

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年8月1日(01.08.2019)



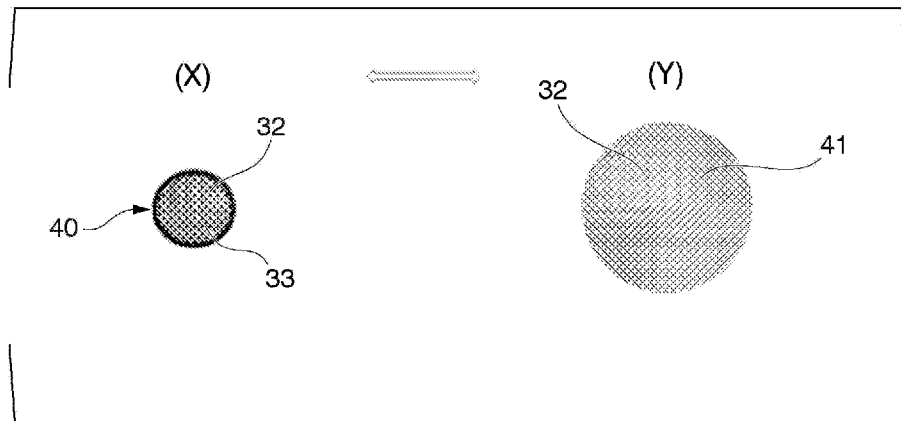
(10) 国際公開番号
WO 2019/146444 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/000880
- (22) 国際出願日: 2019年1月15日(15.01.2019)
- (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 2018-009460 2018年1月24日(24.01.2018) 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: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, 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,

(54) Title: CARRIER FOR CELL CULTURE AND CELL CULTURE VESSEL

(54) 発明の名称: 細胞培養用担体および細胞培養容器

[図1]



(57) Abstract: A carrier for cell culture characterized in that an active substance is carried on a stimulus-responsive substrate for cell culture having a stimulus-responsive polymer and an external signal-receiving material.

(57) 要約: 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料とを有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させたことを特徴とする、細胞培養用担体。

[続葉有]



WO 2019/146444 A1

LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：細胞培養用担体および細胞培養容器

技術分野

[0001] 本発明は細胞培養用担体および細胞培養容器に関する。

背景技術

[0002] 近年、再生医療技術やガン治療技術の進展に伴い、臨床用途の細胞を大量に調製することが求められる。細胞を培養するためには、定期的に培地（細胞培養液）の分解しやすい成分の追加や細胞の状態によって異なる要求成分への変更といったことが必要となる。培地交換は培養系の汚染（コンタミネーション）のリスクを伴う。このため、可能なかぎり人手を介さずに、自動で行えることが好ましい。

[0003] 例えば非特許文献1には、サイトカイン等の作用物質を担持させた担体を培養容器中の細胞周辺に置き、担体から培地内への拡散により作用物質を供給する方法が記載されている。

[0004] また特許文献1には、微小な流路デバイス内の所望の位置に、微量の細胞を配置し、抗がん剤等の薬剤感受性試験を効果的に実施する方法が記載されている。特許文献1に記載の方法では、マイクロ流体デバイスを用い、サイトカイン等の作用物質をポンプを用いてデバイス中の培地に供給している。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第5881031号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Lotz, S et al. Sustained Levels of FGF2 Maintain Undifferentiated Stem Cell Cultures with Biweekly Feeding. PLoS One. 8 (2) : e56289 (2013).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 非特許文献 1 に記載の方法は、担体を培地内に置くだけであり、簡便な操作で実施できる。しかしながら、作用物質は拡散で放出され続けるため、作用物質の供給制御が困難であるという課題がある。

特許文献 1 に記載の方法は、マイクロ流体デバイス外のポンプの駆動を制御することにより、作用物質の供給制御を詳細に実施できる。しかしながら、このような機構を備えるマイクロ流体デバイスは構造が複雑になり、生産コストが高くなるという課題がある。さらに、ポンプ等の機構が占める領域が多くなるため、培養スペースを広く確保できず、細胞を大量に培養できないという課題がある。

[0008] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであって、作用物質の詳細な供給制御が可能であり、細胞を大量に培養でき、低コストで製造できる、細胞培養用担体および細胞培養容器を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明は、下記 [1] ~ [14] の発明を包含する。

[1] 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料とを有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させたことを特徴とする、細胞培養用担体。

[2] 前記作用物質が多孔質基材に内包され、前記細胞培養用刺激応答性基材に前記多孔質基材と前記作用物質とを担持させたことを特徴とする、[1] に記載の細胞培養用担体。

[3] 前記刺激応答性ポリマーは温度応答性ポリマーであることを特徴とする、[1] 又は [2] に記載の細胞培養用担体。

[4] 前記外部信号受信材料は、有機化合物、金属構造体、又は炭素材料であることを特徴とする、[1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の細胞培養用担体。

[5] 前記金属構造体が金ナノロッドであることを特徴とする、[4] に記載の細胞培養用担体。

[6] 前記作用物質が、酵素、サイトカイン、分化誘導因子、抗体等のタンパク質、ホルモン等のペプチド、抗生物質、アミノ酸やグルコース、レチノイン酸等の低分子化合物、DNA等の核酸、ナノ粒子又はリポソームであることを特徴とする、[1]～[5]のいずれか1つに記載の細胞培養用担体。

[7] 前記外部信号受信材料が受信する外部信号は近赤外光であることを特徴とする、[1]～[6]のいずれか1つに記載の細胞培養用担体。

[8] 前記作用物質を含む前記多孔質基材の一部が前記細胞培養用刺激応答性基材で被覆され、それ以外の部分が作用物質不透過層で被覆されていることを特徴とする、[2]に記載の細胞培養用担体。

[9] 前記外部信号受信材料は、濃度分布が形成されるように前記細胞培養用刺激応答性基材に配合されることを特徴とする、[1]に記載の細胞培養用担体。

[10] 前記作用物質を注入するための注入口と、作用物質不透過性の材料で形成され、前記注入口を封止する封止部と、を備えたことを特徴とする、[1]に記載の細胞培養用担体。

[11] 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料とを有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させた細胞培養用担体と、細胞培養部と、を備えたことを特徴とする、細胞培養容器。

[12] 前記作用物質が多孔質基材に内包され、前記細胞培養用刺激応答性基材に前記多孔質基材と前記作用物質とを担持させたことを特徴とする、[11]に記載の細胞培養容器。

[13] 前記刺激応答性ポリマーは温度応答性ポリマーであることを特徴とする、[11]又は[12]に記載の細胞培養容器。

[14] 前記外部信号受信材料は、有機化合物、金属構造体、又は炭素材料であることを特徴とする、[11]～[13]のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

[15] 前記金属構造体が金ナノロッドであることを特徴とする、[14]

に記載の細胞培養容器。

[16] 前記作用物質が、酵素、サイトカイン、分化誘導因子、抗体等のタンパク質、ホルモン等のペプチド、抗生物質、アミノ酸やグルコース、レチノイン酸等の低分子化合物、DNA等の核酸、ナノ粒子又はリポソームであることを特徴とする、[11]～[15]のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

[17] 前記外部信号受信材料が受信する外部信号は近赤外光であることを特徴とする、[11]～[16]のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

[18] 前記作用物質を含む前記多孔質基材の一部が前記細胞培養用刺激応答性基材で被覆され、それ以外の部分が作用物質不透過層で被覆されていることを特徴とする、[12]に記載の細胞培養容器。

[19] 前記外部信号受信材料は、濃度分布が形成されるように前記細胞培養用刺激応答性基材に配合されることを特徴とする、[11]に記載の細胞培養容器。

[20] 前記作用物質を注入するための注入口と、作用物質不透過性の材料で形成され、前記注入口を封止する封止部と、を備えたことを特徴とする、[11]に記載の細胞培養容器。

本発明の更なる特徴及び態様は、添付図面を参照し、以下に述べる実施形態の詳細な説明から明らかとなるであろう。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、作用物質の詳細な供給制御が可能であり、細胞を大量に培養でき、低コストで製造できる、細胞培養用担体および細胞培養容器を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図2]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図3]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図4]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図5]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図6]本発明の細胞培養用担体の一例を示す模式図である。

[図7]本発明の細胞培養容器の一例を用いた細胞培養方法を説明する模式図である。

[図8]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図9]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図10]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図11]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図12]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図13]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図14]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

[図15]本発明の細胞培養容器の一例を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0012] <細胞培養用担体>

本実施形態は、刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料を有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させた細胞培養用担体である。以下、刺激応答性ポリマーの凝集状態と膨潤状において、作用物質の拡散を切り替えられる理由として想定される理論を説明する。ただし、本発明は、この理論に束縛されるものではない。

本実施形態の細胞培養用担体は、細胞培養用刺激応答性基材に作用物質が担持されている。細胞培養用担体は、外部信号を受信する前は細胞培養用刺激応答性基材中の刺激応答性ポリマーが凝集している。この凝集状態においては、ポリマーの密度が高いことや疎水性が高いことから、水に対する溶解性が低い。また、細胞培養用担体に担持されている作用物質が担体外に拡散しないため、作用物質が細胞培養用担体に担持されたままとなる。細胞培養用担体には、作用物質が貯蔵された状態となる。

[0013] 外部信号を受信すると、細胞培養用刺激応答性基材中の刺激応答性ポリマーの凝集がほどける。このため、水に対する溶解性が向上して膨潤し、細胞

培養用担体に担持されていた作用物質が、細胞培養用担体外に拡散する。さらに、外部信号の入力を停止すると、細胞培養用刺激応答性基材が再び凝集状態となり、作用物質の拡散が停止する。外部信号の入力の制御により、刺激応答性ポリマーの凝集を可逆的に制御できる。つまり、本実施形態の細胞培養用担体は、外部信号の入力を制御することにより、作用物質の拡散を詳細に制御することができる。

以下、本実施形態の細胞培養用担体について詳細に説明する。

[0014] <<第1実施形態>>

図1は、第1実施形態の細胞培養用担体40の断面を示す模式図である。図1に示す細胞培養用担体40は、細胞培養用刺激応答性基材33に、作用物質32を担持させた状態である。細胞培養用刺激応答性基材33に作用物質32を直接担持させることにより、構造が簡便となり、効率よく製造することができる。細胞培養用担体40に外部信号を入力すると、全体的に膨潤した膨潤状態41となる。

[0015] 図1中の符号(X)は、刺激応答性ポリマーが凝集し、作用物質の拡散が停止している状態である。また、図1中の符号(Y)は、刺激応答性ポリマーが膨潤し、作用物質が拡散可能な状態である。本実施形態においては、外部信号の入力を制御することにより、作用物質の拡散状態(Y)と、拡散停止(X)とを可逆的に制御できる。以降の図面についても(X)及び(Y)は同様の状態を意味するものとする。

一例をあげると、外部信号の入力前に符号(X)に示す凝集状態である場合、外部信号を受信し、細胞培養用刺激応答性基材33中の刺激応答性ポリマーが非凝集状態41(又は膨潤状態)となると、水に対する溶解性が向上する。これにより、担持されていた作用物質32が担体外に拡散する。

他の例を挙げると、外部信号の入力前に符号(Y)に示す非凝集状態である場合、外部信号を受信し、細胞培養用刺激応答性基材33中の刺激応答性ポリマーが凝集状態となると、水に対する溶解性が低下する。これにより、担持されていた作用物質32は担体内に保持されたままとなる。

[0016] ・刺激応答性ポリマー

外部刺激により、刺激応答性ポリマーの構造が変化し、作用物質の透過性が変化する。刺激応答性ポリマーは直鎖状のポリマーでも、分岐しているポリマーでもよい。刺激応答性ポリマー分子間を架橋して用いてもよい。刺激応答性ポリマーを用いたポリマーブラシ構造を形成して用いてもよい。作用物質の分子サイズが小さい場合は、架橋やポリマーブラシ構造等により刺激応答性ポリマーが高密度な方が、封止効率の面から好ましい。

刺激応答性ポリマーは、温度、光、pH、磁場、電場、超音波、酸化還元、分子濃度等の様々な刺激に対し、応答するものを適宜使用できる。本実施形態においては、局所的に加熱しても、熱平衡により培養温度へ収束させることができ、培養環境への影響が少ないことから細胞にも悪影響がないため、温度応答性ポリマーを用いることが好ましい。

[0017] 温度応答性ポリマーとしては、下限臨界溶液温度（LCST）型ポリマーおよび上限臨界溶液温度（UCST）型ポリマーを用いることができる。下限臨界溶液温度（LCST）型ポリマーとしては、ポリアミド系LCST型ポリマー、ポリエーテル系LCST型ポリマー、ホスホエステル系LCST型ポリマー、およびタンパク質を組み込んだポリマーなどを用いることができる。より具体的には、下限臨界溶液温度（LCST）型ポリマーとしては、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポロキサマー、ポリ（N-ビニルカプロラクタム）、ポリメチルビニルエーテル、メチルセルロース、エラスチン含有ポリマー等を用いることができる。また、上限臨界溶液温度（UCST）型ポリマーとしては、ポリ（アリルアミン-コ-アリルウレア）、ポリ（アクリルアミド-コ-アクリロニトリル）、ヒドロキシプロピルセルロース、ポロキサマー407等のポロキサマー、メタクリルアミドポリマー、およびスルホベタイン基を有するポリメタクリレート等を用いることができる。これらの高分子は、単独で、または複数組み合わせることもできる。また、LCST型高分子またはUCST型高分子は、イソプロピルアクリルアミド、カプロラクタム、アリルアミン、アリルウレア、スルホ

ベタイン、エチレングリコール、メタクリレート、スチレン、ノルボルネン、ホスファゼン、メチルビニルエーテル、アクリロニトリル、およびラクチドからなる群から選ばれる2以上のモノマーを用いて形成されたブロックコポリマーであってもよい。これらのブロックコポリマーの相転移温度は、用いられるモノマーの種類および量比によって調整することができる。また、LCST型高分子と、UCST型高分子とを組み合わせ、温度応答性ポリマーとして用いることもできる。これらの温度応答性材料の相転移温度は、導入する官能基の量等によって適宜調整することができる。例えば、導入する官能基としては、アルキル基、アミド基、ピペラジン基、ピロリジン基、アセタール基、ケタール基、オキサゾリン基、オキシエチレン基、スルホネート基、アルコール基、スルホベタイン基、ウラシル基、ウレイド基、およびグリシンアミド基などを用いることができる。刺激応答温度としては、20℃から60℃の範囲が好ましい。温度応答性ポリマーの刺激応答温度の少なくとも一つが培養温度以上であることが望ましい。特にヒト等の動物細胞の培養においては、培養温度が37℃であるため、刺激応答温度は38℃以上50℃以下が好ましい。LCST型とUCST型を使い分けることで、外部信号の入力前後の状態(X)と(Y)を可逆的に制御することができる。

[0018] ・外部信号

外部信号は、配線が不要であるという観点から光又は磁場が好ましい。光としては、細胞に影響が出にくい近赤外光が好ましい。なかでも、外部信号として使用される光の波長は、水分子が吸収しにくい波長であることが好ましい。例えば、外部信号として使用される光の波長は、650nm以上950nm以下；1000nm以上1350nm以下；1500nm以上1800nm以下の波長であってよい。

[0019] ・外部信号受信材料

外部信号受信材料は、外部信号と刺激応答性高分子の組み合わせによって適宜決定される。例えば、外部信号に近赤外光、刺激応答性高分子に温度応答性高分子を用いた場合、外部信号受信材料には、近赤外光を熱に効率よく

変換できる有機材料および無機材料が用いられる。このような材料としては、有機化合物、金属構造体、又は炭素構造体が用いられてよい。金属構造体及び炭素構造体は、微細であることが好ましい。金属構造体及び炭素構造体を微細にすることで、これらの構造体を沈降せず均一に作り易くすることができるとともに、表面積を大きくすることができるため近赤外光の吸収効率を向上することができる。

このような材料を外部信号受信材料として用いることにより、信号を受信し、外部信号受信材料周辺が局所的に加熱されることで温度応答性ポリマーの構造が変化し、作用物質の拡散と拡散停止を可逆的に制御できる。

[0020] ・ ・ 有機化合物

本実施形態において、有機化合物としては有機色素が好ましい。有機色素としては、シアニン色素、フタロシアニン色素、ナフトロシアニン化合物、ニッケルジチオレン錯体、スクアリウム色素、キノン系化合物、ジインモニウム化合物、アゾ化合物、ポルフィリン化合物、ジチオール金属錯体、ナフトキノン化合物、ジインモニウム化合物等が用いられてよい。また、有機化合物として、有機色素を含有させた樹脂製の粒子を用いてもよい。なお、有機化合物の形状は、粒子に限定しない場合もありうる。有機色素を樹脂に混練させることで、培養液中への有機色素の漏出を抑制することができるため、有機色素が細胞等の培養対象に影響を及ぼすことを避ける上で有効である。

[0021] ・ ・ 金属構造体

本実施形態において、金属構造体としては、アスペクト比で光の吸収波長を制御できることから金属ナノロッドが好ましく、金ナノロッドが特に好ましい。

[0022] ・ ・ 炭素材料

炭素材料としては、炭素構造体が好ましい。炭素構造体として、カーボンナノチューブ、フラーレン、カーボンナノワイヤー等を用いることができる。

[0023] 外部信号が磁場を用いる場合、外部信号受信物質は磁性ナノ粒子等の磁性体を使用することが好ましい。交流磁場の負荷により、磁性ナノ粒子が発熱する。

[0024] 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料との接合、刺激応答性ポリマーの分子間の架橋、細胞培養用刺激応答性基材と作用物質との固定には、各種の官能基と、該官能基に反応する架橋剤を用いて行うことができる。

[0025] 本実施形態において、架橋剤は、ホモ二機能性架橋剤であってもよく、ヘテロ二機能性架橋剤であってもよく、三以上の多機能性架橋剤でもよい。

[0026] 官能基が第一級アミンであれば、NHSエステル、カルボジイミド、アルデヒド、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、スルホニルクロリド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、カーボネート、アリアルハライド、イミドエステル、無水物、フルオロエステル等を含む架橋剤を用いることができる。

[0027] 官能基がカルボキシル基であれば、カルボジイミド等を用いることができる。

官能基がスルフヒドリル基であれば、マレイミド、ハロ酢酸、ピリジルジスルフィド、チオスルホン、ビニルスルホン等を含む架橋剤を用いることができる。

官能基がアルデヒド基であれば、ヒドラジド、アルコキシアミン等を含む架橋剤を用いることができる。

[0028] また、ジアジリン、アリアルアジド等の光反応性基を活用してもよい。アジド-アルキン間、アジド-ホスフィン間等の化学選択的ライゲーシオンを用いてもよい。ポリエチレングリコールやDNAなどの分子をスペーサーとして用いてもよい。

また、電子線照射等のエネルギー付与により各種部材を活性化し、接合や架橋に用いてもよい。

[0029] ・作用物質

本実施形態において、作用物質22としては、酵素、サイトカイン、分化

誘導因子、抗体等のタンパク質、ホルモン等のペプチド、抗生物質、アミノ酸やグルコース、レチノイン酸等の低分子化合物、DNA等の核酸、ナノ粒子、リポソームなど、特に制限はなく利用できる。また、作用物質22は、生体材料抽出物や細胞分泌物であってもよい。作用物質22は、化学物質に限られず、ウィルスであってもよい。多孔質基材に作用物質分泌用の細胞を包埋させ、培養対象の細胞と共培養させることで、細胞分泌物を供給してもよい。これにより、未知の作用物質も培養対象の細胞に供給することが可能となる。

[0030] <<第2実施形態>>

図2は、第2実施形態の細胞培養用担体30の断面を示す模式図である。図2に示す細胞培養用担体30は、細胞培養用刺激応答性基材33と、多孔質基材34と、作用物質32と、作用物質不透過層31とを備える。作用物質32は多孔質基材34に内包されている。本実施形態においては、作用物質32を含む多孔質基材34の一部が細胞培養用刺激応答性基材33で被覆され、それ以外の部分が作用物質不透過層31で被覆されている。作用物質不透過層31は疎水性ポリマー等の有機材料が好ましく、作用物質32が細胞培養用刺激応答性基材33で被覆した部分以外から放出されないことが好ましい。作用物質不透過層31は作用物質を不透過かつ非吸着であれば良く、疎水性ポリマー以外には金属薄膜等の無機材料を用いてもよく、多孔質基材を架橋剤で架橋してもよい。必要に応じて、親水化等のコーティングをしてもよい。

[0031] 細胞培養用刺激応答性基材33を配置する場所と、被覆面積をそれぞれ調整することにより、作用物質32の拡散量と拡散方向を所望の供給量に制御することができる。

図2(Y)に示すように、細胞培養用担体30に外部信号を入力すると、細胞培養用刺激応答性基材33を配置した場所のみが膨潤状態33aとなる。膨潤状態33aとなった部分からのみ作用物質32が拡散により放出されるため、作用物質32の拡散量と拡散方向を所望の供給量に制御することが

できる。

[0032] ・多孔質基材

本実施形態において、作用物質 3 2 は基材に内包されている。該基材としては多孔質基材が好ましい。多孔質基材としては、共有結合に基づく化学ゲルや非共有結合性の分子間力などに基づく物理ゲルでもよいし、両者がゲル構造の形成に寄与したゲルでもよい。具体的には、多孔質基材として、アガロース、デキストリン、ペクチン、アルギン酸ナトリウム、キサンタンガムなどの糖鎖から形成されるハイドロゲル、コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン、ゼラチンなどのタンパク質から形成されるハイドロゲル、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコールなどの合成高分子から形成されるハイドロゲル、シリコンハイドロゲル；メソポーラスカーボン、メソポーラスアルミノシリケート、メソポーラスシリカ等の無機材料を用いることができる。多孔質基材として、これらの複合材料を用いてもよい。

本実施形態において、作用物質 3 2 は多孔質基材 3 4 に内包されていることが好ましい。

[0033] ≪第 3 実施形態≫

図 3 は、第 3 実施形態の細胞培養用担体 2 0 の断面を示す模式図である。図 3 に示す細胞培養用担体 2 0 は、細胞培養用刺激応答性基材 2 1 と、多孔質基材 3 4 と、作用物質 2 2 とを備える。作用物質 2 2 は多孔質基材 3 4 に内包されている。本実施形態の細胞培養用担体 2 0 において、作用物質 2 2 が細胞培養用刺激応答性基材 2 1 に被覆され、貯蔵されている。

[0034] 図 3 中の符号 (X) は、刺激応答性ポリマーが凝集し、作用物質の拡散が停止している状態である。また、図 3 中の符号 (Y) は、刺激応答性ポリマーが膨潤し、作用物質が拡散可能な状態である。本実施形態においては、外部信号の入力を制御することにより、作用物質の拡散状態 (Y) と、拡散停止 (X) とを可逆的に制御できる。

一例をあげると、外部信号の入力前に符号 (X) に示す凝集状態である場合、外部信号を受信し、細胞培養用刺激応答性基材 2 1 中の刺激応答性ポリ

マーが非凝集状態 2 1 a となると、水に対する溶解性が向上する。これにより、担持されていた作用物質 2 2 が担体外に拡散する。

他の例を挙げると、外部信号の入力前に符号 (Y) に示す非凝集状態である場合、外部信号を受信し、細胞培養用応答性基材 2 1 中の刺激応答性ポリマーが凝集状態となると、水に対する溶解性が低下する。これにより、担持されていた作用物質 2 2 は担体内に保持されたままとなる。

[0035] << 第 4 実施形態 >>

図 4 は、第 4 実施形態の細胞培養用担体 5 0 の断面を示す模式図である。図 4 に示す細胞培養用担体 5 0 は、外部信号受信材料 5 2 を、濃度分布が形成されるように細胞培養用刺激応答性基材 5 1 に配合し、作用物質を含む多孔質基材 3 4 を被覆した形態である。符号 5 1 a は濃度分布の勾配を示す。濃度分布があることにより、同一の外部信号入力であっても、作用物質の拡散速度に差をつけることができる。このため、細胞培養容器内で、空間的に作用物質の濃度分布を制御できる。

[0036] << 第 5 実施形態 >>

図 5 は、第 5 実施形態の細胞培養用担体 9 2 の断面を示す模式図である。図 5 に示す細胞培養用担体 9 2 は、作用物質 9 1 が細胞培養用刺激応答性基材 9 0 で被覆されている。作用物質 9 1 は多孔質基材 3 4 に内包されている。作用物質 9 1 には、複数種類の作用物質 9 1 a、作用物質 9 1 b が混合した状態で貯蔵されている。

[0037] << 第 6 実施形態 >>

図 6 は、第 6 実施形態の細胞培養用担体 1 0 0 の断面を示す模式図である。図 6 に示す細胞培養用担体 1 0 0 は、作用物質を含む多孔質基材 1 0 1 が細胞培養用刺激応答性基材 1 0 3 で被覆されている。細胞培養用担体 1 0 0 は、表面に注入口 1 0 2 を備え、所望の作用物質 9 1 を注入することができる。注入口 1 0 2 は、作用物質を注入後に、疎水性ポリマー等の作用物質不透過性の材料で形成した封止部 1 0 5 で封止すると、作用物質 9 1 の漏れが少なくなる作用効果を得られる。

[0038] <細胞培養容器>

本実施形態の細胞培養容器は、前記本実施形態の細胞培養用担体と、細胞培養部と、を備える。

図7は、本実施形態の細胞培養容器1の一例の断面図を示す模式図である。細胞培養容器1は、細胞培養部11と、細胞培養用担体3及び4と、を備える。細胞培養部11は、細胞収容部2を備える。

細胞収容部2には、既存の培養皿、培養プレートのウェル、Lab-on-a-chip等の公知の材料を用いることができる。細胞収容部2の表面は、細胞の接着や脱離、タンパク質の非特異吸着防止等のためのコーティングがなされていてもよい。

[0039] 本実施形態の細胞培養容器1を説明しつつ、本実施形態の細胞培養容器1を用いた細胞培養方法について説明する。

[0040] 図7(a)に示す細胞培養容器1において、細胞培養用担体3は、作用物質として細胞誘因因子9を担持し、細胞培養用担体4は、作用物質として増殖因子10を担持する。

[0041] 次に、図7(b)に示すように、ピペット6を用いて懸濁液6aを細胞収容部2に導入する。その後、図7(c)に示すように、細胞培養部11を蓋7で覆い、細胞を培養する。その後、図7(d)に示すように、細胞収容部2に細胞が接着し、細胞集団8が形成される。

[0042] 細胞培養用担体3は、780nm付近の波長に吸収ピークを有する金ナノロッドを外部信号受信物質として含む。細胞培養用担体4は、900nm付近の波長に吸収ピークを有する金ナノロッドを外部信号受信物質として含む。

図7(e)に示すように、外部信号として780nmの近赤外光Aを照射すると、細胞培養用担体3から細胞誘因因子9が拡散する。また、近赤外光Aの照射を停止すると、細胞誘因因子9の拡散が停止する。

図7(f)に示すように、細胞誘因因子9の拡散により、細胞集団8は細胞培養用担体3の方向に移動する。

[0043] 図7(g)に示すように、外部信号として900nmの近赤外光Bを照射すると、細胞培養用担体4から増殖因子10が拡散する。また、近赤外光Bの照射を停止すると、増殖因子10の拡散が停止する。

増殖因子10の拡散により、細胞が増殖する。

[0044] ・細胞

培養対象の細胞として、間葉系幹細胞、ES細胞、iPS細胞等の幹細胞や前駆細胞、肝臓等の分化細胞、腫瘍由来等の株化された細胞等いずれでもよく、哺乳動物細胞以外の細胞でもよい。細菌や酵母、真菌でもよい。

[0045] ≪細胞培養容器のその他の実施形態≫

図8は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞培養容器60は、蓋7の容器内側に、細胞培養用刺激応答性基材61と、作用物質を含む多孔質基材62を備える。多孔質基材62は蓋7に接するように配置される。細胞培養用刺激応答性基材61は、細胞培養部11内の細胞懸濁液6aに接触するように配置される。

多孔質基材62に含まれる作用物質は、多孔質基材62内で濃度勾配をつけてもよい。細胞培養容器60の蓋7側から外部信号を入力することにより、作用物質を供給することができる。

[0046] 図9は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞培養容器71の細胞培養部11には、ビーズ状の細胞培養用担体70が複数設置されている。細胞培養用担体70には、それぞれ異なる作用物質を担持させることにより、様々な種類の作用物質を供給することができる。

[0047] 図10は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞培養部11に細胞培養用担体80を設置する際、細胞集団8の上部に細胞培養用担体80を載置してもよい。

[0048] 図11は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞集団は、細胞培養部11内に存在する立体的細胞集団8aであってもよい。細胞培養用担体110は、立体的細胞集団8aに接していなくてもよい。図12に示すように、複数の細胞培養用担体110が立体的細胞集団8aに接していてもよ

い。

[0049] 図13は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞培養容器133は、細胞培養部11と、細胞培養用担体132と、半透膜131と、培地130と、細胞懸濁液6aとを備える。培地130は、半透膜131の上を還流している。本実施形態によれば、栄養素や老廃物といった小分子が半透膜を介して交換可能となる。これにより、細胞培養部11内の環境を生存に適した状態に維持できる。また、培地130は、半透膜131の上を還流しているため、培地130の交換が不要となる。半透膜131を透過できない高分子材料は、細胞培養用担体132に担持させることにより供給できる。

[0050] 図14は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞収容部14は、底が凹型形状をしている。細胞収容部14の凹型形状を利用して立体的細胞集団8aを形成することができるとともに、細胞培養用担体140からの刺激が連続的に可能となる。

[0051] 図15は、細胞培養容器の一実施形態を示す図である。細胞培養部11内に存在する立体的細胞集団8aと細胞培養用担体150との間にスペーサー層152を設ける。これにより、細胞が外部信号の入力時の加熱による影響を受けにくくなる。

[0052] 本実施形態の細胞培養容器によれば、培養スペース以外の部分が少ないため、培養スペースを広く確保でき、細胞を大量に培養することができる。また、複雑な構造ではないため、低コストで製造できる。これに加えて、外部信号の入力を調整することにより、作用物質の添加量、添加のタイミング、種類等を詳細に制御できる。

[0053] 本実施形態の細胞培養容器は、長期間にわたって複雑なプロトコルの培養を行い、高効率な大量生産が求められる再生医療製品の細胞製造に適している。

例えば、iPS細胞から肝細胞への分化においては、30日以上 of 長期的な培養を、日によって3~5種類程度のサイトカインの種類を変えながら行う必要がある。また、肝不全への移植治療を想定した場合、必要な細胞数は

約 $10^9 \sim 10^{10}$ 個とも算定されており、高密度に効率的な細胞生産が望まれる。本実施形態の細胞培養容器は、配線や流路が必須の構成ではなく、様々な作用物質が要求される複雑なプロトコルに対しても、単純な機構により対応することができ、大量の培養が可能となる。

実施例

[0054] 次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

[0055] ≪実施例 1 ≫

実施例 1 に用いた各材料は以下の通りである。

[0056] ・多孔質基材

多孔質基材として、表面にカルボキシル基が存在し、4%アガロースゲル粒子 (CarboxyLink; Thermo Fisher Scientific) を用いた。

[0057] ・刺激応答性ポリマー

刺激応答性ポリマー、ポリ(アリルアミン-コアアリルウレア)ゲルを用いた。当該ゲルは、DDSキャリア作成プロトコル集(CMC出版)の182-184ページを参考に、分子量15,000のポリ(アリルアミン)(日東紡メディカル)に対し、93%のアリルアミンの一級アミンにウレイド基導入することで作製した。ウレイド基にもアミノ基が含まれているため、グルタルアルデヒドにより、一部のみの分子内・分子間のアミノ基同士を架橋することでゲル化できた。

[0058] 当該ゲルは、アミノ基が豊富に含まれている。このため、それらの水素結合の相手が温度によって、ポリ(アリルアミン-コアアリルウレア)分子中のアミノ基か、溶媒中の水分子かと切り替わり、凝集と膨潤の相転移を生じさせることができる。

当該ゲルの相転移温度は、NaCl濃度150mM、pH7.5の生理条件下において44℃である。相転移温度以上の温度にすることで膨潤が起こり、物質の透過性が増加し、水に対する溶解性が増加する。

[0059] ・外部信号受信材料

外部信号受信材料として、波長808 nmに吸収ピークを有し、表面にアミノ基が修飾された直径10 nmの金ナノロッド (Sigma-Aldrich) を用いた。

[0060] ・外部信号

外部信号源として、高出力ファイバ出力LD光源808 nm (アズワン) を用いた。

[0061] ・細胞収容部

細胞収容部として、TC処理96ウェルプレート (Corning) を用いた。

[0062] ・作用物質及び培養細胞

作用物質として、血管内皮細胞増殖因子であるVEGF-Aを用いた。

培養細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用いた。HUVECは血液凝固、血管形成などの生理学および薬理的試験に用いられる。培地として、VEGFが添加されていないEBM™ 内皮細胞基本培地 (LONZA) を用いた。

[0063] ・細胞培養用担体の製造

多孔質基材のアガロースゲル粒子表面のカルボキシル基を、EDCおよびsulfon-NHSで活性化させた。活性化の反応はpH6.0のMESバッファー中で室温において行った。これにより、アガロースゲル粒子上に、共有結合でアミノ基を含む物質を固定可能とした。

[0064] 得られたアガロースゲル粒子をMESバッファーで洗浄後、アミノ基修飾金ナノロッドをpH7.2のリン酸緩衝生理食塩水中で反応させた。

次いで、合成したポリ (アリルアミン-コ-アリルウレア) ゲルを反応させ、ゲル中の一部のアミノ基を介して、アガロースゲル粒子表面に金ナノロッドとポリ (アリルアミン-コ-アリルウレア) ゲルを固定化した。洗浄により未反応の金ナノロッドやゲルを除去した。これにより、細胞培養用刺激応答性基材と多孔質基材との複合体1を形成した。

[0065] 10 mMのNaClを加えた、pH7.5、10 mMのHEPESバッフ

ァーに、得られた複合体 1 を浸漬した。

本条件下では、相転移温度が低下し、刺激応答性ポリマーが室温で膨潤するようになり、作用物質を取り込ませることが可能となる。

粒子が残るように上清を除去し、作用物質として VEGF を溶解させた HEPES バッファーを加えた。VEGF は、拡散により膨潤状態の刺激応答性ポリマーを透過し、多孔質基材内に取り込ませた。これにより、細胞培養用担体を製造した。

[0066] 次に、培地へ細胞培養用担体を移し替えた。これにより NaCl 濃度が上昇して、相転移温度が 40℃ 以上になるため、多孔質基材内に VEGF を保持可能とした。VEGF 取り込み済みの粒子は使用まで 4℃ で保存した。

[0067] ・細胞培養

培養プレートに培地に懸濁された HUVEC を播種し、インキュベーター内において、5%CO₂、37℃ で培養することで細胞を接着させた。

新鮮な培地に交換後、細胞培養用担体を導入した。近赤外光照射により、刺激応答性ポリマーが局所加熱され、膨潤し、水に対する溶解性が増大した。

[0068] それに伴い、内包した VEGF が拡散により、培地中に放出されると、HUVEC が増殖を加速した。必要量まで VEGF 拡散量が到達した後、VEGF が細胞代謝に作用することで実験結果に影響を与えるのを防ぐため、近赤外光の照射を停止すると、VEGF の放出を停止できた。

符号の説明

[0069] 20, 30, 40, 50, 70, 80, 92, 100, 110, 132, 1

40…細胞培養用担体

21, 33, 51, 61, 90, 103…細胞培養用刺激応答性基材

22, 32, 52, 62, 91, 101…作用物質

31…作用物質不透過層

34, 62、101…多孔質基材

62…作用物質を含む多孔質基材

- 1 1 …細胞培養部
- 1, 6 0, 7 1, 1 3 3 …細胞培養容器
- 2, 1 4 …細胞収容部
- 3, 5 …細胞培養用担体
- 6 …ピペット
- 6 a …懸濁液
- 7 …蓋
- 8 …細胞集団
- 8 a …立体的細胞集団
- 9 …細胞誘因因子
- 1 0 …増殖因子
- 1 3 1 …半透膜
- 1 3 0 …培地

請求の範囲

- [請求項1] 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料とを有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させたことを特徴とする、細胞培養用担体。
- [請求項2] 前記作用物質が多孔質基材に内包され、前記細胞培養用刺激応答性基材に前記多孔質基材と前記作用物質とを担持させたことを特徴とする、請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [請求項3] 前記刺激応答性ポリマーは温度応答性ポリマーであることを特徴とする、請求項1又は2に記載の細胞培養用担体。
- [請求項4] 前記外部信号受信材料は、有機化合物、金属構造体、又は炭素材料であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞培養用担体。
- [請求項5] 前記金属構造体が金ナノロッドであることを特徴とする、請求項4に記載の細胞培養用担体。
- [請求項6] 前記作用物質が、酵素、サイトカイン、分化誘導因子、抗体等のタンパク質、ホルモン等のペプチド、抗生物質、アミノ酸やグルコース、レチノイン酸等の低分子化合物、DNA等の核酸、ナノ粒子、又はリポソームであることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞培養用担体。
- [請求項7] 前記外部信号受信材料が受信する外部信号は近赤外光であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の細胞培養用担体。
- [請求項8] 前記作用物質を含む前記多孔質基材の一部が前記細胞培養用刺激応答性基材で被覆され、それ以外の部分が作用物質不透過層で被覆されていることを特徴とする、請求項2に記載の細胞培養用担体。
- [請求項9] 前記外部信号受信材料は、濃度分布が形成されるように前記細胞培養用刺激応答性基材に配合されることを特徴とする、請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [請求項10] 前記作用物質を注入するための注入口と、

作用物質不透過性の材料で形成され、前記注入口を封止する封止部と、を備えたことを特徴とする、請求項 1 に記載の細胞培養用担体。

[請求項11] 刺激応答性ポリマーと外部信号受信材料とを有する細胞培養用刺激応答性基材に、作用物質を担持させた細胞培養用担体と、細胞培養部と、を備えたことを特徴とする、細胞培養容器。

[請求項12] 前記作用物質が多孔質基材に内包され、前記細胞培養用刺激応答性基材に前記多孔質基材と前記作用物質とを担持させたことを特徴とする、請求項 1 1 に記載の細胞培養容器。

[請求項13] 前記刺激応答性ポリマーは温度応答性ポリマーであることを特徴とする、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の細胞培養容器。

[請求項14] 前記外部信号受信材料は、有機化合物、金属構造体、又は炭素材料であることを特徴とする、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の細胞培養容器。

[請求項15] 前記金属構造体が金ナノロッドであることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の細胞培養容器。

[請求項16] 前記作用物質が、酵素、サイトカイン、分化誘導因子、抗体等のタンパク質、ホルモン等のペプチド、抗生物質、アミノ酸やグルコース、レチノイン酸等の低分子化合物、DNA等の核酸、ナノ粒子、又はリポソームであることを特徴とする、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の細胞培養容器。

[請求項17] 前記外部信号受信材料が受信する外部信号は近赤外光であることを特徴とする、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養容器。

[請求項18] 前記作用物質を含む前記多孔質基材の一部が前記細胞培養用刺激応答性基材で被覆され、それ以外の部分が作用物質不透過層で被覆されていることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の細胞培養容器。

[請求項19] 前記外部信号受信材料は、濃度分布が形成されるように前記細胞培養用刺激応答性基材に配合されることを特徴とする、請求項 1 1 に記

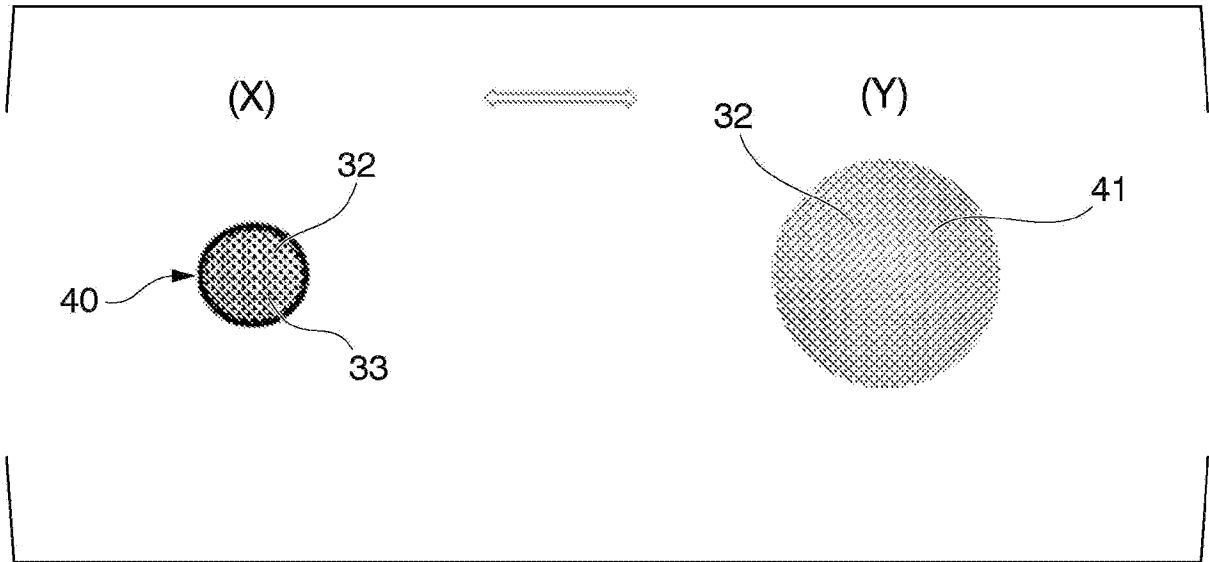
載の細胞培養容器。

[請求項20]

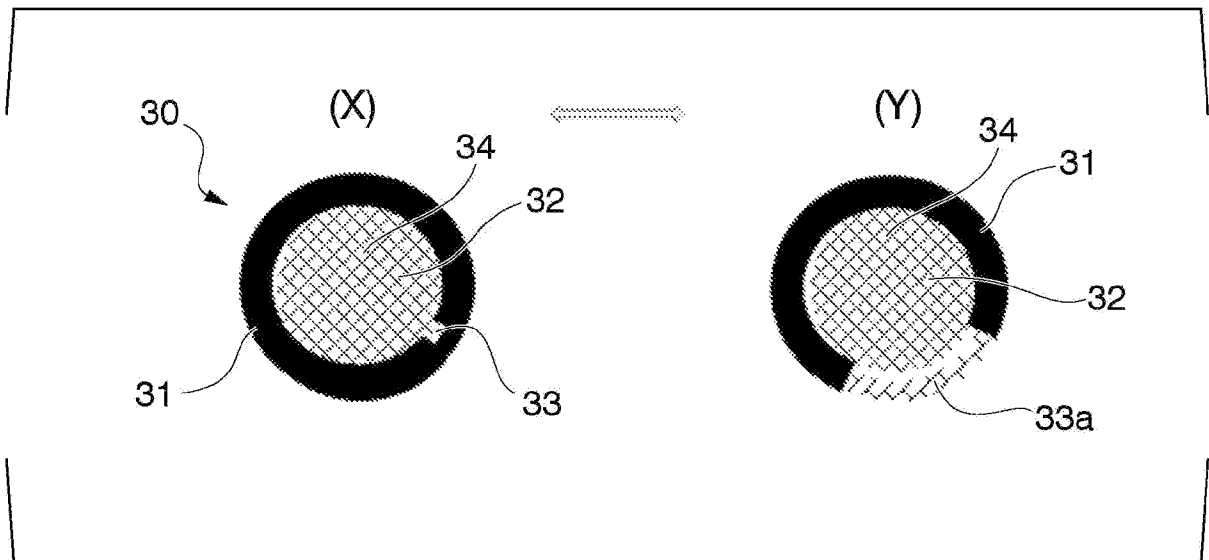
前記作用物質を注入するための注入口と、

作用物質不透過性の材料で形成され、前記注入口を封止する封止部と、を備えたことを特徴とする、請求項11に記載の細胞培養容器。

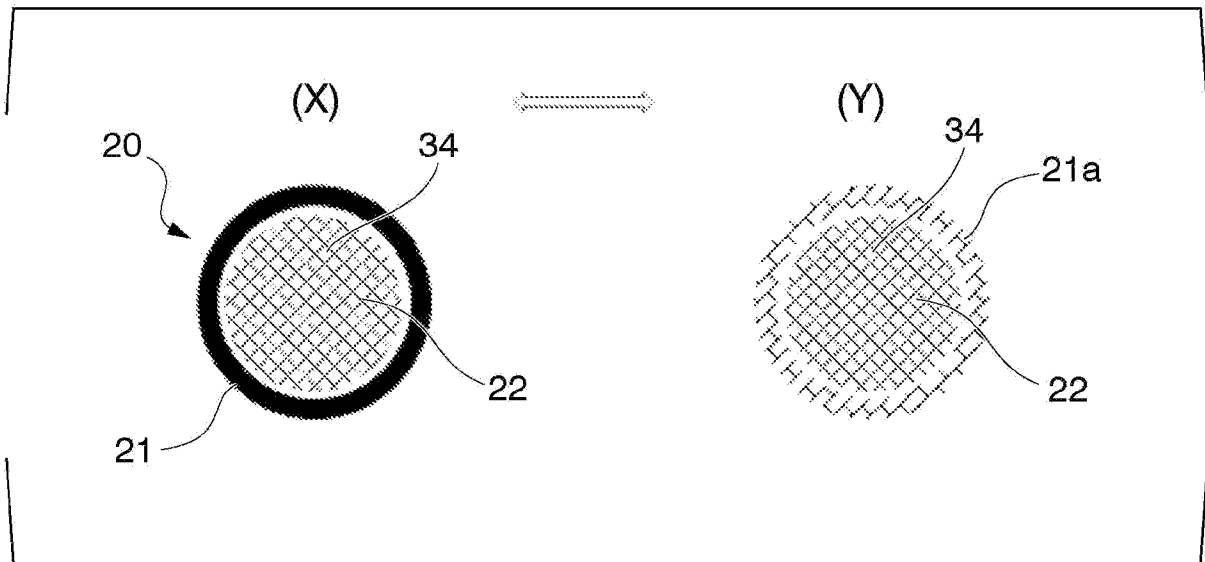
[図1]



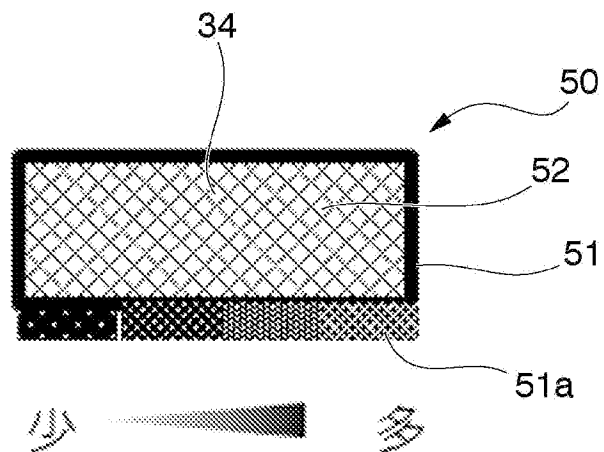
[図2]



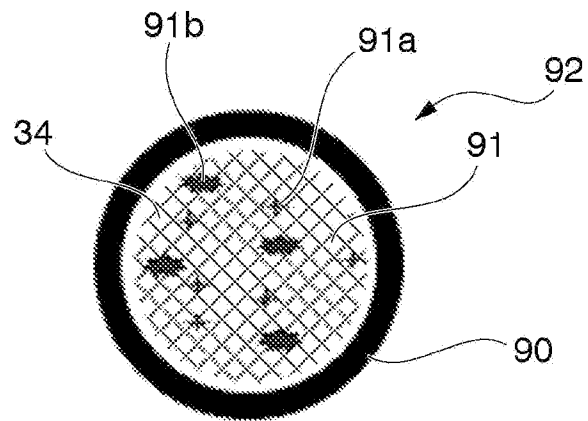
[図3]



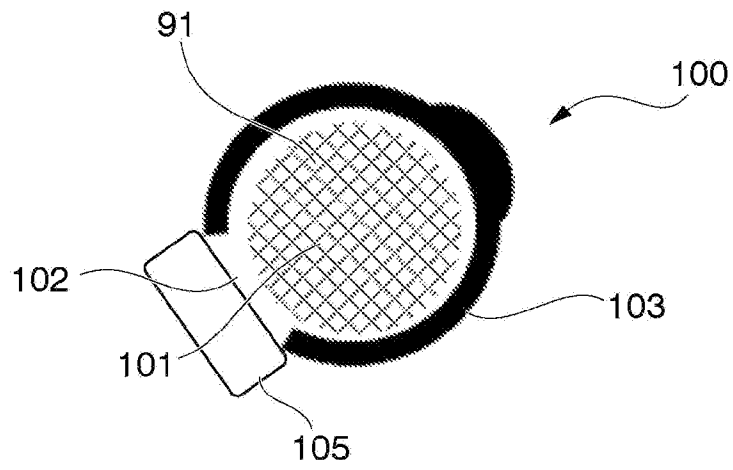
[図4]



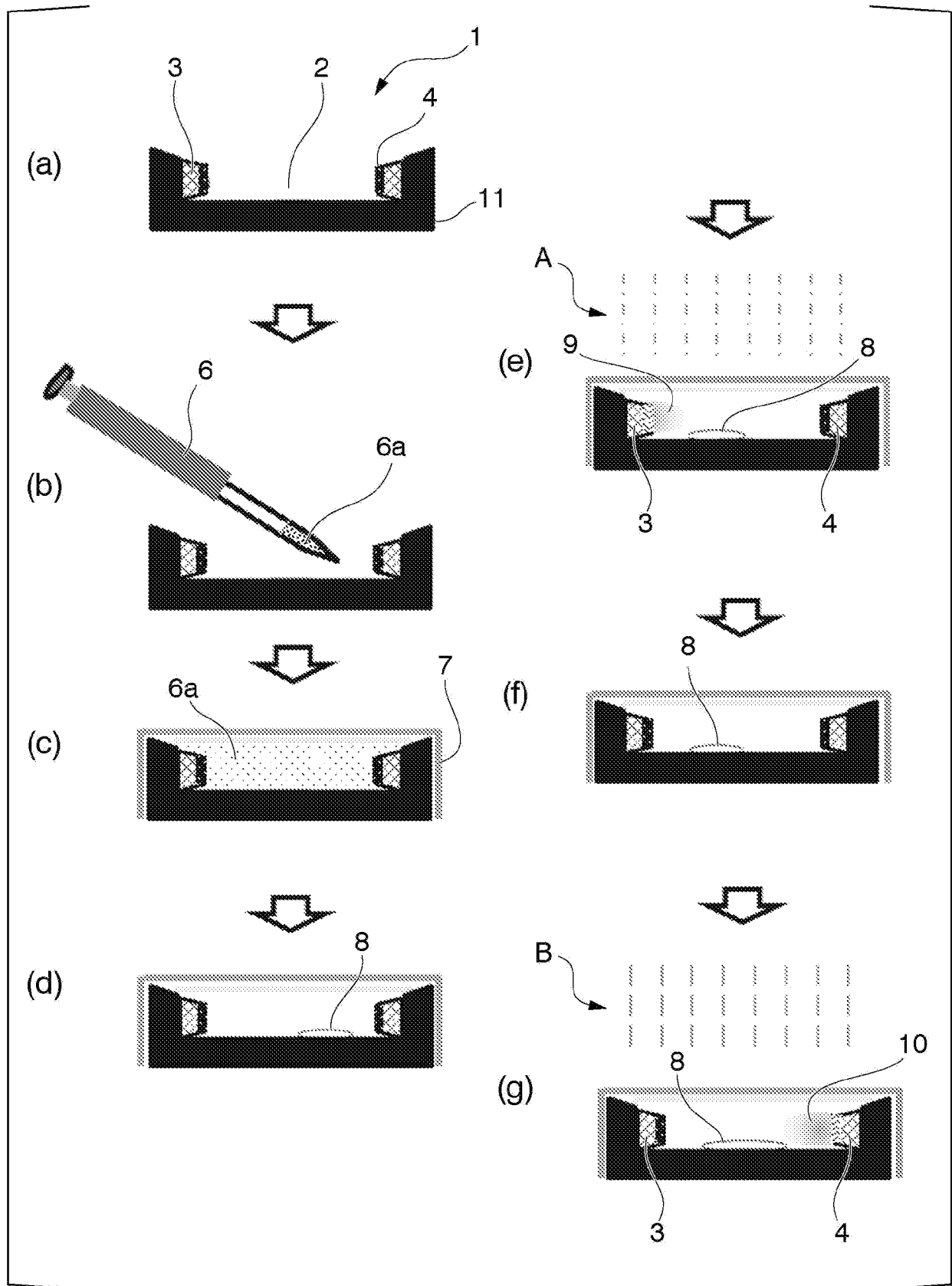
[図5]



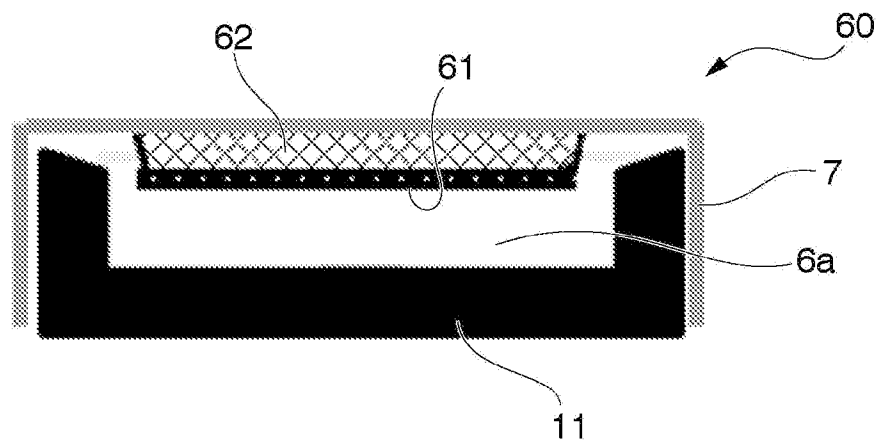
[図6]



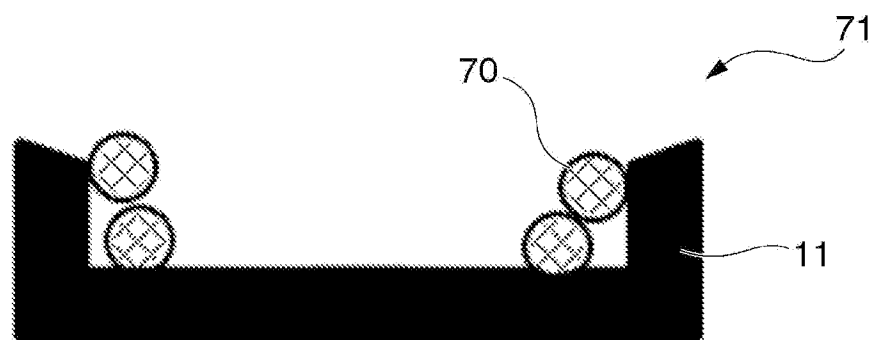
[図7]



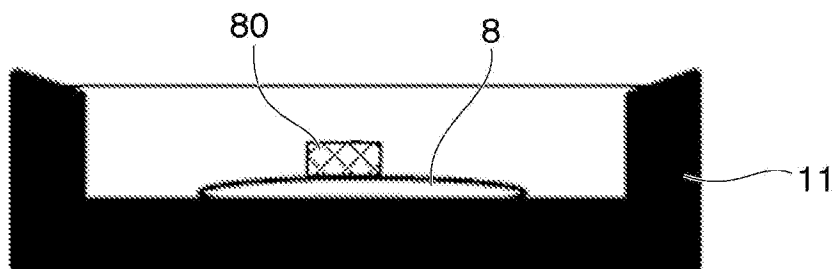
[図8]



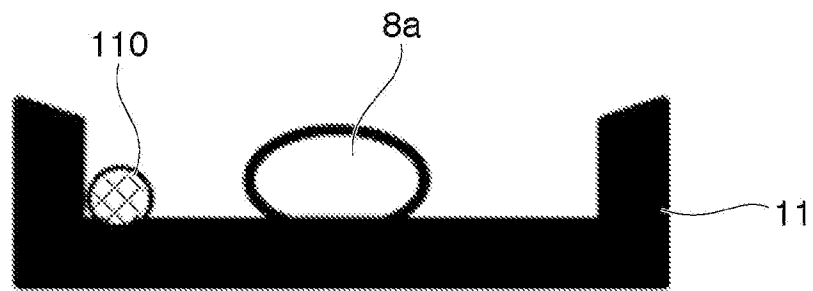
[図9]



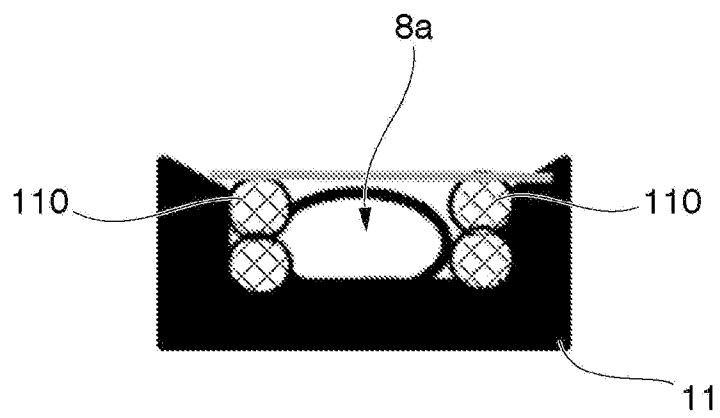
[図10]



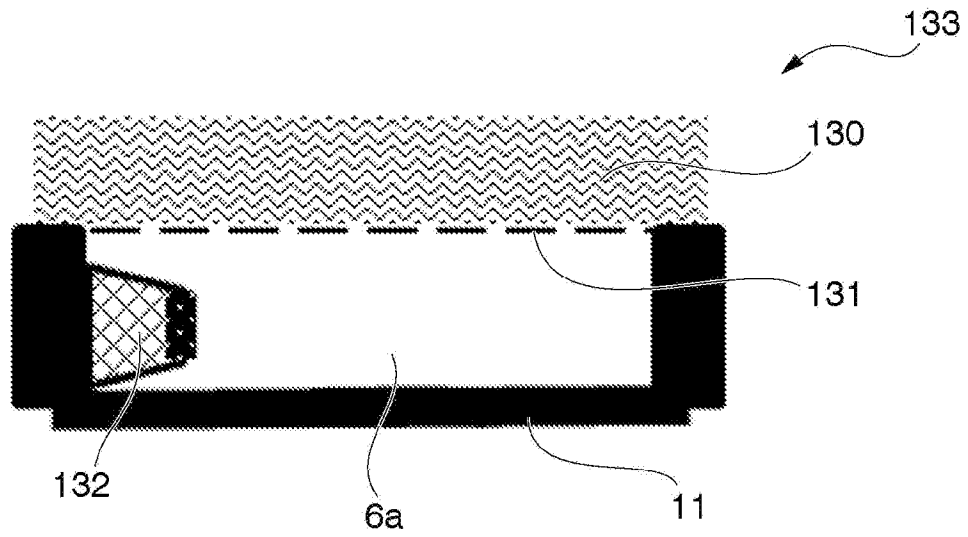
[図11]



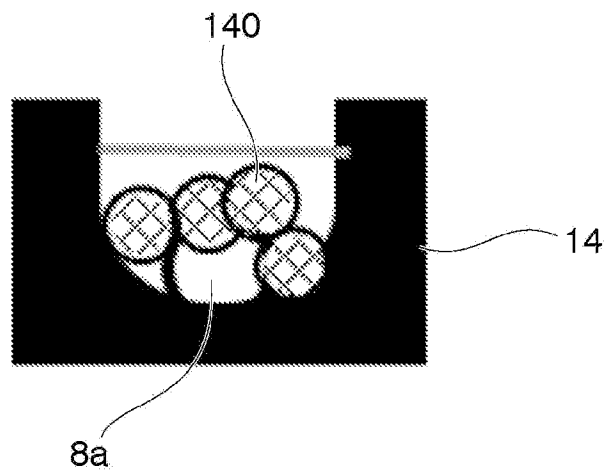
[図12]



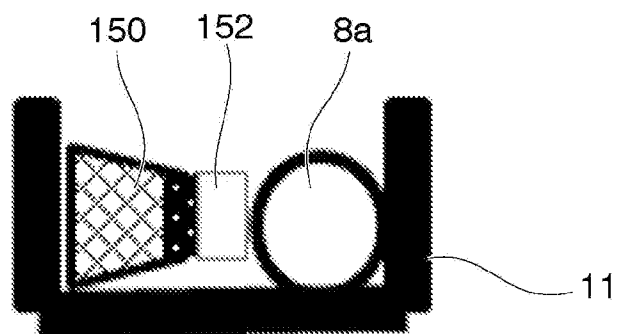
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/000880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12M1/00 (2006.01) i, C12M1/36 (2006.01) i, C12N1/00 (2006.01) i, C12N5/071 (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. C12M1/00, C12M1/36, C12N1/00, C12N5/071

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOTZ, S. et al., "Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding.", PLOS ONE, 20 February 2013, vol. 8, no. 2, e56289 (pp. 1-10), doi: 10.1371/journal.pone.0056289, in particular, abstract	1-20
Y	SANROMAN-IGLESIAS, M. et al., "Conjugated polymers as molecular gates for light-controlled release of gold nanoparticles.", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 15 July 2015, vol. 7, pp. 15692-15695, doi: 10.1021/acsami.5b05087, in particular, abstract	1-20

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" 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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02.04.2019	Date of mailing of the international search report 16.04.2019
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 REPORTInternational application No.
PCT/JP2019/000880

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/081152 A1 (ADMINISTRACION GENERAL DE LA COMUNIDAD AUTONOMA DE EUSKADI) 18 May 2017, claims 1-69 & JP 2018-535651 A & US 2018/0258473 A & EP 3310930 A1	1-20

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M1/36(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i</p>												
<p>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. C12M1/00, C12M1/36, C12N1/00, C12N5/071</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019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		
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											
<p>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)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>LOTZ, S., et al., "Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding.", PLOS ONE, 2013.02.20, Vol.8, No.2, e56289(pp.1-10), doi: 10.1371/journal.pone.0056289, 特に Abstract</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SANROMAN-IGLESIAS, M., et al., "Conjugated polymers as molecular gates for light-controlled release of gold nanoparticles.", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2015.07.15, Vol.7, pp.15692-15695, doi: 10.1021/acsami.5b05087, 特に Abstract</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			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	LOTZ, S., et al., "Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding.", PLOS ONE, 2013.02.20, Vol.8, No.2, e56289(pp.1-10), doi: 10.1371/journal.pone.0056289, 特に Abstract	1-20	Y	SANROMAN-IGLESIAS, M., et al., "Conjugated polymers as molecular gates for light-controlled release of gold nanoparticles.", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2015.07.15, Vol.7, pp.15692-15695, doi: 10.1021/acsami.5b05087, 特に Abstract	1-20	
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	LOTZ, S., et al., "Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding.", PLOS ONE, 2013.02.20, Vol.8, No.2, e56289(pp.1-10), doi: 10.1371/journal.pone.0056289, 特に Abstract	1-20										
Y	SANROMAN-IGLESIAS, M., et al., "Conjugated polymers as molecular gates for light-controlled release of gold nanoparticles.", ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2015.07.15, Vol.7, pp.15692-15695, doi: 10.1021/acsami.5b05087, 特に Abstract	1-20										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 02.04.2019</p>	<p>国際調査報告の発送日 16.04.2019</p>											
<p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 野村 英雄 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 4 1 5 5</p>										

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	WO 2017/081152 A1 (ADMINISTRACION GENERAL DE LA COMUNIDAD AUTONOMA DE EUSKADI) 2017.05.18, 請求項 1-69 & JP 2018-535651 A & US 2018/0258473 A & EP 3310930 A1	1 - 20