

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/150689

発行日 令和2年2月6日 (2020. 2. 6)

(43) 国際公開日 平成30年8月23日 (2018. 8. 23)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M 3/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 3/00	4 B 0 2 9
<b>C 1 2 N 5/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

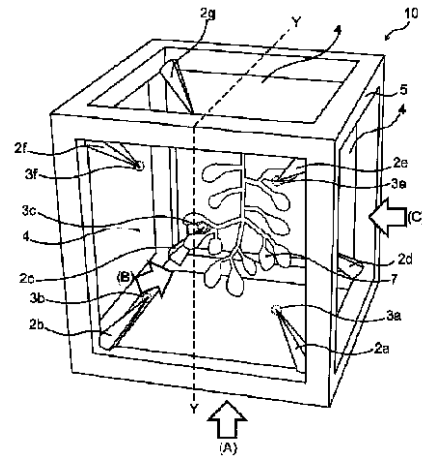
出願番号 特願2018-568007 (P2018-568007)	(71) 出願人 519135633 公立大学法人大阪 大阪府大阪市阿倍野区旭町一丁目2番7-601号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/043675	
(22) 国際出願日 平成29年12月5日 (2017. 12. 5)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-26036 (P2017-26036)	(71) 出願人 504174135 国立大学法人九州工業大学 福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号
(32) 優先日 平成29年2月15日 (2017. 2. 15)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(74) 代理人 100065248 弁理士 野河 信太郎
	(74) 代理人 100159385 弁理士 甲斐 伸二
	(74) 代理人 100163407 弁理士 金子 裕輔
	(74) 代理人 100166936 弁理士 稲本 潔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養容器、観察用試料セル及び細胞培養方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞又は細胞組織を立体培養することができ、かつ、多面観察により培養した細胞又は細胞組織の三次元構造を容易に把握することが可能である細胞培養容器 / 観察用試料セルを提供する。本発明の細胞培養容器 / 観察用試料セルは、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容するための細胞培養容器 / 観察用試料セルであって、細胞培養容器 / 観察用試料セルは、枠部と、枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部と、枠部から細胞培養容器 / 観察用試料セルの内部側に突出した少なくとも1つの凸部とを有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、細胞又は細胞組織を多面観察できるように設けられ、凸部は、細胞又は細胞組織と共に窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容するための細胞培養容器であって、前記細胞培養容器は、枠部と、前記枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部と、前記枠部から前記細胞培養容器の内部側に突出した少なくとも1つの凸部とを有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、前記細胞又は前記細胞組織を多面観察できるように設けられ、前記凸部は、前記細胞又は前記細胞組織と共に前記窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする細胞培養容器。

**【請求項 2】**

少なくとも1つの窓部は、ハイドロゲル又は多孔質体であり、前記多孔質体は、多孔質材料シート、メッシュ、エッチングシート、不織布、織布のうち少なくとも1つを含む請求項1に記載の細胞培養容器。

**【請求項 3】**

前記枠部は、立方体又は直方体であり、各面に前記窓部を設けるための開口を有する請求項1又は2に記載の細胞培養容器。

**【請求項 4】**

前記細胞培養容器は、複数の前記凸部を有し、各凸部は、前記特徴点を有する請求項1～3のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 5】**

前記凸部は、複数の特徴点を有する請求項1～4のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 6】**

前記凸部は、先端部が先細りした形状を有する請求項1～5のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 7】**

前記細胞培養容器は、複数の窓部を有し、前記凸部は、少なくとも2つの窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有する請求項1～6のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 8】**

前記凸部は、少なくとも前記特徴点が自家蛍光を発する材料からなるように設けられた請求項1～7のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 9】**

前記窓部は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含む請求項1～8のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

**【請求項 10】**

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容するための観察用試料セルであって、前記観察用試料セルは、枠部と、前記枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部と、前記枠部から前記観察用試料セルの内部側に突出した少なくとも1つの凸部とを有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、前記細胞又は前記細胞組織を多面観察できるように設けられ、前記凸部は、前記細胞又は前記細胞組織と共に前記窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする観察用試料セル。

**【請求項 11】**

細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容した細胞培養容器中において細胞又は細胞組織を培養するステップと、前記細胞培養容器中の培養した細胞又は細胞組織を観察するステップとを含み、前記細胞培養器は、少なくとも1つの窓部を有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、前記細胞又は前記細胞組織を多面観察できるように設けられ、

10

20

30

40

50

細胞又は細胞組織を培養するステップの前に、前記細胞又は前記細胞組織と共に前記窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有する参照物体を前記細胞培養容器中に設けていることを特徴とする細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養容器、観察用試料セル及び細胞培養方法に関する。

【背景技術】

【0002】

培養ゲル中で細胞組織を立体培養することにより血管組織、気管支組織などを形成する研究が行われている（例えば、特許文献1～3参照）。これらの研究では、通常、ディッシュ中又はウェル中に厚い培養ゲル層を形成し、この培養ゲル層に細胞又は細胞組織を包埋して細胞組織を培養している。培養した細胞組織の観察手法としては、倒立型顕微鏡又は正立型顕微鏡で培養ゲル層の下側又は上側から細胞組織を観察する手法が取られている。特許文献3では、共焦点レーザー顕微鏡を用いて色素で染色した細胞を観察している。

共焦点レーザー顕微鏡では、対物レンズによりレーザービームの焦点を細胞に結び、その焦点における細胞に標識された蛍光物質の自家蛍光を検出することができる。このため、複数の焦点面（ $x-y$ 平面）の二次元画像を $z$ 方向に重ね合わせることで細胞の三次元画像を作成することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2009-213716号公報

【特許文献2】W02004/084967A

【特許文献3】W02012/147878A

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、比較的大きな細胞組織を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する場合、倍率の低い対物レンズを使用する必要がある。倍率の低い対物レンズを用いると、焦点深度が深くなり、 $z$ 方向の解像度が低下する。このため、鮮明な三次元画像を得ることが難しい。

また、細胞の多面観察する場合、通常、それぞれの画像中で同一細胞と考えられる特徴のある細胞を見つけ出し、その細胞を利用して異なる方向からの観察画像の位置合わせを行い、細胞の三次元構造を把握する。この方法では、異なる方向からの観察画像の位置合わせに時間がかかる。また、正確な位置合わせを行うことが難しい。また、比較的特徴の少ない細胞を多面観察する場合、異なる方向からの観察画像の位置合わせを行うことが困難である。

本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、細胞又は細胞組織を立体培養することができ、かつ、多面観察により培養した細胞又は細胞組織の三次元構造を容易に把握することが可能である細胞培養容器/観察用試料セルを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容するための細胞培養容器/観察用試料セルであって、細胞培養容器/観察用試料セルは、枠部と、枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部と、枠部から細胞培養容器/観察用試料セルの内部側に突出した少なくとも1つの凸部とを有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、細胞又は細胞組織を多面観察できるように設けられ、凸部は、細胞又は細胞組織と共に窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする細胞培養容器を提供する。

【発明の効果】

## 【0006】

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容できるように設けられる。このため、培養ゲルを細胞又は細胞組織の足場とすることができ、細胞培養容器／観察用試料セルに収容した培養ゲル中で細胞又は細胞組織を立体培養することができる。

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは栄養成分透過性を有する窓部を有するため、細胞培養容器／観察用試料セルを液体培地中に浸漬することにより、液体培地中の栄養素、タンパク質、酸素などを窓部及び培養ゲルを介して細胞又は細胞組織に供給することができる。

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは枠部と前記枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部とを有するため、細胞培養容器／観察用試料セルの強度を大きくすることができ、細胞培養容器／観察用試料セルの取り扱いが容易になる。また、窓部が傷つくことを抑制することができる。さらに細胞培養容器／観察用試料セルを容易に回転させることができる。

10

## 【0007】

前記窓部は、透光性であり、かつ、細胞又は細胞組織を多面観察できるように設けられる。このため、細胞培養容器／観察用試料セルを顕微鏡にセットして、窓部から容器内部の細胞又は細胞組織を多面観察することができる。また、細胞培養容器／観察用試料セルを回転させて、細胞培養容器／観察用試料セルの各面から細胞又は細胞組織を多面観察することができる。

20

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは枠部から細胞培養容器／観察用試料セルの内部側に突出した少なくとも1つの凸部を有する。このため、細胞培養容器／観察用試料セルの内部に凸部の先端部分を配置することができる。

前記凸部は、細胞又は細胞組織と共に前記窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有する。このため、細胞又は細胞組織を窓部から多面観察した際に、異なる方向からの観察画像に特徴点を入れることができる。この特徴点を参照点として利用して、異なる方向からの観察画像を、細胞組織の形状に依存することなく高精度に位置合わせすることができ、観察対象である細胞又は細胞組織の三次元構造を把握することができる。

窓部が複数の場合、各窓部から取得した複数の観察画像を位置合わせできる。また窓部が1つの場合でも、その窓部を通して互いに異なる角度から取得した複数の観察画像を位置合わせすることができる。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0008】

【図1】本発明の一実施形態の細胞培養容器／観察用試料セルの概略斜視図である。

【図2】図1の破線X-Xにおける細胞培養容器／観察用試料セルの概略断面図である。

【図3】本発明の一実施形態の細胞培養容器／観察用試料セルの概略斜視図である。

【図4】図3の破線Y-Yにおける細胞培養容器／観察用試料セルの概略断面図である。

【図5】液体培地に浸漬した状態の本発明の一実施形態の細胞培養容器／観察用試料セルの概略断面図である。

【図6】(a)～(c)はそれぞれ本発明の一実施形態の細胞培養容器／観察用試料セルの概略斜視図である。

40

【図7】(a)は図3、4の(A)方向からの細胞組織の観察画像の概略図あり、(b)は図3、4の(B)方向からの細胞組織の観察画像の概略図あり、(c)は図3の(C)方向からの細胞組織の観察画像の概略図あり。

【図8】(a)～(d)はそれぞれ本発明の一実施形態の細胞培養容器／観察用試料セルに含まれる凸部の概略図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0009】

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容するための細胞培養容器／観察用試料セルであって、細胞培養容器／観察用試料セルは

50

、枠部と、枠部で囲まれた少なくとも1つの窓部と、枠部から細胞培養容器／観察用試料セルの内部側に突出した少なくとも1つの凸部とを有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、細胞又は細胞組織を多面観察できるように設けられ、凸部は、細胞又は細胞組織と共に窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする。

#### 【0010】

少なくとも1つの窓部は、ハイドロゲル又は多孔質体であることが好ましく、前記多孔質体は、多孔質材料シート、メッシュ、エッチングシート、不織布、織布のうち少なくとも1つを含むことが好ましい。このことにより、窓部が栄養成分透過性を有することができる。 10

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルに含まれる枠部は、立方体又は直方体であり、各面に窓部を設けるための開口を有することが好ましい。このことにより、細胞培養容器の内部空間における空間座標のx軸方向、y軸方向、z軸方向からそれぞれ細胞組織を観察ことができ、細胞組織の三次元構造を容易に把握することができる。

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルは、複数の凸部を有することが好ましく、各凸部は特徴点を有することが好ましい。このことにより、細胞組織の観察画像に複数の特徴点を入れることができ、異なる方向からの観察画像を位置合わせする際に複数の特徴点を参照点として利用して観察画像の回転などを補正することができる。このため、異なる方向からの観察画像をより高精度に位置合わせすることができる。 20

#### 【0011】

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルに含まれる凸部は複数の特徴点を有することが好ましい。このことにより、細胞組織の観察画像に複数の特徴点を入れることができ、異なる方向からの観察画像を位置合わせする際に複数の特徴点を参照点として利用して観察画像の回転などを補正することができる。このため、異なる方向からの観察画像をより高精度に位置合わせすることができる。

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルに含まれる凸部は少なくとも特徴点が自家蛍光を発する材料からなるように設けられることが好ましい。このことにより、共焦点レーザー顕微鏡などで細胞組織を蛍光観察する際に、特徴点を発光させることができ、蛍光観察においても凸部の特徴点を参照点として利用して、異なる方向からの蛍光観察画像を高精度に位置合わせすることができる。 30

#### 【0012】

本発明の細胞培養容器／観察用試料セルに含まれる窓部は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことが好ましい。このことにより、細胞組織の培養に必要な栄養素、刺激因子などが窓部を透過するが可能になる。このため、細胞培養容器／観察用試料セルを液体培地に浸漬することにより、液体培地に含まれる栄養素、刺激因子などを窓部及び培養ゲルを介して細胞組織に供給することができる。また、窓部が透光性を有することができ、窓部を介して細胞培養容器／観察用試料セルの内部の細胞組織を観察することができる。さらに、窓部が十分な強度を有することができ、細胞培養容器／観察用試料セルの内部の培養ゲルの重みにより窓部が大きく変形することを防止することができる。 40

#### 【0013】

本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容した細胞培養容器／観察用試料セル中において細胞又は細胞組織を培養するステップと、細胞培養容器／観察用試料セル中の培養した細胞又は細胞組織を観察するステップとを含み、細胞培養容器／観察用試料セルは、少なくとも1つの窓部を有し、少なくとも1つの窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、細胞又は細胞組織を多面観察できるように設けられ、細胞又は細胞組織を培養するステップの前に、細胞又は細胞組織と共に窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有する参照物体を細胞培養容器／観察用試料セル中に設けていることを特徴とする細胞培養方法も提供する。

また、本発明は、細胞又は細胞組織を包埋する培養ゲルを収容する細胞培養容器用の枠 50

であって、前記枠は、窓部を設けるための少なくとも1つの開口を有し、かつ、枠の内部側に突出した少なくとも1つの凸部を有し、前記窓部は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、前記細胞又は前記細胞組織を多面観察できるように設けられ、前記凸部は、前記細胞又は前記細胞組織と共に前記窓部から観察できる位置に配置された特徴点を有することを特徴とする細胞培養容器用の枠も提供する。

【0014】

以下、図面を用いて本発明の一実施形態を説明する。図面や以下の記述中で示す構成は、例示であって、本発明の範囲は、図面や以下の記述中で示すものに限定されない。

【0015】

図1は本実施形態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図であり、図2は図1の破線X-Xにおける細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。図3は、図1、2に示した細胞培養容器/観察用試料セルに細胞組織を包埋する培養ゲルを収容した状態の細胞培養容器/観察用試料セルの概略斜視図であり、図4は図3の破線Y-Yにおける細胞培養容器/観察用試料セルの概略断面図である。

10

本実施形態の細胞培養容器/観察用試料セル10は、細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を収容するための細胞培養容器/観察用試料セル10であって、細胞培養容器/観察用試料セル10は、枠部5と、枠部5で囲まれた少なくとも1つの窓部4と、枠部5から細胞培養容器/観察用試料セル10の内部側に突出した少なくとも1つの凸部2とを有し、少なくとも1つの窓部4は、透光性であり、かつ、栄養成分透過性を有し、かつ、細胞又は細胞組織7を多面観察できるように設けられ、凸部2は、細胞又は細胞組織7と共に窓部4から観察できる位置に配置された特徴点3を有することを特徴とする。

20

以下、本実施形態の細胞培養容器/観察用試料セル10について説明する。

【0016】

本実施形態の細胞培養容器/観察用試料セル10は、細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を内部に収容することにより細胞又は細胞組織7を培養できる容器であり、かつ、培養した細胞又は細胞組織7を窓部4を介して観察することができる試料セルである。細胞培養容器10と観察用試料セル10は同じものである。

【0017】

本実施形態の細胞培養容器10は、細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を内部に収容していない状態であってもよい。この場合、細胞培養容器10は、培養ゲル6及び細胞組織7を容器内に入れるための開口14を有することができる。この開口14は、培養ゲル6及び細胞組織7を容器内に入れた後に、窓部4を形成することにより塞ぐことができる。開口14は、細胞培養容器10の上面に設けることができる。細胞培養容器10は、例えば、図1、2に示したような構造を有することができる。

30

本実施形態の細胞培養容器10は、細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を内部に収容している状態であってもよい。この場合、細胞培養容器10は、例えば、図3、4に示したような構造を有することができる。

【0018】

細胞培養容器10に収容する培養ゲル6は、培養ゲル6に包埋された細胞又は細胞組織7を培養するためのゲルである。培養ゲル6に包埋する細胞は、一定のパターンで集合した構造を有する細胞組織であってもよく、このような組織構造を有さない細胞であってもよい。また、組織構造を有さない細胞7を培養することにより、細胞組織7が成長してもよい。

40

細胞又は細胞組織7を培養ゲル6に包埋することにより、培養ゲル6を介して細胞7又は細胞組織7に栄養、刺激因子などを供給することができる。また、培養ゲル6が細胞組織7の足場になることができ、細胞組織7が三次元的に成長することができ立体培養することができる。

【0019】

培養ゲル6は、例えば、コラーゲン、ラミニン、エンタクチン、プロテオグリカンなどを含むことができる。また、培養ゲル6は、TGF- $\beta$ 、線維芽細胞増殖因子、組織プラ

50

スミノージェン活性化因子などを含むことができる。さらに、培養ゲル6には、例えば、マトリゲル（登録商標）を用いることができる。

培養ゲル6は、細胞培養容器10に内包され、外部の液体培地9に直接接触しないため、培養ゲル6が液体培地9を吸収し膨潤することにより細胞組織7の相対位置がずれることを抑制することができる。

#### 【0020】

細胞培養容器10は、枠部5と、枠部5で囲まれた少なくとも1つの窓部4とを有する。このため、枠部5と窓部4により内部空間を形成することができ、細胞培養容器10の内部に細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を収容することができる。

また、細胞培養容器10が枠部5を有することにより、細胞培養容器10の強度を大きくすることができ、細胞培養容器10の取り扱いが容易になる。また、細胞培養容器10を容易に回転させることが可能になる。また、窓部4が傷つくことを抑制することができる。枠部5は、少なくとも1つの開口を有する立体形状とすることができ、この開口を塞ぐように窓部4を設けることができる。また、枠部5は、複数の開口を有する立体形状とすることができ、複数の開口をそれぞれ塞ぐように複数の窓部4を設けることができる。

枠部5の材料は、生体適合性を有する樹脂とすることができ、また、枠部5の材料は、例えば、ポリカーボネートとすることができ、

#### 【0021】

窓部4は、栄養成分透過性を有する。このことにより、栄養素、タンパク質（分子量：数万～数十万）、化学物質、酸素などが窓部4を透過することができ、細胞培養容器10の外部の液体培地9などから培養に必要な栄養素などを窓部4及び培養ゲル6を介して細胞組織7に供給することができる。窓部4の材料はハイドロゲル又は多孔質体とすることができ、

ハイドロゲルとは、水中の分散質が繋がってネットワークを形成し系全体として固体状になったものである。また、窓部4は、細胞組織7にタンパク質を供給するために十分なタンパク質透過性を有するように設けることができる。

多孔質体とは、多数の細かい孔を有する部材である。多孔質体は、例えば、多孔質材料シート、メッシュ、エッチングシート、不織布、織布などである。また、多孔質体はシート形状を有することができる。また、多孔質体は、生体適合性を有することが好ましい。多孔質体は、ポリカーボネートなどの樹脂であってもよく、金などの金属であってもよく、ガラスなどの無機化合物であってもよい。

例えば、図5に示したように、細胞培養容器10を液体培地9中に浸漬することにより、液体培地9に含まれる栄養素、タンパク質、化学物質、酸素などを窓部4及び培養ゲル6を介して細胞組織7に供給することができる。また、細胞培養容器10を液体培地9が流れる流路中に配置してもよい。

#### 【0022】

窓部4は、細胞培養容器10の内部に培養ゲル6を収容した場合でも、窓部4が大きく変形することがない強度、又は、窓部4が壊れない強度を有する。

窓部4は、透光性を有する。このため、窓部4を介して細胞培養容器10の内部の細胞組織7を観察することができる。培養中の細胞組織7を窓部4を介して観察してもよく、培養が終わった後の細胞組織7を窓部4を介して観察してもよい。また、色素染色した細胞組織7を窓部4を介して蛍光観察してもよい。

また、窓部4は、枠部5の開口を塞ぐように設けることができる。また、窓部4の形状は、膜状又はシート状とすることができ、また、窓部4の厚さは薄いほうが好ましい。このことにより、窓部4のタンパク質透過性や透光性を向上させることができる。

#### 【0023】

例えば、ハイドロゲルからなる窓部4の強度及びタンパク質透過性は、窓部4に用いられているハイドロゲルのネットワークを形成する分散質の濃度を調整することによって調整することができる。

ネットワークを形成する分散質の濃度が高いほど窓部4の強度が高くなる。窓部4の強

10

20

30

40

50

度としては  $50 \text{ g} / \text{cm}^2$  以上のゲル強度を有することが好ましい。このことにより、細胞培養容器 10 の内部の培養ゲル 6 の重さにより窓部 4 が変形することを抑制することができる。

一方、窓部 4 の分散質の濃度が高すぎると、タンパク質透過性が低下するので、タンパク質透過性を確保する上で、窓部 4 の強度が  $10000 \text{ g} / \text{cm}^2$  以下となるように分散質の濃度に抑えることが好ましい。

従って、窓部 4 の強度としては  $50 \text{ g} / \text{cm}^2$  以上  $10000 \text{ g} / \text{cm}^2$  以下が好ましい。なお、このようなゲル強度を得るための分散質の適切な濃度は、分散質の種類により異なる。

#### 【0024】

窓部 4 は、例えば、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことができる。このことにより、窓部 4 が透光性を有することができる。また、細胞培養容器 10 を液体培地 9 中に浸漬した場合、液体培地 9 に含まれるタンパク質などの栄養が窓部 4 を透過することができ、窓部 4 及び培養ゲル 6 を介して細胞組織 7 に栄養を供給することができる。また、窓部 4 がアガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、アルギン酸ナトリウム又はコラーゲンゲルを含むことにより、細胞培養容器 10 を回転させた場合でも窓部 4 が変形することを抑制することができる。窓部 4 は、好ましくは、アガロースゲル又はポリアクリルアミドゲルである。このことにより、窓部 4 の硬さを容易に調整することができる。また、細胞培養容器 10 の製造コストを低減することができる。

#### 【0025】

窓部 4 がアガロースゲルの場合、アガロースの濃度は、例えば、 $0.5 \sim 4.0 \%$  とすることができる。また、窓部 4 がポリアクリルアミドゲルの場合、ポリアクリルアミドの濃度は、例えば、 $3 \sim 20 \%$  とすることができる。窓部 4 がアルギン酸ナトリウムを含む場合、窓部 4 は、アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを加えてゲル化することにより形成することができる。窓部 4 がコラーゲンゲルの場合、高濃度のコラーゲンゲルで窓部 4 を形成することができる。このことにより窓部 4 が十分な強度を有することができる。

#### 【0026】

細胞培養容器 10 の形状は、細胞又は細胞組織 7 を包埋する培養ゲル 6 を収容する内部空間を有する形状であれば特に限定されないが、図 1 ~ 4 に示したように立方体であってもよく、図 6 (a) に示したように直方体であってもよく、図 6 (b) に示したように六角柱であってもよい。また、細胞培養容器 10 の形状は、図 6 (c) に示したように円柱であってもよい。細胞培養容器 10 の形状は、立方体又は直方体であることが好ましい。このことにより、細胞培養容器 10 の内部空間における空間座標の x 軸方向、y 軸方向、z 軸方向からそれぞれ細胞組織 7 を観察することができ、細胞組織 7 の三次元構造を容易に把握することができる。

図 1 ~ 4、図 6 (a)、(b) のように、細胞培養容器 10 の形状が多面体である場合、枠部 5 は多面体形状を有することができ、多面体形状の各面に窓部 4 を形成するための開口を有することができる。また、図 6 (c) のように、細胞培養容器 10 の形状が円柱である場合、枠部 5 は円柱形状を有することができ、円柱形状の上面、下面、側面に窓部 4 を形成するための開口を有することができる。

#### 【0027】

窓部 4 がハイドロゲルからなる場合、窓部 4 は、窓部用のゾルを枠部 5 の開口に流し込みゲル化させることにより形成することができる。窓部 4 は、平板状であってもよく、曲板状であってもよい。窓部 4 を曲板状にすることにより、1つの窓部 4 から細胞組織 7 を多面観察することができる。

細胞培養容器 10 に培養ゲル 6 を入れる前に、枠部 5 の上面の開口 14 以外の開口に窓部 4 を形成することができる。また、枠部 5 の上面の開口 14 から細胞培養容器 10 の内部に培養ゲル 6 及び細胞組織 7 を入れた後に、枠部 5 の上面の開口 14 に窓部 4 を形成す

10

20

30

40

50



ることができる。

窓部 4 が多孔質体からなる場合、窓部 4 は、多孔質体のシートを枠部 5 に接着することにより形成することができる。

図 1 ~ 4、図 6 のように、立体形状の枠部 5 の開口に窓部 4 を設けることにより、細胞培養容器 10 の内部の細胞組織 7 を異なる方向から観察することが可能となり、細胞組織 7 を多面観察することができる。

また、細胞培養容器 10 を多面体形状とすることにより、多面体形状の各面から細胞組織 7 を観察できるように細胞培養容器 10 を回転させることができ、顕微鏡により異なる面からの細胞組織 7 の観察画像を得ることができる。

#### 【0028】

10

細胞培養容器 10 は、枠部 5 から細胞培養容器 10 の内部側に突出した少なくとも 1 つの凸部 2 を有する。このため、細胞培養容器 10 の内部に凸部 2 の先端部分を配置することができる。凸部 2 は、枠部 5 と同じ部材であってもよい。また、部材を枠部 5 に接着することにより凸部 2 を設けてもよい。

凸部 2 は、枠部 5 から容器の中央部に向かって突出するように設けることができる。このように凸部 2 を設けることにより細胞組織 7 の成長の妨げになりにくい。また、図 1、2、6 の例では、凸部 2 が、枠部 5 の中でも枠の突合せ部分の内側から突出させている。即ち細胞培養容器 10 が多面体形状である場合は、枠部 5 の角部の内側に凸部 2 を設けている。この場合特に、凸部 2 は容器の中央から離れた位置に存在するので、細胞組織 7 の成長の妨げにならない。

20

#### 【0029】

凸部 2 は、細胞又は細胞組織 7 と共に窓部 4 から観察できる位置に配置された特徴点 3 を有する。このため、細胞又は細胞組織 7 を窓部 4 から多面観察した際に、異なる方向からの観察画像に特徴点 3 を入れることができる。この特徴点 3 を参照点として利用して、異なる方向からの観察画像を高精度に位置合わせすることができ、観察対象である細胞又は細胞組織 7 の三次元構造を把握することができる。

図 1 ~ 3 の例では、各凸部 2 a ~ 2 f が枠部 5 の角部から容器内側に突出しているため、各角部に存在する 1 つの凸部 2 を、それに隣接する 3 つの窓部 4 から観察することができる。従って、この 3 つの窓部 4 から観察する画像を高精度に位置合わせすることができる。

30

図 1 ~ 3、6 の例では各凸部 2 の形状においても先細り形状であり、その先端部が特徴点 3 となっているので、特徴点 3 の周囲は光が通過することができる。すなわち、各凸部 2 は、異なる方向から特徴点 3 を観察しやすい形状となっている。

ただし、凸部 2 の形状は、図示したものには限られず、例えば凸部 2 を角部を有する形状（多面体など）とし、その角部を特徴点 3 とすることができる。また、例えば凸部 2 に球状部分を設けて、その球状部分の中心や先端などを特徴点 3 とすることもできる。

#### 【0030】

図 7 (a) は図 3、4 の (A) 方向からの細胞組織 7 の観察画像の概略図あり、図 7 (b) は図 3、4 の (B) 方向からの細胞組織 7 の観察画像の概略図あり、図 7 (c) は図 3 の (C) 方向からの細胞組織 7 の観察画像の概略図ある。このように、異なる方向からの観察画像に凸部 2 b の特徴点 3 b、凸部 2 d の特徴点 3 d を入れることができる。この特徴点 3 b、3 d を参照点として利用して、図 7 (a) (b) (c) の画像を高精度に位置合わせすることができる。このことにより、図 7 (a) の画像に含まれる細胞組織  $X_1$  と、図 7 (b) の画像に含まれる細胞組織  $X_2$  と、図 7 (c) の画像に含まれる細胞組織  $X_3$  とが同じ細胞組織であることを特定することができ、この細胞組織の三次元構造を把握することができる。

40

#### 【0031】

細胞培養容器 10 は、複数の凸部 2 を有することができる。このことにより、細胞組織 7 の観察画像に複数の特徴点 3 を入れることができ、異なる方向からの観察画像を位置合わせする際に複数の特徴点 3 を参照点として利用して観察画像の回転などを補正すること

50

ができる。このため、異なる方向からの観察画像をより高精度に位置合わせすることができる。例えば、図1～4に示した細胞培養容器10は、8つの凸部2a～2eを有している。また、図6(a)～(c)のように、複数の凸部2を細胞培養容器10に設けることができる。

複数の凸部2は、それぞれの凸部2の長さ及び突出角度が異なるように設けることができる。このことにより、細胞培養容器10の内部の様々な箇所に特徴点3を配置することができ、観察する細胞組織7に応じて特徴点3を使い分けることができる。例えば、観察する細胞組織7が広範囲にわたる場合、各部分ごとに、細胞培養容器10の内部に配置された複数の特徴点3の中から最適な特徴点3を参照点として選択することができる。

複数の凸部2は、異なる形状を有することができる。このことにより、細胞組織7の観察画像に含まれる凸部2を容易に特定することができる。

#### 【0032】

凸部2は、複数の特徴点3を有してもよい。この場合、細胞組織7の観察画像に複数の特徴点3を有する凸部2を1つ入れるだけで、観察画像内に参照点を複数とることができるので、複数の参照点を参照して観察画像の回転などを補正することもできる。このため、異なる方向からの観察画像をより高精度に位置合わせすることができる。凸部2は、例えば、図8(a)のように1つの特徴点3を有してもよく、図8(b)～(d)のように複数の特徴点3を有してもよい。

#### 【0033】

凸部2の材料は、生体適合性を有する材料とすることができる。このことにより、凸部2が細胞組織7に生理学的な影響を与えることを防止することができる。凸部2の材料は、例えば、生体適合性エポキシ樹脂、生体適合性アクリル樹脂などの生体適合性高分子とすることができる。

凸部2は、少なくとも特徴点3が自家蛍光を発する材料からなるように設けることができる。このことにより、共焦点レーザー顕微鏡などで細胞組織7を蛍光観察する際に、特徴点3を発光させることができる。凸部2が自家蛍光を発する材料からなってもよく、特徴点3を設けた部分だけが自家蛍光を発する材料からなってもよい。また、自家蛍光を発する材料で形成された凸部2の特徴点3は、細胞組織7の明視野観察においても利用することができる。

凸部2は例えば、生体適合性のフォトレジスト(例えば、SU-8など)により三角で板状の部材を作製し、この部材を枠部5に貼り付けることにより形成することができる。凸部を枠部5に貼り付ける接着剤及びフォトレジストには、生体適合性を有するものを用いることができる。

#### 【0034】

凸部2を変形させることができるように、凸部2を設けてもよい。凸部2を変形させることにより、特徴点3の位置を変更することが可能になり、細胞培養容器10で培養する細胞組織7の種類に応じて特徴点3の位置を変更することができる。

#### 【0035】

### 細胞培養方法

本実施形態の細胞培養方法は、細胞又は細胞組織7を包埋する培養ゲル6を収容した細胞培養容器10中において細胞又は細胞組織7を培養するステップと、細胞培養容器10中の培養した細胞又は細胞組織7を観察するステップとを含む。

本実施形態の細胞培養方法では、細胞又は細胞組織7を培養するステップの前に、細胞又は細胞組織7と共に窓部4から観察できる位置に配置された特徴点3を有する参照物体2を細胞培養容器10中に設けている。

参照物体2は、上述の凸部2であってもよい。

#### 【0036】

一方、参照物体2は、培養ゲル6中に埋め込んだ微小物体であってもよい。参照物体2は、細胞組織7を培養ゲル6中に埋め込む前又は埋め込んだ後に、培養ゲル6中に埋め込むことができる。参照物体2は、細胞組織7と共に窓部4から観察できる位置であり、細

10

20

30

40

50

胞組織 7 の成長の妨げにならない位置に埋め込むことができる。このような参照物体 2 の特徴点 3 を参照点として利用して、異なる方向からの観察画像を高精度に位置合わせすることができ、観察対象である細胞又は細胞組織 7 の三次元構造を把握することができる。

複数の参照物体 2 を培養ゲル 6 中に埋め込んでもよい。また、複数の特徴点 3 を有する参照物体 2 を培養ゲル 6 中に埋め込んでもよい。

参照物体 2 は、例えば、立方体、星型形状、四面体、球体であってもよい。

【 0 0 3 7 】

細胞又は細胞組織 7 を培養するステップでは、例えば、細胞培養容器 1 0 を培養皿 1 2 に溜めた液体培地 9 中に細胞培養容器 1 0 を浸漬すること、又は液体培地 9 が流れる流路中に細胞培養容器 1 0 を設置することにより細胞又は細胞組織 7 を培養することができる。

10

細胞又は細胞組織 7 を観察するステップでは、液体培地 9 中から取り出した細胞培養容器 1 0 ( 試料観察用セル 1 0 ) を顕微鏡にセットすることにより細胞又は細胞組織 7 を観察することができる。細胞組織 7 は、明視野観察又は蛍光観察により観察することができる。細胞組織 7 を蛍光観察する場合、細胞培養容器 1 0 中の細胞組織 7 を色素で染色した後に蛍光観察を行うことができる。

【 0 0 3 8 】

細胞培養容器 1 0 が図 1 ~ 4、図 6 ( a ) ( b ) のように多面体である場合、細胞培養容器 1 0 ( 試料観察用セル 1 0 ) を回転させることにより、多面体の異なる面から細胞組織 7 を観察することができ、細胞組織 7 を多面観察することができる。

20

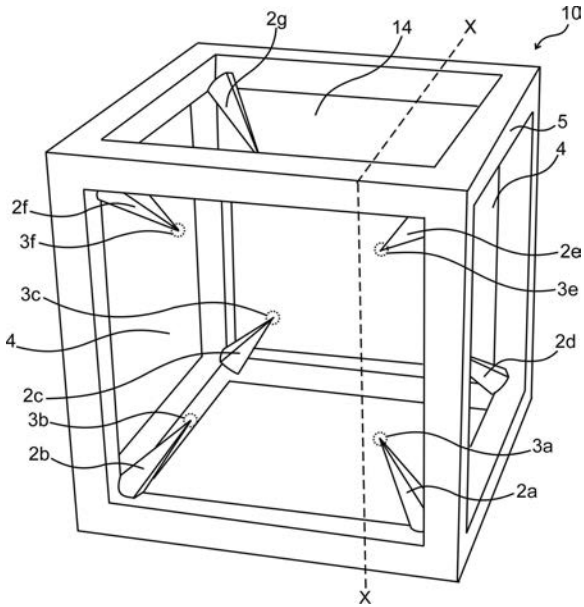
また、細胞培養容器 1 0 ( 試料観察用セル 1 0 ) をガラス容器に入れた後に顕微鏡で細胞組織 7 を観察してもよい。このことにより、顕微鏡に液体培地 9 が付着することを防止することができる。

【 符号の説明 】

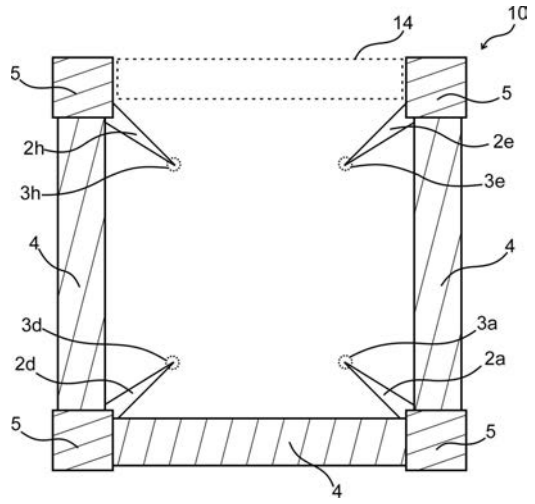
【 0 0 3 9 】

2、2 a、2 b、2 c、2 d、2 e、2 f、2 g、2 h : 凸部 ( 参照物体 )      3、3 a、3 b、3 c、3 d、3 e、3 f、3 g、3 h : 特徴点      4 : 窓部      5 : 枠部  
6 : 培養ゲル      7 : 細胞又は細胞組織      9 : 液体培地      1 0 : 細胞培養容器又は観察用試料セル  
1 2 : 培養皿      1 4 : 開口

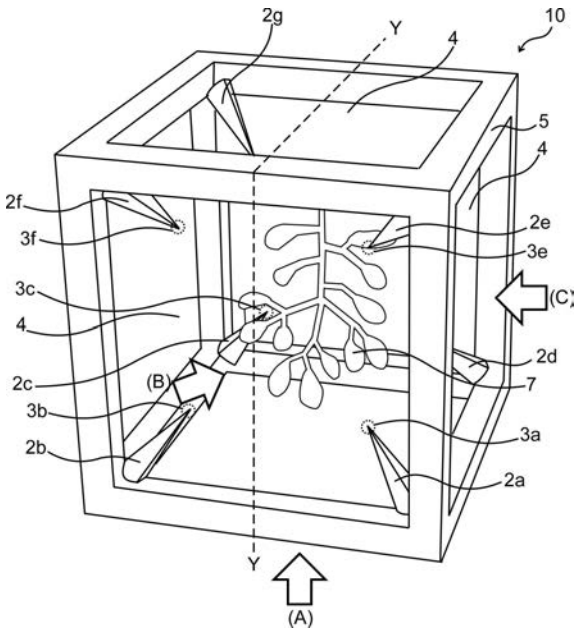
【 図 1 】



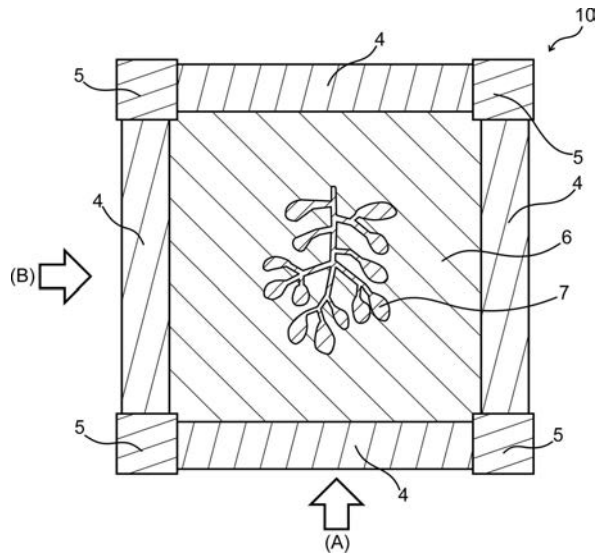
【 図 2 】



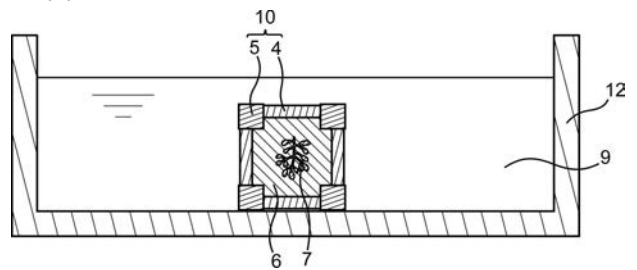
【 図 3 】



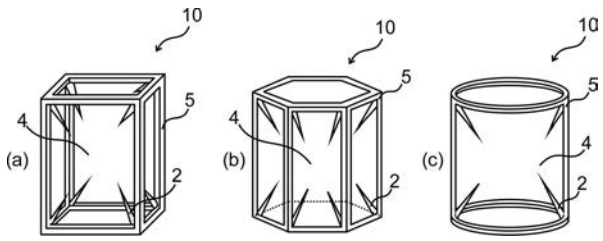
【 図 4 】



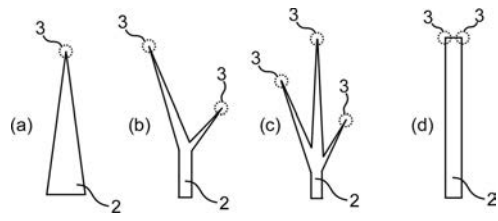
【 図 5 】



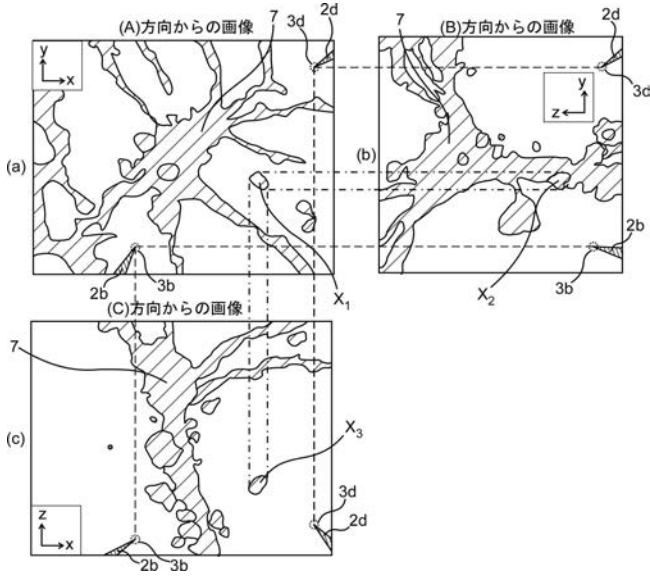
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 7 】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/043675
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C12M3/00 (2006.01) i, C12M1/34 (2006.01) i, C12N5/00 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12M3/00, C12M1/34, C12N5/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996		
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018		
Registered utility model specifications of Japan 1996-2018		
Published registered utility model applications of Japan 1994-2018		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAGIWARA, M. et al., Tissue incubate: in vitro 3D culturing platform with hybrid gel cubes for multidirectional observations, Adv. Healthc. Mater., 2016, vol. 5, issue 13, pp. 1566-1571, ISSN: 2192-2640, particularly, pp. 1566, 1567, fig. 2, 4	1-11
A	野畑李奈ほか, 多面観察可能な三次元培養観察プラットフォームによる細胞組織イメージング, 日本分子細胞生物学学会年会プログラム・要旨集, 2016, 3P-0480, entire text (NOBATA, Rina et al.), non-official translation (Cell tissue imaging by 3D culture platform enabling multi-directional observations, Program & Abstracts of Annual Meeting of Molecular and Cellular Biology Society of Japan)	1-11
<input checked="" 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 21.02.2018		Date of mailing of the international search report 06.03.2018
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/043675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	萩原将也ほか, 多面観察可能な3次元組織培養プラットフォームによる大域イメージング, 再生医療, February 2017, vol. 16, suppl., p. 275, 0-10-1, ISSN: 1347-7919, entire text (HAGIWARA, Masaya et al., Regenerative Therapy), non-official translation (Large scale imaging by 3D tissue culture platform enabling multi-directional observations)	1-11
A	田端泰彦編, 遺伝医学MOOK別冊 細胞の3次元組織化-その最先端技術と材料技術 再生医療とその支援分野 (細胞研究, 創薬研究)への応用と発展のために, 第1版, 株式会社メディカル ドウ, 2014, ISBN: 978-4-944157-71-6, pp. 354-358, particularly, pp. 356-358 (MEDICAL DO, CO., LTD.), non-official translation (edited by TABATA, Yasuhiko, Genetic medicine MOOK separate volume, Three-dimensional organization of cells -its state-of-the-art technology and material technology: for application and development to regenerative therapy and its support fields (cell research, drug discovery research), first edition)	1-11
A	JP 2007-527991 A (DAKO DENMARK A/S) 04 October 2007, claims, paragraphs [0291]-[0298], examples & WO 2005/003773 A1, claims, pages 70-72, examples & US 2006/0154234 A1 & EP 1642131 A1	1-11
A	US 2012/0081518 A1 (LIU, Y. A.) 05 April 2012, claims & CN 102445161 A & TW 201215868 A	1-11
P, A	WO 2017/094451 A1 (OSAKA PREFECTURE UNIVERSITY) 08 June 2017, claims, paragraphs [0009]-[0026], drawings (Family: none)	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 4 3 6 7 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)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. C12M3/00, C12M1/34, C12N5/00											
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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)、CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、DWPI (Thomson Innovation)											
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									
A	HAGIWARA, M., et al., Tissue in Cube: In Vitro 3D Culturing Platform with Hybrid Gel Cubes for Multidirectional Observations, Adv. Healthc. Mater., 2016, vol.5, issue 13, p.1566-1571, ISSN 2192-2640, 特に p.1566, 1567, 図2, 図4	1-11									
A	野畑李奈ほか, 多面観察可能な三次元培養観察プラットフォームによる細胞組織イメージング, 日本分子細胞生物学学会年会プログラム・要旨集, 2016, 3P-0480, 全文	1-11									
<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 21.02.2018		国際調査報告の発送日 06.03.2018									
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) 池上 文緒	4B 3765								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/043675
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
A	萩原将也ほか, 多面観察可能な3次元組織培養プラットフォームによる大域イメージング, 再生医療, Feb-2017, vol.16, Suppl., p.275(0-10-1), ISSN 1347-7919, 全文	1-11
A	田端泰彦編, 遺伝医学MOOK別冊 細胞の3次元組織化—その最先端技術と材料技術 再生医療とその支援分野 (細胞研究, 創薬研究) への応用と発展のために, 第1版, 株式会社メディカル ドゥ, 2014, ISBN 978-4-944157-71-6, p.354-358, 特に p.356-358	1-11
A	JP 2007-527991 A (ダコ デンマーク アクティーゼルスカブ) 2007.10.04, 特許請求の範囲, 段落[0291]-[0298], 実施例 & WO 2005/003773 A1, 特許請求の範囲, p.70-72, 実施例 & US 2006/0154234 A1 & EP 1642131 A1	1-11
A	US 2012/0081518 A1 (YUAN-AN LIU) 2012.04.05, 特許請求の範囲 & CN 102445161 A & TW 201215868 A	1-11
P, A	WO 2017/094451 A1 (公立大学法人大阪府立大学) 2017.06.08, 特許請求の範囲, 段落[0009]-[0026], 図面 (ファミリーなし)	1-11

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72)発明者 萩原 将也

大阪府堺市中区学園町1番1号 大阪府立大学内

(72)発明者 川原 知洋

福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 九州工業大学内

Fターム(参考) 4B029 AA01 AA03 AA21 BB11 CC02 CC03 CC10 DF10 DG10 EA20  
GA08 GB06 GB10  
4B065 AA90X BC46 BD21 BD50 CA44

(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。