

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
【部門区分】 第 1 部門第 1 区分
【発行日】 令和 7 年 6 月 19 日 (2025.6.19)

【国際公開番号】 WO2024/075722
【出願番号】 特願 2024-555804 (P2024-555804)
【国際特許分類】

C 1 2 N 5/07(2010.01)
C 1 2 N 5/071(2010.01)
C 1 2 M 3/00(2006.01)
C 1 2 M 1/00(2006.01)
C 1 2 N 5/00(2006.01)
C 1 2 N 5/0735(2010.01)
C 1 2 N 5/074(2010.01)
C 1 2 N 5/0789(2010.01)
C 1 2 N 5/0797(2010.01)
C 1 2 M 1/02(2006.01)
C 0 8 J 3/12(2006.01)

10

【 F I 】

C 1 2 N 5/07
C 1 2 N 5/071
C 1 2 M 3/00 A
C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 5/00
C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N 5/074
C 1 2 N 5/0789
C 1 2 N 5/0797
C 1 2 M 1/00 C
C 1 2 M 3/00 B
C 1 2 M 1/02 A
C 0 8 J 3/12 Z C E R
C 0 8 J 3/12 C E Z

20

30

【手続補正書】
【提出日】 令和 7 年 4 月 4 日 (2025.4.4)
【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 全文
【補正方法】 変更

40

【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法、並びに温度応答性細胞培養用ビーズおよびそれを使用した培養方法に関する。

【背景技術】
【 0 0 0 2 】

細胞を原料とするバイオ医薬品や再生医療の発展に伴い、細胞を効率よく大量且つ高品質に培養する方法が求められている。浮遊性細胞と接着性細胞に分類される細胞のうち、

50

このような方法で用いられる多くの有用細胞は、間葉系幹細胞や多能性幹細胞など足場依存性細胞であり、そのような細胞は増殖には（通常）細胞が接着可能な足場を必要とする。従来はプラスチック製ディッシュやフラスコが用いられてきたが、細胞需要が拡大するにつれ、大量培養に適したマイクロキャリアを用いた培養方法に注目が集まっている。そして、合成高分子や多糖などの天然高分子などから構成されるビーズ状粒子であるマイクロキャリアが開発されている。マイクロキャリアを細胞懸濁液入りの容器に投入し培養した時に、単位培地量当たりの細胞増殖を高めることができるので、細胞が接着可能な表面積が増加する。

【0003】

マイクロキャリアを用いた培養方法において、マイクロキャリア表面に接着している細胞が増殖するために、培養液を攪拌することで、細胞とマイクロキャリアが浮遊させられる。マイクロキャリアを用いた培養方法は、攪拌条件下で行ったときに、ディッシュやフラスコを用いた従来の培養法に比べ、単位容積当たりの細胞密度を高くできる特徴がある。

10

一方、増殖後の接着性細胞は足場から剥離して回収する必要がある。一般的に、足場に接着した細胞を剥離して回収するには、トリプシンなどのタンパク質分解酵素が用いられる。特に、マイクロキャリア表面で増殖した細胞の回収には、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いてマイクロキャリアから剥離して回収することが一般的である。しかし、トリプシンなどのタンパク質分解酵素の使用は、細胞表面のタンパク質を分解するため細胞にダメージを与えることや、回収した細胞（懸濁液）からトリプシンを除くための煩雑な操作が必要なことが課題であった。

20

【0004】

細胞へのダメージを抑えた細胞回収方法として、例えば特許文献1には、下限臨界温度を有する温度応答性ポリマーを被覆したマイクロキャリアを用いる方法が開示されている。培養温度の37℃では細胞が接着および増殖し、20℃に冷却することで温度応答性ポリマーが親水化し、タンパク質分解酵素を用いることなく、細胞を回収できる。しかしながら、温度応答性マイクロキャリアは細胞の増殖性が低い課題があり、改良の必要があった。

【0005】

また、マイクロキャリアを用いた培養方法におけるタンパク質分解酵素を用いたマイクロキャリアからの剥離に起因する問題については、その問題を解決するために下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアが特許文献2、特許文献3に開示されている。特許文献2、特許文献3によれば、冷却によって下限臨界温度を示す重合体をゾル転移させることで、マイクロキャリア表面の接着力を弱めて細胞をマイクロキャリアから剥離させ、細胞を回収することができる。細胞を回収する際、冷却のみでは細胞を完全にマイクロキャリア表面から剥離することが難しいため、ラボスケールの場合、特許文献3記載のようにピペッティング操作を併用する回収方法が通常である。しかしながら、ピペッティング操作は大量培養への適用の困難さのために、特許文献2、特許文献3記載の細胞回収方法では大量培養技術の提供に至っておらず、より大量培養に適した細胞培養方法が求められた。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特許6313822号公報

【特許文献2】特許第6954047号公報

【特許文献3】特開2021-106543号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本特許の第一の目的は、下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアの細胞

50

培養後の細胞回収方法において、大量培養に適した細胞培養方法を提供することにある。本発明の第二の目的は、細胞増殖性が高い温度応答性マイクロキャリアを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

第一の目的に関し、本発明者らは、マイクロキャリアを用いた培養方法における問題の点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアの細胞培養後の細胞回収方法において、冷却工程と攪拌工程を含む方法により、マイクロキャリアから細胞を高効率かつ低侵襲に細胞を回収できることを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は以下の態様を含む。

10

【0009】

<1-1>

培養容器内で下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアを用いて接着性細胞を培養する方法であって、下記工程（１）～（４）を含むことを特徴とする方法、

（１）下限臨界温度以上の温度の培養液中で、前記マイクロキャリア表面上で前記細胞を培養する工程、

（２）工程（１）の後に、下限臨界温度以下の温度に前記培養液を冷却する工程、

（３）工程（２）の後に、培養容器中の前記培養液を攪拌し、前記マイクロキャリア表面上から細胞を剥離させる工程、

（４）工程（３）の後に、前記マイクロキャリア表面から剥離した前記細胞を回収する工程。

20

【0010】

<1-2>

工程（３）において、攪拌レイノルズ数が５０～２０００の範囲で攪拌することを特徴とする<1-1>記載の方法。

【0011】

<1-3>

工程（２）を、工程（１）で用いた培養液の１０（ v/v ）％～９０（ v/v ）％を下限臨界温度以下の温度に冷却した培養液で交換することにより行うことを特徴とする<1-1>又は<1-2>記載の方法。

30

【0012】

<1-4>

工程（４）を、メッシュを用いてマイクロキャリアを除去することにより行うことを特徴とする<1-1>～<1-3>のいずれかに記載の方法。

【0013】

<1-5>

マイクロキャリアの粒径が５０ μm ～１０００ μm であることを特徴とする<1-1>～<1-4>のいずれかに記載の方法。

【0014】

<1-6>

下限臨界温度が０℃～５０℃であることを特徴とする<1-1>～<1-5>のいずれかに記載の方法。

40

【0015】

<1-7>

接着性細胞が幹細胞であることを特徴とする<1-1>～<1-6>のいずれかに記載の方法。

【0016】

また、第二の目的に関し、本発明者らは、温度応答性マイクロキャリアは細胞の増殖性が低い課題ある点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、正電荷を有するビーズに下限臨界溶解温度を０℃～５０℃に有する温度応答性ポリマーを被覆したビーズは、細胞を良好に接着

50

可能であり、培養終了後に冷却することで細胞を剥離および回収可能なことを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は以下の態様も包含する。

<2-1> 下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーからなるポリマーコート膜と担体から構成される温度応答性ビーズであって、担体表面が正電荷を有し、温度応答性ポリマーの膜厚が 10nm ～ 1000nm であることを特徴とする温度応答性ビーズ。

<2-2> 担体表面の正電荷を有する成分が、3級アミン、4級アンモニウム塩、アルカリ土類金属塩のいずれかを含むことを特徴とする<2-1>に記載の温度応答性ビーズ。

<2-3> 担体の比重が 1.0 ～ 1.1 であることを特徴とする<2-1>又は<2-2>に記載のビーズ。

<2-4> 担体の材質がポリスチレンであることを特徴とする<2-1>～<2-3>のいずれかに記載の温度応答性ビーズ。

<2-5> 担体の粒径が $50\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ であることを特徴とする<2-1>～<2-4>のいずれかに記載の温度応答性ビーズ。

<2-6> <2-1>～<2-5>のいずれかに記載の温度応答性ビーズを用いた細胞培養方法。

【発明の効果】

【0017】

下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアの細胞培養方法において、冷却工程と攪拌工程を含む方法により、マイクロキャリアから細胞を高効率かつ低侵襲に細胞を回収できる。

また、下限臨界溶解温度を 0°C ～ 50°C に有する温度応答性ポリマーからなるポリマーコート膜と担体から構成される温度応答性ビーズであって、担体表面が正電荷を有することを特徴とする温度応答性ビーズは、細胞増殖性が高く、さらに冷却により細胞を回収できる。

【発明を実施するための形態】

【0018】

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

【0019】

<培養容器内で下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアを用いて接着性細胞を培養する方法>

第一の観点において、本発明は、温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法を提供する。本発明は培養容器内で下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアを用いて接着性細胞を培養する方法であって、下記工程(1)～(4)を含むことを特徴とする方法である。

(1) 下限臨界温度以上の温度の培養液中で、前記マイクロキャリア表面上で細胞を培養する工程、

(2) 工程(1)の後に、下限臨界温度以下の温度に培養液を冷却する工程、

(3) 工程(2)の後に、培養容器中の培養液を攪拌し、前記マイクロキャリア表面上から細胞を剥離させる工程、

(4) 工程(3)の後に、前記マイクロキャリア表面から剥離した細胞を回収する工程。

【0020】

下限臨界温度(LCST; Lower Critical Solution Temperature、以下LCSTと記載することがある)とは、この温度よりも低い温度では高分子が水に溶解して透明の溶液になるが、この温度よりも高い温度では水に不溶化して白濁するか沈殿が生じ、相分離する温度である。LCSTは特に限定はないが培養温度付近であることが好ましく、一例として 0°C ～ 50°C の範囲であり、好ましくは 20°C ～ 40°C 、さらに好ましくは 25°C ～ 35°C の範囲である。

【0021】

下限臨界温度を示す単重合体の繰返し単位とその水に対する下限臨界温度は、例えば、N-イソプロピルアクリルアミド（LCST＝32℃）、N-n-プロピルメタクリルアミド（LCST＝22℃）、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド（LCST＝28℃）、N-エトキシエチルアクリルアミド（LCST＝35℃）、N,N-ジエチルアクリルアミド（LCST＝32℃）、N-n-プロピルメタクリルアミド（LCST＝28℃）、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド（LCST＝35℃）、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド（LCST＝23℃）、又はN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド（LCST＝20℃）等が例示できる。下限臨界温度は水溶液の濃度で発現する温度が前後するが、N-イソプロピルアクリルアミドは下限臨界温度発現の濃度依存性が低いため好ましい。

10

【0022】

本発明における下限臨界温度を示す重合体の繰返し単位は、1種類のみでもよく、2種類以上を組み合わせてあってもよい。またLCSTを有するのであれば、LCSTを示す重合体の繰返し単位の他に、LCSTを示さない重合体の繰返し単位を含んでも良い。また細胞やマイクロキャリアへの接着性の向上など目的に応じてLCSTを示す重合体の他にその他高分子化合物を導入しても良い。一例として、本発明の実施例では細胞の接着性を向上させるため、カルボキシスチレンとスチレンから成る高分子化合物を導入している。一例として、重合体のうちLCSTを示すN-イソプロピルアクリルアミドの組成が10mol%以上95mol%以下であり、30mol%以上80mol%以下であると好ましく、65mol%以上70mol%以下であるとさらに好ましい。

20

【0023】

担体の材質は特に限定はないが、例えば、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、セルロース、シクロデキストリン、アクリルアミド、アルギン酸塩、デキストラン、ゼラチン、ガラスあるいはこれら2種類以上の混合物が挙げられる。

【0024】

マイクロキャリアの形状は特に限定はないが、例えば、球状、楕円球状、平板状、管状のものが挙げられる。また、マイクロキャリアは多孔質のものであってもよく多孔質のものでなくてもよい。多孔質の場合、その細孔径に限定はない。

【0025】

マイクロキャリアの直径は特に限定はないが、マイクロキャリアの長径が好ましくは50μm～1000μm、より好ましくは100～700μmである。上記範囲よりも長径が小さいと細胞との分離が難しくなり回収率が低下する。また上記範囲よりも長径が大きいと容積当たりの培養面積が小さくなる。

30

【0026】

本明細書において温度応答性マイクロキャリアとは、下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアを指す。

【0027】

マイクロキャリアへの下限臨界温度を示す重合体の被覆方法は特に限定はないが、例えば電子線照射で下限臨界温度を示す繰返し単位を化学的に被覆する方法、下限臨界温度を示す重合体を溶媒に溶解させた表面処理剤をマイクロキャリアに塗布して物理的に被覆する方法が挙げられる。

40

【0028】

LCSTを示す重合体を被覆したマイクロキャリア表面にはさらに細胞外マトリックスを被覆してもよい。細胞外マトリックスの種類は特に限定は無く、例えば、コラーゲン、アテロコラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、ゼラチン、又はラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン／ニドジェン1,2等を主成分として含有するマトリゲルを用いてもよく、これらを1種類のみでもよく、2種類以上を組み合わせてあってもよい。また、これら細胞外マトリックスのセグメントであってもよい

50

。

【0029】

接着性細胞とはマイクロキャリア等の細胞培養基材の表面に付着する細胞である。細胞の由来は特に限定はないが、例としてヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、ヌードマウス、マウス、モルモット、ブタ、ヒツジ、チャイニーズハムスター、ウシ等が挙げられる。具体的な細胞としては例えばチャイニーズハムスター卵巢由来CHO細胞やアフリカミドリザル腎臓由来Vero細胞、マウス結合組織L929細胞、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞やヒト子宮頸癌由来HeLa細胞等の種々の培養細胞株に加え、例えば生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の免疫に関与するマクロファージや樹状細胞、生体の代謝に関与する肝実質細胞、肝非実質細胞や脂肪細胞、分化能を有する細胞として、誘導多能性幹(iPS)細胞、胚性幹(ES)細胞、胚性生殖(EG)細胞、胚性癌(EC)細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞等の各種幹細胞、又は各組織の前駆細胞、さらにはそれらから分化誘導した細胞等が挙げられ、特に間葉系幹細胞は好適に用いられる。間葉系幹細胞とは、軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞等の間葉系の細胞全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞並びにその前駆細胞の集団を意味する。間葉系幹細胞の由来として特に限定はないが、骨髄、脂肪、歯髄、臍帯血、胎盤、滑膜などの組織由来やES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞由来が挙げられる。

10

20

【0030】

工程(1)は培養容器内の培養液の温度が下限臨界温度以上の温度であることで、下限臨界温度を示す重合体がゲル化し、接着性細胞がマイクロキャリアに接着し増殖できる。ヒト由来細胞を用いる場合は、高い培養効率を得ることを目的に体温付近で行うことが奨励され、一例として30℃～40℃の温度範囲が好ましく、36℃～38℃の温度範囲で行うことがさらに好ましい。下限臨界温度以外の条件に特に限定はなく、例えば静置培養で行っても攪拌培養で行ってもよいが、単位容積当たりの培養面積を高くできる攪拌培養が好ましい。

【0031】

細胞の培養密度は、細胞が接着・増殖すれば特に限定はないが、ヒト由来間葉系幹細胞の場合では、例えばマイクロキャリアの表面積当たり $1.0 \times 10^1 \text{ cells/cm}^2$ ～ $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ が好ましく、 $1.0 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2$ ～ $1.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ がより好ましい。その他の培養条件は特に限定されず、当分野において通常行われる条件下で培養を行ってよい。

30

【0032】

工程(2)における冷却時の培養液の温度は下限臨界温度から1℃以上低温であることが好ましい。マイクロキャリアの温度を降下させる方法(「冷却処理」ともいう)としては培養容器中の液体を冷却した液体に交換することや冷所保管が例示されるが、冷却にかかる時間を短縮するために冷却した液体に交換することが好ましい。冷却した液体に交換する際の交換量は特に限定はないが、一例として10%～90%が好ましく、冷却速度を上げるために50%～90%であることがより好ましい。冷却した液体に特に限定はなく、培養液やその他の培地溶液、等張液など目的に応じて選択することができる。また、冷却時間は、5分～60分が好ましい。

40

【0033】

工程(3)における攪拌方法は特に限定はないが、培養容器の中心に垂直に投入された攪拌翼を回転させる中心攪拌により培養液を攪拌する方法を例示できる。攪拌の程度は特に限定はないが、攪拌の程度を表す指標の一つである攪拌レイノルズ数が50～2000の範囲で攪拌することが好ましく、100～1800の範囲で攪拌することがより好ましく、300～1500の範囲で攪拌すると最も好ましい。攪拌レイノルズ数が50を下回ると、細胞がマイクロキャリアから完全には剥離せず回収率が低下する。また、攪拌レイノルズ数が2000を上回ると細胞が損傷し生細胞率が低下する。攪拌レイノルズ数は以

50

下の式（１）より表される。

攪拌レイノルズ数＝流体の密度×攪拌速度×攪拌径／流体の粘度・・・式（１）

また工程（３）における培養容器中の液体の温度は剥離した細胞がマイクロキャリアに再接着するのを防ぐため下限臨界温度から１℃以上低温であることが好ましい。攪拌する際の液体に特に限定はなく、培養液やその他の培地溶液、等張液など目的に応じて選択することができる。攪拌時間は細胞の回収率とダメージを考慮し、１分～６０分が好ましい。

【００３４】

工程（４）におけるマイクロキャリアと細胞を分離する方法は特に限定はなく、例えば沈降速度の違いで分離する方法や、粒径の違いで分離する方法が挙げられる。粒径の違いで分離する方法として、例えばメッシュでマイクロキャリアと細胞懸濁液を分離する方法が挙げられる。メッシュの材質は特に限定はなく、一例としてナイロンである。メッシュの開き目に特に限定はないが、一例として２０μｍ～１００μｍ、好ましくは３０μｍ～８０μｍ、さらに好ましくは４０μｍ～６０μｍである。メッシュの開き目が小さいと細胞がメッシュを通過せず細胞の回収率が低下する。またメッシュの開き目が大きいとマイクロキャリアもメッシュを通過してしまい分離が困難になる。

10

【００３５】

本発明において細胞培養容器はマイクロキャリアを攪拌して、懸濁させることができる容器であれば特に限定はない。本発明の実施例では３０ｍＬシングルユースバイオリアクター（エイブル株式会社、製品番号：ＢＷＶ－Ｓ０３Ａ）を一例として用いている。

【００３６】

本発明の培養で使用される培養液の組成については、細胞が接着・増殖すれば特に限定は無く、基礎培養液と血清からなり、抗生物質が含まれていても良い。基礎培養液の種類は特に限定はなく、例えば、ＭＥＭ、αＭＥＭ、ＤＭＥＭ、ＥＭＥＭ、ＧＭＥＭ、ＤＭＥＭ／Ｈａｍ'ｓＦ－１２、Ｈａｍ'ｓＦ－１２、Ｈａｍ'ｓＦ－１０、Ｍｅｄｉｕｍ１９９、ＲＰＭＩ１６４０などを用いることができる。血清の種類は特に限定はなく、例えば、牛胎児血清（ＦｅｔａｌＢｏｖｉｎｅＳｅｒｕｍ：ＦＢＳ）、児牛血清、成牛血清、ウマ血清、ヒツジ血清、ヤギ血清、ブタ血清、ニワトリ血清、ウサギ血清、ヒト血清が使用されるが、入手の容易さから一般的にＦＢＳがよく用いられる。培養液中の血清濃度は特に限定はない。費用体効果から一般的には２０ｖｏｌ％以下の濃度で用いられることが多いが、２０ｖｏｌ％超の濃度であっても良い。また、未処理又は未精製の血清をいずれも含まず、精製された血液由来成分又は動物組織由来成分（増殖因子など）を含有する無血清培地であってもよい。

20

30

【００３７】

生細胞率の測定方法としては特に限定はないが、一例として死細胞の細胞質を青く染色するトリパンブルー染色により、細胞の生死を判定する方法が知られている。細胞の生死判定や細胞数の計数方法は特に限定はないが、血球計算盤を用いて作業者が手動で判定する方法や自動細胞計測装置が自動で判定する方法があるが熟練度に依ることなく計測できるため自動細胞計測装置を用いた方法が好ましい。

【００３８】

<温度応答性細胞培養用ビーズおよびその培養方法>

40

第二の観点において、本発明は、温度応答性細胞培養用ビーズ及びその培養方法を提供する。本発明の温度応答性ビーズは、正電荷を有するビーズ担体に下限臨界溶解温度が０℃～５０℃の温度応答性ポリマーを被覆することの特徴とする。

【００３９】

本発明の正電荷を有するビーズ担体の構成は特に限定はない。一例として、担体表面に正電荷を有する化合物を化学的に固定したものでもよいし、物理的に固定したものでもよい。化学的に固定する方法の一例として、担体を製造する際に正電荷を含むモノマーと共重合する方法や、粒子表面を正電荷になる官能基で化学修飾する方法を例示することができる。正電荷になる官能基に特に限定はないが、一例として３級アミノ基や４級アンモニウム基やアルカリ土類金属塩が挙げられ、特に修飾が容易なことから、トリメチルアンモ

50

ニウム基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、リン酸カルシウムを例示することができる。また、物理吸着により固定する方法の一例として、カチオン性ポリマーを担体に被覆する方法や、水への溶解性が低い無機化合物を表面に被覆する方法を例示することができる。

【0040】

正電荷を有するビーズ担体の構成は特に限定はないが、培地中で緩やかに沈降させることが可能であることから比重が1.0~1.1であることが好ましく、より好ましくは1.01~1.06である。比重が1.0より小さい場合は培地に浮くため培養が困難になり、1.1より大きい場合は培地中での分散が困難になる。担体の材質は特に限定はないが、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアルキル（メタ）アクリレート、ポリアルキル（メタ）アクリルアミド、ポリエステル、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、またはそれらの共重合体の樹脂などの合成高分子、デキストラン、セルロースなどの植物由来高分子、あるいは木片やセラミックスを例示できる。ビーズの比重が培養液の比重に近く設計でき、攪拌を伴う細胞培養時にビーズの沈降を抑制できる点で、好ましくはポリスチレン、ポリアルキル（メタ）アクリレート、ポリアルキル（メタ）アクリルアミド、ポリエステル、ポリウレタンなどの合成高分子製ビーズ担体、より好ましくは、ポリスチレン製ビーズ担体である。また、ビーズ担体を構成する材質が培地へ溶出することを抑えるために、架橋されていることが好ましい。ビーズ担体の形状は特に限定はないが、板状でも球状でもよいし、多孔質体であってもよい。ビーズ担体が球状の場合、粒径に特に制限はないが、粒径が大きいと培養液中での分散が困難になり、小さいと細胞の接着が困難になることから、好ましくは50 μ m~1000 μ m、より好ましくは150 μ m~600 μ mであり、さらに好ましくは150 μ m~500 μ mである。

【0041】

本明細書において、下限臨界溶解温度（LCST；Lower Critical Solution Temperature）とは、ある種の高分子において水に対する溶解性が変化する温度であり、LCSTを有する高分子はLCSTよりも高温側では脱水和し、疎水相互作用が強くなり、LCSTよりも低温側では水和し、膨潤または溶解する。

【0042】

本発明の温度応答性ポリマーとは、単独重合体の水に対するLCSTが0 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ Cの間であるモノマーを繰返し単位として含むポリマーを指す。

【0043】

本発明の温度応答性ポリマーの構造は、LCSTを示す繰返し単位を含めばよく、その他の構造としてLCSTを示さない繰返し単位を含んでもよい。良好な温度応答性を示すことから、LCSTを示す繰返し単位はブロック構造であることが好ましい。本発明の温度応答性ビーズを細胞培養に用いる場合、一般的には37 $^{\circ}$ C付近で培養に供することから、LCSTを有する繰返し単位のLCSTは好ましくは0 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C、より好ましくは10 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C、さらに好ましくは20 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ Cである。LCSTが0 $^{\circ}$ C未満あるいは50 $^{\circ}$ Cを超える場合は細胞にダメージを与えるため低侵襲な細胞剥離が困難となる。0 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ CにLCSTを有する繰返し単位の一例として、N-イソプロピルメタクリルアミド（LCST=約44 $^{\circ}$ C）、N-エトキシエチルアクリルアミド（LCST=約35 $^{\circ}$ C）、N-テトラヒドロフルフルメタクリルアミド（LCST=約35 $^{\circ}$ C）、N-イソプロピルアクリルアミド（LCST=約32 $^{\circ}$ C）、N,N-ジエチルアクリルアミド（LCST=約32 $^{\circ}$ C）、N-n-プロピルメタクリルアミド（LCST=約28 $^{\circ}$ C）、N-テトラヒドロフルフルアクリルアミド（LCST=約28 $^{\circ}$ C）、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド（LCST=約22 $^{\circ}$ C）、N-n-プロピルアクリルアミド（LCST=約22 $^{\circ}$ C）、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド（LCST=約20 $^{\circ}$ C）をモノマーとして重合して生成する繰返し単位を例示することができる。温度応答性ポリマーは特に限定はないが、一例として、特許5846584号記載の（N-イソプロピルアクリルアミド）-（n-ブチルメタアクリレート）ブロック共重合体、や（N-イソプロピルアクリルアミド）-（n-ブチルアクリレート）ブロック共重合体、特許695

4047号に記載の(2-ジメチルアミノエチルメタクリレート)-(n-ブチルメタクリレート)-(N-イソプロピルアクリルアミド)ブロック共重合体や、特許7127330号に記載の(N-イソプロピルアクリルアミド)-(n-ブチルメタクリレート)-(2-メトキシエチルアクリレート)ブロック共重合体などを例示することができる。

【0044】

温度応答性ビーズの温度応答性ポリマーの膜厚は、特に限定はなく、好ましくは10nm~1000nm、さらに好ましくは50nm~500nmである。10nm未満では正電荷の効果が強く生じ温度応答性の不良につながり、1000nmを超える場合は正電荷の効果が弱まる。

【0045】

温度応答性ポリマーコート膜に担体に固定させる方法に特に限定はなく、先述のポリマーを化学固定させてもよいし、物理吸着させてもよい。物理吸着により固定化させる場合、その方法に特に限定はなく、一例として、ビーズ担体にポリマー溶液を噴霧した後に乾燥する方法を例示することができる。乾燥する方法に特に限定はないが、風乾や減圧乾燥などが挙げられる。担体が細孔を有する場合は温度応答性ポリマーを被覆する前に、溶媒に数時間浸漬するなどしてガス抜きを行うことが好ましい。

【0046】

本発明の温度応答性ビーズは、マイクロキャリアとして、細胞培養に用いることができる。細胞の種類は、細胞を剥離するために冷却する前の温度応答性ビーズに接着する細胞であれば特に限定はないが、例としてヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、ヌードマウス、マウス、モルモット、ブタ、ヒツジ、チャイニーズハムスター、ウシ、由来の細胞等が挙げられる。具体的な細胞としては例えばチャイニーズハムスター卵巢由来CHO細胞やアフリカミドリサル腎臓由来Vero細胞、マウス結合組織L929細胞、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞やヒト子宮頸癌由来HeLa細胞等の種々の培養細胞株に加え、例えば生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の免疫に関与するマクロファージや樹状細胞、生体の代謝に関与する肝実質細胞、肝非実質細胞や脂肪細胞、分化能を有する細胞として、誘導多能性幹(iPS)細胞、胚性幹(ES)細胞、胚性生殖(EG)細胞、胚性癌(EC)細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞等の各種幹細胞、又は各組織の前駆細胞、さらにはそれらから分化誘導した細胞等が挙げられ、特に間葉系幹細胞は好適に用いられる。間葉系幹細胞とは、軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞等の間葉系の細胞全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞並びにその前駆細胞の集団を意味する。間葉系幹細胞の由来として特に限定は無いが、骨髄、脂肪、歯髄、臍帯血、胎盤、滑膜などの組織由来やES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞由来が挙げられる。

【0047】

本発明の温度応答性ビーズを用いた細胞培養で使用される培養液の組成については、細胞が接着・増殖すれば特に限定は無く、基礎培養液と血清からなり、抗生物質が含まれていても良い。基礎培養液の種類は特に限定はなく、例えば、MEM、αMEM、DMEM、EMEM、GMEM、DMEM/Ham's F-12、Ham's F-12、Ham's F-10、Medium 199、RPMI 1640などを用いることができる。血清の種類は特に限定はなく、例えば、牛胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS)、児牛血清、成牛血清、ウマ血清、ヒツジ血清、ヤギ血清、ブタ血清、ニワトリ血清、ウサギ血清、ヒト血清が使用されるが、入手の容易さから一般的にFBSがよく用いられる。培養液中の血清濃度は特に限定はない。費用効果から一般的には20vol%以下の濃度で用いられることが多いが、20vol%超の濃度であっても良い。また、未処理又は未精製の血清をいずれも含まず、精製された血液由来成分又は動物組織由来成分(増殖因子など)を含有する無血清培地であってもよい。

【0048】

本発明の温度応答性ビーズを用いた細胞培養では、温度応答性ポリマーのLCSTよりも高い温度で細胞を温度応答性ビーズ上で培養し、細胞増殖後に温度応答性ポリマーのLCST以下の温度にすることで増殖した細胞をビーズから剥離する。細胞の培養方法に特に限定はなく、例えば、培地が入った細胞培養用容器に本発明の温度応答性ビーズを加え、細胞を播種後、静置、連続的に攪拌、あるいは一定時間攪拌或いは振盪することにより細胞を培養できる。本発明の温度応答性ビーズから細胞は冷却して剥離する際の冷却方法に特に限定はなく、冷所で冷却してもよいし、冷却した培地で培地交換してもよい。また細胞を効率的に剥離するため、培養基材を軽く叩いたり、揺らしたり、培養液を攪拌したり、あるいはピペティングを併用してもよい。

【0049】

細胞の播種密度は、細胞が接着・増殖すれば特に限定は無いが、ヒト由来間葉系幹細胞の場合では、例えばマイクロキャリアの表面積当たり $1.0 \times 10^1 \text{ cells/cm}^2$ ～ $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ が好ましく、 $1.0 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2$ ～ $1.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ がより好ましい。その他の培養条件は特に限定されず、当分野において通常行われる条件下で培養を行ってよい。

【実施例】

【0050】

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

【0051】

<培養容器内で下限臨界温度を示す重合体を被覆したマイクロキャリアを用いて接着性細胞を培養する方法>

参考例1 温度応答性ポリマー1の合成

200mL 2口フラスコに2-メトキシエチルアクリレート(MEA) 0.650g (5mmol)を加え、さらにシアノメチルドデシルトリチオカルボナートを31.8mg (100μmol)とアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10μmol)とtert-ブチルアルコール10mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱攪拌した。

【0052】

1回目の加熱攪拌後、n-ブチルアクリレート(BA) 3.845g (30mmol)を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10μmol)とtert-ブチルアルコール5mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱攪拌した。

【0053】

2回目の加熱攪拌後、上記にN-イソプロピルアクリルアミド(IPAAm LCST = 32℃) 7.355g (65mmol)を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10μmol)とtert-ブチルアルコール85mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱攪拌した。

【0054】

3回目の加熱攪拌後、反応液を水で再沈精製し、減圧乾燥することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をクロロホルムに溶解し、分液ロートを用いクロロホルム相を回収した。回収したクロロホルム相をエバポレーターで濃縮し、ヘプタンで再沈精製した。沈殿物をろ過で回収し、減圧乾燥することで、温度応答性ポリマー1 poly(MEA-BA-IPAAm)を8.295g得た。得られた温度応答性ポリマー1の組成はMEA:BA:IPAAm=5:30:65(mol%)、下限臨界温度は32℃、Mnは 11.8×10^4 、Mw/Mnは1.45であった。

【0055】

参考例2 温度応答性ポリマー2の合成

200mL 2口フラスコにn-ブチルアクリレート(BA) 3.845g (30mmol)を加え、さらにシアノメチルドデシルトリチオカルボナートを31.8mg (100μmol)とアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10μmol)とtert-ブチル

10

20

30

40

50

アルコール 15 mL を加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱撹拌した。

【0056】

加熱撹拌後、上記にN-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm LCST=32℃) 7.355 g (65 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 1.6 mg (10 μmol) とtert-ブチルアルコール 85 mL を加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱撹拌した。

【0057】

2回目の加熱撹拌後、反応液を水で再沈精製し、減圧乾燥することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をクロロホルムに溶解し、分液ロートを用いクロロホルム相を回収した。回収したクロロホルム相をエバポレーターで濃縮し、ヘプタンで再沈精製した。沈殿物をろ過で回収し、減圧乾燥することで、温度応答性ポリマー2 poly (BA-IPAAm) を7.591 g 得た。得られた温度応答性ポリマー2の組成はBA:IPAAm=32:68 (mol%)、下限臨界温度は32℃、Mnは 10.8×10^4 、Mw/Mnは1.35であった。

10

【0058】

参考例3 高分子化合物1の合成方法 (St/CSt)

100 mL 2口フラスコに構成成分 (A) としてp-カルボキシスチレン (CSt, pKa=4.20) 1.156 g (8 mmol) と構成成分 (B) としてスチレン (St, HLB値=0) 1.271 g (12 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 3.3 mg (20 μmol) とtert-ブチルアルコール 20 mL を加え、窒素ガス置換後、64℃で24時間加熱撹拌した。実施例1と同様の方法で精製することで、高分子化合物1 poly (CSt/St) を0.92 g 得た。得られた高分子化合物1の組成はCSt:St=33:67 (mol%)、数平均分子量Mnは 10.6×10^4 、分子量分布Mw/Mnは1.84であった。

20

【0059】

参考例4 表面処理剤1の調製

1.00 g の温度応答性ポリマー1と0.01 g の高分子化合物1と48.99 g の1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22 μm のフィルター (ミリポア製、親水性フィルター) でろ過し、表面処理剤1を得た。

30

【0060】

参考例5 表面処理剤2の調製

1.00 g の温度応答性ポリマー2と0.01 g の高分子化合物1と48.99 g の1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22 μm のフィルター (ミリポア製、親水性フィルター) でろ過し、表面処理剤2を得た。

【0061】

参考例6 表面処理剤3の調製

1.00 g の温度応答性ポリマー1と0.05 g の高分子化合物1と48.95 g の1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22 μm のフィルター (ミリポア製、親水性フィルター) でろ過し、表面処理剤3を得た。

40

【0062】

参考例7 温度応答性マイクロキャリア1の調製

25 mL のナスフラスコに5 g の無処理マイクロキャリア (Corning、製品番号: 4625、粒径: 125~212 μm) と10 g の表面処理剤1を加えて、1時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性マイクロキャリア1を得た。

【0063】

参考例8 温度応答性マイクロキャリア2の調製

50

25 mL のナスフラスコに 5 g の無処理マイクロキャリア (Corning、製品番号：4625、粒径：125～212 μm) と 10 g の表面処理剤 2 を加えて、1 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性マイクロキャリア 2 を得た。

【0064】

参考例 9 温度応答性マイクロキャリア 3 の調製

25 mL のナスフラスコに 5 g の Amber Chrom (登録商標) 1×8 塩化物フォーム, 100 - 200 mesh (Sigma-Aldrich、製品番号：217425、粒径：54～154 μm) と 10 g の表面処理剤 3 を加えて、1 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性マイクロキャリア 3 を得た。

10

【0065】

実施例 1

30 mL シングルユースバイオリアクター (エイブル株式会社、製品番号：BWV-S03A) に、0.6 g の温度応答性マイクロキャリア 1 を加え、骨髓由来ヒト間葉系幹細胞 (ロンザジャパン (株) 製、製品番号：PT-2501、Lot Number：0000603525) を 8.64×10^5 cells 播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% で (静置 59 分 → 攪拌 55 rpm、1 分) × 10 回後、CO₂ 濃度 5% で 55 rpm で 4 日間攪拌培養した。培養液には間葉系幹細胞増殖培地 2 (PromoCell、製品番号：C-28009) を 30 mL 用いた。

20

【0066】

4 日間培養後、培養液を 24 mL 抜き、4℃ に冷却した培養液を 24 mL 加え、室温 (23℃) で 10 分間静置した。その後培養液を 200 rpm (攪拌レイノルズ数：1330) × 5 分の条件で攪拌し細胞をマイクロキャリアから剥離した。攪拌後、培養液から 100 μm メッシュのセルストレーナーを用いてマイクロキャリアを除去し細胞懸濁液を得た。回収した細胞懸濁液を、160 rcf、25℃、5 分の条件で遠心後、上清を除き、PBS (-) を加え懸濁した。得られた細胞懸濁液を 0.4 w/v % のトリパンブルー溶液と 1：1 で混合し、10 μL を細胞数測定用スライド (Thermo Fisher Scientific (株) 製、商品名：Countess Cell Counting Chamber Slid) に添加し、自動セルカウンター (Thermo Fisher Scientific (株) 製、商品名：Countess II) を用いて、細胞懸濁液の細胞数 A と生細胞率を測定した。その結果、細胞数 A は 1.12×10^7 cells、生細胞率は 95% であった。また、セルストレーナーで除去したマイクロキャリアに対し、トリプシン-EDTA 溶液を用いて酵素処理を行い、冷却と攪拌操作によって剥離しなかった細胞数 B も上述と同様に測定した。これらの値を用いて、式 (2) より細胞回収率を算出した。

30

$A / (A + B) \times 100 (\%) \quad \dots \text{式 (2)}$

その結果細胞数 B は 9.74×10^5 cells、細胞回収率は 92% であった。

【0067】

実施例 2

温度応答マイクロキャリア 2 を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で行った。その結果、細胞数 A は 6.12×10^6 cells、生細胞率は 92%、細胞数 B は 6.80×10^5 cells、細胞回収率は 90% であった。

40

【0068】

実施例 3

4 日間培養後、培養液を 24 mL 抜き、4℃ に冷却した培養液を 24 mL 加え、室温 (23℃) で 10 分間静置後培養液を 15 rpm (攪拌レイノルズ数：100) × 5 分の条件で攪拌し細胞をマイクロキャリアから剥離したこと以外は実施例 1 と同様に行った。その結果、細胞数 A は 7.84×10^6 cells、生細胞率は 98%、細胞数 B は 3.05×10^6 cells、細胞回収率は 72% であった。

50

【0069】

実施例 4

4日間培養後、培養液を24mL抜き、4℃に冷却した培養液を24mL加え、室温（23℃）で10分間静置後培養液を270rpm（攪拌レイノルズ数：1800）×5分の条件で攪拌し細胞をマイクロキャリアから剥離したこと以外は実施例1と同様に行った。その結果、細胞数Aは 1.25×10^7 cells、生細胞率は89%、細胞数Bは 1.55×10^6 cells、細胞回収率は98%であった。

【0070】

実施例 5

30mL シングルユースバイオリアクターに、0.4gの温度応答性マイクロキャリア3を加え、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞を 8.64×10^5 cells播種し、37℃、CO₂濃度5%で（静置175分→攪拌80rpm、5分）×8回後、CO₂濃度5%で80rpmで4日間攪拌培養したこと以外は実施例1と同様に行った。その結果、細胞数Aは 7.75×10^6 cells、生細胞率は96%、細胞数Bは 8.60×10^5 cells、細胞回収率は90%であった。

【0071】

比較例 1

4℃に冷却した培養液を加え、室温（23℃）で10分間静置後培養液を5rpm（攪拌レイノルズ数：33）×5分の条件で攪拌し細胞をマイクロキャリアから剥離したこと以外は実施例1と同様に行った。その結果、細胞数Aは 2.39×10^6 cells、生細胞率は88%、細胞数Bは 8.47×10^6 cells、細胞回収率は22%であり、細胞回収率が大幅に低下した。

【0072】

比較例 2

4℃に冷却した培養液を加え、室温（23℃）で10分間静置後培養液を350rpm（攪拌レイノルズ数：2324）×5分の条件で攪拌し細胞をマイクロキャリアから剥離したこと以外は実施例1と同様に行った。その結果、細胞数Aは 1.29×10^7 cells、生細胞率は68%、細胞数Bは 8.23×10^5 cells、細胞回収率は94%であり、生細胞率が大幅に低下した。

【0073】

比較例 3

無処理マイクロキャリア（Corning、製品番号：4625、粒径：125～212μm）を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で行った。その結果、細胞数Aは 4.98×10^5 cells、生細胞率は92%、細胞数Bは 9.47×10^6 cells、細胞回収率は5%であった。

【0074】

比較例 4

無処理マイクロキャリア2（Amber Chrom（登録商標） 1×8塩化物フォーム, 100 - 200 mesh（Sigma-Aldrich、製品番号：217425、粒径：54～154μm））を用いたこと以外は実施例5と同様の方法で行った。その結果、細胞数Aは 2.75×10^5 cells、生細胞率は85%、細胞数Bは 9.68×10^6 cells、細胞回収率は3%であった。

【0075】

10

20

30

40

50

【表 1】

	マイクロキャリア	細胞剥離時の攪拌条件		生細胞率	細胞回収率
		攪拌速度	攪拌レイノルズ数		
実施例1	温度応答性マイクロキャリア1	200rpm	1330	95%	92%
実施例2	温度応答性マイクロキャリア2	200rpm	1330	92%	90%
実施例3	温度応答性マイクロキャリア1	15rpm	100	98%	72%
実施例4	温度応答性マイクロキャリア1	270rpm	1800	89%	98%
実施例5	温度応答性マイクロキャリア3	200rpm	1330	96%	90%
比較例1	温度応答性マイクロキャリア1	5rpm	33	88%	22%
比較例2	温度応答性マイクロキャリア1	350rpm	2324	68%	94%
比較例3	無処理マイクロキャリア	200rpm	1330	92%	5%
比較例4	無処理マイクロキャリア2	200rpm	1330	85%	3%

10

【0076】

＜温度応答性細胞培養用ビーズおよびその培養方法＞

20

〔モノマー添加率および温度応答性ポリマーの組成の解析〕

フーリエ変換核磁気共鳴（NMR）法を用いた¹H-NMR測定によって求めた。NMR装置はJNM-ECZ400S/L1（日本電子製）を使用し、温度応答性ポリマー10mgを重クロロホルム0.75mLに溶解して測定した。

〔温度応答性ポリマーの分子量、分子量分布の解析〕

温度応答性ポリマーの重量平均分子量（M_w）、数平均分子量（M_n）および分子量分布（M_w/M_n）は、GPCによって測定した。GPC装置はHLC-8320GPC（東ソー製）を使用した。カラムはTSK Gel Super AWM-H（東ソー製）を2本用い、カラム温度を40℃に設定し、濃度検出器は示差屈折計、溶離液は10mMトリフルオロ酢酸ナトリウム/2,2,2-トリフルオロエタノール溶液を用いた。試料濃度1mg/mL、試料注入量0.1mL、溶離液の流速0.6mL/minの条件で測定した。また、分子量算出用の検量線は、分子量が既知であるポリメタクリル酸メチル（PSS Polymer Standards Service GmbH製）を用い、同様の条件で測定を行って作成した。

30

【0077】

〔ポリマーコート膜厚の測定〕

温度応答性ビーズを酸化ルテニウムの蒸気雰囲気中に2時間曝し、ポリマーコート膜を染色した。染色後の温度応答性ビーズを常温硬化型エポキシ樹脂に包埋してウルトラミクロトームで切片を作製した。切片を透過型電子顕微鏡（装置名JEM-2100F、日本電子製）で観察し、画像解析により膜厚を測定した。

40

【0078】

実施例6

〔温度応答性ポリマー4の合成〕

500mL筒型フラスコ（内径80mm）に2-メトキシエチルアクリレート（MEA）1.952g（15mmol）を加え、さらにシアノメチルドデシルトリチオカルボナートを95.1mg（300μmol）とアゾビスイソブチロニトリル4.8mg（30μmol）とtert-ブチルアルコール30mLを加え、アルゴンガスに置換し、62℃の条件で24時間反応した。反応後のMEAのモノマー添加率は96%であった。

【0079】

1回目の加熱攪拌後、上記反応液にn-ブチルアクリレート（BA）11.535g（

50

90 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 4.8 mg (30 μ mol) と tert-ブチルアルコール 10 mL を加え、アルゴンガスに置換し 62 °C の条件で 24 時間反応した。反応後の BA のモノマー添加率は 95 % であった。

【0080】

加熱攪拌後、上記反応液に N-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm: LCST = 32 °C) 22.066 g (195 mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 4.8 mg (30 μ mol) と tert-ブチルアルコール 255 mL を加え、アルゴンガスに置換し、62 °C の条件で 24 時間反応した。反応後の IPAAm のモノマー添加率は 99 % であった。

【0081】

純水 2 L を加えた 3 L ビーカーに反応液全量を滴下して析出した黄色の粘性物を回収した。この粘性物を純水 2 L に 12 時間浸漬した後に、40 °C に加温して固体を回収し、100 °C で 12 時間真空乾燥を行った。この固体をクロロホルム 300 mL に溶解した後に硫酸マグネシウムを 5 g 添加して室温で 1 時間攪拌し、ろ過でろ液を回収した。ヘプタン 2 L を加えた 3 L ビーカーにろ液を滴下して析出した白色固体を回収し、100 °C で 12 時間減圧乾燥を行うことで温度応答性ポリマー 4 を 17.8 g 得た。

【0082】

温度応答性ポリマー 4 の Mn は、Mw / Mn は、組成比は MEA / BA / IPAAm = 5 / 30 / 65 mol % であった。

[表面処理剤 4 の調製]

0.1 g の温度応答性ポリマー 4 と 49.9 g の 1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22 μ m のフィルター (ミリポア製、親水性フィルター) でろ過し、ポリマー濃度 0.2 wt % の表面処理剤 4 を得た。

【0083】

[温度応答性ビーズ 1 の調製]

25 mL のナスフラスコに 5 g のリン酸カルシウムが修飾された無細孔のポリスチレン製粒子と 10 g の表面処理剤 4 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ 1 を得た。温度応答性ポリマーのコート膜厚は約 58 nm であった。

[培養評価]

Costar (R) 超低接着表面 6 well プレート (Corning 製、製品番号 3471) に、PBS (-) で洗浄した温度応答性ビーズ 1 を 60 mg 加え、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (ロンザ製、製品番号 PT-2501、ロット No. 21TL046615) を 1.0×10^5 Cells / well 播種し、37 °C、CO₂ 濃度 5 % で培養した。培地は間葉系幹細胞増殖培地 2 (PromoCell 製、製品番号 C-28009) 5 mL を用いた。4 日間培養後に培地 4 mL を抜き取り、4 °C に冷却した培地 4 mL を添加し、室温で 30 分静置し、細胞懸濁液を孔径 100 μ m のセルストレーナーを通して細胞を回収した。ストレーナーは PBS (-) 4 mL で 2 回洗浄し、細胞懸濁液とともに 200 g $\times$ 5 分の条件で遠心分離して上清を除去した後に培地で懸濁して冷却処理で回収した細胞数を測定した。さらに冷却処理で剥離しなかった細胞 (残存細胞) をトリプシンを用いた酵素処理で回収し、残存細胞数として細胞数を測定した。冷却処理で回収した細胞数と残存細胞数の合計から細胞増殖率を算出し、冷却処理で回収した細胞数と残存細胞数の合計と冷却処理で回収した細胞数から細胞回収率を算出した。細胞増殖率は 590 %、冷却処理による細胞回収率は 86 % であった。

【0084】

実施例 7

[温度応答性ビーズ 2 の調製]

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子 (オルガノ製、製品名 アンバーライト IRA900J CL、比重 1.06) と 10 g の表面処理剤 4 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧

10

20

30

40

50

することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ2を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は62nmであった。

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ2を200mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は710%、細胞回収率は89%であった。

【0085】

実施例8

〔温度応答性ビーズ3の調製〕

25mLのナスフラスコに5gの3級アミンを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーリストA21、比重1.07）と10gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ3を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は66nmであった。

【0086】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ3を90mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は430%、細胞回収率は91%であった。

【0087】

実施例9

〔表面処理剤5の調製〕

0.025gの温度応答性ポリマー4と、49.975gの1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22μmのフィルター（ミリポア製、親水性フィルター）でろ過し、ポリマー濃度0.05wt%の表面処理剤5を調製した。

〔温度応答性ビーズ4の調製〕

25mLのナスフラスコに5gの4級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライトIRA900J C1、比重1.06）と10gの表面処理剤5を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ4を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は16nmであった。

【0088】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ4を200mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は750%、細胞回収率は83%であった。

【0089】

実施例10

〔表面処理剤6の調製〕

0.5gの温度応答性ポリマー4と、49.5gの1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22μmのフィルター（ミリポア製、親水性フィルター）でろ過し、ポリマー濃度1wt%の表面処理剤6を調製した。

〔温度応答性ビーズ5の調製〕

25mLのナスフラスコに5gの4級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライトIRA900J C1、比重1.06）と10gの表面処理剤6を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ5を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は253nmであった。

【0090】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ5を200mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は720%、細胞回収率は90%であった。

【0091】

実施例 11

〔表面処理剤 7 の調製〕

1 g の温度応答性ポリマー 4 と、49 g の 1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晚静置して溶解した。その後、0.22 μm のフィルター（ミリポア製、親水性フィルター）でろ過し、ポリマー濃度 2 wt % の表面処理剤 7 を調製した。

〔温度応答性ビーズ 6 の調製〕

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライト IRA900J CL、比重 1.06）と 10 g の表面処理剤 7 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ 6 を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は 698 nm であった。

【0092】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ 6 を 200 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 680 %、細胞回収率は 92 % であった。

【0093】

実施例 12

〔温度応答性ポリマー 5 の合成〕

500 mL 筒型フラスコ（内径 80 mm）に n-ブチルアクリレート（BA）5.165 g（60 mmol）、シアノメチルドデシルトリチオカルボナートを 95.1 mg（300 μmol ）とアゾビスイソブチロニトリル 4.8 mg（30 μmol ）と tert-ブチルアルコール 30 mL を加え、アルゴンガスに置換し、62 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 24 時間反応した。反応後の BA のモノマー添加率は 97 % であった。

【0094】

加熱攪拌後、上記反応液に N-イソプロピルアクリルアミド（IPAAm：LCST = 32 $^{\circ}\text{C}$ ）27.158 g（240 mmol）を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル 4.8 mg（30 μmol ）と tert-ブチルアルコール 255 mL を加え、アルゴンガスに置換し、62 $^{\circ}\text{C}$ の条件で 24 時間反応した。反応後のモノマー添加率は 98 % であった。

【0095】

純水 2 L を加えた 3 L ビーカーに反応液全量を滴下して析出した黄色の粘性物を回収した。この粘性物を純水 2 L に 12 時間浸漬した後に、40 $^{\circ}\text{C}$ に加温して固体を回収し、100 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間真空乾燥を行った。この固体をクロロホルム 300 mL に溶解した後に硫酸マグネシウムを 5 g 添加して室温で 2 時間攪拌し、ろ過でろ液を回収した。ヘプタン 2 L を加えた 3 L ビーカーにろ液を滴下して析出した白色固体を回収し、100 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間減圧乾燥を行うことで温度応答性ポリマー 5 を 21.2 g 得た。

【0096】

温度応答性ポリマー 5 の Mn は、Mw / Mn は、組成比は BA / IPAAm = 25 / 75 mol % であった。

〔表面処理剤 8 の調製〕

0.1 g の温度応答性ポリマー 5 と 49.9 g の 1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晚静置して溶解した。その後、0.22 μm のフィルター（ミリポア製、親水性フィルター）でろ過し、ポリマー濃度 0.2 wt % の表面処理剤 8 を得た。

【0097】

〔温度応答性ビーズ 7 の調製〕

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライト IRA900J CL、比重 1.06）と 10 g の表面処理剤 8 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ 7 を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は

10

20

30

40

50

52 nmであった。

【0098】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ7を200 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は720%、細胞回収率は71%であった。

【0099】

比較例5

〔温度応答性ビーズ8の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gのポリスチレン製担体、比重1.05)と10 gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧すること溶媒を留去し、温度応答性ビーズ8を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は52 nmであった。

【0100】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ8を60 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は250%、細胞回収率は80%であった。

【0101】

比較例6

〔表面処理剤9の調製〕

0.05 gの温度応答性ポリマー1と499.95 gの1-メトキシ-2-プロパノールをガラス製容器に入れて一晩静置して溶解した。その後、0.22 μmのフィルター（ミリポア製、親水性フィルター）でろ過し、ポリマー濃度0.01 wt%の表面処理剤9を得た。

【0102】

〔温度応答性ビーズ9の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gの4級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライトIRA900J C1、比重1.06)と10 gの表面処理剤9を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ9を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は5 nmであった。

【0103】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ9を200 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は770%、細胞回収率は4%であった。

【0104】

比較例7

〔温度応答性ビーズ10の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gのスルホン酸を修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライト200CT Na、比重1.04)と10 gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ10を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は55 nmであった。

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ10を120 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。培養後に細胞はビーズに接着しておらず、細胞増殖率は90%であった。

【0105】

比較例8

〔温度応答性ビーズ11の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gのカルボン酸を修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子（オルガノ製、製品名アンバーライトIRC76、比重1.04)と10 gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、

温度応答性ビーズ 11 を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は 59 nm であった。

【0106】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ 11 を 140 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。培養後に細胞はビーズに接着しておらず、細胞増殖率は 90 % であった。

比較例 9

〔培養評価〕

リン酸カルシウムが修飾された無細孔のポリスチレン粒子をビーズとして 60 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 590 %、細胞回収率は 3 % であった。

10

【0107】

比較例 10

〔培養評価〕

4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するアンバーライト IRA900J C L (オルガノ製、比重 1.06) をビーズとして 200 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 730 %、細胞回収率は 4 % であった。

比較例 11

〔培養評価〕

3 級アミンを修飾した細孔を有するアンバーリスト A21 (オルガノ製、比重 1.07) をビーズとして 90 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 460 %、細胞回収率は 2 % であった。

20

【0108】

実施例 13

〔温度応答性ビーズ 12 の調製〕

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子 (シグマアルドリッチ製、製品名 Amber Chrom 1×8 200-400 mesh、比重 1.09) と 10 g 表面処理剤 4 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ 12 を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は 50 nm であった。

【0109】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ 12 を 20 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 790 %、細胞回収率は 88 % であった。

30

【0110】

実施例 14

〔温度応答性ビーズ 13 の調製〕

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子 (シグマアルドリッチ製、製品名 Amber Chrom 1×8 100-200 mesh、比重 1.09) と 10 g の表面処理剤 5 を加えて、2 時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ 13 を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は 12 nm であった。

40

【0111】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ 13 を 35 mg 用いたこと以外は実施例 6 と同様に行った。細胞増殖率は 830 %、細胞回収率は 80 % であった。

【0112】

実施例 15

〔温度応答性ビーズ 14 の調製〕

25 mL のナスフラスコに 5 g の 4 級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子 (シグマアルドリッチ製、製品名 Amber Chrom 1×8 100

50

−200 mesh、比重1.09)と10 gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ14を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は61 nmであった。

【0113】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ14を35 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は750%、細胞回収率は86%であった。

【0114】

実施例16

〔温度応答性ビーズ15の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gの4級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子(シグマアルドリッチ製、製品名Amber Chrom1×8 50−100 mesh、比重1.09)と10 gの表面処理剤4を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ15を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は44 nmであった。

【0115】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ15を100 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は790%、細胞回収率は85%であった。

【0116】

比較例12

〔温度応答性ビーズ16の調製〕

25 mLのナスフラスコに5 gの4級アンモニウムクロリドを修飾した細孔を有するポリスチレン製粒子(シグマアルドリッチ製、製品名Amber Chrom1×8 100−200 mesh、比重1.09)と10 gの表面処理剤9を加えて、2時間静置した。その後エバポレーターで減圧することで溶媒を留去し、温度応答性ビーズ16を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は5 nmであった。

【0117】

〔培養評価〕

温度応答性ビーズ16を35 mg用いたこと以外は実施例6と同様に行った。細胞増殖率は750%、細胞回収率は6%であった。

【0118】

〔表2〕

	ポリマーコート膜		担体			培養評価結果	
	温度応答性ポリマー	膜厚	担体	担体表面構成成分	粒径	細胞増殖率	細胞回収率
実施例6	p(MEA/BA/IPAAm)	58nm	リン酸加シウム表面ポリスフィン	リン酸加シウム	200 μm	590%(○)	86%(○)
実施例7	p(MEA/BA/IPAAm)	62nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	710%(○)	89%(○)
実施例8	p(MEA/BA/IPAAm)	66nm	3級アミン表面ポリスフィン	N(CH ₃) ₂	250 μm	480%(○)	91%(○)
実施例9	p(MEA/BA/IPAAm)	16nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	750%(○)	88%(○)
実施例10	p(MEA/BA/IPAAm)	253nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	720%(○)	90%(○)
実施例11	p(MEA/BA/IPAAm)	698nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	880%(○)	92%(○)
実施例12	p(BA/IPAAm)	52nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	720%(○)	71%(○)
比較例5	p(MEA/BA/IPAAm)	52nm	ポリスフィン	-	200 μm	250%(×)	80%(○)
比較例6	p(MEA/BA/IPAAm)	5nm	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	770%(○)	4%(×)
比較例7	p(MEA/BA/IPAAm)	55nm	スルホン酸塩表面ポリスフィン	SO ₃ Na	360 μm	90%(×)	-
比較例8	p(MEA/BA/IPAAm)	59nm	加水分解性塩表面ポリスフィン	COONa	400 μm	80%(×)	-
比較例9	-	-	リン酸加シウム表面ポリスフィン	リン酸加シウム	200 μm	590%(○)	9%(×)
比較例10	-	-	4級アンモニウム塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	520 μm	730%(○)	4%(×)
比較例11	-	-	3級アミン表面ポリスフィン	N(CH ₃) ₂	250 μm	480%(○)	2%(×)

【0119】

10

20

30

40

50

【表 3】

	ポリマーコート膜		担体			培養評価結果	
	温度応答性ポリマー	膜厚	担体	担体表面構成成分	粒径	細胞増殖率	細胞回収率
実施例13	p(MEA/BA/IPAAm)	50nm	4級アミン塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	60 μm	790%(○)	88%(○)
実施例14	p(MEA/BA/IPAAm)	12nm	4級アミン塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	95 μm	830%(○)	80%(○)
実施例15	p(MEA/BA/IPAAm)	61nm	4級アミン塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	95 μm	750%(○)	86%(○)
実施例16	p(MEA/BA/IPAAm)	44nm	4級アミン塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	290 μm	790%(○)	85%(○)
比較例12	p(MEA/BA/IPAAm)	5nm	4級アミン塩表面ポリスフィン	N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl	95 μm	750%(○)	6%(×)

細胞増殖率＝（冷却処理回収細胞数＋残存細胞数）／初期播種数×100
細胞回収率＝冷却処理回収細胞数／（冷却処理回収細胞数＋残存細胞数）×100

10

20

30

40

50