔薄膜 10 は、制御された形状及び配置で複数の微小孔 13 が形成され、本装置 1 において巨核球 M を培養する際に当該巨核球 M を配置する表面 11 を有するものであれば特に限られない。

【0020】

多孔薄膜 10 は、例えば、基板の微細加工により形成されることとしてもよい。微細加工は、例えば、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) の加工技術であり、より具体的には、例えば、フォトリソグラフィである。

【0021】

多孔薄膜 10 は、例えば、エッチング等の微細加工により、基板の一部を削って厚さを減じることにより形成されたものであることとしてもよい。この場合、本装置 1 は、微細加工により基板の一部を削って厚さを減じることにより形成された多孔薄膜 10 と、当該多孔薄膜 10 より厚く、当該多孔薄膜 10 を囲む当該基板の他の一部から構成された枠部

10

20

30

40

50

とを一体的に有する基板部を備えることとしてもよい（後述）。

【0022】

多孔薄膜10を構成する材料は、特に限られず、無機材料及び/又は有機材料を使用することができる。無機材料製の多孔薄膜10は、耐熱性に優れている点で好ましい。無機材料製の多孔薄膜10は、例えば、無機材料製の基板（例えば、シリコンウェハ）の微細加工により形成される。

【0023】

多孔薄膜10は、巨核球Mが配置される一方側の平坦な表面11と、他方側の平坦な表面12とを有することとしてもよい。また、一方側の表面11と他方側の表面12とは平行に形成されていることとしてもよい。

【0024】

多孔薄膜10の厚さは、当該多孔薄膜10が、その一方の表面11における巨核球Mの配置及び培養に耐える力学的強度を有し、且つ当該巨核球Mから産生された血小板Pの微小孔13を介した微小流路30への放出を著しく妨げない範囲であれば特に限られないが、例えば、5~40 μm であることとしてもよく、5~30 μm であることとしてもよく、5~20 μm であることとしてもよい。

【0025】

例えば、多孔薄膜10の厚さが5~20 μm である場合には、当該多孔薄膜10が、巨核球Mから血小板Pが産生される生体内環境における血管壁（厚さ10 μm 程度）に類似した構造となり好ましい。

【0026】

複数の微小孔13は、制御された形状及び配置で形成されたものであれば特に限られない。制御された形状及び配置で形成された複数の微小孔13は、例えば、基板の微細加工により形成された複数の微小孔13であることとしてもよい。微細加工は、例えば、MEMSの加工技術であり、より具体的には、例えば、フォトリソグラフィである。

【0027】

微小孔13は、多孔薄膜10の一方側の表面11から他方側の表面12まで貫通する孔である。また、微小孔13は、巨核球Mが通過できず血小板Pが通過できる形状及びサイズで形成されている。

【0028】

複数の微小孔13の各々の孔径（各微小孔13の直径）は、当該微小孔13を巨核球Mが通過できず血小板Pが通過できる範囲であれば特に限られないが、例えば、2~15 μm であることとしてもよく、2~10 μm であることとしてもよく、2~5 μm であることとしてもよい。

【0029】

例えば、各微小孔13の孔径が2~5 μm である場合には、成熟した巨核球が当該微小孔13を通過することを防止できるだけでなく、未成熟の巨核球が当該微小孔13を通過することも確実に防止することができる。

【0030】

複数の微小孔13の平均孔径は、当該微小孔13を巨核球Mが通過できず血小板Pが通過できる範囲であれば特に限られないが、例えば、2~15 μm であることとしてもよく、2~10 μm であることとしてもよく、2~5 μm であることとしてもよい。

【0031】

複数の微小孔13は、例えば、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で形成されていることとしてもよい。すなわち、制御された形状及び配置で形成された複数の微小孔13は、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で形成された複数の微小孔13であることとしてもよい。

【0032】

さらに、制御された形状及び配置で形成された複数の微小孔13は、例えば、平均孔径が2~15 μm であり、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で形成された複数の微小孔13であることとしてもよい。この場合、複数の微小孔13の平均孔径は、2~10 μm であること

10

20

30

40

50

としてもよく、 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ であることとしてもよい。なお、例えば、多孔薄膜10に平均孔径が $10 \mu\text{m}$ の複数の微小孔13が孔径加工精度 $\pm 10\%$ で形成されている場合、当該複数の微小孔13の孔径は、 $9 \sim 11 \mu\text{m}$ の範囲内となる。

【0033】

複数の微小孔13の開口率は、多孔薄膜10が、その一方の表面11における巨核球Mの配置及び培養に耐える力学的強度を有し、且つ当該巨核球Mから産生された血小板Pの当該微小孔13を介した微小流路30への放出を著しく妨げない範囲であれば特に限られないが、例えば、 $4 \sim 45\%$ であることとしてもよく、 $4 \sim 35\%$ であることとしてもよく、 $4 \sim 25\%$ であることとしてもよい。

【0034】

培養室20は、多孔薄膜10の巨核球Mが配置される表面11側に設けられ、その内部で当該巨核球Mが培養される部屋であれば特に限られない。培養室20は、例えば、その内部で巨核球Mが培養される間、多孔薄膜10の微小孔13を介して微小流路30と連通する以外は密閉される部屋である。また、多孔薄膜10の巨核球Mが配置される表面11は、培養室20の微小流路30側の内壁面を構成することとしてもよい。

【0035】

巨核球Mの培養において、培養室20には、当該巨核球Mを含む培養液Sが収容される。すなわち、多孔薄膜10の表面11に配置された巨核球Mは、培養室20に収容された培養液S中で培養される。

【0036】

微小流路30は、多孔薄膜10の巨核球Mが配置される表面11と反対側に設けられ、培養液Sが流れる流路であれば特に限られない。微小流路30内において、培養液Sは、多孔薄膜10の巨核球Mが配置される表面11と反対側の表面12と接しながら流れる。

【0037】

微小流路30は、培養液Sの流れる方向（図1に示す矢印Xの指す方向）（以下、「流れ方向X」という。）において、少なくとも多孔薄膜10の上流端から下流端まで直線的に形成されていることとしてもよい。この場合、微小流路30の流れ方向Xにおける長さは、多孔薄膜10のそれ以上となる。このため、微小流路30内の培養液Sは、流れ方向Xにおいて、多孔薄膜10の表面12の上流端から下流端まで接触しながら流れる。

【0038】

また、微小流路30は、多孔薄膜10の表面12に沿った方向であって、流れる方向に直交する方向（以下、「幅方向」という。）において、当該多孔薄膜10の一方端から他方端まで形成されていることとしてもよい。この場合、微小流路30の幅方向における長さ（当該微小流路30の幅）は、多孔薄膜10のそれ以上となる。このため、微小流路30内の培養液Sは、幅方向において、多孔薄膜10の表面12の一方端から他方端まで接触しながら流れる。

【0039】

このように、微小流路30が、多孔薄膜10の表面12の全体にわたって直線的に形成されることにより、当該微小流路30内において、培養液Sを当該表面12の全体と接触させながら直線的に流すことができ、その結果、当該表面12の全体に均一なシエアストレスを与えることができる。

【0040】

微小流路30は、培養液Sを $1 \sim 100 \text{mm/秒}$ の流速で流すことができるよう形成されていることとしてもよい。すなわち、微小流路30は、その内部を培養液Sが、 1mm/秒 （生体の毛細血管における血液の流速と同等の流速） $\sim 100 \text{mm/秒}$ （生体の静脈における血液の流速と同等の流速）で流れることができるような形状及びサイズで形成される。この場合、微小流路30内において、生体における血管内の血液流れを模した培養液S流れを形成することができる。

【0041】

本方法においては、上述したような本装置1の培養室20内において多孔薄膜10の一

10

20

30

40

50

方側の表面 1 1 に巨核球 M を配置する。巨核球 M の配置は、例えば、当該巨核球 M を含む培養液 S を培養室 2 0 内に入れて、当該巨核球 M を多孔薄膜 1 0 の表面 1 1 上に沈降させることにより行う。また、巨核球 M の配置は、例えば、当該巨核球 M の前駆細胞を含む培養液 S を培養室 2 0 内に入れて、当該前駆細胞を多孔薄膜 1 0 の表面 1 1 上に沈降させ、さらに当該培養室 2 0 内で当該前駆細胞を培養して当該巨核球 M に分化させることにより行うこととしてもよい。

【 0 0 4 2 】

巨核球 M の由来は、特に限られず、ヒトの巨核球であることとしてもよく、ヒト以外の動物の巨核球であることとしてもよい。また、巨核球 M は、生体から採取された血液に由来する巨核球であることとしてもよく、i P S 細胞又は E S 細胞に由来する巨核球であることとしてもよく、株化された巨核球であることとしてもよく、株化された前駆細胞に由来する巨核球であることとしてもよい。

10

【 0 0 4 3 】

次いで、本方法においては、微小流路 3 0 に培養液 S を流しながら培養室 2 0 内で巨核球 M を培養して血小板 P を産生する。具体的に、例えば、図 1 に示すように、多孔薄膜 1 0 の複数の微小孔 1 3 を介して微小流路 3 0 と連通する以外は密閉された培養室 2 0 内において当該多孔薄膜 1 0 の一方側の表面 1 1 に巨核球 M を配置した状態で、当該微小流路 3 0 の上流端から下流端まで、培養液 S を当該多孔薄膜 1 0 の他方側の表面 1 2 と接触させながら流すことにより、当該培養室 2 0 内で当該巨核球 M を培養するとともに、当該巨核球 M から血小板 P を産生する。

20

【 0 0 4 4 】

ここで、微小流路 3 0 に培養液 S を流すことにより、多孔薄膜 1 0 の複数の微小孔 1 3 を介して、当該多孔薄膜 1 0 の当該微小流路 3 0 と反対側の表面 1 1 に配置された巨核球 M に対して、血小板 P の産生を促進するシェアストレスを与えることができる。

【 0 0 4 5 】

特に、上述のとおり、多孔薄膜 1 0 が平坦な表面 1 1 , 1 2 を有し、微小流路 3 0 が当該多孔薄膜 1 0 の全体に沿って直線的に形成されている場合には、当該多孔薄膜 1 0 の全体に分散された巨核球 M に均一なシェアストレスを与えることができる。

【 0 0 4 6 】

微小流路 3 0 内における培養液 S の流速は、巨核球 M に血小板 P の産生を促進するシェアストレスを与えることができ、且つ当該血小板 P の回収を著しく妨げない範囲であれば特に限られないが、例えば、当該微小流路 3 0 に 1 ~ 1 0 0 m m / 秒の流速で培養液 S を流すこととしてもよい。

30

【 0 0 4 7 】

この場合、微小流路 3 0 における培養液 S の流速を、生体の毛細血管における血液の流速と同等の 1 m m / 秒から、生体の静脈における血液の流速と同等の 1 0 0 m m / 秒までの範囲とすることにより、当該微小流路 3 0 内において、生体における血管内の血液流れを模した培養液 S 流れを形成し、巨核球 M からの血小板 P の産生を効果的に促進することができる。

【 0 0 4 8 】

また、微小流路 3 0 における培養液 S の流速は、本装置 1 内における血小板 P の産生速度と当該培養液 S の流量とに基づき算出される当該培養液 S 中の当該血小板 P の濃度が、当該血小板 P の回収に支障のない範囲となるよう決定することとしてもよい。

40

【 0 0 4 9 】

そして、本方法においては、多孔薄膜 1 0 の表面 1 1 上で巨核球 M を培養することにより、当該巨核球 M から血小板 P を産生する。すなわち、巨核球 M は、多孔薄膜 1 0 の表面 1 1 上において、その細胞質の一部を突起状に変形させ、その後、当該巨核球 M に形成された突起の先端がちぎれて、血小板 P として培養液 S 中に放出される。

【 0 0 5 0 】

なお、巨核球 M の培養に使用される培養液 S は、当該培養液 S 中で巨核球 M から血小板

50

Pを産生できる溶液であれば特に限られない。また、微小流路30に培養液Sを流す方法は、特に限られず、例えば、本装置1は、当該微小流路30に当該培養液Sを流すための推進力を発生させる送液部を備えることとしてもよい。送液部は、例えば、培養液Sを圧送するためのポンプであることとしてもよい。

【0051】

また、本装置1は、例えば、微小流路30の上流端に接続され当該微小流路30に培養液Sを流入させるための上流流路部と、当該微小流路30の下流端に接続され当該微小流路30から当該培養液S（例えば、血小板Pを含む培養液S）を流出させるための下流流路部とを備えることとしてもよい。上流流路部及び下流流路部は、例えば、樹脂製のチューブであることとしてもよい。

10

【0052】

また、本装置1は、例えば、上流流路部の上流端に接続され、微小流路30に流入させる培養液Sを収容した上流容器部と、下流流路部の下流端に接続され、当該微小流路30から流出する当該培養液S（例えば、血小板Pを含む培養液S）を収容する下流容器部とを備えることとしてもよい。上流容器部及び下流容器部は、例えば、樹脂製又はガラス製の容器であることとしてもよい。

【0053】

そして、本方法においては、巨核球Mから多孔薄膜10の微小孔13を介して微小流路30内の培養液S中に放出された血小板Pを回収する。すなわち、巨核球Mは、微小孔13が開口する多孔薄膜10の表面11に配置され、当該微小孔13は血小板Pが通過できる形状及びサイズで形成されているため、当該表面11に配置された巨核球Mから産生された血小板Pは、当該微小孔13を介して微小流路30内を流れる培養液S中に放出される。

20

【0054】

なお、血小板Pの微小孔13を介した放出は、培養室20内又は多孔薄膜10の微小孔13内で産生された血小板Pが当該微小孔13を通過して微小流路30に放出されることであることとしてもよく、及び/又は当該微小孔13を介して微小流路30内に突出した巨核球Mの細胞質の一部から血小板Pが放出されることであることとしてもよい。

【0055】

微小流路30内を流れる培養液S中に放出された血小板Pは、当該微小流路30の流れ方向Xにおける下流端から回収する。すなわち、巨核球Mから産生された血小板Pを含む培養液Sを微小流路30の下流端から回収することにより、当該血小板Pを回収する。

30

【0056】

上述した本装置1及び本方法によれば、体外において巨核球Mから血小板Pを効果的に大量産生することができる。すなわち、制御された形状及び配置で複数の微小孔13が形成された多孔薄膜10を使用することにより、当該多孔薄膜10の一方側の表面11への巨核球Mの配置を直接的に制御し、且つ、微小流路30において当該多孔薄膜10の他方側の表面12と接触させながら培養液Sを流すことにより、適切に配置された当該巨核球Mにシェアストレスを効果的に与えて、血小板Pを効率よく産生することができる。

【0057】

例えば、基板の微細加工により平均孔径2～15 μm の複数の微小孔13が孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下及び開口率4～45%で形成された厚さ5～40 μm の多孔薄膜10と、当該多孔薄膜10の一方側に設けられた培養室20と、当該多孔薄膜10の他方側に設けられた微小流路30とを備える本装置1を使用して、当該培養室20内において当該多孔薄膜の当該一方側の表面11に巨核球Mを配置し、当該微小流路30に培養液Sを流しながら当該培養室20内で当該巨核球Mを培養する場合には、当該巨核球Mにシェアストレスを効果的に与えながら効率よく血小板Pを産生し、当該微小孔13を介して当該微小流路30内の当該培養液S中に放出された当該血小板Pを効率よく回収することができる。

40

【0058】

この場合、複数の微小孔13の平均孔径は、2～10 μm であることとしてもよく、2

50

~ 5 μm であることとしてもよい。また、複数の微小孔 13 の開口率は、4 ~ 35 % であることとしてもよく、4 ~ 25 % であることとしてもよい。また、多孔薄膜 10 の厚さは、5 ~ 30 μm であることとしてもよく、5 ~ 20 μm であることとしてもよい。

【0059】

また、例えば、iPS細胞から誘導した巨核球M又は巨核球Mの前駆細胞（例えば、造血前駆細胞）を予め凍結保存しておき、当該巨核球M又は前駆細胞を任意のタイミングで解凍し、そのまま本装置1内で培養することにより、生体外において血小板Pを短期間で大量に産生することができる。したがって、本装置1及び本方法によれば、生体外において、巨核球Mから血小板Pを工業的に大量産生することも期待できる。

【0060】

また、本装置1は、多孔薄膜10近傍の温度を制御する温度制御部をさらに備えることとしてもよい。この温度制御部は、例えば、多孔薄膜10近傍の温度を30 ~ 40 に制御することとしてもよい。

【0061】

温度制御部は、多孔薄膜10近傍の温度を制御するものであれば特に限られない。すなわち、多孔薄膜近傍の温度を制御する温度制御部は、例えば、本装置1の培養室20内の培養液S及び/又は微小流路30内の培養液Sの温度を制御する温度制御部であることとしてもよい。

【0062】

具体的に、温度制御部は、例えば、本装置1の培養室20に収容されている培養液S及び/又は微小流路30を流れる培養液Sの温度を測定する温度センサー（例えば、熱電対を含む温度センサー）と、当該温度センサーによる温度測定結果に基づき当該培養液Sを加熱するヒーターとを有することとしてもよい。この場合、温度制御部は、本装置1の培養室20内の培養液S及び/又は微小流路30内の培養液Sの温度を、巨核球Mからの血小板Pの産生に適した所定の温度範囲内に維持することができる。この温度範囲は、例えば、30 ~ 40 であることとしてもよい。

【0063】

また、温度センサーは、例えば、その検出部（例えば、当該温度センサーの先端部）が培養室20内の培養液S中に浸漬されるよう設けられることとしてもよい。この場合、例えば、巨核球Mの培養中において、その検出部が培養室20内の培養液S中に浸漬されることにより、当該巨核球Mが浸漬されている当該培養液Sの温度を迅速且つ正確に測定することができる。本装置1が上述のような温度制御部を備えることにより、巨核球Mを血小板Pの産生に適した温度で確実に安定して培養することができる。

【0064】

次に、本実施形態に係る具体的な実施例について説明する。

【実施例】

【0065】

[血小板産生流路装置の製造]

本実施例では、MEMSの加工技術を用いて、血小板産生流路装置として、図2A及び図2Bに示すような本装置1を製造した。図2Aには、本装置1の断面を示し、図2Bには、本装置1を平面視で示す。なお、図2Bでは、本装置1の培養室20の上方の開口部を塞ぐ蓋部23を取り外した状態を示している。

【0066】

本実施例では、図3に示すように、後述する基板の微細加工により、当該基板の一部に複数の微小孔13を形成するとともに、当該一部を削って厚さを減じることにより形成された多孔薄膜10と、当該多孔薄膜10を囲む当該基板の他の一部である枠部14とを一体的に有する基板部40を製造した。基板100としては、Si製のウェハを用い、当該基板100の中央の矩形範囲（2mm x 2mm）に、厚さが10 μm の多孔薄膜10を形成した。

【0067】

10

20

30

40

50

多孔薄膜 10 においては、平均孔径が $4\ \mu\text{m}$ である複数の微小孔 13 を、孔径加工精度 $\pm 10\%$ 以下で、一定の孔間距離（隣接する 2 つの微小孔 13 のうち一方の微小孔 13 の中心と他方の微小孔の中心との距離） $9\ \mu\text{m}$ にて規則的に配置されるよう形成した。

【0068】

複数の微小孔 13 の規則的な配置は、図 4 A に示すようなハニカム配置とした。なお、複数の微小孔 13 の配置は、例えば、図 4 B に示すように、基板を構成する Si の結晶軸方向に直近の微小孔 13 が配置されないようなシフトタイプの配置等、リソグラフィ/エッチング加工技術による制御された意図的な配置であれば特に限られない。

【0069】

図 5 A ~ 図 5 L には、無機材料製の基板 100 の微細加工による多孔薄膜 10 の形成に含まれる工程を示す。基板 100 としては、シリコンウェハの一種である、一般的な SOI (Silicon on Insulator) ウェハを使用した。

【0070】

この基板 100 は、図 5 A に示すように、Si 基板 101 上に積層された BOX (Buried Oxide) 層 102 及び SOI 層 103 を有していた。以下、図 5 B ~ 図 5 K については、基板 100 のうち、図 5 A に示す一点鎖線 V で囲まれた部分に着目して説明する。

【0071】

まず、図 5 B に示すように、基板 100 の表面 100 a (SOI 層 103 の表面) に塗布したレジスト 110 に、複数の微小孔 13 の配置パターン (図 4 A に示す配置) を露光して形成した。

【0072】

次いで、図 5 C に示すように、形成された配置パターンに従い、SOI 層 103 をドライエッチングした。ドライエッチングは、 SF_6 及び C_4F_8 を用いる一般的な Bosch プロセスによる誘導結合プラズマ反応性イオンエッチング (ICP-RIE) により行った。

【0073】

エッチング後、図 5 D に示すように、レジスト剥離液等を用いて、レジスト 110 を除去した。レジスト除去後、図 5 E に示すように、プラズマ CVD 法 (300 程度の SiH_4 、 N_2O ガスを用いる一般的な RF プラズマ CVD 法) により、ハードマスク 120 として、基板 100 の表面全体を被覆する厚さ $3\ \mu\text{m}$ 程度の SiO_2 膜を形成した。さらに、図 5 F に示すように、SOI 層 103 側のハードマスク 120 上に、保護膜として、レジスト 111 を塗布した。

【0074】

そして、図 5 G に示すように、基板 100 を上下反転させて、当該基板 100 の裏面 100 b (図 5 A 参照) 側のハードマスク 120 上に、レジスト 112 を塗布した。その後、このレジスト 112 に、最終的に矩形の多孔薄膜 10 ($2\text{mm} \times 2\text{mm}$) が形成されるよう露光して、当該矩形に対応する、Si 基板 101 の厚さを見込んだサイズの矩形の溝を形成した。

【0075】

次いで、図 5 H に示すように、上記溝の形状に従い、HF 水 (フッ化水素水) 等を用いて、ハードマスク 120 である SiO_2 膜をエッチングした。エッチング後、図 5 I に示すように、レジスト剥離液等を用いて、レジスト 112 を除去した。

【0076】

レジスト除去後、図 5 J に示すように、上記溝の形状に従い、Si 基板 101 を、BOX 層 102 で止まるように、ウェットエッチングした。ウェットエッチングは、TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) や KOH (水酸化カリウム) を用いる一般的なシリコンウェットエッチングプロセスにより行った。

【0077】

さらに、図 5 K に示すように、多孔薄膜 10 を形成する矩形範囲において、BOX 層 1

10

20

30

40

50

02及びハードマスク120(SiO₂膜)をHF水等を用いたウェットエッチングにより除去した。その結果、図5Kに示すように、複数の微小孔13が規則的な配置で形成された多孔薄膜10を得た。

【0078】

最後に、図5Lに示すように、ダイシングにより、基板100から、多孔薄膜10及び枠部14を一体的に有するSiチップである基板部40(図3参照)を切り出した。なお、図5Lにおいて一点鎖線Vで囲む部分が、1つの基板部40に相当する。

【0079】

微小流路30は、孔及び溝が形成された複数枚の石英チップを積層することにより形成した。微小流路30は、流れ方向Xの長さ2mm超、幅(幅方向の長さ)2mm、高さ0.3mmの直線状に形成された。すなわち、微小流路30は、図2A及び図2Bに示すように、その内部を培養液Sが多孔薄膜10の表面12の全体と接触しながら直線的に流れるよう形成された。なお、微小流路30の形成には、石英に代えて、ホウケイ酸ガラス等の他の材料を用いることとしてもよい。

10

【0080】

さらに、図2Aに示すように、多孔薄膜10に対応する位置に貫通穴が形成された金属製の上ホルダー21を、当該多孔薄膜10を有する基板部40に積層することにより、培養室20を形成した。なお、培養室20内で巨核球Mを培養する際には、図2Aに示すように、上ホルダー21の貫通穴の上方の開口部は、蓋部23で塞いだ。

【0081】

20

また、微小流路30の下方側には、当該微小流路30の上流端及び下流端のそれぞれの開口に対応する位置に貫通穴が形成された金属製の下ホルダー22を積層した。そして、図2A及び図2Bに示すように、多孔薄膜10を有する基板部40と微小流路30とを挟む上ホルダー21と下ホルダー22とを固定具50(ボルト及びナット)で固定した。積層した部品の間(例えば、基板部40及び微小流路30と上ホルダー21との間、当該微小流路30と下ホルダー22との間)には、シーリング材(リング)を配置することにより、液漏れを防止した。

【0082】

また、微小流路30の上流端には、下ホルダー22を介して、図示しないシリコンチューブを上流流路部として接続した。さらに、上流流路部の上流端には、微小流路30に流入させる新鮮な培養液Sが収容された図示しないガラス瓶を上流容器部として接続した。

30

【0083】

一方、微小流路30の下流端には、下ホルダー22を介して、図示しないシリコンチューブを下流流路部として接続した。さらに、下流流路部の下流端には、微小流路30から回収された培養液Sを収容するための図示しないガラス瓶を下流容器部として接続した。また、シリコンチューブには、送液部として、培養液Sを圧送するためのシリンジポンプを接続した。

【0084】

[血小板の産生]

iPS細胞から誘導した巨核球Mを含む培養液Sを培養室20に注入し、当該培養液S中で当該巨核球Mを沈降させることにより、当該巨核球Mを多孔薄膜10の表面11に配置した。培養液Sとしては、0.1%のBSA(Bovine Serum Albumin)が添加されたHepes-Tyrode液を用いた。

40

【0085】

次いで、送液部を作動させて、上流流路部を介して培養液Sを微小流路30に流入させるとともに、下流流路部を介して当該培養液Sを当該微小流路30から流出させることにより、当該微小流路30に培養液Sを流しながら培養室20内で巨核球Mの培養を開始した。

【0086】

培養液Sの流量は380µL/分とした。この結果、微小流路30内の培養液Sの流速

50

は、約 10 mm / 秒となった。そして、微小流路 30 に培養液 S を 8 時間流し続け、当該微小流路 30 から流出してくる培養液 S を下流容器部に回収した。また、比較例として、i P S 細胞から誘導した巨核球 M を含む 50 mL の培養液 S を樹脂製のシャーレ内に入れて、当該巨核球 M を 8 時間静置培養した。

【0087】

図 6 には、予め蛍光色素で染色された巨核球 M を、多孔薄膜 10 の一方側の表面 11 に配置し、当該多孔薄膜 10 の他方側から蛍光顕微鏡で観察した結果の一例を示す。図 6 に示すように、蛍光染色され、多孔薄膜 10 の表面 11 に配置された巨核球 M が、微小孔 13 を通して観察された。

【0088】

図 7 には、本装置 1 を用いた本方法により巨核球 M から血小板 P を産生した実施例と、シャーレ内において巨核球 M から血小板 P を産生した比較例とについて、培養条件（培養細胞、培養液、回収された培養液量、培養時間及び培養温度）と、血小板 P の産生量を評価した結果とを示す。

【0089】

血小板 P の産生量は、実施例及び比較例のそれぞれについて、培養された巨核球 M の数に対する、回収された血小板 P の数の比率を算出し、さらに、当該比較例の当該比率を「1」とした場合における、当該実施例の当該比率を算出することにより評価した。

【0090】

その結果、図 7 に示すように、実施例においては、比較例の 8.6 倍もの数の血小板 P を産生することができた。すなわち、本装置 1 を用いた本方法によれば、生体外における巨核球 M からの血小板 P の産生を顕著に促進し、当該血小板 P を大量産生できることが確認された。

【0091】

図 8 には、本装置 1 の他の例を示す。図 8 に示す例において、本装置 1 は、培養室 20 内の培養液 S 及び / 又は微小流路 30 内の培養液 S の温度を制御する温度制御部を備え、当該温度制御部は、当該培養室 20 内の培養液 S の温度を測定する温度センサー 60（例えば、熱電対）と、当該温度センサー 60 による温度測定結果に基づいて培養液 S を加熱するヒーターとを備えている。

【0092】

この温度センサー 60 は、その先端の検出部が培養室 20 内に突出し、当該培養室 20 内で巨核球 M を含む培養液 S に浸漬されるよう設けられているため、当該培養液 S の温度を正確且つ迅速に測定することができる。

【0093】

そして、温度制御部は、温度センサー 60 による温度測定結果に基づき、必要に応じて、微小流路 30 に流入する培養液 S を図示しないヒーターで加熱することにより、培養室 20 内の培養液 S の温度を、巨核球 M からの血小板 P の産生に適した所定の温度範囲（例えば、30 ~ 40）に維持する。

【符号の説明】

【0094】

1 血小板産生流路装置、10 多孔薄膜、11 一方側の表面、12 他方側の表面、13 微小孔、14 枠部、20 培養室、21 上ホルダー、22 下ホルダー、23 蓋部、30 微小流路、40 基板部、50 固定具、60 温度センサー、100 基板、100a 表面、100b 裏面、101 Si 基板、102 BOX 層、103 SOI 層、110, 111, 112 レジスト、120 ハードマスク、M 巨核球、P 血小板、S 培養液。

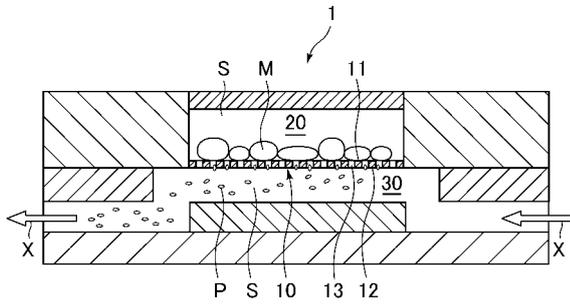
10

20

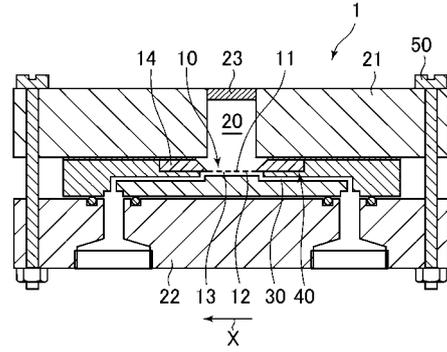
30

40

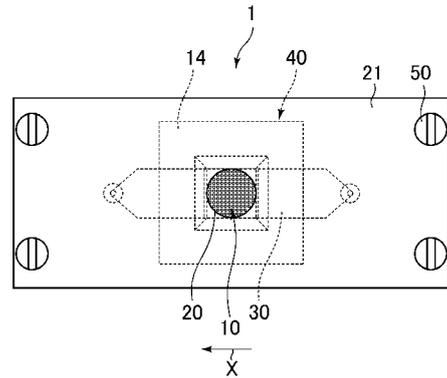
【 図 1 】



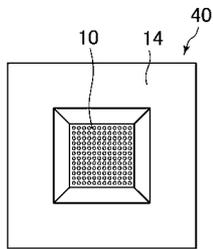
【 図 2 A 】



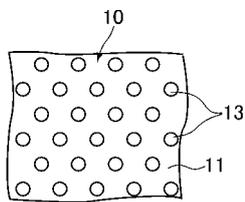
【 図 2 B 】



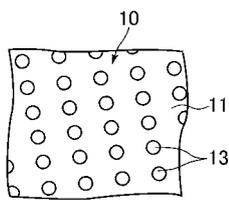
【 図 3 】



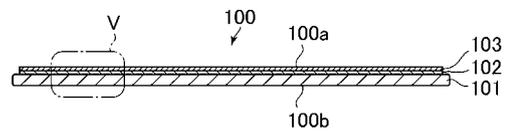
【 図 4 A 】



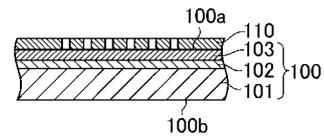
【 図 4 B 】



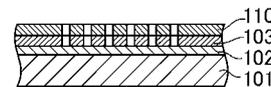
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



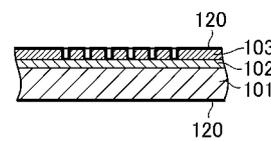
【 図 5 C 】



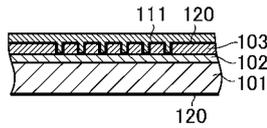
【 図 5 D 】



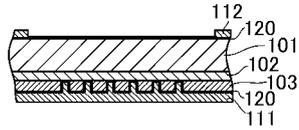
【 図 5 E 】



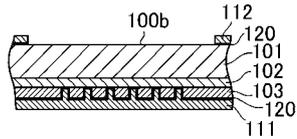
【図5F】



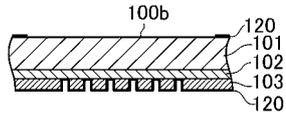
【図5G】



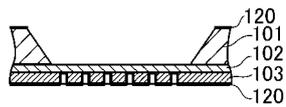
【図5H】



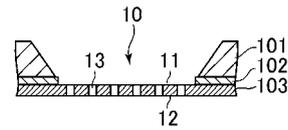
【図5I】



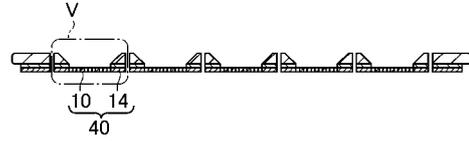
【図5J】



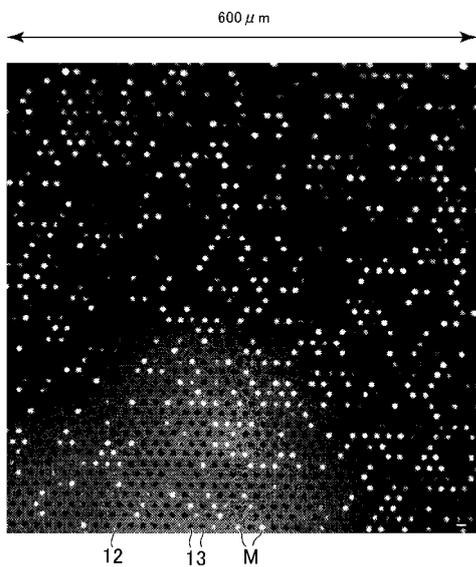
【図5K】



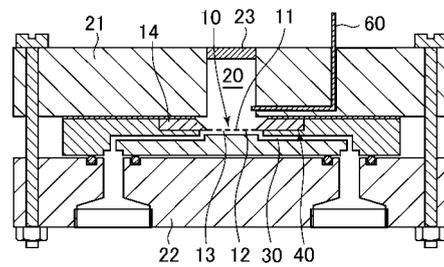
【図5L】



【図6】



【図8】



【図7】

	実施例	比較例
培養細胞	iPS細胞から誘導した巨核球	
培養液	0.1%BSAを添加したHepes-Tyrode液	
回収された培養液量	182mL	50mL
培養時間	8時間	
培養温度	37°C	
回収血小板数/培養巨核球数	86	1