

(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
2020年1月9日(09.01.2020)



(10) 国際公開番号

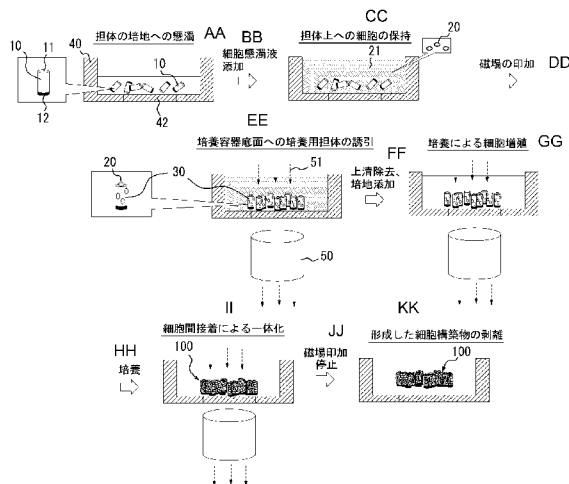
WO 2020/008723 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 11/02 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/018605
- (22) 国際出願日: 2019年5月9日(09.05.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2018-127773 2018年7月4日(04.07.2018) JP
- (71) 出願人: 横河電機株式会社(YOKOGAWA ELECTRIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1808750 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 茂木 豪介(MOGI Takeyuki); 〒1808750 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 杉 村 憲 司 (SUGIMURA Kenji); 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 霞が関コモンゲート西館36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, 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.
- (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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CELL STRUCTURE, CARRIER, AND METHOD FOR PRODUCING CARRIER

(54) 発明の名称: 細胞構築物の製造方法、担体、および担体の製造方法



- AA Suspend carriers in medium
BB Add cell suspension
CC Hold cells on carriers
DD Apply magnetic field
EE Attract culture carriers toward bottom face of culture container
FF Remove supernatant and add medium
GG Grow cells by culturing
HH Culture
II Unify by intercellular adhesion
JJ Stop magnetic field application
KK Strip cell structure thus formed

(57) Abstract: A method for producing a cell structure which comprises: in a container 40, applying a magnetic field to culture carriers comprising carriers 10, which have a magnetic part 12 formed in only a part thereof and a cell-holding part 11, and/or cell-holding carriers 30 so as to arrange the multiple carriers; and then culturing cells 20 which are held on the cell-holding parts 11 while maintaining the arranged state.

(57) 要約: 一部のみに形成された磁性部12と、細胞保持部11とを有する担体10、並びに、細胞保持担体30の少なくとも一方を含む培養用担体を、容器40内で磁場を印加して複数配列し、配列した状態を維持して、細胞保持部11に保持させた細胞20を培養する、細胞構築物の製造方法。

[続葉有]

WO 2020/008723 A1

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：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 補正された請求の範囲（条約第19条(1)）

明 細 書

発明の名称：

細胞構築物の製造方法、担体、および担体の製造方法

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2018年7月4日に日本国に特許出願された特願2018-127773号の優先権を主張するものであり、この先の出願の開示全体をここに参照のために取り込む。

技術分野

[0002] 本開示は、細胞構築物の製造方法、担体、および担体の製造方法に関する。

背景技術

[0003] 近年、再生医療、疾患モデル、薬効試験、安全性試験等の分野で用いる目的で、細胞をシート状、管状、球状などの所望の形状に組織化させた細胞構築物を構築する試みがなされている。

[0004] ここで、細胞を組織化するための方法として、特許文献1には、接着性の細胞が懸濁された溶液(細胞懸濁液)を、細胞非接着性の表面加工が施された培養容器へ導入し、細胞どうしを自律的に凝集させてスフェロイドを形成する方法が開示されている。また、特許文献2には、細胞塊としてのスフェロイドを基板上に備えられた針状体に刺して所望の形状になるように配置した後、培地中で培養を行うことにより、配置したスフェロイドどうしを融合させ、3次元的な細胞構築物を得る方法が開示されている。更に、特許文献3には、細胞に磁性ナノ粒子を付着させ、磁気の印加により、磁性を付与した細胞を浮遊させることによって、集合体(細胞構築物)を形成する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2017-532971号公報

特許文献2：特許第4 5 1 7 1 2 5 号公報

特許文献3：特表 2 0 1 2 - 5 0 3 4 9 2 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、特許文献 1 に記載の方法では、製造する組織の構造をコントロールすることができなかった。特許文献 2 に記載の方法では、生産のスループットが低く、また、細かい構造の形成は困難であった。更に、特許文献 3 に記載の方法では、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールすることができず、かつ、細胞への侵襲性が高かった。

[0007] そこで本開示は、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールでき、かつハイスループットで、さらに細胞への侵襲性も低い、細胞構築物の製造方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

[0008] 幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、一部のみに形成された磁性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場を印加して複数の前記培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、前記容器内で、前記培養用担体が配列した状態を維持して、前記培養用担体の前記細胞保持部に保持させた細胞を培養する工程（C）と、を含む。該構成によれば、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールでき、かつハイスループットで、さらに細胞への侵襲性も低い細胞構築物の製造方法を提供することができる。

[0009] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記担体は、柱状で、高さ方向中央よりも一端側に前記磁性部を有し、前記細胞保持部が高さ方向に延在していてもよい。このように、担体が柱状で、高さ方向中央よりも一端側に磁性部を有し、細胞保持部が高さ方向に延在していることにより、厚みのある細胞構築物を効率よく製造することができる。

[0010] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記工程（B）は、前

記容器に対して振動を加える工程（b 1）を含んでいてもよい。このように、容器に対して振動を加えることにより、培養用担体を精度よく配列することができるので、製造する細胞構築物の形状のばらつきを小さくすることができる。

[0011] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法では、前記工程（B）において、前記磁場を印加したまま前記振動のオンオフを切り替えてもよい。このように、工程（B）において、磁場を印加したまま前記振動のオンオフを切り替えることにより、所望の通りに配列した培養用担体の配列までもが加振により外れる虞を低減することができる。

[0012] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記工程（B）では、振動を加えているときの磁場の磁束密度を振動を加える前の磁場の磁束密度よりも小さくしてもよい。このように、工程（B）において、振動を加えているときの磁場の磁束密度を振動を加える前の磁場の磁束密度よりも小さくすることにより、所望の通りに配列しなかった培養用担体を効率よく配列しなおすことができ、製造する細胞構築物の形状のばらつきを更に小さくすることができる。

[0013] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記工程（B）は、未配列の培養用担体を除去する工程（b 2）を含んでいてもよい。このように、工程（B）において、未配列の培養用担体を除去することにより、精度よく細胞構築物の形状をコントロールすることができる。

[0014] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記培養用担体を二種類以上用いてもよい。このように、培養用担体を二種類以上用いることにより、複雑な構造の細胞構築物を製造することができる。

[0015] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、該培養用担体どうしは、該特性により、互いに親和性または反発性を有してもよい。このように、二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、培養用担体どうしが、該特性により、互いに親和性または反発性を有することに

より、磁場のみを用いて配列を行った場合と比べてより複雑な構造の細胞構築物を製造することができ、かつ培養用担体を精度よく配列することができる。また、培養用担体どうしが互いに親和性または反発性を有することにより、培養用担体が配列した状態を維持し易くなる。

[0016] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、複数の前記培養用担体は、互いに係合する係合部を有し、前記工程（B）において、複数の前記培養用担体を、前記係合部どうしを係合させて配列させてもよい。このように、互いに係合する係合部を有する担体を用い、複数の培養用担体を、係合部どうしを係合させて配列することにより、磁場のみを用いて配列を行った場合と比べてより複雑な構造の細胞構築物を製造することができ、かつ培養用担体を精度よく配列することができる。また、培養用担体の係合部どうしが係合するので、培養用担体が配列した状態を維持し易くなる。

[0017] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記容器は、前記培養用担体が嵌合する嵌合部を有し、前記工程（B）では、前記培養用担体を前記嵌合部に嵌合させて配列させてもよい。このように、容器が、培養用担体が嵌合する嵌合部を有し、培養用担体を嵌合部に嵌合させて配列させることにより、磁場のみを用いて配列を行った場合と比べてより複雑な構造の細胞構築物を製造することができ、かつ培養用担体を精度よく配列することができる。また、培養用担体が容器の嵌合部に嵌合するので、培養用担体が配列した状態を維持し易い。

[0018] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、前記磁性部を前記細胞構築物から除去する工程（D）を含んでもよい。このように、磁性部を細胞構築物から除去することにより、より細胞以外の物質の少ない細胞構築物を製造することができる。

[0019] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、前記担体を前記細胞構築物から除去する工程（E）を含んでもよい。このように、担体を細胞構築物から除去することにより、細胞構築物中で、担体が占めていた部分が空洞となる。よって、例えば空隙が多く酸素透過性の高い細胞構築物など、複雑な構造

の細胞構築物を製造することができる。また、より細胞以外の物質の少ない細胞構築物を製造することができる。

[0020] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、前記工程（B）では、前記容器内の互いに離隔した複数の領域に前記磁場を印加し、複数の前記培養用担体を該複数の領域内で配列してもよい。このように、容器内の互いに離隔した複数の領域に磁場を印加し、複数の培養用担体を複数の領域内で配列することにより、複数の細胞構築物を一容器内で同時に製造することができる、ハイスループットで細胞構築物を製造することができる。

[0021] 実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、細胞保持担体を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場51を印加して複数の培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、容器内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞を培養する工程（C）とを含んでもよい。該構成によれば、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールでき、かつハイスループットで、さらに細胞への侵襲性も低い細胞構築物の製造方法を提供することができる。また、培養用担体を配列する工程（B）の前に、細胞保持担体を含む培養用担体を複数準備することで、異なる細胞種の細胞を保持させた2種類以上の培養用担体を用いることや、異なる細胞比率で細胞を保持させた2種類以上の培養用担体を用いることが容易となる。

[0022] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、担体を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場を印加して複数の培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、配列された培養用担体の細胞保持部に細胞を保持させる工程（b3）と、容器内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞を培養する工程（C）とを含んでもよい。該構成によれば、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールでき、かつハイスループットで、さらに細胞への侵襲性も低い細胞構築物の製造方法を提供することができる。また、細胞を保持させる工程（b3）の前に、培養用担体を配列させることで、培養用担体を配列させる工程（B）において、細胞に悪影響がないよう操作条件を管理する必要がなく、工程（B）の操作が簡便

となる。

- [0023] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法において、細胞懸濁液には、少なくとも二種類以上の細胞が含まれていてもよい。このように、少なくとも二種類以上の細胞を含む懸濁液を用いることにより、二種類以上の細胞を含む細胞構築物を製造することができる。
- [0024] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法では、工程（B）において、隣接した細胞保持担体に保持された少なくとも一部の細胞どうしが接触するよう、細胞保持担体を配列してもよい。このように、隣接した細胞保持担体に保持された少なくとも一部の細胞どうしが接触するよう、細胞保持担体を配列することにより、組織化に要する時間が短縮されるので、更にハイスループットで細胞構築物を製造することができる。
- [0025] 一実施形態に係る細胞構築物の製造方法では、工程（b2）において、除去した前記未配列の培養用担体を、細胞構築物の製造に再利用してもよい。培養用担体を再利用すれば、細胞構築物の製造コストを削減することができる。
- [0026] 幾つかの実施形態に係る担体は、細胞を保持する細胞保持部と、磁性部とを有し、前記磁性部が一部のみに位置する。このような担体を幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法に用いることができる。
- [0027] 幾つかの実施形態に係る担体を製造する方法は、細胞を保持する細胞保持部と、磁性部とを有し、前記磁性部が一部のみに位置する担体を製造する方法であって、型中に、磁性粒子を含有するゾルを含む層と、細胞保持性を有するゾルを含む層とを形成する工程と、前記型中で前記ゾルを固化させる工程と、を含む。このような製造方法によれば、幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法に用いる担体を、簡便に製造することができる。
- [0028] 一実施形態に係る担体の製造方法では、前記型が弾性体からなる。このような製造方法によれば、型が弾性体からなるので、ゾルが固化した後、型を変形させることによって、担体を容易に取り出すことができる。
- [0029] 一実施形態に係る細胞構築物の製造用キットは、一部のみに形成された磁

性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含む培養用担体を含む。このようなキットによれば、幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法を簡便に実施することができる。

[0030] 一実施形態に係る細胞構築物の製造用キットは、一部のみに形成された磁性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含む培養用担体と、取り扱い説明書とを含む。このようなキットによれば、幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法を簡便に実施することができる。

発明の効果

[0031] 本開示によれば、製造する細胞構築物の構造を自由にコントロールでき、かつハイスループットで、さらに細胞への侵襲性も低い、細胞構築物の製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]細胞構築物の製造方法の一例を示す概略図である。

[図2]担体の形状の一例を示す図であり、（A）は、端部に磁性部が形成されている担体、（B）は、高さ方向中央よりも一端側に磁性部が形成されている担体、（C）は、短手方向が高さ方向となっている担体を示す。

[図3]担体の組み合わせの例を示す図であり、（A）は係合部を有する担体の組み合わせの例であり、（B）は異なる特性を有する担体の組み合わせの例である。

[図4]嵌合部を有する容器と、当該嵌合部に嵌合し得る担体とを示す図である。

[図5]（A）は細胞構築物からの磁性部の除去方法の一例を示す図であり、（B）は細胞構築物からの担体の除去方法の一例を示す図である。

[図6]互いに離隔した複数の領域で培養用担体を配列させる例を示す概略図である。

[図7]細胞構築物の製造方法の一例のフローチャートであり、（A）は実施形

態 1 の製造方法の一例、（B）は実施形態 2 の製造方法の一例のフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0033] 以下、本開示の実施形態を、図面に基づいて説明する。各図中、同一符号は、同一または同等の構成要素を示している。

[0034] 〔細胞構築物の製造方法〕

本開示の細胞構築物の製造方法は、一部のみに形成された磁性部を有する培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場を印加して複数の培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、容器内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞 20 を培養する工程（C）とを含む。このように、一部のみに磁性部を有する培養用担体に磁場を印加すれば、容器内で培養用担体を所望の形状に配列することができる。そして、培養用担体を配列させた状態で培養用担体に保持させた細胞を培養すれば、シート状、管状、球状などの所望の形状に組織化させた細胞構築物を構築することができる。また、担体に細胞を保持させる操作および磁場を用いて担体を配列させる操作は、容易かつ細胞侵襲性の低い操作であるので、この細胞構築物の製造方法では、細胞塊を針に刺して配列したり、細胞自身に磁性を付したりする場合と比較し、ハイスループットかつ低侵襲で細胞構築物を製造することができる。また、本実施形態においては、培養用担体を配列する工程（B）の前に、細胞保持担体を含む培養用担体を複数準備することで、異なる細胞種の細胞を保持させた 2 種類以上の培養用担体を用いることや、異なる細胞比率で細胞を保持させた 2 種類以上の培養用担体を用いることが容易となる。

[0035] なお、本開示の細胞構築物の製造方法において用いる培養用担体としては、一部のみに形成された磁性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体（以下、細胞を保持させる前の担体を「細胞未保持担体」と称することがある）、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含み、任意に、細胞未保持担体および細胞保持担体

以外のその他の担体を更に含むものを用いることができる。

[0036] ここで、本開示の細胞構築物の製造方法の工程（C）では、上記の通り、培養用担体に保持させた細胞を培養する。そのため、本開示の細胞構築物の製造方法では、工程（B）で配列される培養用担体が細胞未保持担体を含む場合には、工程（C）において、配列された細胞未保持担体の細胞保持部に細胞を保持させる工程（b3）を実施した後に培養用担体に保持させた細胞を培養し得る。

[0037] そこで、以下では、本開示の細胞構築物の製造方法について、

（1）細胞保持担体を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場を印加して複数の培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、容器内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞を培養する工程（C）とを含む製造方法（実施形態1）と、

（2）細胞未保持担体を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、磁場を印加して複数の培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、配列された培養用担体の細胞保持部に細胞を保持させる工程（b3）と、容器内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞を培養する工程（C）とを含む製造方法（実施形態2）と、

に分けて説明する。

[0038] なお、本開示の細胞構築物の製造方法は、以下に説明する実施形態1および実施形態2に限定されるものではない。

[0039] [実施形態1]

図1及び図7（A）に、細胞構築物の製造方法の流れの一例を示す。図示例においては、まず、培養容器40（容器）内に、細胞保持担体30を含む培養用担体を複数準備する（工程（A））。次に、培養容器40の底部に、培養容器40の外側下方から磁石50を近づけることによって磁場51を印加して、複数の細胞保持担体30を含む複数の培養用担体を培養容器40内で配列する（工程（B））。その後、培養容器40内で、細胞保持担体30を含む培養用担体が配列した状態を維持して、細胞保持担体30の細胞保持

部 1 1 に保持させた細胞 2 0 を培養する（工程（C））。培養によって、細胞間接着がおこり、複数の細胞 2 0 が接着した細胞構築物 1 0 0 が得られる。そして、磁石 5 0 を培養容器 4 0 の底部から遠ざけることによって、得られた細胞構築物 1 0 0 を、培養容器 4 0 の底面 4 2 から剥離し、回収する。以下、各工程の詳細について説明する。

[0040] <工程（A）>

工程（A）では、細胞保持担体 3 0 を含む培養用担体を複数準備する。具体的には、工程（A）の一例では、図 1 に示すように、磁性部 1 2 および細胞保持部 1 1 を有する担体（細胞未保持担体）1 0 を複数準備し、担体 1 0 を培養容器 4 0 内で液体培地等の細胞適合性のある液体に懸濁させて担体懸濁液を作成する。次に、担体 1 0 の懸濁液に対して、液体培地に細胞を懸濁させた細胞懸濁液 2 1 を添加し、細胞保持部 1 1 に細胞 2 0 を保持させ、細胞保持担体 3 0 とする。

[0041] このように、細胞懸濁液 2 1 を用いて担体 1 0 に細胞 2 0 を保持させれば、任意の状態の細胞 2 0 を保持させた培養用担体を簡便に調製することができる。細胞 2 0 の状態としては、例えば、細胞 2 0 の活性度があげられる。任意の状態の細胞 2 0 を保持させた培養用担体を用いることで、細胞構築物 1 0 0 の質、および工程（C）における培養時間を調節することが容易となる。また、工程（B）や工程（C）において用いる培養容器 4 0 と同じ培養容器 4 0 内で細胞保持担体 3 0 を含む培養用担体を調製すれば、細胞構築物 1 0 0 の製造に使用する装置を簡素化することができると共に、培養用担体のロス低減や微生物等のコンタミネーションリスク低減により生産性を高めることができる。

[0042] なお、担体 1 0（細胞未保持担体）は、特に限定されることなく、例えば後述する担体の製造方法を用いて製造することができる。そして、工程（A）で準備する培養用担体には、工程（C）における細胞構築物 1 0 0 の形成が可能な範囲で細胞未保持担体 1 0 が含まれていてもよい。また、工程（A）において細胞保持担体 3 0 を含む培養用担体を準備する方法は、上記一例

に限定されるものではない。具体的には、工程（Ａ）では、市販の細胞保持担体３０を購入して培養用担体を準備してもよいし、担体１０の製造方法の説明について後述するように、細胞保持部１１の形成の際にゾルに細胞２０を混合しておいてから固化させることにより、あらかじめ細胞２０が細胞保持部１１に包埋された細胞保持担体３０を製造して培養用担体とすることもできる。あるいは、細胞プリンターや細胞スプレー、光ピンセット、マニピレーター等を用いて担体１０の細胞保持部１１に細胞２０を接触させることで保持させて、細胞保持担体３０を含む培養用担体を準備してもよい。更に、図７（Ａ）に示す流れでは、担体１０を準備するステップ（Ｓ２）の後に細胞懸濁液２１を用意するステップ（Ｓ４）を行っているが、担体１０の準備と懸濁液の用意は同時に行ってもよいし、担体１０の準備よりも先に細胞懸濁液２１を用意してもよい。

[0043] （担体）

ここで、担体１０としては、特に限定されることなく、一部のみに形成された磁性部１２と、細胞２０を保持させる細胞保持部１１とを有する担体を用いることができる。磁性部１２が一部のみに位置することにより、担体１０の全体が磁性部１２である場合と異なり、工程（Ｂ）において、磁場５１の印加により、培養用担体を特定の向きで配列することが容易である。よって、複雑な構造の細胞構築物１００を効率よく製造することができる。即ち、担体１０を用いることにより、方向性が重要な構造を有する細胞構築物１００を、好適に製造することができる。また、担体１０を用いることにより、細胞２０に直接磁性を付与する必要がないから、細胞への侵襲性も低い。

[0044] 細胞保持部１１は、細胞２０を保持する性質を有する。なお、本願において、細胞保持部１１が細胞を保持するとは、細胞保持部１１に細胞２０が結合することの他、細胞保持部１１に細胞２０が包埋されていること等を含む。細胞保持部１１は、例えば、細胞保持性を有するゾルを固化させることにより形成されている。なお、本願において、細胞保持性を有するゾルとは、固化した際に細胞２０が結合することができる、または細胞２０を包埋する

ことができるゾル等を指す。細胞保持部 11 は、例えば、ハイドロゲルから構成され得、特に生体親和性の高いことが望ましく、アガロースやアルギン酸、ヒアルロン酸等の多糖類；エラスチンやコラーゲン等の細胞外マトリックスを構成する生体高分子；ゼラチン等の生体高分子の変性体；細胞や組織から抽出したマトリゲル（登録商標）やゲルトレックス（登録商標）等の可溶性基底膜調製品；ならびにポリエチレングリコール等の合成高分子等を基材として形成されている。細胞 20 との親和性が高いことから、細胞保持部 11 は、好ましくはハイドロゲルを基材として形成されている。毒性がなく、また細胞 20 を活性化することから、細胞保持部 11 は、より好ましくは細胞外マトリックスを基材として形成されている。

[0045] 磁性部 12 は、磁場 51 を印加することによって、磁場 51 に対して誘因される性質を有する。磁性部 12 は、例えば、磁性粒子を含有するゲルであり得、ゲルに磁性粒子を混練して形成され得る。あるいは、磁性部 12 は、磁性体を担体 10 に挿入して形成されていてもよい。磁性粒子は、磁石粉末、または鉄粉などであり得、磁性体は、磁石、または鉄芯などであり得る。ゲルは例えば、ハイドロゲルから構成され得、特に生体親和性の高いことが望ましい。ゲルは、アガロースやアルギン酸、ヒアルロン酸等の多糖類、エラスチンやコラーゲン等の細胞外マトリックスを構成する生体高分子；ゼラチン等の生体高分子の変性体；細胞や組織から抽出したマトリゲル（登録商標）やゲルトレックス（登録商標）等の可溶性基底膜調製品；ならびにポリエチレングリコール等の合成高分子等から構成され得る。なお、磁性部 12 を、細胞保持性を有するゲルによって構成することで、磁性部 12 に、細胞保持部 11 としての性質を兼ね備えさせることができる。換言すれば、細胞保持性を有するゲルに磁性粒子等を含有させて磁性を付与することによって、磁性部 12 であり、かつ細胞保持部 11 でもある部材を形成することができる。

[0046] 担体 10 の形状は、例えば、柱状、球状、シート状、繊維状、その他どのような形状であってもよく、製造する細胞構築物 100 の形状に応じて選択

すればよい。一実施形態において、担体 10 は、柱状で、高さ方向中央よりも一端側に磁性部 12 を有し、細胞保持部 11 が高さ方向に延在している。担体 10 が、柱状で、高さ方向中央よりも一端側に磁性部 12 を有することにより、後述する工程（B）において、培養用担体を培養容器 40 内で直立させて配列することが容易となる。また、担体 10 が、高さ方向に延在した細胞保持部 11 を有することにより、担体 10 の高さ方向に沿って、細胞 20 を複数積み重なった状態で保持させることができる。従って、後述する工程（C）において、細胞 20 を保持したまま培養を行なうことで、細胞 20 が積み重なって厚みを有する細胞構築物 100 を、効率よく製造することができる。製造する細胞構築物 100 の厚みは、細胞保持部 11 を延在させる範囲および細胞保持部 11 に細胞 20 を保持させる範囲を調節することにより、適宜調節することができる。一例においては、細胞 20 が 3～4 層積み重なった細胞構築物 100 を製造することができる。

[0047] なお、柱状の担体としては、特に限定されることなく、例えば図 2 に示すような形状の担体 10 が挙げられる。図 2（A）に示す例では、担体 10 は、一端部に磁性部 12 が形成されており、かつ長手方向に延在する細胞保持部 11 を有し、全体が柱状の形状をしている。磁性部 12 は端部に形成されている必要はなく、例えば図 2（B）に示す例では、磁性部 12 は、高さ方向中央よりも一端側に形成されている。また、担体 10 の全体の形状も特に限定されず、例えば、図 2（C）に示すような、短手方向が高さ方向となっている柱状であってもよい。図 2（C）に示す例においては、担体 10 は、短手方向の一端部に磁性部 12 が形成されており、長手方向に延在する細胞保持部 11 を有する。図 2（C）に示す形状の担体 10 を用いることによって、磁場 51 によって配列する際に、安定した配置を行うことができる。この他、磁性部 12 は、担体 10 の中央近傍のみに形成されていてもよい。

[0048] （担体懸濁液の準備）

一実施形態の工程（A）では、例えば培養容器 40 内で、担体 10 を細胞適合性のある液体に懸濁させて担体懸濁液を得る。ここで、細胞適合性のあ

る液体としては、リン酸緩衝生理食塩水等の緩衝液やイーグル最小必須培地等の液体培地等を用いることができる。また、細胞適合性のある液体中に担体 10 を懸濁させる方法としては、攪拌、超音波分散、エアレーション等を用いることができる。

[0049] なお、工程（A）では、担体懸濁液を準備することなく、担体 10 を後述する細胞懸濁液 21 に直接懸濁させてもよい。

[0050] 細胞 20 は、原核細胞であっても、真核細胞であってもよい。真核細胞は、ヒトやマウス等の哺乳動物細胞、その他脊椎動物由来の細胞でもよい。この他、細胞 20 は、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、および間葉系細胞等の幹細胞でもよい。細胞 20 は、幹細胞から分化させられた肝細胞等の内胚葉系の細胞、心筋細胞等の中胚葉系の細胞、および神経細胞等の外胚葉系の細胞でもよい。また、細胞 20 は、がん細胞等の腫瘍等に由来する遺伝子変異細胞でも構わない。接着細胞だけでなく、細胞保持部 11 に包埋させることで、血球等の浮遊細胞も細胞 20 として用いることができる。

[0051] 担体 10 の細胞保持部 11 に保持させる細胞 20 としては、所望の細胞構築物 100 の種類に応じた細胞 20 を用いることができる。なお、細胞保持部 11 に保持させる細胞 20 は、一種類のみであってもよいし、二種類以上であってもよい。二種類以上の細胞 20 を細胞保持部 11 に保持させることにより、二種類以上の細胞 20 を含む細胞構築物 100 を製造することができる。

[0052] （細胞懸濁液の用意）

細胞懸濁液 21 は、上述した細胞を、細胞適合性のある液体に懸濁させて得ることができる。ここで、細胞適合性のある液体としては、市販の液体培地等を用いることができる。また、細胞適合性のある液体中に細胞を懸濁させる方法としては、攪拌、超音波分散、エアレーション等の方法を用いることができる。

[0053] （細胞を保持させる工程）

一実施形態の工程（A）では、担体懸濁液と細胞懸濁液 21 とを例えば培

養容器 40 内で接触させて担体 10 の細胞保持部 11 に細胞 20 を保持させ、細胞保持担体 30 を得る。細胞 20 を保持させる条件は、細胞 20 に影響がない条件とすることが好ましく、例えば、ヒト細胞であれば、37℃以下の温度条件とすることが好ましい。細胞懸濁液 21 中の細胞濃度は、細胞保持部 11 と細胞 20 の接着性により決定すればよく、接着性が低い場合は、細胞濃度が高い方が好ましい。また、細胞 20 の増殖能力が高ければ、細胞懸濁液 21 中の細胞濃度は低くてもよい。

[0054] (容器)

なお、一実施形態で使用する容器の形態は、特に限定されず、一般的な培養容器 40 であり得る。好ましくは、培養容器 40 の内面は、細胞 20 が付着し難い材料からなる。培養容器 40 の内面が、細胞 20 が付着し難い材料からなることによって、培養容器 40 の内面の所望しない部分に細胞 20 および細胞保持担体 30 が付着することを防ぐことができる。

[0055] <工程 (B)>

工程 (B) では、磁場 51 を印加して複数の培養用担体を培養容器 40 内で配列する。具体的には、工程 (B) では、例えば培養容器 40 の外側下方から磁石 50 を近づけることによって磁場 51 を印加し、担体 10 の磁性部 12 を磁場 51 が印加されている部分に誘引させて、複数の細胞保持担体 30 を含む複数の培養用担体を培養容器 40 内で配列する。

[0056] なお、培養用担体の配列は、液相中で行ってもよいし、気相中でおこなってもよい。即ち、工程 (B) を実施する際の培養容器 40 内には、液体培地などの液体が充填されていてもよいし、充填されていなくてもよい。

[0057] ここで、磁石 50 としては、例えば電磁石または永久磁石を用いることができる。電磁石を用いれば、磁場 51 の印加と除去とを容易に行うことができる。また、永久磁石を用いれば、安定的に磁場 51 を印加することができる。

[0058] そして、工程 (B) では、磁場 51 を印加するパターンを調節することで、所望の通りに培養用担体を配列させることができるので、本実施形態に係

る細胞構築物の製造方法に従って製造する細胞構築物１００の構造を自由にコントロールすることができる。例えば、配列させる培養用担体の間の距離は、細胞２０どうしが接触する距離とすることもできるし、例えば神経突起を含む細胞構築物１００を形成する場合等には、培養用担体を、細胞２０どうしが離れた距離となるように配置することもできる。なお、培養用担体間で、少なくとも一部の細胞２０を接触させれば、細胞間接着に要する時間を短くし、ハイスループットで細胞構築物１００を製造することができる。

[0059] また、工程（Ｂ）では、磁場５１を用いて配列を行っているので、ハイスループットでの細胞構築物１００の製造を実現することができる。更に、多くの場合磁場５１は細胞２０に悪影響を及ぼさないから、本実施形態に係る細胞構築物の製造方法は、細胞２０への侵襲性も低い。

[0060] ここで、工程（Ｂ）は、培養容器４０に対して振動を加える工程（ｂ１）を含んでもよい。培養容器４０に対して振動を加えながら、培養用担体を配列させることによって、培養用担体を好適に配列させることができる。培養容器４０に対して振動を加えれば、所望の通りに配列しなかった培養用担体が振動により一旦磁場５１による固定から外れ、配列しなおされる。よって、培養用担体を精度よく配列することができるので、製造する細胞構築物１００の形状のばらつきを小さくすることができる。

[0061] また、工程（Ｂ）においては、磁場５１を印加したまま振動のオンオフを切り替えてもよい。このように、工程（Ｂ）において、磁場５１を印加したまま前記振動のオンオフを切り替えることにより、所望の通りに配列しなかった培養用担体を配列しなおした後、一旦振動のない状態で培養用担体を磁場５１によって固定し、その後必要に応じて再度加振することができる。よって、所望の通りに配列した培養用担体の配列までもが加振により外れる虞を低減することができる。

[0062] なお、振動のオンオフを切り得る場合、工程（Ｂ）では、振動を加えているときの磁場５１の磁束密度を振動を加える前の磁場５１の磁束密度よりも小さくしてもよい。このように、工程（Ｂ）において、振動を加えていると

きの磁場 5 1 の磁束密度を振動を加える前の磁場 5 1 の磁束密度よりも小さくすることにより、所望の通りに配列しなかった培養用担体の磁場 5 1 による固定を、振動中に一旦弱めることができる。よって、所望の通りに配列しなかった培養用担体を加振により移動させることが容易となるから、所望の通りに配列しなかった培養用担体を効率よく配列しなおすことができ、製造する細胞構築物 1 0 0 の形状のばらつきを小さくすることができる。

[0063] 更に、工程（B）は、未配列の培養用担体を除去する工程（b 2）を含んでいてもよい。除去方法は特に限定されないが、例えば、培養容器 4 0 の底部に磁場 5 1 を印加したまま、培養容器 4 0 を逆さにする、または洗浄液を加えるなどの穏やかな除去方法が好ましい。このように、工程（B）において、未配列の培養用担体を除去することにより、精度よく細胞構築物 1 0 0 の形状をコントロールすることができる。なお、除去した培養用担体は、細胞構築物 1 0 0 の製造に再利用してもよい。培養用担体を再利用すれば、細胞構築物 1 0 0 の製造コストを削減することができる。

[0064] <工程（C）>

工程（C）では、培養容器 4 0 内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体の細胞保持部 1 1 に保持させた細胞 2 0 を培養する。培養によって、近傍の培養用担体の細胞保持部 1 1 に保持された細胞 2 0 の間で細胞間接着がおこる。結果として、細胞保持部 1 1 に保持された細胞 2 0 が互いに接着した細胞構築物 1 0 0 が得られる。

[0065] なお、細胞 2 0 の培養には、細胞 2 0 の種類に応じて適切な培地を選ぶことができる。例えば細胞 2 0 が肝細胞であれば、肝細胞用培地等の液体培地（培地 4 1）を用いて行うことができる。肝細胞用培地としては、例えば HepatoZYME 等が挙げられる。また、工程（C）では、配列させた状態の培養用担体の細胞保持部 1 1 に対して更に細胞 2 0 を保持させる操作を行ってから培養を行ってもよい。ここで、配列させた状態の培養用担体の細胞保持部 1 1 への細胞 2 0 の保持は、上述した工程（A）において担体 1 0 に細胞 2 0 を保持させる操作と同様の操作で行うことができる。

[0066] ここで、工程（C）においては、磁場 5 1 を印加したまま細胞 2 0 の培養を行ってもよいし、磁場 5 1 の印加を停止して培養を行ってもよい。好ましくは、工程（C）において、磁場 5 1 を印加したまま培養を行う。磁場 5 1 を印加したまま培養を行うことにより、培養の最中に培養用担体の配列が乱れることを防ぐことができる。

[0067] （細胞構築物）

そして、工程（C）では、例えば球状、柱状などの立体的な細胞構築物 1 0 0 の他、シート状の平面的な細胞構築物 1 0 0 も製造することができる。また、たとえば皮膚組織のように、平面的で、ところどころ汗腺および毛穴などの立体的な構造を含む細胞構築物 1 0 0 も好適に製造することができる。

[0068] なお、担体 1 0 および磁性部 1 2 は多くのアッセイに悪影響を及ぼさない。そのため、多くのアッセイには、製造した細胞構築物 1 0 0 から担体 1 0 および磁性部 1 2 をはずさずに、細胞構築物 1 0 0 をそのまま用いることができる。細胞構築物 1 0 0 から磁性部 1 2 をはずさないことで、細胞構築物 1 0 0 を磁場 5 1 によって容易に固定したり、移動させたりすることができる。

[0069] また、製造した細胞構築物 1 0 0 は、磁場 5 1 の印加を停止することによって培養容器 4 0 から浮き上がらせて回収することができるので、細胞構築物 1 0 0 の回収の際に、酵素処理など、細胞構築物 1 0 0 を破損しうる処理を行う必要がない。よって、インタクトな状態で、細胞構築物 1 0 0 を回収することができる。

[0070] ＜工程（D）＞

細胞構築物の製造方法は、工程（C）の後に、磁性部 1 2 を細胞構築物 1 0 0 から除去する工程（D）を、さらに含んでもよい。磁性部 1 2 を細胞構築物 1 0 0 から除去することにより、より細胞 2 0 以外の物質が少ない細胞構築物 1 0 0 を製造することができる。製造した細胞構築物 1 0 0 を NMR で測るなど、磁場が関連する用途に細胞構築物 1 0 0 を用いる場合には

、工程（Ｄ）によって、磁性部１２を除去することが好ましい。

[0071] ここで、磁性部１２の除去は、例えば図５（Ａ）に示すようにして行うことができる。図５（Ａ）の例では、磁性部１２と細胞保持部１１とが異なる材料で形成されている。具体的には、例えば、磁性部１２はアガロースと磁性粒子、細胞保持部１１はコラーゲンから製造されている。そして、図５（Ａ）に示す例では、製造した細胞構築物１００に磁場５１を印加したまま、培地４１にアガロース分解酵素などの磁性部１２を形成する材料のみを分解し得る物質を添加し、反応させる。そして、磁性部１２を形成する材料を分解することによって、磁性部１２を細胞構築物１００から外し、細胞構築物１００を培養容器４０中で浮き上がらせる。なお、アガロース分解酵素などの磁性部１２を形成する材料のみを分解し得る物質の添加および反応は、磁場５１を印加したまま行っても、磁場５１を印加せずに行ってもよい。

[0072] <工程（Ｅ）>

また、細胞構築物の製造方法は、担体１０を細胞構築物１００から除去する工程（Ｅ）を、さらに含んでもよい。担体１０を細胞構築物１００から除去することにより、細胞構築物１００中で、担体１０が占めていた部分が空洞となる。よって、例えば空隙が多く酸素透過性の高い細胞構築物１００など、複雑な構造の細胞構築物１００を製造することができる。また、担体１０を細胞構築物１００から除去することにより、より細胞２０以外の物質が少ない細胞構築物１００を製造することができる。一例において、酵素で分解できる材料で担体１０を形成し、細胞構築物１００の製造後に酵素処理により担体１０を分解することによって、担体１０を除去する。あるいは、担体１０の細胞保持部１１に温度などの刺激に対して応答する刺激応答性ポリマー層を形成しておき、細胞構築物１００の製造後に温度などの刺激を与えて、細胞２０と担体１０とを分離してもよい。また、酸化還元反応を利用して、担体１０を分解させることにより、担体１０を細胞構築物１００から除去してもよい。好ましくは担体１０の除去は、細胞２０への有害性が低いことから、担体１０を酵素により分解すること、または、刺激応答性ポリ

マーにより表面修飾された担体 10 へ外部刺激を加えることにより担体 10 と細胞構築物 100 とを分離することによって行う。図 5 (B) は、工程 (E) の一例を示す概要図である。図 5 (B) の例では、担体 10 は主にコラーゲンから製造されている。培養終了後、培地 41 に対し、コラーゲン分解酵素を添加し、反応させる。コラーゲン分解酵素が担体 10 を分解することによって、担体 10 が細胞構築物 100 から除去され、空隙が多く酸素透過性の高い細胞構築物 100' が得られる。なお、コラーゲン分解酵素の添加およびコラーゲン分解反応は、磁場 51 を印加したまま行っても、磁場 51 を印加せずに行ってもよい。

[0073] 細胞構築物の製造方法では、上述した工程 (A) ~ (C)、その他任意の工程 (D) または工程 (E) 等を、複数回繰り返してもよい。上述した工程 (A) ~ (C)、その他任意の工程を、複数回繰り返すことにより、より複雑な構造の細胞構築物 100 を製造することができる。一例においては、工程 (B) で培養用担体を磁場 51 を印加することにより配列した後、工程 (b2) で未配列の培養用担体を除去する。この後、任意で細胞 20 を培養させた後、磁場 51 領域のパターンを変化させ、再度培養用担体を培養容器 40 に加え、磁場 51 によって配列し、細胞 20 を培養する。結果として、培養用担体の一段階の配列のみでは得られないより複雑な構造の細胞構築物 100 を製造することができる。

[0074] [実施形態 2]

図 7 (B) に、細胞構築物の製造方法の流れの他の例を示す。なお、担体 10、担体懸濁液、細胞 20、細胞懸濁液 21 および培養容器 40 としては、実施形態 1 と同様のものが挙げられるので、以下では説明を省略する。

[0075] ここで、図 7 (B) に示す細胞構築物の製造方法は、細胞未保持担体 10 を含む培養用担体を複数準備する工程 (A) と、磁場 51 を印加して複数の培養用担体を培養容器 40 内で配列する工程 (B) と、配列された培養用担体の細胞保持部 11 に細胞 20 を保持させる工程 (b3) と、培養容器 40 内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞

20を培養する工程（C）とを含む。なお、細胞構築物の製造方法は、実施形態1と同様に、上述した工程（D）または工程（E）を含んでいてもよい。なお、工程（D）および工程（E）は、実施形態1と同様にして行うことができるので、以下では説明を省略する。

[0076] <工程（A）>

工程（A）では、磁性部12および細胞保持部11を有する担体10（細胞未保持担体）を含む培養用担体を複数準備する。

[0077] なお、担体10は、特に限定されることなく、例えば後述する担体の製造方法を用いて製造することができる。また、培養用担体には、細胞保持担体30が含まれていてもよい。

[0078] <工程（B）>

工程（B）は、細胞未保持担体10を含む培養用担体を配列させる以外は上述した実施形態1の工程（B）と同様にして行うことができる。

[0079] <工程（C）>

工程（C）では、配列された培養用担体の細胞保持部11に細胞20を保持させた後（工程（b3））で、培養容器40内で、培養用担体が配列した状態を維持して、培養用担体に保持させた細胞20を培養する。

[0080] ここで、配列された培養用担体の細胞保持部11への細胞20の保持は、磁場51の印加により培養用担体が固定されていること以外は、上述した実施形態1の工程（A）における担体10の細胞保持部11への細胞20の保持と同様にして行うことができる。

[0081] そして、工程（b3）では、工程（B）において配列された培養用担体に含まれていた細胞未保持担体10の細胞保持部11に細胞20が保持され、培養容器40内で細胞保持担体30が配列された状態となる。

[0082] また、培養は実施形態1の工程（C）における培養と同様にして行うことができる。

[0083] そして、実施形態2では、上述した実施形態1と同様にして、シート状、管状、球状などの所望の形状に組織化させた細胞構築物100を、　ハイスル

ーPUTTかつ細胞に対して低侵襲で製造することができる。また、細胞を保持させる工程（b 3）の前に、培養用担体を配列させることで、培養用担体を配列させる工程（B）において、細胞に悪影響がないよう操作条件を管理する必要がなく、工程（B）の操作が簡便となる。

[0084] 以上、実施形態1および実施形態2について説明したが、本開示の細胞構築物の製造方法は、上述した形態には限定されない。

[0085] 具体的には、細胞構築物の製造方法では、担体10を二種類以上用いてもよい。担体10を二種類以上使用すれば、担体10の種類毎に、細胞20の保持のされ方、および培養用担体の配列のされ方等を異ならせ得る。よって、二種類以上の培養用担体を用いることにより、一種類の培養用担体を用いた場合よりも、複雑な構造の細胞構築物100を製造することができる。例えば、高さが異なる二種類以上の柱状の培養用担体を用いることにより、部位によって厚みの異なる細胞構築物100を製造することができる。なお、二種類以上の培養用担体は、形状、材料、比重、磁性部12の位置、磁性部12の磁性の強さ、および細胞保持部11の面積からなる群から選ばれる少なくとも一つが互いに異なり得る。

[0086] 培養用担体は、例えば図3（A）に示すように、互いに係合する係合部を有していてもよい。培養用担体が係合部を有することで、工程（B）において、複数の培養用担体を、係合部どうしを係合させて配列させることができる。培養用担体が係合部を有することで、磁場51のみでなく、係合部どうしの係合が配列に影響する。よって、磁場51のみを用いて配列を行った場合と比べて、培養用担体をより複雑な形状に配列することができるので、より複雑な構造の細胞構築物100を製造することができる。また、培養用担体どうしが互いに係合することによって、磁場51のみで配列を行った場合と比べて、培養用担体を精度よく配列することができる。また、培養用担体の係合部どうしが係合するので、培養用担体が配列した状態を維持し易くなる。図3（A）に示す例では、担体10aの壁面60aと、担体10bに設けられた凹部60bとが、それぞれ係合部となり、工程（B）において、壁

面60aが凹部60bと係合する場合を示しているが、係合部を有する培養用担体は図示例には限定されない。

[0087] また、培養用担体は、例えば図3（B）に示すように、二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、培養用担体どうしが、該特性により、互いに親和性または反発性を有していてもよい。二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、培養用担体どうしが、該特性により、互いに親和性または反発性を有することにより、磁場51のみでなく、一部の特性による親和力または反発力が、培養用担体の配列に影響する。よって、磁場51のみを用いて配列を行った場合と比べて、培養用担体をより複雑な形状に配列することができるので、より複雑な構造の細胞構築物100を製造することができる。また、培養用担体どうしが互いに親和性または反発性を有することにより、培養用担体が配列した状態を維持し易くなる。一例においては、二種類以上の培養用担体間で、疎水性、親水性、担体10の表面を被覆するタンパク質、および電荷からなる群から選ばれる少なくとも一つの特性が異なる。図3（B）に示す例では、担体10cには正電荷が付与されており、一方担体10dには負電荷が付与されている。よって、工程（B）において、担体10cと担体10dとが電氣的に誘引または反発しあい、担体10cと担体10dとが交互に配列されやすくなる。

[0088] また、培養容器40は、図4に示すように、培養用担体が嵌合する嵌合部を有していてもよい。培養容器40が、培養用担体が嵌合する嵌合部を有することで、工程（B）では、培養用担体を嵌合部に嵌合させて配列させることができる。よって、磁場51だけを用いて配列を行うよりも、複雑なパターンの細胞構築物100を形成することができるし、かつ培養用担体を精度よく配列することができる。また、培養用担体が培養容器40の嵌合部に嵌合するので、培養用担体が配列した状態を維持し易い。嵌合部は、配列する培養用担体の種類に応じた形状とすることができる。嵌合部は、培養用担体の少なくとも一部を嵌合することができる形状であればよい。

[0089] ここで、図4に示す例では、担体10eおよび担体10fは、磁性部12eおよび12fの底部の形状12e'および12f'が互いに異なる。培養容器40の底面42には、12e'および12f'がそれぞれ嵌合する嵌合部43eおよび43fがそれぞれ形成されている。そのため、工程(B)において磁場51を印加した際に、嵌合部43eおよび43fに12e'および12f'が嵌合することによって、担体10eおよび担体10fを、精度よく配列することができ、また配列した状態を維持し易い。

[0090] また、図6に示すように、工程(B)では、培養容器40内の互いに離隔した複数の領域70に磁場51を印加し、複数の培養用担体を該複数の領域内で配列してもよい。このように、培養容器40内の互いに離隔した複数の領域70に磁場51を印加することにより、担体10が固定可能な最低強度の磁場範囲を外周とする領域内で、複数の培養用担体が配列される。結果として、複数の細胞構築物100を一培養容器内で同時に製造することができ、ハイスループットで細胞構築物100を製造することができる。磁場51を印加する複数の領域70の間隔は、等間隔である必要はないが、生産効率の観点から、底面42の単位面積当たりの領域70の数が最大となる間隔とすることが望ましい。

[0091] [担体の製造方法]

上述した本開示の細胞構築物の製造方法に使用し得る担体10は、特に限定されることなく、本開示の担体の製造方法を用いて好適に製造することができる。

[0092] ここで、本開示の一実施形態に係る担体の製造方法は、上述した担体10を製造する方法であって、型中に、磁性粒子を含有するゾルを含む層と、細胞保持性を有するゾルを含む層とを形成する工程と、型中でゾルを固化させる工程と、を含む。磁性粒子を含有するゾルからなる層、および細胞保持性を有するゾルからなる層は、ゾルが固化することによって、それぞれ磁性部12、および細胞保持部11となる。該製造方法によれば、幾つかの実施形態に係る細胞構築物の製造方法に用いる担体10を、簡便に製造することが

できる。

[0093] ゼルの種類は特に限定されないが、アガロースやアルギン酸、ヒアルロン酸等の多糖類；エラスチンやコラーゲン等の細胞外マトリックスを構成する生体高分子；ゼラチン等の生体高分子の変性体；細胞や組織から抽出したマトリゲル（登録商標）やゲルトレックス（登録商標）等の可溶性基底膜調製品；ならびにリエチレングリコール等の合成高分子等であり得る。細胞保持部 11 と磁性部 12 とを形成するために用いるゾルは、互いに異なってもよい。なお、ゾルに細胞 20 を混合してからゾルを固化させることによって、細胞保持部 11 への細胞 20 の保持と、細胞保持部 11 の形成とを、同時に行ってもよい。このように、ゾルに細胞 20 を混合してからゾルを固化させることによって、担体 10 を形成した後に、担体 10 に対して細胞懸濁液 21 を混合して細胞 20 を保持させる場合と比較して、濃度の高い細胞懸濁液 21 を用いる必要がないため、細胞 20 の無駄を防ぐことができる。

[0094] また、型としては、任意の型を用いることができるが、製造した担体 10 を容易に取り出す観点からは、ジメチルポリシロキサン等からなるシリコーンゴムなどの弾性を有する材料よりなる型を用いることが好ましい。

[0095] [キット]

一実施形態に係る細胞構築物の製造用キットは、一部のみに形成された磁性部 12 と、細胞 20 を保持させる細胞保持部 11 とを有する担体 10、並びに、当該担体 10 の細胞保持部 11 に細胞 20 を保持させてなる細胞保持担体 30 の少なくとも一方を含む培養用担体を含む。当該製造用キットを用いることにより、本開示の一実施形態に係る細胞構築物の製造方法を、簡便に実施することができる。この他、一実施形態に係る細胞構築物の製造用キットは、キットの取り扱い説明書、培養容器 40、磁場印加器、細胞適合性のある液体からなる群から選ばれる少なくとも一つを含む。細胞構築物の製造用キットは、取り扱い説明書の代わりに、取り扱い説明書をサーバからダウンロードする方法を記載した書面を含んでいてもよい。

実施例

[0096] ジメチルポリシロキサン（以下、PDMSとも称する）を用いて、円柱形状の非貫通孔が形成された型を製造した。非貫通孔のおよそ1/10の高さまで、磁性粒子を混合したマトリゲル（登録商標）溶液（BD Biosciences社製）を、インクジェットスプッターを用いて導入した。次に、マトリゲル溶液（ゾル）を、非貫通孔のおよそ9/10の高さまで、インクジェットスプッターを用いて重層した。次に、型を37℃のインキュベーターに入れ、マトリゲル溶液を固化させた。結果として、円柱状で、一端近傍に磁性粒子が包埋された磁性部を有し、かつ担体の全面が細胞保持部である担体を得た。PDMSが弾性体であることを利用し、型に対して張力を加えることで非貫通孔の孔径を広げ、担体を非貫通孔から取り出した。取り出した担体を、液体培地中に分散させた。

[0097] 肝がん由来細胞株であるHepG2細胞を培養皿上で培養した。十分な量の酵素により、培養皿上から細胞を剥離した。剥離した細胞を液体培地に懸濁して、細胞懸濁液を得た。

[0098] 培養ウェル（培養容器）に、担体が分散された液体培地を導入し、そこに細胞懸濁液を混合した。混合した溶液をインキュベートし、担体上の細胞保持部に細胞を保持させ、細胞保持担体とした。培養ウェルの底面の外側に磁石を配置することで磁場を印加し、細胞保持担体を、磁性部が培養ウェル底面に向く形で配列し、細胞保持担体どうしを近接させた。

[0099] 液体培地を除去し、担体に固定されていない細胞を取り除いた。次に、フレッシュな培地を添加した。そして、磁場51により配列され、互いに近接した状態の細胞保持担体を、適宜培地交換を行いながら、培養した。細胞の増殖および細胞間結合が生じ、細胞保持担体どうしが細胞間接着を介して一体となり、厚みのあるシート状の細胞構築物が形成された。磁石を培養ウェルから遠ざけることで、磁場の印加を停止した。培養底面から形成した組織を剥離させ、回収した。

産業上の利用可能性

[0100] 本開示に係る細胞構築物の製造方法、担体、および担体の製造方法は、再

生医療、疾患モデル、薬効試験、安全性試験等の分野で用いることができる。

符号の説明

- [0101] 1 0、1 0 a～1 0 f 担体
- 1 1 細胞保持部
- 1 2、1 2 e、1 2 f 磁性部
- 2 0 細胞
- 2 1 細胞懸濁液
- 3 0 細胞保持担体
- 4 0 培養容器
- 4 2 底面
- 4 3 e、4 3 f 嵌合部
- 5 0 磁石
- 5 1 磁場
- 6 0 a、6 0 b 係合部
- 7 0 領域
- 1 0 0、1 0 0' 細胞構築物

請求の範囲

- [請求項1] 一部のみに形成された磁性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、
- 磁場を印加して複数の前記培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、
- 前記容器内で、前記培養用担体が配列した状態を維持して、前記培養用担体の前記細胞保持部に保持させた細胞を培養する工程（C）と、
- を含む、細胞構築物の製造方法。
- [請求項2] 前記担体は、柱状で、高さ方向中央よりも一端側に前記磁性部を有し、前記細胞保持部は、高さ方向に延在している、請求項1に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項3] 前記工程（B）は、前記容器に対して振動を加える工程（b1）を含む、請求項1または2に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項4] 前記工程（B）において、前記磁場を印加したまま前記振動のオンオフを切り替える、請求項3に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項5] 前記工程（B）では、振動を加えているときの磁場の磁束密度を振動を加える前の磁場の磁束密度よりも小さくする、請求項3または4に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項6] 前記工程（B）は、未配列の培養用担体を除去する工程（b2）を含む、請求項1から5のいずれか1項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項7] 前記培養用担体を二種類以上用いる、請求項1から6のいずれか1項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項8] 前記二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、該培養用担体どうしは、該特性により、互いに親和性または

反発性を有する、請求項 7 に記載の細胞構築物の製造方法。

- [請求項9] 複数の前記培養用担体は、互いに係合する係合部を有し、
前記工程（B）において、複数の前記培養用担体を、前記係合部どうしを係合させて配列させる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項10] 前記容器は、前記培養用担体が嵌合する嵌合部を有し、
前記工程（B）では、前記培養用担体を前記嵌合部に嵌合させて配列させる、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項11] 前記磁性部を前記細胞構築物から除去する工程（D）を含む、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項12] 前記担体を前記細胞構築物から除去する工程（E）を含む、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項13] 前記工程（B）では、前記容器内の互いに離隔した複数の領域に前記磁場を印加し、複数の前記培養用担体を該複数の領域内で配列する、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項14] 細胞を保持する細胞保持部と、磁性部とを有し、
前記磁性部が一部のみに位置する、担体。
- [請求項15] 請求項 14 に記載の担体を製造する方法であって、
型中に、磁性粒子を含有するゾルを含む層と、細胞保持性を有するゾルを含む層とを形成する工程と、
前記型中で前記ゾルを固化させる工程と、
を含む、担体の製造方法。

補正された請求の範囲

[2019年10月2日 (02.10.2019) 国際事務局受理]

- [請求項 1] 一部のみに形成された磁性部と、細胞を保持させる細胞保持部とを有する担体、並びに、当該担体の細胞保持部に細胞を保持させてなる細胞保持担体の少なくとも一方を含む培養用担体を複数準備する工程（A）と、
- 磁場を印加して複数の前記培養用担体を容器内で配列する工程（B）と、
- 前記容器内で、前記培養用担体が配列した状態を維持して、前記培養用担体の前記細胞保持部に保持させた細胞を培養する工程（C）と、
- を含む、細胞構築物の製造方法。
- [請求項 2] 前記担体は、柱状で、高さ方向中央よりも一端側に前記磁性部を有し、前記細胞保持部は、高さ方向に延在している、請求項 1 に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項 3] 前記工程（B）は、前記容器に対して振動を加える工程（b 1）を含む、請求項 1 または 2 に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項 4] 前記工程（B）において、前記磁場を印加したまま前記振動のオンオフを切り替える、請求項 3 に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項 5] 前記工程（B）では、振動を加えているときの磁場の磁束密度を振動を加える前の磁場の磁束密度よりも小さくする、請求項 3 または 4 に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項 6] 前記工程（B）は、未配列の培養用担体を除去する工程（b 2）を含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。
- [請求項 7] 前記培養用担体を二種類以上用いる、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記

載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 8〕 前記二種類以上の培養用担体間で、少なくとも一部の特性が互いに異なり、
該培養用担体どうしは、該特性により、互いに親和性または反発性を有する、
請求項 7 に記載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 9〕 複数の前記培養用担体は、互いに係合する係合部を有し、
前記工程（B）において、複数の前記培養用担体を、前記係合部どうしを
係合させて配列させる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物
の製造方法。

〔請求項 10〕 前記容器は、前記培養用担体が嵌合する嵌合部を有し、
前記工程（B）では、前記培養用担体を前記嵌合部に嵌合させて配列させ
る、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 11〕 前記磁性部を前記細胞構築物から除去する工程（D）を含む、請求項 1
から 10 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 12〕 前記担体を前記細胞構築物から除去する工程（E）を含む、請求項 1 か
ら 11 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 13〕 前記工程（B）では、前記容器内の互いに離隔した複数の領域に前記磁
場を印加し、複数の前記培養用担体を該複数の領域内で配列する、請求項 1
から 12 のいずれか 1 項に記載の細胞構築物の製造方法。

〔請求項 14〕 細胞を保持する細胞保持部と、磁性部とを有し、
前記磁性部が一部のみに位置する、担体。

〔請求項 15〕 （補正後） 前記磁性部が、一端部に位置する、請求項 14 に記載の担体。

〔請求項 16〕 （追加） 前記磁性部は、磁性粒子を含有するゾルを含む層を有する、請

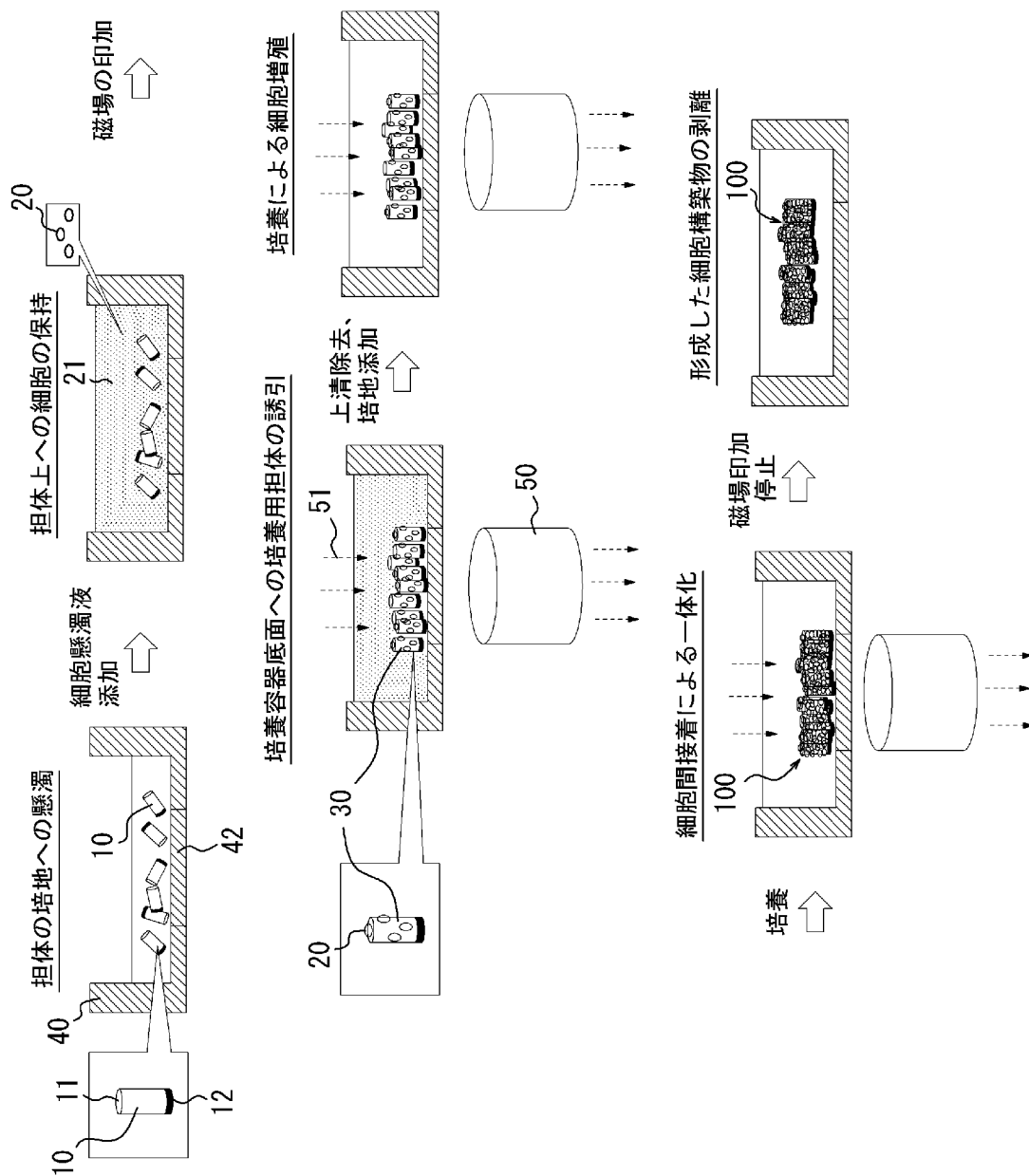
求項 1 4 または 1 5 に記載の担体。

〔請求項 1 7〕（追加） 請求項 1 4 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の担体を製造する方法であって、

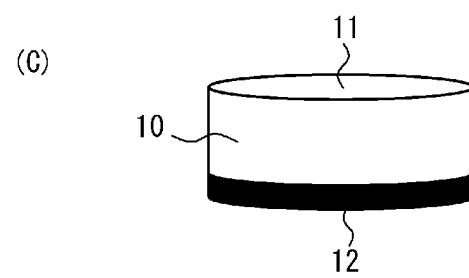
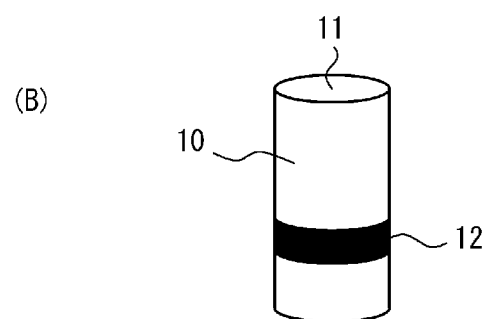
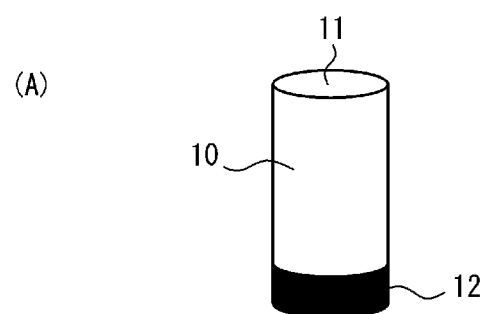
型中に、磁性粒子を含有するゾルを含む層と、細胞保持性を有するゾルを含む層とを形成する工程と、

前記型中で前記ゾルを固化させる工程と、
を含む、担体の製造方法。

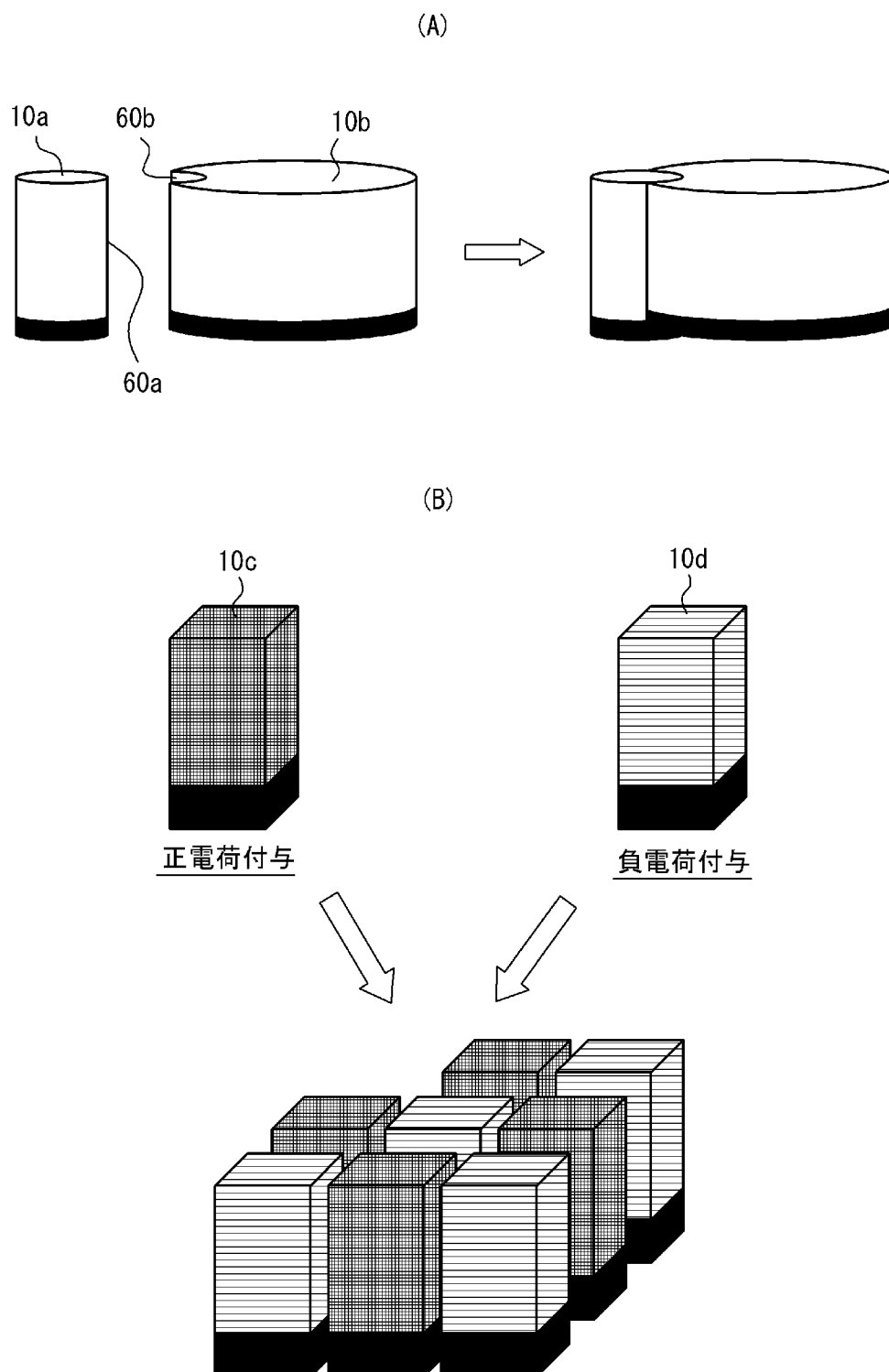
[図1]



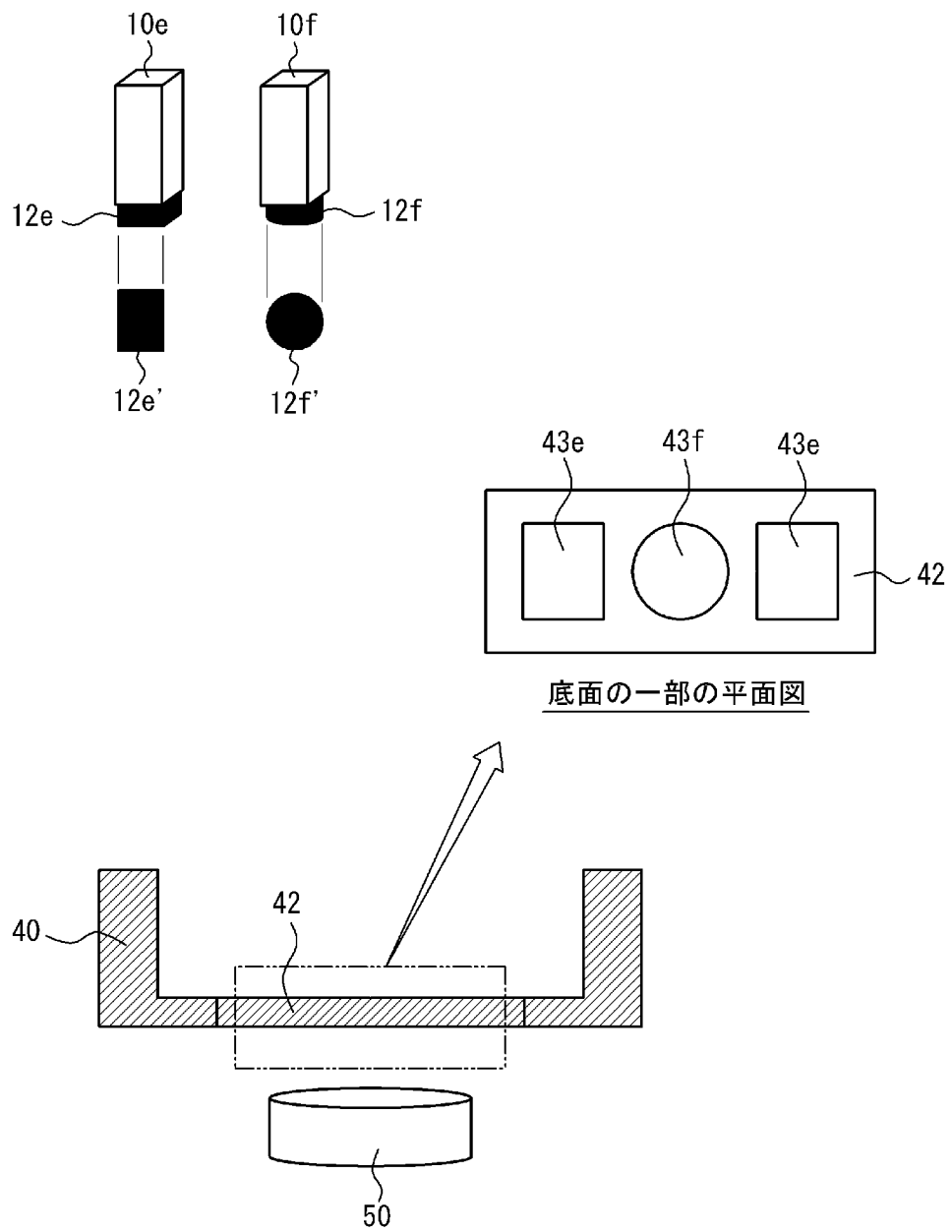
[図2]



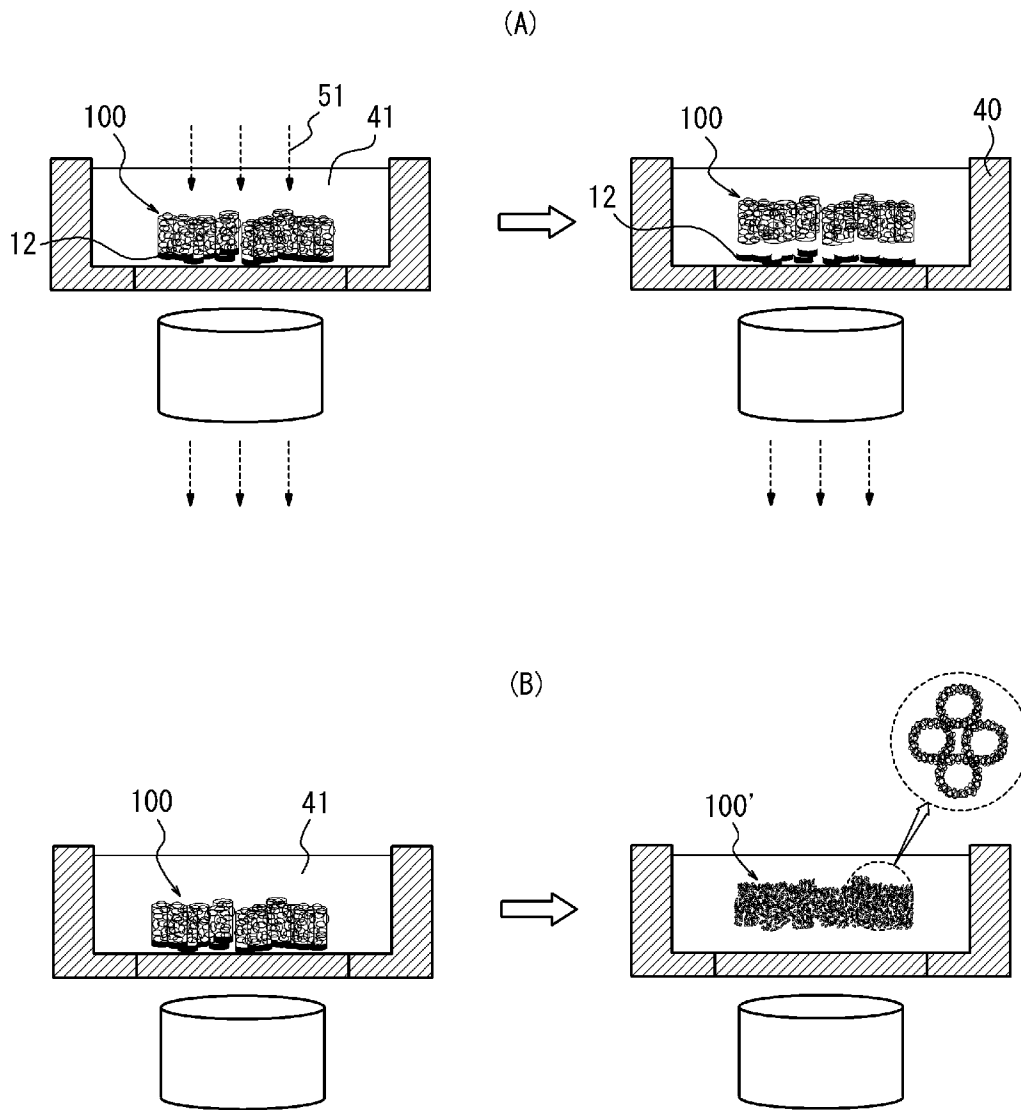
[図3]



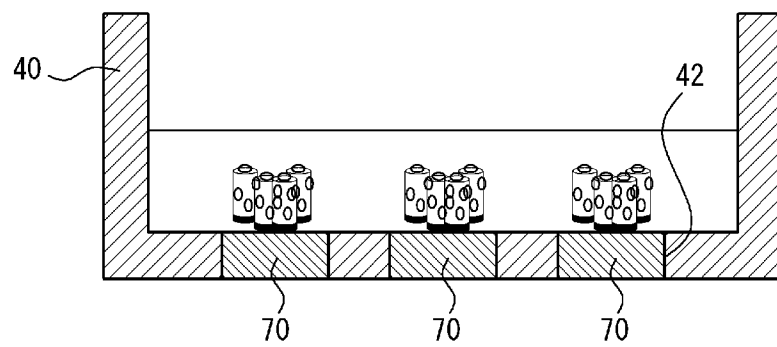
[図4]



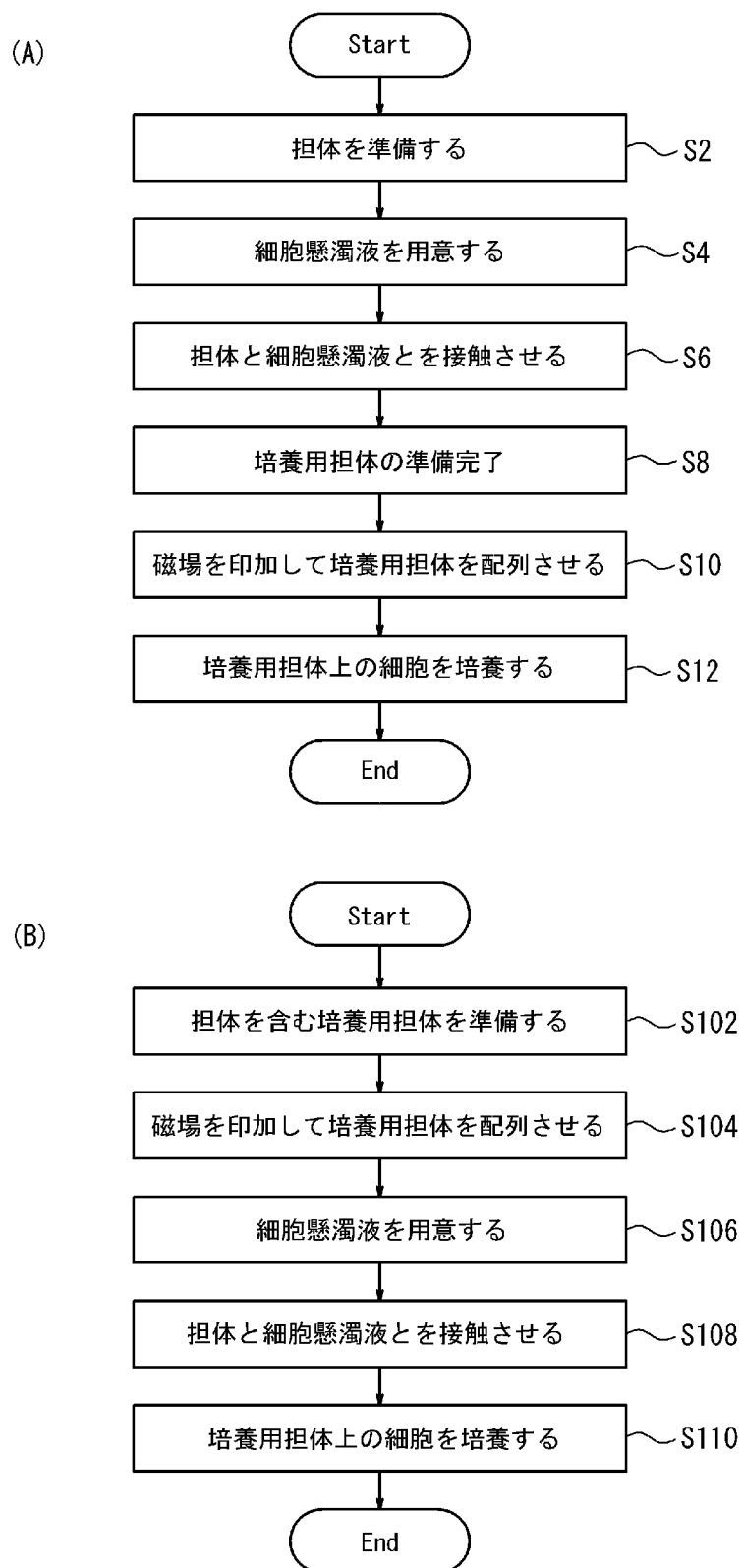
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/018605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N11/02 (2006.01) i, C12N5/07 (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)

Int. Cl. C12N11/02, C12N5/07

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 1971-2019

Registered utility model specifications of Japan 1996-2019

Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), AGRICOLA (STN), FSTA (STN), SCISEARCH (STN), TOXCENTER (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-313007 A (PENTAX CORP.) 11 November 2004, fig. 1 & US 2004/0248291 A1, fig. 1 & GB 2400378 A	14, 15
A	& GB 2413564 A & DE 102004017860 A & FR 2853664 A	1-13
A	JP 2017-510254 A (BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 13 April 2017 & US 2016/0362655 A1 & WO 2015/130745 A1 & EP 3110944 A1	1-15
A	TASOGLU, S. et al., Guided and magnetic self-assembly of tunable magnetoceptive gels, Nature Communications, 01 September 2014, vol. 5, no. 4702, DOI: 10.1038/ncomms5702	1-15



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
22.07.2019

Date of mailing of the international search report
30.07.2019

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/JP2019/018605

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	井藤彰他, 機能性磁性ナノ粒子を用いた三次元組織構築技術, Yakugaku Zasshi, January 2008, vol. 128(1), pp. 21-28 (ITO, Akira et al. Construction of 3D Tissue-Like Structure Using Functional Magnetite Nanoparticles.)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N11/02(2006.01)i, C12N5/07(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. C12N11/02, C12N5/07

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), AGRICOLA (STN), FSTA (STN), SCISEARCH (STN), TOXCENTER (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
X A	JP 2004-313007 A (ペンタックス株式会社) 2004.11.11, 図1 & US 2004/0248291 A1 : Fig. 1 & GB 2400378 A & GB 2413564 A & DE 102004017860 A & FR 2853664 A	14, 15 1-13
A	JP 2017-510254 A (ブリガム・アンド・ウイミンズ・ホスピタル・インコーポレイテッド) 2017.04.13, & US 2016/0362655 A1 & WO 2015/130745 A1 & EP 3110944 A1	1-15

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

22.07.2019

国際調査報告の発送日

30.07.2019

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)

太田 雄三

4 B

3959

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	TASOGLU, S., et al., Guided and magnetic self-assembly of tunable magnetoceptive gels, Nature Communications, 2014.09.01, Vol. 5, No. 4702, DOI: 10.1038/ncomms5702	1-15
A	井藤彰, 他, 機能性磁性ナノ粒子を用いた三次元組織構築技術, Yakugaku Zasshi, 2008.01, Vol. 128(1), p. 21-28	1-15