(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
2024年4月11日(11.04.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/075722 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/07 (2010.01)	*C12N 5/071* (2010.01)
C08J 3/12 (2006.01)	*C12N 5/0735* (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01)	*C12N 5/074* (2010.01)
C12M 3/00 (2006.01)	*C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 1/02 (2006.01)	*C12N 5/0789* (2010.01)
C12N 5/00 (2006.01)	*C12N 5/0797* (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/036049

(22) 国際出願日： 2023年10月3日(03.10.2023)

(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	2022-160144	2022年10月4日(04.10.2022)	JP
特願	2022-160143	2022年10月4日(04.10.2022)	JP
特願	2023-039008	2023年3月13日(13.03.2023)	JP
特願	2023-087922	2023年5月29日(29.05.2023)	JP

(71) 出願人: 東ソー株式会社 (**TOSOH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町４５６０番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 平床 聖也 (**HIRATOKO, Shoya**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 根津 友祐(**NEZU, Yusuke**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 今富 伸哉(**IMATOMI, Shinya**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 伊藤 博之(**ITO, Hiroyuki**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外 (**AOKI, Atsushi** et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目２３番１号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

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

(54) **Title:** CELL CULTURE METHOD USING TEMPERATURE-RESPONSIVE MICROCARRIER, AND BEADS FOR TEMPERATURE-RESPONSIVE CELL CULTURE

(54) 発明の名称： 温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法及び温度応答性細胞培養用ビーズ

(57) **Abstract:** The present invention provides: a method for culturing adhesive cells using a microcarrier coated with a polymer that exhibits a lower critical temperature within a culture vessel, wherein the method is characterized by including the following steps (1) to (4): (1) a step that cultures the cells on the microcarrier surface in a culture broth of a temperature at or above the lower critical temperature; (2) a step that, after step (1), cools the culture broth to or below the lower critical temperature; (3) a step that, after step (2), stirs the culture broth in the culture vessel, and detaches the cells from the microcarrier surface; and (4) a step that, after step (3), recovers the cells detached from the microcarrier surface; and temperature-responsive beads composed of a carrier and a polymer coat film comprising a temperature-responsive polymer having a lower critical solution temperature of 0 ° C to 50 ° C, wherein the carrier surface has a positive charge and the film thickness of the temperature-responsive polymer is 10 nm to 1000 nm.

(57) 要約：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、（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撹拌し、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、並びに 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を提供する。

WO 2024/075722 A1

［続葉有］

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国（表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能）: ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

温度応答性マイクロキャリアを用いた細胞培養方法及び温度応答性細胞培養用ビーズ

技術分野

[0001]　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の培養方法に関する。

背景技術

[0002]　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。細胞は浮遊性細胞と接着性細胞に分類されるが、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、増殖には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することで、細胞が接着可能な表面積が増加し、単位培地量当たりの細胞増殖を高めることができる。

[0003]　マイクロキャリアを用いた培養方法は、培養液を撹拌して細胞とマイクロキャリアを浮遊させ、マイクロキャリア表面に接着した細胞が増殖する方法である。マイクロキャリアを用いた培養方法は撹拌下で行うことで、従来のディッシュやフラスコを用いた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。

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、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。

[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が困難であり、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。

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培養方法において、冷却工程と撹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包する。

[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撹拌し、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。

[0010] ＜１－２＞

工程（３）において、撹拌レイノルズ数が５０～２０００の範囲で撹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。

[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５０μｍ～１０００μｍ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。

[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℃～５０℃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５０μｍ～１０００μｍであることを特徴とする＜２－１＞～＜２－４＞のいずれかに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、冷却工程と撹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℃～５０℃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撹拌し、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℃～５０℃の範囲であり、好ましくは２０℃～４０℃、さらに好ましくは２５℃～３５℃の範囲である。

[0021] 下限臨界温度を示す単独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。

[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。

[0023] マイクロキャリア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。

[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。

[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。

[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巣由来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。

[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撹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撹拌培養が好ましい。

[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１．０×１０^{1}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}～１．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}が好ましく、１．０×１０^{2}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}～１．０×１０^{4}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。

[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。

[0033] 工程（３）における撹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撹拌翼を回転させる中心撹拌により培養液を撹拌する方法を例示できる。撹拌の程度は特に限定はないが、撹拌の程度を表す指標の一つである撹拌レイノルズ数が５０～２０００の範囲で撹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。

[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（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。

[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＞

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ぶ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を特徴とする。

[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、撹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５０μｍ～１０００μｍ、より好ましくは１５０μｍ～６００μｍであり、さらに好ましくは１５０μｍ～５００μｍ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℃～５０℃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℃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℃～５０℃、より好ましくは１０℃～４０℃、さらに好ましくは２０℃～３５℃である。ＬＣＳＴが０℃未満あるいは５０℃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℃～５０℃にＬＣＳＴを有する繰り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℃）、Ｎ－エトキシエチルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約３５℃）、Ｎ－テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約３５℃）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約３２℃）、Ｎ，Ｎ－ジエチルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約３２℃）、Ｎ－ｎ－プロピルメタクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約２８℃）、Ｎ－テトラヒドロフルフリルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約２８℃）、Ｎ－メチル－Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約２２℃）、Ｎ－ｎ－プロピルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約２２℃）、Ｎ－メチル－Ｎ－ｎ－プロピルアクリルアミド（ＬＣＳＴ＝約２０℃）をモノマーとして重合して生成する繰り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６９５４０４７号に記載の（２－ジメチルアミノエチル

メタクリレート）－（ｎ－ブチルメタアクリレート）－（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－ブチルメタアクリレート）－（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巣由来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’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（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。

[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

、連続的に撹拌、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、培養液を撹拌したり、あるいはピペッ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１．０×１０^{1}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}～１．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}が好ましく、１．０×１０^{2}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}～１．０×１０^{4}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

２００ｍＬ２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時間加熱撹拌した。

[0052] １回目の加熱撹拌後、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時間加熱撹拌した。

[0053] ２回目の加熱撹拌後、上記にＮ－イソプロピルアクリルアミド（ＩＰＡＡ

ｍ　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時間加熱撹拌した。

[0054]　３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

２００ｍＬ２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１５ｍＬ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℃）７．３５５ｇ（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７．５９１ｇ得た。得られた温度応答性ポリマー２の組成はＢＡ：ＩＰＡＡｍ＝３２：６

８（ｍｏｌ％）、下限臨界温度は３２℃、Ｍｎは１０．８×１０^{4}、Ｍｗ／Ｍｎは１．３５であった。

[0058] 参考例３　高分子化合物１の合成方法（Ｓｔ/ＣＳｔ）

１００ｍＬ２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）１．１５６ｇ（８ｍｍｏｌ）と構成成分（Ｂ）としてスチレン（Ｓｔ，ＨＬＢ値＝０）１．２７１ｇ（１２ｍｍｏｌ）を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル３．３ｍｇ（２０μｍｏｌ）とｔｅｒｔ－ブチルアルコール２０ｍＬ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１ｐｏｌｙ（ＣＳｔ／Ｓｔ）を０．９２ｇ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。

[0059] 参考例４　表面処理剤１の調製

１．００ｇの温度応答性ポリマー１と０．０１ｇの高分子化合物１と４８．９９ｇ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、表面処理剤１を得た。

[0060] 参考例５　表面処理剤２の調製

１．００ｇの温度応答性ポリマー２と０．０１ｇの高分子化合物１と４８．９９ｇ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、表面処理剤２を得た。

[0061] 参考例６　表面処理剤３の調製

１．００ｇの温度応答性ポリマー１と０．０５ｇの高分子化合物１と４８．９５ｇ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、表面処理剤３を得た。

[0062] 参考例７　温度応答性マイクロキャリア１の調製

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇの無処理マイクロキャリア（Ｃｏｒｎｉｎｇ、製品番号：４６２５、粒径：１２５～２１２μｍ）と１０ｇ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

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇの無処理マイクロキャリア（Ｃｏｒｎｉｎｇ、製品番号：４６２５、粒径：１２５～２１２μｍ）と１０ｇ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

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇのＡｍｂｅｒＣｈｒｏｍ（登録商標）　１×８塩化物フォーム,１００‐２００ｍｅｓｈ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、製品番号：２１７４２５、粒径：５４～１５４μｍ）と１０ｇ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。

[0065] 実施例１

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）に、０．６ｇの温度応答性マイクロキャリア１を加え、骨髄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：０００００６０３５２５）を８．６４×１０^{5}ｃｅｌｌｓ播種し、３７℃、CO_2濃度５％で（静置５９分→撹拌５５ｒｐｍ、１分）×１０回後、５５ｒｐｍで４日間撹拌培養した。培養液には間葉系幹細胞増殖培地２（ＰｒｏｍｏＣｅｌｌ、製品番号：Ｃ－２８００９）を３０ｍL用いた。

[0066] 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分間静置した。その後培養液を２００ｒｐｍ（撹拌レイノルズ数：１３３０）×５分の条件で撹拌し細胞をマイクロキャリアから剥離した。撹拌後、培養液から１００μｍ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、１６０ｒｃｆ、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０．４ｗ／ｖ％のトリパンブルー溶液と１：１で混合し、１０μＬ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　ⅡＩ）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、冷却と撹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。

Ａ／（Ａ＋Ｂ）×１００（％）　・・・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。

[0068]　実施例３

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１５ｒｐｍ（撹拌レイノルズ数：１００）×５分の条件で撹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。

[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（撹拌レイノルズ数：１８００）×５分の条件で撹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→撹拌８０ｒｐｍ、５分）×８回後、８０ｒｐｍで４日間撹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（撹拌レイノルズ数：３３）×５分の条件で撹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（撹拌レイノルズ数：２３２４）×５分の条件で撹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（ＡｍｂｅｒＣｈｒｏｍ（登録商標）　１×８塩化物フォーム,１００‐２００ｍｅｓｈ（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] [表1]

	マイクロキャリア	細胞剥離時の撹拌条件		生細胞率	細胞回収率
		撹拌速度	撹拌レイノルズ数		
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%

[0076] ＜温度応答性細胞培養用ビーズおよびその培養方法＞

［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（Ｍｗ）、数平均分子量（Ｍｎ）および分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）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ＴＳＫｇｅｌ 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。

[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。

[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回目の加熱撹拌後、上記反応液にｎ－ブチルアクリレート（ＢＡ）１１．５３５ｇ（９０ｍｍｏｌ）を加え、さらに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１０ｍＬ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ＢＡのモノマー添加率は９５％であった。

[0080] 加熱撹拌後、上記反応液にＮ－イソプロピルアクリルアミド（ＩＰＡＡｍ：ＬＣＳＴ＝３２℃）２２．０６６ｇ（１９５ｍｍｏｌ）を加え、さらに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２５５ｍＬ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ＩＰＡＡｍのモノマー添加率は９９％であった。

[0081] 純水２Ｌを加えた３Ｌ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２Ｌに１２時間浸漬した後に、４０℃に加温して固体を回収し、１００℃で１２時間真空乾燥を行った。この固体をクロロホルム３００ｍＬに溶解した後に硫酸マグネシウムを５ｇ添加して室温で１時間撹拌し、ろ過でろ液を回収した。ヘプタン２Ｌを加えた３Ｌ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℃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１７．８ｇ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＝５／３０／６５ｍｏｌ％であった。

［表面処理剤４の調製］

０．１ｇの温度応答性ポリマー４と４９．９ｇ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０．２ｗｔ％の表面処理剤４を得た。

[0083] ［温度応答性ビーズ１の調製］

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇ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１を得た。温度応答性ポリマーのコート膜厚は約５８ｎｍであった。

［培養評価］

Ｃｏｓｔａｒ（R）超低接着表面６ｗｅｌｌ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６０ｍｇ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℃、CO_2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）５ｍＬを用いた。４日間培養後に培地４ｍＬを抜き取り、４℃に冷却した培地４ｍＬを添加し、室温で３０分静置し、細胞懸濁液を孔径１００μｍ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（－）４ｍＬで２回洗浄し、細胞懸濁液とともに２００ｇ×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］

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　ＣＩ、比重１．０６）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　ＣＩ、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　ＣＩ、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］

１ｇの温度応答性ポリマー４と、４９ｇ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２ｗｔ％の表面処理剤７を調製した。

［温度応答性ビーズ６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　ＣＩ、比重１．０６）と１０ｇ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６９８ｎｍであった。

[0092]　［培養評価］

温度応答性ビーズ６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］

５００ｍＬ筒型フラスコ（内径８０ｍｍ）にｎ－ブチルアクリレート（ＢＡ）５．１６５ｇ（６０ｍｍｏｌ）、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ＢＡのモノマー添加率は９７％であった。

[0094] 加熱撹拌後、上記反応液にＮ－イソプロピルアクリルアミド（ＩＰＡＡｍ：ＬＣＳＴ＝３２℃）２７．１５８ｇ（２４０ｍｍｏｌ）を加え、さらに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２５５ｍＬ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。反応後のモノマー添加率は９８％であった。

[0095] 純水２Ｌを加えた３Ｌ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２Ｌに１２時間浸漬した後に、４０℃に加温して固体を回収し、１００℃で１２時間真空乾燥を行った。この固体をクロロホルム３００ｍＬに溶解した後に硫酸マグネシウムを５ｇ添加して室温で２時間撹拌し、ろ過でろ液を回収した。ヘプタン２Ｌを加えた３Ｌ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℃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２１．２ｇ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＝２５／７５ｍｏｌ％であった。

［表面処理剤８の調製］

０．１ｇの温度応答性ポリマー５と４９．９ｇ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０．２ｗｔ％の表面処理剤８を得た。

[0097] ［温度応答性ビーズ７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　Ｃｌ、比重１．０６）と１０ｇ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５２ｎｍであった。

[0098] ［培養評価］

温度応答性ビーズ７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７１％であった。

[0099] 比較例５

［温度応答性ビーズ８の調製］

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇのポリスチレン製担体、比重１．０５）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５２ｎｍであった。

[0100] ［培養評価］

温度応答性ビーズ８を６０ｍｇ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］

０．０５ｇの温度応答性ポリマー１と４９９．９５ｇ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０．０１ｗｔ％の表面処理剤９を得た。

[0102] ［温度応答性ビーズ９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　ＣＩ、比重１．０６）と１０ｇ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５ｎｍであった。

[0103] ［培養評価］

温度応答性ビーズ９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］

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇ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１０を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は５５ｎｍであった。

［培養評価］

温度応答性ビーズ１０を１２０ｍｇ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］

２５ｍＬのナスフラスコに５ｇ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１１を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は５９ｎｍであった。

[0106] ［培養評価］

温度応答性ビーズ１１を１４０ｍｇ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６０ｍｇ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。

[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　ＣＩ（オルガノ製、比重１．０６）をビーズとして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４６０％、細胞回収率は２％であった。

[0108] 実施例１３

［温度応答性ビーズ１２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（シグマアルドリッチ製、製品名Ａｍｂｅｒ　Ｃｈｒｏｍ１×８　２００－４００ｍｅｓｈ、比重１．０９）と１０ｇ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５０ｎｍであった。

[0109] ［培養評価］

温度応答性ビーズ１２を２０ｍｇ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。

[0110] 実施例１４

［温度応答性ビーズ１３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（シグマアルドリッチ製、製品名Ａｍｂｅｒ　Ｃｈｒｏｍ１×８　１００－２００ｍｅｓｈ、比重１．０９）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１３を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は１２ｎｍであった。

[0111] ［培養評価］

温度応答性ビーズ１３を３５ｍｇ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］

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（シグマアルドリッチ製、製品名Ａｍｂｅｒ Ｃｈｒｏｍ１×８　１００－２００ｍｅｓｈ、比重１．０９）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１４を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は６１ｎｍであった。

[0113] ［培養評価］

温度応答性ビーズ１４を３５ｍｇ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］

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（シグマアルドリッチ製、製品名Ａｍｂｅｒ Ｃｈｒｏｍ１×８　５０－１００ｍｅｓｈ、比重１．０９）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１５を得た。温度応答性ポリマーコート膜厚は４４ｎｍであった。

[0115] ［培養評価］

温度応答性ビーズ１５を１００ｍｇ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］

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（シグマアルドリッチ製、製品名Ａｍｂｅｒ Ｃｈｒｏｍ１×８　１００－２００ｍｅｓｈ、比重１．０９）と１０ｇ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５ｎｍであった。

[0117]　［培養評価］

温度応答性ビーズ１６を３５ｍｇ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)	55nm	ジ酸無水物系表面ポリスチレン	ジ酸無水物	200μm	530%(○)	6%(○)
実施例7	p(MEA/BA/IPAAm)	82nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	710%(○)	8%(○)
実施例8	p(MEA/BA/IPAAm)	68nm	3級アミン表面ポリスチレン	$N(CH_3)_2$	250μm	430%(○)	8%(○)
実施例9	p(MEA/BA/IPAAm)	18nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	750%(○)	8%(○)
実施例10	p(MEA/BA/IPAAm)	553nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	720%(○)	9%(○)
実施例11	p(MEA/BA/IPAAm)	639nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	580%(○)	9%(○)
実施例12	p(BA/IPAAm)	52nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	720%(○)	7%(○)
比較例5	p(MEA/BA/IPAAm)	52nm	ポリスチレン	-	200μm	250%(×)	8%(○)
比較例6	p(MEA/BA/IPAAm)	5nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	770%(○)	4%(×)
比較例7	p(MEA/BA/IPAAm)	55nm	水酸基塩表面ポリスチレン	OH⁻	300μm	30%(×)	-
比較例8	p(MEA/BA/IPAAm)	55nm	酸ポリ酸塩表面ポリスチレン	COO⁻	400μm	30%(×)	-
比較例9	-	-	ジ酸無水物系表面ポリスチレン	ジ酸無水物	200μm	580%(○)	8%(×)
比較例10	-	-	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	520μm	720%(○)	4%(×)
比較例11	-	-	3級アミン表面ポリスチレン	$N(CH_3)_2$	250μm	480%(○)	2%(×)

[0119] [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チレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	80μm	790%(○)	8%(○)
実施例14	p(MEA/BA/IPAAm)	12nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	85μm	830%(○)	8%(○)
実施例15	p(MEA/BA/IPAAm)	51nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	85μm	750%(○)	8%(○)
実施例16	p(MEA/BA/IPAAm)	44nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	230μm	720%(○)	8%(○)
比較例12	p(MEA/BA/IPAAm)	5nm	4級アミン塩表面ポリスチレン	$N^+(CH_3)_3Cl^-$	85μm	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

請求の範囲

[請求項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撹拌し、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。

[請求項2] 工程（３）において、撹拌レイノルズ数が５０～２０００の範囲で撹拌することを特徴とする請求項１記載の方法。

[請求項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請求項２記載の方法。

[請求項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請求項３記載の方法。

[請求項5] マイクロキャリアの粒径が５０μｍ～１０００μｍであることを特徴とする請求項４記載の方法。

[請求項6] 下限臨界温度が０℃～５０℃であることを特徴とする請求項５記載の方法。

[請求項7] 接着性細胞が幹細胞であることを特徴とする請求項６記載の方法。

[請求項8] 下限臨界溶解温度を０℃～５０℃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。

[請求項9] 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請求項８に記載の温度応答性ビーズ。

[請求項10] 担体の比重が１．０～１．１であることを特徴とする請求項９に記載のビーズ。

[請求項11] 担体の材質がポリスチレンであることを特徴とする請求項１０に記載の温度応答性ビーズ。

[請求項12] 担体の粒径が５０μｍ～１０００μｍであることを特徴とする請求項１１に記載の温度応答性ビーズ。

[請求項13] 請求項１２に記載の温度応答性ビーズを用いた細胞培養方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/036049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/07(2010.01)i; ***C08J 3/12***(2006.01)i; ***C12M 1/00***(2006.01)i; ***C12M 3/00***(2006.01)i; ***C12N 1/02***(2006.01)i; ***C12N 5/00***(2006.01)i; ***C12N 5/071***(2010.01)i; ***C12N 5/0735***(2010.01)i; ***C12N 5/074***(2010.01)i; ***C12N 5/0775***(2010.01)i; ***C12N 5/0789***(2010.01)i; ***C12N 5/0797***(2010.01)i

FI: C12N5/07; C12N5/071; C12M3/00 A; C12M1/00 A; C12N5/0775; C12N5/00; C12N5/0735; C12N5/074; C12N5/0789; C12N5/0797; C12N1/02; C08J3/12 Z CER; C08J3/12 CEZ; C12M1/00 C

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)

C12N5/07; C08J3/12; C12M1/00; C12M3/00; C12N1/02; C12N5/00; C12N5/071; C12N5/0735; C12N5/074; C12N5/0775; C12N5/0789; C12N5/0797

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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 2021-159049 A (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.) 11 October 2021 (2021-10-11) claims, paragraphs [0056], [0058]-[0061], [0130], example 1	1-2
Y		3-13
X	WO 2012/029877 A1 (CELLSEED INC.) 08 March 2012 (2012-03-08) claims 1, 4, 5, paragraphs [0017], [0021], [0025], [0030], [0031], [0033]-[0037]	1-2
Y		3-13
Y	JP 2021-114995 A (TOSOH CORP) 10 August 2021 (2021-08-10) paragraphs [0024], [0025]	3-7
Y	JP 2020-110140 A (TOSOH CORP.) 27 July 2020 (2020-07-27) claim 2, paragraph [0038]	3-7
Y	JP 2019-126326 A (TOSOH CORP.) 01 August 2019 (2019-08-01) paragraph [0034]	8-13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 December 2023	**19 December 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/036049

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIS使い方シリーズ 新版 プラスチック材料選択のポイント. 第2版. Japanese Standards Association, 2003, ISBN: 4-542-30396-9, pp. 436, 437, non-official translation (JIS How To Series - New Edition: Points for Selecting Plastic Materials. 2nd Edition.) in particular, p. 437, Polystyrene Density	8-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/036049

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-159049 A	11 October 2021	(Family: none)	
WO 2012/029877 A1	08 March 2012	JP 2017-12172 A claims 1, 4, 5, paragraphs [0017], [0021], [0025], [0030], [0031], [0033]-[0037]	
JP 2021-114995 A	10 August 2021	(Family: none)	
JP 2020-110140 A	27 July 2020	(Family: none)	
JP 2019-126326 A	01 August 2019	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/036049

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/07(2010.01)i; C08J 3/12(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 1/02(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; C12N 5/0797(2010.01)i
FI: C12N5/07; C12N5/071; C12M3/00 A; C12M1/00 A; C12N5/0775; C12N5/00; C12N5/0735; C12N5/074; C12N5/0789; C12N5/0797; C12N1/02; C08J3/12 Z CER; C08J3/12 CEZ; C12M1/00 C

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））

C12N5/07; C08J3/12; C12M1/00; C12M3/00; C12N1/02; C12N5/00; C12N5/071; C12N5/0735; C12N5/074; C12N5/0775; C12N5/0789; C12N5/0797

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	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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 2021-159049 A (ダイキン工業株式会社) 11.10.2021 (2021-10-11) [特許請求の範囲], [0056], [0058]-[0061], [0130], 実施例１	1-2
Y		3-13
X	WO 2012/029877 A1 (株式会社セルシード) 08.03.2012 (2012-03-08) [請求項1], [請求項4], [請求項5], [0017], [0021], [0025], [0030], [0031], [0033]-[0037]	1-2
Y		3-13
Y	JP 2021-114995 A (東ソー株式会社) 10.08.2021 (2021-08-10) [0024], [0025]	3-7
Y	JP 2020-110140 A (東ソー株式会社) 27.07.2020 (2020-07-27) [請求項2], [0038]	3-7
Y	JP 2019-126326 A (東ソー株式会社) 01.08.2019 (2019-08-01) [0034]	8-13

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
01.12.2023	19.12.2023

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

山内　達人 4N 3348

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/036049

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
A	JIS使い方シリーズ 新版 プラスチック材料選択のポイント 第2版，新版第2版，財団法人 日本規格協会，2003，ISBN 4-542-30396-9，pp. 436-437 特にp. 437におけるポリスチレンの密度の欄	8-13

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/036049

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-159049 A	11.10.2021	(ファミリーなし)	
WO 2012/029877 A1	08.03.2012	JP 2017-12172 A [請求項1], [請求項4], [請求項5], [0017], [0021], [0025], [0030], [0031], [0033] - [0037]	
JP 2021-114995 A	10.08.2021	(ファミリーなし)	
JP 2020-110140 A	27.07.2020	(ファミリーなし)	
JP 2019-126326 A	01.08.2019	(ファミリーなし)	