

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月9日(09.05.2019)



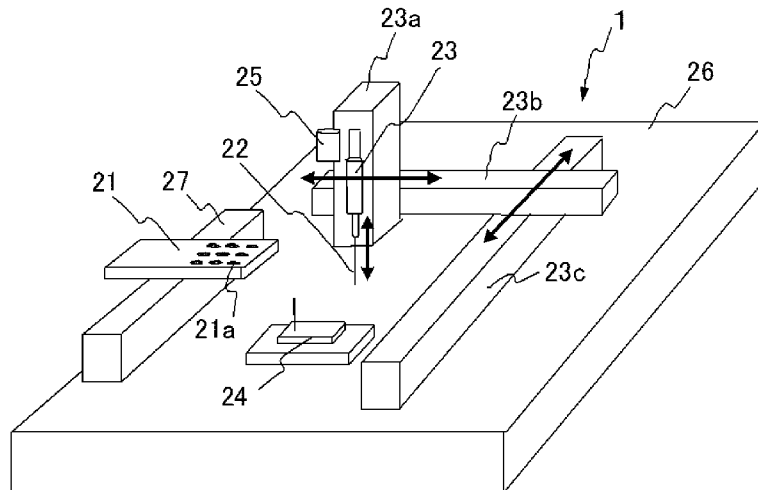
(10) 国際公開番号

WO 2019/087262 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/039168
- (22) 国際出願日: 2017年10月30日(30.10.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社サイフューズ (**CYFUSE BIOMEDICAL K.K.**) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岸井 保人 (**KISHII Yasuto**); 〒1130033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ 株式会社サイフューズ内 Tokyo (JP). 徳永 周彦 (**TOKUNAGA Norihiko**); 〒1130033 東京都文京区本郷7-
- (74) 代理人: 岡部 譲, 外 (**OKABE Yuzuru et al.**); 〒1070062 東京都港区南青山1-1-1 新青山ビル東館8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: CELL STRUCTURE PRODUCTION DEVICE

(54) 発明の名称: 細胞構造体製造装置



(57) Abstract: This cell structure production device is provided with: multiple thin long needles having a sharp tip; a puncturing part that, one or more times for each of the multiple needles, releasably holds an end opposite the needle tip, lowers the needle with respect to a cell tray holding cell clusters and causes the tip to puncture and pierce a cell cluster, and lifts the needle after the puncturing; a base part having face that can hold the needle by being transfixes with the tip of the needle thus receiving the tip; and a control unit for aligning each of the multiple needles on the base part by moving the puncturing part so that each of the multiple needles piercing the cell clusters is at a prescribed position on the base part, lowering each of the multiple needles by a prescribed distance so that the tip thereof transfixes the base part at the prescribed position on the base part, and controlling the puncturing part so that after the base part is transfixes by the tip, the releasable hold on the needles is released.

WO 2019/087262 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約 : 細胞構造体製造装置は、細長く先端が尖った複数のニードルと、前記複数のニードルのそれぞれについて、一回以上、前記ニードルの前記先端と反対側の端部を着脱可能に保持して細胞塊が保持された細胞トレイに対して前記ニードルを下降させて前記先端で前記細胞塊を穿刺して貫通して穿刺後に前記ニードルを上昇させる穿刺部と、前記ニードルの前記先端が突き刺さることで前記先端を受容して前記ニードルを保持可能な面を有するベース部と、前記複数のニードルのそれぞれについて、前記細胞塊が穿刺された前記複数のニードルのそれぞれが前記ベース部の上で所定の位置となるように前記穿刺部を移動させ、前記ベース部の所定の位置で前記先端を前記ベース部の上に突き刺すように前記複数のニードルのそれぞれを所定の量だけ下降させ、前記先端が前記ベース部の上に突き刺さった後に前記保持を解除するように穿刺部を制御して、前記ベース部の上で前記複数のニードルのそれぞれの整列を行う制御部と、を備える。

明 細 書

発明の名称：細胞構造体製造装置

技術分野

[0001] 本発明は、細胞の立体構造体を製造するために用いられる細胞構造体製造装置およびその方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、特許文献1に開示されるように、隣接するように接触した細胞塊同士が融合する性質を利用し、基板の法線方向に延在するように予め固定されている複数の針状体からなる支持体を利用し、複数の細胞塊が隣接するように細胞塊を立体的に積層して立体構造体を作製する手法が知られている。この手法では、細胞塊を取り出してその支持体の複数の針状体の各々に、吸引等で保持した複数の細胞塊のそれぞれを複数の針状体のそれぞれに突き刺して細胞塊が串刺しになった支持体を製作するものである。その状態で培養して細胞塊が互いに融合した後に針状体から細胞塊を引き抜くことによって、細胞の立体構造体を得る手法である。

[0003] これに対し、特許文献2では、培養プレート上に移動しないように並べられた細胞塊に一本の細い針状体を鉛直方向に昇降させて、細胞塊が串刺しになった一本の針状体を作製し、それを繰り返して整列枠に整列させて培養する手法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第4517125号明細書

特許文献2：国際公開第2016/047737号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1で開示される手法では針状体は支持体の所定の位置に予め固定されているので、細胞塊を穿刺できる位置は針状体の位置となり、細胞塊の

位置として選択できる位置の自由度が少ない。また、この手法では、特殊な形の細胞立体構造体を作製したい場合には、予め支持体を準備しておかなければならず、リードタイムが長くなる問題がある。

[0006] これに対し、特許文献2で開示される手法では、針状体で細胞塊を穿刺して、細胞塊が串刺しになった針状体を整列枠にはめ込んで保持するため、整列枠における針状体の保持部としての設定位置により、細胞塊の位置として選択できる位置の自由度が少ない。また、この手法では、特殊な形の細胞立体構造体を作製したい場合には、それに合わせた整列枠を予め準備しておかなければならず、特許文献1で開示される手法と同様にリードタイムが長くなる。

[0007] 本発明はこれらの課題に鑑みてなされたものであり、穿刺した細胞塊を自由な形状で適切に突き刺すことのできる細胞構造体製造装置と、これで使用される細胞トレイを提供するものである。

課題を解決するための手段

[0008] 細長く先端が尖った複数のニードルと、前記複数のニードルのそれぞれについて、一回以上、前記ニードルの前記先端と反対側の端部を着脱可能に保持して細胞塊が保持された細胞トレイに対して前記ニードルを下降させて前記先端で前記細胞塊を穿刺して貫通して穿刺後に前記ニードルを上昇させる穿刺部と、前記ニードルの前記先端が突き刺さることで前記先端を受容して前記ニードルを保持可能な面を有するベース部と、前記複数のニードルのそれぞれについて、前記細胞塊が穿刺された前記複数のニードルのそれぞれが前記ベース部の上で所定の位置となるように前記穿刺部を移動させ、前記ベース部の所定の位置で前記先端を前記ベース部の上に突き刺すように前記複数のニードルのそれぞれを所定の量だけ下降させ、前記先端が前記ベース部の上に突き刺さった後に前記保持を解除するように穿刺部を制御して、前記ベース部の上で前記複数のニードルのそれぞれの整列を行う制御部と、を備える細胞構造体製造装置により解決する。

[0009] 細長く先端が尖った複数のニードルと、前記複数のニードルを移動させる

穿刺部と、前記ニードルの前記先端が突き刺さることで前記先端を受容して前記ニードルの保持が可能な面を有するベース部と、を備える細胞構造体製造装置によって、細胞構造体を製造する方法であって、その方法は、前記複数のニードルの一について、一回以上、前記ニードルの前記先端と反対側の端部を着脱可能に保持して細胞塊が保持された細胞トレイに対して前記ニードルを下降させて前記先端で前記細胞塊を穿刺して貫通して穿刺後に前記ニードルを上昇させる穿刺工程と、前記穿刺工程の後に、前記細胞塊が穿刺された前記複数のニードルの一を前記ベース部の上の所定の位置に移動させ、前記ベース部の所定の位置で前記先端を前記ベース部の上に突き刺すように前記複数のニードルの一を所定の量だけ下降させ、前記先端が前記ベース部の上に突き刺さった後に前記保持を解除する配置工程と、を備え、前記方法は、前記ベース部に保持された前記複数のニードルのそれぞれの間隔が所定の距離となるように前記穿刺工程と前記配置工程とを前記複数のニードルのすべてに対して繰り返して行うことで前記複数のニードルの整列を行う細胞構造体の製造方法により解決する。

発明の効果

[0010] 本発明の細胞トレイによれば、細胞構造体の製造において、細胞塊の配置の自由度を高くすることができる

図面の簡単な説明

[0011] [図1]細胞構造体製造装置を示した図である。

[図2]細胞構造体製造装置の構成ブロック図である。

[図3A]細胞塊をニードルで突き刺す工程を示した図である。

[図3B]細胞塊をニードルで突き刺す工程を示した図である。

[図3C]細胞塊をニードルで突き刺す工程を示した図である。

[図3D]細胞塊をニードルで突き刺す工程を示した図である。

[図4A]細胞塊の穿刺完了後のニードルをベース部に配置する工程を示した図である。

[図4B]細胞塊の穿刺完了後のニードルをベース部に配置する工程を示した図

である。

[図4C]細胞塊の穿刺完了後のニードルをベース部に配置する工程を示した図である。

[図4D]細胞塊の穿刺完了後のニードルをベース部に配置する工程を示した図である。

[図5A]細胞塊を穿刺する際のニードルと細胞塊の位置関係を示した図である。

[図5B]細胞塊を穿刺する際のニードルと細胞塊の位置関係を示した図である。

[図6A]ニードルに穿刺された細胞塊同士の間隔の関係を示した図である。

[図6B]ニードルに穿刺された細胞塊同士の間隔の関係を示した図である。

[図6C]細胞塊同士の間隔の設定方法の概念を示した図である。

[図7A]細胞塊を穿刺してニードルに配置するまでのプロセスのフローチャートである。

[図7B]配置するニードルの個数とその位置を決定するプロセスのフローチャートである。

[図8]細胞シート構造体作製のニードル配置の例を示した図である。

[図9A]管状細胞構造体作製のニードル配置の例のプロセスの概略図である。

[図9B]管状細胞構造体作製のニードル配置の例のプロセスの概略図である。

[図10A]管状細胞構造体作製のニードル配置の例における細胞塊構成図である。

[図10B]二重細胞塊構成による管状細胞構造体作製のニードル配置の例における細胞塊構成図である。

[図11]管状細胞構造体作製のニードル配置の別の例を示した図である。

発明を実施するための形態

[0012] まず、本発明の細胞構造体の製造方法とそれを実現する細胞構造体製造装

置 1 について図 1 から図 2 を用いて説明する。図 1 は、細胞構造体製造装置 1 を示している。図 2 は、細胞構造体製造装置 1 の構成ブロック図を示している。細胞構造体製造装置 1 は、機構部 2 と、回路部 3 とを備えている。細胞塊（スフェロイド）は沢山の細胞を培養して凝集して球状の細胞塊として形成されたもので、培養プロセスの後に細胞トレイ 2 1 の細胞受容部 2 1 a 内に移し変えられて保持される。機構部 2 は、ニードル 2 2 と、穿刺部 2 3 と、ベース部 2 4 とを備えている。機構部 2 は、検出部 2 5 を備えていても良い。回路部 3 は、制御部 3 1 と、処理部 3 2 と、記憶部 3 3 とを備えている。

[0013] 細胞トレイ 2 1 は、枠部材に細胞受容部 2 1 a が配置されたトレイである。細胞受容部 2 1 a には細胞塊が保持される。細胞受容部 2 1 a には、少なくとも 1 個以上の細胞塊が入れている。細胞受容部 2 1 a は孔の底面に不織布などニードル 2 2 が貫通しやすい多孔質材を配置したものや、底部にニードル 2 2 の先端の逃げ部となる窪みを有するものとすることができる。

[0014] ニードル 2 2 は、たとえばステンレスまたはタングステンから成る先端が尖った細長い針状体であって、細胞非接着性、防錆性、低溶出性を有し、細胞塊を突き刺すに足る剛性を有する。ニードル 2 2 の断面径は、細胞塊を突き刺したときに細胞塊を破壊せず、そして細胞塊の融合を妨げない任意の径を有しており、直径 50 マイクロメートルから 300 マイクロメートルの径を有している。細胞構造体製造装置 1 では、複数本のニードル 2 2 が用意されている。複数本のニードル 2 2 は、ニードルカートリッジ（不図示）に格納されていて、穿刺部 2 3 がニードルカートリッジに移動し、穿刺部 2 3 はニードルカートリッジから一本のニードル 2 2 を着脱可能に保持するようになっている。穿刺部 2 3 は台座 2 6 の上で、鉛直方向移動部 2 3 a, 水平方向移動部 2 3 b, 2 3 c により、水平方向 2 軸と鉛直方向 1 軸の 3 軸方向に移動が可能である。

[0015] ベース部 2 4 はシリコン材などでできた台座であって、ニードル 2 2 が自立するように容易に突き刺し可能であって、ニードル 2 2 の先端が突き刺

さるとニードル 2 2 が自立するようにニードル 2 2 を保持可能な部材である。穿刺部 2 3 は、細胞トレイ 2 1 の細胞受容部 2 1 a の上とベース部 2 4 の上との間を移動可能である。

[0016] 検出部 2 5 は、光センサなどの受光素子やカメラなどの撮像素子であって、細胞受容部 2 1 a の中の細胞塊を検出可能である。検出部 2 5 は、細胞塊を認識可能であれば、さまざまなタイプの検出手段を検出部 2 5 として使用することが可能である。どのような検出部 2 5 も、受光素子または撮像素子からの信号は記憶部 3 3 に格納される。処理部 3 2 は記憶部 3 3 から信号のデータを読み出して細胞塊の輪郭を取得することができる。処理部 3 2 で処理された細胞塊のデータは記憶部 3 3 に格納される。制御部 3 1 は、処理部 3 2 に基づいて、穿刺部 2 3 を移動させてニードル 2 2 の位置を制御する。

[0017] 次に図 3 A から図 3 D と図 4 A から図 4 D を参照して、細胞構造体製造装置 1 において、細胞塊 4 を保持している細胞受容部 2 1 a およびベース部 2 4 に対して、穿刺部 2 3 に保持されるニードル 2 2 がいかに動作するかを説明する。図 3 A から図 3 D は細胞塊 4 をニードル 2 2 で突き刺す工程を示した図である。図 4 A から図 4 D は、細胞塊 4 の穿刺完了後のニードル 2 2 をベース部 2 4 に配置する工程を示した図である。まず、制御部 3 1 は、穿刺すべき細胞塊 4 の位置を特定する。制御部 3 1 は、穿刺部 2 3 をその細胞塊 4 の上に移動させる。穿刺部 2 3 は所定の高さの待機位置に待機している。穿刺部 2 3 が穿刺すべき細胞塊 4 の上に移動したら、制御部 3 1 は穿刺部 2 3 を下降させるように制御する。穿刺部 2 3 はそれにしたがって、ニードル 2 2 が細胞塊 4 を貫通させるように、細胞トレイ 2 1 に対して下降して細胞塊 4 を穿刺する。ニードル 2 2 の所定の位置に細胞塊 4 が位置するまで、ニードル 2 2 が所定の降下量だけ降下した位置（降下位置）に位置すると、ニードル 2 2 は細胞塊 4 を貫通して細胞塊 4 がニードル 2 2 の所定位置に位置することになる。その後、制御部 3 1 は穿刺部 2 3 を上昇させるように制御する。穿刺部 2 3 はそれにしたがって、ニードル 2 2 が細胞トレイ 2 1 に対して上昇する。細胞塊 4 を穿刺したニードル 2 2 が次に穿刺すべき細胞塊 4

の上に位置するように、制御部 3 1 は穿刺部 2 3 を移動させる。この工程を繰り返して、1 個以上の細胞塊 4 を 1 本のニードル 2 2 に穿刺させる。

[0018] 続いて、1 個以上の細胞塊 4 のニードル 2 2 への穿刺が完了したら、細胞塊 4 が穿刺されたニードル 2 2 がベース部 2 4 の上に位置するように穿刺部 2 3 を移動させる。制御部 3 1 は、穿刺部 2 3 を、処理部 3 2 によって算出されたベース部 2 4 上でのニードル 2 2 の所定位置まで移動させる。穿刺部 2 3 がその所定位置の上に移動を完了したら、穿刺部 2 3 が下降して、ニードル 2 2 の先端をベース部 2 4 に突き刺して配置する。ニードル 2 2 の先端が突き刺さったら、穿刺部 2 3 はニードル 2 2 の保持を解除する。この際、穿刺部 2 3 自体が下降してニードル 2 2 の先端をベース部 2 4 に仮刺しし、穿刺部 2 3 に配置される押圧部がさらにニードル 2 2 を本刺しする形態をとることができる。ベース部 2 4 に突き刺さったニードル 2 2 は鉛直方向に延在するように自立した状態でベース部 2 4 に配置されて保持される。他のニードル 2 2 について、細胞トレイ 2 1 上において細胞塊 4 のニードル 2 2 への穿刺が完了したら、そのニードル 2 2 について処理部 3 2 で算出された所定の位置に、穿刺部 2 3 を移動させて、同様にニードル 2 2 の先端をベース部 2 4 に突き刺して、ニードル 2 2 をベース部 2 4 に配置して保持させる。

[0019] 図 5 A と図 5 B を用いて、一本のニードル 2 2 に穿刺する細胞塊 4 の位置の制御について説明する。ニードル 2 2 に穿刺する細胞塊 4 の位置は、穿刺部 2 3 の降下量によって制御する。図 5 A はニードル 2 2 に穿刺される全ての細胞塊 4 が隣接する場合を示した図である。まず、基準位置からニードル 2 2 の先端までの長さを予め計算しておく。そして、ニードル 2 2 にすべての細胞塊 4 が隣接するように穿刺する場合には、穿刺部 2 3 の任意の基準位置からニードル 2 2 の先端側の細胞塊 4 の位置までの距離 L_1 を予め計算する。基準位置からニードル 2 2 の先端までの長さから距離 L_1 の長さを減じた量が穿刺部 2 3 の降下量となる。この細胞塊 4 に隣接するように穿刺すべき 2 つ目の細胞塊 4 の位置は、基準位置から細胞塊の直径 d_1 を距離 L_1 に加えた距離 L_2 となる。したがって、基準位置からニードル 2 2 の先端まで

の距離から距離 L_2 を減じた量が2つ目の細胞塊4に対しての穿刺部23の降下量となる。また、同様に、これに隣接するように穿刺すべき3つ目の細胞塊4の位置は、基準位置から細胞塊の直径 d_2 を距離 L_2 に加えた距離 L_3 の位置となり、基準位置からニードル22の先端までの長さから距離 L_3 を減じた量が3つめの細胞塊4に対しての穿刺部23の降下量となる。ここで、細胞塊4の直径 d_1 と d_2 は、実際には細胞塊ごとに異なるが、培養段階でほぼ同じ大きさに制御できるから、一律の直径とするように同じ直径として、すなわち平均値を算出して、それを使用してもよい。同様のプロセスを穿刺すべき細胞塊4の個数だけ繰り返す。

[0020] 図5Bはニードル22に細胞塊4同士が隣接しないように細胞塊4を穿刺した図である。まず、基準位置からニードル22の先端までの長さを予め計算しておく。ニードル22において細胞塊4が隣接しないように穿刺する場合にも、まず1個目の細胞塊4について、基準位置から細胞塊4においてニードル22の先端側にあたる位置までの距離 L_1 を予め計算しておき、基準位置からニードル22の先端までの長さとの差の量が1個目の細胞塊4に対する穿刺部23の降下量となる。次に、間隔 L をもって1個目の細胞塊4から離して2個目の細胞塊4を穿刺するときは、細胞塊4の直径 d_3 を加えた距離 L_4 を算出し、基準位置からニードル22の先端までの長さとの差の量が2個目の細胞塊4に対する穿刺部23の降下量となる。この場合も、細胞塊4の直径 d_1 と d_2 は、実際には異なるが、培養段階でほぼ同じ大きさに制御できるから、一律の直径とするように同じ直径として算出することができる。

[0021] 一のニードル22において穿刺されて隣接する細胞塊4、およびベース部24に配置された隣接する2本のニードル22において隣接する細胞塊4は、ある程度強く接触する状態が好ましい。そのため、細胞塊4同士の外形が単に接する程度では不十分で、所定の圧縮率で隣接する細胞塊4が接触する状態が好ましい。図6Aから図6Cを用いて、隣接する細胞塊4aと細胞塊4bとの間の距離について説明する。図6Aは細胞塊4同士が触れる程度の

位置関係を示した図である。図6Bは、好ましい細胞塊4同士の距離を示した図である。図6Cは細胞塊4に対しての要求仕様となる外形に対してニードル22の間隔寸法を決定する際の圧縮率の関係を示している。図6Aのように、幾何学的には細胞塊4同士が触れる程度の距離P1は細胞塊4の半径 d_{avr} の2倍（直径）に等しく、これがニードル22aとニードル22bとの間隔にとって最低限必須の距離に該当する。しかし、実際には、培養において細胞塊4が隣接する細胞塊4と融合するには、一定の圧力と接触面積をもって接触していることが好ましい。したがって、細胞塊4同士の好ましい間隔P2は、細胞塊4同士が触れる程度の距離P1から間隔tを除いた距離P2（ $P2 = P1 - t$ ）にすることが好ましく、1本のニードル22において、または隣接するニードル22aとニードル22bとの距離をP2とすることが好ましい。これを圧縮率 $\delta = P2 / P1 = (P1 - t / P1)$ と定義する。圧縮率 δ は細胞塊4によって所定の範囲が許容されるように決定されて、一般には20%以下の範囲で設定される。

[0022] 圧縮率はたとえば下記のように設定される。最終的に製造したい完成状態の細胞構造体の外形寸法または内径寸法が要求仕様の寸法として設定される。この要求寸法から、ニードル22の位置を決定する。ここでは、例として、外形寸法が要求仕様の寸法として設定される場合について説明する。たとえば、図6Cの製造したい完成状態の細胞構造体の外形41に対してはニードル22の間隔 u_1 が圧縮率 δ として決定される。すなわち、外形寸法から細胞塊4の半径を減算した位置が最外部のニードル22の中心位置となる。この最外部のニードル22の中心位置の幅を細胞塊4の直径で割った際に許容される圧縮率 δ が維持されるようなニードル22の距離を設定する。圧縮率が高くも無く、低くも無い最適な圧縮率 δ 、たとえば20%で、ニードル22の距離を選択することが好ましい。ところが、僅かに寸法が違う要求仕様の細胞構造体の外形42に対しては、要求仕様の差異がニードル22の間隔 u_1 の倍数が維持されない限り、ニードル22の間隔 u_1 と同じ圧縮率 δ を保持してニードル22の間隔を決定できない。したがって、そのような場合

には、圧縮率 δ を許容される範囲内で下げて設定する必要が生じる。すなわち、図6Cのような場合には、外形41と外形42とを比較すると、外形41に対するニードル22の間隔 u_1 について、同じ圧縮率 δ でのニードル22の間隔の維持はできないので、許容される範囲で圧縮率 δ を下げて、ニードル22の間隔 u_1 を間隔 u_2 にするように、外形寸法に合わせたニードル22の間隔寸法を設定する。

[0023] 続いて、図7Aと図7Bとを参照して、細胞構造体製造装置1により細胞塊4を穿刺して細胞構造体を製造する方法について説明する。図7Aは細胞塊4を穿刺して細胞構造体を製造する方法の各プロセスのフローチャートを示している。

[0024] まず、穿刺すべき細胞塊4の位置や大きさを特定し、ニードル22の降下量を決定する。ベース部24上にニードル22を配置するそれぞれのニードルの箇所を決定する決定ステップ(S1)を実行する。このステップで、前記算出のとおり、一本のニードル22における降下量についても、隣接するニードル22aとニードル22bとの距離についても、細胞塊4の直径に圧縮率 δ と乗じた距離として設定する。このステップでは、用意した複数のニードル22の任意の一本のニードル22につき、何個の細胞塊4が穿刺され、細胞塊4がニードル22のどの位置に穿刺されるかが決定される。そして、このステップでは、細胞塊4が穿刺されたニードル22のそれぞれにつき、ベース部24上において配置する配置位置を決定しておく。

[0025] 続いて、前ステップで特定された穿刺部23を穿刺する細胞受容部21a上の細胞塊4の上に移動させるステップ(S2)を実行する。そこで、ニードル22を前ステップで算出した降下量だけ降下して、細胞塊4にニードル22を貫通させるステップ(S3)を実行する。ニードル22が所定の降下量だけ降下を完了した後に、ニードル22を待機位置に上昇させるステップ(S4)を実行する。ニードル22に所定の個数の細胞塊4が所定の位置に穿刺されるまで、ステップ(S2)からステップ(S4)を繰り返す(S5)。所定の個数の細胞塊4をニードル22に穿刺したら、予め決定ステップ

(S1)において決定したベース部24の上の所定位置に穿刺部23を移動させる(S6)。そして、穿刺部23を所定量だけ降下させて、ベース部24にニードル22の先端を突き刺す(S7)。ニードル22の先端がベース部24に突き刺した後に穿刺部23を所定量だけ上昇させる(S8)。

[0026] 決定ステップ(S1)は、詳細には、穿刺すべき細胞塊4の位置や大きさを特定する。図7Bは、そのうち、穿刺すべき細胞塊4の位置についてのデータを処理する部分のフローチャートを示している。まず、穿刺を行う細胞トレイ21の一の細胞受容部21aを特定する(S101)。検出部25で細胞受容部21a上の細胞塊4を認識する。検出部25をカメラとした場合には映像で細胞塊4の輪郭を認識する(S102)。そこから、穿刺すべき細胞塊4の中心位置、たとえば重心位置を特定し、細胞塊4の直径を算出する。複数の細胞塊4に対してこれを行ってもよい。複数の細胞塊4の直径を統計的に処理して代表的な直径を決定する。たとえば、複数の細胞塊4の直径の平均値としてもよい(S103)。また、細胞塊4の直径は、予め測定した細胞塊4の直径に基づいて、ユーザが入力した値とすることもできる。細胞受容部21a上には一個の細胞塊4が載置されている場合もあり、複数の細胞塊4が載置されている場合もある。前者の場合には細胞受容部21a上の一個の細胞塊4の中心位置を特定し、後者の場合には細胞受容部21a上のすべての細胞塊4の中心位置と、その穿刺する細胞塊4の順番を決定する。細胞塊4の大きさのデータは記憶部33に格納され、細胞塊4の直径の値から統計的に平均値 d_{avr} を算出することも可能である。最終的に製造すべき細胞構造体の外形寸法から細胞塊4の半径を減算した位置を再外部となるニードル22の中心位置の包絡線として決定する(S104)。そして、細胞塊4の直径と圧縮率 δ により、前述のとおり、ニードル22の間隔を決定する(S105)。

[0027] 続いて、図8から図11を参照して、製造する細胞構造体のためのニードル22の配置例を説明する。図8は、細胞構造体シートを一度に複数枚作製するためのニードル22の配置である。この場合は、ニードル22の間隔 v

1 および間隔 v_2 はそれぞれ等間隔となる。ニードル 22 の間隔 v_1 および間隔 v_2 は最終的な完成状態で要求される外形に応じて、圧縮率 δ をそれぞれ設定して、間隔 v_1 および間隔 v_2 を決定する。また、図 8 に示すように、それぞれのニードル 22 において、間隔をあけて細胞塊 4 を配置すれば、複数のシートを一度に形成することができる。

[0028] 続いて、図 9 A と図 9 B は断面として正確な円が要求される中空管状細胞構造体を作製する場合のニードル 22 の配置であり、ベース部 24 の法線方向に、中空管の中心軸が延在するようにニードル 22 を配置したものである。図 10 A は、図 9 B の場合の中空管の中心軸に沿った方向からみた断面図を示している。この場合、図 9 A に示すように、ニードル 22 の包絡線 5 が円を形成するように、ベース部 24 に細胞塊 4 を穿刺したニードル 22 を所定の順序で環状に突き刺して配置する。所定の順序は最も効率的な順序で配置を行う。すなわち、環状形状を構成する複数のニードル 22 において、必ずしも隣接するニードル 22 の順序で配置を行うのではなく、ベース部 24 の面内における方向にそって配置を行ってもよい。図 9 B のように中空管が形成されるようにニードル 22 を配置する。ここでも、外形寸法が要求仕様の寸法として設定されている場合を例として説明するが、内径寸法を要求仕様の寸法としてもよい。これを管の中心軸方向から見た場合、管状の細胞構造体の要求仕様は管の外形 5 b の直径 R_{req} で決定されるので、その直径寸法から細胞塊 4 の直径 d_{avr} を除算した包絡線 5 a は直径 R_1 の円となる。ニードル 22 はこの直径 R_1 の包絡線 5 a 上に配置する。このとき、円周の長さは πR_1 になるので、これを細胞塊 4 の直径 d_{avr} で割るとニードル 22 の単純な間隔が算出できる。そして、これに圧縮率 δ をかけてニードル 22 の間隔 u を決定する。図 10 B は、図 10 A において細胞塊 4 を二重に配置した場合のニードル 22 の配置例である。圧縮率 δ とニードル 22 の間隔 u との関係につき複数の組み合わせが考えられるときは最適なものを決定する。たとえば、外径寸法を要求仕様の寸法としたときには圧縮率 δ が最小となる組み合わせを選択し、内径寸法を要求仕様の寸法としたときには圧縮率 δ が最

大となる組み合わせを選択することができる。この場合は、さらに、包絡線 5 a の内側に包絡線 5 c を配置するので、細胞塊 4 の直径 d_{avr} の 2 倍を除算した直径 R_2 が内側の管の直径となる。包絡線 5 c についても包絡線 5 a と同様に計算する。包絡線 5 c は直径 R_2 の円であるので、ここから円周の長さは πR_2 になるので、これを細胞塊 4 の直径 d_{avr} で割るとニードル 2 2 の単純な間隔が算出でき、圧縮率 δ を考慮してニードル 2 2 の間隔を決定する。圧縮率 δ とニードル 2 2 の間隔 u との関係につき複数の組み合わせが考えられるときは最適なものを決定する。この場合、内径寸法を要求仕様の寸法としたときには圧縮率 δ が最大となる組み合わせを選択することができる。

[0029] 図 1 1 は、中空管の中心軸がベース部 2 4 と平行になるようにニードル 2 2 を配置したものである。この場合も中空部をもった管路として形成できるので図 9 B の場合と同じであるが、ニードル 2 2 を連続に配置できる限り、長さに制限なく、長い中空管状細胞構造体を作製することができる。

符号の説明

- [0030] 1 細胞構造体製造装置
- 2 機構部
- 3 回路部
- 4 細胞塊
- 5 包絡線
- 2 1 細胞トレイ
- 2 2 ニードル
- 2 3 穿刺部
- 2 4 ベース部
- 2 5 検出部
- 3 1 制御部
- 3 2 処理部
- 3 3 記憶部

請求の範囲

[請求項1]

細長く先端が尖った複数のニードルと、

前記複数のニードルのそれぞれについて、一回以上、前記ニードルの前記先端と反対側の端部を着脱可能に保持して細胞塊が保持された細胞トレイに対して前記ニードルを下降させて前記先端で前記細胞塊を穿刺して貫通して穿刺後に前記ニードルを上昇させる穿刺部と、

前記ニードルの前記先端が突き刺さることで前記先端を受容して前記ニードルを保持可能な面を有するベース部と、

前記複数のニードルのそれぞれについて、前記細胞塊が穿刺された前記複数のニードルのそれぞれが前記ベース部の上で所定の位置となるように前記穿刺部を移動させ、前記ベース部の所定の位置で前記先端を前記ベース部の上に突き刺すように前記複数のニードルのそれぞれを所定の量だけ下降させ、前記先端が前記ベース部の上に突き刺さった後に前記保持を解除するように穿刺部を制御して、前記ベース部の上で前記複数のニードルのそれぞれの整列を行う制御部と、を備える細胞構造体製造装置であって、

前記所定の位置は、前記ベース部に保持された前記複数のニードルのそれぞれの間隔が所定の距離となっている位置である細胞構造体製造装置。

[請求項2]

請求項1に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記所定の量は、前記複数のニードルのそれぞれにおいて、前記ベース部の前記面から穿刺されているそれぞれの細胞塊の高さが同じとなるような量である細胞構造体製造装置。

[請求項3]

請求項1または2に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記所定の距離は前記細胞塊の直径に所定の圧縮率を乗じて得られた距離であって前記細胞塊の直径よりも短い距離である細胞構造体製造装置。

[請求項4]

請求項3に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記細胞塊の直径はユーザにより入力される直径の値である細胞構造体製造装置。

[請求項5]

請求項3に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記細胞構造体製造装置は前記細胞トレイに保持された複数の細胞塊の形状を検出する検出部を有し、

前記細胞塊の直径は前記検出部が検出した結果からの測定値に基づいて算出された前記複数の細胞塊の平均直径である細胞構造体製造装置。

[請求項6]

請求項1から5のいずれか一項に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記整列は、前記ベース部の上で、前記複数のニードルが直交する二方向に前記所定の距離をもった等間隔での整列である細胞構造体製造装置。

[請求項7]

請求項1から5のいずれか一項に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記整列は、前記ベース部に刺さっている前記複数のニードルのそれぞれの位置が前記ベース部の法線方向に円を形成する整列である細胞構造体製造装置。

[請求項8]

請求項7に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記複数のニードルの本数は、製作すべき細胞構造体の要求外形から前記細胞塊の直径を減じた直径に対する円周または要求内形から前記細胞塊の直径を加えた直径に対する円周を前記所定の距離で除して算出される細胞構造体製造装置。

[請求項9]

請求項1から5のいずれか一項に記載の細胞構造体製造装置であって、

前記整列は、前記ベース部に刺さっている前記複数のニードルのそれぞれの位置が前記ベース部の面と平行な方向が中心軸となる円の断面を形成する整列である細胞構造体製造装置。

- [請求項10] 細長く先端が尖った複数のニードルと、
前記複数のニードルを移動させる穿刺部と、
前記ニードルの前記先端が突き刺さることで前記先端を受容して前記ニードルの保持が可能な面を有するベース部と、を備える細胞構造体製造装置によって、細胞構造体を製造する方法であって、その方法は、
前記複数のニードルの一について、一回以上、前記ニードルの前記先端と反対側の端部を着脱可能に保持して細胞塊が保持された細胞トレイに対して前記ニードルを下降させて前記先端で前記細胞塊を穿刺して貫通して穿刺後に前記ニードルを上昇させる穿刺工程と、
前記穿刺工程の後に、前記細胞塊が穿刺された前記複数のニードルの一を前記ベース部の上の所定の位置に移動させ、前記ベース部の所定の位置で前記先端を前記ベース部の上に突き刺すように前記複数のニードルの一を所定の量だけ下降させ、前記先端が前記ベース部の上に突き刺さった後に前記保持を解除する配置工程と、を備え、
前記方法は、前記ベース部に保持された前記複数のニードルのそれぞれの間隔が所定の距離となるように前記穿刺工程と前記配置工程とを前記複数のニードルのすべてに対して繰り返して行うことで前記複数のニードルの整列を行う細胞構造体の製造方法。
- [請求項11] 請求項10に記載の細胞構造体の製造方法であって、
前記所定の量は、前記複数のニードルのそれぞれにおいて、前記ベース部の前記面から穿刺されているそれぞれの細胞塊の高さが同じとなるような量である細胞構造体の製造方法。
- [請求項12] 請求項10または11に記載の細胞構造体の製造方法であって、
前記所定の距離は前記細胞塊の直径に所定の圧縮率を乗じて得られた距離であって前記細胞塊の直径よりも短い距離である細胞構造体の製造方法。
- [請求項13] 請求項12に記載の細胞構造体の製造方法であって、

前記細胞塊の直径はユーザにより入力される直径の値である細胞構造体の製造方法。

[請求項14]

請求項12に記載の細胞構造体の製造方法であって、

前記細胞構造体製造装置は前記細胞トレイに保持された複数の細胞塊の形状を検出する検出部を有し、

前記方法は、前記検出部により検出した複数の細胞塊の形状の結果の測定値に基づいて前記複数の細胞塊の平均直径を算出する工程を備え、その平均直径を前記細胞塊の直径とした細胞構造体の製造方法。

[請求項15]

請求項10から14のいずれか一項に記載の細胞構造体の製造方法であって、

前記整列は、前記ベース部の上で、前記複数のニードルが直交する二方向に前記所定の距離をもった等間隔での整列である細胞構造体の製造方法。

[請求項16]

請求項10から14のいずれか一項に記載の細胞構造体の製造方法であって、

前記整列は、前記ベース部に刺さっている前記複数のニードルのそれぞれの位置が前記ベース部の法線方向に円を形成する整列である細胞構造体の製造方法。

[請求項17]

請求項15に記載の細胞構造体の製造方法であって、

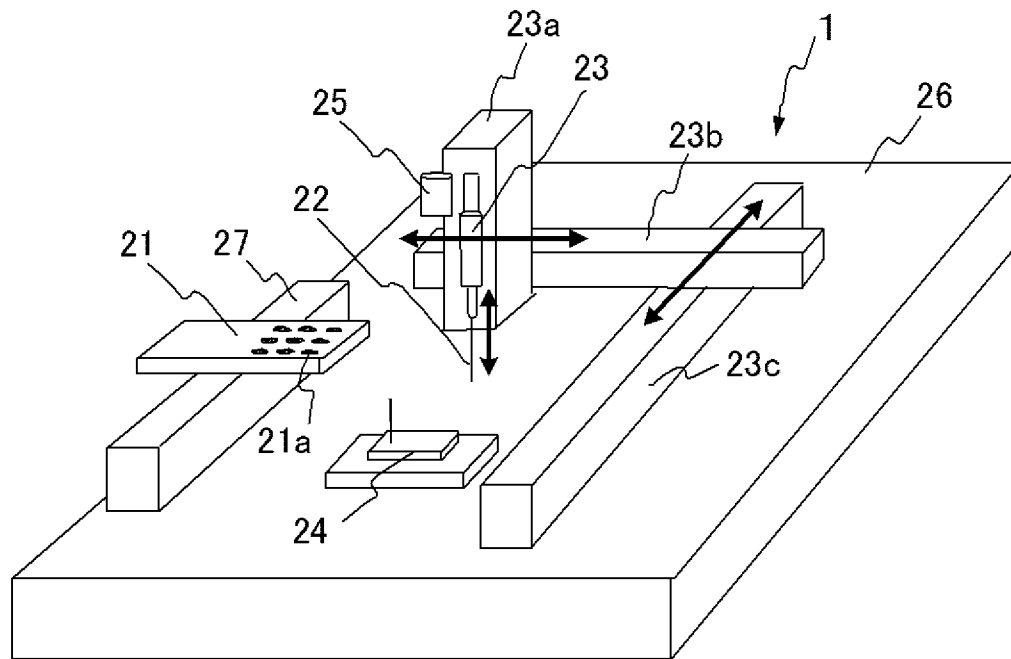
前記複数のニードルの本数は、製作すべき細胞構造体の要求外周直径から前記細胞塊の直径を減じた直径に対する円周を前記所定の距離で除して算出される細胞構造体の製造方法。

[請求項18]

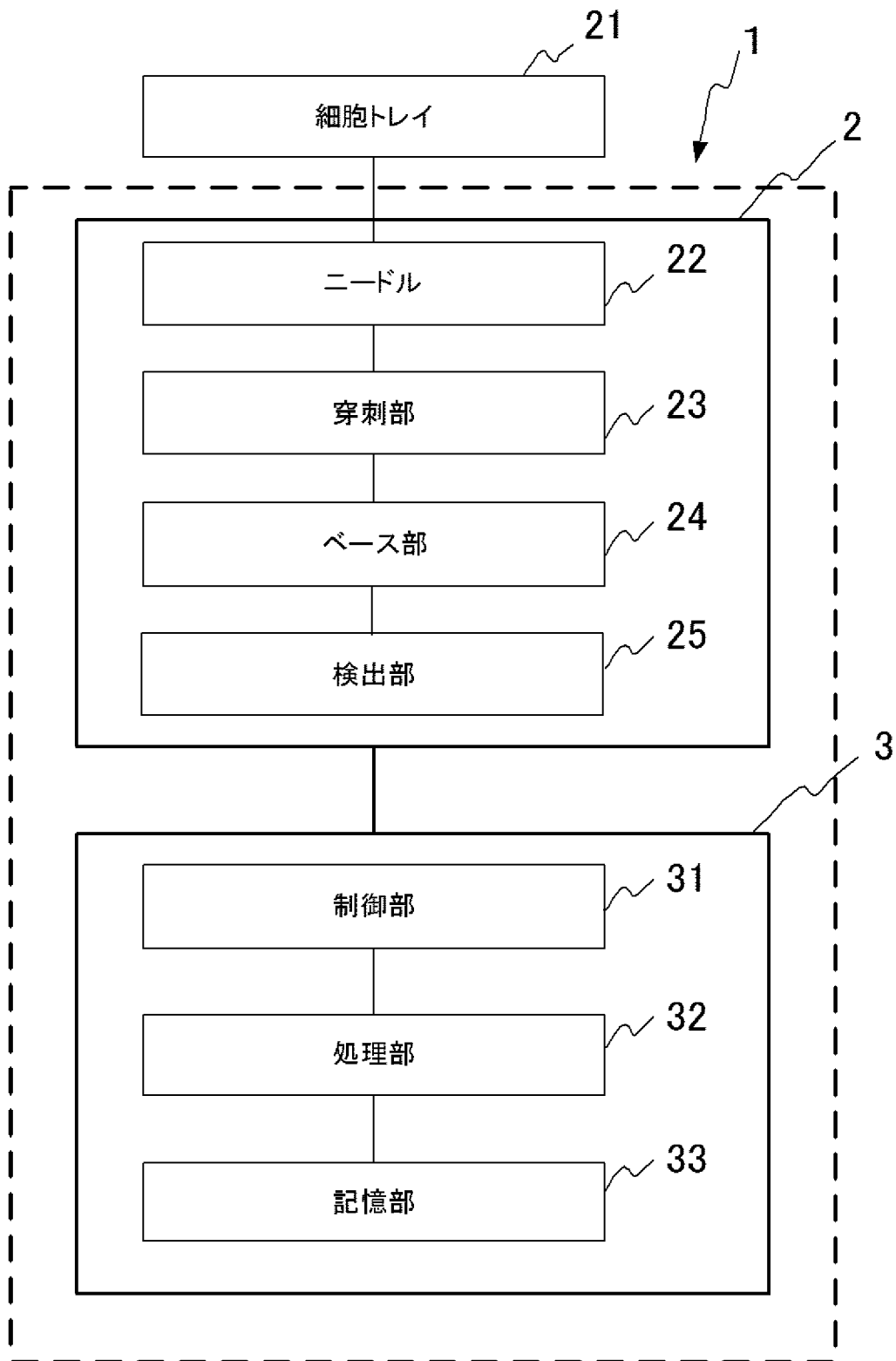
請求項10から14のいずれか一項に記載の細胞構造体の製造方法であって、

前記整列は、前記ベース部に刺さっている前記複数のニードルのそれぞれの位置が前記ベース部の面と平行な方向が中心軸となる円の断面を形成する整列である細胞構造体の製造方法。

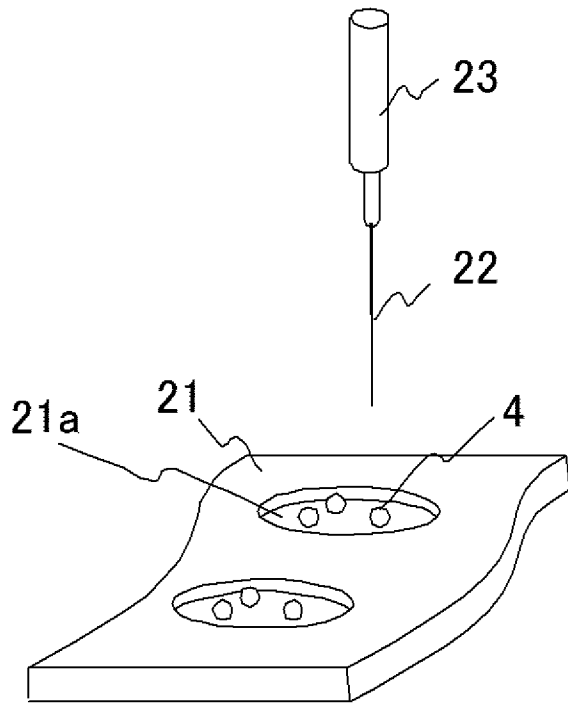
[図1]



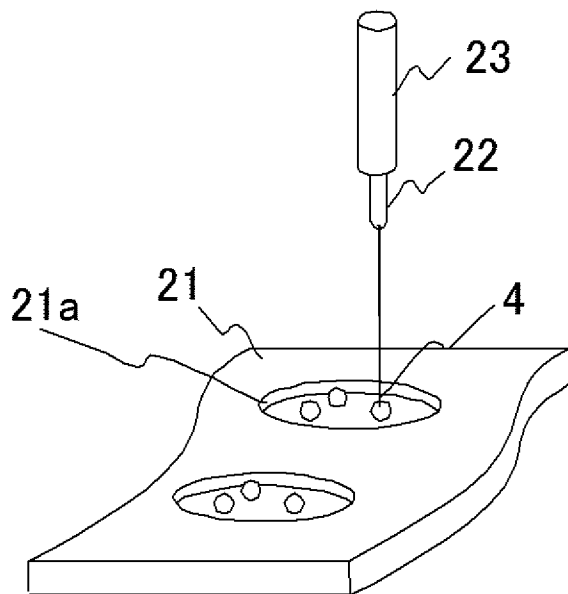
[図2]



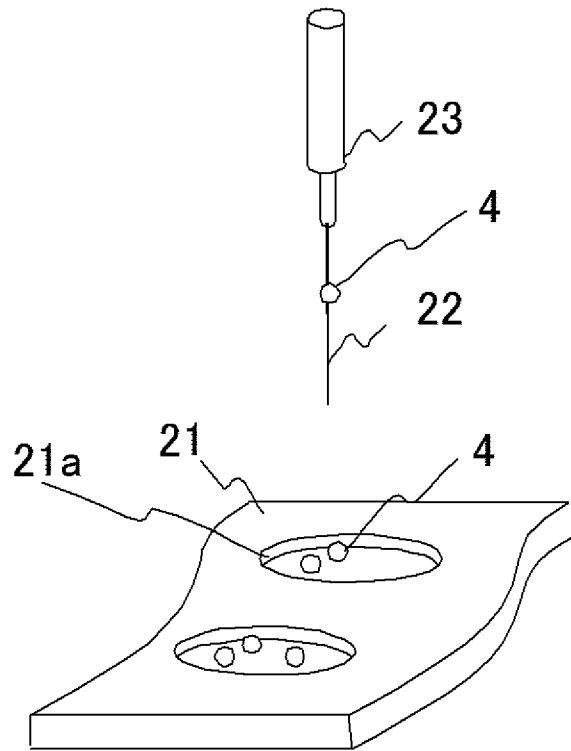
[図3A]



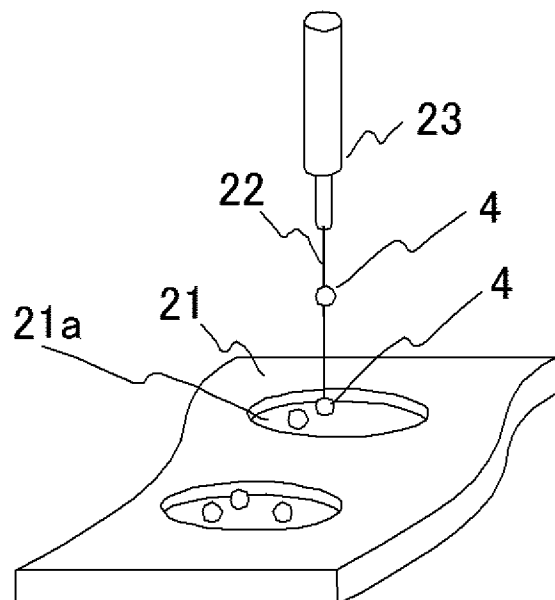
[図3B]



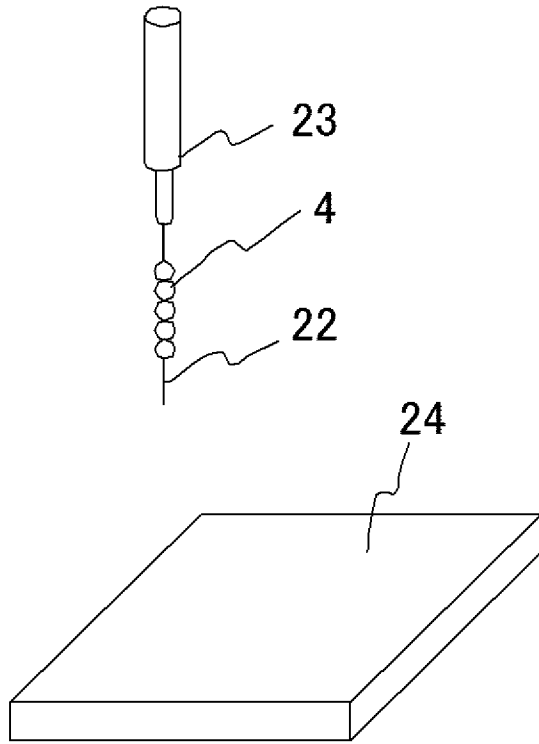
[図3C]



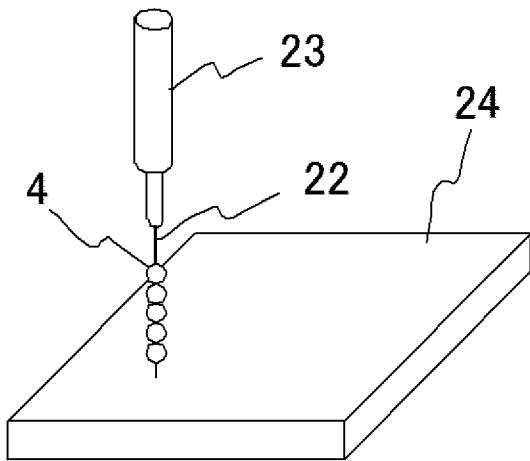
[図3D]



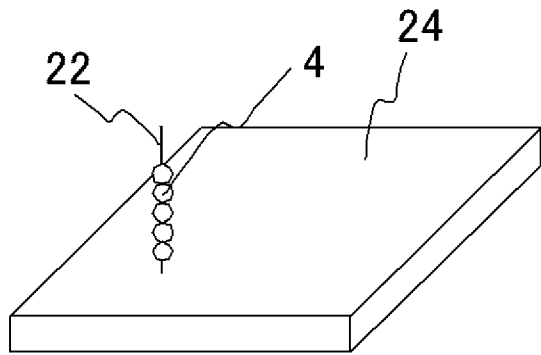
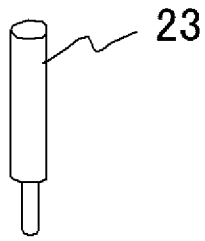
[図4A]



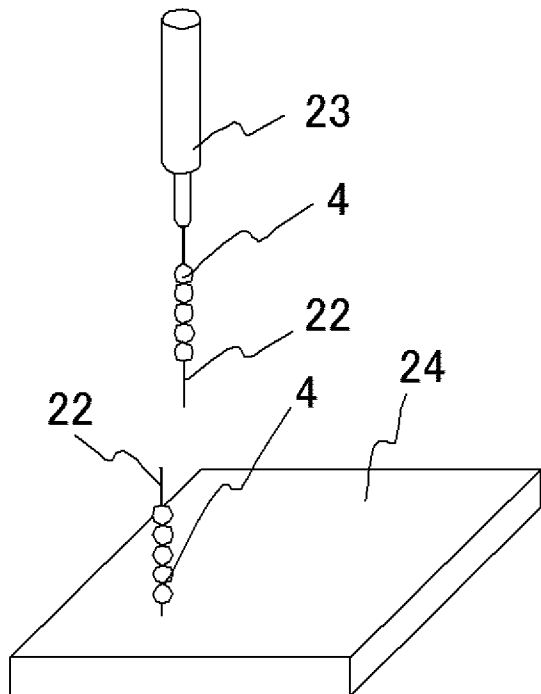
[図4B]



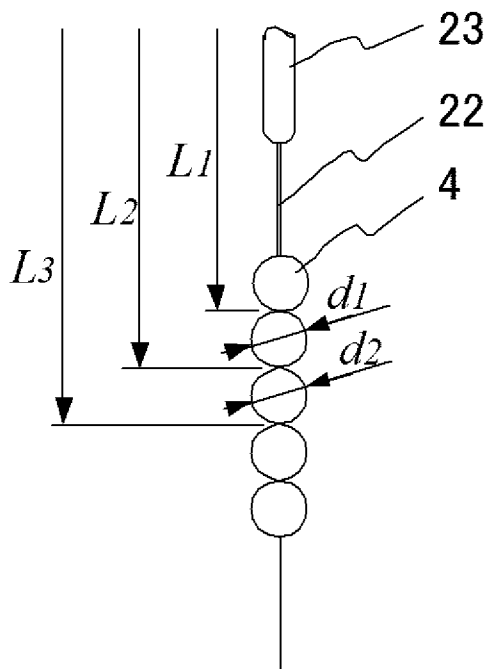
[図4C]



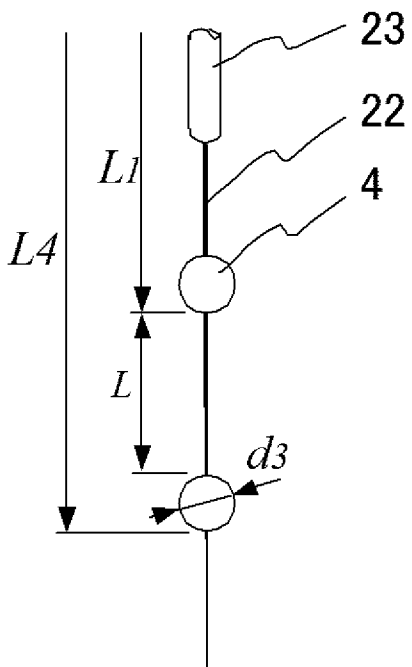
[図4D]



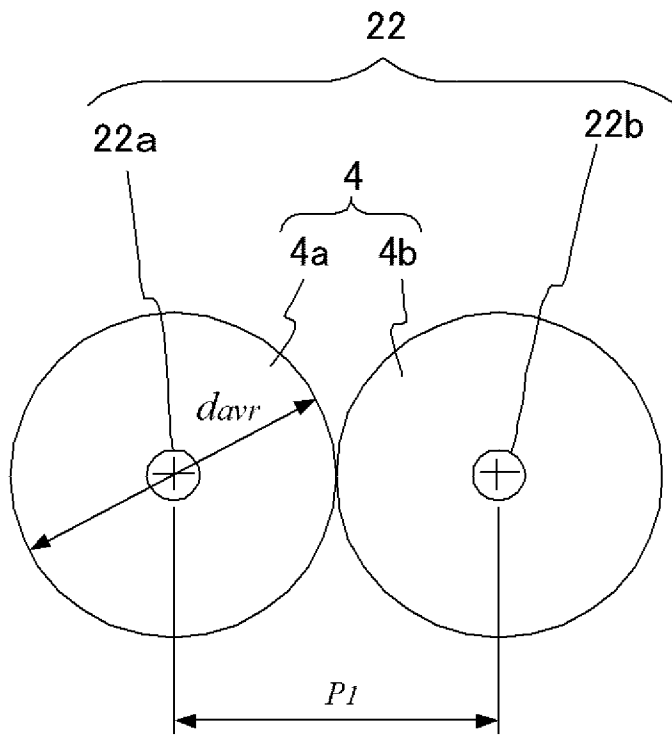
[図5A]



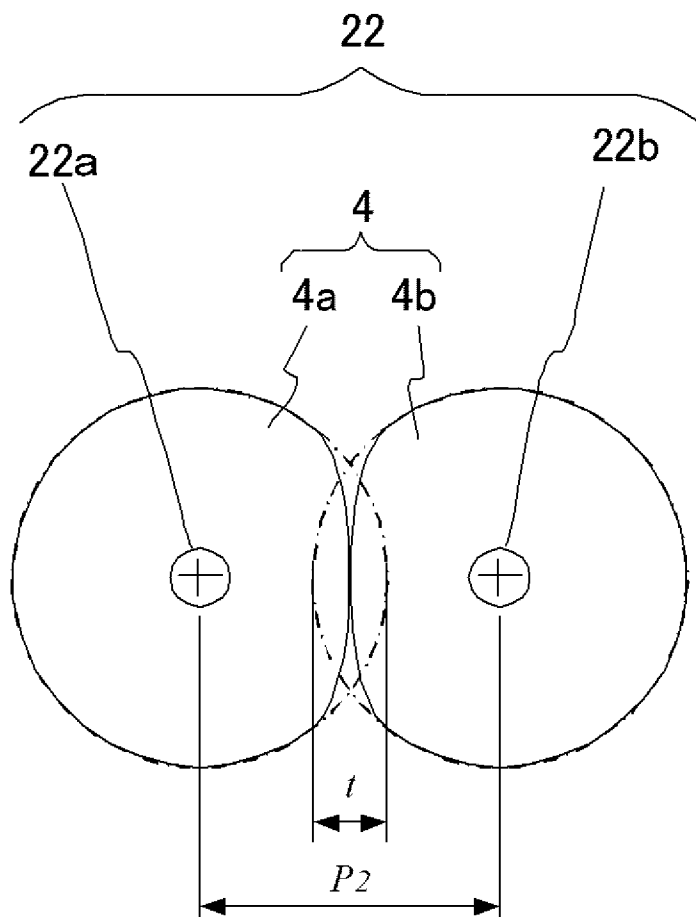
[図5B]



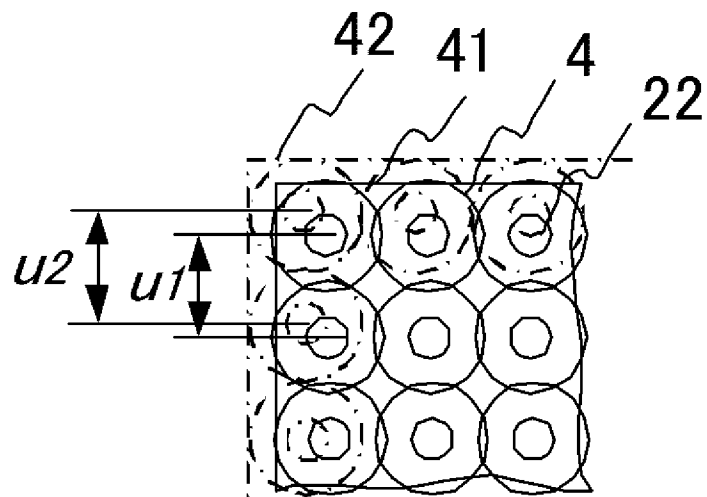
[図6A]



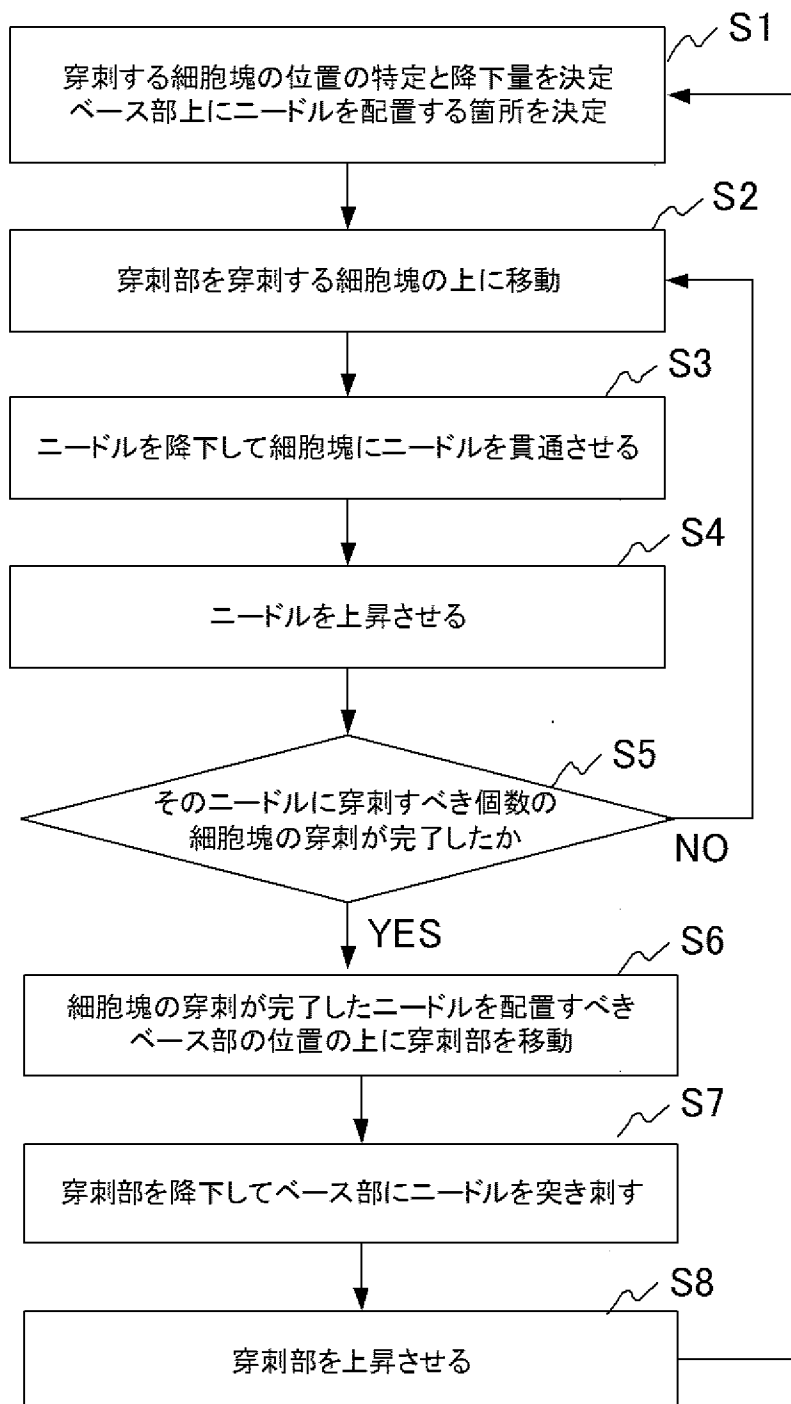
[図6B]



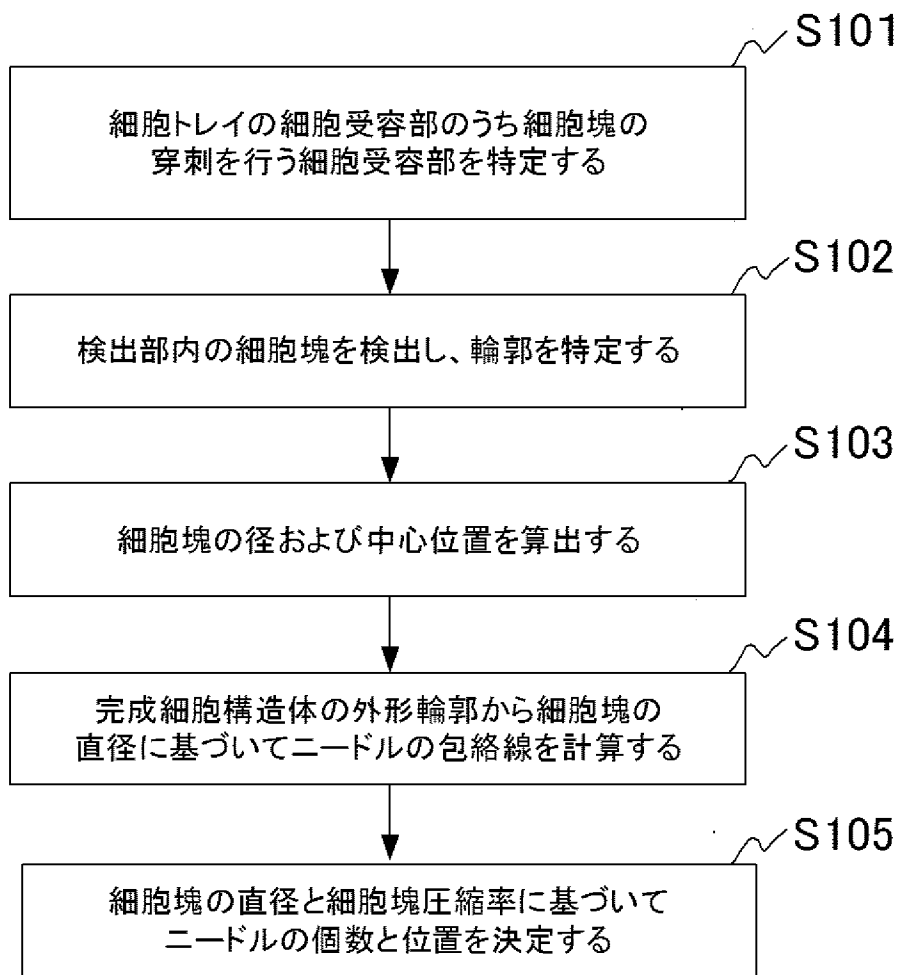
[図6C]



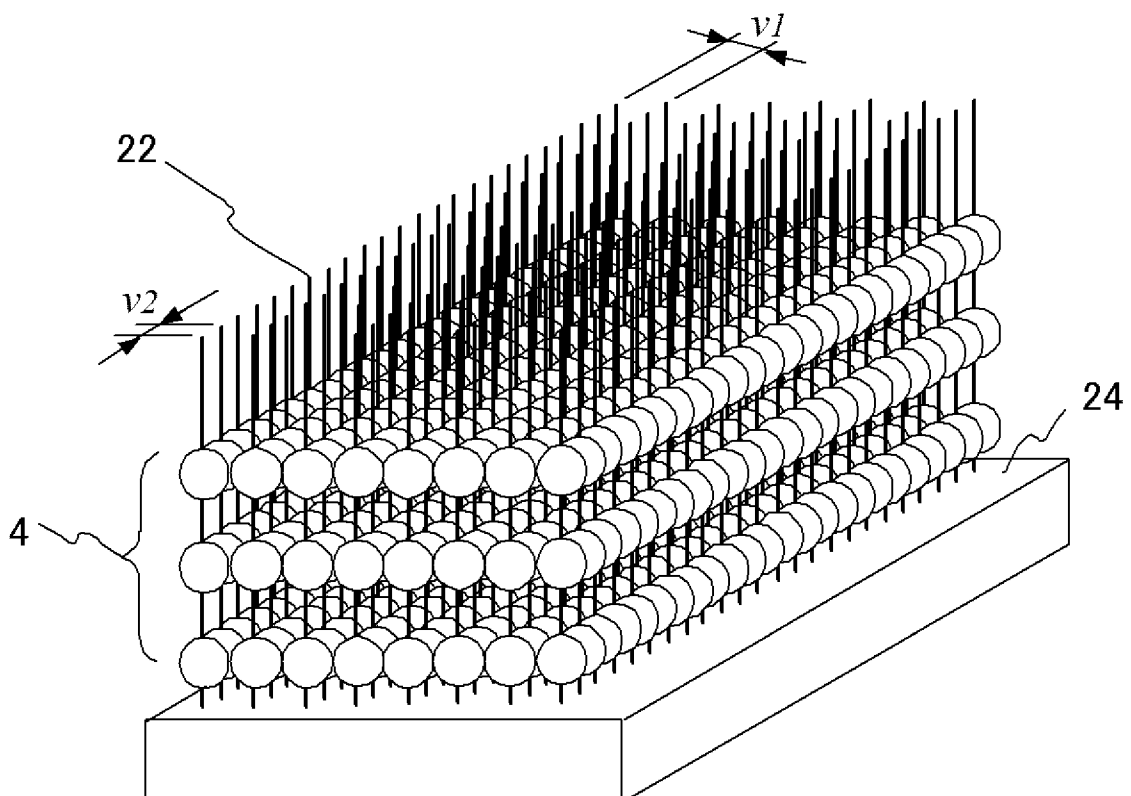
[図7A]



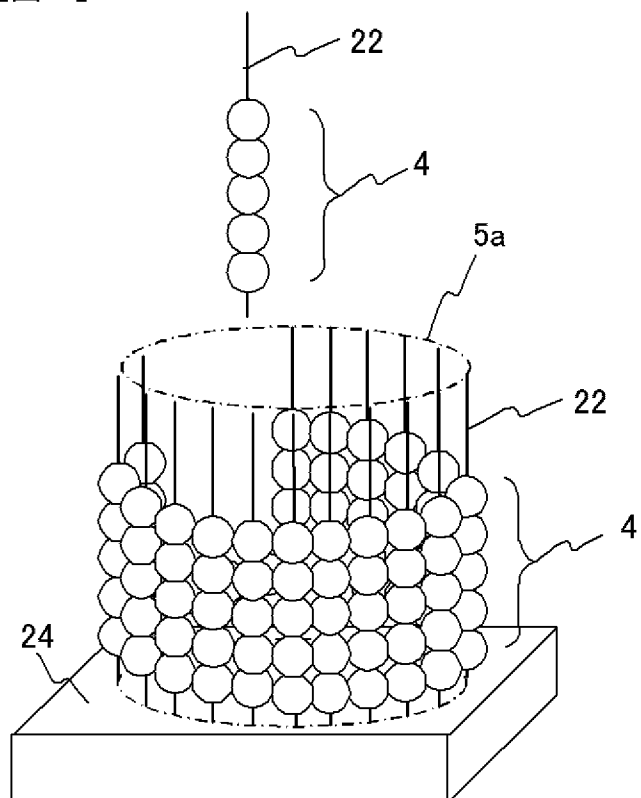
[図7B]



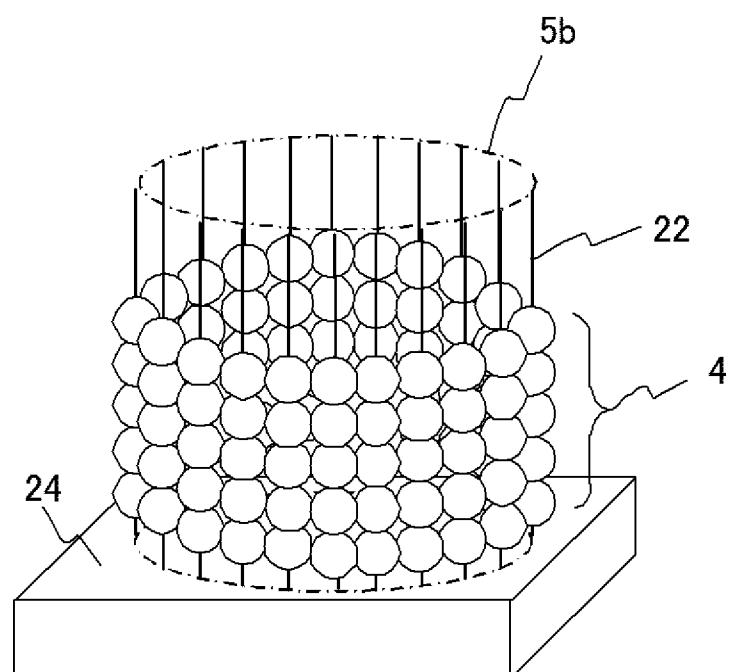
[図8]



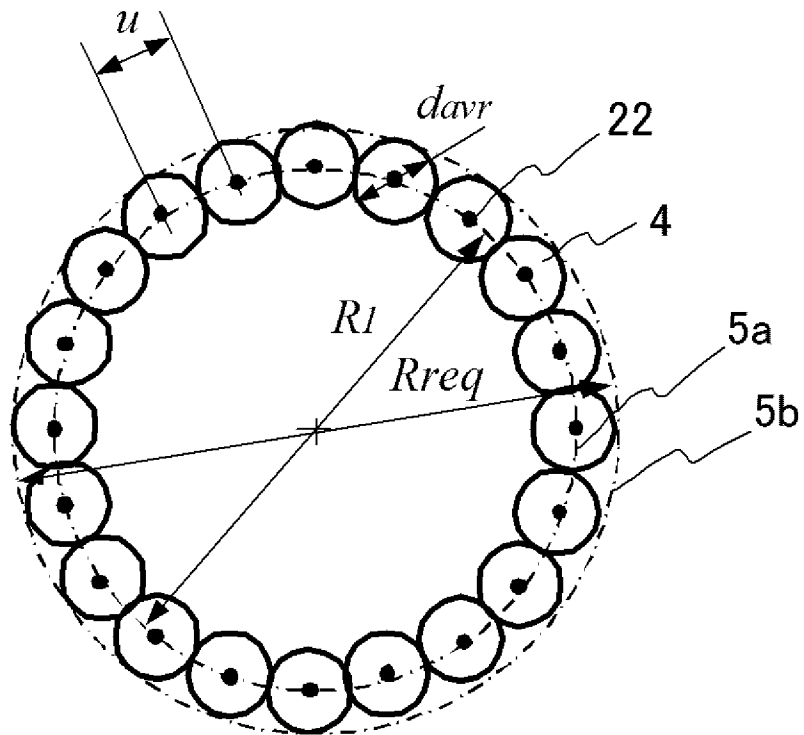
[図9A]



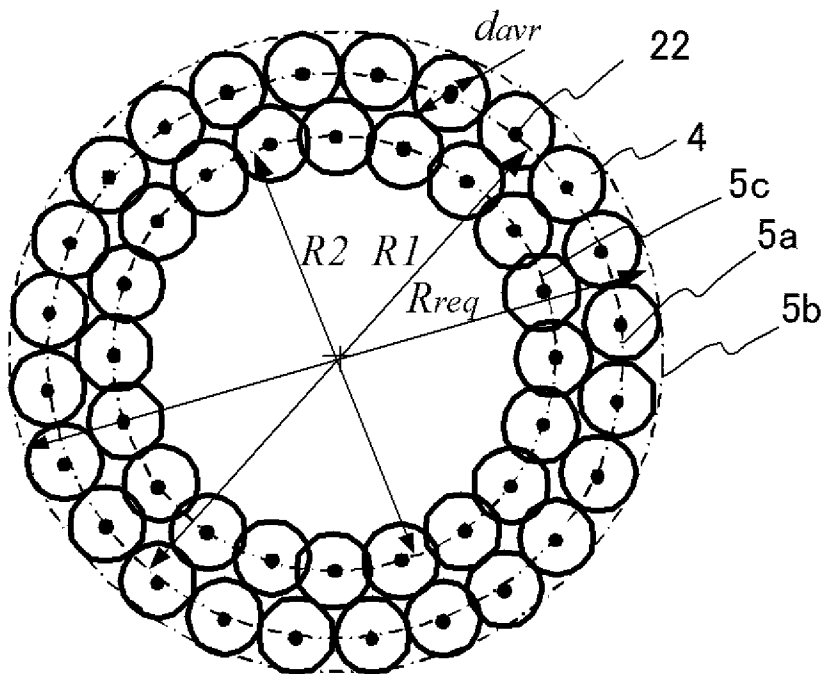
[図9B]



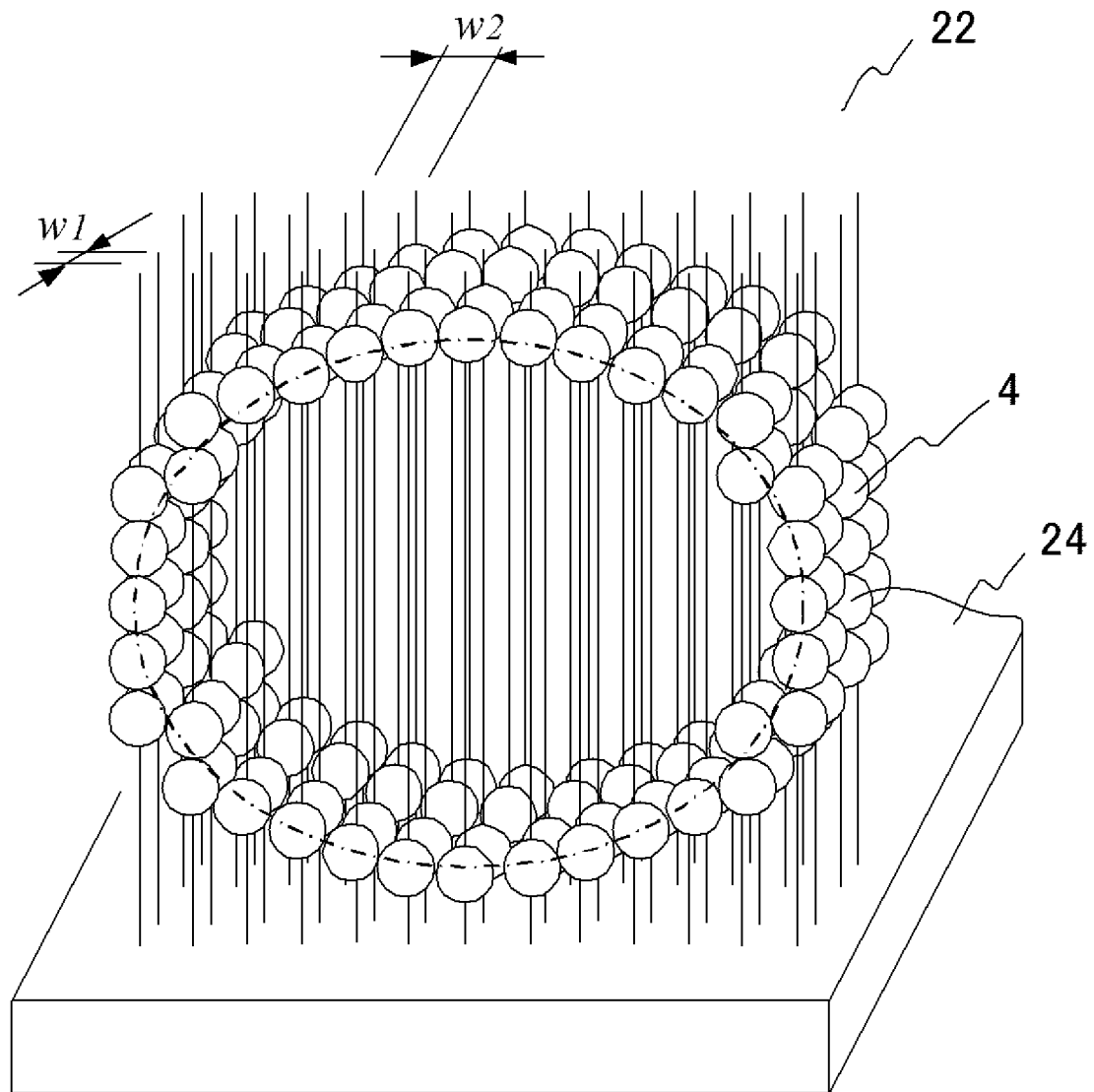
[図10A]



[図10B]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/039168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12M3/00 (2006.01) 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)

Int. Cl. C12M3/00

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), PubMed, CiNi i, CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/047737 A1 (CYFUSE BIOMEDICAL K.K.) 31 March 2016, claims 9-23, fig. 1-18, paragraphs [0025], [0032] & US 2016/0348066 A1, claims, paragraphs [0101], [0108], fig. 1-18 & EP 3091067 A1 & CN 106164239 A	1-18
A	WO 2017/134787 A1 (CYFUSE BIOMEDICAL K.K.) 10 August 2017, claims 9-23, fig. 1-18, paragraphs [0025], [0032] (Family: none)	1-18
A	藤川眞麗恵他, スフェロイド形成ロボットを用いたスフェロイドの作製, 再生医療, 01 February 2017, vol. 16 suppl., p. 421, P-02-108, entire text, non-official translation (FUJIKAWA, Marie et al. Spheroid Manufacture Using Spheroid Formation Robots, Regenerative Medicine.)	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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 12.01.2018	Date of mailing of the international search report 23.01.2018
---	--

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/JP2017/039168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	口石幸治, 企業紹介 バイオ 3D プリンティング技術による再生医療 —株式会社サイフューズ, 再生医療, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 57-59, fig. 1 (KUCHII, Koji. Company Introduction: Regeneration of think tissue using novel bio 3D printing technologies. Cyfuse Biomedical K.K. Regenerative Medicine.)	1-18
A	WO 2008/123614 A1 (KYUSHU UNIVERSITY) 16 October 2008, claims 1-21, fig. 1-3 & JP 8-123614 A1 & US 2011/0200559 A1 & EP 2130910 A1	1-18
A	ISHIHARA K. et al., Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold - free autologous construct derived from high- density bone marrow-derived mesenchymal stem cells., Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2014, 9:98, p. 1-10, fig. 1	1-18

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			
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			
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 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), PubMed, CiNii, Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	
A	WO 2016/047737 A1 (株式会社サイフューズ) 2016.03.31, 請求項9-23、図1-18、【0025】、【0032】 & US 2016/0348066 A1 claims, [0101], [0108], Figs. 1-18 & EP 3091067 A1 & CN 106164239 A	1-18	
A	WO 2017/134787 A1 (株式会社サイフューズ) 2017.08.10, 請求項9-23、図1-18、【0025】、【0032】 (ファミリーなし)	1-18	
A	藤川 眞麗恵 他, スフェロイド形成ロボットを用いたスフェロイドの作製, 再生医療, 2017.02.01, 第16巻増刊号, p.421, P-02-108, 全文	1-18	
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ 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 「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 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 12.01.2018		国際調査報告の発送日 23.01.2018	
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) 宮岡 真衣	4B 4044
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

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	口石 幸治, 企業紹介 バイオ3Dプリンティング技術による再生医療-株式会社サイフューズ, 再生医療, 2014, Vol. 13 No. 2, p. 57-59, 図1	1-18
A	WO 2008/123614 A1 (国立大学法人九州大学) 2008. 10. 16, 請求項1-21、図1-3 & JP 8-123614 A1 & US 2011/0200559 A1 & EP 2130910 A1	1-18
A	ISHIHARA K. et al, Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells., Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2014, 9:98, p.1-10, Fig. 1	1-18