

WO 2012/036011 A1

(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
2012年3月22日(22.03.2012)



PCT



(10) 国際公開番号

WO 2012/036011 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2011/070170

(22) 国際出願日:

2011年9月5日(05.09.2011)

(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 2010-205305 2010年9月14日(14.09.2010) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 旭硝子株式会社(ASAHI GLASS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤 亨 (ITOH, Tohru) [JP/JP]; 〒2730044 千葉県船橋市行田一丁目50番1号 A G C テクノグラス株式会社内 Chiba (JP). 多田 豊(TADA, Yutaka) [JP/JP]; 〒2730044 千葉県船橋市行田一丁目50番1号 A G C テクノグラス株式会社内 Chiba (JP). 和田 綾(WADA, Aya) [JP/JP]; 〒2730044 千

葉県船橋市行田一丁目50番1号 A G C テクノグラス株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 泉名 謙治, 外(SENMYO, Kenji et al.); 〒1010035 東京都千代田区神田紺屋町17番地 S I A 神田スクエア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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

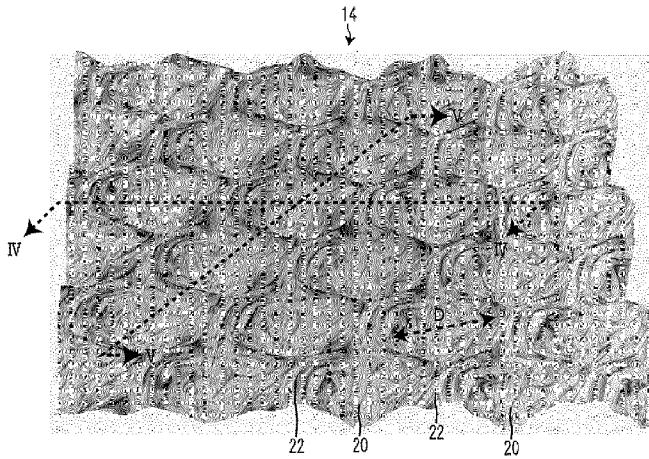
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: CULTURE SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 培養基材

[図3]



(57) Abstract: This culture substrate efficiently performs spheroid culturing. The culture substrate is a culture vessel that produces a spheroid formed from culturing and three-dimensionally clumping cells. The culture substrate comprises a synthetic resin material. A plurality of indentations (20) that serve as compartments wherein cells are cultured are formed on the surface of the culture substrate. The plurality of indentations (20) are formed by means of laser irradiation of the surface of the culture substrate. An embankment section (22) where the synthetic resin material has been melted and piled up is formed around the openings of the indentations (20). The surface of the culture substrate between two mutually adjacent indentations (20) is a non-flat surface.

(57) 要約: スフェロイド培養を効率的に行う。培養基材は、細胞を培養して三次元的に凝集させてなるスフェロイドを作製する培養容器である。培養基材は、合成樹脂材からなる。培養基材の表面には、細胞が培養される隔壁となる複数の窪み部20が形成されている。複数の窪み部20は、培養基材表面にレーザ照射することにより形成される。窪み部20の開口周辺には、合成樹脂材が溶解して盛り上がった土手部22が形成されている。互いに近接する2個の窪み部20の間の培養基材表面は、非平坦面となっている。

WO 2012/036011 A1



NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 國際調查報告 (條約第 21 条(3))
NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：培養基材

技術分野

[0001] 本発明は、細胞や組織片などの被培養物を培養してスフェロイドを作製する培養基材に関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞を二次元的に培養する単層培養に代わって、細胞を培養して三次元的に凝集させるスフェロイド培養が注目されている。スフェロイド培養は、単層培養に比べて、生体内の細胞に近い状態を構築することができ、細胞が生体内で有する特異的な機能を引き出すことができる。

[0003] スフェロイド培養を行う従来の培養基材101の一例として、例えば、図11に示した容器が挙げられる。この容器の底面114には、図12に示したように、互いに間隔を空けて複数の窪み部120が形成されている。容器の底面114は、細胞接着抑制剤（図示省略）で被膜されている（特許文献1参照）。

[0004] スフェロイド培養は、スフェロイド前駆体としての細胞が攪拌された培養液50を培養容器内に流し込み、窪み部120内で細胞を培養する。そうすると、窪み部120内の細胞は、図12に示したように、窪み部120の形状・大きさに対応して培養されて、三次元的に凝集して、スフェロイド60を形成する。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2007/055056号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ところが、上述した従来の培養基材101を用いてスフェロイド培養を行うと、スフェロイド60の他に、単層培養された細胞62や、不均一な大き

さのスフェロイドも多く形成されるという問題点が見い出された。この原因は、従来の培養基材101には、図12に示したように、互いに近接する窪み部120間の基板表面に平坦面130が形成されているからと考えられた。このように、この平坦面130が形成されている場合、培養容器内に、細胞が攪拌された培養液50を流し込むと、平坦面130上にも細胞が沈殿する。このような細胞が培養容器内に存在すると、窪み部の大きさに対応したスフェロイド60の他に、二次元的に培養されたり、窪みの大きさの影響を受けないランダムな大きさのスフェロイドが形成されたりするからである。このように、従来の培養基材101では、所望の大きさのスフェロイドを均一に形成させる培養を効率的に行うことができない。これら、単層培養された細胞や、ランダムな大きさのスフェロイドは、窪みの大きさに対応した均一なスフェロイドと比較して、生理機能が異なったり、幹細胞培養の場合には、分化のステージが異なったりなど、培養容器内の細胞群の均一性が低くなり、実験データの評価等に支障をきたす。

[0007] そこで、本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであり、所望の大きさのスフェロイドを均一に形成でき、培養を効率的に行える培養基材の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記の目的を達成するために、本発明に係る培養基材は、被培養物が培養される隔室を形成する窪み部が培養基材表面に複数形成されており、互いに近接する前記窪み部の間の培養基材表面が非平坦面であることを特徴とする。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、スフェロイド培養を効率的に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明の第1の実施形態に係る培養基材の斜視図である。

[図2]本発明の第1の実施形態に係る培養基材の縦断面図である。

[図3]本発明の第1の実施形態に係る培養基材のウェル形成領域の一部斜視図

である。

[図4]図3のIV-IV矢視断面図である。

[図5]図3のV-V矢視断面図である。

[図6]本発明の第1の実施形態に係る培養基材の表面上にレーザ光の照射スポットを模式的に示した平面図である。

[図7]本発明の第2の実施形態に係る培養基材のウェル形成領域の一部断面図である。

[図8]本発明の第3の実施形態に係る培養基材がシャーレ内に設置された状態の縦断面図である。

[図9]本発明の第4の実施形態に係る培養基材の平面図である。

[図10]本発明の第4の実施形態に係る培養基材の縦断面図である。

[図11]従来の培養基材の縦断面図である。

[図12]従来の培養基材の表面上に被培養物を模式的に示した断面図である。

発明を実施するための形態

[0011] [第1の実施形態]

本発明の第1の実施形態に係る培養基材について、図1ないし図6を用いて説明する。

図1は、本発明の培養基材を有する培養容器の斜視図である。図2は、培養容器の縦断面図である。図3は、培養基材のウェル形成領域の一部斜視図である。図4は、図3のIV-IV矢視断面図である。図5は、図3のV-V矢視断面図である。図6は、培養基材の表面上に照射するレーザ光の照射スポットを示した平面図である。

[0012] 本実施形態に係る培養基材1は、細胞を培養して三次元的に凝集させてなるスフェロイド（細胞凝集塊）を作製する培養容器の主要部である。

[0013] まず、本実施形態に係る培養基材1の構成について説明する。

培養容器は、図1および図2に示したように、容器本体10および蓋12を備えている。この例において、容器本体10の内側の底板部14が、培養基材1に相当する部分となる。かかる容器本体10の内側の底板部14、す

なわち培養基材1は、例えばポリスチレンなどの合成樹脂材から構成されている。本実施形態では、培養基材1は、合成樹脂材料を用いた射出成形により得られる。

- [0014] 容器本体10は、円板状の底板部14、および、環状の側壁部16を有している。側壁部16は、底板部14の外周縁から起立している。本実施形態では、底板部14の直径は、85mm、底板部14の厚さは、1mmに設計されている。また、側壁部16の高さは、20mmに設計されている。
- [0015] 蓋12は、容器本体10に上方の開口部に対応した形状に形成されている。蓋12は、細胞の培養環境を維持するために、容器本体10に被せられて使用される。
- [0016] 底板部14の上面（すなわち、容器本体10の内側の面に相当する培養基材の上面）のウェル形成領域24（すなわち、被培養物が培養される隔室が形成される領域）には、図2ないし図5に示したように、複数の窪み部20が形成されている。窪み部20の内面は、滑らかな凹面になっている。窪み部20は、被培養物が培養される隔室（ウェル：well）を形成する。本実施形態では、直径85mmの円形のウェル形成領域24に14200個程度（約250個/cm²）の窪み部20が形成されている。
- [0017] 本実施形態では、窪み部20は、培養基材表面のウェル形成領域24に対してレーザ光を照射することにより形成される。レーザ照射は、図6に示したように、x-y面上に設置された底板部14の上面に対して、レーザ光をz軸方向に照射して行う。
- [0018] まず、レーザ照射装置の照射部をx軸の正方向に走査させつつ、一定の間隔（例えば800μm）ごとにレーザ光を照射して、x軸方向に並んだ複数の窪み部20を形成する。続けて、照射部をy軸方向に一定の距離（例えば400μm）だけ走査させた後、照射部をx軸の負方向に走査させつつ、一定の間隔（例えば800μm）ごとにレーザ光を照射して、x軸方向に並んだ複数の窪み部20を形成する。同様に、照射部をy軸方向に一定の距離（例えば400μm）だけ走査させる。これを繰り返して、底板部14の上面

に規則的に配列された複数の窪み部 20 を形成する。

[0019] 本実施形態では、図 6 に示したように、照射スポット A の中心座標 (x, y) を原点 (0, 0) とすると、照射スポット A に近接した照射スポット B の中心は、(0.8, 0)、照射スポット C の中心は、(0.4, 0.4)、照射スポット D の中心は、(-0.4, 0.4) に位置する。このように、照射スポット A, B の x 座標と照射スポット C, D の x 座標とをずらすことにより、ウェル形成領域 24 に複数の窪み部 20 を稠密に形成することができる。窪み部 20 は、培養基材 1 のウェル形成領域 24 の単位面積あたり、10 個/cm²～10000 個/cm²、形成するのが好ましい。さらに好ましくは、20 個/cm²～8000 個/cm²、さらに好ましくは、20 個/cm²～3000 個/cm²である。

上記した数値範囲を示す「～」とは、特段の定めがない限り、その前後に記載された数値を下限値及び上限値として含む意味で使用され、以下本明細書において「～」は、同様の意味をもって使用される。

[0020] 本実施形態では、レーザ光源には、CO₂ レーザを用い、レーザ光は、出力 10 W、照射速度 6100 mm/m in でパルス照射される。照射スポットの形状は、円形であり、その直径は、約 400 μm である。スフェロイドは、小さすぎると所望の生理機能が生じず、また、大きすぎるとスフェロイドの中心部が壊死してしまう。これを考慮すると、照射スポットの直径は、20～1500 μm が適当である。

[0021] なお、照射スポットの形状は、円形であるのに対して、窪み部 20 の開口形状は、略楕円形に偏平している。この開口形状の偏平は、容器本体 10 の成形時において金型に合成樹脂材を流し込む方向に起因するものと考えられる。

[0022] 培養基材表面（底板部 14 の上面）にレーザ光が照射されると、底板部 14 を構成する合成樹脂材が溶解して、窪み部 20 が形成される。さらに、窪み部 20 の開口周辺には、図 3 ないし図 5 に示したように、溶解した合成樹脂材が盛り上がって、土手部 22 が形成される。

- [0023] 本実施形態では、互いに隣り合った2個の窪み部20は、1個または2個の土手部22を介して形成されており、互いに近接する窪み部20間の培養基材表面には、平坦面が残らない。すなわち、互いに近接する窪み部20間の培養基材表面が非平坦面30になっている。なお、図4に示した図3のIV-IV矢視断面において、隣り合った2個の窪み部20の間に介在する2個の土手部22は、互いに連結していて、非平坦面30を形成している。
- [0024] レーザ光の照射位置や出力量などの照射条件を調節することにより、近接する窪み部20間の距離、窪み部20の径・深さ、土手部22の幅・高さなどを調節できる。本実施形態では、互いに近接する窪み部20間の培養基材表面に平坦面が残らないように、すなわち、互いに近接する窪み部20間の培養基材表面が非平坦面30になるように、レーザ光の照射条件が設定されて、レーザ照射が行われる。
- [0025] なお、窪み部20の深さ（すなわち、図4、5に示したように、レーザ照射前の底板部14（すなわち、培養基材）の上面を基準とした深さ）dは、 $10 \sim 1500 \mu\text{m}$ に設計されることが望ましく、本実施形態では、 $200 \pm 20 \mu\text{m}$ に設計されている。なお、底板部14の厚さは、深さdに応じて貫通しないよう適宜設計される。また、略楕円形の窪み部20の開口の長径（レーザ照射前の底板部14の上面での長径）Dは、 $10 \sim 1500 \mu\text{m}$ に設計されることが望ましく、本実施形態では、 $500 \pm 20 \mu\text{m}$ に設計されている。さらに、土手部22の高さ（すなわち、図4、5に示したように、レーザ照射前の底板部14の上面を基準とした高さ）hは、 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ に設計されることが望ましく、本実施形態では、 $25 \pm 5 \mu\text{m}$ に設計されている。
- [0026] 底板部14の上面、すなわち培養基材相当部分の表面は、細胞接着抑制剤（図示省略）により被膜されているのが好ましい。培養基材細胞接着抑制剤は、細胞が底板部14の上面、特に、窪み部20の内面に接着するのを抑制する役割を果たす。細胞接着抑制剤としては、例えば、リン脂質ポリマー、ポリヒドロキシエチルメタアクリレート、あるいは、ポリエチレングリコ-

ルなどが用いられる。

[0027] 次に、本実施形態に係る培養基材1を用いた被培養物の培養方法について説明する。

[0028] 被培養物であるスフェロイド前駆体としての細胞を培養液50に入れて、攪拌する。攪拌後、培養液50を容器本体10内に流し入れる(図2参照)。そうすると、培養液50中の細胞は、沈殿して、窪み部20内に収まる。

[0029] その後、容器本体10に蓋12を被せて、数日～数十日間放置する。窪み部20内の細胞は、培養され、増殖する。このとき、窪み部20の内面が細胞接着抑制剤により被膜されているため、細胞は、窪み部20の形状・大きさに対応して、三次元的に凝集する。こうして、スフェロイドが得られる。

[0030] 次に、本実施形態に係る培養基材1の効果について説明する。

本実施形態によれば、互いに近接する窪み部20間の培養基材表面が非平坦面30になっている。そのため、沈殿する被培養物が窪み部20に收まりやすい。

[0031] 従来の培養基材101では、隣接する窪み部120間の培養基材表面に平坦面130が形成されている。そのため、平坦面130において、細胞が単層培養されたり、窪み部120の大きさの影響を受けないランダムな大きさのスフェロイドが形成してしまう。一方、本実施形態に係る培養基材1では、隣接する窪み部20間の培養基材表面は、非平坦面30になっている。そのため、単層培養されたり、不均一なスフェロイドが形成されにくく、均一なスフェロイドが形成される確率が高く、スフェロイド培養を効率良く行うことができる。

[0032] スフェロイドの用途や培養する細胞の種類などに応じて、作製すべきスフェロイドの大きさはそれぞれ異なる。そのため、スフェロイドの作製にあたっては、所望するスフェロイドの大きさに対応した窪み部20を備えた培養基材1を用意する必要がある。ここで、本実施形態では、レーザ照射により窪み部20および土手部22を形成する。したがって、照射位置や出力量などの照射条件を調節することによって、培養基材1に任意の大きさの窪み部

20および土手部22を容易に形成することができる。

[0033] また、培養基材として、ポリスチレンなどの透明な合成樹脂材を使用し、この合成樹脂材に対して、レーザ光照射加工により窪み部を形成した場合、窪み部20の断面形状は上開きとなり、かつ、レーザ光の熱により窪み部20の内面が滑らかになって、透過光が乱反射するのを低減することができ、窪み部20内で培養されるスフェロイドの顕微鏡による観察を、容易に行うことができる。

[0034] [第2の実施形態]

本発明の第1の実施形態に係る培養基材について、図7を用いて説明する。図7は、培養基材のウェル形成領域の一部断面図である。なお、本実施形態は、第1の実施形態の変形例であって、第1の実施形態と同一部分または類似部分には、同一符号を付して、重複説明を省略する。

[0035] 第1の実施形態では、複数の窪み部20および土手部22は、培養基材表面にレーザ光を照射することにより形成された。一方、本実施形態では、培養基材1は、複数の窪み部20を形成する凸部および土手部22を形成する凹部を備えた金型を用いて、合成樹脂材料を射出成形して得られる。複数の窪み部20および土手部22は、培養基材1の成形と同時に形成される。

[0036] 本実施形態では、図7に示したように、培養基材1の培養基材表面には、半球状の窪み部20および断面半円状の土手部22が形成されている。金型を用いて射出成型により培養基材1を製造することにより、より均一性の高い窪み部20を形成することができ、形成されるスフェロイドの均一性を高くすることができる。

[0037] [第3の実施形態]

本発明の第1の実施形態に係る培養基材について、図8を用いて説明する。図8は、培養基材がシャーレ内に設置された状態の縦断面図である。なお、本実施形態は、第1の実施形態の変形例であって、第1の実施形態と同一部分または類似部分には、同一符号を付して、重複説明を省略する。

[0038] 第1の実施形態に係る培養基材1は、培養容器の内側の底面（底板部14

の上面)に複数の窪み部20が形成されている。一方、本実施形態に係る培養基材1は、円板状に形成された合成樹脂材からなる。培養基材1は、合成樹脂材料を円板状の基板に射出成形された後、その一方の表面に対してレーザ光が照射されて、培養基材1の一方の表面に複数の窪み部20が形成されている。

[0039] 本実施形態に係る培養基材1は、図8に示したように、例えばガラス製のシャーレ40内に設置されて使用される。本実施形態によれば、第1の実施形態に比べて、培養基材1の成形が容易であり、製造コストを抑えることができる。

[0040] [第4の実施形態]

本発明の第4の実施形態に係る培養基材について、図9および図10を用いて説明する。図9は、培養基材の平面図である。図10は、培養基材を備えた容器本体と蓋を有する培養容器の縦断面図である。なお、本実施形態は、第1の実施形態の変形例であって、第1の実施形態と同一部分または類似部分には、同一符号を付して、重複説明を省略する。

[0041] 本実施形態に係る培養基材1は、図9に示したように、容器本体10の底板部14が相当し、この底板部14の上面に4つの円形のウェル形成領域24を有している。4つのウェル形成領域24は、互いに間隔を空けて配置されている。そして、培養基材1のウェル形成領域24のそれぞれに被培養物が培養される隔室を形成する窪み部が基材表面に複数形成されており、互いに近接する前記窪み部の間の基材表面が非平坦面とされている。

[0042] 本実施形態では、ピペットなどを用いて、スフェロイド前駆体としての細胞が入れられ、攪拌された培養液50や受精卵を含む培養液50を4つのウェル形成領域24上に滴下する。続いて、図10に示したように、容器本体10内にミネラルオイル52を流し入れる。このとき、培養液50とミネラルオイル52とは、混ざり合わない。この状態で数日～数十日間放置して、スフェロイドを作製したり、受精卵を培養したりする。

[0043] 本実施形態によれば、1つの培養基材1で数種類のスフェロイドを作製す

ることができる。

[0044] [他の実施形態]

上記の各実施形態は、代表的な例示であって、本発明は、これらに限定されるものではない。例えば、培養基材1の材料は、合成樹脂材ではなく、ガラスであっても良い。また、培養基材1の形状・大きさについては、任意に設計できる。さらに、窪み部20および土手部22の形状・大きさについても、培養する細胞や所望するスフェロイドの形状・大きさに応じて、任意に設計できる。

[0045] また、上記の実施形態を組み合わせても良い。例えば、第3の実施形態に係る円板状の培養基材1の窪み部20を、第2の実施形態で説明したように、射出成形により形成しても良い。

産業上の利用可能性

[0046] 本発明によれば、互いに近接する窪み部間の培養基材表面が非平坦面になっているため、沈殿する被培養物が窪み部に収まりやすく、また非平坦面になっているため、二次元的に単層に培養されたり、不均一なスフェロイドが形成されにくく、三次元的に均一に凝集されたスフェロイドが形成される確率が高く、スフェロイド培養を効率良く行うことができる。

なお、2010年9月14日に出願された日本特許出願2010-205305号の明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の開示として取り入れるものである。

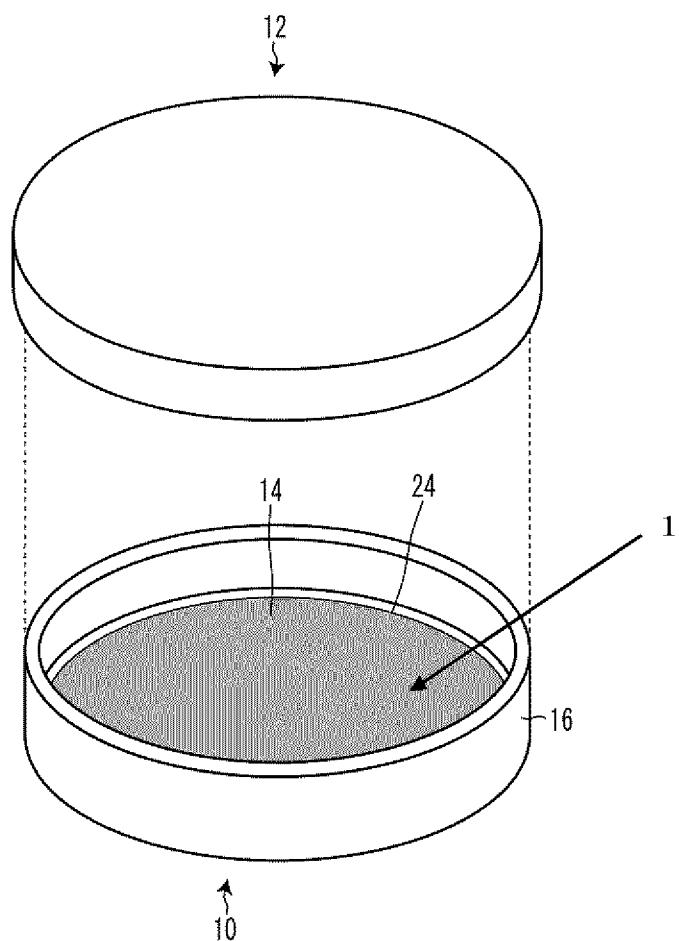
符号の説明

[0047] 1…培養基材、10…容器本体、12…蓋、14…底板部、16…側壁部、20…窪み部、22…土手部、24…ウェル形成領域、30…非平坦面、40…シャーレ、50…培養液、52…ミネラルオイル

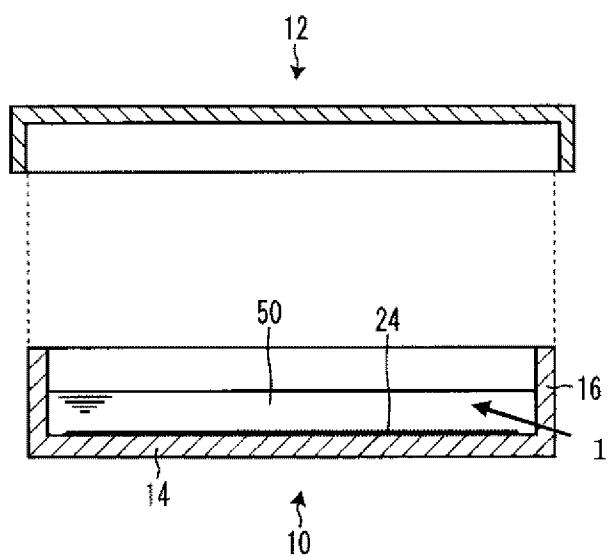
請求の範囲

- [請求項1] 被培養物が培養される隔室を形成する窪み部が培養基材表面に複数形成されており、互いに近接する前記窪み部の間の培養基材表面が非平坦面であることを特徴とする培養基材。
- [請求項2] 互いに近接する前記窪み部の間に介在する前記非平坦面が土手部を有することを特徴とする請求項1に記載の培養基材。
- [請求項3] 少なくとも前記窪み部の内面が細胞接着抑制剤により被膜されることを特徴とする請求項1または2に記載の培養基材。
- [請求項4] 前記窪み部の開口の直径が $20\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $1500\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求項1ないし3のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項5] 前記窪み部の深さが $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $1500\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項6] 前記複数の窪み部が前記培養基材表面に稠密に配置されていることを特徴とする請求項1ないし5のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項7] 前記窪み部が前記培養基材表面のウェル形成領域の表面に複数形成されていることを特徴とする請求項1ないし6のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項8] 前記複数の窪み部が、前記培養基材表面のウェル形成領域の表面に、 $10\text{ 個}/\text{cm}^2 \sim 10000\text{ 個}/\text{cm}^2$ 、形成されていることを特徴とする請求項1ないし7のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項9] 前記窪み部が前記培養基材表面へのレーザ照射により形成されていることを特徴とする請求項1ないし8のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項10] 前記培養基材の材質が合成樹脂からなることを特徴とする請求項1ないし9のいずれか一項に記載の培養基材。
- [請求項11] 請求項1ないし10のいずれか一項に記載の培養基材を備えた培養容器。

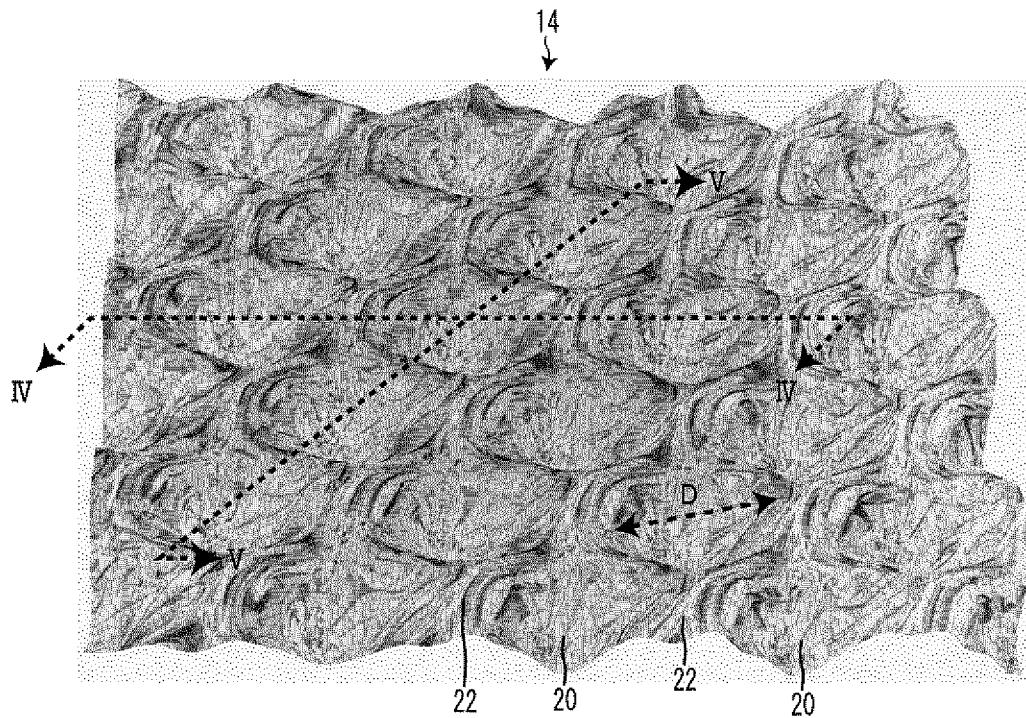
[図1]



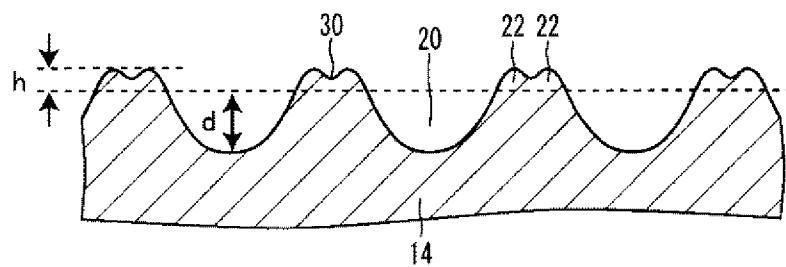
[図2]



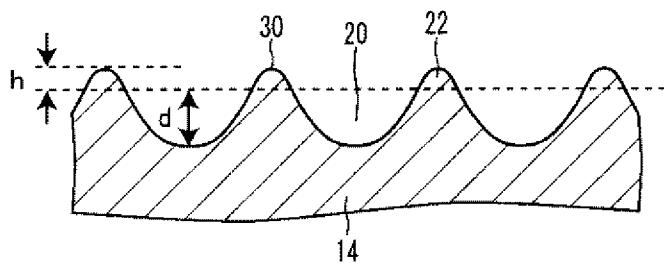
[図3]



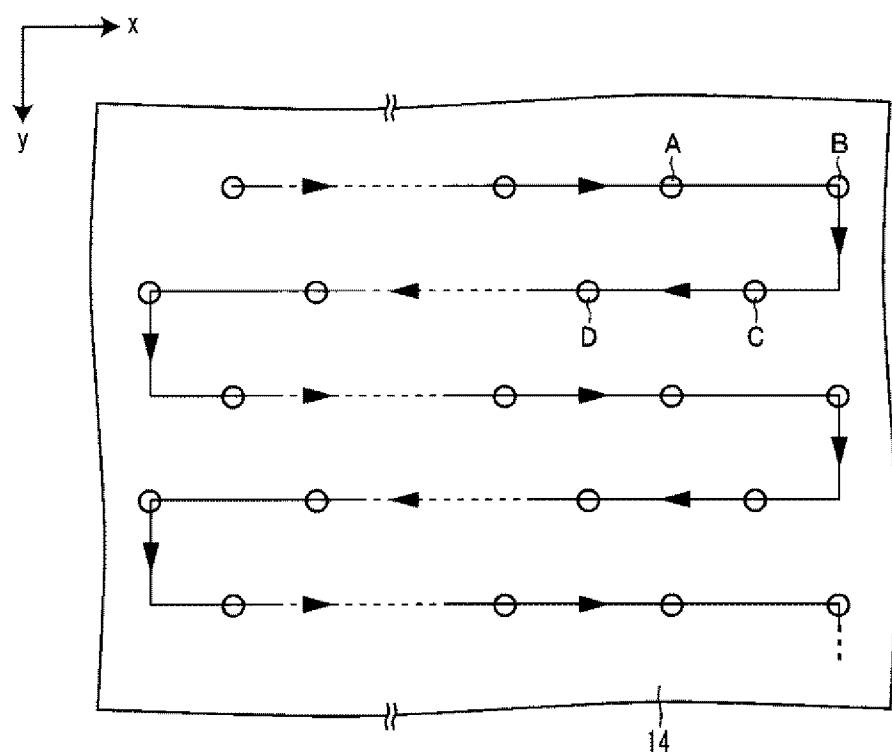
[図4]



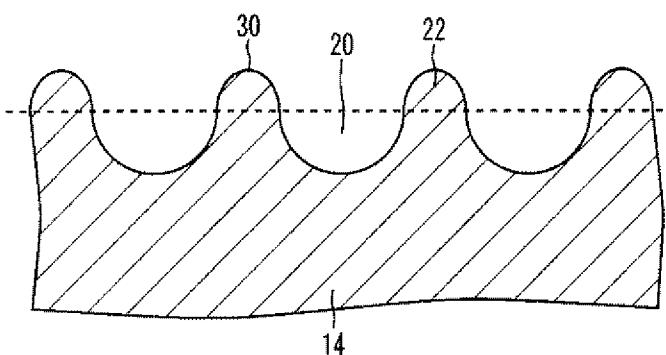
[図5]



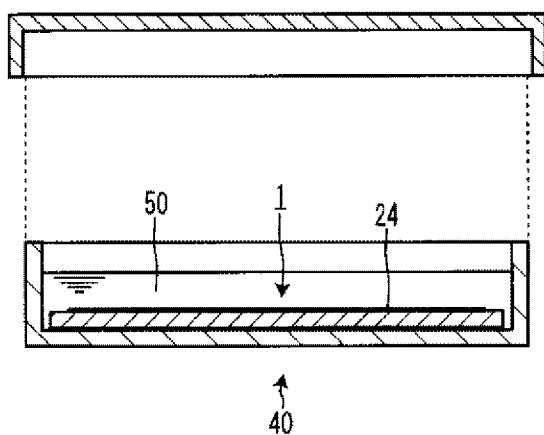
[図6]



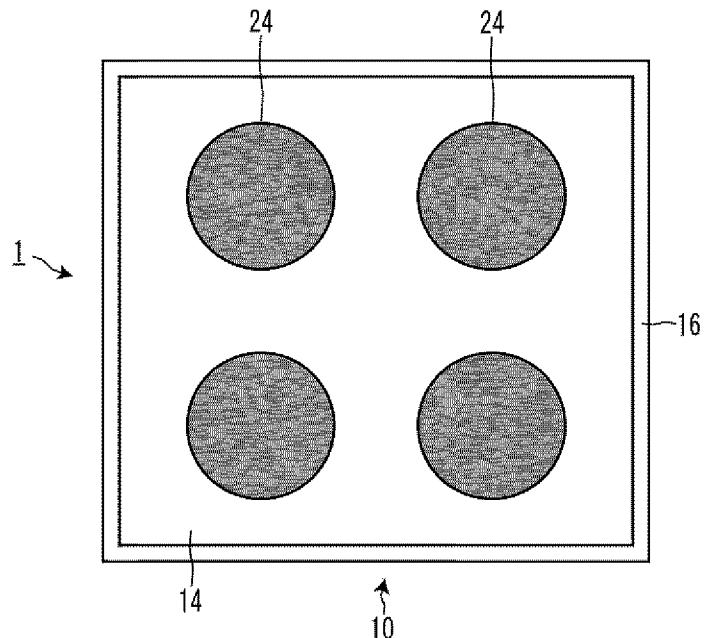
[図7]



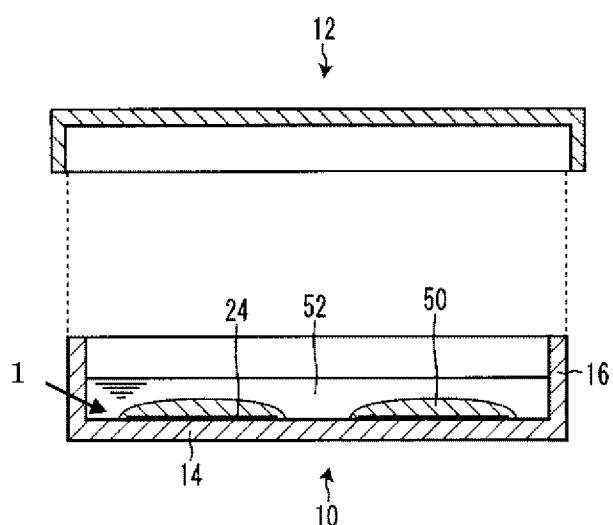
[図8]



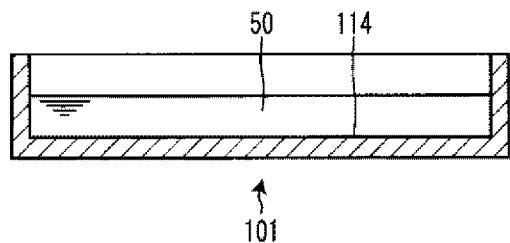
[図9]



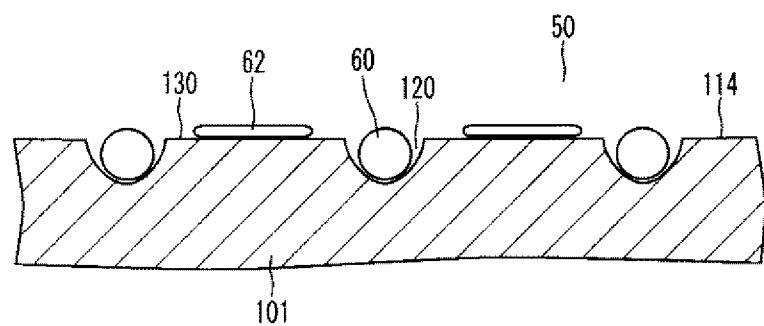
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M3/00 (2006.01) 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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-050194 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 12 March 2009 (12.03.2009), entire text (Family: none)	1-11
Y	JP 2001-522242 A (Minnesota Mining and Manufacturing Co.), 13 November 2001 (13.11.2001), page 13 & US 2001/0024805 A1 & EP 0973863 A1 & WO 1998/045406 A1 & DE 69733366 D & DE 69733366 T & AU 3829997 A & BR 9714569 A & AU 735311 B & CA 2286195 A	9-11

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
02 November, 2011 (02.11.11)

Date of mailing of the international search report
15 November, 2011 (15.11.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070170

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/156041 A1 (Kuraray Co., Ltd.), 24 December 2008 (24.12.2008), paragraph [0031] & US 2010/0190253 A1 & EP 2169049 A1 & CN 101679933 A & KR 10-2010-0020524 A	9-11
A	JP 2010-088347 A (Tohoku University), 22 April 2010 (22.04.2010), entire text (Family: none)	1-11
A	JP 2003-503021 A (University of Wales College of Medicine), 28 January 2003 (28.01.2003), entire text & US 7052720 B1 & GB 9913979 A & GB 9913979 A0 & EP 1185620 A2 & EP 1624055 A1 & WO 2000/078927 A2 & DE 60044871 D & AU 5542800 A & CA 2373391 A & AU 772667 B & AT 478940 T	1-11

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

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

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

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(JDreamII)、医学・薬学予稿集全文データベース

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 2009-050194 A (住友ベークライト株式会社) 2009.03.12, 全文 (ファミリーなし)	1-11
Y	JP 2001-522242 A (ミネソタ・マイニング・アンド・マニュファクチャリング・カンパニー) 2001.11.13, 第13頁 & US 2001/0024805 A1 & EP 0973863 A1 & WO 1998/045406 A1 & DE 69733366 D & DE 69733366 T & AU 3829997 A & BR 9714569 A & AU 735311 B & CA 2286195 A	9-11

 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

02.11.2011

国際調査報告の発送日

15.11.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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）

長谷川 茜

4N

3228

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
Y	WO 2008/156041 A1 (株式会社クラレ) 2008.12.24, 段落[0031] & US 2010/0190253 A1 & EP 2169049 A1 & CN 101679933 A & KR 10-2010-0020524 A	9-11
A	JP 2010-088347 A (国立大学法人東北大学) 2010.04.22, 全文 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2003-503021 A (ユニバーシティ オブ ウェールズ カレッジ オブ メディスン) 2003.01.28, 全文 & US 7052720 B1 & GB 9913979 A & GB 9913979 A0 & EP 1185620 A2 & EP 1624055 A1 & WO 2000/078927 A2 & DE 60044871 D & AU 5542800 A & CA 2373391 A & AU 772667 B & AT 478940 T	1-11