

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-506416

(P2013-506416A)

(43) 公表日 平成25年2月28日 (2013.2.28)

(51) Int. Cl.		F I			テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/077</b>	<b>(2010.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>2 O 2 G</b>	<b>4 B O 2 9</b>
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>C</b>	<b>4 B O 6 5</b>
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>A</b>	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2012-532045 (P2012-532045)	(71) 出願人	390041542
(86) (22) 出願日	平成22年9月27日 (2010.9.27)		ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成24年3月19日 (2012.3.19)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州、スケネ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2010/051033		クタディ、リバーロード、1 番
(87) 国際公開番号	W02011/040867	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成23年4月7日 (2011.4.7)		弁理士 荒川 聡志
(31) 優先権主張番号	12/570,032	(74) 代理人	100105588
(32) 優先日	平成21年9月30日 (2009.9.30)		弁理士 小倉 博
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100129779
			弁理士 黒川 俊久
		(74) 代理人	100113974
			弁理士 田中 拓人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞遊離のための方法及びキット

## (57) 【要約】

細胞を遊離させるための方法及びキットが提供される。本方法は、基体上に固定化された多層高分子電解質コーティングを含む細胞培養支持体上に培養細胞を用意する段階、及び DMSO を含む遊離溶液によって細胞培養支持体から培養細胞を遊離させる段階を含んでなる。本キットは、細胞培養支持体及び遊離溶液を含んでなる。細胞培養支持体は基体及び該基体上に固定化された多層高分子電解質コーティングを含み、遊離溶液は DMSO を含む。

【選択図】 図 1 B

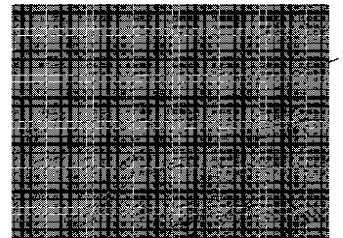


FIG. 1A

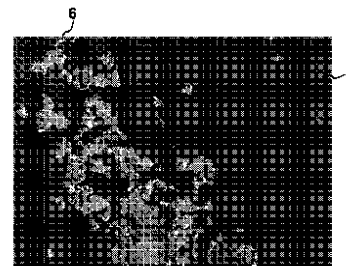


FIG. 1B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞を遊離させる方法であって、

a) 基体上に固定化された多層高分子電解質コーティングを含む細胞培養支持体上に培養細胞を用意する段階、及び

b) DMSOを含む遊離溶液を添加することで細胞培養支持体から培養細胞を遊離させる段階

を含んでなる方法。

**【請求項 2】**

培養細胞が間葉間質細胞からなる、請求項 1 記載の方法。

10

**【請求項 3】**

培養細胞がヒト間葉間質細胞からなる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

遊離溶液中の DMSO 濃度が約 0.01 ~ 1.0 % の範囲内にある、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

**【請求項 5】**

遊離溶液中の DMSO 濃度が約 0.02 ~ 0.5 % の範囲内にある、請求項 4 記載の方法。

**【請求項 6】**

遊離溶液中の DMSO 濃度が約 0.1 ~ 0.5 % の範囲内にある、請求項 5 記載の方法。

20

**【請求項 7】**

細胞培養支持体を室温でインキュベートすることで培養細胞が細胞培養支持体から遊離される、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 8】**

インキュベーションが約 10 ~ 30 分間実施される、請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

多層高分子電解質コーティングが 1 以上のホモポリマー層を含む、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 10】**

多層ポリマーコーティングが 1 以上のコポリマー層を含む、請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載の方法。

30

**【請求項 11】**

多層ポリマーコーティングが 1 以上のホモポリマー層及び 1 以上のコポリマー層を含む、請求項 1 乃至請求項 10 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 12】**

多層ポリマーコーティングがコポリマー層及びホモポリマー層を交互に配列したものを含む、請求項 1 乃至請求項 11 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 13】**

多層ポリマーコーティングが 1 以上の温度応答性ポリマー層を含む、請求項 1 乃至請求項 12 のいずれか 1 項記載の方法。

40

**【請求項 14】**

多層ポリマーコーティングが 1 以上のポリ - (ジ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート) - コ - ポリアクリル酸層を含む、請求項 1 乃至請求項 13 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 15】**

多層高分子電解質コーティングが 1 以上のポリ - L - リシン層を含む、請求項 1 乃至請求項 14 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 16】**

細胞を培養するためのキットであって、

50

基体及び該基体上に固定化された多層高分子電解質コーティングを含む細胞培養支持体、並びに

細胞遊離のための遊離溶液であって、DMSOを含む遊離溶液を含んでなるキット。

【請求項 17】

さらに細胞を培養するための培地を含む、請求項 16 記載のキット。

【請求項 18】

多層高分子電解質コーティングが 1 以上の温度応答性ポリマー層を含む、請求項 16 又は請求項 17 記載のキット。

【請求項 19】

多層高分子電解質コーティングが 1 以上のポリ - (ジ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート) - コ - ポリアクリル酸層を含む、請求項 16 乃至請求項 18 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 20】

多層高分子電解質コーティングが 1 以上のホモポリマー層を含む、請求項 16 乃至請求項 19 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 21】

多層高分子電解質コーティングが 1 以上のポリ - L - リシン層を含む、請求項 16 乃至請求項 20 のいずれか 1 項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞遊離のための方法に関する。さらに詳しくは、本発明はポリマー系の細胞培養支持体から細胞を遊離させるための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、付着細胞はガラス表面上又はポリマー基体上で増殖させていた。細胞培養のための表面は、細胞の付着及び増殖を高めるように前処理されることが多い。生物医学的及び生物学的用途においては、要求に応じた細胞分離又は細胞遊離を可能にする付着細胞用のマトリックスが古くから要望されていた。

【0003】

培養細胞は、各種の方法によって細胞培養支持体から分離又は遊離させることができる。常用される細胞遊離方法には、(掻き取りのような)機械的方法、(トリプトシンのような)タンパク質分解酵素による処理、(EDTAのような)カルシウムキレーターの使用、又はかかる方法の組合せがある。しかし、これら従来の細胞遊離方法の多くは培養細胞に悪影響を及ぼすことがあり、またその固有の構造及び機能を変化させることがある。例えば、トリプシンによる細胞の処理(即ち、トリプシン処理)は苛酷な方法であり、細胞の表現型に影響を及ぼす可能性があるため、幹細胞のようなデリケートな細胞にとって望ましくない。さの上、トリプシンは通例は動物に由来しており、共分画されたタンパク質又は生物学的作用因子(例えば、ウイルス又はマイコプラズマ)のような不純物を含むことがある。動物由来の不純物は、細胞療法のような重大な用途のために遊離細胞を使用することを制限する。細胞を遊離させるための機械的方法は労働集約的であり、工業的規模の細胞培養用途のためには実用的でないことが多い。

【0004】

他の非酵素的方法には、超音波又は衝撃波を用いて気泡を生成させ、それによって細胞の分離を容易にする物理的方法がある。ポリ - N - イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)のような温度応答性ポリマーを含む細胞培養支持体からは、細胞培養支持体を約 4 ~ 20 の範囲内の温度に冷却することで培養細胞を遊離させることができる。

【0005】

工業的規模の細胞培養プロセスにおいて高い収量を得るためには、効率的な遊離が特に

10

20

30

40

50

重要である。したがって、細胞形態及び細胞生存性に影響を及ぼすことなしに迅速で効率的な細胞分離を行うための一層良好な細胞遊離技術を開発することが緊急に要望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

米国特許出願公開第2008/0241926号明細書

【発明の概要】

【0007】

本発明は一般に、細胞培養支持体から細胞を遊離させるための方法及びキットの両方を含んでいる。

10

【0008】

細胞培養支持体から細胞を遊離させるための方法の一例は、細胞培養支持体上に培養細胞を用意する段階、及び遊離溶液を添加することで細胞培養支持体から培養細胞を遊離させる段階を含んでいる。遊離溶液はジメチルスルホキシド(DMSO)を含んでいる。細胞培養支持体は基体上に多層高分子電解質系コーティングを含んでいる。

【0009】

細胞を培養するためのキットの一例は、一般に、細胞培養支持体及び細胞遊離のための遊離溶液を含んでいる。遊離溶液はDMSOを含んでいる。細胞培養支持体は、基体及び該基体上に多層高分子電解質系コーティングを含んでいる。

20

【0010】

細胞を遊離させるための方法の別の例は、(基体上に多層高分子電解質系コーティングを含む)細胞培養支持体上に培養ヒト間葉幹細胞を用意する段階、及び遊離溶液と共に細胞をインキュベートすることで培養細胞を細胞培養支持体から室温で遊離させる段階を含んでいる。遊離溶液はPBS中に約0.01%のDMSOを含んでいる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

本発明の上記その他の特徴、態様及び利点は、添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明を読んだ場合に一層よく理解されよう。添付の図面中では、図面全体を通じて類似の部分には同一の符号で示されている。

30

【図1】図1Aは、DMSOを含む遊離溶液の添加後における未被覆ガラススライドの画像である。図1Bは、DMSOを含む遊離溶液を用いて細胞を遊離させた後における、多層高分子電解質系コーティングを有するガラススライドの画像である。

【図2】図2はWST-1細胞アッセイのグラフィカルプロットを表し、遊離細胞と混合して450nmで測定した場合におけるWST-1試薬の光学密度の変化を示している。450nmでの光学密度はアッセイ系中に存在する細胞数と相関している。細胞は、PBS中にDMSOを含む遊離溶液を用いて未被覆ガラススライド又は又は多層高分子電解質被覆ガラススライドから遊離させた。

【発明を実施するための形態】

【0012】

特許請求される発明の主題を一層明確で簡潔に記載するため、以下の説明及び添付の特許請求の範囲中で使用される特定の用語に関して以下に定義を示す。明細書全体を通じ、特定の用語の例示は非限定的な例と見なすべきである。

40

【0013】

本明細書中で使用する「細胞培養支持体」とは、細胞を付着させて培養するための支持体である。細胞培養支持体は基体を含み得る。基体は、細胞の付着及び増殖のために適したコーティング材料で被覆又は積層することができる。好適なコーティング材料としては、特に限定されないが、高分子電解質が挙げられる。

【0014】

本明細書中で使用する「基体」とは、コーティングに対して支持を与える基材又はホル

50

ダーである。被覆された基体は細胞培養支持体として使用できる。

【0015】

本明細書中で使用する「遊離溶液」とは、細胞培養支持体から細胞を遊離又は分離させるために役立つ溶液である。遊離溶液は、1種以上の極性非プロトン性溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO））を含んでいる。例えば、DMSOは水混和性を有する極性非プロトン性溶媒ファミリーに属している。これらの溶媒は高分子電解質のようなポリマーと強い相互作用を示し、ポリマーの凝集及び細胞の付着をもたらす水素結合並びに静電相互作用を攪乱することができる。遊離溶液は、リン酸緩衝食塩水（PBS）中にDMSOを含んでいる。

【0016】

本明細書中で使用する「高分子電解質」とは、ポリマーの繰返し単位が電解質基を有するポリマーである。これらの基が水溶液（例えば、水）中で解離するとポリマーは帯電する。したがって、高分子電解質の性質は電解質（塩）及びポリマー（高分子量化合物）の両方に類似しており、時には高分子塩と呼ばれる。高分子電解質溶液は塩のように導電性であり、大抵はポリマーのように粘稠である。多くの生物学的分子は高分子電解質である。高分子電解質の例には、特に限定されないが、ポリペプチド（又はタンパク質）、DNA及びポリマーがある。

【0017】

薬物スクリーニング及び細胞療法のような用途のためには、高収量の健康で生存可能な細胞が要求される。工業的規模の細胞製造ユニット又は細胞バイオリクターでは、細胞を培養するのに適した細胞培養支持体がしばしば使用される。培養細胞を治療用途で使用するのであれば、細胞培養支持体から細胞を遊離させるための効率的な非酵素的方法が特に有用であり得る。

【0018】

細胞培養支持体から細胞を遊離させるための本発明の方法及びキットは、幹細胞のようなデリケートな細胞に関して有用である。正常な細胞又はデリケートな細胞の効率的な遊離は、本発明の細胞遊離方法及びキットを用いて達成できる。

【0019】

培養細胞を遊離させるための方法の一例は、細胞培養支持体上に培養細胞を用意する段階、及びDMSOを含む遊離溶液を添加することで細胞培養支持体から培養細胞を遊離させる段階を含んでいる。細胞培養支持体は基体上に固定化された多数の高分子電解質層（多層高分子電解質）を含むことができる。

【0020】

細胞は、DMSOを含む遊離溶液を用いて遊離される。遊離溶液中のDMSO濃度（v/v）は、約0.01～1.0%の範囲内にあり得る。若干の実施形態では、遊離溶液中のDMSO濃度は、約0.02～0.5%及び0.1～0.5%の範囲内にあり得る。細胞遊離の効率は、遊離溶液中のDMSO濃度を变化させることで高めることができる。細胞遊離の効率はDMSO濃度の増加と共に上昇し得る。さらに、遊離溶液はリン酸緩衝食塩水（PBS）中にDMSOを含むことができ、この場合に溶液のpHは約7.5である。

【0021】

培養細胞の遊離はさらに、室温或いは約15～37℃、約20～35℃又は約20～30℃の範囲内の温度で細胞培養支持体を遊離溶液と共にインキュベートすることで最適化できる。

【0022】

細胞培養支持体を室温で様々な時間（例えば、約1～2時間、約30分間～1時間又は約10～30分間）にわたりインキュベートすることで、細胞を細胞培養支持体から遊離させることができる。若干の実施形態では、細胞遊離の効率は遊離溶液の添加後における細胞遊離のためのインキュベーション時間を变化させることで調節できる。例えば、細胞遊離の効率はインキュベーション時間の増加と共に上昇し得る。

10

20

30

40

50

## 【0023】

細胞を遊離させるための方法は、細胞培養支持体上に培養細胞を用意する段階を含んでいる。かかる方法は、細胞培養支持体上で細胞を培養することを含み得る。かかる細胞は、例えば細胞タイプに応じ、約20～37、約30～37及び約35～37.5の様々な温度範囲で培養することができる。

## 【0024】

細胞を培養フラスコ内で増殖させ、細胞培養支持体に付加してさらに増殖させることもできる。特に限定されないが、血液、骨髓又は組織切片のような生物学的源から細胞を抽出した後、それを細胞培養支持体上で増殖させることもできる。若干の実施形態では、細胞培養支持体をスピナーフラスコ、堆積培養フラスコ、攪拌槽型反応器又は任意の他のインビトロ細胞培養システム内に導入することができる。

10

## 【0025】

かかる方法はまた、脆弱な細胞を細胞培養支持体上で培養した後に遊離させるためにも使用できる。脆弱な細胞としては、特に限定されないが、胚性幹細胞、成体幹細胞、誘導多分化能性幹細胞、樹状細胞、造血細胞、間葉間質細胞、神経細胞、再プログラム細胞又は再分化細胞が挙げられる。例えば、培養幹細胞は、細胞培養支持体を0.01% (v/v)のDMSOを含む遊離溶液と共に約10分間インキュベートすることで細胞培養支持体から遊離される。

## 【0026】

臨床又は研究用途で使用するための高い純度を有する幹細胞を良好な収量で生成するためには、幹細胞を培養するための効率的な方法が決定的に重要である。幹細胞は細胞培養中にその多能性又は多分化能性を失ったり、或いは分化したりすることがあるので、幹細胞の培養ではしばしば特殊な技術が要求される。その上、細胞を遊離させるための従来の方法(例えば、機械的掻き取り又はトリプシン処理)は培養幹細胞を遊離させるには適さないことがある。これらの問題は、細胞遊離方法の非酵素的な例の1つを用いることで対処できる。例えば、間葉間質細胞を培養した後、本明細書中に記載される非酵素的なDMSO系細胞遊離方法を用いることで、培養された間葉間質細胞に悪影響を及ぼすことなく間葉間質細胞を成功裡に遊離させることができる。

20

## 【0027】

細胞培養支持体は、1以上のポリマー層を含む細胞培養ベッド、細胞担体ビーズ、ディスク又はスカフォールドとして構成できる。基体の例には、マイクロキャリア、膜、繊維、中空系、毛細管、容器、フラスコ、ディスク、ビーズ、ペトリ皿、プレート、織布又は不織布或いはメッシュ、ナノ繊維マット、粒子、スカフォールド或いはフォームがある。基体材料の例には、特に限定されないが、ガラス、ポリマー、金属、セラミック及びこれらの組合せがある。

30

## 【0028】

細胞培養支持体は、多層高分子電解質系コーティングを含み得る。多層高分子電解質系コーティングは、1以上のコポリマー層又は1以上のホモポリマー層を含み得る。他の実施形態では、多層高分子電解質系コーティングは1以上のコポリマー層及び1以上のホモポリマー層を含み得る。コポリマー層及びホモポリマー層は、コーティング中において交互配列状態で堆積させることもできる。例えば、細胞培養支持体は、コポリマー層及び/又はホモポリマー層の交互ブロックを含み得る。高分子電解質系コーティングの多数の層は、レイヤー・バイ・レイヤー(LBL)技術を用いて形成できる。LBL技術を使用することで、1以上のポリマー層を互いに重ね合わせて配列できる。

40

## 【0029】

多層高分子電解質系コーティングはコポリマーを含み得るが、かかるコポリマーはブロックコポリマーであり得る。コーティングは多数の同一又は相異なるブロックコポリマー層を含み得る。ブロックコポリマーの非限定的な一例は温度応答性両親媒性ブロックコポリマー(TRABC)である。かかるブロックコポリマーは、ポリ(ジ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート)-コ-ポリ(アクリル酸)からなり得る。ブロッ

50

クコポリマーに加えて、多層コーティングはさらに1以上の追加ポリマー層（例えば、ホモポリマー又はコポリマー）を含み得る。ホモポリマーの非限定的な例には、ポリ（L-リシン）、ポリ（アリルアミン）、ポリ（エチレンイミン）及びポリ（ビニルピロリドン）がある。

#### 【0030】

多層高分子電解質コーティング中のホモポリマー又はコポリマーは、1以上の外部刺激（例えば、温度、pH又はイオン強度）に応答し得る。ホモポリマーはイオン強度又はpH或いはその両方に応答し得る。コポリマーは温度又はpH或いはその両方に応答し得る。

#### 【0031】

多層高分子電解質系コーティングは、非共有結合的相互作用によって基体に付着させることができる。基体に対してポリマーコーティングを非共有結合的に付着させることは、しばしば、複雑な幾何学的形状の基体（例えば、フラットシート、ビーズ、立方体、多孔質フォーム、繊維及び不織布）を使用するための融通性のような顕著な利点を与える。

#### 【0032】

細胞を培養して遊離させるための本発明のキットの一実施形態は、基体及び該基体上に多層ポリマー系コーティングを有する細胞培養支持体並びに遊離溶液を含み得る。かかるキットはさらに、（例えば、凍結状態の）細胞及び/又は細胞を培養するための培地を含み得る。かかるキットはさらに、細胞の取扱い、培地及び細胞培養支持体からの遊離のためのプロトコルを含み得る。かかるキットは、キットの使用方法を記載したマニュアルと共にパッケージすることができる。

#### 【実施例】

#### 【0033】

##### 実施例 1

##### 多層ポリマー被覆細胞培養支持体の作製

多層ポリマー被覆細胞培養支持体を以下のようにして作製した。ポリ-L-リシン（PLL）被覆ガラススライド（PolySciences Inc.）を8×8mmの正方形に切断した。スライドを脱イオン（DI）水及び無水エタノールで洗浄し、次いで室温で風乾した。乾燥したスライドをポリ（ジ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート）-コ-ポリ（アクリル酸）（PDEGMEMMA-コ-PAA）の0.1% DI水溶液中に37℃で60分間浸漬した。次いで、スライドをDI水で洗浄し、ポリ-L-リシン（Aldrich社）の0.1%溶液（w/v）と共に37℃で60分間インキュベートした。ポリ-L-リシン（PLL）の0.1%溶液は、少量（約0.1mol%）のフルオレセイン5-イソチオシアネート（Sigma社からのFITC）官能化ポリ-L-リシン（FITC-PLL）蛍光プローブを含んでいた。蛍光プローブの導入により、ポリマー層の蛍光強度を測定して多層コーティングの適正な形成を判定することができる。スライドを温かい（37℃の）DI水で洗浄し、次いでポリ（ジ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート）-コ-ポリ（アクリル酸）の0.1%溶液と共に37℃で60分間インキュベートした。スライドをDI水で洗浄し、風乾した。Typhoon蛍光イメージャー上でFITC蛍光の強度を測定することにより、付着したPLLの量を求めた。

#### 【0034】

測定した蛍光の定量分析により、（FITCが結合した）PLL/PDEGMEMMA-コ-PAAの5層コーティングの形成が確認された。基体上におけるPLL/PDEGMEMMA-コ-PAAコーティングの形成はさらに、飛行時間二次イオン質量分析法（ToF-SIMS）によって確認された（データは示さず）。ToF-SIMSスペクトルは、観測された負のSiO<sub>2</sub>イオンに関してピーク高さ及びピーク位置の漸進的な減少を示した。5つのPLL/PDEGMEMMA-コ-PAA層を有するLBLコーティングは、未被覆のガラススライドに対してSiO<sub>2</sub>イオンがほとんど検出できない（データは示さず）程度に厚かった。

10

20

30

40

50

## 【0035】

実施例 2多層細胞培養支持体上での細胞培養及びそれに続く細胞遊離

細胞培養支持体を用いてヒト間葉幹細胞（hMSC、ATCC）を培養した。先ず、間葉幹細胞増殖培地（PT-3001、Lonza社）を用いて、これらの細胞をポリスチレン表面上で培養した。細胞を培養するためには、約 $10^5$ 個のヒト間葉幹細胞（初代培養物）を細胞培養支持体（未被覆及び／又は被覆ガラススライド）の表面上に播種し、5%  $CO_2$ の加湿雰囲気中において37℃でインキュベートした。

## 【0036】

細胞培養インキュベーター内において、未被覆及び／又はポリマー被覆ガラス表面上で細胞を1週間増殖させた。明視野顕微鏡検査によって細胞の拡大をモニターし、3～4日ごとに培地を交換した。PBS中に0.01%（v/v）DMSOを含む遊離溶液を添加することで細胞遊離を試験した。細胞が約100%コンフルエントである時に細胞培養支持体（未被覆又は被覆ガラススライド）から培地を除去した。細胞をPBSで洗い、次いで付着細胞を有する増殖表面を覆うのに十分な遊離溶液を添加した。遊離溶液で覆われた細胞培養支持体を室温で30分間インキュベートした。細胞層が分散するまで、細胞を倒立顕微鏡で観察した。続いて、遊離した細胞を細胞培養支持体からピペットで吸い出すことで細胞培養支持体から除去した。図1Aは、0.01%（v/v）DMSOを含む遊離溶液を用いて培養されたヒト間葉幹細胞を遊離させることを試みた後における未被覆細胞培養支持体（2）の画像を示している。図1Bは、0.01%（v/v）DMSOを含む遊離溶液を用いてヒト間葉幹細胞（6）を遊離させた後における多層PLL/PDEGMA-コ-PAA（5層）被覆細胞培養支持体（4）の画像を示している。

## 【0037】

実施例 3遊離細胞の定量的推定

WST-1アッセイ試薬を用いて細胞増殖アッセイ溶液の光学密度を450nmで測定することで実施した細胞遊離の定量的測定結果を図2に示す。細胞懸濁液を500gで5分間遠心することで遊離細胞をペレットとして沈殿させた。ペレット化細胞を200μlの増殖培地中に再懸濁し、96ウェルプレートに移した。プレートを500gで5分間回転させた。各ウェルに150μlの新鮮な増殖培地及び15μlのWST-1細胞アッセイ試薬を添加した。アッセイ試薬と共に細胞を37℃で2.5時間インキュベートした。この実験は3つの相異なる組についての反復試験で実施した。未被覆ガラススライド（棒8）及び5層のPLL/PDEGMA-コ-PAAで被覆されたガラススライド（棒10）からの細胞遊離を図2に示す。データは、5層のPLL/PDEGMA-コ-PAAで被覆されたガラススライド（10）がガラススライドの未被覆表面（8）に比べて効率的な細胞遊離をもたらすことを示している。未被覆ガラススライドは対照として役立った。未被覆ガラススライドからの遊離細胞に関する信号と5層PLL/PDEGMA-コ-PAA被覆ガラススライドからの遊離細胞に関する信号との差は遊離効率の尺度を与えるが、図2に示される通り、多層ポリマー被覆細胞培養支持体は明らかに効率的である。

## 【0038】

以上、本明細書中には本発明の若干の特徴のみを例示し説明してきたが、当業者には数多くの修正及び変更が想起されるであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は本発明の技術的範囲に含まれるこのような修正及び変更のすべてを包含することを理解すべきである。

## 【符号の説明】

## 【0039】

- 2 未被覆細胞培養支持体
- 4 多層高分子電解質被覆細胞培養支持体
- 6 ヒト間葉幹細胞

10

20

30

40

50

【図 1】

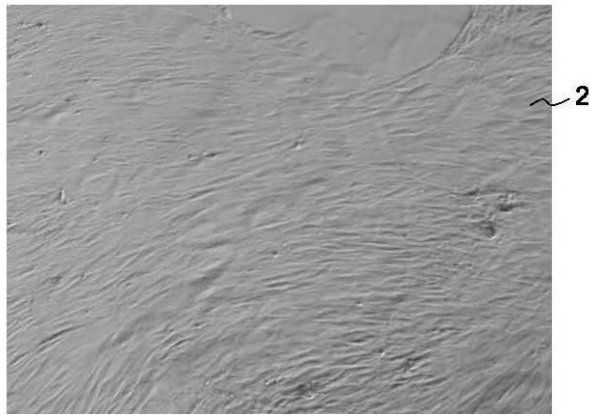


FIG. 1A

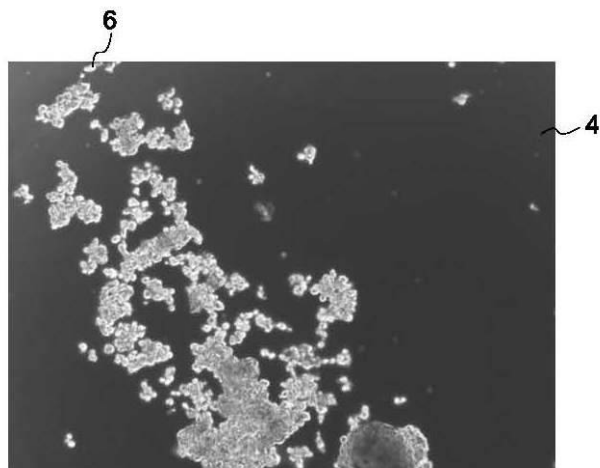


FIG. 1B

【 図 2 】

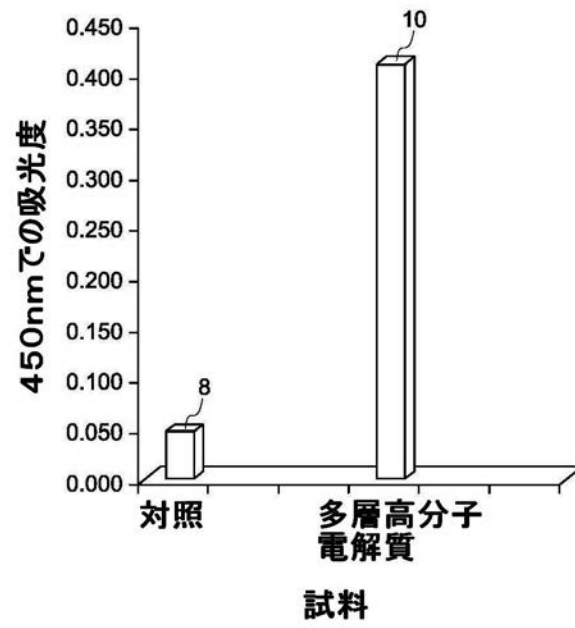


FIG. 2

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2010/051033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
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)		
IPC: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Vodouhê C. et al., "Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films", Biomaterials, 2006, Vol. 27, pages 4149-4156; abstract; page 4150, column 2, line 2 - line 3; page 4150, column 2, paragraph [0002] - paragraph [0006]; page 4151, column 1, paragraph [0001] - paragraph [0002] --	16-17, 20-21
X	Liang J.F. et al., "Dimethyl sulfoxide induces multilayer aggregates and prolongs survival of primary cultured hepatocytes", Biotechnology Techniques, 1997, Vol. 11, No. 12, pages 869-872; abstract; page 870, column 1, paragraph [0005] - page 871, column 1, paragraph [0003]; page 872, column 1, paragraph [0001] --	1, 4, 9-21
A	US 20080241926 A1 (LEE ILSOON ET AL), 2 October 2008 (2008-10-02); abstract; [0007].[0010].[0027] --	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22-12-2010		Date of mailing of the international search report 22-12-2010
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 668 02 86		Authorized officer Terese Sandström Telephone No. + 46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2010/051033
--

**Continuation of:** second sheet  
**International Patent Classification (IPC)**  
**C12N 5/02** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at [www.prv.se](http://www.prv.se) (English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at [www.prv.se](http://www.prv.se) (Swedish version)

Use the application number as username. The password is **VZCPBHYPVT**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/SE2010/051033**

US 20080241926 A1 02/10/2008 NONE

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ルビンシュタイン, スラヴォミール

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

(72)発明者 スミス, レジナルド・ディ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

(72)発明者 ロギン, イヴェリナ・アール

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

(72)発明者 スサーラ, プラミーラ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

Fターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC01 CC02

4B065 AA93X AC20 BC41 BD50