

(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
2016年6月30日(30.06.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/104344 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085443
- (22) 国際出願日: 2015年12月18日(18.12.2015)
- (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 2014-258564 2014年12月22日(22.12.2014) JP
- (71) 出願人: 大日本印刷株式会社(DAI NIPPON PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 登山 伸人(TOYAMA Nobuhito); 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 草原 仁美(KUSAHARA Hitomi); 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 高橋 洋一(TAKAHASHI Yoichi); 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 稲月 友一(INAZUKI Yuichi); 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 三好 洋美(MIYOSHI Hiromi); 〒

3510198 埼玉県和光市広沢2番1号国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 山形 豊(YAMAGATA Yutaka); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

- (74) 代理人: 太田 昌孝, 外(OTA Masataka et al.); 〒1010043 東京都千代田区神田富山町2番地2 松井ビル4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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING UNDIFFERENTIATED CELLS AND SUBSTRATE FOR SEPARATING UNDIFFERENTIATED CELLS

(54) 発明の名称: 未分化細胞の分離方法及び未分化細胞分離用基板

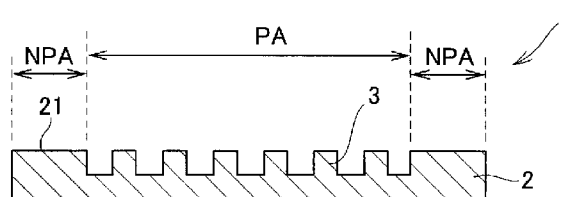


FIG. 1

(57) Abstract: A method for separating undifferentiated cells from a cell mixture containing the undifferentiated cells with differentiated cells, said method comprising a step for using a nano convex/concave structure in which a plurality of pillar patterns are regularly arranged and contacting the cell mixture with these pillar patterns, wherein the gaps G among the pillar patterns and the dimension D thereof have such a relationship that either the undifferentiated cells or the differentiated cells easily adhere to the pillar patterns while the other cells hardly adhere to the pillar patterns. According to this method, differentiated cells can be selectively and easily separated from a cell mixture containing undifferentiated cells with the differentiated cells.

(57) 要約: 未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から未分化細胞を分離する方法は、複数のピラー状パターンが規則性を有して配列されてなるナノ凹凸構造体を用い、複数のピラー状パターンに細胞混合物を接触させる工程を含み、ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、未分化細胞及び分化細胞のうちのいずれか一方がピラー状パターンに接着し易く、他方がピラー状パターンに接着し難い関係を具備する。これにより、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から分化細胞を選択的に、かつ容易に分離することができる。



WO 2016/104344 A1

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))

明 細 書

発明の名称：未分化細胞の分離方法及び未分化細胞分離用基板 技術分野

[0001] 本発明は、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から当該未分化細胞を分離する方法及び当該未分化細胞を分離するために用いられる基板に関する。

背景技術

[0002] 体性幹細胞、i P S細胞、E S細胞等に代表される幹細胞は、神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞等の様々な機能を有する細胞への分化能を有する。そのため、幹細胞を分化誘導させることで得られる神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞等を用いて生体の細胞、組織、器官等を再構築する再生医療分野への応用が期待されている。

[0003] 幹細胞の再生医療分野への応用研究にあたり、幹細胞と、当該幹細胞から分化誘導した分化細胞（神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞等）とを含む細胞混合物から、未分化の幹細胞を分離・取得するのが望ましい場合がある。未分化細胞を分化誘導させる際に、分化細胞が混在していると、未分化細胞の分化誘導の効率が低下することがある。また、そのようにして分化誘導した細胞を、例えば組織形成に使用する場合、組織形成不全が起こるおそれがある。そのため、当該細胞混合物から分化細胞を除去し、未分化細胞を分離・取得することが重要となる。

[0004] 一方で、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物を使用した組織形成が可能であるとの報告もある（非特許文献1参照）。この場合において、細胞混合物中における未分化細胞の細胞密度が適切な範囲に調整されていることが重要となる。

[0005] 従来、所定の目的細胞を含む細胞混合物から当該目的細胞を分離する方法として、細胞混合物に含まれる目的細胞とその他の細胞との大きさの違いに着目し、当該目的細胞を捕捉可能なフィルタを備える分離装置を用いて分離

する方法（特許文献 1 参照）、分離目的細胞に識別ラベル等を付加し、当該識別ラベル等を検出することにより目的細胞を分離する方法（特許文献 2，特許文献 3，非特許文献 2 参照）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開 2 0 0 3 － 2 7 4 9 2 3 号公報

特許文献2：特開 2 0 0 5 － 2 7 5 7 9 号公報

特許文献3：特開 2 0 1 1 － 8 7 4 7 5 号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Takabe et al., "Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation", Cell Stem Cell, Vol. 16, pp. 556-565, 2015

非特許文献2：Kuanyin K. Lin et al., "Detection of Hematopoietic Stem Cells by Flow Cytometry", METHODS IN CELLS BIOLOGY, Vol. 103, 2011

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 特許文献 1 に記載の分離方法は、細胞混合物に含まれる目的細胞の大きさと、細胞混合物に含まれる他の細胞の大きさに応じて、目的細胞を捕捉可能なフィルタを用いることにより、当該目的細胞を分離する方法である。したがって、細胞混合物に含まれる所定の目的細胞の大きさが、当該細胞混合物に含まれる他の細胞の大きさと異なる場合には、当該目的細胞を分離することができる。しかしながら、未分化細胞と分化細胞との大きさは実質的に同一であるため、上記分離方法を用いても、上記細胞混合物から未分化細胞を完全に分離・取得することができず、一方（例えば未分化細胞）の細胞密度を向上させることも困難であるという問題がある。

[0009] また、特許文献 2、特許文献 3 及び非特許文献 2 に記載の分離方法を用いて細胞混合物中の未分化細胞を分離するためには、細胞混合物中の未分化細胞

胞に識別ラベル等を付与する必要がある、当該識別ラベル等の検出により未分化細胞を分離することが可能な方法ではある。しかし、分離された未分化細胞を分化誘導して得られる分化細胞を用いて組織形成を行うためには、分離後の未分化細胞から識別ラベル等を除去しなければならない場合があるが、識別ラベル等の未分化細胞への付与及び除去操作により、当該未分化細胞に損傷を与えてしまうおそれがある。また、かかる識別ラベル等の付与・除去作業が煩雑であるという問題もある。

[0010] このような課題に鑑みて、本発明は、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から未分化細胞を選択的に、容易に、かつ低侵襲で分離することのできる方法及び当該分離方法に用いられる未分化細胞分離用基板を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するために、本発明は、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から前記未分化細胞を分離する方法であって、複数のピラー状パターンが規則性を有して配列されてなるナノ凹凸構造体を用い、前記複数のピラー状パターンに前記細胞混合物を接触させる工程を含み、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、前記未分化細胞及び前記分化細胞のうちのいずれか一方が前記ピラー状パターンに接着し易く、他方が前記ピラー状パターンに接着し難い関係を具備することを特徴とする未分化細胞の分離方法を提供する（発明1）。

[0012] 本発明者らの鋭意研究により、ナノ凹凸構造体に複数のピラー状パターンが規則性を有して配列されていることで、当該ナノ凹凸構造体の複数のピラー状パターンが配列されている領域において、未分化細胞と分化細胞とのピラー状パターンに対する接着性に違いが生じることが見出された。よって、上記発明（発明1）によれば、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から未分化細胞を選択的に、容易に、かつ低侵襲で分離することができる。

[0013] なお、本発明において、ピラー状パターンの間隔とは、「一のピラー状パターンの平面視中心と、それに隣接する他のピラー状パターンの平面視中心

とを結ぶ直線長さからピラー状パターンの寸法を差し引いた長さ」を意味し、ピラー状パターンの寸法とは、「平面視略正形状のピラー状パターンであれば当該正方形の一辺の長さ、平面視略円形状のピラー状パターンであれば当該円の直径」を意味する。また、本発明において「分離」とは、少なくとも2種の細胞（例えば、未分化細胞及び分化細胞）を含む細胞混合物から、いずれか一方の細胞（例えば、未分化細胞）を完全に分離・取得することに限らず、当該細胞混合物中におけるいずれか一方の細胞（例えば、未分化細胞）の細胞密度を高めることをも意味するものとする。

[0014] 上記発明（発明1）においては、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、いずれも50～500nmの範囲内であるのが好ましく（発明2）、いずれも100～250nmの範囲内であるのが好ましい（発明3）。

[0015] 上記発明（発明1～3）において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記（1-1）～（1-7）のいずれかの関係を有していてもよい（発明4）。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 187.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-5)$$

$$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-6)$$

$$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-7)$$

[0016] 上記発明（発明１～３）において、前記ピラー状パターンの間隔 G と寸法 D とが、下記（２－１）～（２－７）のいずれかの関係を有していてもよい（発明５）。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (2-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \quad \cdots (2-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm} \text{ 又は } 187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \cdots (2-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm} \text{ 又は } 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (2-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \cdots (2-5)$$

$$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}; 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (2-6)$$

$$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}; 162.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \cdots (2-7)$$

[0017] 上記発明（発明１～３）において、前記ピラー状パターンの間隔 G と寸法 D とが、下記（３－１）～（３－７）のいずれかの関係を有していてもよい（発明６）。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (3-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \quad \cdots (3-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm} \text{ 又は } 187.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (3-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm} \text{ 又は } 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (3-4)$$

$$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}; 212.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \quad \dots (3-5)$$

$$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 112.5 \text{ nm} \text{ 又は } 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (3-6)$$

$$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \text{ 又は } 162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \quad \dots (3-7)$$

[0018] 上記発明（発明１～３）において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記（４－１）～（４－７）のいずれかの関係を有していてもよい（発明７）。

$$100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-1)$$

$$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-2)$$

$$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-3)$$

$$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-4)$$

$$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 187.5 \text{ nm} \text{ 又は } 212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-5)$$

$$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \text{ 又は } 212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-6)$$

$$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 137.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (4-7)$$

[0019] 上記発明（発明１～３）において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記（５－１）～（５－４）のいずれかの関係を有していてもよい（発明８）。

$$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}; 187.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm} \quad \dots (5-1)$$

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm} ; 112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \dots (5-2)$

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm} ; 112.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm} \dots (5-3)$

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm} ; 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \dots (5-4)$

[0020] 上記発明（発明１～６）において、前記未分化細胞が、マウスに由来する間葉系幹細胞であり、前記分化細胞が、前記未分化細胞から分化した骨芽細胞であるのが好ましい（発明９）。

[0021] 上記発明（発明１～５、７、８）において、前記未分化細胞が、ヒトに由来する間葉系幹細胞であるのが好ましい（発明１０）。

[0022] 上記発明（発明１～１０）において、前記凹凸構造体は、前記複数のピラー状パターンが正三角形格子の各格子点上に配列されていてもよいし（発明１１）、前記複数のピラー状パターンが方形格子の各格子点上に配列されていてもよい（発明１２）。

[0023] また、本発明は、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から前記未分化細胞を分離するために用いられる未分化細胞分離用基板であって、第１面及び前記第１面に対向する第２面を有する基材と、前記基材の前記第１面に規則性を有して配列形成されてなる複数のピラー状ナノパターンとを備え、前記ピラー状ナノパターンの間隔Ｇと寸法Ｄとが、前記未分化細胞及び前記分化細胞のうちのいずれか一方が前記ピラー状ナノパターンに接着し易く、他方が前記ピラー状ナノパターンに接着し難い関係を具備することを特徴とする未分化細胞分離用基板を提供する（発明１３）。

[0024] 上記発明（発明１３）において、前記ピラー状ナノパターンの間隔Ｇと寸法Ｄとが、いずれも５０～５００ｎｍの範囲内であるのが好ましく（発明１４）、前記ピラー状パターンの間隔Ｇと寸法Ｄとが、いずれも１００～２５０ｎｍの範囲内であるのが好ましい（発明１５）。

[0025] 上記発明（発明１３～１５）において、前記ピラー状パターンの間隔Ｇと

寸法Dとが、下記(1-1)～(1-7)のいずれかの関係を有していてもよい(発明16)。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 187.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-5)$$

$$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-6)$$

$$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (1-7)$$

[0026] 上記発明(発明13～15)において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(2-1)～(2-7)のいずれかの関係を有していてもよい(発明17)。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (2-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \quad \dots (2-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm} \text{ 又は } 187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \dots (2-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm} \text{ 又は } 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (2-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$$

$m \cdots (2-5)$

$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm} ; 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$

$\cdots (2-6)$

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm} ; 162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm}$

$\cdots (2-7)$

[0027] 上記発明（発明13～15）において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記（3-1）～（3-7）のいずれかの関係を有していてもよい（発明18）。

$100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm} ; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \cdots (3-1)$

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm} ; 112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \cdots (3-2)$

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm} ; 100 \text{ nm} \leq D < 162.5 \text{ nm}$ 又は
 $187.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \cdots (3-3)$

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm} ; 162.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$ 又は
 $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \cdots (3-4)$

$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm} ; 212.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \cdots (3-5)$

$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm} ; 100 \text{ nm} \leq D < 112.5 \text{ nm}$ 又は
 $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \cdots (3-6)$

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm} ; 100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ 又は
 $162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \cdots (3-7)$

[0028] 上記発明（発明13～15）において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記（4-1）～（4-7）のいずれかの関係を有していてもよい（発明19）。

$100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm} ; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \cdots (4-1)$

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm} ; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$

… (4-2)

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$

… (4-3)

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$

… (4-4)

$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 187.5 \text{ nm}$ 又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (4-5)

$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ 又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (4-6)

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $137.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (4-7)

[0029] 上記発明(発明13~15)において、前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(5-1)~(5-4)のいずれかの関係を有していてもよい(発明20)。

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}$; $187.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$ … (5-1)

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ … (5-2)

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$ … (5-3)

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (5-4)

[0030] 上記発明(発明13~18)において、前記未分化細胞が、マウスに由来する間葉系幹細胞であり、前記分化細胞が、前記未分化細胞から分化した骨芽細胞であるのが好ましい(発明21)。

[0031] 上記発明(発明13~17, 19, 20)において、前記未分化細胞が、ヒトに由来する間葉系幹細胞であるのが好ましい(発明22)。

[0032] 上記発明(発明13~22)において、前記複数のピラー状パターンは、

正三角形格子の各格子点上に配列されていてもよいし（発明２３）、方形格子の各格子点上に配列されていてもよい（発明２４）。

発明の効果

[0033] 本発明によれば、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から分化細胞を選択的に、容易に、かつ低侵襲で分離することのできる方法及び当該分離方法に用いられる未分化細胞分離用基板を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]図１は、本発明の一実施形態に係る未分化細胞分離用基板の概略構成を示す切断端面図である。

[図2]図２は、本発明の一実施形態に係る未分化細胞分離用基板の複数のピラー状パターンの配列構成の一の態様を概略的に示す平面図である。

[図3]図３は、本発明の一実施形態に係る未分化細胞分離用基板の複数のピラー状パターンの配列構成の他の態様を概略的に示す平面図である。

[図4]図４は、本発明の一実施形態に係る未分化細胞分離用基板の製造工程を切断端面図にて示す工程フロー図である。

[図5]図５は、試験例１及び２において用いた試験用未分化細胞分離用基板のピラー状パターンが形成された各領域を示す平面図である。

[図6]図６は、試験例１の評価試験において撮像した領域 P A₃₄近傍のマウス由来間葉系幹細胞の画像及びマウス由来間葉系幹細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

[図7]図７は、試験例２の評価試験において撮像した領域 P A₃₄近傍のマウス由来骨芽細胞の画像及びマウス由来骨芽細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

[図8]図８は、試験例３の評価試験において撮像した領域 P A₃₄近傍のヒト由来間葉系幹細胞の画像及びヒト由来間葉系幹細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

[図9]図９は、試験例４の評価試験において撮像した領域 P A₃₄近傍のヒト由来骨芽細胞の画像及びヒト由来骨芽細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

。

[図10]図10は、試験例5の評価試験において撮像した領域P A₂₄近傍のヒト由来脂肪前駆細胞の画像及びヒト由来脂肪前駆細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

[図11]図11は、試験例6の評価試験において撮像した領域P A₂₄近傍のヒト由来軟骨細胞の画像及びヒト由来軟骨細胞の移動軌跡を示す顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0035] 本発明の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。

図1は、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板の概略構成を示す切断端面図であり、図2は、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板の複数のピラー状パターンの配列構成の一の態様を概略的に示す平面図であり、図3は、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板の複数のピラー状パターンの配列構成の他の態様を概略的に示す平面図である。

[0036] 図1に示すように、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板1は、基部2と、基部2の主面21に形成されてなるピラー状パターン3とを有するナノ凹凸構造体により構成され、分化細胞と未分化細胞とを含む細胞混合物から、未分化細胞を分離するために用いられる。

[0037] 細胞混合物に含まれる未分化細胞及び分化細胞は、接着性を有する細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば、未分化細胞として体性幹細胞、iPS細胞、ES細胞等を挙げることができ、分化細胞として上記未分化細胞から分化誘導した神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞等を挙げることができる。これらのうち、特に、未分化細胞がマウスに由来する間葉系幹細胞であって、分化細胞が当該未分化細胞から分化誘導させた骨芽細胞である場合、未分化細胞がヒトに由来する間葉系幹細胞であって、分化細胞が当該未分化細胞から分化誘導させた骨芽細胞、脂肪前駆細胞又は軟骨細胞である場合、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板1を用いることで、より効率的に未分化細胞を分離することができる。

[0038] 基部2を構成する材料としては、石英ガラス、合成石英ガラス、ソーダガラス、蛍石、フッ化カルシウム、フッ化マグネシウム、アクリルガラス、ホウケイ酸ガラス等のガラス材料；ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、その他ポリオレフィン等の樹脂材料等の透明材料等を用いることができる。特に、基部2を構成する材料として上記透明材料を用いると、未分化細胞のピラー状パターン3への接着状態を顕微鏡などで観察しながら未分化細胞の分離操作を行うことができるため好ましい。

[0039] なお、本実施形態において「透明」とは、波長190～800nmの光を対象物（本実施形態においては基部2）の片側から照射した際、照射された側とは反対側へ光が到達することを意味する。好適な基準を透過率で示すならば20%以上、好ましくは50%以上、特に好ましくは80%以上である。

[0040] 基部2の形状は、特に限定されるものではなく、例えば、平面視略矩形状、平面視略円形状等を挙げることができる。また、平面視における基部2の大きさや、基部2の厚さも特に限定されるものではなく、未分化細胞分離用基板1の用途等に応じて適宜設定され得る。例えば、細胞混合物から未分化細胞を分離するために、ディッシュ等に未分化細胞分離用基板1を収容し、当該ディッシュ内で未分化細胞分離用基板1と細胞混合物とを接触させる場合、未分化細胞分離用基板1の平面視における大きさは、当該ディッシュ内に収容可能な大きさに設定され得る。同様に、未分化細胞分離用基板1の厚さも、上記ディッシュ内に未分化細胞分離用基板1を載置したときに、そのピラー状パターン3と細胞混合物とが接触可能な厚さに設定され得る。

[0041] ピラー状パターン3は、平面視略円形又は略矩形であり、基部2と一体的な構造物として、基部2の主面21上の所定の領域PA内に所定の規則性を有して配列するように形成されている。

[0042] 具体的には、図2に示すように、平面視略矩形のピラー状パターン3が、正三角形状の格子Grの各格子点上に配列されていてもよいし、図3に示すように、方形状の格子Grの各格子点上に配列されていてもよい。

[0043] 本実施形態において、上記ピラー状パターン3が形成される所定の領域P Aは、基部2の主面2 1上における上記ピラー状パターン3が形成されない領域N P Aの大きさが可能な限り小さくなるように、当該主面2 1上に設定されているのが好ましい。後述するように、本実施形態におけるピラー状パターン3がナノレベルの間隔G及び寸法Dを有すること、特にそれらが所定の関係を具備することで、細胞混合物中の未分化細胞と分化細胞との接着性の違いが発現され、未分化細胞及び分化細胞のうちのいずれか一方は当該ピラー状パターン3に相対的に接着し易く、他方は当該ピラー状パターン3に相対的に接着し難い。一方、ピラー状パターン3が形成されない領域N P Aには、未分化細胞及び分化細胞がともに接着する。すなわち、ピラー状パターン3が形成されない領域N P Aが大きいと、未分化細胞を効率的に分離することができないおそれがある。したがって、ピラー状パターン3が形成されない領域N P Aを可能な限り小さくすることで、未分化細胞を効率的に分離することができる。

[0044] 本実施形態において、ピラー状パターン3の間隔G及び寸法Dは、いずれも細胞接着複合体と同等サイズの50～500nmの範囲内であるのが好ましく、100～250nmの範囲内であるのがより好ましい。

[0045] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞との組み合わせが、マウス由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、ヒト由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、ヒト由来間葉系幹細胞及び脂肪前駆細胞、又はヒト由来間葉系幹細胞及び軟骨細胞である場合、好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(1-1)～(1-7)のいずれかの関係を具備する。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-3)$$

$$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-4)$$

$$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 187.5 \text{ nm}$$

又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-5)$

$$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$$

又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-6)$

$$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-7)$$

[0046] より好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(1-1')～(1-7')

のいずれかの関係を具備する。

$$100 \text{ nm} \leq G \leq 110 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-1')$$

$$115 \text{ nm} \leq G \leq 135 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-2')$$

$$140 \text{ nm} \leq G \leq 160 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-3')$$

$$165 \text{ nm} \leq G \leq 185 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-4')$$

$$190 \text{ nm} \leq G \leq 210 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 185 \text{ nm} \text{ 又は } 215 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-5')$$

$$215 \text{ nm} \leq G < 235 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 135 \text{ nm} \text{ 又は } 215 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-6')$$

$$240 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-7')$$

[0047] さらに好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(1-1'')～(1-7'')

のいずれかの関係を具備する。

$$100 \text{ nm} \leq G \leq 105 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \dots (1-1'')$$

$$120\text{ nm} \leq G \leq 130\text{ nm}; 120\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-2'')$$

$$145\text{ nm} \leq G \leq 155\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-3'')$$

$$170\text{ nm} \leq G \leq 180\text{ nm}; 120\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-4'')$$

$$195\text{ nm} \leq G \leq 205\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 180\text{ nm} \text{ 又は } 220\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-5'')$$

$$220\text{ nm} \leq G \leq 230\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 130\text{ nm} \text{ 又は } 220\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-6'')$$

$$245\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (1-7'')$$

[0048] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞との組み合わせが、マウス由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、並びにヒト由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、ヒト由来間葉系幹細胞及び脂肪前駆細胞、又はヒト由来間葉系幹細胞及び軟骨細胞である場合、好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(2-1)～(2-7)のいずれかの関係を具備する。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (2-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \quad \cdots (2-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm} \text{ 又は } 187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \cdots (2-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm} \text{ 又は } 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \cdots (2-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm} \quad \cdots (2-5)$$

$$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}; 237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$$

… (2-6)

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm} ; 162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm}$

… (2-7)

[0049] より好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(2-1') ~ (2-7')

') のいずれかの関係を具備する。

$100 \text{ nm} \leq G \leq 110 \text{ nm} ; 115 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (2-1')

$115 \text{ nm} \leq G \leq 135 \text{ nm} ; 115 \text{ nm} \leq D \leq 135 \text{ nm}$ … (2-2')

$140 \text{ nm} \leq G \leq 160 \text{ nm} ; 115 \text{ nm} \leq D \leq 160 \text{ nm}$ 又は $190 \text{ nm} \leq D < 235 \text{ nm}$ … (2-3')

$165 \text{ nm} \leq G \leq 185 \text{ nm} ; 165 \text{ nm} \leq D \leq 210 \text{ nm}$ 又は $240 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (2-4')

$190 \text{ nm} \leq G \leq 210 \text{ nm} ; 215 \text{ nm} \leq D \leq 235 \text{ nm}$ … (2-5')

$215 \text{ nm} \leq G \leq 235 \text{ nm} ; 240 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (2-6')

$240 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm} ; 165 \text{ nm} \leq D \leq 235 \text{ nm}$ … (2-7')

[0050] さらに好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(2-1'') ~ (2-7'')

' ') のいずれかの関係を具備する。

$100 \text{ nm} \leq G \leq 105 \text{ nm} ; 120 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ … (2-1'')

$120 \text{ nm} \leq G \leq 130 \text{ nm} ; 120 \text{ nm} \leq D \leq 130 \text{ nm}$ … (2-2'')

$145 \text{ nm} \leq G \leq 155 \text{ nm} ; 120 \text{ nm} \leq D \leq 155 \text{ nm}$ 又は $195 \text{ nm} \leq D \leq 230 \text{ nm}$ … (2-3'')

$170 \text{ nm} \leq G \leq 180 \text{ nm} ; 170 \text{ nm} \leq D \leq 205 \text{ nm}$ 又は 245 nm

$$m \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (2-4'')$$

$$195 \text{ nm} \leq G \leq 205 \text{ nm}; 220 \text{ nm} \leq D \leq 230 \text{ nm} \quad \cdots (2-5'')$$

$$220 \text{ nm} \leq G \leq 230 \text{ nm}; 245 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (2-6'')$$

$$245 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 170 \text{ nm} \leq D \leq 230 \text{ nm} \quad \cdots (2-7'')$$

[0051] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞との組み合わせが、マウス由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞である場合、好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(3-1)～(3-7)のいずれかの関係を具備する。

$$100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-1)$$

$$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \quad \cdots (3-2)$$

$$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 162.5 \text{ nm} \text{ 又は } 187.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-3)$$

$$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}; 162.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm} \text{ 又は } 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-4)$$

$$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}; 212.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \quad \cdots (3-5)$$

$$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 112.5 \text{ nm} \text{ 又は } 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-6)$$

$$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \text{ 又は } 162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm} \quad \cdots (3-7)$$

[0052] より好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(3-1')～(3-7')のいずれかの関係を具備する。

$$100 \text{ nm} \leq G \leq 110 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-1')$$

$$115 \text{ nm} \leq G \leq 135 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 135 \text{ nm} \quad \cdots (3-2')$$

$$140 \text{ nm} \leq G \leq 160 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 160 \text{ nm} \text{ 又は } 190 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-3')$$

$$165 \text{ nm} \leq G \leq 185 \text{ nm}; 165 \text{ nm} \leq D \leq 210 \text{ nm} \text{ 又は } 240 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-4')$$

$$190 \text{ nm} \leq G \leq 210 \text{ nm}; 215 \text{ nm} \leq D \leq 235 \text{ nm} \quad \cdots (3-5')$$

$$215 \text{ nm} \leq G \leq 235 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 110 \text{ nm} \text{ 又は } 240 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-6')$$

$$240 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 135 \text{ nm} \text{ 又は } 165 \text{ nm} \leq D \leq 235 \text{ nm} \quad \cdots (3-7')$$

[0053] さらに好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(3-1'')~(3-7'')のいずれかの関係を具備する。

$$100 \text{ nm} \leq G \leq 105 \text{ nm}; 120 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-1'')$$

$$120 \text{ nm} \leq G \leq 130 \text{ nm}; 120 \text{ nm} \leq D \leq 130 \text{ nm} \quad \cdots (3-2'')$$

$$145 \text{ nm} \leq G \leq 155 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 155 \text{ nm} \text{ 又は } 195 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-3'')$$

$$170 \text{ nm} \leq G \leq 180 \text{ nm}; 170 \text{ nm} \leq D \leq 205 \text{ nm} \text{ 又は } 245 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-4'')$$

$$195 \text{ nm} \leq G \leq 205 \text{ nm}; 220 \text{ nm} \leq D \leq 230 \text{ nm} \quad \cdots (3-5'')$$

$$220 \text{ nm} \leq G \leq 230 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 105 \text{ nm} \text{ 又は } 245 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (3-6'')$$

$$245 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 100 \text{ nm} \leq D \leq 130 \text{ nm} \text{ 又は } 170 \text{ nm} \leq D \leq 230 \text{ nm} \quad \cdots (3-7'')$$

[0054] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞との組み合わせが、ヒト由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、ヒト由来間葉系幹細胞及び脂肪前駆細胞、又はヒト由来間葉系幹細胞及び軟骨細胞である場合、好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(4-1)～(4-7)のいずれかの関係を具備する。

$$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-1)$$

$$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-2)$$

$$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-3)$$

$$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}; 112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-4)$$

$$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 187.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-5)$$

$$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm} \text{ 又は } 212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-6)$$

$$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}; 137.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-7)$$

[0055] より好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(4-1')～(4-7')のいずれかの関係を具備する。

$$100\text{ nm} \leq G \leq 110\text{ nm}; 100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-1')$$

$$115\text{ nm} \leq G \leq 135\text{ nm}; 115\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-2')$$

$$140\text{ nm} \leq G \leq 160\text{ nm}; 115\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-3')$$

$$165\text{ nm} \leq G \leq 185\text{ nm}; 115\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm} \quad \dots (4-4')$$

$190\text{ nm} \leq G \leq 210\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 185\text{ nm}$ 又は $215\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-5')

$215\text{ nm} \leq G \leq 235\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 135\text{ nm}$ 又は $215\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-6')

$240\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $140\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-7')

[0056] さらに好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(4-1'')~(4-7'')のいずれかの関係を具備する。

$100\text{ nm} \leq G \leq 105\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-1'')

$120\text{ nm} \leq G \leq 130\text{ nm}$; $120\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-2'')

$145\text{ nm} \leq G \leq 155\text{ nm}$; $120\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-3'')

$170\text{ nm} \leq G \leq 180\text{ nm}$; $120\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-4'')

$195\text{ nm} \leq G \leq 205\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 180\text{ nm}$ 又は $220\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-5'')

$220\text{ nm} \leq G \leq 230\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 130\text{ nm}$ 又は $220\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-6'')

$245\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $145\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (4-7'')

[0057] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞との組み合わせが、ヒト由来間葉系幹細胞及び骨芽細胞、ヒト由来間葉系幹細胞及び脂肪前駆細胞、並びにヒト由来間葉系幹細胞及び軟骨細胞である場合、好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(5-1)~(5-4)のいずれかの関係を具備する。

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $187.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm}$... (5-1)

$$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm} \quad \cdots (5-2)$$

$$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}; 112.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm} \quad \cdots (5-3)$$

$$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (5-4)$$

[0058] より好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(5-1')～(5-4')

$$115 \text{ nm} \leq G \leq 135 \text{ nm}; 190 \text{ nm} \leq D \leq 210 \text{ nm} \quad \cdots (5-1')$$

$$140 \text{ nm} \leq G \leq 160 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 135 \text{ nm} \quad \cdots (5-2')$$

$$165 \text{ nm} \leq G \leq 185 \text{ nm}; 115 \text{ nm} \leq D \leq 210 \text{ nm} \quad \cdots (5-3')$$

$$240 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 240 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (5-4')$$

[0059] さらに好ましくは、上記間隔G及び寸法Dは、下記(5-1'')～(5-4'')

$$120 \text{ nm} \leq G \leq 130 \text{ nm}; 195 \text{ nm} \leq D \leq 205 \text{ nm} \quad \cdots (5-1'')$$

$$145 \text{ nm} \leq G \leq 155 \text{ nm}; 120 \text{ nm} \leq D \leq 130 \text{ nm} \quad \cdots (5-2'')$$

$$170 \text{ nm} \leq G \leq 180 \text{ nm}; 120 \text{ nm} \leq D \leq 205 \text{ nm} \quad \cdots (5-3'')$$

$$245 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}; 245 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm} \quad \cdots (5-4'')$$

[0060] ピラー状パターン3の間隔G及び寸法Dが上記(1-1)～(1-7)のいずれかの関係、好ましくは上記(1-1')～(1-7')のいずれかの

関係、より好ましくは上記（ $1-1''$ ）～（ $1-7''$ ）のいずれかの関係を具備することで、いずれか一方の細胞（未分化細胞又は分化細胞）がピラー状パターン３に相対的に接着し易く、他方の細胞（分化細胞又は未分化細胞）はピラー状パターン３に相対的に接着し難くなる。

[0061] ピラー状パターン３の間隔 G 及び寸法 D が上記（ $2-1$ ）～（ $2-7$ ）のいずれかの関係、好ましくは上記（ $2-1'$ ）～（ $2-7'$ ）のいずれかの関係、より好ましくは上記（ $2-1''$ ）～（ $2-7''$ ）のいずれかの関係を具備することで、細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞とが、マウス由来のものであっても、ヒト由来のものであっても、いずれか一方の細胞（未分化細胞又は分化細胞）がピラー状パターン３に相対的に接着し易く、他方の細胞（分化細胞又は未分化細胞）はピラー状パターン３に相対的に接着し難くなり、汎用性が高くなる。

[0062] 細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞とがマウス由来のものである場合、ピラー状パターン３の間隔 G 及び寸法 D が上記（ $3-1$ ）～（ $3-7$ ）のいずれかの関係、好ましくは上記（ $3-1'$ ）～（ $3-7'$ ）のいずれかの関係、より好ましくは上記（ $3-1''$ ）～（ $3-7''$ ）のいずれかの関係を具備することで、未分化細胞がピラー状パターン３に相対的に接着し易く、分化細胞がピラー状パターン３に相対的に接着し難くなる。

[0063] 細胞混合物に含まれる未分化細胞がヒト由来間葉系幹細胞であって、分化細胞がそれから分化誘導された骨芽細胞、脂肪前駆細胞又は軟骨細胞である場合、ピラー状パターン３の間隔 G 及び寸法 D が上記（ $4-1$ ）～（ $4-7$ ）のいずれかの関係、好ましくは上記（ $4-1'$ ）～（ $4-7'$ ）のいずれかの関係、より好ましくは上記（ $4-1''$ ）～（ $4-7''$ ）のいずれかの関係を具備することで、いずれか一方の細胞（未分化細胞又は分化細胞）がピラー状パターン３に相対的に接着し易く、他方の細胞（分化細胞又は未分化細胞）がピラー状パターン３に相対的に接着し難くなる。

[0064] 特に、ピラー状パターン３の間隔 G 及び寸法 D が上記（ $5-1$ ）～（ $5-4$ ）のいずれかの関係、好ましくは上記（ $5-1'$ ）～（ $5-4'$ ）のいずれ

れかの関係、より好ましくは上記（ $5-1''$ ）～（ $5-4''$ ）のいずれかの関係を具備することで、細胞混合物に含まれる未分化細胞がヒト由来間葉系幹細胞であって、分化細胞がそれから分化誘導された骨芽細胞、脂肪前駆細胞及び軟骨細胞のいずれであっても、いずれか一方の細胞（未分化細胞又は分化細胞）がピラー状パターン3に相対的に接着し易く、他方の細胞（分化細胞又は未分化細胞）がピラー状パターン3に相対的に接着し難くなり、汎用性が高くなる。

[0065] このように、細胞混合物に含まれる未分化細胞と分化細胞とのピラー状パターン3に対する接着性の違いを利用して、細胞混合物とピラー状パターン3とを接触させるだけで、当該ピラー状パターン3に相対的に接着し難い細胞を、培養液中に浮遊させることができる。目的とする細胞がピラー状パターン3に相対的に接着し易い細胞である場合、ピラー状パターン3上に残存する当該細胞を容易に分離することができる。一方、目的とする細胞がピラー状パターン3に相対的に接着し難い細胞である場合、培養液を回収することで当該細胞を分離することができる。

[0066] なお、本実施形態において、ピラー状パターン3の間隔Gとは、「一のピラー状パターン3の平面視中心Cと、それに最近接の他のピラー状パターン3の平面視中心Cとを結ぶ直線長さLからピラー状パターンの寸法Dを差し引いた長さ」を意味し、ピラー状パターン3の寸法Dとは、「平面視略正形状のピラー状パターン3であれば当該正方形の一辺の長さ、平面視略円形状のピラー状パターン3であれば当該円の直径」を意味する。

[0067] ピラー状パターン3の高さ（アスペクト比）は、特に限定されるものではなく、ピラー状パターン3の寸法Dに応じて、適宜設定され得る。通常、ピラー状パターン3のアスペクト比が0.5～5程度になるように、ピラー状パターン3の高さが設定され得る。

[0068] 本実施形態において、ピラー状パターン3が形成される所定の領域PAは、基部2の主面21の略全面に設定されているが、このような態様に限定されるものではない。例えば、基部2の主面21を第1～第Nの領域（Nは2

以上の整数である。)に区分し、各領域にピラー状パターン3が形成されていてもよい。この場合、ピラー状パターン3の間隔G及び寸法Dは各領域で同一であってもよいし、異なってもよい。

[0069] 上述したような構成を有する未分化細胞分離用基板1によれば、後述する実施例から明らかなように、分化細胞と未分化細胞とを含む細胞混合物とピラー状パターン3とを接触させると、未分化細胞及び分化細胞のうちのいずれか一方はピラー状パターン3に相対的に接着し易く、他方はピラー状パターン3に相対的に接着し難い。そのため、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離することができる。例えば、間隔G及び寸法Dの関係において未分化細胞が相対的に接着し易いピラー状パターン3を有する未分化細胞分離用基板1を用いることで、ピラー状パターン3上に残存する未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離することができる。一方、間隔G及び寸法Dの関係において未分化細胞が相対的に接着し難いピラー状パターン3を有する未分化細胞分離用基板1を用いることで、培養液中に浮遊する未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離することができる。また、従来の未分化細胞に付与された識別ラベル等を検出することにより当該未分化細胞を分離する方法のように、識別ラベル等の付与・除去操作を必要としないため、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板1によれば、細胞混合物から未分化細胞を低侵襲で分離することができる。

[0070] 未分化細胞である間葉系幹細胞を患者に投与する再生医療の分野において、間葉系幹細胞のみを選択的に培養することが望まれる場合がある。その間葉系幹細胞の培養工程において、一部が骨芽細胞等に分化し、不要な細胞（分化細胞である骨芽細胞等）が混在してしまうおそれがある。しかしながら、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板1を用いれば、そのようにして混在する不要な細胞（分化細胞である骨芽細胞等）を除去し、目的とする間葉系幹細胞を選択的に、かつ容易に分離することができるため、間葉系幹細胞を高い細胞密度で培養することが可能となる。

[0071] また、未分化細胞である間葉系幹細胞を分化させた軟骨細胞を患者に移植

する再生医療の分野において、軟骨細胞に分化させるにあたって間葉系幹細胞を選択的に培養し、増殖させることが望ましい場合がある。その間葉系幹細胞の培養工程において、当該間葉系幹細胞の一部が骨芽細胞に分化してしまうことがある。しかしながら、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板 1 を用いれば、意図せずして分化してしまった骨芽細胞を除去することができるため、間葉系幹細胞を高い細胞密度で培養し、増殖させることが可能となる。

[0072] 上述したような構成を有する未分化細胞分離用基板 1 は、例えば、下記のようにして製造することができる。図 4 は、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板 1 の製造工程を切断端面図にて示す工程フロー図である。

[0073] 図 4 (a) に示すように、まず、ハードマスク層 30 を備える基板 20 を準備し、当該基板 20 のハードマスク層 30 上にレジスト膜 40 を形成し、電子線描画装置等を用いてレジスト膜 40 にパターン潜像を形成する。

[0074] 基板 20 としては、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板 1 の構成材料（例えば、石英ガラス、合成石英ガラス、ソーダガラス、蛍石、フッ化カルシウム、フッ化マグネシウム、アクリルガラス、ホウケイ酸ガラス等のガラス材料；ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、その他ポリオレフィン等の樹脂材料等の透明材料）からなる基板等を用いることができる。

[0075] ハードマスク層 30 を構成する材料としては、例えば、金属クロム、酸化クロム、窒化クロム、酸窒化クロム等を用いることができる。ハードマスク層 30 は、後述する工程（図 4 (d) 参照）により基板 20 をエッチングするために用いられるハードマスクパターン 31 を形成するための層である。そのため、基板 20 を構成する材料とのエッチング選択比を考慮した材料により構成される。例えば、基板 20 が石英ガラスにより構成される場合、ハードマスク層 30 は金属クロム等により構成されるのが望ましい。

[0076] レジスト膜 40 を構成するレジスト材料としては、特に限定されるものではなく、従来公知のエネルギー線感応型レジスト材料（例えば、電子線感応

型レジスト材料、紫外線感応型レジスト材料等）等を用いることができる。

[0077] レジスト膜40に形成されるパターン潜像は、未分化細胞分離用基板1におけるピラー状パターン3の間隔G及び寸法Dと実質的に同一の間隔及び寸法で形成される。

[0078] 次に、図4（b）に示すように、レジスト膜40に現像処理を施し、レジストパターン41を形成し、図4（c）に示すように、レジストパターン41をマスクとしてハードマスク層30をエッチングし、ハードマスクパターン31を形成する。

[0079] その後、図4（d）に示すように、ハードマスクパターン31をマスクとして基板20をエッチングして、基板20の主面21の所定の領域PAにピラー状パターン3を形成し、最後にハードマスクパターン31を剥離することで、図4（e）に示すように、基部2と、基部2の主面21に形成されたピラー状パターン3とを有する未分化細胞分離用基板1を製造することができる。

[0080] 上述した構成を有する未分化細胞分離用基板1においては、未分化細胞及び分化細胞を含む細胞混合物にピラー状パターン3を接触させると、未分化細胞及び分化細胞のうちのいずれか一方はピラー状パターン3に接着し易く、他方はピラー状パターン3に接着し難い。この接着性の違いを利用することで、本実施形態に係る未分化細胞分離用基板1は、未分化細胞を選択的に、容易に、かつ低侵襲で分離可能との効果を奏するため、未分化細胞を分離する方法に好適に用いることができる。

[0081] かかる未分化細胞分離方法において、未分化細胞分離用基板1のピラー状パターン3と細胞混合物とを接触させる方法としては、例えば、ディッシュ内に未分化細胞分離用基板1を載置し、当該ディッシュ内に細胞混合物を播種することによりピラー状パターン3と細胞混合物とを接触させる方法等が挙げられる。

[0082] ディッシュ内にて未分化細胞分離用基板1のピラー状パターン3と細胞混合物とを接触させる方法において、当該ピラー状パターン3と細胞混合物と

を接触させる時間は、未分化細胞を選択的に分離するのに十分な時間である限り、特に制限されるものではない。

[0083] 上述したように、本実施形態によれば、未分化細胞分離用基板 1 のピラー状パターン 3 と細胞混合物とを接触させることで、未分化細胞及び分化細胞のうちのいずれか一方はピラー状パターン 3 に接着し易く、他方はピラー状パターン 3 に接着し難い。よって、未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から、未分化細胞を選択的に、容易に、かつ低侵襲で分離することができる。

[0084] 以上説明した実施形態は、本発明の理解を容易にするために記載されたものであって、本発明を限定するために記載されたものではない。したがって、上記実施形態に開示された各要素は、本発明の技術的範囲に属する全ての設計変更や均等物をも含む趣旨である。

[0085] 上記実施形態においては、基部 2 の主面 2 1 に一体的な凹凸構造として形成されたピラー状パターン 3 を有する未分化細胞分離用基板 1 を例に挙げて説明したが、本発明はこのような態様に限定されるものではない。例えば、未分化細胞分離用基板 1 は、基部 2 の主面 2 1 に、基部 2 とは別個の部材として構成されるピラー状パターン 3 を有する凹凸構造体（例えば、ピラー状パターン 3 を有するシート状部材等）を取り付けてなるものであってもよい。

[0086] 上記実施形態においては、エッチングによりピラー状パターン 3 を形成し、その後ハードマスクパターン 3 1 を剥離することで未分化細胞分離用基板 1 を製造しているが、本発明はこのような態様に限定されるものではない。例えば、ピラー状パターン 3 が形成された基部 2 を、当該ピラー状パターン 3 の寸法及び高さを変動させることなく薄板化してもよい。また、基部 2 上の複数の領域にピラー状パターン 3 を形成し、領域ごとに切断（個片化）することで、未分化細胞分離用基板 1 を製造してもよい。

実施例

[0087] 以下、実施例等を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は下記

の実施例等により何ら限定されるものではない。

[0088] 〔試験用未分化細胞分離用基板の製造例１〕

厚さ 6 nm の Cr からなるハードマスク層 30 が主面 21 に設けられている基板 20 としての石英ガラス基板（152 mm × 152 mm，厚さ：6.35 mm）を用意し、電子線感応型レジスト（製品名：SEBP-9012，信越化学工業社製）をハードマスク層 30 上に塗布してレジスト膜 40 を形成した。当該レジスト膜 40 上に電子線描画装置を用いてピラー状のレジストパターン 41 を形成した。なお、ピラー状のレジストパターン 41 は、図 2 に示すように、正三角形形状の格子 Gr の各格子点上に位置するように形成された。また、石英ガラス基板 20 の主面 21 上の 14 mm φ の領域 PA 内に 49 個の区分領域 PA₀₁～PA₄₉（各領域 PA₀₁～PA₄₉ の大きさ：450 μm × 450 μm）を設定し、各領域に間隔 G 及び寸法 D の異なるピラー状のレジストパターン 41 が形成された（図 5 参照）。

[0089] 次に、レジストパターン 41 をマスクとして用いてハードマスク層 30 をドライエッチング（エッチングガス：Cl₂+O₂）し、残存するレジストパターン 41 を除去して、ハードマスクパターン 31 を形成した。

[0090] 上述のようにして形成されたハードマスクパターン 31 をマスクとして用いて石英ガラス基板 20 をエッチングし、石英ガラス基板 20 の主面 21 の各領域に、所定の間隔 G 及び寸法 D のピラー状パターン 3 を形成した。最後に、ハードマスクパターン 31 を剥離して、試験用未分化細胞分離用基板を製造した（図 5 参照）。なお、試験用未分化細胞分離用基板の各領域 PA₀₁～PA₄₉ に形成されたピラー状パターン 3 の間隔 G 及び寸法 D を、走査型電子顕微鏡（Vistec 社製，製品名：LWM9000）を用いて測定したところ、下記表 1 に示されるとおりであった。

[0091]

[表1]

領域PA	間隔G(nm)	寸法D(nm)	領域PA	間隔G(nm)	寸法D(nm)	領域PA	間隔G(nm)	寸法D(nm)
PA ₀₁	100	100	PA ₂₂	175	100	PA ₃₆	225	100
PA ₀₂		125	PA ₂₃		125	PA ₃₇		125
PA ₀₃		150	PA ₂₄		150	PA ₃₈		150
PA ₀₄		175	PA ₂₅		175	PA ₃₉		175
PA ₀₅		200	PA ₂₆		200	PA ₄₀		200
PA ₀₆		225	PA ₂₇		225	PA ₄₁		225
PA ₀₇		250	PA ₂₈		250	PA ₄₂		250
PA ₀₈	125	100	PA ₂₉	200	100	PA ₄₃	250	100
PA ₀₉		125	PA ₃₀		125	PA ₄₄		125
PA ₁₀		150	PA ₃₁		150	PA ₄₅		150
PA ₁₁		175	PA ₃₂		175	PA ₄₆		175
PA ₁₂		200	PA ₃₃		200	PA ₄₇		200
PA ₁₃		225	PA ₃₄		225	PA ₄₈		225
PA ₁₄		250	PA ₃₅		250	PA ₄₉		250
PA ₁₅	150	100						
PA ₁₆		125						
PA ₁₇		150						
PA ₁₈		175						
PA ₁₉		200						
PA ₂₀		225						
PA ₂₁		250						

[0092] [試験例1]

底面に 14 mm ϕ の穴が形成されている穴あきディッシュ (35 mm ϕ) を準備し、ピラー状パターン 3 が形成されている各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ が当該底面の穴から露出するように、試験用未分化細胞分離用基板を穴あきディッシュの底面の外側に取り付けた。

[0093] 次に、マウス由来の間葉系幹細胞 (理研 BRC, 未分化細胞) を上記穴あきディッシュ内に播種し、当該未分化細胞と試験用未分化細胞分離用基板のピラー状パターン 3 とを接触させた。培養液として、POWERED BY 10 (グライコテクニカ社製) を用いた。

[0094] 細胞播種から 36 時間後に各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 近傍を撮像した画像に基づき、ピラー状パターン 3 の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。

[0095] なお、当該評価試験においては、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{MU} ($P_{MU} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$, N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内 (ピラー状パターン 3 上) 及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。) を算出し、当該細胞数比 P_{MU} をピラー状パターン 3 に対する親和性の指標として評価した。

[0096] 上記細胞数比 P_{MU} の数値が大きいほどピラー状パターン 3 に対して接着しやすい (親和性が高い) と評価することができ、小さいほどピラー状パターン 3 に対して接着し難い (親和性が低い) と評価することができる。

[0097] 評価結果を表 2 に示す。また、上記評価試験において撮像した領域 PA_{34} 近傍の間葉系幹細胞の画像及び間葉系幹細胞の移動軌跡を図 6 に示す。なお、図 6 に示す矢印線は、間葉系幹細胞の移動軌跡を表すものである。

[0098] [試験例 2]

マウス由来の間葉系幹細胞を分化誘導させた骨芽細胞 (分化細胞) をディッシュ内に播種した以外は、試験例 1 と同様にして、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{MD} ($P_{MD} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$, N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内 (ピラー状パターン 3 上) 及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の

数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。)を算出することで、ピラー状パターン3の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。評価結果を表2にあわせて示す。また、評価試験において撮像した領域 PA_{34} 近傍の骨芽細胞の画像及び骨芽細胞の移動軌跡を図7に示す。なお、図7に示す矢印線は、骨芽細胞の移動軌跡を表すものである。

[0099] [試験例3]

ヒト由来の間葉系幹細胞（未分化細胞）をディッシュ内に播種した以外は、試験例1と同様にして、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{HU} ($P_{HU} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$), N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内（ピラー状パターン3上）及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。)を算出することで、ピラー状パターン3の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。評価結果を表2にあわせて示す。また、評価試験において撮像した領域 PA_{34} 近傍の間葉系幹細胞の画像及び間葉系幹細胞の移動軌跡を図8に示す。なお、図8に示す矢印線は、間葉系幹細胞の移動軌跡を表すものである。

[0100] [試験例4]

ヒト由来の間葉系幹細胞を分化誘導させた骨芽細胞（分化細胞）をディッシュ内に播種した以外は、試験例1と同様にして、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{H0} ($P_{H0} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$), N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内（ピラー状パターン3上）及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。)を算出することで、ピラー状パターン3の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。評価結果を表2にあわせて示す。また、評

価試験において撮像した領域 PA_{34} 近傍の骨芽細胞の画像及び骨芽細胞の移動軌跡を図 9 に示す。なお、図 9 に示す矢印線は、骨芽細胞の移動軌跡を表すものである。

[0101] [試験例 5]

ヒト由来の間葉系幹細胞を分化誘導させた脂肪前駆細胞（分化細胞）をディッシュ内に播種し、培地として Adipogenic Maintenance Medium (Lonza 社製) を使用した以外は、試験例 1 と同様にして、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{HA} ($P_{HA} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$), N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内（ピラー状パターン 3 上）及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。）を算出することで、ピラー状パターン 3 の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。評価結果を表 2 にあわせて示す。また、評価試験において撮像した領域 PA_{24} 近傍の脂肪前駆細胞の画像及び脂肪前駆細胞の移動軌跡を図 10 に示す。なお、図 10 に示す矢印線は、脂肪前駆細胞の移動軌跡を表すものである。

[0102] [試験例 6]

ヒト由来の間葉系幹細胞を分化誘導させた軟骨細胞（分化細胞）をディッシュ内に播種し、培地として Chondrocyte Growth Medium (PromoCell 社製) を使用した以外は、試験例 1 と同様にして、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における細胞数比 P_{HC} ($P_{HC} = N_{in} / (N_{in} + N_{out})$), N_{in} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ 内（ピラー状パターン 3 上）及び各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の境界に存在する細胞の数」を、 N_{out} は「各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ と同一面積の領域であって、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ の外周を取り囲む領域内に存在する細胞の数」を表す。）を算出することで、ピラー状パターン 3 の間隔 G 及び寸法 D と、細胞接着の状態との関係性を評価する評価試験を行った。評価結果を表 2 にあわせて示す。また、評価試験において撮像した領域 PA_{24} 近傍の軟骨細胞の画像及び軟骨細胞の移動軌跡を図 11 に示す。なお、図 11 に示す矢印線は、軟骨細胞の移動軌跡を表すも

のである。

[0103] [表2]

G(nm)	D(nm)	領域	細胞数比					
			P _{MJ}	P _{MD}	P _{HU}	P _{HO}	P _{HA}	P _{HC}
100	100	PA ₀₁	0.530	0.430	0.403	0.000	0.596	0.622
	125	PA ₀₂	0.400	0.220	0.385	0.000	0.454	0.409
	150	PA ₀₃	0.320	0.150	0.428	0.000	0.773	0.539
	175	PA ₀₄	0.420	0.230	0.452	0.000	0.455	0.513
	200	PA ₀₅	0.410	0.070	0.543	0.000	0.475	0.495
	225	PA ₀₆	0.300	0.150	0.543	0.164	0.543	0.516
	250	PA ₀₇	0.160	0.000	0.558	0.000	0.769	0.624
125	100	PA ₀₈	0.500	0.420	0.507	0.439	0.587	0.535
	125	PA ₀₉	0.440	0.070	0.501	0.000	0.739	0.580
	150	PA ₁₀	0.380	0.350	0.422	NA	0.678	0.543
	175	PA ₁₁	0.410	0.280	0.439	1.000	0.660	0.510
	200	PA ₁₂	0.410	0.330	0.311	0.000	0.628	0.565
	225	PA ₁₃	0.240	0.280	0.530	0.000	0.619	0.556
	250	PA ₁₄	0.380	0.330	0.570	0.000	0.625	0.498
150	100	PA ₁₅	0.350	0.530	0.545	NA	0.581	0.549
	125	PA ₁₆	0.440	0.000	0.324	0.000	0.538	0.645
	150	PA ₁₇	0.430	0.250	0.513	0.000	0.609	0.565
	175	PA ₁₈	0.340	0.250	0.360	0.439	0.683	0.485
	200	PA ₁₉	0.340	0.000	0.382	0.000	0.720	0.446
	225	PA ₂₀	0.280	0.000	0.292	NA	0.478	0.666
	250	PA ₂₁	0.080	0.500	0.456	0.000	0.573	0.536
175	100	PA ₂₂	0.400	0.450	0.709	NA	0.516	0.576
	125	PA ₂₃	0.280	0.300	0.314	0.000	0.560	0.509
	150	PA ₂₄	0.360	0.430	0.409	0.000	0.626	0.724
	175	PA ₂₅	0.320	0.210	0.355	0.000	0.746	0.693
	200	PA ₂₆	0.150	0.500	0.264	0.000	0.691	0.518
	225	PA ₂₇	0.260	0.290	0.475	0.000	0.814	0.583
	250	PA ₂₈	0.330	0.190	0.419	0.281	0.748	0.532
200	100	PA ₂₉	0.320	0.440	0.433	0.000	0.714	0.649
	125	PA ₃₀	0.390	0.280	0.471	0.000	0.571	0.603
	150	PA ₃₁	0.440	0.360	0.205	NA	0.383	0.642
	175	PA ₃₂	0.350	0.330	0.440	0.439	0.698	0.800
	200	PA ₃₃	0.350	0.390	0.341	NA	0.487	0.476
	225	PA ₃₄	0.260	0.000	0.635	0.000	0.638	0.598
	250	PA ₃₅	0.350	0.330	0.509	0.000	0.666	0.473
225	100	PA ₃₆	0.170	0.620	0.455	1.000	0.597	0.521
	125	PA ₃₇	0.410	0.440	0.346	0.000	0.673	0.443
	150	PA ₃₈	0.390	0.260	0.540	0.439	0.435	0.665
	175	PA ₃₉	0.370	0.400	0.484	NA	0.616	0.706
	200	PA ₄₀	0.370	0.380	0.492	NA	0.498	0.460
	225	PA ₄₁	0.360	0.300	0.490	0.164	0.629	0.626
	250	PA ₄₂	0.430	0.220	0.462	0.164	0.542	0.579
250	100	PA ₄₃	0.380	0.150	0.584	NA	0.492	0.549
	125	PA ₄₄	0.480	0.000	0.448	NA	0.534	0.587
	150	PA ₄₅	0.300	0.400	0.474	0.000	0.481	0.425
	175	PA ₄₆	0.350	0.120	0.222	0.207	0.587	0.704
	200	PA ₄₇	0.350	0.000	0.242	0.281	0.505	0.736
	225	PA ₄₈	0.370	0.700	0.536	0.000	0.528	0.666
	250	PA ₄₉	0.250	0.170	0.349	0.135	0.525	0.660

[0104] 試験例 1 及び試験例 2 の評価結果から、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における未分化細胞捕捉効率 E_{MU} 及び分化細胞捕捉効率 E_{MD} を下記式により算出した。結果を表 3 に示す。

$$E_{MU} = P_{MU} / (P_{MU} + P_{MD})$$

$$E_{MD} = P_{MD} / (P_{MU} + P_{MD})$$

[0105] 試験例 3 及び試験例 4 の評価結果から、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における未分化細胞捕捉効率 E_{HOU} 及び分化細胞捕捉効率 E_{HOD} を下記式により算出した。結果を表 3 にあわせて示す。

$$E_{HOU} = P_{HU} / (P_{HU} + P_{HO})$$

$$E_{HOD} = P_{HO} / (P_{HU} + P_{HO})$$

[0106] 試験例 3 及び試験例 5 の評価結果から、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における未分化細胞捕捉効率 E_{HAU} 及び分化細胞捕捉効率 E_{HAD} を下記式により算出した。結果を表 3 にあわせて示す。

$$E_{HAU} = P_{HU} / (P_{HU} + P_{HA})$$

$$E_{HAD} = P_{HA} / (P_{HU} + P_{HA})$$

[0107] 試験例 3 及び試験例 6 の評価結果から、各領域 $PA_{01} \sim PA_{49}$ における未分化細胞捕捉効率 E_{HCU} 及び分化細胞捕捉効率 E_{HCD} を下記式により算出した。結果を表 3 にあわせて示す。

$$E_{HCU} = P_{HU} / (P_{HU} + P_{HC})$$

$$E_{HCD} = P_{HC} / (P_{HU} + P_{HC})$$

[表3]

G(nm)	D(nm)	領域	未分化細胞捕捉効率				分化細胞捕捉効率			
			E_{MU}	E_{HOU}	E_{HAU}	E_{HCU}	E_{MD}	E_{HOD}	E_{HAD}	E_{HCD}
100	100	PA ₀₁	0.552	1.000	0.404	0.394	0.448	0.000	0.596	0.606
	125	PA ₀₂	0.645	1.000	0.459	0.485	0.355	0.000	0.541	0.515
	150	PA ₀₃	0.681	1.000	0.356	0.442	0.319	0.000	0.644	0.558
	175	PA ₀₄	0.646	1.000	0.499	0.468	0.354	0.000	0.501	0.532
	200	PA ₀₅	0.854	1.000	0.533	0.523	0.146	0.000	0.467	0.477
	225	PA ₀₆	0.667	0.768	0.500	0.512	0.333	0.232	0.500	0.488
	250	PA ₀₇	1.000	1.000	0.421	0.472	0.000	0.000	0.579	0.528
125	100	PA ₀₈	0.543	0.536	0.463	0.487	0.457	0.464	0.537	0.513
	125	PA ₀₉	0.863	1.000	0.404	0.463	0.137	0.000	0.596	0.537
	150	PA ₁₀	0.521	NA	0.384	0.437	0.479	NA	0.616	0.563
	175	PA ₁₁	0.594	0.305	0.400	0.463	0.406	0.695	0.600	0.537
	200	PA ₁₂	0.554	1.000	0.331	0.355	0.446	0.000	0.669	0.645
	225	PA ₁₃	0.462	1.000	0.461	0.488	0.538	0.000	0.539	0.512
	250	PA ₁₄	0.535	1.000	0.477	0.534	0.465	0.000	0.523	0.466
150	100	PA ₁₅	0.398	NA	0.484	0.498	0.602	NA	0.516	0.502
	125	PA ₁₆	1.000	1.000	0.376	0.334	0.000	0.000	0.624	0.666
	150	PA ₁₇	0.632	1.000	0.457	0.476	0.368	0.000	0.543	0.524
	175	PA ₁₈	0.576	0.451	0.345	0.426	0.424	0.549	0.655	0.574
	200	PA ₁₉	1.000	1.000	0.347	0.461	0.000	0.000	0.653	0.539
	225	PA ₂₀	1.000	NA	0.380	0.305	0.000	NA	0.620	0.695
	250	PA ₂₁	0.138	1.000	0.443	0.460	0.862	0.000	0.557	0.540
175	100	PA ₂₂	0.471	NA	0.579	0.552	0.529	NA	0.421	0.448
	125	PA ₂₃	0.483	1.000	0.359	0.381	0.517	0.000	0.641	0.619
	150	PA ₂₄	0.456	1.000	0.395	0.361	0.544	0.000	0.605	0.639
	175	PA ₂₅	0.604	1.000	0.322	0.339	0.396	0.000	0.678	0.661
	200	PA ₂₆	0.231	1.000	0.276	0.338	0.769	0.000	0.724	0.662
	225	PA ₂₇	0.473	1.000	0.368	0.449	0.527	0.000	0.632	0.551
	250	PA ₂₈	0.635	0.599	0.359	0.441	0.365	0.401	0.641	0.559
200	100	PA ₂₉	0.421	1.000	0.378	0.400	0.579	0.000	0.622	0.600
	125	PA ₃₀	0.582	1.000	0.452	0.439	0.418	0.000	0.548	0.561
	150	PA ₃₁	0.550	NA	0.348	0.242	0.450	NA	0.652	0.758
	175	PA ₃₂	0.515	0.501	0.387	0.355	0.485	0.499	0.613	0.645
	200	PA ₃₃	0.473	NA	0.412	0.417	0.527	NA	0.588	0.583
	225	PA ₃₄	1.000	1.000	0.499	0.515	0.000	0.000	0.501	0.485
	250	PA ₃₅	0.515	1.000	0.434	0.519	0.485	0.000	0.566	0.481
225	100	PA ₃₆	0.215	0.313	0.433	0.466	0.785	0.687	0.567	0.534
	125	PA ₃₇	0.482	1.000	0.339	0.439	0.518	0.000	0.661	0.561
	150	PA ₃₈	0.600	0.551	0.554	0.448	0.400	0.449	0.446	0.552
	175	PA ₃₉	0.481	NA	0.440	0.407	0.519	NA	0.560	0.593
	200	PA ₄₀	0.493	NA	0.497	0.516	0.507	NA	0.503	0.484
	225	PA ₄₁	0.545	0.749	0.438	0.439	0.455	0.251	0.562	0.561
	250	PA ₄₂	0.662	0.738	0.460	0.444	0.338	0.262	0.540	0.556
250	100	PA ₄₃	0.717	NA	0.543	0.516	0.283	NA	0.457	0.484
	125	PA ₄₄	1.000	NA	0.456	0.433	0.000	NA	0.544	0.567
	150	PA ₄₅	0.429	1.000	0.496	0.527	0.571	0.000	0.504	0.473
	175	PA ₄₆	0.745	0.518	0.275	0.240	0.255	0.482	0.725	0.760
	200	PA ₄₇	1.000	0.463	0.324	0.248	0.000	0.537	0.676	0.752
	225	PA ₄₈	0.346	1.000	0.504	0.446	0.654	0.000	0.496	0.554
	250	PA ₄₉	0.595	0.721	0.399	0.346	0.405	0.279	0.601	0.654

[0108] 表3に示す未分化細胞捕捉効率 E_{MU} の算出結果及び分化細胞捕捉効率 E_{MD} の算出結果から、マウス由来間葉系幹細胞（未分化細胞）と骨芽細胞（分化細胞）

胞)とを含む細胞混合物をピラー状パターン3に接触させた場合に推定される、マウス由来間葉系幹細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{mu} 及び骨芽細胞の選択的分離可能性 A_{MD} についての総合評価を表4に示す。

[0109] 表3に示す未分化細胞捕捉効率 E_{HOU} の算出結果及び分化細胞捕捉効率 E_{HOD} の算出結果から、ヒト由来間葉系幹細胞(未分化細胞)と骨芽細胞(分化細胞)とを含む細胞混合物をピラー状パターン3に接触させた場合に推定される、ヒト由来間葉系幹細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HOU} 及び骨芽細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HOD} を表4にあわせて示す。

[0110] 表3に示す未分化細胞捕捉効率 E_{HAU} の算出結果及び分化細胞捕捉効率 E_{HAD} の算出結果から、ヒト由来間葉系幹細胞(未分化細胞)と脂肪前駆細胞(分化細胞)とを含む細胞混合物をピラー状パターン3に接触させた場合に推定される、ヒト由来間葉系幹細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HAU} 及び脂肪前駆細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HAD} を表4にあわせて示す。

[0111] 表3に示す未分化細胞捕捉効率 E_{HCU} の算出結果及び分化細胞捕捉効率 E_{HCD} の算出結果から、ヒト由来間葉系幹細胞(未分化細胞)と軟骨細胞(分化細胞)とを含む細胞混合物をピラー状パターン3に接触させた場合に推定される、ヒト由来間葉系幹細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HCU} 及び軟骨細胞の選択的分離可能性についての総合評価 A_{HCD} を表4にあわせて示す。

[0112]

[表4]

G(nm)	D(nm)	領域	総合評価							
			A _{MU}	A _{HOU}	A _{HAU}	A _{HCU}	A _{MD}	A _{HOD}	A _{HAD}	A _{HCD}
100	100	PA ₀₁	△	◎	×	×	×	×	△	○
	125	PA ₀₂	○	◎	×	×	×	×	△	△
	150	PA ₀₃	○	◎	×	×	×	×	○	△
	175	PA ₀₄	○	◎	×	×	×	×	△	△
	200	PA ₀₅	◎	◎	△	△	×	×	×	×
	225	PA ₀₆	○	○	×	△	×	×	△	×
	250	PA ₀₇	◎	◎	×	×	×	×	△	△
125	100	PA ₀₈	△	△	×	×	×	×	△	△
	125	PA ₀₉	◎	◎	×	×	×	×	△	△
	150	PA ₁₀	△	NA	×	×	×	NA	○	△
	175	PA ₁₁	△	×	×	×	×	○	○	△
	200	PA ₁₂	△	◎	×	×	×	×	○	○
	225	PA ₁₃	×	◎	×	×	△	×	△	△
	250	PA ₁₄	△	◎	×	△	×	×	△	×
150	100	PA ₁₅	×	NA	×	×	○	NA	△	△
	125	PA ₁₆	◎	◎	×	×	×	×	○	○
	150	PA ₁₇	○	◎	×	×	×	×	△	△
	175	PA ₁₈	△	×	×	×	×	△	○	△
	200	PA ₁₉	◎	◎	×	×	×	×	○	△
	225	PA ₂₀	◎	NA	×	×	×	NA	○	○
	250	PA ₂₁	×	◎	×	×	◎	×	△	△
175	100	PA ₂₂	×	NA	△	△	△	NA	×	×
	125	PA ₂₃	×	◎	×	×	△	×	○	○
	150	PA ₂₄	×	◎	×	×	△	×	○	○
	175	PA ₂₅	○	◎	×	×	×	×	○	○
	200	PA ₂₆	×	◎	×	×	○	×	○	○
	225	PA ₂₇	×	◎	×	×	△	×	○	△
	250	PA ₂₈	○	△	×	×	×	×	○	△
200	100	PA ₂₉	×	◎	×	×	△	×	○	△
	125	PA ₃₀	△	◎	×	×	×	×	△	△
	150	PA ₃₁	△	NA	×	×	×	NA	○	○
	175	PA ₃₂	△	△	×	×	×	×	○	○
	200	PA ₃₃	×	NA	×	×	△	NA	△	△
	225	PA ₃₄	◎	◎	×	△	×	×	△	×
	250	PA ₃₅	△	◎	×	△	×	×	△	×
225	100	PA ₃₆	×	×	×	×	○	○	△	△
	125	PA ₃₇	×	◎	×	×	△	NA	○	△
	150	PA ₃₈	△	△	△	×	×	×	×	△
	175	PA ₃₉	×	NA	×	×	△	NA	△	△
	200	PA ₄₀	×	NA	×	△	△	NA	△	×
	225	PA ₄₁	△	○	×	×	×	×	△	△
	250	PA ₄₂	○	○	×	×	×	×	△	△
250	100	PA ₄₃	○	NA	△	△	×	NA	×	×
	125	PA ₄₄	◎	NA	×	×	×	NA	△	△
	150	PA ₄₅	×	◎	×	△	△	×	△	×
	175	PA ₄₆	○	△	×	×	×	×	○	○
	200	PA ₄₇	◎	×	×	×	×	△	○	○
	225	PA ₄₈	×	◎	△	×	○	×	×	△
	250	PA ₄₉	△	○	×	×	×	×	○	○

[0113] 表4において、総合評価の「◎」、「○」、「△」及び「×」は、下記指標に基づくものである。

$$\textcircled{\bullet} : E_{\text{MU}}, E_{\text{HOU}}, E_{\text{HAU}}, E_{\text{HCU}} > 0.8 ; E_{\text{MD}}, E_{\text{HOD}}, E_{\text{HAD}}, E_{\text{HCD}} > 0.8$$

$$\textcircled{\circ} : 0.6 < E_{\text{MU}}, E_{\text{HOU}}, E_{\text{HAU}}, E_{\text{HCU}} \leq 0.8 ; 0.6 < E_{\text{MD}}, E_{\text{HOD}}, E_{\text{HAD}}, E_{\text{HCD}} \leq 0.8$$

$$\triangle : 0.5 < E_{\text{MU}}, E_{\text{HOU}}, E_{\text{HAU}}, E_{\text{HCU}} \leq 0.6 ; 0.5 < E_{\text{MD}}, E_{\text{HOD}}, E_{\text{HAD}}, E_{\text{HCD}} \leq 0.6$$

$$\times : E_{\text{MU}}, E_{\text{HOU}}, E_{\text{HAU}}, E_{\text{HCU}} \leq 0.5 ; E_{\text{MD}}, E_{\text{HOD}}, E_{\text{HAD}}, E_{\text{HCD}} \leq 0.5$$

[0114] 表2～4に示す結果、並びに図6～11から、ナノ凹凸構造体、特に間隔G及び寸法Dが、いずれも100～250nmの範囲内であるピラー状パターン3であれば、細胞の接着性を変化させ得る傾向が見出された。さらに、その接着性の変化は、細胞の分化状態によって異なることが明らかとなった。間葉系幹細胞の捕捉効率 E_{MD} 、 E_{HOD} が相対的に高いピラー状パターン3を有する領域（表4に示す総合評価が「◎」又は「○」の領域）においては、間葉系幹細胞とそれから分化誘導させた骨芽細胞とを含む細胞混合物中の間葉系幹細胞がピラー状パターン3に相対的に接着し易くなるため、当該細胞混合物を当該ピラー状パターン3に接触させるだけで、当該細胞混合物から間葉系幹細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得することができる、又は間葉系幹細胞の細胞密度を高めることができると考えられる。一方、間葉系幹細胞から分化誘導させた分化細胞（骨芽細胞、脂肪前駆細胞、軟骨細胞等）の捕捉効率 E_{MD} 、 E_{HOD} 、 E_{HAD} 、 E_{HCD} が相対的に高いピラー状パターン3を有する領域（表4に示す総合評価が「◎」又は「○」の領域）においては、間葉系幹細胞とそれから分化した分化細胞とを含む細胞混合物中の分化細胞がピラー状パターン3に相対的に接着し易くなるため、当該細胞混合物を当該ピラー状パターン3に接触させるだけで、当該細胞混合物から間葉系幹細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得することができる、又は間葉系幹細胞の細胞密度を高めることができると考えられる。

[0115] 上記試験例の結果から明らかなように、寸法D（ $D = 100 \sim 250 \text{ nm}$ ）

）の複数のピラー状パターン３を間隔 G （ $G = 100 \sim 250 \text{ nm}$ ）で規則性を有して配列されたナノ凹凸構造体を用いると、未分化細胞及び分化細胞を含む細胞混合物と、ピラー状パターン３とを接触させるだけで、細胞の接着性の違いに基づき、当該細胞混合物から、未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離し、取得することができると考えられる。

[0116] 好ましくは下記（１－１）～（１－７）に示す関係を具備する間隔 G 及び寸法 D を有するピラー状パターン３が形成された未分化細胞分離用基板１を用いることで、細胞の接着性の違いに基づき、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

[0117] $100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－１）

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－２）

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－３）

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－４）

$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 187.5 \text{ nm}$
又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－５）

$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$
又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－６）

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（１－７）

[0118] 特に好ましくは下記（２－１）～（２－７）に示す関係を具備する間隔 G 及び寸法 D を有するピラー状パターン３が形成された未分化細胞分離用基板１を用いることで、細胞の種類に依存することなく、細胞の接着性の違いに基づき、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する

、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

[0119] $100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$...
(2-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$... (2-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm}$ 又は $187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm}$ 又は $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-4)

$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}$; $212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-5)

$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}$; $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-6)

$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-7)

[0120] 細胞混合物に含まれる未分化細胞がマウス由来間葉系幹細胞であって、分化細胞がそれから分化誘導させた骨芽細胞である場合、好ましくは下記(3-1)～(3-7)に示す関係を具備する間隔G及び寸法Dを有するピラー状パターン3が形成された未分化細胞分離用基板1を用いることで、細胞の接着性の違いに基づき、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

[0121] $100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$...
(3-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$... (3-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm}$ 又は $187.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (3-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 212.5$

$$nm \text{ 又は } 237.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (3-4)$$

$$187.5nm \leq G < 212.5nm; 212.5nm \leq D < 237.5nm \quad \cdots (3-5)$$

$$212.5nm \leq G < 237.5nm; 100nm \leq D < 112.5nm$$

又は $237.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (3-6)$

$$237.5nm \leq G \leq 250nm; 100nm \leq D < 137.5nm \text{ 又は } 162.5nm \leq D < 237.5nm \quad \cdots (3-7)$$

[0122] 細胞混合物に含まれる未分化細胞がヒト由来間葉系幹細胞であって、分化細胞がそれから分化誘導させた骨芽細胞、脂肪前駆細胞又は軟骨細胞である場合、好ましくは下記(4-1)～(4-7)に示す関係を具備する間隔G及び寸法Dを有するピラー状パターン3が形成された未分化細胞分離用基板1を用いることで、細胞の接着性の違いに基づき、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

$$[0123] \quad 100nm \leq G < 112.5nm; 100nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-1)$$

$$112.5nm \leq G < 137.5nm; 112.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-2)$$

$$137.5nm \leq G < 162.5nm; 112.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-3)$$

$$162.5nm \leq G < 187.5nm; 112.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-4)$$

$$187.5nm \leq G < 212.5nm; 100nm \leq D < 187.5nm$$

又は $212.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-5)$

$$212.5nm \leq G < 237.5nm; 100nm \leq D < 137.5nm$$

又は $212.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-6)$

$$237.5nm \leq G \leq 250nm; 137.5nm \leq D \leq 250nm \quad \cdots (4-7)$$

[0124] 特に好ましくは下記（５－１）～（５－４）に示す関係を具備する間隔 G 及び寸法 D を有するピラー状パターン ３が形成された未分化細胞分離用基板 １を用いることで、細胞混合物に含まれる未分化細胞がヒト由来間葉系幹細胞であって、分化細胞がそれから分化誘導させた骨芽細胞、脂肪前駆細胞及び軟骨細胞のいずれの場合であっても、細胞の接着性の違いに基づき、細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

[0125] $112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}$; $187.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$ …（５－１）
 $137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ …（５－２）
 $162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$ …（５－３）
 $237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$ …（５－４）

[0126] 以上のように、当該未分化細胞分離用基板 １のピラー状パターン ３と、未分化細胞及び分化細胞を含む細胞混合物とを接触させるだけで、当該細胞混合物から未分化細胞を選択的に、かつ容易に分離・取得する、又は未分化細胞の細胞密度を高めることができる。

産業上の利用可能性

[0127] 本発明は、未分化細胞や分化細胞を用いた再生医療に関する技術分野等において有用である。

符号の説明

[0128] １…未分化細胞分離用基板
 ２…基部（基材）
 ２１…主面（第１面）
 ３…ピラー状パターン

請求の範囲

[請求項1] 未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から前記未分化細胞を分離する方法であって、

複数のピラー状パターンが規則性を有して配列されてなるナノ凹凸構造体を用い、前記複数のピラー状パターンに前記細胞混合物を接触させる工程を含み、

前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、前記未分化細胞及び前記分化細胞のうちのいずれか一方が前記ピラー状パターンに接着し易く、他方が前記ピラー状パターンに接着し難い関係を有することを特徴とする未分化細胞の分離方法。

[請求項2] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、いずれも50～500nmの範囲内であることを特徴とする請求項1に記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項3] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、いずれも100～250nmの範囲内であることを特徴とする請求項1又は2に記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項4] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(1-1)～(1-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-4)

$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 187.5$

$n\text{ m}$ 又は $212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-5)

$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 137.5$

$n\text{ m}$ 又は $212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-6)

$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$...
(1-7)

[請求項5] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(2-1)～(2-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$
... (2-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$... (2-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm}$ 又は $187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm}$ 又は $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-4)

$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}$; $212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-5)

$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}$; $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-6)

$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-7)

[請求項6] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(3-1)～(3-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$
... (3-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137$

. 5 nm ... (3-2)

137.5 nm $\leq G < 162.5$ nm ; 100 nm $\leq D < 162.5$ nm
又は 187.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (3-3)

162.5 nm $\leq G < 187.5$ nm ; 162.5 nm $\leq D < 212.5$ nm
又は 237.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (3-4)

187.5 nm $\leq G < 212.5$ nm ; 212.5 nm $\leq D < 237.5$ nm
... (3-5)

212.5 nm $\leq G < 237.5$ nm ; 100 nm $\leq D < 112.5$ nm
又は 237.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (3-6)

237.5 nm $\leq G \leq 250$ nm ; 100 nm $\leq D < 137.5$ nm
又は 162.5 nm $\leq D < 237.5$ nm ... (3-7)

[請求項7]

前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(4-1)～(4-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

100 nm $\leq G < 112.5$ nm ; 100 nm $\leq D \leq 250$ nm ...
(4-1)

112.5 nm $\leq G < 137.5$ nm ; 112.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (4-2)

137.5 nm $\leq G < 162.5$ nm ; 112.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (4-3)

162.5 nm $\leq G < 187.5$ nm ; 112.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (4-4)

187.5 nm $\leq G < 212.5$ nm ; 100 nm $\leq D < 187.5$ nm
又は 212.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (4-5)

212.5 nm $\leq G < 237.5$ nm ; 100 nm $\leq D < 137.5$ nm
又は 212.5 nm $\leq D \leq 250$ nm ... (4-6)

237.5 nm $\leq G \leq 250$ nm ; 137.5 nm $\leq D \leq 250$ nm
... (4-7)

[請求項8] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(5-1)～(5-4)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

1 1 2. 5 nm $\leq$ G < 1 3 7. 5 nm ; 1 8 7. 5 nm $\leq$ D < 2 1 2. 5 nm ... (5-1)

1 3 7. 5 nm $\leq$ G < 1 6 2. 5 nm ; 1 1 2. 5 nm $\leq$ D < 1 3 7. 5 nm ... (5-2)

1 6 2. 5 nm $\leq$ G < 1 8 7. 5 nm ; 1 1 2. 5 nm $\leq$ D < 2 1 2. 5 nm ... (5-3)

2 3 7. 5 nm $\leq$ G $\leq$ 2 5 0 nm ; 2 3 7. 5 nm $\leq$ D $\leq$ 2 5 0 nm ... (5-4)

[請求項9] 前記未分化細胞が、マウスに由来する間葉系幹細胞であり、
前記分化細胞が、前記未分化細胞から分化した骨芽細胞であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項10] 前記未分化細胞が、ヒトに由来する間葉系幹細胞であることを特徴とする請求項1～5、並びに請求項7及び請求項8のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項11] 前記凹凸構造体は、前記複数のピラー状パターンが正三角形格子の各格子点上に配列されてなることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項12] 前記凹凸構造体は、前記複数のピラー状パターンが方形格子の各格子点上に配列されてなることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の未分化細胞の分離方法。

[請求項13] 未分化細胞と分化細胞とを含む細胞混合物から前記未分化細胞を分離するために用いられる未分化細胞分離用基板であって、
第1面及び前記第1面に対向する第2面を有する基材と、
前記基材の前記第1面に規則性を有して配列形成されてなる複数の

ピラー状ナノパターンと

を備え、

前記ピラー状ナノパターンの間隔Gと寸法Dとが、前記未分化細胞及び前記分化細胞のうちのいずれか一方が前記ピラー状ナノパターンに接着し易く、他方が前記ピラー状ナノパターンに接着し難い関係を有することを特徴とする未分化細胞分離用基板。

[請求項14] 前記ピラー状ナノパターンの間隔Gと寸法Dとが、いずれも50～500nmの範囲内であることを特徴とする請求項13に記載の未分化細胞分離用基板。

[請求項15] 前記ピラー状ナノパターンの間隔Gと寸法Dとが、いずれも100～250nmの範囲内であることを特徴とする請求項13又は14に記載の未分化細胞分離用基板。

[請求項16] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(1-1)～(1-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$...
(1-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-4)

$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 187.5\text{ nm}$ 又は $212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-5)

$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$ 又は $212.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (1-6)

$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$...

(1-7)

[請求項17] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(2-1)～(2-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$
 ... (2-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$... (2-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm}$ 又は $187.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm}$ 又は $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-4)

$187.5\text{ nm} \leq G < 212.5\text{ nm}$; $212.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-5)

$212.5\text{ nm} \leq G < 237.5\text{ nm}$; $237.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (2-6)

$237.5\text{ nm} \leq G \leq 250\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 237.5\text{ nm}$... (2-7)

[請求項18] 前記ピラー状パターンの間隔Gと寸法Dとが、下記(3-1)～(3-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

$100\text{ nm} \leq G < 112.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$
 ... (3-1)

$112.5\text{ nm} \leq G < 137.5\text{ nm}$; $112.5\text{ nm} \leq D < 137.5\text{ nm}$... (3-2)

$137.5\text{ nm} \leq G < 162.5\text{ nm}$; $100\text{ nm} \leq D < 162.5\text{ nm}$ 又は $187.5\text{ nm} \leq D \leq 250\text{ nm}$... (3-3)

$162.5\text{ nm} \leq G < 187.5\text{ nm}$; $162.5\text{ nm} \leq D < 212.5\text{ nm}$

5 nm 又は $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (3-4)
 $187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}$; $212.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm}$... (3-5)
 $212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 112.5 \text{ nm}$ 又は $237.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (3-6)
 $237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ 又は $162.5 \text{ nm} \leq D < 237.5 \text{ nm}$... (3-7)

[請求項19] 前記ピラー状パターンの間隔 G と寸法 D とが、下記(4-1)～(4-7)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

$100 \text{ nm} \leq G < 112.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-1)

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-2)

$137.5 \text{ nm} \leq G < 162.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-3)

$162.5 \text{ nm} \leq G < 187.5 \text{ nm}$; $112.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-4)

$187.5 \text{ nm} \leq G < 212.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 187.5 \text{ nm}$ 又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-5)

$212.5 \text{ nm} \leq G < 237.5 \text{ nm}$; $100 \text{ nm} \leq D < 137.5 \text{ nm}$ 又は $212.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-6)

$237.5 \text{ nm} \leq G \leq 250 \text{ nm}$; $137.5 \text{ nm} \leq D \leq 250 \text{ nm}$... (4-7)

[請求項20] 前記ピラー状パターンの間隔 G と寸法 D とが、下記(5-1)～(5-4)のいずれかの関係を有することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

$112.5 \text{ nm} \leq G < 137.5 \text{ nm}$; $187.5 \text{ nm} \leq D < 212.5 \text{ nm}$

. 5 nm ... (5 - 1)

1 3 7. 5 nm $\leq G < 1 6 2$. 5 nm ; 1 1 2. 5 nm $\leq D < 1 3 7$

. 5 nm ... (5 - 2)

1 6 2. 5 nm $\leq G < 1 8 7$. 5 nm ; 1 1 2. 5 nm $\leq D < 2 1 2$

. 5 nm ... (5 - 3)

2 3 7. 5 nm $\leq G \leq 2 5 0$ nm ; 2 3 7. 5 nm $\leq D \leq 2 5 0$ nm

... (5 - 4)

[請求項21] 前記未分化細胞が、マウスに由来する間葉系幹細胞であり、
前記分化細胞が、前記未分化細胞から分化した骨芽細胞であることを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

[請求項22] 前記未分化細胞が、ヒトに由来する間葉系幹細胞であることを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 7、並びに請求項 1 9 及び 2 0 のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

[請求項23] 前記複数のピラー状パターンは、正三角形格子の各格子点上に配列されていることを特徴とする請求項 1 3 ~ 2 2 のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

[請求項24] 前記複数のピラー状パターンは、方形格子の各格子点上に配列されていることを特徴とする請求項 1 3 ~ 2 2 のいずれかに記載の未分化細胞分離用基板。

[図1]

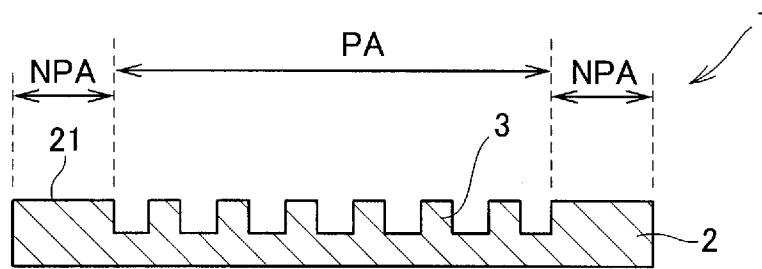


FIG.1

[図2]

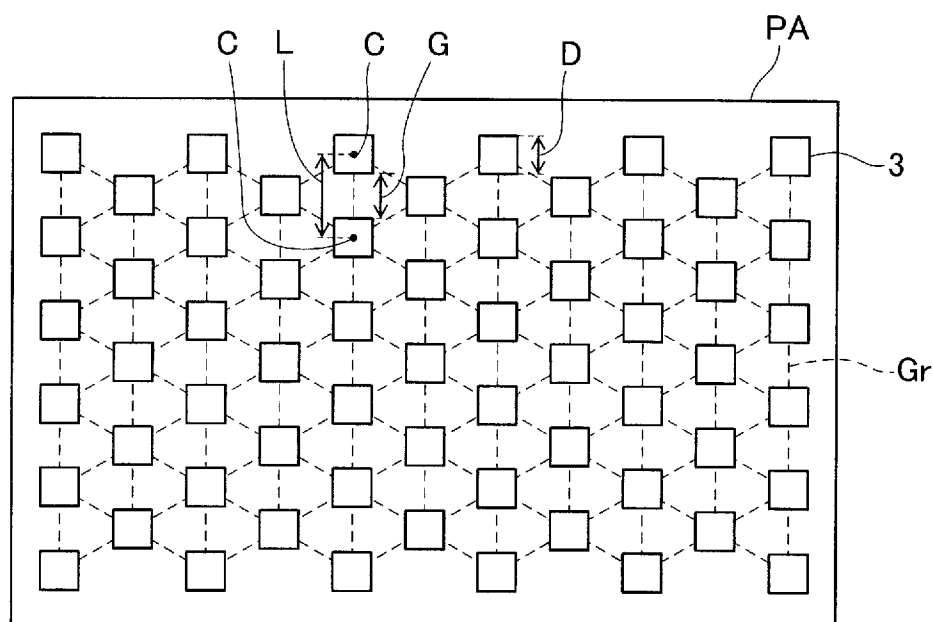


FIG.2

[図3]

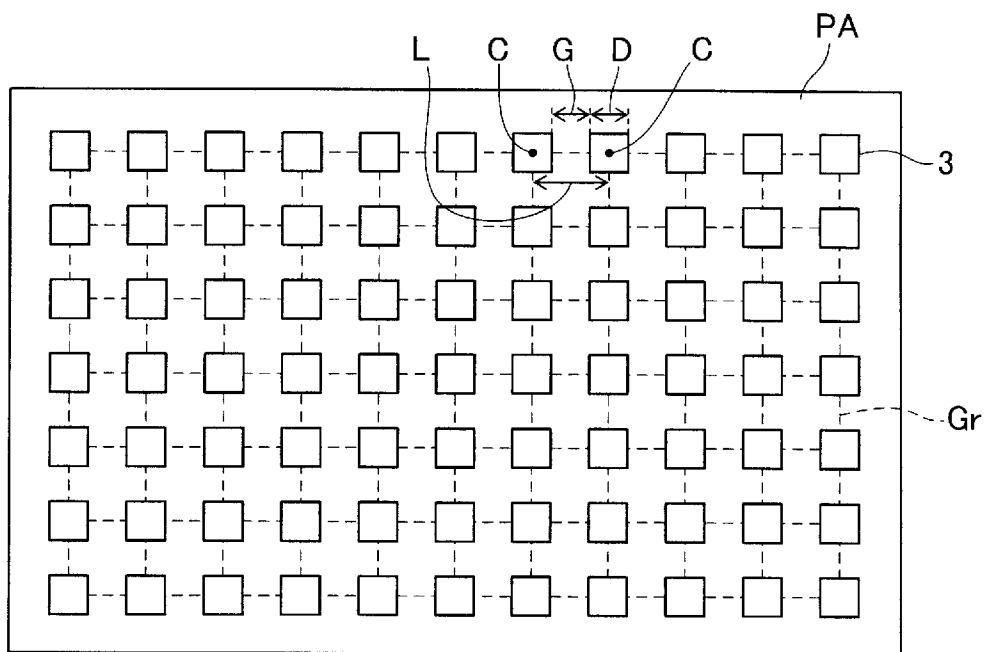


FIG.3

[図4]

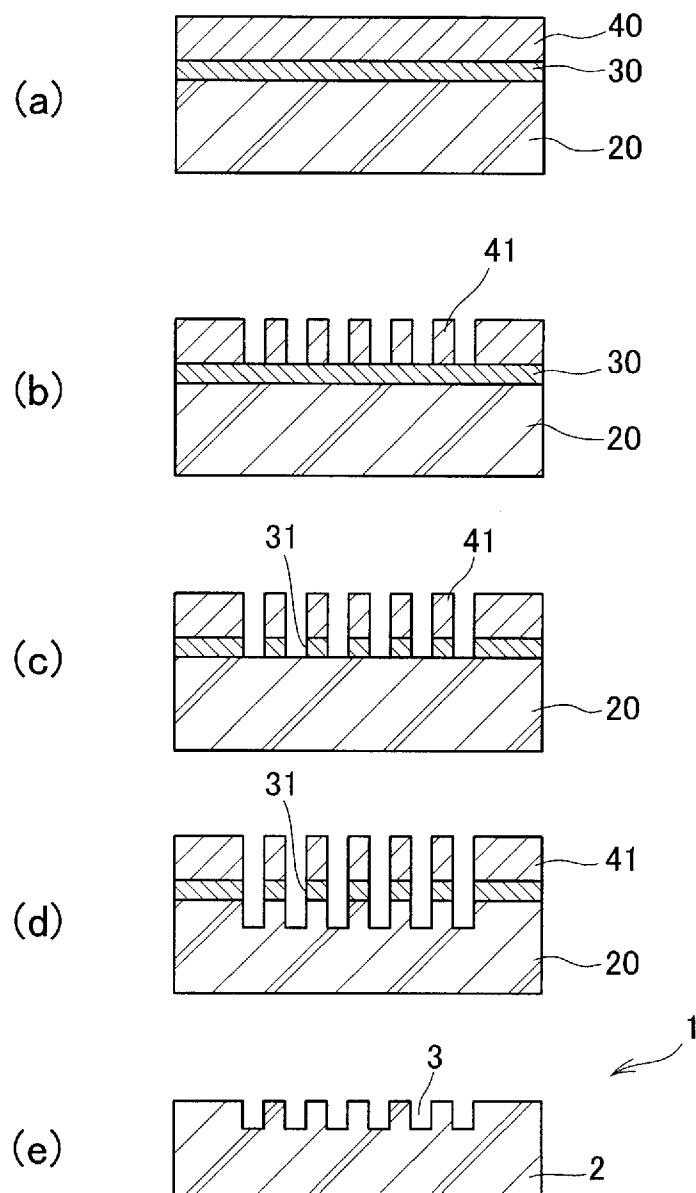


FIG.4

[図5]

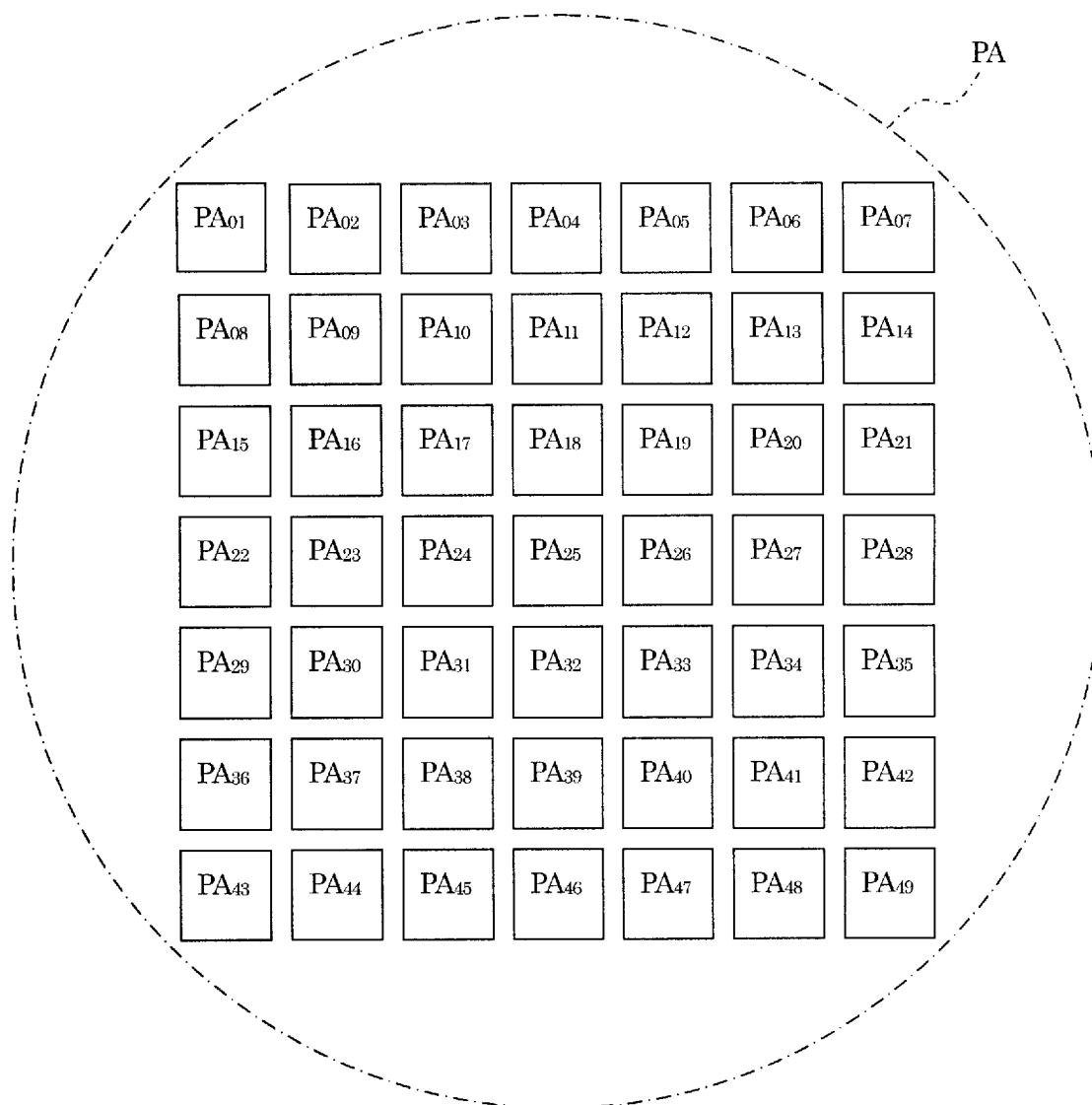
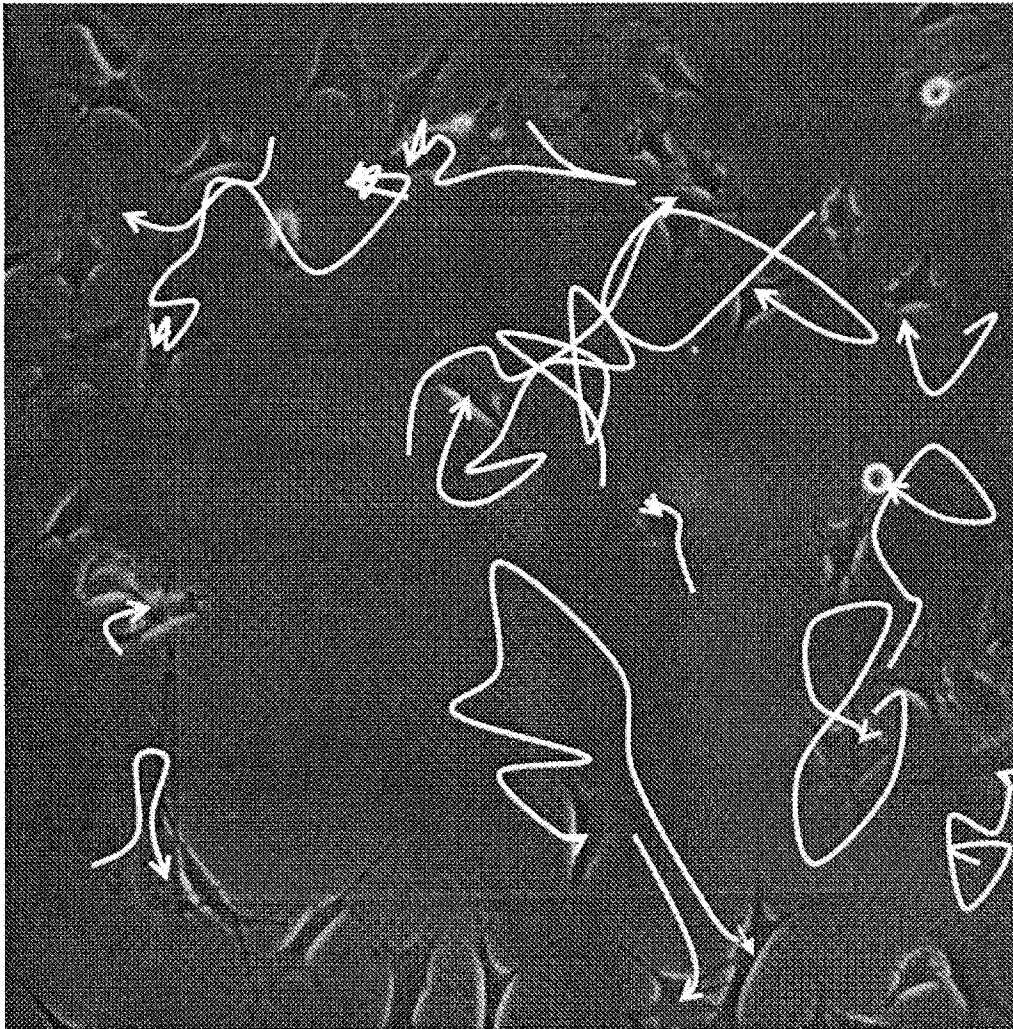
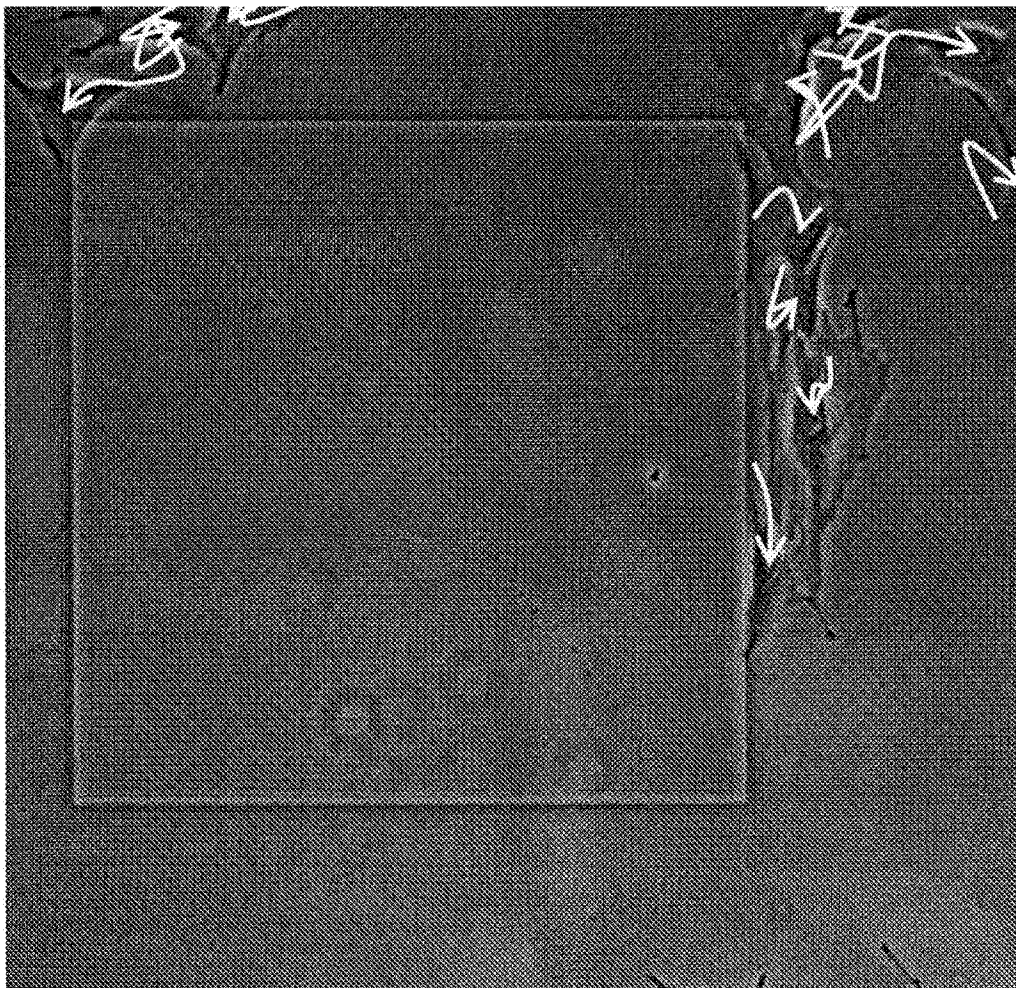


FIG. 5

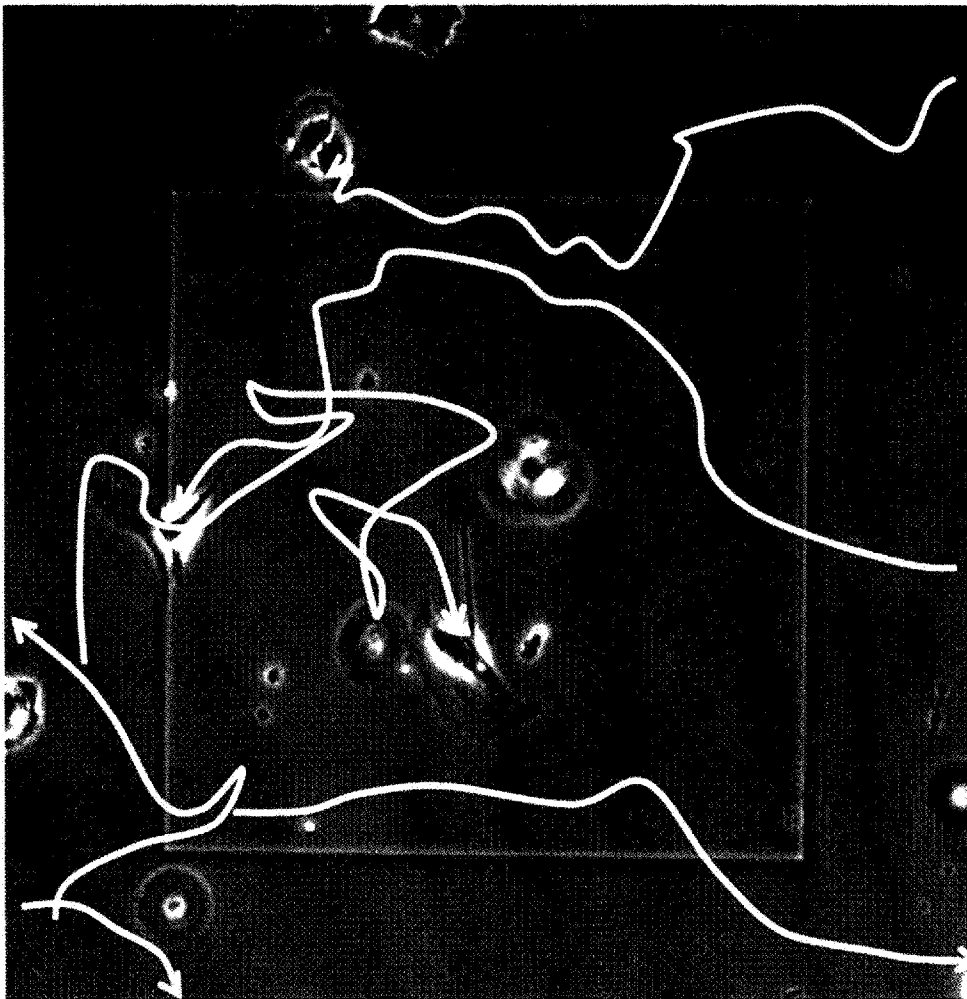
[図6]



[図7]



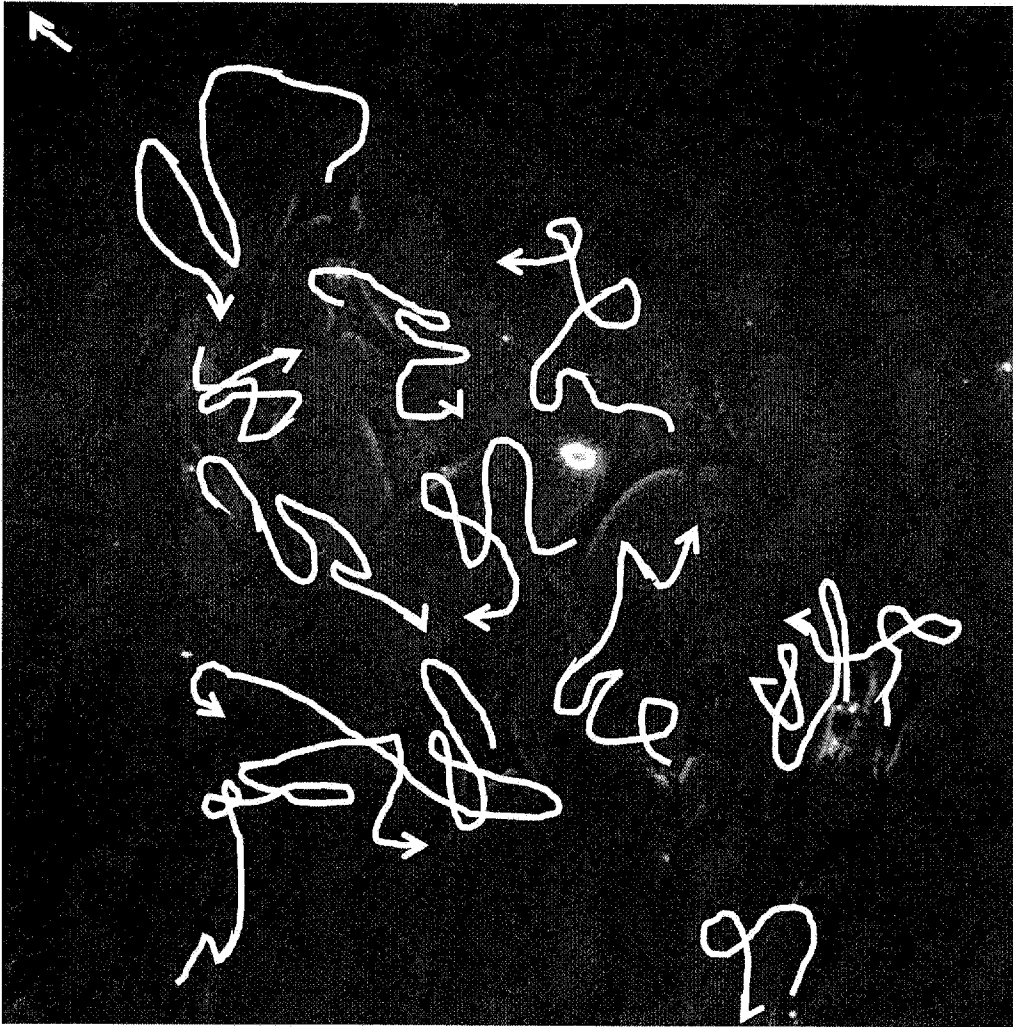
[図8]



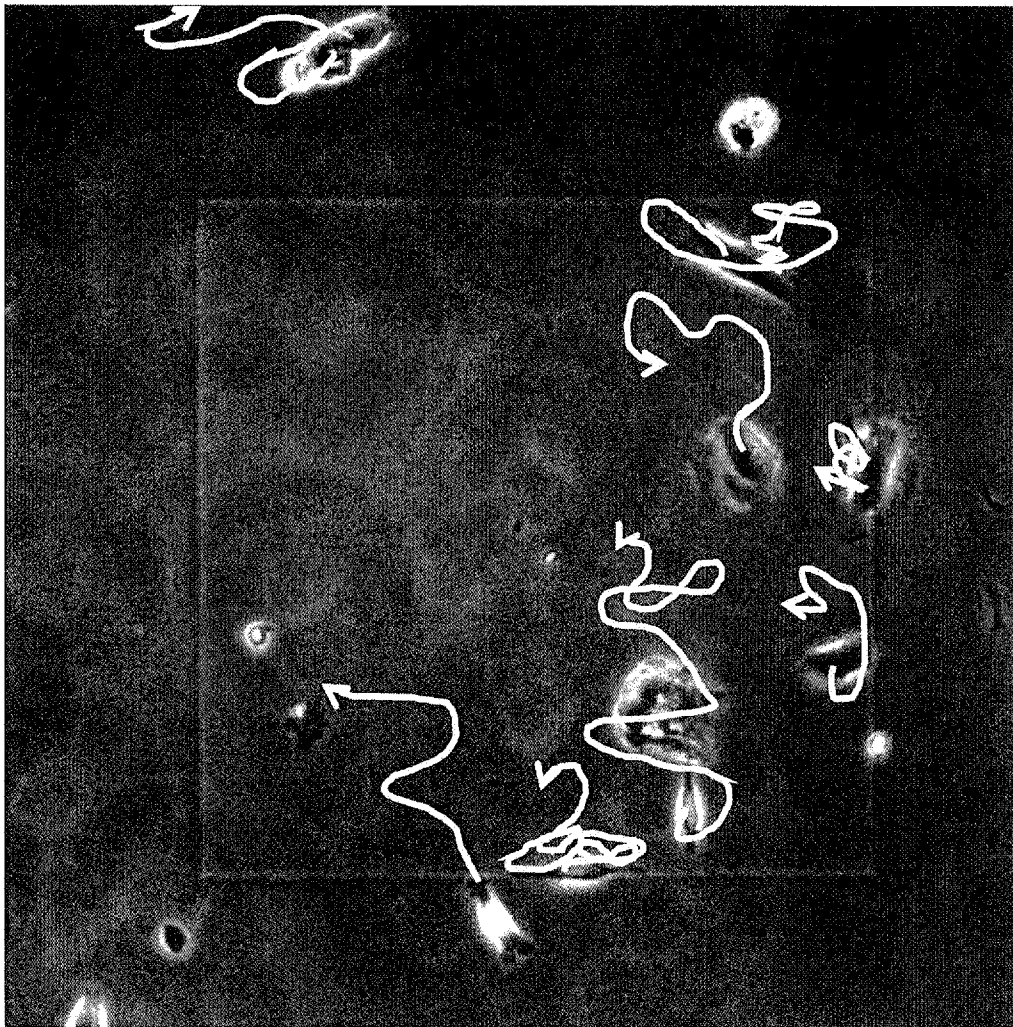
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12N5/0775(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)

C12M3/00, C12N5/0775

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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 2-76570 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 15 March 1990 (15.03.1990), claims 1 to 3; page 2, lower left column, 2nd line from the bottom to lower right column, line 7; example 1 (Family: none)	1-24
A	Masumi YAMADA et al. "Saibo no Bunri·Senbatsu no Tameno Micro Ryutai Device", Journal of the Society for Bioscience and Bioengineering, Japan, 25 April 2014 (25.04.2014), vol.92, no.4, 153 to 156	1-24
A	HUANG LR, et al., Continuous particle separation through deterministic lateral displacement., Science., 2004.05.14, Vol.304(5673), 987-990	1-24

☒ 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
15 February 2016 (15.02.16)

Date of mailing of the international search report
23 February 2016 (23.02.16)

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/JP2015/085443

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2015-142526 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 06 August 2015 (06.08.2015), claims 1 to 10 (Family: none)	1-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12N5/0775(2010.01)i

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. C12M3/00, C12N5/0775

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2-76570 A (大日本印刷株式会社) 1990.03.15, 請求項 1-3, 2 頁 左下欄下から 2 行-右下欄 7 行, 実施例 1 (ファミリーなし)	1-24
A	山田 真澄ら, 細胞の分離・選抜のためのマイクロ流体デバイス, 生 物工学会誌, 2014.04.25, 92 巻 4 号, 153-156	1-24
A	HUANG LR, et al., Continuous particle separation through deterministic lateral displacement., Science., 2004.05.14, Vol.304(5673), 987-990	1-24

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
「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

15.02.2016

国際調査報告の発送日

23.02.2016

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4 N

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
P, A	JP 2015-142526 A (大日本印刷株式会社) 2015. 08. 06, 請求項 1-10 (ファミリーなし)	1-24