

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年9月3日(03.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/174932 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/42 (2006.01) C12N 11/08 (2020.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 11/089 (2020.01)
C12N 11/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/001755

(22) 国際出願日: 2020年1月20日(20.01.2020)

(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 2019-035675 2019年2月28日(28.02.2019) JP

(71) 出願人: 浜松ホトニクス株式会社 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP];
〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 Shizuoka (JP).

(72) 発明者: 木村 祐史 (KIMURA Yuji); 〒4358558
静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1
浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 風見 紗弥香 (KAZAMI Sayaka); 〒4358558 静岡

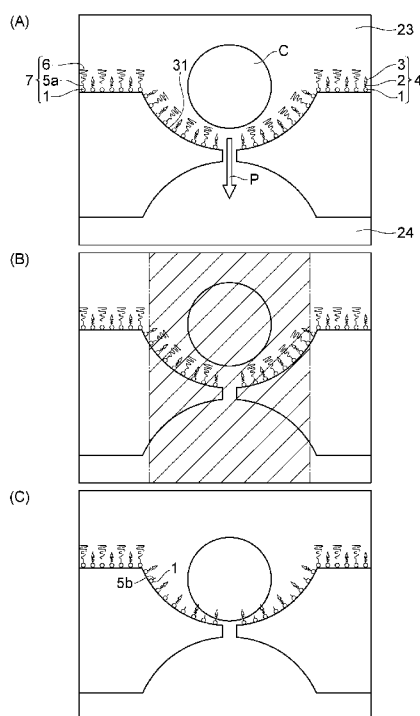
県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 伊藤 博康 (ITOHI Hiroyasu); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP).

(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, 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,

(54) Title: CELL ADHESION COMPOSITION AND CELL ADHESION SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 細胞接着用組成物及び細胞接着用基材



(57) Abstract: A cell adhesion composition according to an embodiment of the present invention comprises an amphipathic compound and a conjugate of DNA and a hydrophilic molecule, wherein the amphipathic compound has a hydrophilic group and a hydrophobic group that is able to non-covalently bond with a cell membrane, and the weight average molecular weight of the hydrophilic molecule in the conjugate is greater than the weight average molecular weight of the hydrophilic molecule from which the hydrophilic group of the amphipathic compound is derived. This cell adhesion composition makes it possible to use light having an arbitrarily defined wavelength to impart a cell adhesion capacity to a substrate at an arbitrarily defined time.

(57) 要約: 本発明の一形態に係る細胞接着用組成物は、両親媒性化合物と、DNA及び親水性分子のコンジュゲートと、を含み、両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有し、コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい。かかる細胞接着用組成物によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで基材に細胞接着能を付与することができる。

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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：細胞接着用組成物及び細胞接着用基材

技術分野

[0001] 本発明は、細胞接着用組成物及び細胞接着用基材に関する。

背景技術

[0002] 光により基材の細胞接着性をコントロールする手法としては、特許文献 1 ～ 3 に記載されるような種々の技術が知られている。これらの技術によれば、基材に光を照射することで基材に細胞接着能を付与することができる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開 2 0 1 5 － 7 3 4 6 0

特許文献2：特開 2 0 0 9 － 6 5 9 4 5

特許文献3：特開 2 0 0 6 － 8 9 7 5

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 特許文献 1 ～ 3 に記載される技術では、基材に細胞接着能を付与するために用いられる光が、紫外線（UV）等、特定の波長を有する光に限定されていた。UVは細胞にダメージを与えるため好ましくない。また、基材に接着された細胞はしばしば蛍光色素を用いて観察されるため、細胞接着能を基材に付与するために用いる光が特定の波長に限定されていると、細胞の観察に用いることのできる蛍光色素の選択肢が狭まる。

[0005] そこで、本発明は、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで基材に細胞接着能を付与することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の一形態に係る細胞接着用組成物は、両親媒性化合物と、DNA及び親水性分子のコンジュゲートと、を含む。両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有する。コンジュゲートの親水

性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい。

[0007] 親水性基は、ポリアルキレングリコール、ポリグリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される親水性分子の残基であってよい。疎水性基は、炭素数 7～22 の脂肪族炭化水素基、又は、炭素数 7～22 の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質の残基であってよい。好ましくは、親水性基はポリエチレングリコールの残基である。好ましくは、疎水性基は、炭素数 10～20 の脂肪族炭化水素基又は炭素数 10～20 の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質の残基である。コンジュゲートの親水性分子は、ポリアルキレングリコール、ポリグリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される親水性分子であってよい。細胞接着用組成物は、1 分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを 1 以上含んでよい。コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量の 1 倍超であってよい。

[0008] 本発明の一形態に係る細胞接着用基材は、基材と、1 以上の両親媒性化合物と、1 以上の、DNA 及び親水性分子のコンジュゲートと、を備える。各両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有する。各両親媒性化合物の親水性基と各コンジュゲートの DNA は、基材と結合している。コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい。

[0009] 細胞接着用基材は、1 分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを 1 以上備えてよい。

[0010] 本発明の他の形態に係る細胞接着用基材は、基材と、1 以上の、両親媒性化合物及び DNA のコンジュゲートと、を備える。各両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、上記 DNA と結合した親水性基と、を有する。DNA は基材と結合している。

- [0011] 細胞接着用基材は、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質をさらに備えてよい。
- [0012] 本発明の一形態に係るマイクロ流路デバイスは、内部の少なくとも一部が上記細胞接着用組成物でコーティングされた流路を備える。
- [0013] マイクロ流路デバイスは、第一の流路と、上記第一の流路に隣接する第二の流路と、上記第一の流路と上記第二の流路とをつなぐ連絡部であって、上記第一の流路側に細胞を捕捉可能な開口部を有する連絡部と、を備えてよく、上記第一の流路の内部が上記細胞接着用組成物でコーティングされていてよい。
- [0014] 本発明の一形態に係る細胞を基材上に接着する方法は、基材を上記細胞接着用組成物でコーティングする工程と、基材に、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質を接触させる工程と、基材に光を照射して光反応性物質を励起させる工程と、基材に細胞を接触させる工程と、を備える。

発明の効果

- [0015] 本発明によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで基材に細胞接着能を付与することができ、また、基材に細胞接着能を付与するために必要な光の照射時間が短い。より具体的には、本発明によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで、任意の細胞を接着することができる基材及び該基材を備えるマイクロ流路デバイス、並びにこれらを製造するために使用することのできる組成物が提供される。また、本発明によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで基材に任意の細胞を接着することが可能な方法が提供される。さらに、本発明によれば、任意の形状の細胞パターンを簡便に得ることができる。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]マイクロ流路デバイスの一例を示す模式図である。
- [図2]細胞を基材上に接着する方法の概略を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明の一実施形態に係る細胞接着用組成物は、両親媒性化合物と、DNA及び親水性分子のコンジュゲートと、を含む。両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有する。基材に細胞接着用組成物を接触させると、両親媒性化合物の親水性基及びコンジュゲートのDNAが基材と結合し、基材を両親媒性化合物とDNA及び親水性分子のコンジュゲートとでコーティングすることができる。基材との結合性を上げる観点から、両親媒性化合物の親水性基とコンジュゲートのDNAには、結合性物質が結合されていてもよい。両親媒性化合物が細胞接着能を有するのに対し、DNAと親水性分子とのコンジュゲートは、両親媒性化合物の細胞接着能をマスキングする作用を有する。したがって、細胞接着用組成物でコーティングされた基材は、潜在的な細胞接着能を有する。後述するように、基材に光を照射してコンジュゲートを分解することで、両親媒性化合物による細胞接着能が発現し、基材は細胞を接着することが可能となる。

[0018] 親水性基は、ポリアルキレングリコール、ポリグリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される1種以上の親水性分子の残基であってよい。より具体的には、親水性基は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ペンタエリスリトール、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン、及びオクタグリセリンからなる群より選択される1種以上の親水性分子の残基であってよい。好ましくは、親水性基はポリエチレングリコールの残基である。本明細書において、親水性分子の残基とは、親水性分子から、他の分子と共有結合を形成する際に除去される1以上の原子（例えば、水素）又は基を除いて得られる基を意味する。

[0019] 基材又は結合性物質との結合性を上げる観点から、親水性基は、反応性官能基を有していてもよい。反応性官能基は、公知の反応性官能基であれば特に限定されず、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基又はマレイミド基であってよい。

[0020] 親水性基は、200以上、400以上、600以上、1000以上、2000以上、3000以上、5000以上、又は8000以上の重量平均分子量を有する親水性分子の残基であってよい。親水性基は、20000以下、10000以下、8000以下、5000以下、3000以下、2000以下、1000以下又は600以下の重量平均分子量を有する親水性分子の残基であってよい。重量平均分子量は、例えば、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）を用いて求めることができる。

[0021] 疎水性基は、細胞膜に非共有結合することが可能であれば特に限定されず、例えば、炭素数7～22の脂肪族炭化水素基、又は、炭素数7～22の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質の残基であってよい。脂肪族炭化水素基は、飽和又は不飽和であってよく、直鎖又は分岐鎖であってよい。脂肪族炭化水素基の炭素数は、10～20又は11～18であってもよい。脂肪族炭化水素基は、例えば、オクチル基（C8）、デシル基（C10）、ドデシル基（C12）、テトラデシル基（C14）、ヘキサデシル基（C16）、オクタデシル基（C18）、イソステアリル基（C18）、エイコシル基（C20）、ドコシル基（C22）等の飽和脂肪族炭化水素基であってよく、ミリストレイル基（C14）、パルミトレイル基（C16）、オレイル基（C18）、リノレイル基（C18）、アラキドニル基（C20）、エルカイル基（C22）等の不飽和脂肪族炭化水素基であってもよい。リン脂質中の脂肪族炭化水素基の数は、1以上又は2以上であってよく、好ましくは1又は2である。リン脂質としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジルセリンが挙げられる。リン脂質は例えば、1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPЕ）であってよい。非共有結合は、疎水性相互作用であってよい。本明細書において、リン脂質の残基とは、リン脂質から、他の分子と共有結合を形成する際に除去される1以上の原子（例えば、水素）又は基を除いて得られる基を意味する。

[0022] 両親媒性化合物は、具体的には例えば、ポリアルキレングリコール、ポリ

グリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される親水性分子と、炭素数 7 ～ 22 の脂肪族炭化水素及び炭素数 7 ～ 22 の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質からなる群より選択される疎水性分子とが互いに共有結合した化合物であってよい。親水性分子及び疎水性分子の詳細は上述したとおりである。親水性分子は、上述の反応性官能基を有してよい。両親媒性化合物の具体例としては、ポリエチレングリコールと炭素数 7 ～ 22 の脂肪族炭化水素とが共有結合した化合物（PEG 脂質）、及び、ポリエチレングリコールと炭素数 7 ～ 22 の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質とが共有結合した化合物（PEG リン脂質）が挙げられる。PEG 脂質は、例えばオレイルーOーポリエチレングリコールスクシニルーNーヒドロキシースクシンイミジルエステルであってよい。PEGーリン脂質は、例えばNー〔N'ー（3'ーマレイミドー1'ーオキソプロピル）アミノプロピルポリオキシエチレンオキソカルボニル〕ー1, 2ージステアロイルーsnーグリセロール3ーホスホエタノールアミンであってよい。

[0023] DNAは、活性酸素によって分解され得るDNAであれば特に限定されず、いかなる長さ及び配列のDNAも用いることができる。例えば、17量体～30量体、18量体～25量体、又は20～22量体のDNAであれば入手しやすい。DNAは一本鎖であっても二本鎖であってもよい。DNAは、親水性分子及び基材若しくは結合性分子との結合性を上げる観点から、反応性官能基を有していてもよい。反応性官能基は、特に限定されず、例えば、カルボキシ基、チオール基、アミノ基等公知の反応性官能基から、親水性分子及び基材若しくは結合性分子の種類に応じて適宜選択できる。例えば、結合性分子がウシ血清アルブミン（BSA）であり、親水性分子がマレイミド基を有するPEGである場合、DNAは、BSAのアミノ基と架橋剤により反応するカルボキシ基と、PEGのマレイミド基と反応するチオール基と、を有することができる。

[0024] コンジュゲートの親水性分子は、ポリアルキレングリコール、ポリグリセ

リン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される1種以上の親水性分子であってよい。より具体的には、コンジュゲートの親水性分子は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ペンタエリスリトール、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン、及びオクタグリセリンからなる群より選択される1種以上の親水性分子であってよい。好ましくは、コンジュゲートの親水性分子はポリエチレングリコールである。

[0025] DNAとの結合性を上げる観点から、コンジュゲートの親水性分子は、反応性官能基を有していてもよい。反応性官能基は、特に限定されず、例えば、NHS基、マレイミド基等公知の反応性官能基であってよい。

[0026] 両親媒性化合物の細胞接着能をマスキングする観点から、親水性分子の重量平均分子量は、例えば、2000以上、5000以上、又は10000以上であってよく、80000以下、60000以下、40000以下、30000以下、20000以下、10000以下、又は5000以下であってよい。

[0027] 基材との結合性を上げる観点から、両親媒性化合物の親水性基とコンジュゲートのDNAには、結合性物質がコンジュゲートされていてもよい。結合性物質は、基材、両親媒性化合物の親水性基、及びコンジュゲートのDNAと結合することができる官能基を有する物質であれば特に限定されず、例えば、BSA、卵白アルブミン、コラーゲン等のタンパク質又はポリリジン等のポリペプチドであってよい。

[0028] 細胞接着用組成物は、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質を1種以上、さらに含むことができる。光反応性物質は、光照射により活性酸素を生成する物質であれば特に限定されず、所望の波長を有する光で励起可能な任意の光反応性物質を選択することができる。光反応性物質は、例えば、蛍光色素、光増感剤、及び光触媒からなる群より選択される1種以上の光反応性物質であってよい。光反応性物質は、好ましく

は、DNAに結合することができるDNA結合性光反応性物質であり、より好ましくはDNA結合性蛍光色素である。蛍光色素は、例えば、YOYO（登録商標）-1、YO-PRO（登録商標）-1、TOTO（登録商標）-1、TO-PRO（登録商標）-1、BOBO（登録商標）-1、及びBO-PRO（登録商標）-1からなる群より選択されるDNA結合性の蛍光色素であってよい。光増感剤としては、例えば、ポルフィマーナトリウム、タラポルフィリンナトリウム等のポルフィリン誘導体が挙げられる。光触媒としては、例えば、酸化チタン（IV）が挙げられる。細胞へのダメージを防ぐ観点から、光反応性物質は、380 nm超の光で励起される物質であることが好ましい。例えば、光反応性物質は、430 nm以上、450 nm以上、又は480 nm以上の光で励起される物質であってよい。

[0029] 細胞接着用組成物は、1分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを1以上、5以上、10以上、15以上、又は20以上含んでよい。コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量の1倍超、5倍以上、10倍以上、又は20倍以上であってよい。両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量と、コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量との組み合わせは、例えば、200～600と2000～5000、1000～5000と10000～60000、又は8000～20000と10000～80000であってよい。

[0030] 本発明の一実施形態に係る細胞接着用基材は、基材と、1以上、好ましくは複数の両親媒性化合物と、1以上、好ましくは複数の、DNA及び親水性分子のコンジュゲートと、を備える。基材表面の少なくとも一部は、両親媒性化合物及びコンジュゲートに覆われており、各両親媒性化合物の親水性基と各コンジュゲートのDNAは、基材と結合している。すなわち、基材と両親媒性化合物とは、基材-親水性基-疎水性基の順番で各要素が並ぶように結合しており、基材とコンジュゲートとは、基材-DNA-親水性分子の順番で各要素が並ぶように結合している。本実施形態に係る細胞接着用基材は

、基材を上述の細胞接着用組成物でコーティングすることにより得ることができる。両親媒性化合物の詳細、並びに、DNA及び親水性分子のコンジュゲートの詳細は、上述のとおりである。

[0031] 基材の素材及び形状は、細胞を接着するのに適していることが好ましいが、特に限定されない。基材の素材は、例えば、ガラス、セラミック、金属、又は合成樹脂であってよい。合成樹脂は、例えば、ポリスチレン樹脂、シリコーン樹脂、アクリル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、又はエポキシ樹脂であってよい。基材は、例えば、平板、フィルム、粒子、棒又は多孔質体の形状を有していてもよく、基材の表面は平面であっても曲面であってもよい。

[0032] 両親媒性化合物の親水性基及びコンジュゲートのDNAとの結合性を上げる観点から、基材は、表面が結合性物質でコーティングされた基材であってもよい。結合性物質の詳細は、上述のとおりである。

[0033] 細胞接着用基材は、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質をさらに備えていてよい。具体的には、コンジュゲートのDNAには光反応性物質が結合していてもよい。光反応性物質の詳細は上述のとおりである。

[0034] 細胞接着用基材は、1分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを1以上、5以上、10以上、15以上、又は20以上備えていてよい。

[0035] 基材表面において、両親媒性化合物は、親水性基が基材表面から近い側に位置し、かつ疎水性基が基材表面から遠い側に位置するように配向しており、コンジュゲートは、DNAが基材表面から近い側に位置し、かつ親水性分子が基材表面から遠い側に位置するように、配向している。上述のとおり、コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい。したがって、本実施形態に係る細胞接着用基材の最外部には、コンジュゲートの親水性分子が露出しており、両親媒性化合物の細胞接着能を有する疎水性基は、コンジュゲートの親水性分子の下に隠れている。後述するように、基材に光反応性物

質を付与し、次いでこれを光により励起させることにより、コンジュゲートのDNAが切断されて親水性分子が解離し、よって、両親媒性化合物の疎水性基が最外部に露出する。したがって、本実施形態に係る細胞接着用基材によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで、任意の細胞を接着することができる。さらに、本実施形態に係る細胞接着用基材によれば、任意の細胞パターンを簡便に得ることができる。

[0036] 本発明の他の実施形態に係る細胞接着用基材は、基材と、1以上、好ましくは複数の両親媒性化合物及びDNAのコンジュゲートと、を備える。各両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、上記DNAと結合した親水性基と、を有し、DNAは基材と結合している。すなわち、基材とコンジュゲートとは、基材－DNA－親水性基－疎水性基の順番で各要素が並ぶように結合している。

[0037] 両親媒性化合物、DNA、及び基材の詳細は上述のとおりである。ただし、本実施形態においては、両親媒性化合物は基材又は結合性物質とは結合しておらず、DNAと結合している。また、本実施形態においては、DNAは上記親水性分子とは結合しておらず、親水性基と結合している。

[0038] DNAと両親媒性化合物とは、反応性官能基を介して結合していてもよい。反応性官能基は、特に限定されず、例えば、カルボキシ基、チオール基、アミノ基、NHS基、マレイミド基等公知の反応性官能基であってよい。

[0039] 細胞接着用基材は、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質をさらに備えていてよい。具体的には、コンジュゲートのDNAには光反応性物質が結合していてもよい。光反応性物質の詳細は上述のとおりである。

[0040] 基材表面において、両親媒性化合物とDNAとのコンジュゲートは、DNAが基材表面から近い側に位置し、かつ疎水性基が基材表面から遠い側に位置するように配向している。したがって、本実施形態に係る細胞接着用基材の最外部には、細胞接着能を有する疎水性基が露出しており、これにより細胞が接着される。基材に上述の光反応性物質を付与し、次いでこれを光によ

り励起させることにより、DNAが切断されて、接着された細胞がコンジュゲートとともに基材から解放される。したがって、本実施形態に係る細胞接着用基材によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで基材に接着された任意の細胞を解放及び回収することができる。さらに、本実施形態に係る細胞接着用基材によれば、任意の細胞パターンを簡便に得ることができる。

[0041] 一実施形態において、本発明は、内部の少なくとも一部が上述の細胞接着用組成物でコーティングされた流路を備える、マイクロ流路デバイスを提供する。マイクロ流路デバイスは、一般的に、1以上のマイクロ流路を備えるデバイスであり、細胞を捕捉及び解析する手段として利用することができる。

[0042] 図1に本実施形態に係るマイクロ流路デバイスの一例を示す。図1の(A)に示すマイクロ流路デバイス40は、流路23と、流路23に隣接する流路24と、流路23と流路24とをつなぐ連絡部30とを備える。流路23、流路24、及び連絡部30は、いずれも基板22に設けられた溝であり、基板22の溝が形成された側の主面にはカバーガラス21が積層されている。基板22は、特に限定されないが、例えば、シリコンゴム（例えば、ジメチルポリシロキサン）等の樹脂製であってよい。基板22が樹脂製である場合、流路23、流路24、及び連絡部30は、フォトリソグラフィーにより容易に形成することができる。

[0043] 流路23には液体の注入口25及び26、並びに注出口28が設けられており、流路24には液体の注入口27及び注出口29が設けられている。注入口25～27には、例えば、細胞懸濁液、試料、標準試料、バッファー等の液体が注入される。注入口25及び26から流路23に導入された液体は、注出口28からマイクロ流路デバイス40の外に排出され、注入口27から流路24に導入された液体は、注出口29からマイクロ流路デバイス40の外に排出される。液体は、例えばシリンジを用いて注入口に注入することができる。注入口は、使用する液体の数だけあってもよいが、一つの流路に

対して少なくとも1つの注入口があれば足りる。したがって、注入口26はなくてもよいし、流路23及び／又は流路24に1以上の注入口を追加してもよい。同様に、流路23及び／又は流路24に1以上の注出口を追加してもよい。

[0044] 図1の(B)に連絡部30の拡大図を示す。この図では、流路23に細胞懸濁液が導入されている。連絡部30は、流路23と流路24とをつなぐ孔32と、細胞Cを捕捉可能な開口部(開口端)31と、を有する。ここで、細胞Cを捕捉可能とは、流路23内の圧力が流路24内の圧力よりも高い条件下において、流路23内に存在する細胞Cを流路23側の開口部31に保持することができることを意味する。図1では、開口部31が窪みを形成しているが、開口部31の形状は、細胞Cを捕捉可能であれば特に限定されず、平坦であってもよい。連絡部30は、細胞Cが通り抜けることができない形状である必要がある。したがって、孔32の孔径は、細胞Cの直径よりも十分に小さいことが好ましい。また、図1では、連絡部30は孔32を介して流路23と流路24とをつないでいるが、孔32をスリットに置き換えてもよい。開口部31は、細胞Cが存在する流路側に設けられてさえいればよい。図1では、流路23に細胞懸濁液が導入されているため、開口部31は流路23側に設けられてさえいればよい。流路24に細胞懸濁液を導入する場合、開口部31は流路24側に設けられてさえいればよい。

[0045] 図2の(A)に連絡部30をさらに拡大した模式図を示す。この図では、細胞Cが、流路23から流路24の方向(図中、矢印Pによって示す方向)にはたらく力によって、開口部31に捕捉されている。矢印Pの方向に働く力は、流路23と流路24との圧力差により生じている。図2の(A)では、細胞Cは流路23を構成する内壁に接着しておらず、もし流路23と流路24との圧力差が解消されれば、細胞Cは開口部31から解放される。

[0046] 流路23の内部は、上述の細胞接着用組成物でコーティングされている。この図では、両親媒性化合物4は、結合性物質1と、親水性基2と、疎水性基3と、を備え、コンジュゲート7は、結合性物質1と、DNA5aと、親

水性分子 6 と、を備える。各両親媒性化合物 4 の親水性基 2 と各コンジュゲート 7 の DNA 5 a は、流路 2 3 を構成する内壁、すなわち流路 2 3 の内表面と、任意で結合性物質 1 を介して結合している。なお、上述のとおり、結合性物質 1 は必須ではない。また、流路 2 3 の内部はその全体に渡ってコーティングされている必要はなく、流路 2 3 の内部の少なくとも一部、具体的には、少なくとも開口部 3 1 がコーティングさえしていれば十分である。

[0047] 図 2 の (B) 及び (C) は、開口部 3 1 に細胞を接着するまでの過程を示す。図 2 の (A) に示す状態にある細胞を開口部 3 1 に接着させるためには、まず、開口部 3 1 に上述の光反応性物質 (図示せず) を付与する。光反応性物質は、開口部 3 1 にあらかじめ付与されていてもよい。あるいは、流路 2 3 に光反応性物質を導入することにより、開口部 3 1 に光反応性物質を付与してもよい。光反応性物質は、DNA 5 a に結合させることが好ましい。その後、図 2 の (B) に示すように、開口部 3 1 に光を照射して光反応性物質を励起させる。光反応性物質の励起により生じた活性酸素は、DNA 5 a を切断し、疎水性基 3 と細胞 C の細胞膜との非共有結合を妨げていた親水性分子 6 が流路 2 3 の内壁から解離する。残された DNA 断片 5 b は、疎水性基 3 と細胞 C との結合を妨げるには小さいため、疎水性基 3 と細胞 C の細胞膜とが非共有結合して、細胞 C が開口部 3 1 に接着する。

[0048] 本実施形態に係るマイクロ流路デバイス 4 0 において、開口部 3 1 の細胞接着能は、任意のタイミングで発現させることができる。したがって、開口部 3 1 に目的の細胞 C 以外の細胞又は夾雑物が捕捉された場合には、流路 2 3 と流路 2 4 の圧力差を逆転させてそれらを開口部 3 1 から解放することができる。一方、開口部 3 1 に目的の細胞 C が捕捉された場合には、開口部 3 1 に光を照射することで、細胞 C を開口部 3 1 に接着することができる。一度細胞 C が開口部 3 1 に接着されれば、流路 2 3 と流路 2 4 との圧力差を維持しておく必要がない。すなわち、本実施形態に係るマイクロ流路デバイス 4 0 によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングで、細胞を選択的にかつ簡便に捕捉及び解析することができる。

- [0049] 次に上述の細胞接着用組成物を用いて細胞を基材上に接着する方法を説明する。本発明の一実施形態に係る細胞を基材上に接着する方法は、（a）基材を上述の細胞接着用組成物でコーティングする工程と、（b）基材に上述の光反応性物質を接触させる工程と、（c）基材に光を照射して光反応性物質を励起させる工程と、（d）基材に細胞を接触させる工程と、を備える。
- [0050] 工程 a では、基材を上述の細胞接着用組成物でコーティングすることにより、上述の細胞接着用基材を得る。
- [0051] 工程 a でコーティングされる基材は、特に限定されず、基材の素材及び形状の例は上述のとおりである。基材の具体的な例としては、例えば、スライドガラス、培養皿、マルチウェルプレート、マイクロ流路デバイスのマイクロ流路の内壁等が挙げられる。
- [0052] コーティングの仕方は特に限定されず、例えば、液体状の細胞接着用組成物を基材上に接触させることで基材をコーティングすることができる。細胞接着用組成物を基材上に接触させる方法は特に限定されず、例えば、細胞接着用組成物を基材に滴下してもよく、基材を細胞接着用組成物に浸してもよい。
- [0053] 工程 b では、基材に光反応性物質を接触させる。この工程により、基材に光反応性物質が付与される。好ましくは、光反応性物質は、基材に結合したコンジュゲートの DNA に結合する。光反応性物質の詳細は上述のとおりである。工程 b は工程 a の後に行ってもよく、工程 a と同時に行ってもよい。いいかえれば、細胞接着用組成物でコーティングされた基材に光反応性物質を接触させてもよく、細胞接着用組成物と光反応性物質を基材に同時に接触させてもよい。細胞接着用組成物と光反応性物質を基材に同時に接触させる場合、細胞接着用組成物に光反応性物質が含まれていてもよい。
- [0054] 工程 c では、基材に光を照射して光反応性物質を励起させる。励起された光反応性物質は活性酸素を生じ、活性酸素によってコンジュゲートの DNA が切断される。したがって、この工程により、細胞の接着を妨げていた親水性分子がコンジュゲートから解離し、親水性分子の下に隠れていた細胞接着

能を有する両親媒性化合物の疎水性基が基材表面の最外部に露出する。

[0055] 光の波長、照射強度、及び照射時間は、光反応性物質を励起させることができれば特に限定されない。細胞へのダメージを防ぐ観点から、光の波長は、380 nm超であることが好ましい。例えば、光の波長は、430 nm以上、450 nm以上、又は480 nm以上であってもよい。照射時間は、例えば、1秒以上、10秒以上、又は60秒以上であってもよい。

[0056] 工程cは工程bの後に行うことができる。

[0057] 工程dでは、基材に細胞を接触させる。この工程により、両親媒性化合物の疎水性基が細胞膜と非共有結合し、細胞が基材に接着する。基材に細胞を接触させる方法は特に限定されず、例えば、細胞懸濁液を基材に滴下してもよく、基材を細胞懸濁液に浸してもよい。工程dは、工程aの後の任意の段階で行うことができる。工程dを工程bの前に行う場合、工程b（光反応性物質の接触）及び光の照射（工程c）は、基材に細胞を接触させた状態を維持したまま行うことが好ましい。工程dを工程bと同時に、又は工程bの後かつ工程cの前に行う場合、光の照射（工程c）は、基材に細胞を接触させた状態を維持したまま行うことが好ましい。

[0058] 本実施形態に係る細胞を基材上に接着する方法によれば、任意の波長を有する光を用いて、任意のタイミングかつ短い照射時間で、基材に細胞を接着することができる。

実施例

[0059] （準備）

1. PEG-DNA-BSAの調製

5'末端にカルボキシ基を、3'末端にチオール基を有する20量体のDNA（配列：TCTATCTGCAGGCGCTCTCC）を合成した。このDNAとBSAをpH7.0の10mM MOPS-KOHにそれぞれ溶解し、DNA溶液とBSA溶液を得た。BSA溶液とDNA溶液を1:5のモル比で混合した。この混合液に1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド（EDC）を最終濃度が10mMとなるように混合

し、DNAの5'末端のカルボキシ基とBSAのアミノ基を結合させた。スピンカラムを用いて余剰DNAを取り除いた後、PEG-マレイミド（PEGの重量平均分子量：20000）を、BSAとPEGのモル比が1：10となるようにpH7.0の10mM MOPS-KOHとともに加え、混合した。混合液を30分インキュベーションすることでDNA-BSAとPEGを結合させ、DTTを最終濃度1mMで混合することで反応を停止させた。

[0060] 2. PEG脂質-BSAの調製

BSAとPEG脂質-NHSをpH7.0の10mM MOPS-KOHにそれぞれ溶解し、BSA溶液とPEG脂質溶液を得た。PEG脂質-NHSとしては、オレイル- α -ポリエチレングリコール- ω -スクシニル-N-ヒドロキシ- ω -スクシンイミジルエステル（PEGの重量平均分子量：2000、日油株式会社製「SUNBRIGHT OE-020CS」）を使用した。BSA溶液とPEG脂質溶液を1：10のモル比で混合し、30分室温にてインキュベーションした。pH6.8のTris-HClを加え、反応を停止させた。

[0061] 3. PEGリン脂質-DNA-BSAの調製

PEG-マレイミドのかわりにPEGリン脂質-マレイミドを用いて、PEG-DNA-BSAの調製と同様にしてPEGリン脂質-DNA-BSAを調製した。PEGリン脂質-マレイミドとしては、N-[N'-(3'-マレイミド-1'-オキソプロピル)アミノプロピルポリオキシエチレンオキソカルボニル]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（PEGの重量平均分子量：2000、日油株式会社製「SUNBRIGHT DSPE-020MA」）を使用した。

[0062] （実施例1）

BSA濃度が全体で0.5mg/mLとなるようにPEG-DNA-BSAとPEG脂質-BSAを1：5の割合で混合した。この混合溶液を洗浄済みのカバーガラス（24mm×36mm，t0.17mm）に滴下し、表

面がPEG-DNA-BSAとPEG脂質-BSAでコーティングされた基板を得た。

[0063] YOYO-1（最大吸収波長491 nm、最大蛍光波長509 nm）を最終濃度が10 μ Mとなるようにバッファーに加え、基板上に滴下した。その後、絞りを用いて、所定の円形領域に励起光を10秒間照射し、円形領域に細胞接着性を付与した。励起後、遊離したPEG、蛍光色素、分解されたDNA等をバッファーにより洗い流した。

[0064] 1×10^5 細胞/mLの濃度となるように、血清を含まない培地に細胞を懸濁した。上記基板に細胞懸濁液を接触させ、10分後に、血清を含む培地で余剰の細胞を洗い流した。基板上の細胞を培養し、一日後、位相差顕微鏡を用いて基板上の細胞を観察した。細胞は上記円形領域内で接着及び伸展し、円形パターンを形成していた。

[0065]（実施例2）

BSA濃度が全体で0.5 mg/mLとなるようにPEG-DNA-BSAとPEG脂質-BSAを1:5の割合で混合した。この混合溶液を図1に示すようなマイクロ流路デバイスの流路23に導入し、流路23の内側をPEG-DNA-BSAとPEG脂質-BSAでコーティングした。

[0066] 1×10^5 細胞/mLの濃度となるように、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に細胞を懸濁した。流路23に細胞懸濁液を導入し、流路24にPBSを導入した。流路23内の圧力が流路24内の圧力よりも高くなるように流速を調整し、所望の細胞を開口部31に保持した。開口部31に所望の細胞以外の細胞又は細胞の破砕物が捕捉された場合は、圧力差を逆転させて、それらを開口部31から解放した。

[0067] 開口部31に所望の細胞が捕捉された後、YOYO-1を含むPBSを流路23に導入した。開口部31に励起光を10秒間照射した。照射後、流路23内にPBSを導入し、遊離したPEG、蛍光色素、分解されたDNA等を洗い流した。開口部31には所望の細胞が接着していた。

[0068]（実施例3）

B S A濃度が0.5 mg/mLとなるようにPEGリン脂質-DNA-B S Aをバッファーに懸濁した。この懸濁液を洗浄済みのカバーガラス(24 mm×36 mm, t 0.17 mm)に滴下し、表面がPEGリン脂質-DNA-B S Aでコーティングされた基板を得た。

[0069] 1×10^5 細胞/mLの濃度となるように、血清を含まない培地に細胞を懸濁した。上記基板に細胞懸濁液を接触させた。細胞の基板への接着を確認後、血清入り培地で基板を洗浄し、コンフルエントになるまで細胞を培養した。

[0070] Y O Y O-1を最終濃度が10 μ Mとなるように培地に加え、基板上に滴下した。その後、絞りをを用いて、所定の円形領域に励起光を10秒間照射した。円形領域の細胞は基板から剥離し、培地中に浮遊した。培地中に浮遊した細胞は回収した。

符号の説明

[0071] 1・・・結合性物質、2・・・親水性基、3・・・疎水性基、4・・・両親媒性化合物、5 a・・・DNA、5 b・・・DNA断片、6・・・親水性分子、7・・・コンジュゲート、21・・・カバーガラス、22・・・基板、23, 24・・・流路、25, 26, 27・・・注入口、28, 29・・・注出口、40・・・マイクロ流路デバイス、30・・・連絡部、31・・・開口部、32・・・孔、C・・・細胞。

請求の範囲

- [請求項1] 両親媒性化合物と、DNA及び親水性分子のコンジュゲートと、を含み、
- 両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有し、
- コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい、細胞接着用組成物。
- [請求項2] 親水性基が、ポリアルキレングリコール、ポリグリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される親水性分子の残基であり、
- 疎水性基が、炭素数7～22の脂肪族炭化水素基、又は、炭素数7～22の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質の残基である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] コンジュゲートの親水性分子が、ポリアルキレングリコール、ポリグリセリン、多糖、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、及びポリアクリルアミドからなる群より選択される親水性分子である、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 親水性基がポリエチレングリコールの残基であり、疎水性基が炭素数10～20の脂肪族炭化水素基又は炭素数10～20の脂肪族炭化水素基を有するリン脂質の残基である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] 1分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを1以上含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項6] コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量が、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量の1倍超である、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] 基材と、1以上の両親媒性化合物と、1以上の、DNA及び親水性

分子のコンジュゲートと、を備え、

各両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、親水性基と、を有し、

各両親媒性化合物の親水性基と各コンジュゲートのDNAは、基材と結合しており、

コンジュゲートの親水性分子の重量平均分子量は、両親媒性化合物の親水性基が由来する親水性分子の重量平均分子量よりも大きい、細胞接着用基材。

[請求項8] 1分子の両親媒性化合物あたりコンジュゲートを1以上備える、請求項7に記載の細胞接着用基材。

[請求項9] 基材と、1以上の、両親媒性化合物及びDNAのコンジュゲートと、を備え、

各両親媒性化合物は、細胞膜に非共有結合可能な疎水性基と、前記DNAと結合した親水性基と、を有し、

DNAは基材と結合している、細胞接着用基材。

[請求項10] 光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質をさらに備える、請求項7～9のいずれか一項に記載の細胞接着用基材。

[請求項11] 内部の少なくとも一部が請求項1～6のいずれか一項に記載の細胞接着用組成物でコーティングされた流路を備える、マイクロ流路デバイス。

[請求項12] 第一の流路と、

前記第一の流路に隣接する第二の流路と、

前記第一の流路と前記第二の流路とをつなぐ連絡部であって、前記第一の流路側に細胞を捕捉可能な開口部を有する連絡部と、を備え、

前記第一の流路の内部が請求項1～6のいずれか一項に記載の細胞接着用組成物でコーティングされている、請求項11に記載のマイクロ流路デバイス。

[請求項13] 基材を請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の細胞接着用組成物でコーティングする工程と、

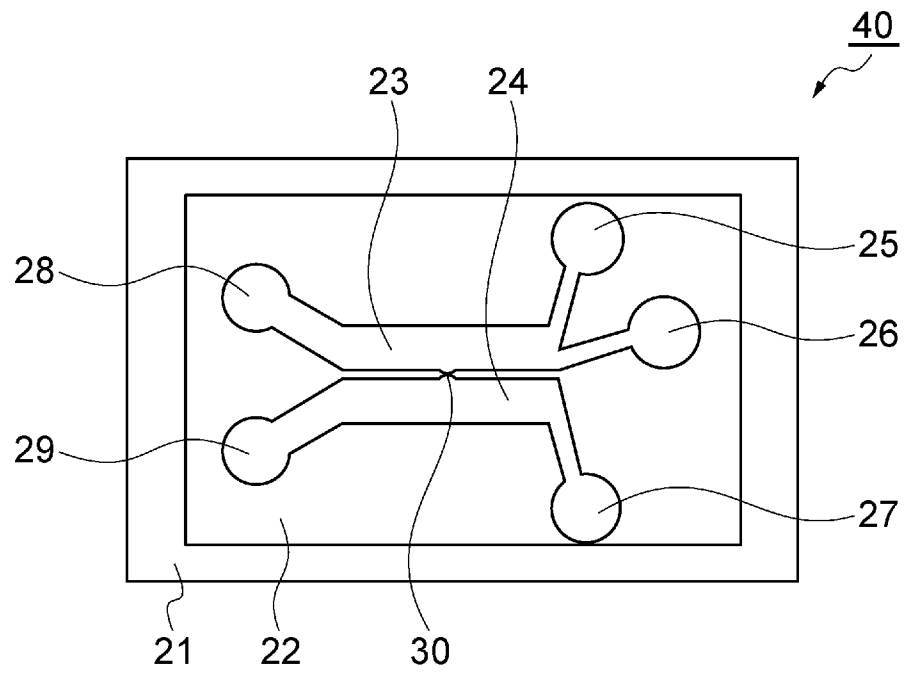
 基材に、光反応性物質であって、光照射により活性酸素を生成する光反応性物質を接触させる工程と、

 基材に光を照射して光反応性物質を励起させる工程と、

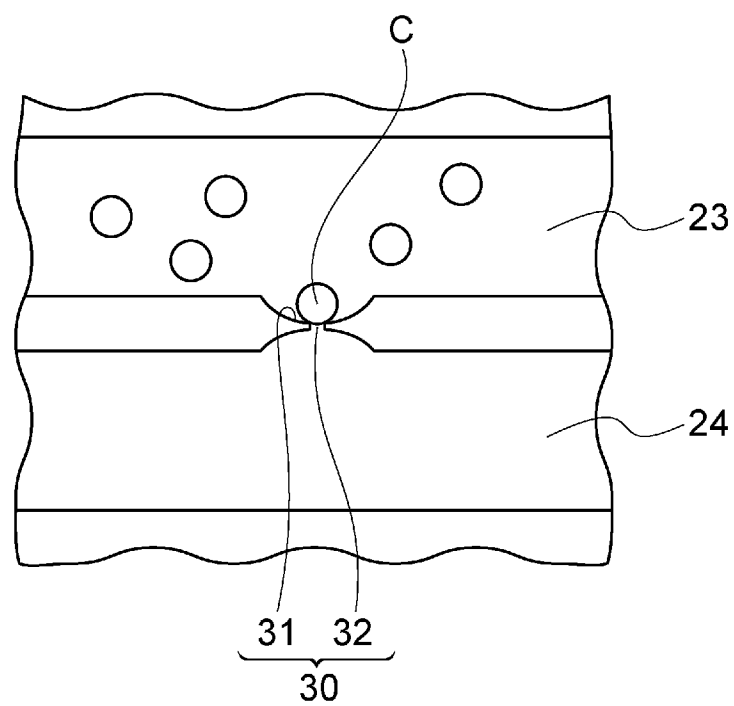
 基材に細胞を接触させる工程と、を備える、細胞を基材上に接着する方法。

[図1]

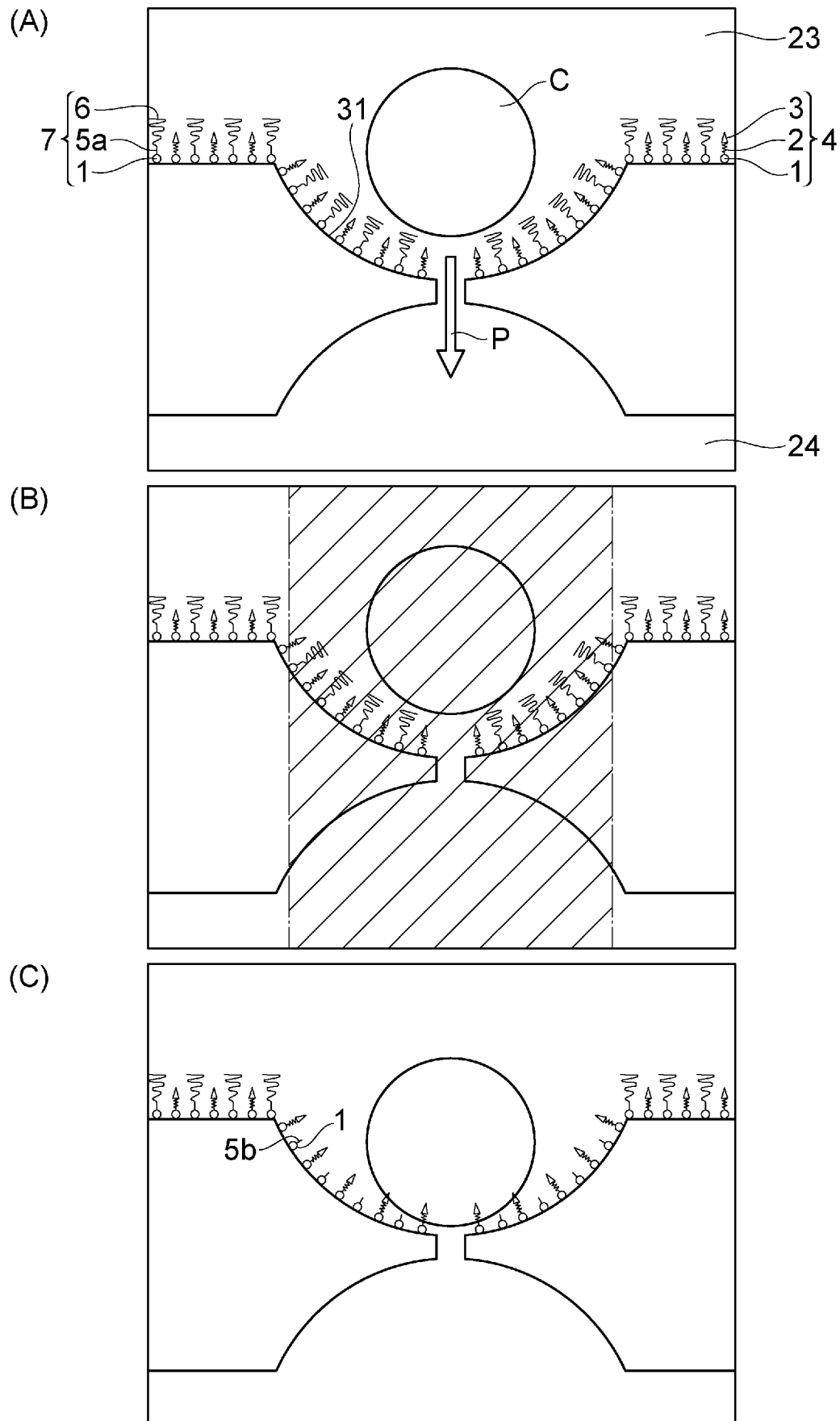
(A)



(B)



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/001755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/42(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; C12N 11/00(2006.01)i; C12N 11/08(2020.01)i; C12N 11/089(2020.01)i
FI: C12N11/00; C12N5/00; C12M1/42; C12N11/08; C12N11/089

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)

C12M1/42; C12N5/00; C12N11/00; C12N11/08; C12N11/089

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); BIOSIS (STN); CAplus (STN); MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-524038 A (ALLVIVO, INC.) 12.08.2004 (2004-08-12) claims, paragraphs [0018]-[0020], [0022], [0027]	1-6
Y	paragraphs [0018]-[0020], [0022], [0027]	11, 12
A	paragraphs [0018]-[0020], [0022], [0027]	7-10, 13
Y	JP 2008-136475 A (UNIV. WASEDA) 19.06.2008 (2008-06-19) claims, paragraphs [0025], [0030]	11, 12
A	entire text	1-10, 13
Y	JP 2012-235764 A (IJIRO, Kuniharu) 06.12.2012 (2012-12-06) claims, paragraphs [0008], [0035]	9, 10
A	claims, paragraphs [0008], [0035]	1-8, 11-13



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

"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
11 March 2020 (11.03.2020)

Date of mailing of the international search report
24 March 2020 (24.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/001755

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-011747 A (CANON INC.) 21.01.2010 (2010-01-21) paragraph [0043]	9-10
A	entire text	1-8, 11-13
Y	JP 2004-519516 A (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH) 02.07.2004 (2004-07-02) paragraphs [0009], [0010]	10
A	entire text	1-9, 11-13
Y	松浦 輝男 ほか, コバルト錯体による酸素分子および有機過酸化物の活性化, 石油学会誌, 1989, vol. 32, no. 3, pp. 111-121, in particular, page 119, formula 36, page 119, left column, line 6 from the bottom to right column, line 4 from the top	10
A	entire text, (MATSUURA, Teruo et al., "Activation of Molecular Oxygen and Organic Peroxides by Cobalt Complexes", Journal of The Japan Petroleum Institute)	1-9, 11-13
A	WO 2017/169259 A1 (SONY CORP.) 05.10.2017 (2017-10-05) claims	1-13
A	HOFFHECKER, I. T. et al., "Sequence-specific nuclease-mediated release of cells tethered by oligonucleotide phospholipids", Biomaterials, 17 March 2015, vol. 53, pp. 318-329, summary, fig. 3	1-13
A	LI, W. et al., "Near-Infrared- and pH-Responsive System for Reversible Cell Adhesion using Graphene/Gold Nanorods Functionalized with i-Motif DNA", Angew. Chem. Int. Ed., 2013, vol. 52, pp. 6726-6730, entire text	1-13
A	US 2014/0275509 A1 (NANOIMMUNOTECH SRL) 18.09.2014 (2014-09-18) entire text	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/001755

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2004-524038 A	12 Aug. 2004	US 2004/0219541 A1 entire text WO 2002/077159 A2 claims, pp. 5-6, 8 EP 1363961 A entire text	
JP 2008-136475 A	19 Jun. 2008	(Family: none)	
JP 2012-235764 A	06 Dec. 2012	(Family: none)	
JP 2010-011747 A	21 Jan. 2010	US 2010/0003745 A1 paragraph [0051]	
JP 2004-519516 A	02 Jul. 2004	US 2003/0045538 A1 entire text WO 2002/079191 A1 pp. 3-4 EP 1373250 A entire text	
WO 2017/169259 A1	05 Oct. 2017	US 2019/0264159 A1 claims EP 3438236 A entire text	
US 2014/0275509 A1	18 Sep. 2014	WO 2012/150373 A1 entire text EP 2706354 A1 entire text	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/42(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; C12N 11/00(2006.01)i; C12N 11/08(2020.01)i; C12N 11/089(2020.01)i FI: C12N11/00; C12N5/00; C12M1/42; C12N11/08; C12N11/089		
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）） C12M1/42; C12N5/00; C12N11/00; C12N11/08; C12N11/089		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); BIOSIS (STN); Cplus (STN); MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2004-524038 A (オールヴィヴォ インコーポレイテッド) 12.08.2004 (2004 - 08 - 12) 特許請求の範囲、段落 0018-0020, 0022, 0027	1-6
Y	特許請求の範囲、段落 0018-0020, 0022, 0027	11, 12
A	特許請求の範囲、段落 0018-0020, 0022, 0027	7-10, 13
Y	JP 2008-136475 A (学校法人早稲田大学) 19.06.2008 (2008 - 06 - 19) 特許請求の範囲、段落 0025, 0030	11, 12
A	全文	1-10, 13
Y	JP 2012-235764 A (居城 邦治) 06.12.2012 (2012 - 12 - 06) 特許請求の範囲、段落 0008, 0035	9, 10
A	特許請求の範囲、段落 0008, 0035	1-8, 11-13
Y	JP 2010-011747 A (キヤノン株式会社) 21.01.2010 (2010 - 01 - 21) 段落 0043	9, 10
A	全文	1-8, 11-13
☒ 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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 11.03.2020		国際調査報告の発送日 24.03.2020
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） 井関 めぐみ 4N 5574 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	JP 2004-519516 A (カウンシル オブ サイエнтиフィック アンド インダストリアル リサーチ) 02.07.2004 (2004 - 07 - 02) 段落 0 0 0 9, 0 0 1 0	10
A	全文	1-9, 11-13
Y	松浦 輝男 ほか, コバルト錯体による酸素分子および有機過酸化物の活性化, 石油学会誌, 1989, Vol.32, No.3, p.111-121 特に 1 1 9 頁の式 3 6 および、1 1 9 頁左欄下から 6 行目－右欄上から 4 行目	10
A	全文	1-9, 11-13
A	WO 2017/169259 A1 (ソニー株式会社) 05.10.2017 (2017 - 10 - 05) 特許請求の範囲	1-13
A	HOFHECKER, I. T. et al., Sequence-specific nuclease-mediated release of cells tethered by oligonucleotide phospholipids, Biomaterials, 2015.03.17, Vol.53, p.318-329 要旨、図 3	1-13
A	LI, W. et al., Near-Infrared- and pH-Responsive System for Reversible Cell Adhesion using Graphene/Gold Nanorods Functionalized with i-Motif DNA, Angew. Chem. Int. Ed., 2013, Vol.52, p.6726-6730 全文	1-13
A	US 2014/0275509 A1 (NANOIMMUNOTECH SRL) 18.09.2014 (2014 - 09 - 18) 全文	1-13

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/JP2020/001755

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2004-524038	A	12.08.2004	US 2004/0219541 A1 全文 WO 2002/077159 A2 CLAIMS, pages 5-6, 8 EP 1363961 A 全文	
JP	2008-136475	A	19.06.2008	(ファミリーなし)	
JP	2012-235764	A	06.12.2012	(ファミリーなし)	
JP	2010-011747	A	21.01.2010	US 2010/0003745 A1 Paragraph [0051]	
JP	2004-519516	A	02.07.2004	US 2003/0045538 A1 全文 WO 2002/079191 A1 Pages 3-4 EP 1373250 A 全文	
WO	2017/169259	A1	05.10.2017	US 2019/0264159 A1 Claims EP 3438236 A 全文	
US	2014/0275509	A1	18.09.2014	WO 2012/150373 A1 全文 EP 2706354 A1 全文	