

(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
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/253069 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C08F 293/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C08J 3/12 (2006.01) C12N 11/08 (2020.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/020256

(22) 国際出願日: 2024年6月3日(03.06.2024)

(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 2023-093312 2023年6月6日(06.06.2023) JP
特願 2023-147342 2023年9月12日(12.09.2023) JP

(71) 出願人: 東ソー株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町4 5 6 0番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 今富伸哉 (IMATOMI Shinya); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 平床聖也 (HIRATOKO Shoya); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 池谷大空 (IKEYA Sora); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 金栄鎮 (KIM Young-Jin); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 林政浩 (HAYASHI Masahiro); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 最上聡文 (MOGAMI Toshifumi); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 伊藤博之 (ITO Hiroyuki); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3番地1 東ソー株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

(54) Title: TEMPERATURE-RESPONSIVE MICROCARRIER

(54) 発明の名称: 温度応答性マイクロキャリア

(57) Abstract: The present invention relates to a microcarrier that comprises beads that are coated with a polymer coating film that includes a temperature-responsive polymer that has a lower critical solution temperature of 0 ° C – 50 ° C and a polymer that has a negative charge.

(57) 要約: 本発明は、下限臨界溶解温度を0℃～50℃に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロキャリアに関する。



WO 2024/253069 A1

明 細 書

発明の名称： 温度応答性マイクロキャリア

技術分野

[0001] 本発明は、温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなる温度応答性マイクロキャリアに関する。

背景技術

[0002] 細胞を原料にして製造する細胞医薬品は難治疾患の治療薬として注目を集めている。また、抗体医薬品やワクチンなどの生産のため大量細胞培養法が注目を集めており、原料細胞を効率的に製造する技術が求められている。一般的にヒト細胞を含め多くの動物細胞は足場依存性があり、細胞を増殖する際は細胞が接着し安定的に増殖できる適切な足場が必要である。コスト低減に当たり、単位培地量当たりの細胞増殖が高くなる足場の設計を行う必要があった。これを解決するため、合成高分子や多糖などの天然高分子を原料としたビーズから構成されるマイクロキャリアが特許文献1に記載されている。マイクロキャリアを細胞懸濁液入りの容器に投入し培養することで、細胞はマイクロキャリア表面で増殖し、単位培地量当たりの細胞増殖を高めることができる。

[0003] 細胞がマイクロキャリア表面を全て覆うまで培養した後は、細胞をマイクロキャリアから剥がして新しいマイクロキャリアに植え継ぐ拡大培養を行う。一般的なマイクロキャリアではトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いてマイクロキャリアから細胞を剥がすが、タンパク質分解酵素が残存すると培養に悪影響を与えるため、タンパク質分解酵素を除去ないし中和する工程が必要となる。

[0004] これに対し、特許文献2記載の温度応答性マイクロキャリアを用いる場合は、冷却することで細胞をタンパク質分解酵素不要でマイクロキャリア表面から剥離できるため工程の簡略化が可能になる。しかしながら特許文献2記載の温度応答性マイクロキャリアでは必ずしも十分に細胞を剥離できず、よ

り好適な温度応答性を発現する温度応答性マイクロキャリアが求められた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2013-515473号公報

特許文献2：特許第6954047号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本特許の目的は、好適な温度応答性を発現する温度応答性マイクロキャリアを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、以上の点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、下限臨界溶解温度を0℃～50℃に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロキャリアにより、好適な温度応答性を発現することを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は以下の態様を含む。

<1>下限臨界溶解温度を0℃～50℃に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロキャリア。

<2>負電荷を有するポリマーの割合が0.1～20wt%であることを特徴とする<1>記載のマイクロキャリア。

<3>負電荷を有するポリマー中にカルボキシ基が含まれることを特徴とする<1>又は<2>記載のマイクロキャリア。

<4>負電荷を有するポリマー中のカルボキシ基の割合が10～50wt%であることを特徴とする<1>～<3>記載のマイクロキャリア。

<5>ビーズ表面がカチオン性であることを特徴とする<1>～<4>記載のマイクロキャリア。

<6>ビーズに正電荷を有する官能基が修飾していることを特徴とする<1>

<5>記載のマイクロキャリア。

<7>ビーズがトリメチルアンモニウムクロライド修飾ポリスチレンであることを特徴とする<1>～<6>記載のマイクロキャリア。

<8>ビーズの粒径が $20\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ であることを特徴とする<1>～<7>記載のマイクロキャリア。

<9>温度応答性ポリマーが下記（A）、（B）、（C）のブロックを含むブロック共重合体であることを特徴とする<1>～<8>記載のマイクロキャリア。

（A）HLB値（グリフィン法）が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

（B）HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

（C）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が 0°C ～ 50°C の範囲にある温度応答性重合体ブロック。

<10><1>～<9>記載のマイクロキャリアの製造方法。

<11>ビーズを、下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーとを含むポリマーコート膜で被覆する工程を備えることを特徴とする<1>～<9>記載のマイクロキャリアの製造方法。

<12><1>～<9>記載のマイクロキャリアを用いた細胞培養方法。

<13><1>～<9>記載のマイクロキャリアを含有する培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする細胞培養方法。

<14>キレート剤を導入した冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を含むことを特徴とする<12>又は<13>記載の細胞培養方法。

発明の効果

[0008] 下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロ

キャリアにより、好適な温度応答性を発現することができる。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明するが、本発明を以下の内容に限定する趣旨ではない。本発明は、その趣旨の範囲内で適宜変更して実施できる。

[0010] 本発明は下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロキャリアである。

[0011] 本発明における温度応答性ポリマーは下限臨界溶解温度が 0°C ～ 50°C で相溶性が変化すれば特に限定はないが、相溶性の変化を顕著に表すためにブロック共重合体であることが好ましく、一例として下記（A）、（B）、（C）のブロックを含むブロック共重合体を例示できる。

（A）HLB値（グリフィン法）が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

（B）HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

（C）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が 0°C ～ 50°C の範囲にある温度応答性重合体ブロック。

[0012] HLB値（Hydrophilic-Lipophile Balance : HLB）とは、W. C. Griffin, Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1, 311 (1949). に記載の、水と油への親和性の程度を表す値であり、0から20までの値を取り、0に近いほど疎水性が高く、20に近いほど親水性が高くなる。計算式によりHLB値を算出方法として、アトラス法、グリフィン法、デイビス法、川上法があるが、本明細書においては、グリフィン法により算出した値を使用し、本発明のブロック共重合体を構成する各ブロックの繰り返し単位中の親水部の式量と繰り返し単位の総式量を元に、下記の計算式により算出した。

$$HLB \text{ 値} = 20 \times (\text{繰り返し単位中の親水部の式量}) \div (\text{繰り返し単位の総式量})$$

[0013] 前述の、各ブロックの繰り返し単位中の親水部の定義として、スルホン部 ($-\text{SO}_3-$)、ホスホノ基部 ($-\text{PO}_3-$)、カルボキシル基部 ($-\text{COOH}$)、エステル部 ($-\text{COO}-$)、アミド部 ($-\text{CONH}-$)、イミド部 ($-\text{CON}-$)、アルデヒド基部 ($-\text{CHO}$)、カルボニル基部 ($-\text{CO}-$)、ヒドロキシル基部 ($-\text{OH}$)、アミノ基部 ($-\text{NH}_2$)、アセチル基部 ($-\text{COCH}_3$)、エチレンアミン部 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$)、エチレンオキシ部 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、アンモニウムイオン、ハロゲン化物イオン、酢酸イオンを例示することができる。

[0014] 繰り返し単位中の親水部の算出では、親水部を構成する原子が、他の親水部を構成する原子として重複してはならない。繰り返し単位中のHLB値の算出例を以下に記載した。例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (分子量: 295.27) の場合、親水部は、エステル部が1部、ホスホノ基部が1部およびエチレンアミン部が1部であり、親水部の分子量は181.04であるから、HLB値は12.3である。2-ジメチルアミノエチルメタクリレート (分子量: 157.11) の場合、親水部は、エステル部が1部およびエチレンアミン部が1部であり、親水部の分子量は86.07であるから、HLB値は11.0である。メチルメタクリレート (分子量: 100.12) の場合、親水部は、エステル部が1部であり、親水部の分子量は44.01であるから、HLB値は8.8である。n-ブチルメタクリレート (分子量: 142.20) の場合、親水部は、エステル部が1部であり、親水部の分子量は44.01であるから、HLB値は6.2である。

[0015] 下限臨界溶解温度 (LCST; Lower Critical Solution Temperature) とは、この温度よりも低い温度では高分子が水に溶解して透明の溶液になるが、この温度よりも高い温度では不溶

化して白濁するか沈殿が生じ、相分離する温度である。ブロック (C) に含まれる繰返し単位とその水に対する L C S T は、例えば、N-イソプロピルアクリルアミド (L C S T = 3 2 °C)、N-n-プロピルメタクリルアミド (L C S T = 2 2 °C)、N-テトラヒドロフルフルルアクリルアミド (L C S T = 2 8 °C)、N-エトキシエチルアクリルアミド (L C S T = 3 5 °C)、N,N-ジエチルアクリルアミド (L C S T = 3 2 °C)、N-イソプロピルメタクリルアミド (L C S T = 4 4 °C)、N-n-プロピルメタクリルアミド (L C S T = 2 8 °C)、N-テトラヒドロフルフルルメタクリルアミド (L C S T = 3 5 °C)、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド (L C S T = 2 3 °C)、またはN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド (L C S T = 2 0 °C) などが例示できる。本発明におけるブロック (C) は、前記繰返し単位を 1 種類のみ用いてもよく、2 種類以上を組み合わせ用いてもよい。また温度応答性を有するのであれば、前記温度応答性繰返し単位の他に、異なる繰返し単位を含んでも良い。

[0016] (A)、(B)、(C) のブロックを含むブロック共重合体の一例として、(A) 2-メトキシエチルアクリレート (H L B 値 = 1 3. 5) の繰返し単位、(B) n-ブチルアクリレート (H L B 値 = 6. 9) の繰返し単位、(C) N-イソプロピルアクリルアミド (L C S T = 3 2 °C) の繰返し単位からなるブロック共重合体が挙げられる。

[0017] 温度応答性ポリマーのその他の例として、(C) 成分のみから構成されるホモポリマーや、(A) 成分と (C) 成分から構成される共重合体、(B) 成分と (C) 成分から構成される共重合体が挙げられる。共重合体はランダム共重合体であっても、ブロック共重合体であっても良い。

[0018] 温度応答性ポリマーの数平均分子量は特に限定はないが、一例として 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 0 であり、好ましくは 5 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 0、さらに好ましくは 1 0 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 0 である。

[0019] 本発明において負電荷を有するポリマーとは、水中で電離してアニオン性を示す官能基を有するポリマーである。アニオン性を示す官能基は特に限定

はないが、一例としてヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホ基であり、これらの中でも酸性の制御が容易なことからカルボキシ基が好ましい。負電荷を有するポリマーの繰り返し単位は特に限定はないが、一例として、ビニルフェノール、アクリル酸、メタクリル酸、スチレンスルホン酸が挙げられる。負電荷を有するポリマーに、負電荷を有するポリマーの繰り返し単位の他に、負電荷を有さないポリマーの繰り返し単位を含んでも良く、一例としてスチレンスルホン酸とスチレンの共重合体が挙げられる。また共重合体はランダム共重合体やブロック共重合体であっても良い。

[0020] 負電荷を有するポリマーの官能基がカルボキシ基である場合、負電荷を有するポリマー中のカルボキシ基の割合は特に限定はないが、温度応答性を良好に発現するために、一例として10～50wt%であり、好ましく15～40wt%、より好ましくは20～30wt%である。

[0021] 負電荷を有するポリマーの数平均分子量は特に限定はないが、一例として1000～1000000であり、好ましくは5000～500000、さらに好ましくは10000～200000である。

[0022] 本発明においてビーズとは粉粒体である。ビーズの粒径に特に限定はなく、一例として1 μ m～10mm、5 μ m～5mm、20 μ m～1000 μ mである。ビーズの形状は特に限定はなく、一例として球形、直方形、円柱形、円筒形、星形などが挙げられる。ビーズの真密度は特に限定はないが、温度応答性マイクロキャリアを製造する際に使用するポリマー溶液の密度より高いほど好ましく、一例として0.9～20.0g/cm³である。またビーズに細孔があってもなくても良い。ビーズの乾燥重量当たりの比表面積は特に限定はないが、一例として10～100000cm²/gである。乾燥重量当たりの比表面積はBET (Brunauer Emmett Teller) 法で測定した値を用いることもできるが、本出願ではSEM画像から求めた平均粒子径と粒子比重から計算して求めた。

[0023] ビーズの素材に特に限定はなく、一例として金属、金属酸化物、無機塩、合成高分子、生体高分子、またはそれらの複合物など様々な素材に適用でき

る。ビーズの表面は特に限定はないが、細胞増殖を高めるためにカチオン性であること、又は正電荷を有する官能基が修飾していることが好ましい。正電荷を有する官能基の一例として、アンモニウム基やアンモニウム基誘導体が挙げられる。具体的なビーズとしては例えば、ポリスチレン等が挙げられ、トリメチルアンモニウムクロライド修飾ポリスチレンが好ましい。

[0024] 本発明において温度応答性マイクロキャリアの製法は特に限定はないが、一般的な、ビーズにポリマーを吸着させるなどの物理的に被覆する方法又はビーズにポリマーを共有結合で固定するなどの化学的に被覆する方法が挙げられる。ビーズにポリマーを吸着させるなどビーズを物理的に被覆する場合は、被覆する方法に特に限定はなく、一例として含浸法や浸漬法、ヘンシェルミキサー法が挙げられる。含浸法及び浸漬法はビーズにポリマー溶液を浸漬ないし吹付を行い、減圧して溶媒を除去することで温度応答性マイクロキャリアが得られる。ヘンシェルミキサー法は、攪拌翼付きの反応槽でビーズを攪拌翼により攪拌させながら、乾燥用の気体を反応槽内に吹き込みつつ、ポリマーコート溶液を加えることで、短時間で温度応答性マイクロキャリアを得る方法である。ヘンシェルミキサー法及び含浸法は用いたポリマー溶液を全量吸着できるため温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーの組成比調整や被覆量調整が容易な利点がある。また、後者のビーズにポリマーを化学共有結合で固定する場合は、化学共有結合の種類に特に限定はなく、一例としてエステル結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合などが挙げられ、反応後に洗浄して未反応化合物を除去することで温度応答性マイクロキャリアが得られる。被覆後の乾燥工程において、乾燥用の気体に制限はなく、例えば窒素、空気、アルゴン、ネオン等、ビーズ及びポリマーコート溶液と反応性の無い気体であれば特に制限はない。

[0025] 本発明において温度応答性マイクロキャリアの製造方法は、例えば、ビーズを、下限臨界溶解温度を0℃～50℃に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーとを含むポリマーコート膜で被覆する工程を備えることを特徴とする方法であってもよい。

[0026] 本発明において温度応答性マイクロキャリアの負電荷を有するポリマーの割合は特に限定はないが、一例として0.1～20wt%であり、好適な温度応答性を発現するために、好ましくは0.3～10wt%、より好ましくは0.5～5wt%、更に好ましくは0.5～4wt%であり、特に好ましくは0.5～3wt%である。

[0027] 本発明において温度応答性マイクロキャリアは細胞培養、特に接着性細胞の細胞培養に使用できる。接着性細胞とはマイクロキャリア等の細胞培養基材の表面に付着しながら増殖する細胞である。培養する接着細胞の由来は特に限定はないが、一例としてヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、ヌードマウス、マウス、モルモット、ブタ、ヒツジ、チャイニーズハムスター、ウシ等の哺乳類やニワトリ、アヒル等の鳥類等が挙げられる。また、培養する細胞（接着細胞）の種類に特に限定はなく、一例としてヒト又は動物由来間葉系幹細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞、アフリカミドリザルの腎臓上皮由来のVERO細胞、イヌ腎臓由来のMDCK細胞、ヒト胎児正常肺組織由来のMRC-5細胞、ニワトリ胎児由来のCEF細胞、ハムスター腎臓由来のBHK細胞、マウス結合組織由来のL929細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞HEK293細胞、ウシ腎臓由来のMDBK細胞、ネコ腎臓由来のCRFK細胞、モルモット腎臓由来のCPK細胞、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞、更に生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の代謝に関与する肝実質細胞、肝非実質細胞や脂肪細胞、分化能を有する細胞として、種々の組織に存在する幹細胞、さらにはそれらから分化誘導した細胞が挙げられる。また、上述の細胞種が不死化された細胞株などが挙げられる。これら以外でも、血液、リンパ液、髄液、喀痰、尿又は便に含まれる細胞や、体内あるいは環境中に存在する微生物、ウイルス、原虫等を例示できる。使用する培地の種類は特に限定はなく、血清培地であっても無血清培地であっても良く、細胞の種類に応じて適宜選択できる。

[0028] 本発明の培養で使用される基礎培地の種類は特に限定はなく、例えば、MEM、 α MEM、DMEM、EMEM、GMEM、DMEM/Ham's F-12、Ham's F-12、Ham's F-10、Medium 199、RPMI 1640などを用いることができる。また、血清培地であっても無血清培地であっても良いが、使用血清は特に限定はなく、例えば、牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS)、児牛血清、成牛血清、ウマ血清、ヒツジ血清、ヤギ血清、ブタ血清、ニワトリ血清、ウサギ血清、ヒト血清が使用できる。また、完成培地は抗生物質を含有してもしなくても良く、細胞の種類に応じて適宜選択できる。

[0029] 本発明の温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法は特に限定はなく、静置条件で培養しても良いし、攪拌条件で培養しても良い。攪拌条件で培養する場合は攪拌速度に特に限定はなく、一例として1~1000 rpmである。培養時の培養温度は特に限定はないが、温度応答性ポリマー被覆されたマイクロキャリアの表面が疎水化し細胞が接着しやすい環境の提供ができるLCST以上で行うことが好ましい。培養後はLCST未満の温度に冷却することでマイクロキャリア上の細胞を回収できる。冷却方法は特に限定はなく、冷却器を使用して直接冷却しても良いし、培地を冷却液で交換しても良い。冷却液は基礎培地であっても、成長因子や血清等を含む完成培地であっても、リン酸緩衝液であっても良いが、リン酸緩衝液を選択することで細胞がマイクロキャリアから剥離しやすくなる。冷却用のリン酸緩衝液にEDTA、EGTAなどのキレート剤を導入すると細胞がさらにシングルセルとしてマイクロキャリアから剥離しやすくなる。ここでシングルセルとは、細胞同士が繋がっている状態から脱し、1細胞ごとに分離していることを意味している。リン酸緩衝液中のキレート剤の濃度は特に限定はなく、1 μ M~1 mMである。細胞を回収する際は、冷却液に流動があると温度応答性マイクロキャリアの冷却を促進できるため好ましく、一例として攪拌やピペティングで流動を得ることができる。

[0030] 本発明の温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法は、例えば、

本発明のマイクロキャリアを含有する培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする方法であってもよい。本発明の温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法は、キレート剤を導入した冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を更に含んでもよい。

[0031] 本発明の温度応答性マイクロキャリアの培養性能は全細胞数と冷却剥離率で評価する。全細胞数が同じ培養面積の現行の汎用マイクロキャリアで培養した全細胞数と同等もしくは下回る場合は培養性能不良と判断する。現行の汎用マイクロキャリアは、Cytiva社の表面がカチオン性であるCytodex 1又は／及びCorning社の表面がアニオン性であるCellbindとする。温度応答性冷却剥離率の評価方法は特に限定はないが、一例として（１）冷却で回収した細胞数を測定し、さらに（２）冷却で剥離しなかった細胞はタンパク質分解酵素を用いて回収した細胞数を測定し、（１）の細胞数を、（１）と（２）の細胞数の和で割り、１００を掛けた値で冷却剥離率として評価することができる。細胞数の計測方法は特に限定はないが、血球計算板などを用いて評価できる。

実施例

[0032] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例により何ら制限されるものではない。なお、断りのない限り、試薬は市販品を用いた。

[0033] ＜ブロック共重合体の組成解析＞

核磁気共鳴測定装置（日本電子製、商品名JNM-ECZ400S/L1）を用いたプロトン核磁気共鳴分光（ $^1\text{H-NMR}$ ）スペクトル分析より求めた。

[0034] ＜ブロック共重合体の分子量、分子量分布の解析＞

重量平均分子量（ M_w ）、数平均分子量（ M_n ）及び分子量分布（ M_w/M_n ）は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）によって測定した。GPC装置は東ソー（株）製 HLC-8320GPCを用い、カラムは東ソー（株）製 TSKgel SuperAWM-Hを2本用い、カラム温度を40℃に設定し、溶離液は10mMトリフルオロ酢酸ナト

リウムを含む2, 2, 2-トリフルオロエタノールを用いて測定した。測定試料は1.0 mg/mLで調製して測定した。分子量の検量線は、分子量既知のポリメタクリル酸メチル (Sigma-Aldrich社製) を用いた。

[0035] <温度応答性ポリマーMBIの合成>

100 mL 2口フラスコに2-メトキシエチルアクリレート (MEA) 0.650 g (5 mmol) を加え、さらにシアノメチルドデシルカルボナートを31.8 mg (100 μ mol) とアゾビスイソブチロニトリル1.6 mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン10 mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱撹拌した。

[0036] 1回目の加熱撹拌後、上記にn-ブチルアクリレート (BA) 3.845 g (30 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6 mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン5 mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で48時間加熱撹拌した。

[0037] 2回目の加熱撹拌後、上記にN-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm, LCST=32℃) 7.355 g (65 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6 mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン35 mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で48時間加熱撹拌した。

[0038] 3回目の加熱撹拌後、反応液を水で再沈精製し、減圧乾燥することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をクロロホルムに溶解し、分液ロートを用いクロロホルム相を回収した。回収したクロロホルム相をエバポレーターで濃縮し、ヘキサンで再沈精製した。沈殿物をろ過で回収し、減圧乾燥することで、ポリマーMBIを5.805 g得た。得られたブロック共重合体MBIの組成比はMEA/BA/IPAAm=5/26/69 (mol%) であり、数平均分子量Mnは8.5万、分子量分布Mw/Mnは1.78であった。

[0039] <負電荷を有するポリマーCStS>

100 mL 2口フラスコにp-カルボキシスチレン (CSt) 1.156

g (8 mmol) とスチレン (St) 1.271 g (12 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 3.3 mg (20 μ mol) と tert-ブチルアルコール 20 mL を加え、アルゴンガス置換後、64°C で 24 時間加熱攪拌した。反応液を n-ヘプタンで再沈精製し、減圧乾燥することで、ポリマー CStS を 0.92 g 得た。ポリマー CStS の組成比は CSt/St = 33/67 (mol%)、数平均分子量 Mn は 10.6 万、分子量分布 Mw/Mn は 1.84 であった。

[0040] <エバポレーターの設置>

ロータリーエバポレーターとして東京理化器械製の N-1300、小型冷却水循環装置として東京理化器械製の CCA-1112A、ダイヤフラム型真空ポンプとして東京理化器械製の NVP-2100V、ウォーターバスとして東京理化器械製の OSB-2200 をそれぞれ設置した。小型冷却水循環装置の流体に水を使用し、温度は 3°C にした。ウォーターバスの温度は 50°C にした。

[0041] <細胞数と細胞生存率の計測>

細胞懸濁液中から 10 μ L を細胞数測定用スライド (Thermo Fisher Scientific 製、商品名 Countess Cell Counting Chamber Slid) に添加し自動セルカウンター (Thermo Fisher Scientific 製、商品名 Countess II) を用いて、細胞数を測定した。

[0042] 実施例 1

200 mL のフラスコに 0.050 wt% の温度応答性ブロック共重合体 MBI の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g と 0.0025 wt% のポリマー CStS の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g 加えた。さらに直径 130 μ m の乾燥したポリスチレンビーズ (表面: カチオン性、平均比重: 1.08) を 10 g 加え、1 分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度 60 rpm に設定の上、12000 Pa で 1 分間定圧処理した。さらに 10000 Pa で 1 分間定圧処理、8000 Pa

で1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0043] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が4.76wt%である温度応答性マイクロキャリア1を得た。

[0044] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに204mg（培養面積87cm²）の温度応答性マイクロキャリア1と30mLのPromoCell社製間葉系幹細胞増殖培地2を加えた。さらにロンザ製のヒト骨髄由来間葉系幹細胞（継代数2）を 5×10^5 cells加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気インキュベーター内で100rpmの攪拌条件で6日間培養した。

[0045] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、静置してマイクロキャリアを沈降させ、22.5mLの培地を抜取り、新たに22.5mLの1mMのEDTAを含む4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-））を加え、10分間静置した。静置後に室温で3分間、300rpmで攪拌した。細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、さらにセルストレーナー上に5mLのPBS（-）を2回加え、細胞をチューブ内に回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 70.8×10^5 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15mLのチューブに移し、5mLのTrypLE Express Enzyme（Thermo Fisher Scientific

i c 製)を加え、37℃の5vol%CO₂雰囲気です5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、さらにセルストレーナー上に5mLのPBS(一)を2回加え、細胞をチューブ内に回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は22.1×10⁵個であった。冷却剥離率は76%だった。

[0046] 実施例2

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.0015wt%のポリマーCS t Sの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。さらに直径130μmの乾燥したポリスチレンビーズ(表面:カチオン性、平均比重:1.08)を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0047] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が2.91wt%である温度応答性マイクロキャリア2を得た。

[0048] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア2を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は78.2×10⁵個で、冷却で回

収できなかった細胞数は 18.2×10^5 個であった。冷却剥離率は81%だった。

[0049] 実施例3

200 mLのフラスコに0.050 wt %の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10 gと0.0005 wt %のポリマーCS t Sの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10 g加えた。さらに直径 $130 \mu\text{m}$ の乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10 g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60 rpmに設定の上、12000 Paで1分間定圧処理した。さらに10000 Paで1分間定圧処理、8000 Paで1分間定圧処理、6000 Paで2分間定圧処理、4000 Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500 Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0050] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150 mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200 mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.99 wt %である温度応答性マイクロキャリア3を得た。

[0051] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア3を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 96.4×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 19.1×10^5 個であった。冷却剥離率は83%だった。

[0052] 実施例4

200 mLのフラスコに0.050 wt %の温度応答性ブロック共重合体

MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.00038wt%のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理し真空含浸処理を行った。

[0053] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.74wt%である温度応答性マイクロキャリア4を得た。

[0054] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア4を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 93.4×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 3.6×10^5 個であった。冷却剥離率は96%だった。

[0055] 実施例5

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.00025wt%のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Pa

aで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0056] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.50wt%である温度応答性マイクロキャリア5を得た。

[0057] <ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア5を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髓由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 73.2×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 29.3×10^5 個であった。冷却剥離率は71%だった。

[0058] 実施例6

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を12gと0.00038wt%のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を12g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0059] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150 mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200 mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.74 wt %である温度応答性マイクロキャリア6を得た。

[0060] <ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア6を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髓由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 109.0×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.6×10^5 個であった。冷却剥離率は98%だった。

[0061] 実施例7

200 mLのフラスコに0.050 wt %の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を8 gと0.00038 wt %のポリマーCS t Sの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を8 g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10 g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60 rpmに設定の上、12000 Paで1分間定圧処理した。さらに10000 Paで1分間定圧処理、8000 Paで1分間定圧処理、6000 Paで2分間定圧処理、4000 Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500 Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0062] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150 mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200 mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有する

ポリマーの割合が0.74wt%である温度応答性マイクロキャリア7を得た。

[0063] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア7を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 94.7×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 20.5×10^5 個であった。冷却剥離率は82%だった。

[0064] 実施例8

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を6gと0.00038wt%のポリマーCSISの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を6g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0065] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.74wt%である温度応答性マイクロキャリア8を得た。

[0066] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア8を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄

由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 84.7×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 28.6×10^5 個であった。冷却剥離率は75%だった。

[0067] 実施例9

<VERO細胞培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに356mg（培養面積150cm²）の温度応答性マイクロキャリア2と30mLの10%のウシ胎児血清（Fetal bovine serum、バイオウエスト社製）と1%の抗生物質－抗真菌剤溶液（和光純薬社製）を含有するDME M（Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製）を加えた。さらにJCRB細胞バンク製のVERO細胞（継代数16）を 1×10^6 cells加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気インキュベーター内で120rpmの攪拌条件で8日間培養した。

[0068] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペッティング操作を行い、剥離細胞を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 15.0×10^6 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15mLのチューブに移し、5mLのCTS TrypLE Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、37℃の5vol%CO₂雰囲気で5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった

細胞数は 1.7×10^6 個であった。冷却剥離率は89%だった。

[0069] 実施例10

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア3を用いたこと以外は実施例9の<VERO細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 11.0×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.8×10^6 個であった。冷却剥離率は86%だった。

[0070] 実施例11

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア4を用いたこと以外は実施例9の<VERO細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 12.8×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 0.8×10^6 個であった。冷却剥離率は94%だった。

[0071] 比較例1

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.050wt%のポリマーCSISの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。さらに直径 $130\mu\text{m}$ の乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0072] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終

的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が50.00wt%である温度応答性マイクロキャリア9を得た。

[0073] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア9を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 22.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 89.0×10^5 個であった。冷却剥離率は20%だった。

[0074] 比較例2

200mLのフラスコに0.050wt%の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。さらに直径 $130\mu\text{m}$ の乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60rpmに設定の上、12000Paで1分間定圧処理した。さらに10000Paで1分間定圧処理、8000Paで1分間定圧処理、6000Paで2分間定圧処理、4000Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0075] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.00wt%である温度応答性マイクロキャリア10を得た。

[0076] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア10を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し

、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 39.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 10.7×10^5 個であった。冷却剥離率は79%だが、全細胞数が参考例1記載の現行の汎用マイクロキャリアで培養した全細胞数を下回った。

[0077] 比較例3

200 mLのフラスコに0.050 wt %のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10 g加えた。さらに直径 $130 \mu\text{m}$ の乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）を10 g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60 rpmに設定の上、12000 Paで1分間定圧処理した。さらに10000 Paで1分間定圧処理、8000 Paで1分間定圧処理、6000 Paで2分間定圧処理、4000 Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500 Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0078] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150 mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200 mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が100.00 wt %であるマイクロキャリア11を得た。

[0079] <ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア11を用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髓由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髓由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 2.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 98.5×10^5 個であった。冷却剥離率は2%だった。

[0080] 比較例4

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア9を用いたこと以外は実施例9の<VERO

細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 6.7×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 6.1×10^6 個であった。冷却剥離率は52%だった。

[0081] 比較例 5

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア10を用いたこと以外は実施例9の<VERO細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 6.9×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.2×10^6 個であった。冷却剥離率は85%だった。

[0082] 比較例 6

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア11を用いたこと以外は実施例9の<VERO細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 1.4×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.1×10^6 個であった。冷却剥離率は85%だった。

[0083] 参考例 1

<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに20mg（培養面積 87 cm^2 ）のオートクレーブ滅菌したCytodex 1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を加えた。さらにロンザ製のヒト骨髄由来間葉系幹細胞（継代数2）を 5×10^5 cells加えて37℃の5vol% CO₂雰囲気インキュベーター内で60rpmの攪拌条件で6日間培養した。

[0084] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、静置してCytodex 1を沈降させ、27mLの培地を抜取り、新たに27mLのPBS（－）を加えた。静置してCytodex 1を沈降させ、27mLの液を抜取り、5mLのTrypLE Express Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、37℃の5vol% CO₂雰囲気5分間静置した。細胞懸濁液を目

開き $70\ \mu\text{m}$ のセルストレーナーをセットした $50\ \text{mL}$ のチューブに通し、さらにセルストレーナー上に $5\ \text{mL}$ の PBS (－) を 2 回加え、細胞をチューブ内に回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。細胞数は 51.7×10^5 個であった。

[0085] 参考例 2

<VERO細胞培養>

参考例 1 のマイクロキャリア (Cytodex 1、表面：カチオン性、平均比重：1.03) を $34.1\ \text{mg}$ (培養面積 $150\ \text{cm}^2$) 用いたこと及び攪拌速度を $60\ \text{rpm}$ にしたこと以外は実施例 9 の<VERO細胞培養>と同じ方法で VERO 細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 1.4×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 8.7×10^6 個であった。冷却剥離率は 14% だった。

[0086] 参考例 3

<VERO細胞培養>

エイブル社製の $30\ \text{mL}$ シングルユースバイオリアクターに $416\ \text{mg}$ (培養面積 $150\ \text{cm}^2$) のオートクレーブ滅菌した Cellbind (表面：アニオン性、平均比重：1.026) を加えた。さらに $30\ \text{mL}$ の 10% のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum、バイオウエスト社) と 1% の抗生物質－抗真菌剤溶液 (和光純薬社) を含有する DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社) を加えた。さらに JCRB 細胞バンク製の VERO 細胞 (継代数 16) を 1×10^6 cells 加えて 37°C の 5 vol% CO_2 雰囲気インキュベーター内で $120\ \text{rpm}$ の攪拌条件で 8 日間培養した。Cellbind マイクロキャリアを用いたこと以外は実施例 9 の<VERO細胞培養>と同じ方法で VERO 細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 1.4×10^6 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 14.1×10^6 個であった。冷却剥離率は 9% だった。

[0087] 実施例 12

200 mLのフラスコに0.050 wt %の温度応答性ブロック共重合体MBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を12 gと0.00038 wt %のポリマーCS t Sの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を12 g加えた。さらに直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を10 g加え、1分間静置した。フラスコをエバポレーターに設置し、攪拌速度60 rpmに設定の上、12000 Paで1分間定圧処理した。さらに10000 Paで1分間定圧処理、8000 Paで1分間定圧処理、6000 Paで2分間定圧処理、4000 Paで3分間定圧処理した。攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで1500 Paまで減圧し真空含浸処理を行った。

[0088] フラスコをエバポレーターから取り外し、イオン交換水を150 mL加え、超音波を照射し10分間静置した。ろ過で回収したビーズを200 mLのフラスコに移し、エバポレーターで攪拌速度120 rpmに設定の上、最終的に真空ポンプの出力を最大にして30分間処理することで負電荷を有するポリマーの割合が0.74 wt %である温度応答性マイクロキャリア12を得た。

[0089] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア12を195 mg（培養面積87 cm²）用いたこと及び攪拌速度を60 rpmにした以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 61.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.4×10^5 個であった。冷却剥離率は98%だった。

[0090] 実施例13

500 mLのセパラブルフラスコをセットしPTFE（poly（1, 1, 2, 2-tetrafluoroethylene）製）攪拌翼を装着し、直径130 μ mの乾燥したポリスチレンビーズ（表面：カチオン性、平均比重：1.08）40 gを加え100 rpmで攪拌しながらフラスコ内窒素

ガスでパージした。ポリスチレンビーズを80℃まで予熱させた後、攪拌速度を300rpmまで上げ、0.014wt%の温度応答性ブロックコポリマーMBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を7gと0.0001wt%のポリマーCSISの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を1g加え4分間混合した。80℃の熱風乾燥機で20時間追加乾燥後、負電荷を有するポリマーの割合が4.76wt%である温度応答性マイクロキャリア13を得た。

[0091] <ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア13を204mg（培養面積87cm²）用いたこと以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 16.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 2.4×10^5 個であった。冷却剥離率は87%だった。

[0092] 参考例4

<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCellbind（表面：アニオン性、平均比重：1.026）を238mg（培養面積87cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 20.0×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 28.2×10^5 個であった。冷却剥離率は59%だった。

[0093] 参考例5

<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を20mg（培養面積87cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例1の<ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養>と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 21.1×10^5 個で、冷却で回収できな

った細胞数は 28.9×10^5 個であった。冷却剥離率は42%だった。

[0094] 実施例14

<VERO細胞培養>

温度応答性マイクロキャリア13を340mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例9の<VERO細胞培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 122.0×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 12.0×10^5 個であった。冷却剥離率は91%だった。

[0095] 実施例15

<VERO細胞の無血清培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに356mg（培養面積150cm²）の温度応答性マイクロキャリア13とVP-SFM（1X）（Thermo Fisher Scientific製、製品番号：11681020）1Lに200mMのL-Glutamine Solution（1X）（ATCC製、製品番号：30-2214）20mLを加え最終濃度が20mMの完成培地30mLを加えた。さらに、Vero細胞（American Type Culture Collection（ATCC）製、製品番号：CCL-81）を 1×10^6 cells加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気の内インキュベーター内で100rpmの攪拌条件で8日間培養した。

[0096] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペッティング操作を行い、剥離細胞を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は46.

5×10^5 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15 mLのチューブに移し、5 mLのCTS TrypLE Select Enzyme (Thermo Fisher Scientific製)を加え、 37°C の5 vol% CO_2 雰囲気です5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70 μm のセルストレーナーをセットした50 mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は 4.2×10^5 個であった。冷却剥離率は92%だった。

[0097] 参考例6

<VERO細胞の無血清培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex 1 (表面:カチオン性、平均比重:1.03)を34.1 mg (培養面積150 cm^2) 用いたこと及び攪拌速度を60 rpmにした以外は実施例15の<VERO細胞の無血清培養>と同じ方法でVERO細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 3.6×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 36.4×10^5 個であった。冷却剥離率は9%だった。

[0098] 実施例16

<BHK-21細胞培養>

エイブル社製の30 mL シングルユースバイオリアクターに340 mg (培養面積150 cm^2) の温度応答性マイクロキャリア12と10%のウシ胎児血清 (FBS、バイオウエスト社製) と1%の抗生物質-抗真菌剤溶液 (和光純薬社製) を含有するDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製) の完成培地30 mLを加えた。さらに、BHK-21細胞 (ATCC製、製品番号:CCL-10) を 1×10^6 cells加えて 37°C の5 vol% CO_2 雰囲気のインキュベーター内で60 rpmの攪拌条件で7日間培養した。

[0099] 培養後、30 mL シングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70 μm のセルストレーナーをセットした50 mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞

が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペティング操作を行い、剥離細胞を目開き70 μ mのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は148.0 $\times 10^5$ 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15mLのチューブに移し、5mLのCTS TrypLE Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、37℃の5vol%CO₂雰囲気です5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70 μ mのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は19.0 $\times 10^5$ 個であった。冷却剥離率は89%だった。

[0100] 参考例7

<BHK-21細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCellbind（表面：アニオン性、平均比重：1.026）を416mg（培養面積150cm²）用いたこと以外は実施例16の<BHK-21細胞培養>と同じ方法でBHK-21細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は6.0 $\times 10^5$ 個で、冷却で回収できなかった細胞数は115.0 $\times 10^5$ 個であった。冷却剥離率は5%だった。

[0101] 参考例8

<BHK-21細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を34.1mg（培養面積150cm²）用いたこと以外は実施例16の<BHK-21細胞培養>と同じ方法でBHK-21細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は18.0 $\times 10^5$ 個で、冷却で回収できなかった細胞数は104.0 $\times 10^5$ 個であった。冷却剥離率は15%だった。

[0102] 実施例 17

<CRFK細胞培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに356mg（培養面積150cm²）の温度応答性マイクロキャリア4と10%のウマ血清（HS、シグマアルドリッチジャパン合同会社製）を含有するEMEM（ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium、ATCC製、製品番号：30-2003）の完成培地30mLを加えた。さらに、CRFK細胞（ATCC製、製品番号：CCL-94）を 0.8×10^6 cells加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気の内キュベーター内で100rpmの攪拌条件で7日間培養した。

[0103] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペッティング操作を行い、剥離細胞を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 26.8×10^5 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15mLのチューブに移し、5mLのCTS TrypLE Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、37℃の5vol%CO₂雰囲気で5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は 3.1×10^5 個であった。冷却剥離率は90%だった。

[0104] 実施例 18

<CRFK細胞培養>

マイクロキャリア12を340mg（培養面積150cm²）用いたこと及

び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例17の＜CRFK細胞培養＞と同じ方法でCRFK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 13.8×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 3.8×10^5 個であった。冷却剥離率は78%だった。

[0105] 実施例19

＜CRFK細胞培養＞

マイクロキャリア13を356mg（培養面積150cm²）用いたこと以外は実施例17の＜CRFK細胞培養＞と同じ方法でCRFK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 21.2×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 4.6×10^5 個であった。冷却剥離率は82%だった。

[0106] 参考例9

＜CRFK細胞培養＞

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCellbind（表面：アニオン性、平均比重：1.026）を416mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例17の＜CRFK細胞培養＞と同じ方法でCRFK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 9.2×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 12.9×10^5 個であった。冷却剥離率は42%だった。

[0107] 参考例10

＜CRFK細胞培養＞

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を34.1mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例17の＜CRFK細胞培養＞と同じ方法でCRFK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 3.2×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 16.0×10^5 個であった。冷却剥離率は17%だった。

[0108] 実施例20

<MDCK細胞培養>

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに356mg（培養面積150cm²）の温度応答性マイクロキャリア4と10%のウシ胎児血清（FBS、バイオウエスト社製）と1%の抗生物質－抗真菌剤溶液（和光純薬社製）を含有するDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製）の完成培地30mLを加えた。さらに、MDCK細胞（Japanese Collection of Research Bioresources（JCRB）製、製品番号：JCRB9029）を 0.6×10^6 cells加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気インキュベーター内で100rpmの攪拌条件で7日間培養した。

- [0109] 培養後、30mLシングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、4℃のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペッティング操作を行い、剥離細胞を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 137.0×10^5 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15mLのチューブに移し、5mLのCTS TrypLE Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、37℃の5vol%CO₂雰囲気5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナーをセットした50mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は 37.0×10^5 個であった。冷却剥離率は79%だった。

- [0110] 実施例21

<MDCK細胞培養>

マイクロキャリア12を340mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例19の＜MDCK細胞培養＞と同じ方法でMDCK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 112.0×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 32.0×10^5 個であった。冷却剥離率は78%だった。

[0111] 参考例11

＜MDCK細胞培養＞

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCellbind（表面：アニオン性、平均比重：1.026）を416mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例20の＜MDCK細胞培養＞と同じ方法でMDCK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 2.3×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 68.8×10^5 個であった。冷却剥離率は3%だった。

[0112] 参考例12

＜MDCK細胞培養＞

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を34.1mg（培養面積150cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例20の＜MDCK細胞培養＞と同じ方法でMDCK細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 16.7×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 157.4×10^5 個であった。冷却剥離率は10%だった。

[0113] 実施例22

＜MRC-5細胞培養＞

エイブル社製の30mLシングルユースバイオリアクターに204mg（培養面積87cm²）の温度応答性マイクロキャリア4と10%のウシ胎児血清（FBS、バイオウエスト社製）と1%の抗生物質－抗真菌剤溶液（和光純薬社製）を含有するDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製）の完成培地30mLを加えた

。さらに、MRC-5細胞（Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 製、製品番号：JCRB9008）を 0.5×10^6 cells 加えて 37°C の5 vol % CO_2 雰囲気の内キュベーター内で100 rpmの撹拌条件で6日間培養した。

[0114] 培養後、30 mL シングルユースバイオリアクターを室温の安全キャビネットに移し、細胞懸濁液を目開き70 μm のセルストレーナーをセットした50 mLのチューブに通し、浮遊細胞を除去し、セルストレーナー上の細胞が接着されているマイクロキャリアのみ回収し、 4°C のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））を加え、10分間静置した。静置後に60回ピペッティング操作を行い、剥離細胞を目開き70 μm のセルストレーナーをセットした50 mLのチューブに通すことで回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 9.8×10^5 個であった。さらにセルストレーナー上のマイクロキャリアを15 mLのチューブに移し、5 mLのCTS TrypLE Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を加え、 37°C の5 vol % CO_2 雰囲気で5分間静置した。細胞懸濁液を目開き70 μm のセルストレーナーをセットした50 mLのチューブに通し、細胞を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。冷却で回収できなかった細胞数は 4.1×10^5 個であった。冷却剥離率は71%だった。

[0115] 実施例23

<MRC-5細胞培養>

マイクロキャリア12を195 mg（培養面積87 cm^2 ）用いたこと及び撹拌速度を60 rpmにした以外は実施例22の<MRC-5細胞培養>と同じ方法でMRC-5細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 18.8×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 1.0×10^5 個であった。冷却剥離率は95%だった。

[0116] 参考例13

<MRC-5細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCellbind（表面：アニオン性、平均比重：1.026）を238mg（培養面積87cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例22の<MRC-5細胞培養>と同じ方法でMRC-5細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 3.4×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 8.8×10^5 個であった。冷却剥離率は28%だった。

[0117] 参考例14

<MRC-5細胞培養>

マイクロキャリアをオートクレーブ滅菌したCytodex1（表面：カチオン性、平均比重：1.03）を20mg（培養面積87cm²）用いたこと及び攪拌速度を60rpmにした以外は実施例22の<MRC-5細胞培養>と同じ方法でMRC-5細胞を培養し、細胞数を計測した。冷却で回収した細胞数は 4.2×10^5 個で、冷却で回収できなかった細胞数は 9.2×10^5 個であった。冷却剥離率は31%だった。

[0118]

[表1]

	負電荷を有するポリマーの割合	マイクロキャリアコード	冷却で回収した細胞数	剥離しなかった細胞数	細胞培養性能	冷却剥離率	
						%	-
	wt%	-	10 ⁵ 個	10 ⁵ 個	-		
実施例 1	4.76	マイクロキャリア 1	70.8	22.1	良好	76	良好
実施例 2	2.91	マイクロキャリア 2	78.2	18.2	良好	81	良好
実施例 3	0.99	マイクロキャリア 3	96.4	19.1	良好	83	良好
実施例 4	0.74	マイクロキャリア 4	93.4	3.6	良好	96	良好
実施例 5	0.50	マイクロキャリア 5	73.2	29.3	良好	71	良好
実施例 6	0.74	マイクロキャリア 6	109.0	1.6	良好	98	良好
実施例 7	0.74	マイクロキャリア 7	94.7	20.5	良好	82	良好
実施例 8	0.74	マイクロキャリア 8	84.7	28.6	良好	75	良好
実施例 9	2.91	マイクロキャリア 2	150.0	17.0	良好	89	良好
実施例 10	0.99	マイクロキャリア 3	110.0	18.0	良好	86	良好
実施例 11	0.74	マイクロキャリア 4	128.0	8.0	良好	94	良好
比較例 1	50.00	マイクロキャリア 9	22.3	89.0	良好	20	不良
比較例 2	0.00	マイクロキャリア 10	39.3	10.7	不良	79	良好
比較例 3	100.00	マイクロキャリア 11	2.3	98.5	良好	2	不良
比較例 4	50.00	マイクロキャリア 9	67.0	61.0	良好	52	不良
比較例 5	0.00	マイクロキャリア 10	69.0	12.0	不良	85	良好
比較例 6	100.00	マイクロキャリア 11	14.0	111.0	良好	11	不良
参考例 1	0.00	Cytodex1	-	51.7	良好	-	-
参考例 2	0.00	Cytodex1	14.0	87.0	良好	14	不良
参考例 3	0.00	Cellbind	14.0	141.0	良好	9	不良

[0119] [表2]

	負電荷を有する ポリマーの割合 wt%	マイクロキャリアコード -	冷却で回収した細胞数 10 ⁵ 個	剥離しなかった細胞数 10 ⁵ 個	細胞培養性能 -	冷却剥離率	
						%	-
実施例 12	0.74	マイクロキャリア 12	61.3	1.4	良好	98	良好
実施例 13	4.76	マイクロキャリア 13	16.3	2.4	良好	87	良好
参考例 4	0.00	Cellbind	28.2	20.0	良好	59	不良
参考例 5	0.00	Cytodex1	21.1	28.9	良好	42	不良
実施例 14	0.74	マイクロキャリア 12	122.0	12.0	良好	91	良好
実施例 15	4.76	マイクロキャリア 13	46.5	4.2	良好	92	良好
参考例 6	0.00	Cytodex1	3.6	36.4	良好	9	不良
実施例 16	0.74	マイクロキャリア 12	148.0	19.0	良好	89	良好
参考例 7	0.00	Cellbind	6.0	115.0	良好	5	不良
参考例 8	0.00	Cytodex1	18.0	104.0	良好	15	不良
実施例 17	0.74	マイクロキャリア 4	26.8	3.1	良好	90	良好
実施例 18	0.74	マイクロキャリア 12	13.8	3.8	良好	78	良好
実施例 19	4.76	マイクロキャリア 13	21.2	4.6	良好	82	良好
参考例 9	0.00	Cellbind	9.2	12.9	良好	42	不良
参考例 10	0.00	Cytodex1	3.2	16.0	良好	17	不良
実施例 20	0.74	マイクロキャリア 4	137.0	37.0	良好	79	良好
実施例 21	0.74	マイクロキャリア 12	112.0	32.0	良好	78	良好
参考例 11	0.00	Cellbind	2.3	69.8	良好	3	不良
参考例 12	0.00	Cytodex1	16.7	157.4	良好	10	不良

[0120]

[表3]

	負電荷を有する ポリマーの割合	マイクロキャリアコード	冷却で回収した細胞数	剥離しなかった細胞数	細胞培養性能	冷却剥離率	
						%	-
実施例 22	wt% 0.74	-	10 ⁵ 個	10 ⁵ 個	-	71	良好
実施例 23	0.74	マイクロキャリア 4	9.8	4.1	良好	95	良好
参考例 13	0.00	マイクロキャリア 12	18.8	1.0	良好	28	不良
参考例 14	0.00	Cellbind Cytodex1	3.4	8.8	良好	31	不良

請求の範囲

- [請求項1] 下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーを含むポリマーコート膜を被覆したビーズからなるマイクロキャリア。
- [請求項2] 負電荷を有するポリマーの割合が $0.1\sim 20\text{wt}\%$ であることを特徴とする請求項1記載のマイクロキャリア。
- [請求項3] 負電荷を有するポリマー中にカルボキシ基が含まれることを特徴とする請求項2記載のマイクロキャリア。
- [請求項4] 負電荷を有するポリマー中のカルボキシ基の割合が $10\sim 50\text{wt}\%$ であることを特徴とする請求項3記載のマイクロキャリア。
- [請求項5] ビーズ表面がカチオン性であることを特徴とする請求項4記載のマイクロキャリア。
- [請求項6] ビーズに正電荷を有する官能基が修飾していることを特徴とする請求項4記載のマイクロキャリア。
- [請求項7] ビーズがトリメチルアンモニウムクロライド修飾ポリスチレンであることを特徴とする請求項6記載のマイクロキャリア。
- [請求項8] ビーズの粒径が $20\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項7記載のマイクロキャリア。
- [請求項9] 温度応答性ポリマーが下記（A）、（B）、（C）のブロックを含むブロック共重合体であることを特徴とする請求項8記載のマイクロキャリア。
- （A）HLB値（グリフィン法）が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。
- （B）HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。
- （C）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が $0^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲にある温度応答性重合体ブロック。
- [請求項10] 請求項1～9記載のマイクロキャリアの製造方法。

- [請求項11] ビーズを、下限臨界溶解温度を0℃～50℃に有する温度応答性ポリマーと負電荷を有するポリマーとを含むポリマーコート膜で被覆する工程を備えることを特徴とする請求項1～9記載のマイクロキャリアの製造方法。
- [請求項12] 請求項1～9記載のマイクロキャリアを用いた細胞培養方法。
- [請求項13] 請求項1～9記載のマイクロキャリアを含有する培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする細胞培養方法。
- [請求項14] キレート剤を含む冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を含むことを特徴とする請求項12記載の細胞培養方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C08F 293/00</i> (2006.01)i; <i>C08J 3/12</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 11/08</i> (2020.01)i FI: C12M3/00 A; C12N11/08; C08F293/00; C08J3/12 CEZ; C12N5/00; C12N5/071; C08J3/12 Z CER 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) C12M3/00; C08F293/00; C08J3/12; C12N5/00; C12N5/071; C12N11/08 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2022/202911 A1 (TOSOH CORPORATION) 29 September 2022 (2022-09-29) claims 1, 3, 12, examples 1, paragraphs [0029], [0033]	1-14
Y	JP 2010-508851 A (ETHICON, INC.) 25 March 2010 (2010-03-25) paragraphs [0052], [0053]	1-14
Y	JP 2016-501026 A (DEPUY SYNTHES PRODUCTS, INC.) 18 January 2016 (2016-01-18) paragraphs [0134], [0135]	1-14
Y	JP 2011-514169 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 06 May 2011 (2011-05-06) paragraphs [0178], [0179]	1-14
Y	JP 2016-036274 A (IHI CORP.) 22 March 2016 (2016-03-22) paragraph [0007]	14
A		1-13
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 08 August 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/020256

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/054755 A1 (NISSAN CHEMICAL CORP.) 19 March 2020 (2020-03-19)	14
A	paragraph [0046]	1-13
Y	WO 2015/111686 A1 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 30 July 2015 (2015-07-30)	14
A	paragraph [0086]	1-13
A	WO 2015/093393 A1 (DIC CORPORATION) 25 June 2015 (2015-06-25)	1-14
A	JP 2019-094421 A (TOSOH CORPORATION) 20 June 2019 (2019-06-20)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/020256

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/202911	A1	29 September 2022	EP 4299716 A1 claims 1, 3, 12, examples 1, paragraphs [0030], [0034] CN 117043317 A	
JP	2010-508851	A	25 March 2010	US 2008/0166328 A1 paragraphs [0056], [0057] WO 2008/060541 A2 EP 2089511 A2 CN 101611139 A	
JP	2016-501026	A	18 January 2016	WO 2014/093598 A1 paragraphs [0127], [0128] EP 2931875 A1 KR 10-2015-0094760 A CN 105026551 A	
JP	2011-514169	A	06 May 2011	US 2010/0093053 A1 paragraphs [0484], [0485] WO 2009/116951 A2 EP 2479260 A1	
JP	2016-036274	A	22 March 2016	(Family: none)	
WO	2020/054755	A1	19 March 2020	US 2022/0041971 A1 paragraph [0084] EP 3848451 A1 CN 112996901 A	
WO	2015/111686	A1	30 July 2015	US 2017/0009201 A1 paragraph [0166] EP 3098300 A1 CN 105934511 A KR 10-2016-0117496 A	
WO	2015/093393	A1	25 June 2015	US 2017/0029763 A1	
JP	2019-094421	A	20 June 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12M 3/00(2006.01)i; C08F 293/00(2006.01)i; C08J 3/12(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i;
C12N 5/071(2010.01)i; C12N 11/08(2020.01)i
FI: C12M3/00 A; C12N11/08; C08F293/00; C08J3/12 CEZ; C12N5/00; C12N5/071; C08J3/12 Z CER

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））

C12M3/00; C08F293/00; C08J3/12; C12N5/00; C12N5/071; C12N11/08

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 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2022/202911 A1（東ソー株式会社）29.09.2022（2022-09-29） 請求項1、3、12、実施例1、[0029][0033]	1-14
Y	JP 2010-508851 A（エシコン・インコーポレイテッド）25.03.2010（2010-03-25） [0052][0053]	1-14
Y	JP 2016-501026 A（デビュイ・シンセス・プロダクツ・インコーポレイテッド） 18.01.2016（2016-01-18） [0134][0135]	1-14
Y	JP 2011-514169 A（エージェンシー フォー サイエンス，テクノロジー アンド リ サーチ）06.05.2011（2011-05-06） [0178][0179]	1-14
Y	JP 2016-036274 A（株式会社 I H I）22.03.2016（2016-03-22） [0007]	14
A		1-13

☒ 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、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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抵
触するものではなく、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 08.08.2024

国際調査報告の発送日 20.08.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

三須 大樹 4N 7883

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2020/054755 A1 (日産化学株式会社) 19.03.2020 (2020 - 03 - 19)	14
A	[0 0 4 6]	1-13
Y	WO 2015/111686 A1 (日産化学工業株式会社) 30.07.2015 (2015 - 07 - 30)	14
A	[0 0 8 6]	1-13
A	WO 2015/093393 A1 (D I C株式会社) 25.06.2015 (2015 - 06 - 25)	1-14
A	JP 2019-094421 A (東ソー株式会社) 20.06.2019 (2019 - 06 - 20)	1-14

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/020256

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/202911	A1	29.09.2022	EP	4299716	A1	
				請求項 1、3、12、実施例 1、[0030][0034]			
				CN	117043317	A	
JP	2010-508851	A	25.03.2010	US	2008/0166328	A1	
				[0056][0057]			
				WO	2008/060541	A2	
				EP	2089511	A2	
				CN	101611139	A	
JP	2016-501026	A	18.01.2016	WO	2014/093598	A1	
				[0127][0128]			
				EP	2931875	A1	
				KR	10-2015-0094760	A	
				CN	105026551	A	
JP	2011-514169	A	06.05.2011	US	2010/0093053	A1	
				[0484][0485]			
				WO	2009/116951	A2	
				EP	2479260	A1	
JP	2016-036274	A	22.03.2016	(ファミリーなし)			
WO	2020/054755	A1	19.03.2020	US	2022/0041971	A1	
				[0084]			
				EP	3848451	A1	
				CN	112996901	A	
WO	2015/111686	A1	30.07.2015	US	2017/0009201	A1	
				[0166]			
				EP	3098300	A1	
				CN	105934511	A	
				KR	10-2016-0117496	A	
WO	2015/093393	A1	25.06.2015	US	2017/0029763	A1	
JP	2019-094421	A	20.06.2019	(ファミリーなし)			