(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
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/182316 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/008595

(22) 国際出願日： 2021年3月5日(05.03.2021)

(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 2020-040551 2020年3月10日(10.03.2020) JP

(71) 出願人: 東洋製罐グループホールディングス株式会社(**TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.**) [JP/JP]; 〒1418627 東京都品川区東五反田２丁目１８番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 戸 谷 貴 彦 (**TOTANI Takahiko**); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ケ谷区岡沢町２２－４ 東洋製罐グループホールディングス株式会社 綜合研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 生 富 成 一 (**IKUTOMI Shigekazu**); 〒1580083 東京都世田谷区奥沢６丁目３４番１号 内海第２ビル５階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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, 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：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2021/182316 A1

(54) **Title:** BAG-LIKE CULTURING VESSEL

(54) 発明の名称： 袋状培養容器

(57) **Abstract:** The present invention enables provision of a bag-like culturing vessel in which floating cells induced from pluripotent stem cells can be suitably grown. A bag-like culturing vessel for growing floating cells induced from pluripotent stem cells, wherein a culturing part of the bag-like culturing vessel is formed from a polyethylene-based resin, and the static water contact angle of the culturing part is 49.6-90.1 °. The static water contact angle of the culturing part is more preferably 49.6-80.0°, and further preferably 74.2-80.0°.

(57) 要約：多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を好適に増殖可能な袋状培養容器の提供を可能とする。多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を増殖させるための袋状培養容器であって、袋状培養容器の培養部がポリエチレン系樹脂により形成され、培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下である袋状培養容器。培養部の静的水接触角は４９．６°以上８０．０°以下であることがより好ましく、７４．２°以上８０．０°以下であることがさらに好ましい。

明　細　書

発明の名称 ： 袋状培養容器

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養技術に関し、特に多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞用の袋状培養容器に関する。

背景技術

[0002] 近年、医薬品の生産や、遺伝子治療、再生医療、免疫療法等の分野において、細胞や組織、微生物などを人工的な環境下で効率良く大量に培養することが求められている。

細胞を大量に培養する場合には、容量の大きい培養容器を容易に製造可能な軟包材からなる袋状の培養容器（培養バッグ）を用いることが有益である。

[0003] ところが、袋状培養容器などを用いて浮遊性細胞につき各種条件で培養実験を行ったところ、袋状培養容器を用いた場合に、相対的に高い培養効率を得ることができなかった。

具体的には、培養容器の培養部（培養容器内において細胞培養が行われる表面部分）が親水化処理された、本来は接着性細胞の培養に適する培養容器を用いた場合の方が、高い培養効率が得られた。

[0004] リンパ球や樹状細胞など培地中に浮遊させて培養が行われる浮遊性細胞を培養する場合、細胞が培養容器の培養部に接着しないように培養部が疎水性であることが望ましい。

また、浮遊性細胞の培養にあたっては、一般的に、培養部に細胞が接着しないように、培養部に対して細胞接着抑制剤（細胞低接着処理剤）の塗布に適した表面処理が行われ、これを塗布した培養容器が用いられている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２０１９－１９３６０４号公報

特許文献2：特開２０１９－１９８２８８号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ここで、上記の培養実験で用いた浮遊性細胞は、ｉＰＳ細胞を分化誘導して得られたｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞であった。このため、本発明者は、このような浮遊性細胞の培養にあたっては、通常の浮遊性細胞用の培養容器とは別個の性質を備えた培養容器が適するのではないかと推察した。

具体的には、ｉＰＳ細胞は、培養容器の培養部に接着させて増殖させることのできる接着性細胞である。このため、ｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞についても、一般的な浮遊性細胞用の培養容器ではなく、接着性細胞用の培養容器が有する性質の方が適しているのではないかと推察した。なお、ｉＰＳ細胞を培養する方法としては、培養容器の培養部に細胞を接着させることなく、スフェア（細胞凝集塊）を形成させて、スフェアを培養容器内で浮遊させて培養する方法もある。

[0007] そこで、本発明者は鋭意研究して、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を袋状培養容器を用いて増殖させる場合には、袋状培養容器の培養部がポリエチレン系樹脂により形成され、培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下であることが好ましいことを見いだした。また、この培養部の静的水接触角としては、４９．６°以上８０．０°以下であることがより好ましい。

[0008] ところで、本出願人は、従来から浮遊性細胞用の培養容器と接着性細胞用の培養容器を製造するための適切な条件につき研究し、特許文献１に記載の培養容器基材及び特許文献２に記載の細胞培養容器を既に提案している。

特許文献１に記載の培養容器基材は接着性細胞用であるため、この培養容器基材により形成された培養容器は、浮遊性細胞用である本発明とは用途が相違している。また、この培養容器の培養部の静的水接触角は８０°より大きいため、本発明の袋状培養容器の培養部の静的水接触角の好適な範囲とは異なるものとなっている。

[0009] 特許文献２に記載の細胞培養容器は、培養部の静的水接触角が８０°～９５°のものを浮遊性細胞用とし、培養部の静的水接触角が６０°～８０°のものを接着性細胞用としている。

一方、本発明の袋状培養容器は、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞用であるため、特許文献２に記載の浮遊性細胞用の細胞培養容器に比較して用途がさらに限定されている。また、本発明の袋状培養容器の培養部の静的水接触角の好適な範囲は、特許文献２に記載の浮遊性細胞用の細胞培養容器とは異なるものとなっている。

[0010] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を好適に増殖可能な袋状培養容器の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 上記目的を達成するため、本発明の袋状培養容器は、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を増殖させるための袋状培養容器であって、前記袋状培養容器の培養部がポリエチレン系樹脂により形成され、前記培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下である構成としてある。

[0012] また、本発明の袋状培養容器を、前記培養部の静的水接触角が４９．６°以上８０．０°以下であること構成とすることがより好ましく、前記培養部の静的水接触角が７４．２°以上８０．０°以下である構成とすることがさらに好ましい。

また、本発明の袋状培養容器を、前記多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞がｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞である構成とすることが好ましい。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を好適に増殖可能な袋状培養容器の提供が可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]静的水接触角についての説明図である。

[図2]試験１の各種培養容器を用いた細胞培養における各培養日数後の培養細胞数を示す図である。

[図3]試験１の各種培養容器を用いた細胞培養における各培養日数後の増殖倍率を示す図である。

[図4]試験１の各種培養容器を用いた細胞培養における各培養日数後の増殖倍率を表すグラフを示す図である。

[図5]試験１の各種培養容器を用いた細胞培養における１１日後の増殖倍率を表すグラフを示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の袋状培養容器の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態及び実施例の具体的な内容に限定されるものではない。

本実施形態の袋状培養容器は、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を増殖させるための袋状培養容器であって、袋状培養容器の培養部がポリエチレン系樹脂により形成され、培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下であることを特徴とする。

[0016] 多能性幹細胞は、生体の様々な組織に分化誘導され得る細胞であり、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）などを挙げることができる。

浮遊性細胞は、培養容器内で培地中に浮遊させて培養が行われる細胞であり、Ｔ細胞などのリンパ球や樹状細胞等を挙げることができる。本実施形態では、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞としてｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞を好適に用いることができる。

[0017] 本実施形態の袋状培養容器の培養部の材料であるポリエチレン系樹脂としては、例えば、ポリエチレン、エチレンとα－オレフィンの共重合体、エチレンと酢酸ビニルの共重合体、エチレンとアクリル酸やメタクリル酸共重合体と金属イオンを用いたアイオノマー等を挙げることができる。本実施形態では、ポリエチレン系樹脂として、ポリエチレン又はエチレンビニルアセテートを用いることが特に好ましい。

[0018] 静的水接触角とは、図１に示すように、静止した液体の表面が固体壁の表

面に接するところで液面と固体面がなす角（θｓ）を意味する。静的水接触角が大きいと、固体壁の表面の疎水性が相対的に強く、静的水接触角が小さいと、固体壁の表面の親水性が相対的に強いという関係がある。

具体的には、ポリエチレン系樹脂の一種であるポリエチレンフィルムからなる培養容器の培養部における静的水接触角が６０°より大きく８０°以下の場合、接着性細胞は培養部に好適に接着して、効率的に培養できることが知られている。

[0019] また、ポリエチレンフィルムの表面の静的水接触角は、未処理の状態では９５°以上を示し、疎水性が強いために、接着性細胞を接着させて培養することはできない。また、細胞接着抑制剤をコーティングすることもできないため、浮遊性細胞を培養することもできない。

一方、ポリエチレンフィルムからなる培養容器の培養部に表面処理を施して、その静的水接触角を８０°より大きく９５°未満とすれば、培養部に細胞接着抑制剤をコーティングすることができ、浮遊性細胞を培養することが可能となる。

[0020] 本実施形態の袋状培養容器の培養部の静的水接触角は、４９．６°以上９０．１°以下であり、本実施形態の袋状培養容器は、このような静的水接触角を有することにより、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を好適に増殖させることが可能になっている。

[0021] また、本実施形態の袋状培養容器の培養部の静的水接触角を、４９．６°以上８０．０°以下とすることがより好ましく、７４．２°以上８０．０°以下（又は未満）とすることがさらに好ましい。

本実施形態の袋状培養容器の培養部の静的水接触角をこのような範囲にすることで、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞の増殖効率をより好適に向上させることが可能になっている。

[0022] これらの条件で増殖が良くなったメカニズムは、明らかではないが、ｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞は、天然のＴ細胞に比較して凝集しやすいため、ある程度の強度で培養部に接着させることによって、過度な凝集を防ぐことで、一部

の細胞が酸欠や栄養不足に陥るのが回避されているためと推測される。

また、後述する実施例に示されるように、培養部の静的水接触角の親水性が強すぎると増殖効率は低下する。その理由は明らかではないが、細胞が培養部に強く貼り付くことで、増殖時に培養部から浮き上がる動作が阻害されていることが原因の一つではないかと推測される。

[0023] 本実施形態の袋状培養容器は、培養部がエキシマ処理又はコロナ処理により親水化処理されてなることを特徴とする。

エキシマ処理は、光源としてエキシマランプを用いる表面処理である。波長２００ｎｍ以下の紫外線は真空紫外線と呼ばれ、エキシマ処理ではこの真空紫外線の照射が行われる。エキシマランプには様々な波長の真空紫外線を照射するものがあるが、一般的には、波長１７２ｎｍのキセノンエキシマランプが使用されている。そして、培養部とランプの距離、及びステージの移動速度等を所望の大きさに設定することにより実施する。

このようなエキシマ処理をポリエチレンフィルムに施すと、ポリエチレンの表面物性が変化して、親水化される。また、エキシマ処理の処理強度が強いほど、その親水化の程度は大きくなる。エキシマ処理によれば、処理ムラがなく、均一に親水化された培養面を得ることができる。

[0024] コロナ処理は、コロナ放電照射を用いる表面処理である。例えばバッチ式コロナ処理装置を使用して、出力、電極間距離、及びステージの移動速度等を所望の大きさに設定することにより実施する。

このようなコロナ処理をポリエチレンフィルムに施すと、ポリエチレンの表面物性が変化して、親水化される。また、コロナ処理の処理強度が強いほど、その親水化の程度は大きくなる。

[0025] 本実施形態の袋状培養容器の培養部に塗布されない細胞接着因子とは、例えばラミニンなどを挙げることができる。

また、本実施形態の袋状培養容器の培養部に塗布されない細胞接着抑制剤としては、リン脂質ポリマー、ポリビニルアルコール誘導体、リン脂質・高分子複合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール

、アガロース、キトサン、ポリエチレングリコール、アルブミン等を挙げることができる。

[0026] 本実施形態の袋状培養容器は、１つ以上の注入出用ポートを備え、この注入出用ポートを介して、袋状培養容器に培地や細胞懸濁液を注入することができ、また袋状培養容器から培地や細胞懸濁液を排出することができる。なお、注入出用ポートにはチューブが接続され、チューブには培地供給容器、細胞回収容器、酵素供給容器、廃棄容器等を適宜接続することができる。

[0027] 本実施形態の袋状培養容器（培養部を除く）の材料としては、ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン系樹脂などを好適に用いることができる。例えば、ポリエチレン、エチレンとα－オレフィンの共重合体、エチレンと酢酸ビニルの共重合体、エチレンとアクリル酸やメタクリル酸共重合体と金属イオンを用いたアイオノマー等を挙げることができる。また、ポリオレフィン、スチレン系エラストマー、ポリエステル系熱可塑性エラストマー、シリコーン系熱可塑性エラストマー、シリコーン樹脂等を用いることもできる。さらに、シリコーンゴム、軟質塩化ビニル樹脂、ポリブタジエン樹脂、エチレン－酢酸ビニル共重合体、塩素化ポリエチレン樹脂、ポリウレタン系熱可塑性エラストマー、ポリエステル系熱可塑性エラストマー、シリコーン系熱可塑性エラストマー、スチレン系エラストマー、例えば、ＳＢＳ（スチレン・ブタジエン・スチレン）、ＳＩＳ（スチレン・イソプレン・スチレン）、ＳＥＢＳ（スチレン・エチレン・ブチレン・スチレン）、ＳＥＰＳ（スチレン・エチレン・プロピレン・スチレン）、ポリオレフィン樹脂、フッ素系樹脂等を用いてもよい。

[0028] 注入出用ポートの材料としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、塩化ビニル、ポリスチレン系エラストマー、ＦＥＰなどの熱可塑性樹脂等を用いることができる。

[0029] 本実施形態の袋状培養容器は、例えばポリエチレンフィルムを用いて、その少なくとも一部の領域にエキシマ処理等を施すことにより、当該領域の静的水接触角を、４９．６°以上９０．１°以下として当該領域を培養部とし

、当該ポリエチレンフィルムを袋状に配置して注入出用ポートを挟み込み、周囲をヒートシールすることなどによって形成することができる。

[0030] 以上説明したように、本実施形態の袋状培養容器によれば、多能性幹細胞から誘導されたＴ細胞などの浮遊性細胞を好適に増殖することが可能となる。

実施例

[0031] 以下、本実施形態の袋状培養容器と、培養部に親水化処理がなされていない静的水接触角が本実施形態の範囲外である袋状培養容器とを用いて、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を培養した試験について説明する。

[0032]（試験１）

培養に使用した細胞は、ｉＰＳ細胞から分化誘導され、ＣＤ３抗体及びレトロネクチンを用いて活性化されたＴ細胞である。

具体的には、京都大学ｉＰＳ細胞研究所（CiRA）から供与されたFf-I01s04株を公知の方法（WO2017/221975）に準じて分化させることによって得られたＴ細胞である。

[0033] 培養に使用した培地は、ＩＭＤＭ培地(Thermo Fisher Scientific社)に対し、ＦＢＳ（corning社）１５％、ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン溶液（Sigma-Aldrich社）１％、インスリン-トランスフェリン-セレニウム溶液（Thermo Fisher Scientific社）１％、L-アスコルビン酸 2-リン酸 セスキマグネシウム塩 水和物（Sigma-Aldrich社）５０μg/ml、ＩＬ－７（PeproTech社）１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－１５（PeproTech社）１０ｎｇ／ｍｌを加えたものを使用した。

[0034] 袋状培養容器の材料としては、ポリエチレンフィルムを使用した。袋状培養容器の培養部も同一のポリエチレンフィルムにより一体的に形成した。

そして、袋状培養容器の培養部となる領域に対し、親水化処理としてエキシマ処理又はコロナ処理を以下の条件で行った。

[0035] エキシマ処理を行うための装置としては、キセノンエキシマランプ装置（株式会社エム・ディ・コム製のエキシマ照射装置）を使用して、電圧を１２

Ｖとした。

そして、培養部とランプの距離、及びキセノンエキシマランプ装置におけるポリエチレンフィルムを配置したステージの移動速度を以下の条件としてエキシマ処理を行い、培養部の静的水接触角を測定した。

[0036] 培養部とランプの距離が４ｍｍ、キセノンエキシマランプ装置におけるポリエチレンフィルムを配置したステージの移動速度を２０ｍｍ／ｓｅｃとした場合における培養部の静的水接触角は、９０．１°であった。

また、同距離を　４ｍｍ、同ステージの移動速度を５ｍｍ／ｓｅｃとした場合における培養部の静的水接触角は、８２．０°であり、同距離を４ｍｍ、同ステージの移動速度を２ｍｍ／ｓｅｃとした場合における培養部の静的水接触角は、７７．８°であり、同距離を４ｍｍ、同ステージの移動速度を２ｍｍ／ｓｅｃとし、同処理を２回行った場合における培養部の静的水接触角は、７４．２°であった。

[0037] コロナ処理を行うための装置としては、バッチ式コロナ処理装置（春日電機株式会社製）を使用した。そして、出力を５２０Ｗ、電極間距離を５ｍｍ、バッチ式コロナ処理装置におけるポリエチレンフィルムを配置したステージの移動速度を５０ｍｍ／ｓｅｃとし、これを３回繰り返して処理した場合における培養部の静的水接触角は、４９．６°であった。

なお、これらの静的水接触角は、フィルム表面から任意に１０カ所の点を選択してそれぞれにおける静的水接触角を測定し、その平均値を算出することにより得た。

[0038] 袋状培養容器は、上記のように処理した各ポリエチレンフィルムを培養部の面積が１０ｃｍ×１０ｃｍとなるように、インパルスシーラーでシールすることによって形成した。また、このとき、ポリエチレン製のポートを挟み込んでシールを行うことにより、注入出用ポートを取り付けた。

[0039] 細胞培養は、以下の培養プロトコルにより行った。

まず、１．５×10^{6}ｃｅｌｌｓの細胞を３０ｍｌの培地に懸濁して、各袋状培養容器内に封入した。

次に、培養開始から３日後に細胞数をカウントし、それぞれの袋状培養容器内の懸濁液１５ｍｌを除去し、新たな培地を３０ｍｌ追加した。

[0040] 培養開始から５日後に細胞数をカウントし、それぞれの袋状培養容器内の懸濁液３５ｍｌを除去し、新たな培地を３０ｍｌ追加した。

培養開始から７日後に細胞数をカウントし、それぞれの袋状培養容器内の懸濁液３０ｍｌを除去し、新たな培地を３０ｍｌ追加した。

[0041] そして、培養開始から１１日後に最終の細胞数をカウントした。その結果を図２に示す。

なお、上記の培養プロトコルにおいて、途中で懸濁液を捨てている理由は、細胞密度が上がりすぎると増殖が止まってしまうため、培養部の静的水接触角による影響を適切に評価できないためである。また、図２に示される各日における播種細胞数は、懸濁液を捨てた後、袋状培養容器内に存在している細胞数を示している。

[0042] そして、細胞数をカウントした各日の間隔ごとに細胞数が何倍になったかを計算して、これらを掛け合わせることで、合計増殖倍率を求めた。

具体的には、図３に示すように、０日目の細胞数に対する３日目の細胞数の増殖倍率と、３日目の播種細胞数に対する５日目の細胞数の増殖倍率と、５日目の播種細胞数に対する７日目の細胞数の増殖倍率と、７日目の播種細胞数に対する１１日目の細胞数の増殖倍率とを算出し、これらを掛け合わせることによって、合計増殖倍率を算出した。

[0043] また、各日における増殖倍率を同様にして、それまでの各日の間隔で算出された倍率を掛け合わせることにより算出した。その結果を表すグラフを図４に示す。さらに、１１日目の増殖倍率を示すグラフを図５に示す。

[0044] これらの図に示されるように、袋状培養容器の培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下である場合、培養部に親水化処理を行っていない袋状培養容器に比較して、多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞の増殖倍率が大きく向上することが分かった。

特に、培養部の静的水接触角が７４．２°以上で、少なくとも８０．０°

以下の場合に、優れた増殖効率が示されている。

[0045] 本発明は、以上の実施形態及び実施例に限定されるものではなく、本発明の範囲内において、種々の変更実施が可能であることは言うまでもない。

例えば、上記実施形態及び実施例では、エキシマ処理の条件として特定の条件を示したが、これらに限定されるものではなく、袋状培養容器の培養部の静的水接触角が本発明の範囲内になるように処理可能な表面処理方法及び処理条件であれば、適宜変更することが可能である。

産業上の利用可能性

[0046] 本発明は、ｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞等を効率的に大量に作成する場合などに、好適に利用することが可能である。

[0047] この明細書に記載の文献及び本願のパリ優先の基礎となる日本出願明細書の内容を全てここに援用する。

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞を増殖させるための袋状培養容器であって、前記袋状培養容器の培養部がポリエチレン系樹脂により形成され、前記培養部の静的水接触角が４９．６°以上９０．１°以下であることを特徴とする袋状培養容器。

[請求項2] 前記培養部の静的水接触角が４９．６°以上８０．０°以下であることを特徴とする請求項１記載の袋状培養容器。

[請求項3] 前記培養部の静的水接触角が７４．２°以上８０．０°以下であることを特徴とする請求項１又は２記載の袋状培養容器。

[請求項4] 前記多能性幹細胞から誘導された浮遊性細胞がｉＰＳ細胞由来Ｔ細胞であることを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の袋状培養容器。

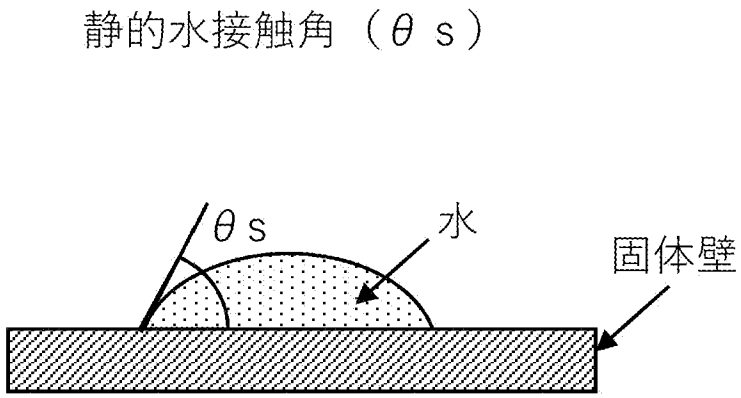
[請求項5] 前記ポリエチレン系樹脂がポリエチレン又はエチレンビニルアセテートであることを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の袋状培養容器。

[請求項6] 前記培養部がエキシマ処理又はコロナ処理により親水化処理されてなることを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の袋状培養容器。

[請求項7] 前記培養部には細胞接着因子及び細胞接着抑制剤のいずれもが塗布されていないことを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の袋状培養容器。

[請求項8] １つ以上の注入出用ポートを備えたことを特徴とする請求項１～７のいずれかに記載の袋状培養容器。

[図1]



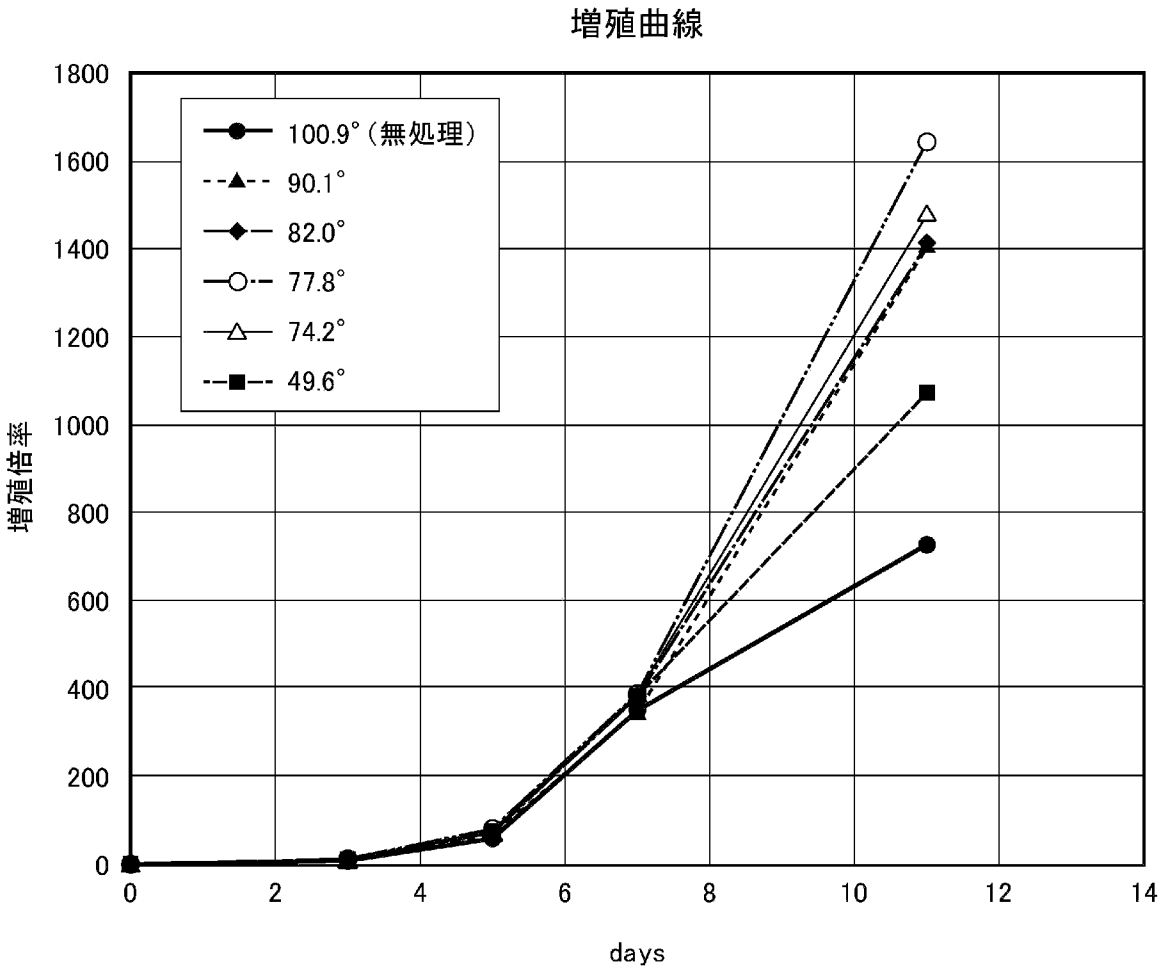
[図2]

細胞数	100.9°（無処理）	90.1°	82.0°	77.8°	74.2°	49.6°
0日目	1.4896×10^{6}	1.4896×10^{6}	1.4896×10^{6}	1.4896×10^{6}	1.4896×10^{6}	1.4896×10^{6}
3日目	17.76×10^{6}	19.95×10^{6}	19.05×10^{6}	20.91×10^{6}	18.51×10^{6}	20.67×10^{6}
3日目播種細胞数	8.88×10^{6}	9.975×10^{6}	9.525×10^{6}	10.455×10^{6}	9.255×10^{6}	10.335×10^{6}
5日目	44.55×10^{6}	50.85×10^{6}	54.00×10^{6}	60.75×10^{6}	56.25×10^{6}	56.70×10^{6}
5日目播種細胞数	9.90×10^{6}	11.30×10^{6}	12.00×10^{6}	13.50×10^{6}	12.50×10^{6}	12.60×10^{6}
7日目	57.20×10^{6}	56.40×10^{6}	62.00×10^{6}	63.20×10^{6}	62.80×10^{6}	59.20×10^{6}
7日目播種細胞数	14.30×10^{6}	14.10×10^{6}	15.50×10^{6}	15.80×10^{6}	15.70×10^{6}	14.80×10^{6}
11日目	30.00×10^{6}	58.00×10^{6}	58.40×10^{6}	68.00×10^{6}	61.20×10^{6}	44.40×10^{6}

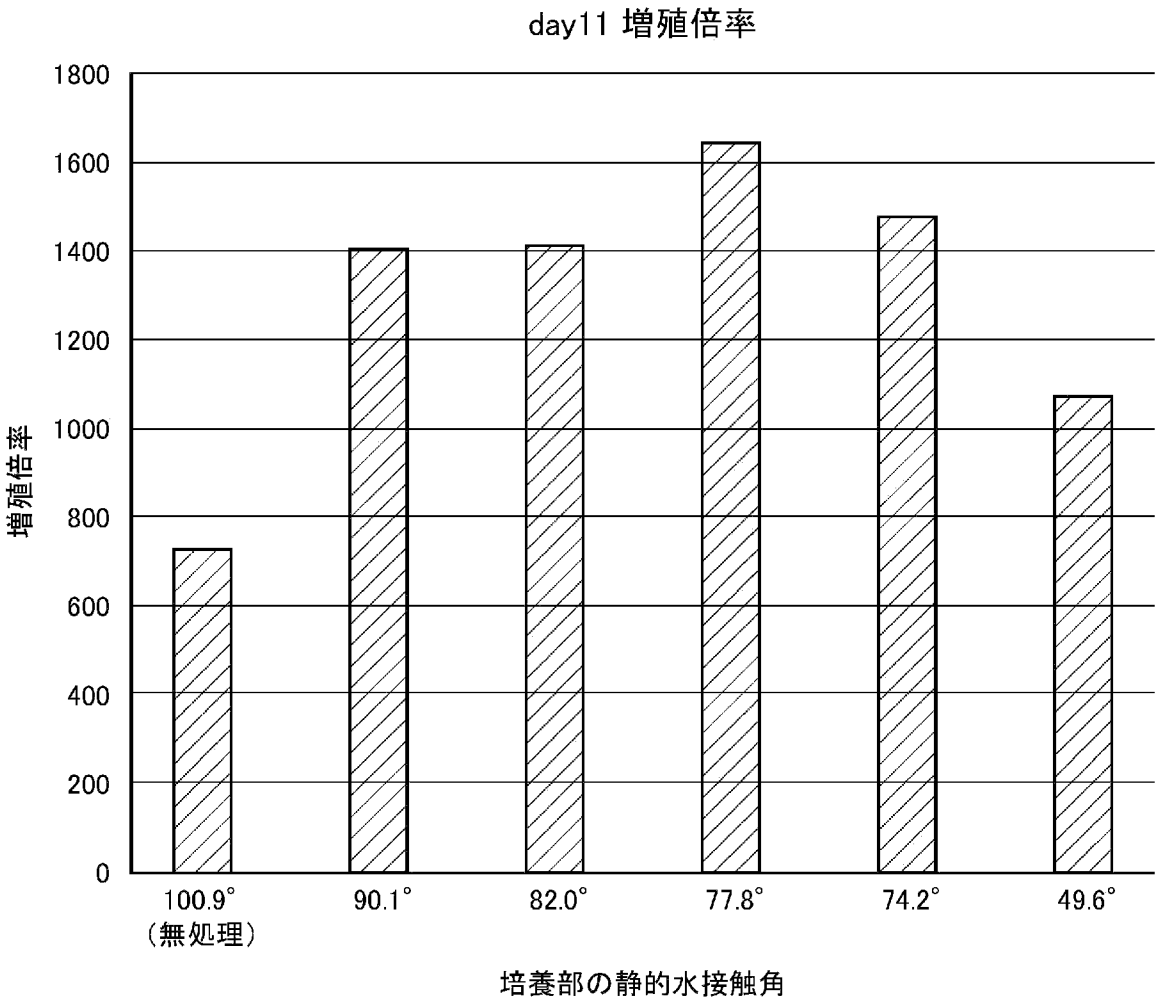
[図3]

増殖倍率	100.9°（無処理）	90.1°	82.0°	77.8°	74.2°	49.6°
0日目	1	1	1	1	1	1
3日目	12	13	13	14	12	14
5日目	60	68	73	82	76	76
7日目	346	341	375	382	379	358
11日目	725	1402	1411	1643	1479	1073

[図4]


増殖曲線
100.9°（無処理）
90.1°
82.0°
77.8°
74.2°
49.6°
増殖倍率
days
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
0
2
4
6
8
10
12
14

[図5]


day11 増殖倍率
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
増殖倍率
100.9°
（無処理）
90.1°
82.0°
77.8°
74.2°
49.6°
培養部の静的水接触角

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/008595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i
FI: C12M3/00Z

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. C12M3/00

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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.
X A	JP 2016-146777 A (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.) 18 August 2016 (2016-08-18), examples	1, 4, 5, 7, 8 2, 3, 6
X A	JP 2019-77787 A (TOYO INK SC HOLDINGS CO., LTD.) 23 May 2019 (2019-05-23), claims, paragraph [0110], examples	1, 2, 4, 5, 7, 8 3, 6
X A	JP 2019-22453 A (TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.) 14 February 2019 (2019-02-14), claims, paragraph [0029], examples	1-6, 8 7
X	JP 2019-198288 A (TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.) 21 November 2019 (2019-11-21), claims, paragraph [0032], examples	1-8

☐ 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	Date of mailing of the international search report
11 May 2021	18 May 2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/008595

JP 2016-146777 A	18 August 2016	WO 2016/129220 A1
JP 2019-77787 A	23 May 2019	(Family: none)
JP 2019-22453 A	14 February 2019	US 2020/0148992 A1 claims, paragraph [0081], examples WO 2019/021748 A1 EP 3660139 A1 CN 110997894 A
JP 2019-198288 A	21 November 2019	(Family: none)

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/008595

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
FI: C12M3/00 Z

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

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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 2016-146777 A (ダイキン工業株式会社) 18.08.2016 (2016-08-18) 実施例	1,4,5,7,8
A		2,3,6
X	JP 2019-77787 A (東洋インキＳＣホールディングス株式会社) 23.05.2019 (2019-05-23) 特許請求の範囲、［０１１０］段落、実施例	1,2,4,5,7,8
A		3,6
X	JP 2019-22453 A (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 14.02.2019 (2019-02-14) 特許請求の範囲、［００２９］段落、実施例	1-6,8
A		7
X	JP 2019-198288 A (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 21.11.2019 (2019-11-21) 特許請求の範囲、［００３２］段落、実施例	1-8

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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	国際調査報告の発送日
11.05.2021	18.05.2021

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）
上村　直子 4N 4508
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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/JP2021/008595

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-146777 A	18.08.2016	WO 2016/129220 A1	
JP 2019-77787 A	23.05.2019	（ファミリーなし）	
JP 2019-22453 A	14.02.2019	US 2020/0148992 A1 特許請求の範囲、［0081］段落、実施例 WO 2019/021748 A1 EP 3660139 A1 CN 110997894 A	
JP 2019-198288 A	21.11.2019	（ファミリーなし）	