

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/129673

発行日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(43) 国際公開日 **平成27年9月3日 (2015. 9. 3)**

(51) Int. Cl.	F I	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 M 3/00 (2006. 01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 3 3
C 1 2 N 5/071 (2010. 01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 5
C 1 2 N 11/04 (2006. 01)	C 1 2 N 11/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

出願番号 特願2016-505223 (P2016-505223)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/055178	
(22) 国際出願日 平成27年2月24日 (2015. 2. 24)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-34166 (P2014-34166)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(32) 優先日 平成26年2月25日 (2014. 2. 25)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 亀井 謙一郎 京都府京都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 陳 勇 京都府京都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学内
	F ターム (参考) 4B029 AA03 AA08 BB11 CC05 CC10 DA03 DB19 DF01 DF10 EA20 4B033 NA16 NB33 NB56 NB62 NC06 ND12 ND20
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体デバイス及び細胞の微小3次元培養法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも2つの開口部と接続した細胞培養チャンバーを有し、前記細胞培養チャンバー内に細胞とヒドロゲルを導入して三次元ゲル培地で培養したときに、少なくとも1つの開口部から細胞培養チャンバーへの生理活性物質の供給を前記チャンバー内の濃度勾配を形成しながら行うことができる、マイクロ流体デバイスを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの開口部と接続した細胞培養チャンバーを有し、前記細胞培養チャンバー内に細胞とヒドロゲルを導入して三次元ゲル培地で培養したときに、少なくとも 1 つの開口部から細胞培養チャンバーへの生理活性物質の供給を前記チャンバー内での濃度勾配を形成しながら行うことができる、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2】

前記ヒドロゲルは細胞培養チャンバー内で形成される、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの開口部と細胞培養チャンバーとを接続する流路が前記チャンバーの径と比較して細いことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のマイクロ流体デバイスの細胞培養チャンバーに細胞と流動状ヒドロゲルを導入する工程、前記ヒドロゲルをゲル状に変換する工程、少なくとも 1 つの開口部から生理活性物質を細胞培養チャンバー内で濃度勾配を形成するように供給して前記生理活性物質の存在下に細胞を培養する工程を含む、細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 5】

前記細胞が多能性幹細胞である、請求項 4 に記載の細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 6】

前記細胞がヒト多能性幹細胞である、請求項 4 に記載の細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 7】

複数の生理活性物質を濃度勾配を形成するように細胞培養チャンバーに供給することを特徴とする、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の微小 3 次元培養法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロ流体デバイス及び細胞の微小 3 次元培養法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞は、生体内において細胞外微小環境下においてその機能制御が行われている。細胞外微小環境とは、主に(i)成長因子・ビタミン・ガス分子などの可溶性因子、(ii)細胞外マトリックスタンパク・固さなどの不可溶性因子、(iii)細胞間相互作用、から構成されている。これらの因子が複雑に、且つ厳密に制御されながら、細胞機能の制御を行なっている。つまり、ヒトES 細胞およびヒトiPS 細胞などの目的細胞の機能を自在に制御するためには、この細胞外微小環境を自在に制御することが必須となる。

【0003】

しかし、これらの制御はマイクロメータースケールと非常に小さい環境下で行われており、従来の細胞の培養・実験法は、培養ディッシュやプレートを用いた 2 次元環境では、再現することができない。そこで、従来法では困難であった、3 次元細胞培養・実験環境を作製する事ができる手法が望まれてきた。

【0004】

従来のヒトES/iPS 細胞の培養・実験法は、培養ディッシュなどの 2 次元環境下で行われていた(非特許文献1, 2)。

【0005】

しかし、本来、細胞は 3 次元環境下に置かれており、2 次元環境下では本来の機能を発現することはできない。ヒトES/iPS 細胞を用いた組織工学においても、3 次元環境を整えることは非常に重要である。

【0006】

大きさも非常に重要な因子となる。細胞は生体内において、マイクロメータースケール

10

20

30

40

50

の微小環境において制御されている。例えば、可溶性因子の濃度勾配や、細胞外基質の固さなどが挙げられる。従来法ではこれらの因子を制御することは困難であった。もちろん、これらの因子を網羅的に解析することは、ほぼ不可能であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】K. Kamei et al. Lab Chip, 9(4), 555-563 (2009)

【非特許文献2】K. Kamei et al. Lab Chip, 10(9), 1113-1119 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

本発明は、細胞を三次元環境下に培養するのに適したマイクロ流体デバイス及び細胞、特に多能性幹細胞の機能制御及び解析を可能にする微小3次元培養法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】

本発明では、マイクロ流体デバイスを用いてヒトES細胞およびヒトiPS細胞の新規微小3次元細胞培養デバイスを開発した。このマイクロ流体デバイスは非常に微量で細胞培養を行うことができ、また簡便に3次元培養を確立することができる。

【0010】

20

従来のヒトES細胞およびヒトiPS細胞の培養・実験法は、培養ディッシュやプレートを用いた2次元環境で行われている。しかし、細胞は生体内において3次元微小環境下でその制御が行われており、2次元環境下では細胞が持つ本来の機能が発揮されない。そこで、従来法では行うことができない、3次元細胞培養・実験環境を作製することができる手法が望まれてきた。

【0011】

本発明者はこれまでにマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養・アッセイ法の開発を行って来た。本発明では、マイクロ流体デバイスを用いて3次元的な微小環境を作製し、且つ生体適合性の高いヒドロゲルを細胞支持担体として使用することによって、3次元培養を可能にした。

30

【0012】

本発明は、これらの既知方法・技術の問題点を解決する新規技術であり、好ましい実施形態における本発明の特徴は以下の点である。

(1) マイクロ流体デバイスによる細胞、特にヒトES/iPS細胞等の多能性幹細胞の三次元培養法の開発

(2) ヒドロゲルを用いたヒトES/iPS細胞培養法の三次元化

(3) 相転移ヒドロゲルを用いることによる、マイクロ流体デバイスへの細胞の導入・摘出の簡便化、細胞への低ダメージ化

具体的には、本発明は、以下のマイクロ流体デバイス及び微小3次元培養法を提供するものである。

40

項1. 少なくとも2つの開口部と接続した細胞培養チャンバーを有し、前記細胞培養チャンバー内に細胞とヒドロゲルを導入して三次元ゲル培地で培養したときに、少なくとも1つの開口部から細胞培養チャンバーへの生理活性物質の供給を前記チャンバー内の濃度勾配を形成しながら行うことができる、マイクロ流体デバイス。

項2. 前記ヒドロゲルは細胞培養チャンバー内で形成される、項1に記載のマイクロ流体デバイス。

項3. 少なくとも1つの開口部と細胞培養チャンバーとを接続する流路が前記チャンバーの径と比較して細いことを特徴とする、項1又は2に記載のマイクロ流体デバイス。

項4. 項1～3のいずれかに記載のマイクロ流体デバイスの細胞培養チャンバーに細胞と流動状ヒドロゲルを導入する工程、前記ヒドロゲルをゲル状に変換する工程、少なくと

50

も1つの開口部から生理活性物質を細胞培養チャンバー内で濃度勾配を形成するように供給して前記生理活性物質の存在下に細胞を培養する工程を含む、細胞の微小3次元培養法。

項5． 前記細胞が多能性幹細胞である、項4に記載の細胞の微小3次元培養法。

項6． 前記細胞がヒト多能性幹細胞である、項4に記載の細胞の微小3次元培養法。

項7． 複数の生理活性物質を濃度勾配を形成するように細胞培養チャンバーに供給することを特徴とする、項4～6のいずれかに記載の微小3次元培養法。

【発明の効果】

【0013】

本発明では、マイクロ流体デバイスを用いてES細胞およびiPS細胞などの多能性幹細胞を含む細胞の微小3次元細胞培養を行うことができる。このマイクロ流体デバイスは非常に微量で細胞培養を行うことができ、また簡便に3次元培養を確立することができる。

10

【0014】

本発明のマイクロ流体デバイスは、多種類の生理活性物質を濃度勾配をかけながら3次元ゲルに供給できるため、細胞、特に多能性幹細胞の分化、機能制御における各種生理活性物質の作用を網羅的にスクリーニングすることが可能になった。

【0015】

本発明はこれまで生体外に作製することができなかつた細胞外微小環境を、マイクロ流体デバイスを用いることで創出し、それに対する細胞応答を評価することができるデバイスを開発したことを特徴とする。ヒト多能性幹細胞を始めとする哺乳類細胞は、生体内において細胞外微小環境によってその機能を厳密に制御されており、その制御機構を知ることが、組織工学、細胞移植治療や再生医療の発展には欠かせなかつた。本開発は、この問題点を克服し、ヒトを含む哺乳類の多能性幹細胞の実用化へ大きく貢献できるものである。

20

【0016】

更に、本発明で開発したデバイスや創薬スクリーニングにも応用することが可能である。これまでの細胞を用いた創薬スクリーニングはプレート上に2次元培養した細胞を使用するものであつた。しかし、細胞の機能発現には3次元組織化が必要であり、つまり薬剤に対する細胞の応答も当然異なる。本発明では、3次元培養のハイスループット化にも成功しており、よってヒト多能性幹細胞を始めとする細胞を3次元培養化、それを用いた創薬スクリーニングを可能にする。

30

この細胞外微小環境は、ヒト多能性幹細胞だけでなく、がん幹細胞においても非常に重要である。

【0017】

近年、細胞外微小環境はがん幹細胞形成に作用していることが示唆されているが、生体外においてがん幹細胞の研究を行うことは困難であつた。本発明で提示する3次元培養法は、がん幹細胞研究にも応用可能であり、がんの根本治療法の開発にも大きく貢献できるものである。

【0018】

また、マイクロ流体デバイスを使用しているため、サンプル一つの量・コストを抑えられることも、利点である。

40

【0019】

本発明のマイクロ流体デバイスを用いることによって、細胞への物理的・化学的な刺激を同時に行い、それらに対する細胞応答を評価することが可能になる。

【0020】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト多能性幹細胞の3次元培養のハイスループット化しているという点で、既に他の研究より優位にたっている。また、このハイスループット化はデバイスへの挿入口が従来の96穴プレートと同じ場所になっており、従来から使用されているオートインジェクターなどの装置がそのまま使用することが出来るのも利点である。マイクロ流体デバイスを用いることによって、サンプル一つの量・コストを軽

50

減できるのも本発明の特徴である。従来の96穴プレートを用いる場合、サンプル一つにつき100~200 μ Lのサンプルが必要であるが、本発明では10 μ Lと1/10に抑えることができ、実用化のレベルに達している。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明におけるヒト多能性幹細胞の三次元微小環境培養の概念図。マイクロ流体デバイス中に流動状態のヒドロゲルとヒト多能性幹細胞の混合液を導入し、三次元培養を行うことができる。培養に必要な成長因子などの生理活性物質はヒドロゲル中を拡散することで、細胞に供給することが可能。必要に応じて分化に必要な因子も導入可能である。

【図2】本発明で使用した温度感受性相転移ヒドロゲル(Mebiol(登録商標))。温度を変えることで、細胞をゲル中に導入・採取することが可能になる。

【図3】本発明における実験操作手順。1. マイクロ流体デバイス(μ FD)を作製。2. 通常のヒト多能性幹細胞の二次元培養。3. ヒト多能性幹細胞を酵素処理、または物理的処理により回収し、ヒドロゲルと混ぜる。4. ヒト多能性幹細胞・ヒドロゲル混合溶液を μ FDに導入し、温度を変えることによりヒドロゲルを固まらせる。5. 三次元培養。必要に応じて培地交換を行う。

【図4】マイクロ流体デバイスの作製工程。3D-CADにより目的のデザインを作製し、3Dプリンタにより構造の鋳型を印刷した。通常のフォトリソグラフィによる鋳型の作成や、大量生産用の射出成形などにも用いられる金型による作成も可能である。鋳型には、PDMS原料液(塩基と硬化剤の混合液)を流し込み、 μ FD構造を有するPDMS製のデバイスを作製した。

【図5】本発明の三次元培養用マイクロ流体デバイスの例を示す。(左)細胞導入・培地交換用に大きな開口部が1つ、小さい開口部の出口が1つあり、大小2つの開口部を細胞培養チャンバーで接続してある。大きい開口部から培地、成長因子等を導入することにより濃度勾配を作製することができる。(右)2つの大きな開口部を細胞培養チャンバーと接続してある。細胞培養チャンバー中で均一な細胞培養が可能である。

【図6】ハイスループットスクリーニング(HTS)マイクロ流体デバイス(μ FD)。本発明の三次元培養は、HTS- μ FDにも適用可能である。

【図7】オートインジェクタによる送液。96穴(左図)及び384穴(右図)フォーマットにおいて、チップとHTS- μ FDとの対応関係を確認した。

【図8】 μ FD中で三次元培養したヒト多能性幹細胞の写真と、他の手法で培養したヒト多能性幹細胞形成コロニーの形状。 μ FDや浮遊培養した場合には、ヒト多能性幹細胞は球状の細胞塊になる。従来の二次元培養では単層のコロニーになる。

【図9】免疫蛍光染色法によるヒト多能性幹細胞マーカー(OCT4とNANOG)の発現確認。共に μ FD中で培養したヒト多能性幹細胞で強く発現していることが確認できた。

【図10】フローサイトメトリーによるヒト多能性幹細胞マーカー(SSEA4とTRA-1-60)、及び分化マーカー(SSEA1)の発現確認。三種類の固さの違うゲル(Soft-HG、Mid-HG、Hard-HG)を用いて三次元培養を行ったが、どの環境においても強く幹細胞マーカーが発現し、分化マーカーの発現は確認できなかった。

【図11】定量PCR法によるヒト多能性幹細胞マーカー(SOX2、NANOG、POU5F1(OCT4))の発現確認。三次元培養中(HG)においても通常の二次元培養(マトリゲルMG)と同様に強く幹細胞マーカーが発現していることが確認できた。

【図12】 μ FD中における三次元培養環境の「固さ」をゲル濃度によって変えることができる。本図は、異なる固さのゲル中でのヒト多能性幹細胞sphereの大きさを示している。Too soft(45 mg mL⁻¹)、Soft(61 mg mL⁻¹)、Medium(75 mg mL⁻¹)、Hard(91 mg mL⁻¹)である。Too softヒドロゲル中のsphereは大きくなることができるが、ゲルがあまりにも柔らかすぎ、細胞を保持することができない。

【図13】ハイスループットスクリーニング(HTS)マイクロ流体デバイス(μ FD)。写真に示すように三次元培養のスクリーニングも可能。細胞周期解析。浮遊培養している細胞に比べて、G2/M期の細胞が少ないことが確認できた。

10

20

30

40

50

【図14】ホタルルシフェラーゼを用いた細胞活性(ATP)評価。どの条件においてもほぼ同等のATP活性を示しており、細胞にダメージがないことが確認できた。

【図15】 μ FD/ヒドロゲル中における成長因子の拡散測定。bFGF(分子量17kDa)とトランスフェリン(分子量80kDa)の異なる固さのゲル中での拡散を評価した。各因子は蛍光標識してある。分子量の小さい因子が速やかに拡散していることが確認できた。

【図16】 μ FD+ヒドロゲル(Soft-HG 61 mg mL⁻¹)中における蛍光標識デキストランの拡散。分子量の異なる蛍光標識デキストランを準備し、それらが拡散していく様子を、蛍光顕微鏡で観察した。大きい分子ほどヒドロゲル中を拡散しづらいことが確認できる。

【図17】 μ FD+ヒドロゲル(Soft-HG 61 mg mL⁻¹)中における蛍光標識デキストランの拡散。分子量の異なる蛍光標識デキストランを準備し、それらが拡散していく様子を、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光強度を測定しながら、分子の拡散を定量した。分子量の大きさに応じて、拡散が減少することが確認できる。

【図18】 μ FD+ヒドロゲル(Soft-HG 61 mg mL⁻¹)中における蛍光標識デキストランの拡散。分子量の小さいデキストラン(3~5kDa)はゲルの固さ(濃度)の影響を受け、柔らかいゲル中では速やかに拡散することが確認できた。しかし、分子量が大きい(10kDa以上)と、ゲルの固さにはほぼ影響を受けないことが確認できた。

【図19】 μ FD/ヒドロゲル中の成長因子濃度勾配によるヒト多能性幹細胞のコロニー形成効率。成長因子の濃度が高い入口付近ではコロニー形成が効率よく起きていることが確認できた。

【図20】ハイスループットスクリーニング(HTS)マイクロ流体デバイス(μ FD)とそのマイクロ流体部分の概念図。細胞培養チャンバーにヒドロゲルに混入した細胞を導入する。細胞維持用の培地タンクと、細胞刺激溶液用タンクを1つの細胞培養チャンバーに接続し、細胞刺激物の濃度勾配を作製することが可能。

【図21】マイクロ流体デバイス中の細胞培養チャンバーのデザイン図。単一細胞培養チャンバーの中で、複数の濃度勾配を作製することができる。マイクロ流体デバイスのデザインに応じて様々な刺激を与えることが可能。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明で使用する細胞は、動物細胞、好ましくは脊椎動物細胞であり、特に哺乳類細胞である。哺乳類としては、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、猫などが挙げられ、ヒトが好ましく例示される。細胞は、多能性幹細胞であることが好ましい。多能性幹細胞としては、ES細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞、脂肪幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞、筋幹細胞等の幹細胞が挙げられ、好ましくはES細胞、iPS細胞等の多数の器官、組織に分化することができる幹細胞である。このような幹細胞は、分化の過程で1又は複数の生理活性物質の濃度勾配が必要と考えられており、本発明のデバイス及びハイスループットシステムを用いることで、幹細胞の分化に重要な物質をアッセイすることができる。

【0023】

濃度勾配と共に供給される生理活性物質(刺激物)としては、カルシウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、ナトリウムイオン、塩素イオン等のイオン類、肝細胞成長因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF- α 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGF(karatinocyte growth factor)等のサイトカイン類、アミノ酸(Ala, Gly, His, Arg, Lys, Asp, Glu, Asn, Gln, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Ser, Cys, Met, Pro, Thr、アラニン、タウリン、オルニチンなど)、神経伝達物質、糖類(グルコース、フルクトース、マルトース、ラクトース、ショ糖など)、カルボン酸(酢酸、ピルビン酸、酪酸、乳酸、マレイン

10

20

30

40

50

酸、フマル酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、ケトグルタル酸など)、脂質(トリグリセライド、ジグリセライド、ステロイド、モノテルペン、ジテルペン、セスキテルペン、リン脂質、ガングリオシド)、ポリアミン(スペルミジン、スペルミンなど)、ムコ多糖、グルクロン酸、ガラクトロン酸、pH調整剤などが挙げられる。pH調整剤としては、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸などの酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸リチウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素リチウムなどの塩基、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝液が挙げられる。

【0024】

三次元培養に用いるヒドロゲル材料は、細胞をチャンバー内に導入するときには、流動性を有し、チャンバー内で他の物質の添加或いは加温(例えば37)するなどの手段によりゲル化可能な材料が広く使用できる。

10

【0025】

本発明で使用するヒドロゲルとしては、キトサンゲル、コラーゲンゲル、ゼラチンゲル、ペプチドゲル、フィブリンゲル、デンプン、ペクチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、アルギン酸塩、フィブロインなどが挙げられ、これらの1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。

【0026】

好ましい1つの実施形態において、ヒドロゲルは、温度に応じて相転移を起こす材料が好ましく、例えば15 以下では液状であるが、細胞培養条件(37)ではゲル状になるようなゲルである。このような材料は、細胞をマイクロ流体デバイスに導入するときは、低温下で細胞操作を行い、培養時には37 にしてゲル化し、培養後に細胞を取り出す際には、またデバイスを低温下に置くことによって、ゲルが液状になり、取り出すことが可能になる。

20

【0027】

ゲルの濃度を増加することにより、ゲルを固くすることができ、ゲルの濃度を下げることにより柔らかいゲルを形成できる。ゲル強度とゲル濃度の関係は各々のヒドロゲル材料において公知であり、当業者は容易に必要とする濃度を選択できる。

【0028】

本発明の1つの好ましい実施形態において、三次元培養のためのゲルは、温度感受性のゲル材料である。このようなゲル材料は公知であり、例えばMebiol(登録商標)を使用することができる。

30

【0029】

本発明の1つの好ましい実施形態において、アルギン酸ナトリウムなどのカルシウムイオンを加えることでゲル化可能なゲル材料を使用することができる。例えばアルギン酸ナトリウムと細胞培養液と細胞を含む混合液を細胞培養チャンバーに導入し、その後カルシウムイオンの溶液を開口部から細胞培養チャンバーに浸透させることにより、細胞培養チャンバー内をゲル化させることができる。また、キレート剤によりカルシウムイオンを除去することで、ゲルを流動化させることができる。

【0030】

本発明の1つの好ましい実施形態において、例えば新田ゼラチン製のコラーゲンゲルのように37 で30分加温することでゲル化するようなヒドロゲルを使用することができる。コラーゲンゲルは、コラゲナーゼを作用させることによりゲルを分解し、細胞を取り出すことができる。コラーゲン以外にもゼラチン、ヒアルロン酸、ペプチド、フィブリン、キトサンなど、酵素の作用により分解可能なヒドロゲルを好ましく使用することができる。

40

【0031】

本発明では、細胞環境の固さによる細胞挙動の検討も行うことができる。ゲル中における生理活性物質の拡散は溶液中のそれとは異なり分子量の大きさによって劇的に変化する。この現象は生体内においても起きている現象であり、本発明のマイクロ流体デバイスは

50

この生体内の条件を再現できるものである。

【0032】

本発明は、ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞の3次元培養法として特に有用である。この方法を用いることによって、従来法では行うことができなかったヒトを含む哺乳類の多能性幹細胞（例えばヒトES細胞、ヒトiPS細胞）の機能制御・解析を行うことができる。

【0033】

本発明のマイクロ流体デバイスを用いて細胞を3次元培養する方法は、模式的に図1、3に示され、温度感受性相転移ゲルの1例を図2に示す。

【0034】

本発明のマイクロ流体デバイスは、例えば図4に記載のように3Dプリンターなどを用いて鑄型を形成した後、原料を鑄型に流し込み、重合などにより固化させることで得ることができる。図4ではPDMS製のマイクロ流体デバイスが示されているが、他の材料からなるマイクロ流体デバイスも図4及び公知の方法に基づき当業者であれば容易に作製できる。

【0035】

マイクロ流体デバイスは、多数の細胞培養チャンバーを有し、該デバイスは好ましくはハイスループット用デバイスであるので、チャンバーは1つのデバイスに、10~400個程度、例えば16個、48個、96個、384個などの個数で有し得る。

【0036】

本発明のマイクロ流体デバイスは、細胞培養チャンバーに細胞や培養液などを供給可能な2以上の開口部を接続しており（図5、21）、細胞培養チャンバーにおいて細胞を3次元培養できるとともに培養液の交換、生理活性物質の濃度勾配を有する供給を行うことができる。細胞培養チャンバーは1つのデバイスに多数形成されているのがよく、1つのデバイスに96個或いは384個形成することでハイスループットデバイスとして使用可能である（図4、6、7）。

【0037】

マイクロ流体デバイスは上部に蓋を重ね合わせて培養液の蒸発を防止することが好ましい。

【0038】

ヒドロゲル中における生理活性物質の拡散の様子は、図15に示され、開口部に導入された生理活性物質はヒドロゲル中を拡散すること、拡散は生理活性物質の分子量により影響されることが示されている。拡散速度はゲル強度によっても影響される（図18）。ヒドロゲルの濃度によりゲル強度を変化させ得ることが図12に示され、図13は本発明のハイスループットスクリーニング(HTS)マイクロ流体デバイス(μFD)により、細胞周期解析が行えることを示す。図14は、本発明の三次元培養で培養された細胞がダメージを受けていないことがATP活性に基づき示されている。図16、17は、大きい生理活性物質は拡散速度が遅いことを示す。

【0039】

本発明の好ましい実施形態では、多数の細胞培養チャンバーを有するマイクロ流体デバイスを形成し、該チャンバーで細胞を培養する。培養された多能性幹細胞はマーカーを発現し（図9~11）、多能性幹細胞のコロニー形成効率などの生理活性物質による作用は、濃度勾配により影響される（図19）。図20は、生理活性物質を供給する刺激用溶液タンクと細胞培養チャンバーの間の流路が細く、生理活性物質が少しずつ供給されるために濃度勾配が形成されること、培地用タンク（開口部）は細胞培養チャンバーと直結され、効率よく培地を供給、交換できる実施形態を示す。図21に示すように生理活性物質（刺激物）を供給する開口部は1つでも2以上であってもよく、複数の物質を任意のタイミングで三次元培養細胞に供給することができる。

【0040】

細胞培養チャンバーの高さは100~1000μm程度、幅は100~1000μm程度

10

20

30

40

50

、奥行きは1000～10000 μm程度である。細胞培養チャンバーと開口部を接続するマイクロ流路の長さは1000～10000 μm程度、マイクロ流路の径は100～1000 μm程度である。

【0041】

開口部の大きさは、マイクロ流路の径よりも大きい。開口部の大きさが細胞培養チャンバーの径と近ければ細胞をチャンバー内に導入するに効果的である。一方、開口部と細胞培養チャンバーを両者の径よりも細いマイクロ流路で接続した場合、生理活性物質の拡散が制限されるため、生理活性物質の濃度勾配を作りやすい。

【0042】

チャンバーは複数の(通常2個の)開口部を有し、チャンバーの一方の開口部から新しい培養液を供給すればマイクロ流路を経由して他方の開口部から古い培養液が排出され、それにより培養液の交換が可能である。

10

【0043】

マイクロ流体デバイスの材質は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ジフェニルシロキサンなどのポリシロキサン系ポリマー、シリコーン樹脂/シリコーンゴム、天然ゴムないし合成ゴム、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリメチルアクリレート(PMA)、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレンなどのポリオレフィン、ポリウレタン、ポリスチレン、フッ素化ポリマー(PTFE、PVdFなど)、ポリ塩化ビニル、ポリメチルヒドロゲンシロキサン、ジメチルシロキサンとメチルヒドロジェンシロキサン単位のコポリマーなどのホモポリマー

20

【0044】

またはコポリマー、さらにはこれらのブレンドが挙げられるが、ポリシロキサン系ポリマーが好ましく、PDMSがより好ましい。マイクロ流体デバイスは透明性が高いことが、三次元細胞培養の評価を行いやすいので好ましい。また、マイクロ流体デバイスは酸素、二酸化炭素などの気体透過性に優れているのが好ましい。

【0045】

マイクロ流体デバイスは、対応する鋳型を製造し、その鋳型に上記の高分子またはその原料を流し込んで製造することができる。鋳型の作製法は特に限定されないが、3Dプリンタを用いるのが好ましい。

30

【0046】

チャンバーは、培養液及び細胞数が少なくなるのが好ましい。1つのチャンバー内の空間には、例えば100～2000 μlの液体/ゲルを保持することができる。この空間に細胞と培養液を供給することにより細胞培養を行うことができる。

【0047】

1つのチャンバー内で培養される細胞数は、通常 $5 \times 10^5 \sim 0.5 \times 10^5$ 個/cm²程度である。チャンバーの培養空間の形状は、三次元培養が可能であれば特に限定されないが、例えば円筒状、角筒状、楕円筒状などの形状が挙げられる。

40

【0048】

特に好ましい実施形態において、本発明は、以下の(a)～(d)の開発により支えられている。

(a) 新規3次元培養用マイクロ流体デバイスの開発

生体内で細胞機能制御に重要な役割を果たしている「細胞外微小環境」は、従来の実験系ではその生体外での再現が非常に困難であった。これは、従来の細胞培養ディッシュなどが大きな(mm～cm程度)の空間しか扱えないためであり、細胞外微小環境の再現に必要なμmレベルの実験系では無かった。反面マイクロ流体デバイスは、μmレベルの微小空間を作製することが可能になり、細胞外微小環境の再現に一步近づく。

【0049】

50

しかし、これまでのマイクロ流体デバイスでの細胞実験系は、細胞をマイクロ流体デバイス内の培養基材（ガラスやプラスチックなど）上に平面上に培養しているだけであったので、本当の意味での3次元培養ではなかった。そこで、本発明では本当の3次元培養を可能にするために、細胞外基質としてハイドロゲルを使用した。ハイドロゲルはポリマーが水を内包することによって形成されるゲルであり、培養液とポリマーを混ぜることによって、ゲル中での細胞を可能にする。また、ポリマー濃度を変えることによって、ゲルの固さも調節することができ、これまで試験することが難しかった「環境の固さが細胞に与える影響」など行うことが可能になった。また、ゲル中の物質の拡散は分子量の大きさに依存し、ゲル内における物質拡散と、それに対する細胞応答の評価を行うことも可能である。

10

(b) 相転移ハイドロゲルを用いたヒトES/iPS細胞3次元培養法の開発

ハイドロゲルを用いた細胞培養法では、細胞にダメージを与えること無く、細胞を回収することは非常に困難であった。そこで、本発明の好ましい実施形態ではこの問題を解決するために、可逆的に相転移することができるハイドロゲルを使用した。このハイドロゲルは細胞接着性は低いものの、細胞毒性は無く、3次元培養の際の支持担体として用いることが可能である。また、細胞場用環境下（37℃）ではゲル化し、低温度（20℃）以下では液状になるので、細胞に影響を与えること無く、マイクロ流体デバイスへの導入、摘出が可能になる。

【0050】

(c) 3Dプリンタを用いたマイクロ流体デバイス鋳型作成技術の開発

20

μFDは細胞生物学において様々な利点を持つ反面、作製過程において、鋳型準備に時間がかかることが問題点であった。

【0051】

本発明では、鋳型作製のために3Dプリンタを使用することを発明した。3Dプリンタは複雑な3次元構造をプリントすることが可能であり、近年では家庭用の3Dプリンタも市販されるようになった。本発明で使用した3DプリンタはXY解像度が50 μm、Z解像度が15 μmであり、細胞培養用のマイクロ流体デバイス作製には十分な性能である。鋳型として使用する材料はプラスチック製樹脂であり、熱耐性が70℃と比較的低温であるため、マイクロ流体デバイスの材料であるpolydimethylsiloxane (PDMS)に転写する際には、温度を65℃に保って行った。

30

(d) マイクロ流体デバイスと組み合わせたハイスループットスクリーニングシステムの開発

多能性幹細胞の機能を維持し、分化を行うために適切な生理活性物質（刺激物）を効率よく同定するために、本発明では、マイクロ流体デバイスと組み合わせたハイスループットスクリーニングシステムを開発した。生理活性物質は、3次元培養において濃度勾配のもとに供給することができ、発生・分化にどのような生理活性物質がどのような濃度勾配で供給されることが適切であるのかについて、本発明のデバイスを用いてハイスループットスクリーニングシステムで決定することができる。

【実施例】

【0052】

40

以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。

実施例1：3Dプリンタを用いたマイクロ流体デバイス作製方法

(1) 材料

SYLGARD（登録商標）184 Silicone Elastomer kit（base, curing agent）（Dow corning）

Nunc オムニトレイ（Thermo scientific 165218）

ガラスボトムディッシュ（岩城硝子）

3Dプリンタ AGILISTA（Keyence）

デシケーター

50

コロナフィット CFG-500 (信光電気計装株式会社)
3D-CAD (AutoCAD、Blender 等)

(2) 操作手順

鋳型の作製

1. 3次元画像描画ソフトウェア(3D-CAD)により、マイクロ流路構造の型となる鋳型デザインを有するマスクを作製する。

【0053】

2. 鋳型デザインを.stfファイルに変換する。

【0054】

3. .stfファイルを3Dプリンタに転送し、印刷する。

【0055】

マイクロ流路構造を有するPDMSの作製

1. Silicone Elastomer BaseとCuring agentを10:1の重量比で攪拌ミキサーを用いて混合する(PDMS混合液)。

【0056】

2. PDMS混合液を、3Dプリンタにより印刷された鋳型に流し込む。

【0057】

3. デシケーターで30分間脱気を行う。

【0058】

4. 65のオーブンで加熱、オーバーナイト。

【0059】

5. 鋳型からPDMSを回収する。

【0060】

マイクロ流体デバイス(HTS- μ FD、HTNS- μ FD)の作製

1. オムニトレイまたはガラスボトムディッシュをコロナ処理する(コロナフィットCFG-500等を用いる)。

【0061】

2. PDMSの表面をコロナ処理する。

【0062】

3. オムニトレイまたはガラスボトムディッシュとPDMSを貼り合わせる。

【0063】

4. 65のオーブンで加熱、オーバーナイト。

【0064】

5. 使用するまでデシケーター内で保存する。

【0065】

実施例2: Mebiol gel(相転移ゲル)を用いたヒト多能性幹細胞の3次元培養法

(1) 材料

Mebiol gel メビオール株式会社PMW20-1001(10ml 希釈用)

mTeSR1

株式会社ベリタス ST-05850

Y-27632

和光純薬株式会社

250-00513(5mg)

TrypLE Express(1x), Phenol Red Life technologies 12605028(500ml)

(2) 操作手順

Mebiol gelの溶解

Mebiol gelは乾燥状態で重さを計測し、10ml希釈用に対して6~10mlのmTeSR1を加え、4°Cで一晩静置して溶解させる。実験の際のMebiol gel濃度は以下の通り。

【0066】

10

20

30

40

50

Soft 61mg/ml
 Medium 75mg/ml
 Hard 91mg/ml

ヒト多能性幹細胞の3次元培養化

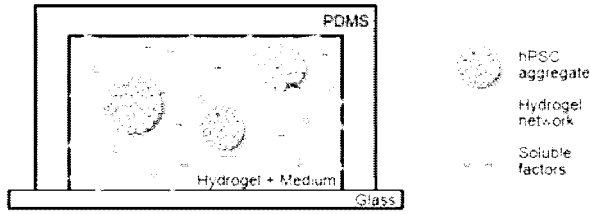
1. 流体デバイスはUV 照射15 分間で殺菌
 2. Y-27632 を最終濃度10 μ M で含むmTeSR1 培地を調製
 3. MEF 上、またはMatrigel 上の細胞をD-PBS(-)で2 回リンス
 4. TrypLE Express を加え37 で3~5 分間静置
 5. TrypLE Express を吸引除去 10
 6. MEF 上の細胞を用いる場合は、剥離したMEF を除去するため培地で細胞層をリンス
 7. mTeSR1+Y-27632 培地で細胞を回収
 8. シングルセルにするため、細胞懸濁液をピペッティング
 9. 1000rpmで3 分間遠心
 10. 上清を吸引除去
 11. 細胞ペレットをmTeSR1+Y-27632 培地に再懸濁
 12. 細胞数を計測
 13. 4×10^5 cells を新しいチューブに分注
 14. 1000rpm 3 分間遠心
 15. 上清を吸引除去 20
- (ゲルの凝固防止のため以降の操作は氷上で行い、チップも氷上で冷却した物を用いる)
16. 細胞ペレットを100~200 μ l のMebiol gel (mTeSR1 で溶解) に懸濁 (4×10^5 cells/100~200 μ l)
 17. この時、最終濃度10 μ M でY-27632 をMebiol gel に添加
 18. 氷上で冷却した流体デバイス内に細胞-Mebiol gel 懸濁液を導入 ($2 \sim 4 \times 10^4$ cells /10 μ l)
 19. 37 で5 分間静置してゲル化
 20. デバイス上のmedium supplier にmTeSR1+Y-27632 培地を添加
 21. 乾燥防止のため、dish に滅菌蒸留水を加える 30
 22. 翌日の培地交換はmTeSR1+Y-27632 培地で行い、それ以降はmTeSR1 培地で毎日1 回培地交換を行う。

【0067】

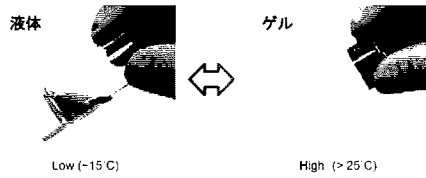
Mebiol gel からの細胞の回収

1. medium supplier 内の古い培地を除去
2. デバイスを氷上に5 分間静置
3. 流体内に新しい培地を加え、ゲルを希釈
4. 流体内から細胞を回収

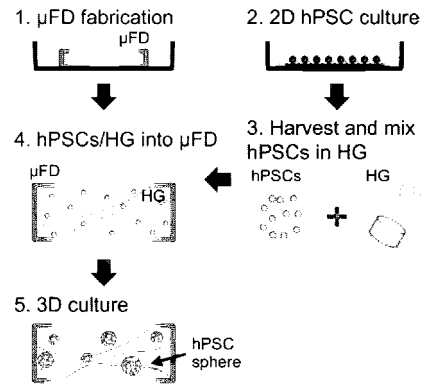
【 図 1 】



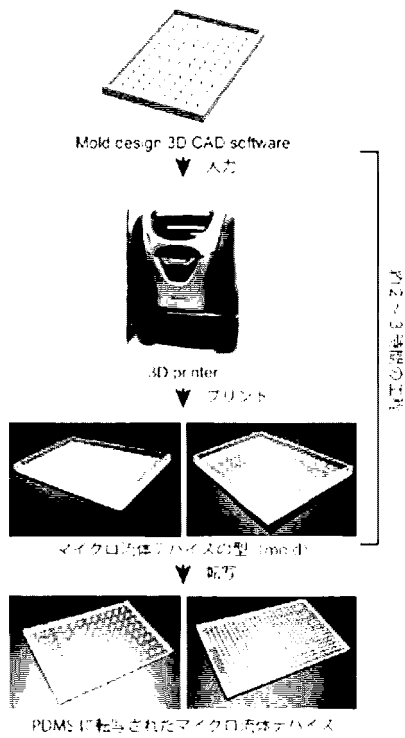
【 図 2 】



【 図 3 】



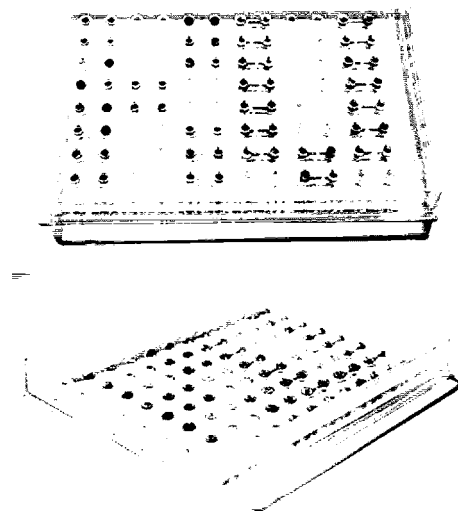
【 図 4 】



【 図 5 】



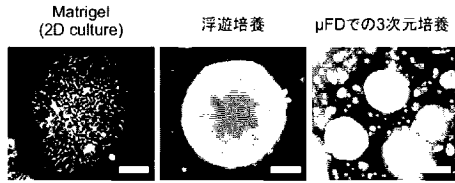
【 図 6 】



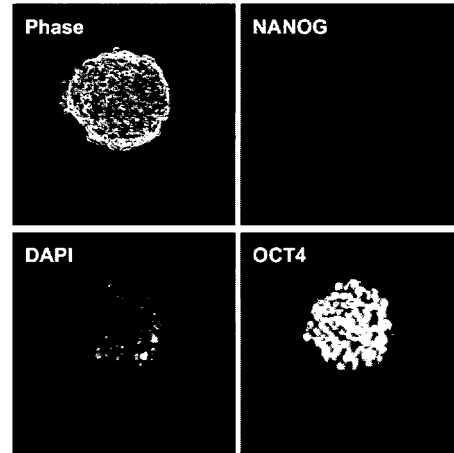
【 図 7 】



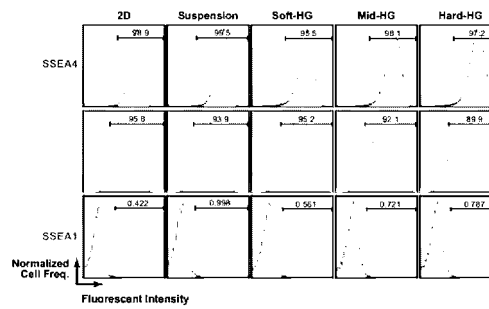
【 図 8 】



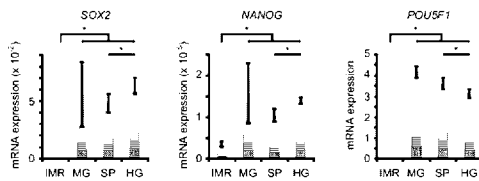
【 図 9 】



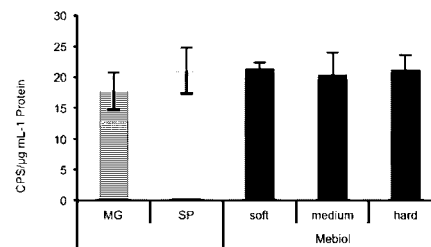
【 図 10 】



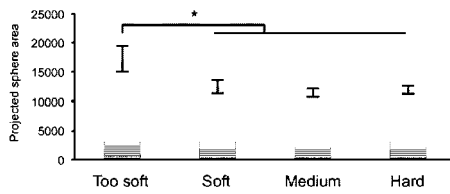
【 図 11 】



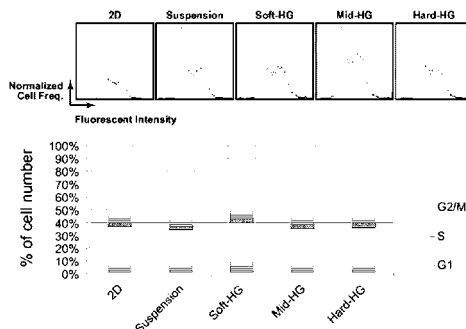
【 図 14 】



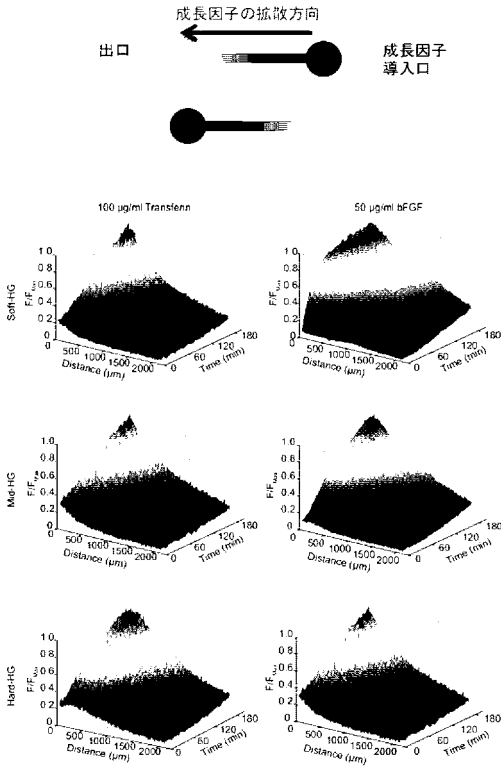
【 図 12 】



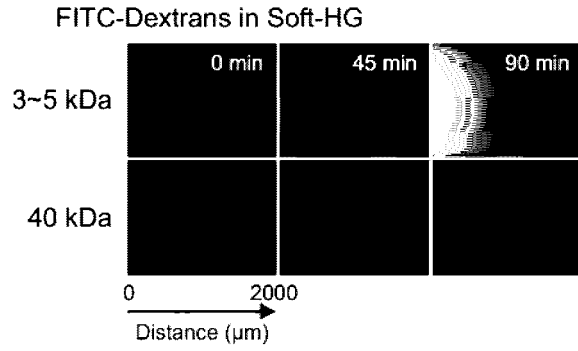
【 図 13 】



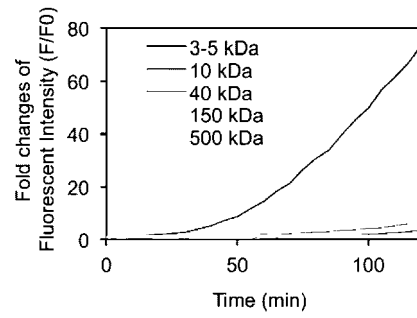
【 図 1 5 】



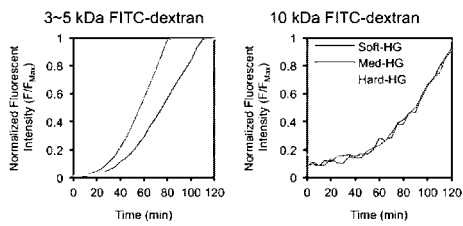
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

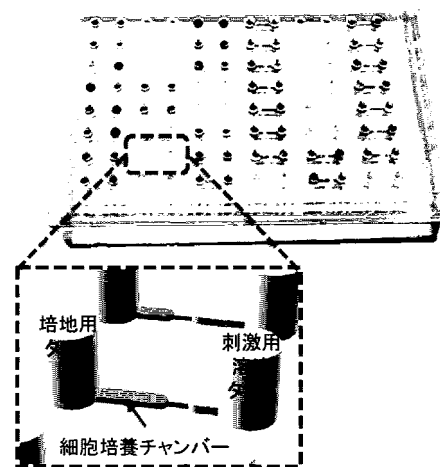
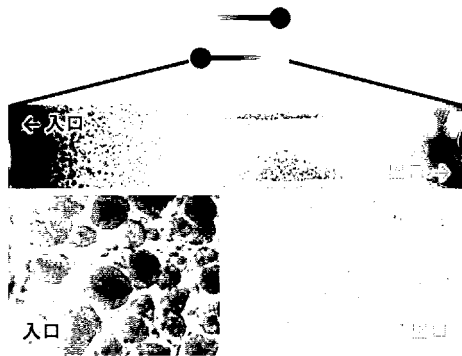


【 図 1 8 】

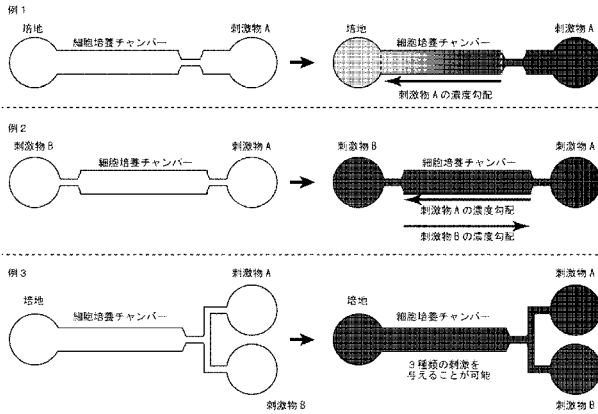


【 図 2 0 】

【 図 1 9 】



【図 2 1】



【手続補正書】

【提出日】平成27年10月23日(2015.10.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの開口部と接続した細胞培養チャンバーを有し、前記細胞培養チャンバー内に細胞とヒドロゲルを導入して三次元ゲル培地で培養したときに、少なくとも 1 つの開口部から細胞培養チャンバーへの生理活性物質の供給を前記チャンバー内での濃度勾配を形成しながら行うことができるマイクロ流体デバイスであって、前記開口部の大きさが、細胞培養チャンバーの径よりも大きく、前記少なくとも 1 つの開口部と細胞培養チャンバーとを接続する流路の流れが、前記勾配が形成される方向及び細胞が導入される方向と一致する、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2】

2 つの開口部と細胞培養チャンバーを有する、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 3】

前記ヒドロゲルは細胞培養チャンバー内で形成される、請求項 1 または 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 4】

チャンバーを 10 ~ 400 個有し、ハイスループット用である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のマイクロ流体デバイスの細胞培養チャンバーに細胞と流動状ヒドロゲルを導入する工程、前記ヒドロゲルをゲル状に変換する工程、少なくとも 1 つの開口部から生理活性物質を細胞培養チャンバー内で濃度勾配を形成するように供給して前記生理活性物質の存在下に細胞を培養する工程を含む、細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 6】

前記細胞が多能性幹細胞である、請求項 5 に記載の細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 7】

前記細胞がヒト多能性幹細胞である、請求項 5 に記載の細胞の微小 3 次元培養法。

【請求項 8】

複数の生理活性物質を濃度勾配を形成するように細胞培養チャンバーに供給することを特徴とする、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の微小 3 次元培養法。

【請求項 9】

少なくとも 2 つの開口部と接続した細胞培養チャンバーを有し、前記細胞培養チャンバー内に細胞とヒドロゲルを導入して三次元ゲル培地で培養したときに、少なくとも 1 つの開口部から細胞培養チャンバーへの生理活性物質の供給を前記チャンバー内での濃度勾配を形成しながら行うことができるマイクロ流体デバイスであって、前記開口部の大きさが、細胞培養チャンバーの径よりも大きく、前記少なくとも 1 つの開口部と細胞培養チャンバーとを接続する流路の流れが、前記勾配が形成される方向と一致し、前記少なくとも 1 つの開口部と細胞培養チャンバーとを接続する流路が前記チャンバーの径と比較して細い、マイクロ流体デバイス。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/055178
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CELLDIRECTOR 3D. PRODUCT NOTE. Gradientech AB, 2013, Introduction, How it works, Figure 1	1-7
Y	WO 2010/056186 A1 (GRADIENSTECH AB), 20 May 2010 (20.05.2010), claims; drawings; page 19, 5th paragraph & US 2011/0217771 A1 & EP 2358472 A	1-7
Y	JP 3190145 B2 (Yamato KUBOTA), 23 July 2001 (23.07.2001), claims; examples (Family: none)	1-7
Y	WO 2014/027693 A1 (Osaka University), 20 February 2014 (20.02.2014), drawings; paragraphs [0015] to [0027] (Family: none)	5-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May 2015 (14.05.15)		Date of mailing of the international search report 26 May 2015 (26.05.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 5 1 7 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	CELLDIRECTOR 3D. PRODUCT NOTE. Gradientech AB, 2013, Introduction、How it works、Figure 1	1-7									
Y	WO 2010/056186 A1 (GRADIENSTECH AB) 2010.05.20, 特許請求の範囲、 図面、第19頁第5段落 & US 2011/0217771 A1 & EP 2358472 A	1-7									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 14.05.2015		国際調査報告の発送日 26.05.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司	4N 3534								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 5 1 7 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 3190145 B2 (窪田倭) 2001.07.23, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-7
Y	WO 2014/027693 A1 (国立大学法人大阪大学) 2014.02.20, 図面、 [0015]-[0027] (ファミリーなし)	5-7

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BA30 BB40 BC46 BD50 CA44 CA46 CA60

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。