

(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  
2019年1月31日(31.01.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/021748 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12M 1/00* (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01) 株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP). 松岡 洋佑(MATSUOKA Yousuke); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町 2 2 番地 4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/025017
- (22) 国際出願日: 2018年7月2日(02.07.2018)
- (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 2017-142318 2017年7月22日(22.07.2017) JP  
特願 2017-201441 2017年10月17日(17.10.2017) JP
- (71) 出願人: 東洋製罐グループホールディングス株式会社(TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.) [JP/JP]; 〒1418627 東京都品川区東五反田2丁目18番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 戸谷 貴彦 (TOTANI Takahiko); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町 2 2 番地 4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP). 田中 郷史(TANAKA Satoshi); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町 2 2 番地 4 東洋製罐グループホールディングス
- (74) 代理人: 生 富 成 一 (IKUTOMI Shigekazu); 〒1580083 東京都世田谷区奥沢 6 丁目 3 4 番 1 号 内海第 2 ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: CULTURE VESSEL, METHOD FOR MANUFACTURING CULTURE VESSEL, LAMINATED STRUCTURE, AND METHOD FOR PRODUCING LAMINATED STRUCTURE

(54) 発明の名称: 培養容器、培養容器の製造方法、積層構造体、及び積層構造体の製造方法

(57) Abstract: [Problem] The problem is, in the production of a culture vessel which can be used for the culture of spheres and is made from a flexible packaging material, to enable the prevention of the detachment of a cell adhesion inhibitor applied on one inner surface of the culture vessel and therefore enable the prevention of the offset of the cell adhesion inhibitor onto the other inner surface upon the contact of the inner surfaces with each other. [Solution] A culture vessel which is made from a flexible packaging material and has a first side surface part and a second side surface part that face each other, wherein: a surface treatment is applied onto at least an inner surface side of the first side surface part so that a contact-angle hysteresis of the surface of the inner surface side of the first side surface part can become larger than that of the surface of an inner surface side of the second side surface side wherein the contact-angle hysteresis is defined as "an (advancing contact angle) - (receding contact angle)" upon water being slid down; and a film made from a cell adhesion inhibitor is formed on the inner surface side of the first side surface part.

(57) 要約: 【課題】 スフェア培養のための軟包材からなる培養容器の製造において、培養容器の内面が接触することにより、一方の内面に塗布した細胞接着抑制剤が剥がれて、他方の内面に裏移りしてしまうことを防止することを可能とする。【解決手段】 軟包材からなる培養容器であって、対面する第一の側面部と第二の側面部とを備え、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角-後退接触角と定義した場合に、第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きくなるように、少なくとも第一の側面部の内面側に表面処理が施されており、かつ、第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤からなる膜が形成された培養容器とする。

WO 2019/021748 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

培養容器、培養容器の製造方法、積層構造体、及び積層構造体の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養技術に関し、特にスフェア培養に用いられる培養容器に関する。

また、本発明は、細胞培養容器などを製造するために好適に使用可能な積層構造体、及びその製造方法に関する。

### 背景技術

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

このような状況において、培養容器に細胞と培養液を充填して、閉鎖系で自動的に細胞を大量培養することが行われている。

[0003] また、最近では、i P S細胞などの接着細胞を培養容器に接着させることなく、培養容器内で細胞を浮遊させて培養し、スフェア（凝集塊）を形成させることによって、細胞の培養効率を向上させる方法が用いられている。この場合、通常、培養容器内の底面には、細胞が接着しないように、細胞接着抑制剤を塗布（コーティング）しておく必要がある。

[0004] ここで、スフェアを形成する培養方法に関して、特許文献1には、細胞接着抑制剤が内面に塗布された、凹部を有する培養基材が提案されている。この培養基材は、リジッドなものであり、細胞接着抑制剤を内面に塗布することによって、スフェアは適切に形成し得ると考えられる。

[0005] また、細胞培養容器の製造に使用するフィルムやシート（以下、単にフィルムと称する場合がある）は、その表面に細胞接着抑制剤を塗布した後に、細胞培養容器の製造時まで保管する必要があった。

### 先行技術文献

## 特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2012/036011号パンフレット  
特許文献2：特開2013-70636号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 細胞を効率的に大量に培養する場合には、容積の大きい培養容器を比較的容易に製造可能な、軟包材からなる培養容器を用いて、閉鎖系で細胞を自動的に培養することが好ましい。

しかしながら、このような軟包材からなる培養容器は、一般にバッグ形状となるため、培養容器内の底面に細胞接着抑制剤を塗布すると、培養容器内の底面と上面が接触することによって、図8に示すように、底面に塗布された細胞接着抑制剤の膜が上面に裏移りして、底面から剥がれてしまうという問題があった。

- [0008] すなわち、このように細胞接着抑制剤の膜が底面から剥がれると、細胞がその細胞接着抑制剤の剥がれた底面部分に接着してしまうため、細胞はスフェアを適切に形成することができなくなり、スフェア培養が阻害されてしまうという問題があった。

- [0009] そこで、本発明者らは鋭意研究し、培養容器内の底面と上面の基材を特定の条件で加工することによって、細胞接着抑制剤の膜が底面から上面に裏移りしない培養容器を製造することに成功し、本発明を完成させた。

すなわち、培養容器における細胞接着抑制剤を塗布する表面の接触角ヒステリシスが、これに対面する表面の接触角ヒステリシスよりも大きくなるように、少なくとも細胞接着抑制剤を塗布する表面側に表面処理を施し、かつ、当該表面に細胞接着抑制剤の膜を形成することによって、細胞接着抑制剤の膜が剥がれて対面側に裏移りすることを防止することが可能となった。

- [0010] ところで、細胞接着抑制剤を塗布したフィルムは、ロール状に巻き取って保管される場合があるが、使用に際してフィルムを平面状に展開すると、細胞接着抑制剤がフィルムから剥がれてしまうという問題があった。

具体的には、図13及び図14に示すように、フィルムをロール状に巻き取る際に、細胞接着抑制剤を培養基材100に塗布して形成されたコーティング層200が、培養基材100におけるコーティング層200と反対側の表面に密着する。

そして、フィルムを平面状に戻す際に、コーティング層200が培養基材100の表面から剥がれて、培養基材100の反対側の表面に裏移りするという問題があった。

[0011] そこで、本発明者らは鋭意研究し、可撓性を有する、フィルム又はシート状の培養基材の第一の面の親水性を、その反対側の第二の面の親水性よりも高くなるように処理し、第一の面にコーティング層を形成して培養基材をロール状に巻き取って積層構造体を形成することにより、コーティング層の裏移りが生じない積層構造体を製造することに成功し、本発明を完成させた。

[0012] ここで、特許文献2の実施例1には、培養基材の表面にプラズマ処理を行い、細胞低接着化処理を行うことが記載されている。

しかしながら、この培養基材は可撓性を有するものでなく、また培養基材の両面の親水性を考慮して、コーティング層の裏移りが生じない積層構造体を形成可能にするものではなかった。

[0013] 本発明は、上記事情に鑑みなされたものであり、スフェア培養のための軟包材からなる培養容器の製造において、培養容器の内面が接触することにより、一方の内面に塗布した細胞接着抑制剤が剥がれて、他方の内面に裏移りしてしまうことを防止可能な培養容器、及び培養容器の製造方法の提供を目的とする。

[0014] また、本発明は、上記事情に鑑みなされたものであり、培養基材をロール状に巻き取って形成された積層構造体において、培養基材の表面上に形成されたコーティング層が裏移りしない積層構造体、及びその製造方法の提供を目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0015] 上記目的を達成するため、本発明の培養容器は、軟包材からなる培養容器

であって、対面する第一の側面部と第二の側面部とを備え、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きくなるように、少なくとも前記第一の側面部の内面側に表面処理が施されており、かつ、前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤からなる膜が形成された構成としてある。

[0016] また、本発明の培養容器の製造方法は、スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に親水化処理を施し、前記フィルム又はシートの親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、前記第一の側面部に対面する第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい前記培養容器を形成し、前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布する方法としてある。

[0017] また、本発明の培養容器の製造方法は、スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に第一の親水化処理を施すと共に、前記フィルム又はシートの他の一部に前記第一の親水化処理よりも親水化力の小さい第二の親水化処理を施し、前記フィルム又はシートの前記第一の親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、前記第一の側面部に対面する前記第二の親水化処理が施された面を内面側に備えた第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい前記培養容器を形成し、前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布する方法としてある。

[0018] また、上記目的を達成するため、本発明の積層構造体は、可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体であって、前記培養基材はフィルム又は

シート状であり、ロール状に巻き取られて前記積層構造体を形成し、前記培養基材は、コーティング層が形成された第一の表面と、その反対側の第二の表面とを有し、前記第一の表面の親水性が前記第二の表面の親水性よりも高い構成としてある。

[0019] また、本発明の積層構造体の製造方法は、可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体の製造方法であって、フィルム又はシートからなる前記培養基材の第一の表面の親水性が、前記第一の表面の反対側の第二の表面の親水性よりも大きくなるように、少なくとも前記第一の表面に親水化処理を施し、前記第一の表面上にコーティング剤を塗布してコーティング層を形成し、前記培養基材をロール状に巻き取る方法としてある。

### 発明の効果

[0020] 本発明によれば、スフェア培養のための軟包材からなる培養容器の製造において、培養容器の内面が接触することにより、一方の内面に塗布した細胞接着抑制剤が剥がれて、他方の内面に裏移りしてしまうことを防止することが可能となる。

また、本発明によれば、培養基材をロール状に巻き取って形成された積層構造体において、培養基材の表面上に形成されたコーティング層が裏移りしない積層構造体、及びその製造方法の提供が可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0021] [図1A]静的水接触角についての説明図である。

[図1B]接触角ヒステリシスについての説明図である。

[図2]実施例1（実施例11）（培養容器の基材（培養基材）：PE，下面（第一の表面）：コロナ処理1回、上面（第二の表面）：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）、実施例2（実施例12）（培養容器の基材：PE，下面：コロナ処理3回、上面：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）、比較例1（比較例11）（培養容器の基材：PE，下面：無処理、上面：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図3]比較例2（比較例12）（培養容器の基材（培養基材）：PE，下面（第一の表面）：無処理、上面（第二の表面）：コロナ処理1回，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）、比較例3（比較例13）（培養容器の基材：PE，下面：コロナ処理1回、上面：コロナ処理3回，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）、比較例4（比較例14）（培養容器の基材：PE，下面：コロナ処理3回、上面：コロナ処理3回，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図4]実施例3（実施例13）（培養容器の基材（培養基材）：COC，下面（第一の表面）：コロナ処理3回、上面（第二の表面）：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）、比較例5（比較例15）（培養容器の基材：COC，下面：無処理、上面：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図5]実施例4（実施例14）（培養容器の基材（培養基材）：PE，下面（第一の表面）：コロナ処理3回、上面（第二の表面）：無処理，細胞接着抑制剤：ポリビニルアルコール）、比較例6（比較例16）（培養容器の基材：PE，下面：無処理、上面：無処理，細胞接着抑制剤：ポリビニルアルコール）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図6]実施例5（実施例15）（培養容器の基材（培養基材）：PE，下面（第一の表面）：コロナ処理1回、上面（第二の表面）：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー，50℃7日間経過後）、実施例6（実施例16）（培養容器の基材：PE，下面：コロナ処理3回、上面：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー，50℃7日間経過後）、比較例7（比較例17）（培養容器の基材：PE，下面：無処理、上面：無処理，細胞接着抑制剤：リン脂質ポリマー，50℃7日間経過後）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図7]実施例7（実施例17）（培養容器の基材（培養基材）：PE，下面（第一の表面）：エキシマ処理1回、上面（第二の表面）：無処理，細胞接着

抑制剤：リン脂質ポリマー）における細胞接着抑制剤の裏移り状況を撮影した写真を示す図である。

[図8]従来の培養容器の製造工程における細胞接着抑制剤の裏移りを示す模式図である。

[図9]本発明の実施形態に係る積層構造体の構成を示す模式図である。

[図10]本発明の実施形態に係るその他の積層構造体の構成を示す模式図である。

[図11]本発明の実施形態に係る積層構造体の製造方法（第一の製造方法）を示す模式図である。

[図12]本発明の実施形態に係る積層構造体の製造方法（第二の製造方法）を示す模式図である。

[図13]積層構造体を形成する様子を示す模式図である。

[図14]従来の積層構造体におけるコーティング層の裏移りを示す模式図である。

### 発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明の培養容器、及び培養容器の製造方法の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態の具体的な内容に限定されるものではない。

本実施形態の培養容器は、軟包材からなる培養容器であって、対面する第一の側面部と第二の側面部とを備え、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きくなるように、少なくとも第一の側面部の内面側に表面処理が施されており、かつ、第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤からなる膜が形成されたことを特徴とする。

[0023] まず、静的水接触角と接触角ヒステリシスについて、図1A及び図1Bを参照して説明する。

静的水接触角とは、静止した液体の表面が固体壁の表面に接するところで

液面と固体面がなす角（図1Aの $\theta_s$ ）を意味する。静的水接触角が大きいと、固体壁の表面の疎水性が相対的に強く、静的水接触角が小さいと、固体壁の表面の親水性が相対的に強いという関係がある。

[0024] 接触角ヒステリシスとは、水滴が固体壁の表面を滑落するときの前進接触角（ $\theta_a$ ）と、後退接触角（ $\theta_r$ ）との差（滑落時ヒステリシス（ $\theta_a - \theta_r$ ））を意味する。

すなわち、水平に支持した固体壁の表面に水滴を滴下し、固体壁を徐々に傾けて、液滴が転落を開始したときの前進接触角と後退接触角にもとづき算出される。この接触角ヒステリシスは、固体壁の表面の動的な親水性（濡れ性）を示す指標として用いられる。接触角ヒステリシスが大きいと、固体壁の表面の親水性が相対的に強く、接触角ヒステリシスが小さいと、固体壁の表面の疎水性が相対的に強いという関係がある。

[0025] 本実施形態の培養容器を構成する軟包材としては、ポリオレフィンを用いることが好ましく、ポリエチレン（PE）、環状オレフィンコポリマー（COC）等を用いることがより好ましい。特に、少なくとも培養容器の第一の側面部の内面側と第二の側面部の内面側を、ポリオレフィンを用いて構成することが好ましい。

[0026] 第一の側面部の内面側、及び第二の側面部の内面側は、培養容器内の表面を構成し、細胞培養時において、通常、第一の側面部の内面側が底面となるように培養容器を配置して用いられることを想定している。

すなわち、一般的に細胞培養に使用される培養液の比重は細胞の比重よりも小さいため、培養容器を静置させたときに細胞は、下方に沈降する。このため、通常は、第一の側面部の内面側が底面となるように、培養容器が配置される。

一方、仮に、培養液の比重が細胞の比重よりも大きい場合には、培養容器を静置させたときに細胞は上方に集まると考えられるため、第一の側面部の内面側が上面となるように、培養容器を配置することとなる。

[0027] 本実施形態の培養容器は、一般的にバッグ形状であり、対面する二つの側

面部を備えている。そして、これら側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、異なる値を示すように、少なくとも一方の側面部の内面側に、表面処理が施されている。

このとき、培養容器における、細胞接着抑制剤の膜が形成される表面側（一般的には底面側）の接触角ヒステリシスが、これに対面する、細胞接着抑制剤の膜が形成されない表面側（一般的には上面側）の接触角ヒステリシスよりも、大きくなるように、培養容器の内面に対して表面処理が施される。

表面処理としては、親水化処理を行うことが好ましい。親水化処理の方法としてコロナ処理やエキシマ処理などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0028] 具体的には、例えば以下の（A）～（F）ようにすることができるが、これらに限定されない。なお、以下において、細胞接着抑制剤の膜を形成する表面を第一の側面、細胞接着抑制剤の膜を形成しない表面を第二の側面と称する。

[0029] （A）第一の側面にコロナ処理を1回行い、第二の側面には表面処理を行わない。

（B）第一の側面にコロナ処理を3回行い、第二の側面には表面処理を行わない。

（C）第一の側面にコロナ処理を3回行い、第二の側面にコロナ処理を1回行う。

（D）第一の側面にエキシマ処理を1回行い、第二の側面には表面処理を行わない。

（E）第一の側面にエキシマ処理を3回行い、第二の側面には表面処理を行わない。

（F）第一の側面にエキシマ処理を3回行い、第二の側面にエキシマ処理を1回行う。

[0030] また、本実施形態の培養容器では、以下の（a）～（k）のような表面処理方法は行われたい。その理由は、これらの表面処理方法によれば、細胞接着

抑制剤の膜を形成する表面側の接触角ヒステリシスが、これに直面する、細胞接着抑制剤の膜を形成しない表面側の接触角ヒステリシスよりも小さくなるか、又は同じになるためである。

- [0031] (a) 第一の側面に表面処理を行わず、第二の側面にも表面処理を行わない。
- 。
- (b) 第一の側面に表面処理を行わず、第二の側面にコロナ処理を1回行う。
- 。
- (c) 第一の側面に表面処理を行わず、第二の側面にコロナ処理を3回行う。
- 。
- (d) 第一の側面にコロナ処理を1回行い、第二の側面にもコロナ処理を1回行う。
- (e) 第一の側面にコロナ処理を1回行い、第二の側面にコロナ処理を3回行う。
- (f) 第一の側面にコロナ処理を3回行い、第二の側面にもコロナ処理を3回行う。
- (g) 第一の側面に表面処理を行わず、第二の側面にエキシマ処理を1回行う。
- (h) 第一の側面に表面処理を行わず、第二の側面にエキシマ処理を3回行う。
- (i) 第一の側面にエキシマ処理を1回行い、第二の側面にもエキシマ処理を1回行う。
- (j) 第一の側面にエキシマ処理を1回行い、第二の側面にエキシマ処理を3回行う。
- (k) 第一の側面にエキシマ処理を3回行い、第二の側面にもエキシマ処理を3回行う。

[0032] 本実施形態において、細胞接着抑制剤としては、リン脂質ポリマー、ポリビニルアルコール誘導体、リン脂質・高分子複合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、アガロース、キトサン、ポリエチ

レングリコール、アルブミン等を用いることができる。また、これらを組み合わせて用いても良い。

[0033] 本実施形態の培養容器は、細胞接着抑制剤の膜が形成される側面部の内面側に、複数のウェルが形成されたものとするのも好ましい。本実施形態の培養容器において、このようなウェルを形成することで、細胞を各ウェル内に集めることができるため、例えば、スフェア培養の初期段階における細胞密度を高めることができ、スフェアの形成効率を向上させることが可能となる。

[0034] また、本実施形態の培養容器の製造方法は、スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に親水化処理を施し、フィルム又はシートの親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、第一の側面部に対面する第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい培養容器を形成し、第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布することを特徴とする。

[0035] また、本実施形態の培養容器の製造方法を、スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に第一の親水化処理を施すと共に、フィルム又はシートの他の一部に第一の親水化処理よりも親水化力の小さい第二の親水化処理を施し、フィルム又はシートの第一の親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、第一の側面部に対面する第二の親水化処理が施された面を内面側に備えた第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい培養容器を形成し、第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布する方法とするのも好ましい。

[0036] すなわち、本実施形態の培養容器の製造方法では、ポリオレフィンからな

るフィルム又はシートの一部に親水化処理を施すと共に、このフィルム又はシートを用いて培養容器を製袋することで、接触角ヒステリシスの値が異なる側面部を備えた培養容器を形成する。

具体的には、細胞接着抑制剤の膜を形成する表面側（第一の側面部の内面側、一般的には底面側）の接触角ヒステリシスが、これに対面する、細胞接着抑制剤の膜を形成しない表面側（第二の側面部の内面側、一般的には上面側）の接触角ヒステリシスよりも、大きい培養容器を形成する。

[0037] そして、このような培養容器の第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布することで、細胞接着抑制剤の膜が容易に剥がれることのない培養容器を製造することが可能となっている。

したがって、本実施形態の培養容器の製造方法によれば、スフェアを好適に形成可能な培養容器を製造することが可能である。

[0038] 以上説明したように、本実施形態の培養容器、及び培養容器の製造方法によれば、培養容器内における、細胞接着抑制剤の膜が形成される表面の接触角ヒステリシスが、これに対面する、細胞接着抑制剤の膜が形成されない表面の接触角ヒステリシスよりも大きい培養容器を得ることができる。

このような培養容器に塗布された細胞接着抑制剤は、塗布された表面から剥がれて対面側に裏移りすることがないため、スフェア培養を適切に行うことが可能である。

[0039] 次に、本発明の積層構造体、及び積層構造体の製造方法の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態の具体的な内容に限定されるものではない。

本実施形態の積層構造体は、可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体であって、培養基材はフィルム又はシート状であり、ロール状に巻き取られて積層構造体を形成し、培養基材は、コーティング層が形成された第一の表面と、その反対側の第二の表面とを有し、第一の表面の親水性が第二の表面の親水性よりも高いことを特徴とする。

すなわち、接触角ヒステリシスを前進接触角－後退接触角と定義した場合

、第一の表面のヒステリシスが第二の表面のヒステリシスより大きくなっている。

また、第二の表面とコーティング層は、接着することなく密着した状態となっている。

本実施形態の積層構造体は、多層フィルムからなるものであってよく、培養容器などを形成するための包材として好適に使用することができる。

[0040] 本実施形態の積層構造体は、図9に示すように、表面にコーティング層2が形成された培養基材1が積層して形成されている。なお、図9には、本実施形態の積層構造体の一部のみが示されている。また、同図の積層構造体は、培養基材1を4層有しているが、これに限定されず、2層や3層有していても5層以上有するものであってもよい。

このような積層構造体は、表面にコーティング層2が形成された培養基材1をロール状に巻き取ることによって形成することができる。同図において最上層以外のコーティング層2は、その下の培養基材1の表面12に接着しているが、その上の培養基材1の下面には接着することなく密着している。

[0041] 培養基材1の表面11（第一の表面）には、親水化処理が施されており、これによって、親水化処理を施さない場合に比較して、静的水接触角が相対的に減少し、接触角ヒステリシスが相対的に増加した状態となっている。親水化処理は、例えばコロナ処理やエキシマ処理などにより行うことができるが、これらに限定されるものではない。

そして、このように親水化処理を施された培養基材1の表面11上にコーティング剤が塗布されて、コーティング層2が形成されている。

[0042] 本実施形態の積層構造体は、上記のように、培養基材1の表面11に親水化処理を施すことによって、培養基材1の表面11の接触角ヒステリシスが、培養基材1の表面12（培養基材1における、コーティング層2が形成された表面と反対側の表面）（第二の表面）の接触角ヒステリシスよりも相対的に大きい状態となっている。

[0043] このように、本実施形態の積層構造体は、培養基材1の表面11の接触角

ヒステリシスが、培養基材 1 の表面 1 2 の接触角ヒステリシスよりも大きい  
ため、使用に際して培養基材 1 を平面状に展開するにあたり、培養基材 1 の  
表面 1 1 上に形成されたコーティング層 2 が、培養基材 1 の表面 1 2 に裏移  
りすることを防止できる。

したがって、本実施形態の積層構造体によれば、培養基材 1 の表面 1 1 上  
に形成されたコーティング層 2 が、培養基材 1 の表面 1 2 に接着して表面 1  
1 から剥がれることを防止することが可能となっている。

[0044] 培養基材 1 を構成する材料としては、ポリオレフィンを用いることが好ま  
しく、ポリエチレン (PE)、環状オレフィンコポリマー (COC) 等を用  
いることがより好ましい。特に、少なくとも培養基材 1 の表面 1 1 側を、ポ  
リオレフィンを用いて構成することが好ましい。

[0045] コーティング層 2 を形成するコーティング剤としては、特に限定されな  
いが、例えば、細胞接着抑制剤とすることができる。この細胞接着抑制剤とし  
ては、リン脂質ポリマー、ポリビニルアルコール誘導体、リン脂質・高分子  
複合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、ア  
ガロース、キトサン、ポリエチレングリコール、アルブミン等を用いること  
ができる。また、これらを組み合わせて用いても良い。

[0046] また、培養基材を同一又は異なる複数の基材の層からなるものとするこ  
ともできる。具体的には、図 10 に示すように、培養基材として、培養基材 1  
と培養基材 1 a とを接着して形成したものとすることができる。また、より  
多く数の培養基材を接着して形成することもできる。このとき、培養基材 1  
の表面 1 1 の接触角ヒステリシスは、培養基材 1 a の表面 1 2 a (又は最も  
下側の培養基材の底面) (第二の表面) の接触角ヒステリシスよりも大きい  
。

培養基材 1 a 及びその他の培養基材を構成する材料としても、ポリオレフ  
インを用いることが好ましく、ポリエチレン (PE)、環状オレフィンコポ  
リマー (COC) 等を用いることがより好ましい。

培養基材をこのように複数の基材の層からなるものとした場合でも、コー

ティング層 2 が培養基材の第二の表面に接着して剥がれることを防止することができる。

[0047] 本実施形態の積層構造体の製造方法は、可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体の製造方法であって、フィルム又はシートからなる培養基材の第一の表面の親水性が、第一の表面の反対側の第二の表面の親水性よりも大きくなるように、少なくとも第一の表面に親水化処理を施し、第一の表面上にコーティング剤を塗布してコーティング層を形成し、培養基材をロール状に巻き取ることを特徴とする。

[0048] 具体的には、図 1 1 に示すように、培養基材 1 の表面 1 1 に親水化処理を施して、培養基材 1 の表面 1 1 の接触角ヒステリシスが、培養基材 1 の表面 1 2 の接触角ヒステリシスよりも大きい状態とする。同図の例では、培養基材 1 の表面 1 2 には、親水化処理を施していない。次に、培養基材 1 の表面 1 1 上にコーティング層 2 を形成する。なお、培養基材を複数の基材の層からなるものとしてもよい。以下においても同様である。

そして、このようにして得られた培養基材 1 をロール状に巻き取ることによって、本実施形態の積層構造体を得ることができる。

[0049] また、図 1 2 に示すように、培養基材 1 の表面 1 2 に親水化処理を施すこともできる。この場合、培養基材 1 の表面 1 2 には、培養基材 1 の表面 1 1 に対する親水化処理 A よりも親水化力の小さい親水化処理 B が施される。すなわち、培養基材 1 の表面 1 1 の親水性よりも、培養基材 1 の表面 1 2 の親水性が小さくなるように、培養基材 1 の表面 1 2 に親水化処理が施される。

その結果、培養基材 1 の表面 1 1 の親水性の方が、培養基材 1 の表面 1 2 の親水性よりも高い状態の積層構造体を得られる。

これによって、培養基材 1 の表面 1 1 の方が、培養基材 1 の表面 1 2 よりもコーティング層 2 との密着性が強くなり、コーティング層 2 が表面 1 2 に接着して、表面 1 1 から剥がれることを防止することが可能となっている。

[0050] すなわち、図 1 1 及び図 1 2 に示す方法のいずれの場合でも、本実施形態の積層構造体の製造方法において、培養基材 1 の表面 1 1 の接触角ヒステリ

シスが、培養基材 1 の表面 1 2 の接触角ヒステリシスよりも大きくなるように、培養基材 1 の表面 1 1 に対して親水化処理が施される。具体的には、例えば以下の (I) ~ (V I) ようにすることができるが、これらに限定されない。

[0051] (I) 表面 1 1 にコロナ処理を 1 回行い、表面 1 2 には親水化処理を行わない。

(I I) 表面 1 1 にコロナ処理を 3 回行い、表面 1 2 には親水化処理を行わない。

(I I I) 表面 1 1 にコロナ処理を 3 回行い、表面 1 2 にコロナ処理を 1 回行う。

(I V) 表面 1 1 にエキシマ処理を 1 回行い、表面 1 2 には親水化処理を行わない。

(V) 表面 1 1 にエキシマ処理を 3 回行い、表面 1 2 には親水化処理を行わない。

(V I) 表面 1 1 にエキシマ処理を 3 回行い、表面 1 2 にエキシマ処理を 1 回行う。

[0052] また、本実施形態の積層構造体の製造方法では、以下の (i) ~ (i x) ような親水化処理は行われぬ。その理由は、表面 1 1 の接触角ヒステリシスが、表面 1 2 の接触角ヒステリシスよりも小さくなるか、又は同じになるためである。

[0053] (i) 表面 1 1 に親水化処理を行わず、表面 1 2 にも親水化処理を行わない。

(i i) 表面 1 1 に親水化処理を行わず、表面 1 2 にコロナ処理を 1 回行う。

(i i i) 表面 1 1 にコロナ処理を 1 回行い、表面 1 2 にもコロナ処理を 1 回行う。

(i v) 表面 1 1 にコロナ処理を 1 回行い、表面 1 2 にコロナ処理を 3 回行う。

(v) 表面 1 1 にコロナ処理を 3 回行い、表面 1 2 にもコロナ処理を 3 回行う。

(v i) 表面 1 1 に親水化処理を行わず、表面 1 2 にエキシマ処理を 1 回行う。

(v i i) 表面 1 1 にエキシマ処理を 1 回行い、表面 1 2 にもエキシマ処理を 1 回行う。

(v i i i) 表面 1 1 にエキシマ処理を 1 回行い、表面 1 2 にエキシマ処理を 3 回行う。

(i x) 表面 1 1 にエキシマ処理を 3 回行い、表面 1 2 にもエキシマ処理を 3 回行う。

[0054] ここで、本実施形態においては、親水性を接触角ヒステリシスにより判断している。その理由は、静的水接触角は、空気と触れている時の最表層の親水性官能基の量と相関のあるものであるため、経時により官能基が樹脂に潜り込んでしまうと、その数値が疎水性側にまで変化すると考えられるためである。

一方、接触角ヒステリシスは、最表層と少し内側の親水性官能基の量と相関のあるものであるため、経時により官能基が樹脂に潜り込んでも、その数値にほとんど変化がないと考えられるためである。

[0055] 本実施形態の積層構造体の製造方法において、複数の層からなる培養基材の形成方法としては、多層押出成形やラミネート法を用いることができる。

多層押出成形では、例えば、複数の種類の樹脂をそれぞれ独立した押出機に注入して、これらの押出機から多層 T ダイへ複数の種類の樹脂を押出す。そして、多層 T ダイにより溶融した樹脂を流し、これを巻き取ることによって複数の層からなる培養基材を得ることができる。

また、ラミネート法では、別途成形したフィルム同士を加熱しながら圧着することにより、複数の層からなる培養基材を得ることができる。なお、この場合、例えば PE とナイロンや、PE と PET のように種類が全く異なる樹脂を積層させる場合には、接着剤を使用するが、PE と親水化処理 PE な

どは同じ性質の樹脂同士であるため、接着剤は不要である。

[0056] 以上説明したように、本実施形態の積層構造体、及び積層構造体の製造方法によれば、

培養基材をロール状に巻き取って形成された積層構造体において、培養基材の表面上に形成されたコーティング層が剥がれて、裏移りすることを防止することが可能となる。

さらに、上述の積層構造体からフィルムを送り出して、三方或いは四方をヒートシールすることで二枚のフィルムを貼り合わせた袋状容器形態とすることができる。

また、コーティング層は、表面11の全面にコーティングしてもよいし、未ヒートシール領域のみに選択的にコーティングしてもよい。積層構造体は包装材として好適に用いられる。

## 実施例

[0057] 以下、本発明の実施形態に係る培養容器において、細胞接着抑制剤の膜が形成される表面の接触角ヒステリシスが、これに対面する、細胞接着抑制剤の膜が形成されない表面の接触角ヒステリシスよりも大きければ、細胞接着抑制剤が塗布された表面から剥がれて対面側に裏移りすることがないことを確認するために行った実験について詳細に説明する。

[0058] (実施例1)

ポリオレフィンからなる長方形のフィルムを準備して、図2に示すように、その左半分側の正方形部分を培養容器における底面と想定し、その右半分側の正方形部分を培養容器における上面と想定した。そして、底面に細胞接着抑制剤を塗布した後、上面を底面に重ね合わせて荷重をかけ、その後、上面を底面から剥離して、細胞接着抑制剤が上面に裏移りしたか否かを目視により判定した。具体的には、以下のように行った。

[0059] まず、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面処理として、底面に対してバッチ式コロナ処理装置(春日電機株式会社製、以下同様)を用いてコロナ処理を1回施した。また、上面に対して

は、表面処理を行わなかった。

このとき、底面の静的水接触角は  $71.9^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $43.6^\circ$  であった。また、上面の静的水接触角は  $96.7^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $18.0^\circ$  であった。

[0060] 静的水接触角及びヒステリシスの測定には、固液界面解析システム *DropMaster 700*（協和界面科学株式会社製）を使用した。

具体的には、静的水接触角（ $\theta_s$ ）は、フィルム上に純水  $3\mu\text{l}$  を滴下して測定した。また、接触角ヒステリシス（ $\theta_a - \theta_r$ ）は、フィルム上に純水  $30\mu\text{l}$  を滴下し、1秒毎に  $1^\circ$  ずつ測定台を傾け、滑落時の前進接触角（ $\theta_a$ ）と後退接触角（ $\theta_r$ ）を接線法により算出して得た。

[0061] 次に、底面に対して、細胞接着抑制剤として  $0.5\%$  に調製されたリン脂質ポリマー（*LIPIDURE*（登録商標）、日油株式会社）エタノール溶液をバーコーターで塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この底面に対して上面を貼り付けて、 $10\text{g}/\text{cm}^2$  の荷重をかけて1分静置した後、上面を底面から剥離した。

[0062] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。本実験では底面を親水化したことにより、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0063]（実施例2）

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン（PE）フィルムを使用した。そして、表面処理として、底面に対してバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、底面の静的水接触角は  $54.2^\circ$  であり、接触角ヒステリシス

は50.3°であった。また、上面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

[0064] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、裏移りしていなかった。本実験では底面をより強く親水化したことによって、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が一層向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0065] (比較例1)

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面及び上面に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、底面及び上面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

[0066] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に大きく裏移りしていた。本実験では底面も上面も共に疎水性のままであるため、底面の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、上面に裏移りして、底面から剥離してしまっただと考えられる。

[0067] (比較例2)

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面に対して、表面処理を行わなかった。一方、上面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。

このとき、底面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。また、上面の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0068] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に大きく裏移り

していた。本実験では底面が疎水性のままである一方、上面が強く親水化されたため、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜が上面に裏移りし、底面から剥離してしまったと考えられる。

[0069] (比較例3)

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を1回施し、上面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。

このとき、底面の静的水接触角は71.9°であり、接触角ヒステリシスは43.6°であった。また、上面の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0070] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に大きく裏移りしていた。本実験では底面よりも上面がより強く親水化されたため、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜が上面に裏移りし、底面から剥離してしまったと考えられる。

[0071] (比較例4)

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面及び上面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。

このとき、底面及び上面の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0072] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に大きく裏移りしていた。本実験では底面も上面も同様に強く親水化されたため、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜が上面に裏移りし、底面から剥離してしまっ

と考えられる。

このように、比較例 2～4 の結果から、上面が強く親水化されていると、細胞接着抑制剤は底面から剥離しやすくなることが分かった。

[0073] (実施例 3)

フィルムの材料と表面処理の条件を実施例 1 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、環状オレフィンコポリマー (COC) フィルムを使用した。そして、底面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を 3 回施した。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、底面の静的水接触角は 55.2° であり、接触角ヒステリシスは 48.8° であった。また、上面の静的水接触角は 97.0° であり、接触角ヒステリシスは 22.6° であった。

[0074] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。本実験では底面を親水化したことによって、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0075] (比較例 5)

表面処理の条件を実施例 3 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 3 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、環状オレフィンコポリマー (COC) フィルムを使用した。そして、底面及び上面に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、底面及び上面の静的水接触角は、97.0° であり、接触角ヒステリシスは 22.6° であった。

[0076] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面にわずかに裏移りしていた。本実験では底面も上面も共に疎水性のままであるため、底面の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、上面に裏移りして、底面から剥離

してしまったと考えられる。

[0077] (実施例4)

細胞接着抑制剤の種類とそのコーティング方法、及び表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。また、底面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、底面の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。また、上面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

また、細胞接着抑制剤として、側鎖にアジド基を有するポリビニルアルコール(BIOSURFINE(登録商標)-AWP, 東洋合成工業株式会社)を使用した。この細胞接着抑制剤を1%の水溶液に調製してバーコーターで底面に塗布した後、波長254nmのUVを積算光量0.7J/cm<sup>2</sup>で照射して硬化させた。

[0078] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。本実験では底面を親水化したことによって、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

すなわち、細胞接着抑制剤の種類を異なるものとした場合でも、底面に親水化処理を施すことによって、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りすることを防止することができた。

[0079] (比較例6)

表面処理の条件を実施例4と異なるものとし、その他の条件については、実施例4と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。また、底面及び上面に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、底面及び上面の静的水接触角は $96.7^\circ$ であり、接触角ヒステリシスは $18.0^\circ$ であった。

また、細胞接着抑制剤として、側鎖にアジド基を有するポリビニルアルコール (BIOSURFINE(登録商標)-AWP, 東洋合成工業株式会社) を使用した。この細胞接着抑制剤を1%の水溶液に調製してバーコーターで底面に塗布した後、波長 $254\text{ nm}$ のUVを積算光量 $0.7\text{ J/cm}^2$ で照射して硬化させた。

[0080] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面にわずかに裏移りしていた。本実験では底面も上面も共に疎水性のままであるため、底面の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、上面に裏移りして、底面から剥離してしまったと考えられる。

[0081] (実施例5)

実施例1と同じ条件でフィルムに表面処理を行った後、 $50^\circ\text{C}$ で7日間経過後に、底面及び上面の静的水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、底面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を1回施した。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。

[0082]  $50^\circ\text{C}$ で7日間経過後、コロナ処理を1回行った底面の静的水接触角は $87.8^\circ$ であり、接触角ヒステリシスは $43.9^\circ$ であった。また、表面処理を行わなかった上面の静的水接触角は $96.7^\circ$ であり、接触角ヒステリシスは $18.0^\circ$ であった。

すなわち、底面に表面処理を施したフィルムを $50^\circ\text{C}$ で7日間保管した結果、底面の静的水接触角は、表面処理を行っていない数値に近い、疎水性を示す数値にまで戻っていることが分かる。これに対して、底面の接触角ヒステリシスは、実施例1と比較して大きな変化は見られなかった。

[0083] 次に、実施例1と同様に、底面に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥さ

せた。

そして、この底面に対して上面を貼り付けて、 $10\text{ g/cm}^2$ の荷重をかけて1分静置した後、上面を底面から剥離した。

[0084] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。

すなわち、底面の静的水接触角が疎水性を示す数値にまで戻っていたが、底面の接触角ヒステリシスは親水化された数値を示しており、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0085] ここで、静的水接触角は、空気と触れている時の最表層の親水性官能基の量と相関のあるものであるため、経時で官能基が樹脂に潜り込んでしまった結果、その数値が疎水性を示す値にまで変化したと考えられる。

これに対して、接触角ヒステリシスは、最表層と少し内側の親水性官能基の量と相関のあるものであるため、経時で官能基が樹脂に潜り込んでも、その数値がほとんど変化しなかったと考えられる。

そして、このように底面の静的水接触角は疎水性の数値を示すものの、底面の接触角ヒステリシスが親水化された数値を示す場合に、底面は親水化されていると言えることが、上記の通り、明らかとなった。

[0086] (実施例6)

表面処理の条件を実施例5と異なるものとし、その他の条件については、実施例5と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。そして、 $50^\circ\text{C}$ で7日間経過後に、底面及び上面の静的水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

[0087] このとき、コロナ処理を3回行った底面の静的水接触角は $85.3^\circ$ であ

り、接触角ヒステリシスは44.5°であった。また、表面処理を行わなかった上面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

すなわち、底面に表面処理を施したフィルムを50°Cで7日間保管した結果、底面の静的水接触角は、表面処理を行っていない数値に近い、疎水性を示す数値にまで戻っていることが分かる。これに対して、底面の接触角ヒステリシスには、大きな変化は見られなかった。

[0088] 次に、実施例1と同様に、底面に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この底面に対して上面を貼り付けて、10g/cm<sup>2</sup>の荷重をかけて1分静置した後、上面を底面から剥離した。

[0089] その結果、実施例5と同様に、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。

すなわち、底面の静的水接触角が疎水性を示す数値にまで戻っていたが、底面の接触角ヒステリシスは親水化された数値を示しており、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0090] (比較例7)

表面処理の条件を実施例5と異なるものとし、その他の条件については、実施例5と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、底面及び上面に対して、表面処理を行わなかった。そして、50°Cで7日間経過後に、底面及び上面の静的水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

このとき、底面及び上面の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

[0091] 次に、実施例1と同様に、底面に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この底面に対して上面を貼り付けて、 $10\text{ g/cm}^2$ の荷重をかけて1分静置した後、上面を底面から剥離した。

[0092] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていた。本実験では底面も上面も共に疎水性のままであるため、底面の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、上面に裏移りして、底面から剥離してしまったと考えられる。

[0093] (実施例7)

表面処理の条件を実施例1と異なるものとし、その他の条件については、実施例1と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面処理として、底面に対してエキシマ照射装置(株式会社エム・ディ・コム製)を用いてエキシマ処理を1回施した。このとき、エキシマ処理の条件は12V、照射距離4mm、テーブル移動速度 $5\text{ mm/sec}$ とした。また、上面に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、底面の静的水接触角は $76.2^\circ$ であり、接触角ヒステリシスは $41.8^\circ$ であった。また、上面の静的水接触角は $96.7^\circ$ であり、接触角ヒステリシスは $18.0^\circ$ であった。

[0094] その結果、底面に形成された細胞接着抑制剤の膜は、上面に裏移りしていなかった。本実験では底面を親水化したことによって、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で上面は疎水性のままであるため、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

すなわち、親水化処理の方法をコロナ処理とは異なるものとした場合でも、底面に親水化処理を施すことによって、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りすることを防止することができた。

[0095] 以上の通り、培養容器内の底面のみを親水化するか、又は底面を上面より

も強く親水化することによって、底面の基材と細胞接着抑制剤の密着性を上面の基材と細胞接着抑制剤の密着性よりも相対的に向上させることができ、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離を防止できることが明らかとなった。一方、培養容器内の上面を強く親水化すると、細胞接着抑制剤は底面から剥離しやすくなることが明らかとなった。

また、細胞接着抑制剤の種類を異なるものとした場合でも、培養容器内の底面のみを親水化するか、又は底面を上面よりも強く親水化することにより、底面から上面に細胞接着抑制剤が裏移りすることを防止できることが分かった。

[0096] 次に、本発明の本実施形態に係る積層構造体において、培養基材 1 のコーティング層が形成される表面の接触角ヒステリシスが、その表面の反対側のコーティング層が形成されない表面の接触角ヒステリシスよりも大きければ、コーティング層が形成された表面から剥がれて反対側の表面に裏移りすることがないことを確認するために行った実験について詳細に説明する。

なお、以下に示す実施例 11～17、及び比較例 11～17は、それぞれ上述した実施例 1～7、及び比較例 1～7と同一の実験であるが、それぞれ対応する実施形態において使用している用語が異なるため、改めて説明する。

[0097] (実施例 11)

ポリオレフィンからなる長方形のフィルムを準備して、図 2 に示すように、その左半分側の正方形部分を培養基材 1 の表面 11 と想定し、その右半分側の正方形部分を培養基材 1 の表面 12 と想定した。そして、表面 11 に細胞接着抑制剤を塗布した後、表面 12 を表面 11 に重ね合わせて荷重をかけ、その後、表面 12 を表面 11 から剥離して、細胞接着抑制剤が表面 12 に裏移りしたか否かを目視により判定した。具体的には、以下のように行った。

[0098] まず、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、表面処理として、表面 11 に対してバッチ式コロナ処理装置 (春日電機

株式会社製、以下同様)を用いてコロナ処理を1回施した。また、表面12に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、表面11の静的水接触角は71.9°であり、接触角ヒステリシスは43.6°であった。また、表面12の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

[0099] 静的水接触角及びヒステリシスの測定には、固液界面解析システムDropMaster 700(協和界面科学株式会社製)を使用した。

具体的には、静的水接触角( $\theta_s$ )は、フィルム上に純水3 $\mu$ lを滴下して測定した。また、接触角ヒステリシス( $\theta_a - \theta_r$ )は、フィルム上に純水30 $\mu$ lを滴下し、1秒毎に1°ずつ測定台を傾け、滑落時の前進接触角( $\theta_a$ )と後退接触角( $\theta_r$ )を接線法により算出して得た。

[0100] 次に、表面11に対して、細胞接着抑制剤として0.5%に調製されたリン脂質ポリマー(LIPIDURE(登録商標)、日油株式会社)エタノール溶液をバーコーターで塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この表面11に対して表面12を貼り付けて、10g/cm<sup>2</sup>の荷重をかけて1分静置した後、表面12を表面11から剥離した。

[0101] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜(コーティング層)は、表面12に裏移りしていなかった。本実験では表面11を親水化したことにより、表面11の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面12は疎水性のままであるため、表面11から表面12に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0102] (実施例12)

表面処理の条件を実施例11と異なるものとし、その他の条件については、実施例11と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面処理として、表面11に対してバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、表面12に対しては、表面処理を行わ

なかった。

このとき、表面 1 1 の静的水接触角は 54.2° であり、接触角ヒステリシスは 50.3° であった。また、表面 1 2 の静的水接触角は 96.7° であり、接触角ヒステリシスは 18.0° であった。

[0103] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、裏移りしていなかった。本実験では表面 1 1 をより強く親水化したことによって、表面 1 1 の基材と細胞接着抑制剤の密着性が一層向上し、一方で表面 1 2 は疎水性のままであるため、表面 1 1 から表面 1 2 に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0104] (比較例 1 1)

表面処理の条件を実施例 1 1 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 1 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、表面 1 1 及び表面 1 2 に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、表面 1 1 及び表面 1 2 の静的水接触角は 96.7° であり、接触角ヒステリシスは 18.0° であった。

[0105] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 1 2 に大きく裏移りしていた。本実験では表面 1 1 も表面 1 2 も共に疎水性のままであるため、表面 1 1 の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、表面 1 2 に裏移りして、表面 1 1 から剥離してしまったと考えられる。

[0106] (比較例 1 2)

表面処理の条件を実施例 1 1 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 1 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、表面 1 1 に対して、表面処理を行わなかった。一方、表面 1 2 に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を 3 回施した。

このとき、表面 1 1 の静的水接触角は 96.7° であり、接触角ヒステリ

シスは18.0°であった。また、表面12の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0107] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12に大きく裏移りしていた。本実験では表面11が疎水性のままである一方、表面12が強く親水化されたため、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜が表面12に裏移りし、表面11から剥離してしまったと考えられる。

[0108] (比較例13)

表面処理の条件を実施例11と異なるものとし、その他の条件については、実施例11と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面11に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を1回施し、表面12に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。

このとき、表面11の静的水接触角は71.9°であり、接触角ヒステリシスは43.6°であった。また、表面12の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0109] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12に大きく裏移りしていた。本実験では表面11よりも表面12がより強く親水化されたため、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜が表面12に裏移りし、表面11から剥離してしまったと考えられる。

[0110] (比較例14)

表面処理の条件を実施例11と異なるものとし、その他の条件については、実施例11と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面11及び表面12に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。

このとき、表面11及び表面12の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。

[0111] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 1 2 に大きく裏移りしていた。本実験では表面 1 1 も表面 1 2 も同様に強く親水化されたため、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜が表面 1 2 に裏移りし、表面 1 1 から剥離してしまったと考えられる。

このように、比較例 1 2 ~ 1 4 の結果から、表面 1 2 が強く親水化されていると、細胞接着抑制剤は表面 1 1 から剥離しやすくなることが分かった。

[0112] (実施例 1 3)

フィルムの材料と表面処理の条件を実施例 1 1 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 1 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、環状オレフィンコポリマー (COC) フィルムを使用した。そして、表面 1 1 に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を 3 回施した。また、表面 1 2 に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、表面 1 1 の静的水接触角は 55.2° であり、接触角ヒステリシスは 48.8° であった。また、表面 1 2 の静的水接触角は 97.0° であり、接触角ヒステリシスは 22.6° であった。

[0113] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 1 2 に裏移りしていなかった。本実験では表面 1 1 を親水化したことによって、表面 1 1 の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面 1 2 は疎水性のままであるため、表面 1 1 から表面 1 2 に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0114] (比較例 1 5)

表面処理の条件を実施例 1 3 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 3 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、環状オレフィンコポリマー (COC) フィルムを使用した。そして、表面 1 1 及び表面 1 2 に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、表面 1 1 及び表面 1 2 の静的水接触角は、97.0° であり、

接触角ヒステリシスは22.6°であった。

[0115] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12にわずかに裏移りしていた。本実験では表面11も表面12も共に疎水性のままであるため、表面11の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、表面12に裏移りして、表面11から剥離してしまったと考えられる。

[0116] (実施例14)

細胞接着抑制剤の種類とそのコーティング方法、及び表面処理の条件を実施例11と異なるものとし、その他の条件については、実施例11と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。また、表面11に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、表面12に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、表面11の静的水接触角は54.2°であり、接触角ヒステリシスは50.3°であった。また、表面12の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

また、細胞接着抑制剤として、側鎖にアジド基を有するポリビニルアルコール(BIOSURFINE(登録商標)-AWP, 東洋合成工業株式会社)を使用した。この細胞接着抑制剤を1%の水溶液に調製してバーコーターで表面11に塗布した後、波長254nmのUVを積算光量0.7J/cm<sup>2</sup>で照射して硬化させた。

[0117] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12に裏移りしていなかった。本実験では表面11を親水化したことによって、表面11の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面12は疎水性のままであるため、表面11から表面12に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

すなわち、細胞接着抑制剤の種類を異なるものとした場合でも、表面11に親水化処理を施すことによって、表面11から表面12に細胞接着抑制剤

が裏移りすることを防止することができた。

[0118] (比較例 16)

表面処理の条件を実施例 14 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 14 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。また、表面 11 及び表面 12 に対して、表面処理を行わなかった。

このとき、表面 11 及び表面 12 の静的水接触角は  $96.7^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $18.0^\circ$  であった。

また、細胞接着抑制剤として、側鎖にアジド基を有するポリビニルアルコール (BIOSURFINE(登録商標)-AWP, 東洋合成工業株式会社) を使用した。この細胞接着抑制剤を 1% の水溶液に調製してバーコーターで表面 11 に塗布した後、波長  $254\text{ nm}$  の UV を積算光量  $0.7\text{ J/cm}^2$  で照射して硬化させた。

[0119] その結果、表面 11 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 12 にわずかに裏移りしていた。本実験では表面 11 も表面 12 も共に疎水性のままであるため、表面 11 の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、表面 12 に裏移りして、表面 11 から剥離してしまったと考えられる。

[0120] (実施例 15)

実施例 11 と同じ条件でフィルムに表面処理を行った後、 $50^\circ\text{C}$  で 7 日間経過後に、表面 11 及び表面 12 の静的水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、表面 11 に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を 1 回施した。また、表面 12 に対しては、表面処理を行わなかった。

[0121]  $50^\circ\text{C}$  で 7 日間経過後、コロナ処理を 1 回行った表面 11 の静的水接触角は  $87.8^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $43.9^\circ$  であった。また、表面処理を行わなかった表面 12 の静的水接触角は  $96.7^\circ$  であり、接触角

ヒステリシスは18.0°であった。

すなわち、表面11に表面処理を施したフィルムを50℃で7日間保管した結果、表面11の静的水接触角は、表面処理を行っていない数値に近い、疎水性を示す数値にまで戻っていることが分かる。これに対して、表面11の接触角ヒステリシスは、実施例1と比較して大きな変化は見られなかった。

[0122] 次に、実施例11と同様に、表面11に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この表面11に対して表面12を貼り付けて、10g/cm<sup>2</sup>の荷重をかけて1分静置した後、表面12を表面11から剥離した。

[0123] その結果、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12に裏移りしていなかった。

すなわち、表面11の静的水接触角が疎水性を示す数値にまで戻っていたが、表面11の接触角ヒステリシスは親水化された数値を示しており、表面11の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面12は疎水性のままであるため、表面11から表面12に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0124] このように表面11の静的水接触角は疎水性の数値を示すものの、表面11の接触角ヒステリシスが親水化された数値を示す場合に、表面11は親水化されていると言えることが、上記の通り、明らかとなった。

[0125] (実施例16)

表面処理の条件を実施例15と異なるものとし、その他の条件については、実施例15と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面11に対して、表面処理としてバッチ式コロナ処理装置を用いてコロナ処理を3回施した。また、表面12に対しては、表面処理を行わなかった。そして、50℃で7日間経過後に、表面11及び表面12の静的

水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

[0126] このとき、コロナ処理を3回行った表面11の静的水接触角は85.3°であり、接触角ヒステリシスは44.5°であった。また、表面処理を行わなかった表面12の静的水接触角は96.7°であり、接触角ヒステリシスは18.0°であった。

すなわち、表面11に表面処理を施したフィルムを50℃で7日間保管した結果、表面11の静的水接触角は、表面処理を行っていない数値に近い、疎水性を示す数値にまで戻っていることが分かる。これに対して、表面11の接触角ヒステリシスには、大きな変化は見られなかった。

[0127] 次に、実施例11と同様に、表面11に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この表面11に対して表面12を貼り付けて、10g/cm<sup>2</sup>の荷重をかけて1分静置した後、表面12を表面11から剥離した。

[0128] その結果、実施例15と同様に、表面11に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面12に裏移りしていなかった。

すなわち、表面11の静的水接触角が疎水性を示す数値にまで戻っていたが、表面11の接触角ヒステリシスは親水化された数値を示しており、表面11の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面12は疎水性のままであるため、表面11から表面12に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

[0129] (比較例17)

表面処理の条件を実施例5と異なるものとし、その他の条件については、実施例5と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン(PE)フィルムを使用した。そして、表面11及び表面12に対して、表面処理を行わなかった。そして、50℃で7日間経過後に、表面11及び表面12の静的水接触角と接触角ヒステリシスを測定した。

このとき、表面 1 1 及び表面 1 2 の静的水接触角は  $96.7^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $18.0^\circ$  であった。

[0130] 次に、実施例 1 1 と同様に、表面 1 1 に対して、細胞接着抑制剤を塗布して膜を形成した後、この細胞接着抑制剤の膜をクマシーブルーにて染色して乾燥させた。

そして、この表面 1 1 に対して表面 1 2 を貼り付けて、 $10\text{ g/cm}^2$  の荷重をかけて 1 分静置した後、表面 1 2 を表面 1 1 から剥離した。

[0131] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 1 2 に裏移りしていた。本実験では表面 1 1 も表面 1 2 も共に疎水性のままであるため、表面 1 1 の基材と細胞接着抑制剤が十分に接着せず、表面 1 2 に裏移りして、表面 1 1 から剥離してしまったと考えられる。

[0132] (実施例 1 7)

表面処理の条件を実施例 1 1 と異なるものとし、その他の条件については、実施例 1 1 と同様にして、実験を行った。

具体的には、フィルムとして、ポリエチレン (PE) フィルムを使用した。そして、表面処理として、表面 1 1 に対してエキシマ照射装置 (株式会社 エム・ディ・コム製) を用いてエキシマ処理を 1 回施した。このとき、エキシマ処理の条件は  $12\text{ V}$ 、照射距離  $4\text{ mm}$ 、テーブル移動速度  $5\text{ mm/sec}$  とした。また、表面 1 2 に対しては、表面処理を行わなかった。

このとき、表面 1 1 の静的水接触角は  $76.2^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $41.8^\circ$  であった。また、表面 1 2 の静的水接触角は  $96.7^\circ$  であり、接触角ヒステリシスは  $18.0^\circ$  であった。

[0133] その結果、表面 1 1 に形成された細胞接着抑制剤の膜は、表面 1 2 に裏移りしていなかった。本実験では表面 1 1 を親水化したことによって、表面 1 1 の基材と細胞接着抑制剤の密着性が向上し、一方で表面 1 2 は疎水性のままであるため、表面 1 1 から表面 1 2 に細胞接着抑制剤が裏移りせず、剥離しなかったと考えられる。

すなわち、親水化処理の方法をコロナ処理とは異なるものとした場合でも

、表面 1 1 に親水化処理を施すことによって、表面 1 1 から表面 1 2 に細胞接着抑制剤が裏移りすることを防止することができた。

[0134] 以上の通り、培養容器内の表面 1 1 のみを親水化するか、又は表面 1 1 を表面 1 2 よりも強く親水化することによって、表面 1 1 の基材とコーティング層の密着性を表面 1 2 の基材とコーティング層の密着性よりも相対的に向上させることができ、表面 1 1 から表面 1 2 にコーティング層が裏移りせず、剥離を防止できることが明らかとなった。一方、培養容器内の表面 1 2 を強く親水化すると、コーティング層は表面 1 1 から剥離しやすくなることが明らかとなった。

また、コーティング層の種類を異なるものとした場合でも、培養容器内の表面 1 1 のみを親水化するか、又は表面 1 1 を表面 1 2 よりも強く親水化することにより、表面 1 1 から表面 1 2 にコーティング層が裏移りすることを防止できることが分かった。

[0135] 本発明は、以上の実施形態に限定されるものではなく、本発明の範囲内において、種々の変更実施が可能であることは言うまでもない。

例えば、上記実施例では、培養容器の基材としてポリエチレンと環状オレフィンコポリマーを用いたが、ポリオレフィンであればその他の基材を用いても良い。また、表面処理としては、接触角ヒステリシスの値にもとづき親水化が示されるものであれば、コロナ処理やエキシマ処理に限定されず、その他の処理を用いることもできる。さらに、培養容器内の上面及び下面に細胞接着抑制剤の膜を形成するなど適宜変更することが可能である。

### 産業上の利用可能性

[0136] 本発明は、iPS細胞などをスフェア培養する場合に好適に利用することが可能である。

また、本発明は、細胞培養容器を製造するための包材などに好適に利用することが可能である。

[0137] この明細書に記載の文献及び本願の pari 優先の基礎となる日本出願明細書の内容を全てここに援用する。

## 符号の説明

- [0138] 1、1 a 培養基材  
1 1 第一の表面  
1 2、1 2 a 第二の表面  
2 コーティング層

## 請求の範囲

- [請求項1] 軟包材からなる培養容器であって、  
対面する第一の側面部と第二の側面部とを備え、  
接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きくなるように、少なくとも前記第一の側面部の内面側に表面処理が施されており、かつ、  
前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤からなる膜が形成された  
ことを特徴とする培養容器。
- [請求項2] 前記第一の側面部の内面側の基材及び前記第二の側面部の内面側の基材がポリオレフィンからなることを特徴とする請求項1記載の培養容器。
- [請求項3] 少なくとも前記第一の側面部の内面側に親水化処理が施されていることを特徴とする請求項1又は2記載の培養容器。
- [請求項4] 前記細胞接着抑制剤が、少なくともリン脂質ポリマー又はポリビニルアルコール誘導体のいずれかであることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の培養容器。
- [請求項5] 前記第一の側面部の内面側に複数のウェルが形成されたことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の培養容器。
- [請求項6] スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、  
ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に親水化処理を施し、  
前記フィルム又はシートの親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、前記第一の側面部に対面する第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステ

リシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい前記培養容器を形成し、

前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布することを特徴とする培養容器の製造方法。

[請求項7]

スフェア培養のための培養容器の製造方法であって、

ポリオレフィンからなるフィルム又はシートの一部に第一の親水化処理を施すと共に、前記フィルム又はシートの他の一部に前記第一の親水化処理よりも親水化力の小さい第二の親水化処理を施し、

前記フィルム又はシートの前記第一の親水化処理が施された面を内面側に備えた第一の側面部と、前記第一の側面部に対面する前記第二の親水化処理が施された面を内面側に備えた第二の側面部とを備え、かつ、接触角ヒステリシスを水滑落時の前進接触角－後退接触角と定義した場合に、前記第一の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスが、前記第二の側面部の内面側の表面の接触角ヒステリシスより大きい前記培養容器を形成し、

前記第一の側面部の内面側に、細胞接着抑制剤を塗布することを特徴とする培養容器の製造方法。

[請求項8]

可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体であって、

前記培養基材はフィルム又はシート状であり、ロール状に巻き取られて前記積層構造体を形成し、

前記培養基材は、コーティング層が形成された第一の表面と、その反対側の第二の表面とを有し、前記第一の表面の親水性が前記第二の表面の親水性よりも高い

ことを特徴とする積層構造体。

[請求項9]

前記第二の表面と前記コーティング層が接着することなく密着していることを特徴とする請求項8記載の積層構造体。

[請求項10]

接触角ヒステリシスを前進接触角－後退接触角と定義した場合、前記第一の表面のヒステリシスが前記第二の表面のヒステリシスより大

きいことを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の積層構造体。

[請求項11] 前記コーティング層が細胞接着抑制剤を前記第一の表面に塗布して形成されたことを特徴とする請求項 8～10 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項12] 前記細胞接着抑制剤がリン脂質ポリマー又はポリビニルアルコール誘導体であることを特徴とする請求項 8～11 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項13] 前記培養基材がポリオレフィンからなることを特徴とする請求項 8～12 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項14] 前記第一の表面に親水化処理が施されていることを特徴とする請求項 8～13 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項15] 前記第二の表面に親水化処理が施されていないことを特徴とする請求項 8～14 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項16] 前記第二の表面の親水性が、前記第一の表面の親水性よりも小さくなるように、前記第二の表面に親水化処理が施されていることを特徴とする請求項 8～15 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項17] 前記培養基材が同一又は異なる複数の基材の層からなることを特徴とする請求項 8～16 のいずれかに記載の積層構造体。

[請求項18] 可撓性を有する培養基材を重ね合わせた積層構造体の製造方法であって、

フィルム又はシートからなる前記培養基材の第一の表面の親水性が、前記第一の表面の反対側の第二の表面の親水性よりも大きくなるように、少なくとも前記第一の表面に親水化処理を施し、

前記第一の表面上にコーティング剤を塗布してコーティング層を形成し、

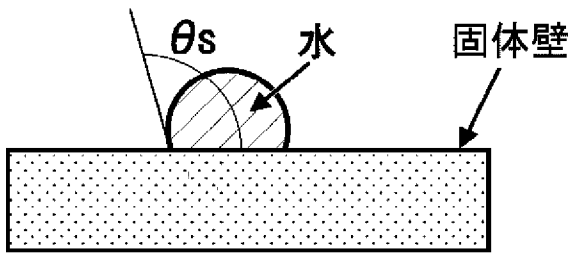
前記培養基材をロール状に巻き取る

ことを特徴とする積層構造体の製造方法。

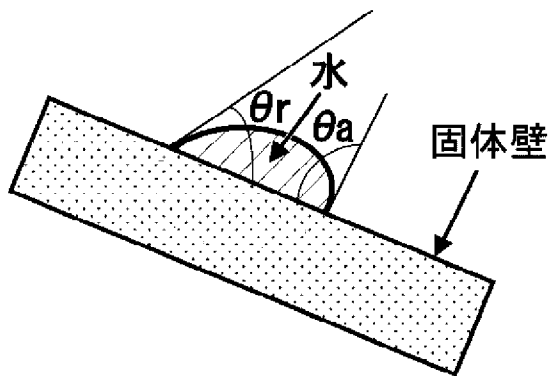
[請求項19] 前記第一の表面の親水性よりも前記第二の表面の親水性が小さくな

るように、前記第二の表面に親水化処理を施す  
ことを特徴とする請求項 1 8 記載の積層構造体の製造方法。

[図1A]

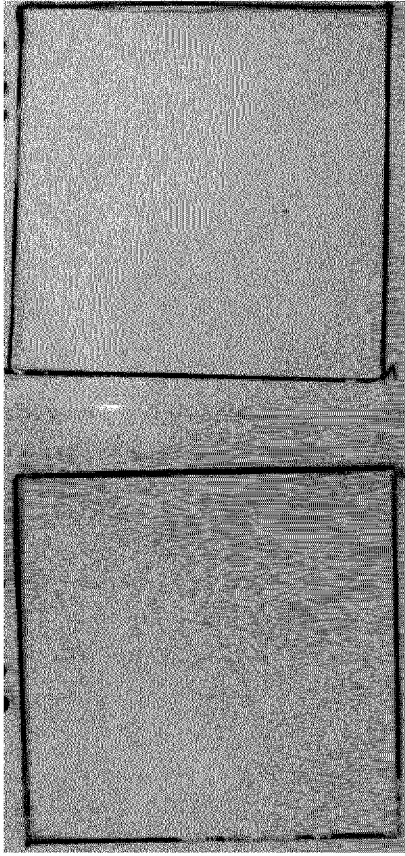


[図1B]



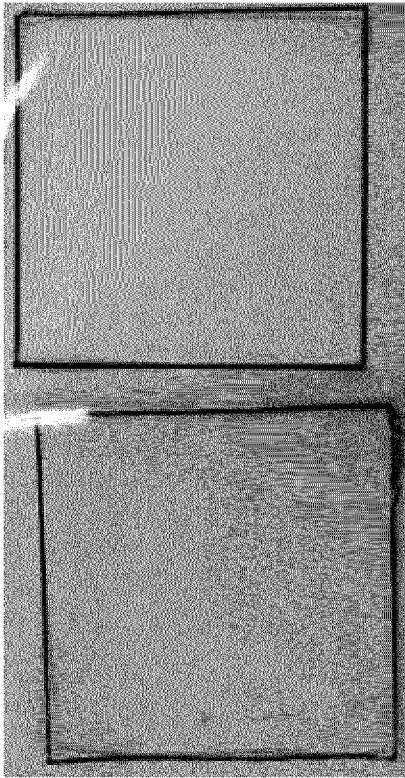
[図2]

実施例2 (実施例12)



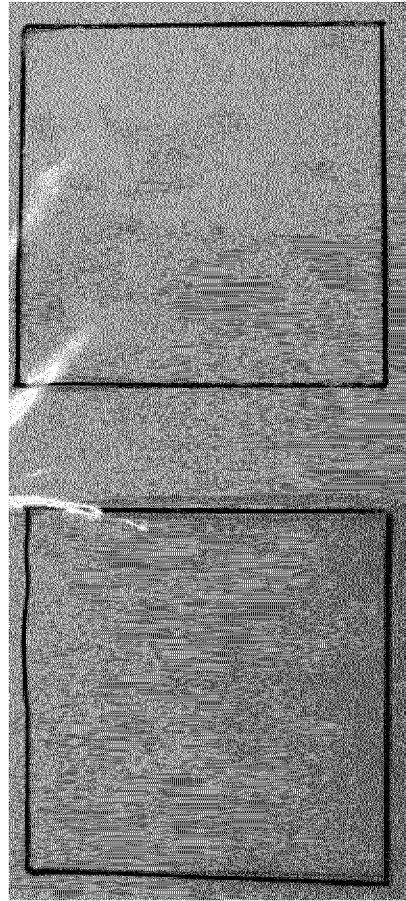
裏移りなし

実施例1 (実施例11)



裏移りなし

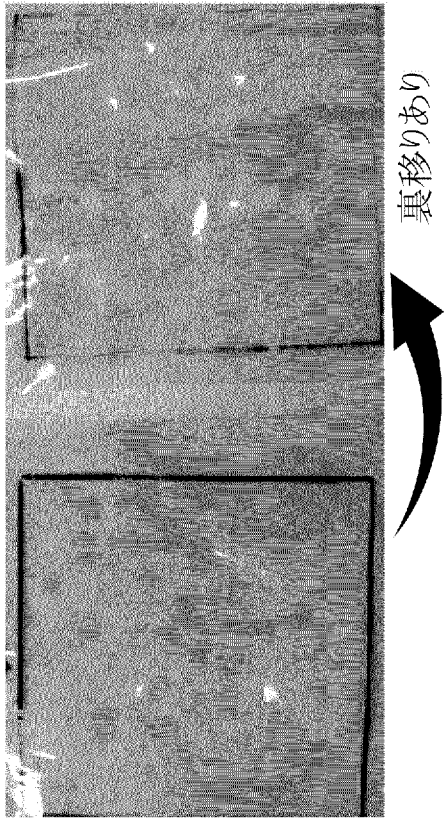
比較例1 (比較例11)



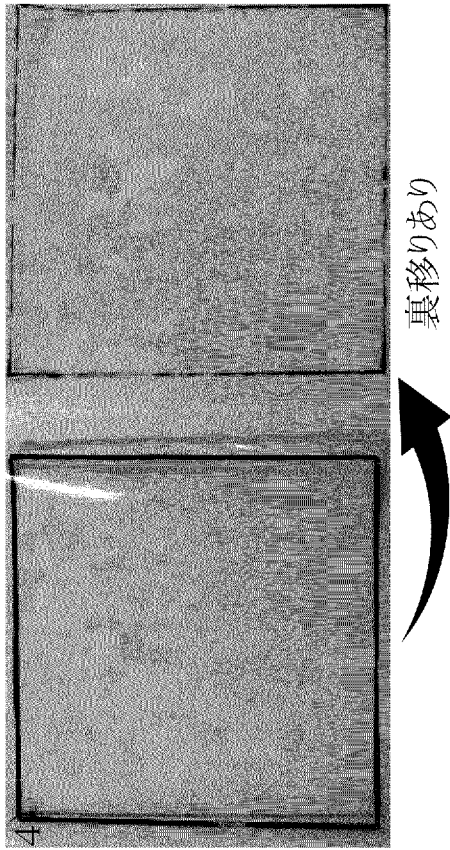
裏移りあり

[図3]

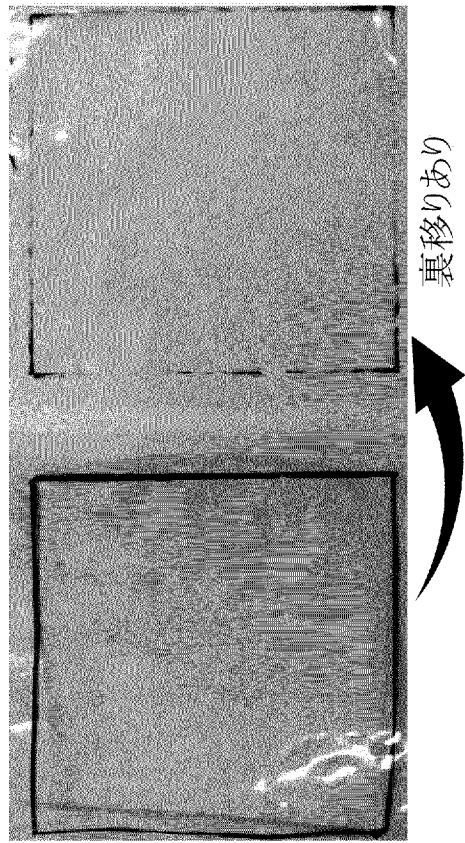
比較例3 (比較例13)



比較例2 (比較例12)

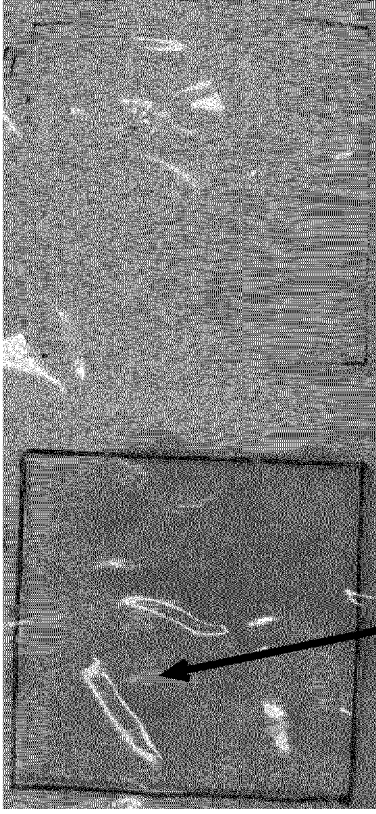


比較例4 (比較例14)

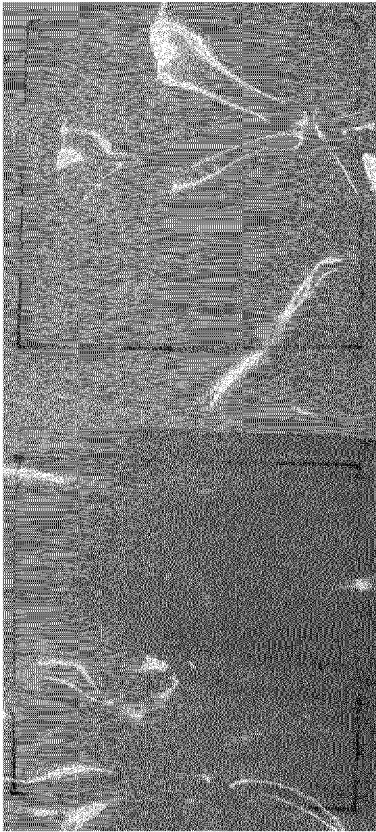


[図4]

比較例5 (比較例15)

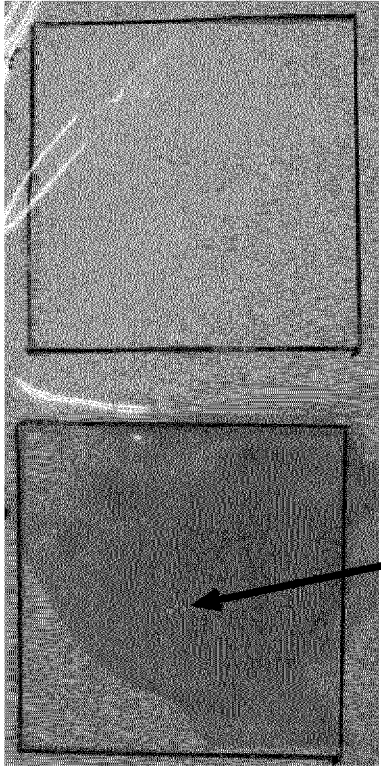


実施例3 (実施例13)



[図5]

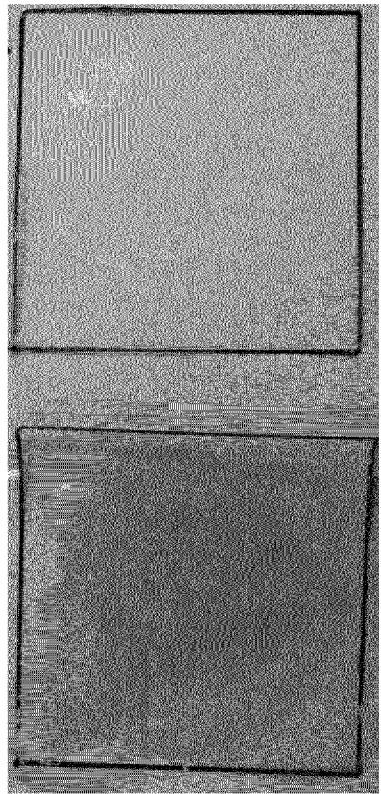
比較例6 (比較例16)



裏移りあり

この辺りに  
剥がれあり

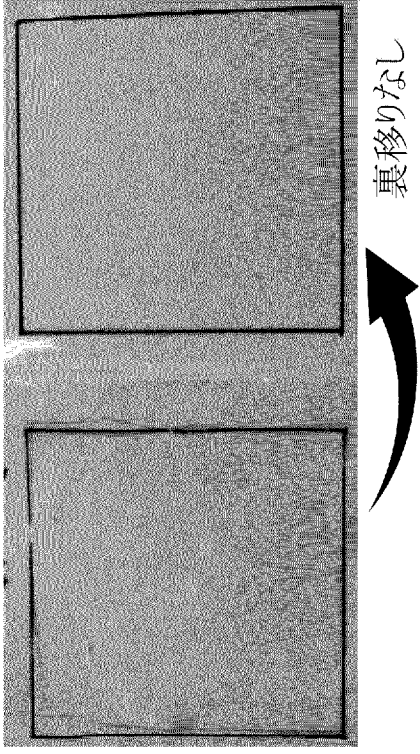
実施例4 (実施例14)



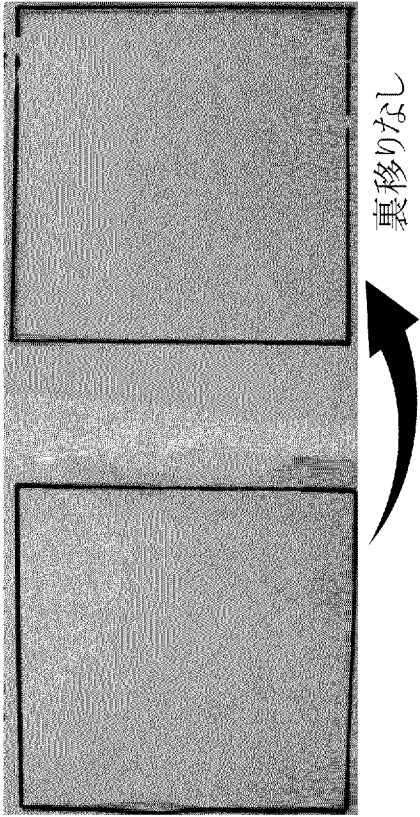
裏移りなし

[図6]

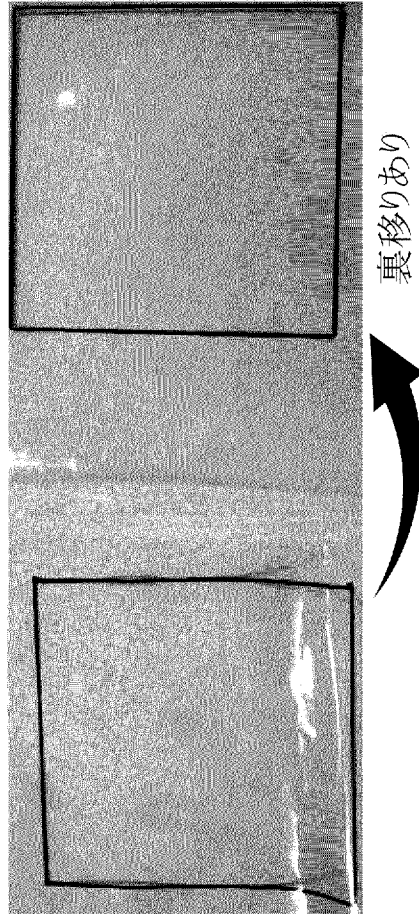
実施例6 (実施例16)



実施例5 (実施例15)

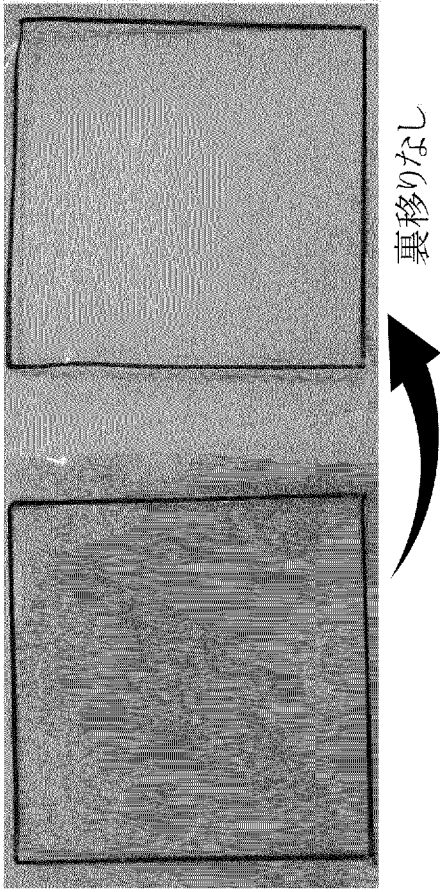


比較例7 (比較例17)

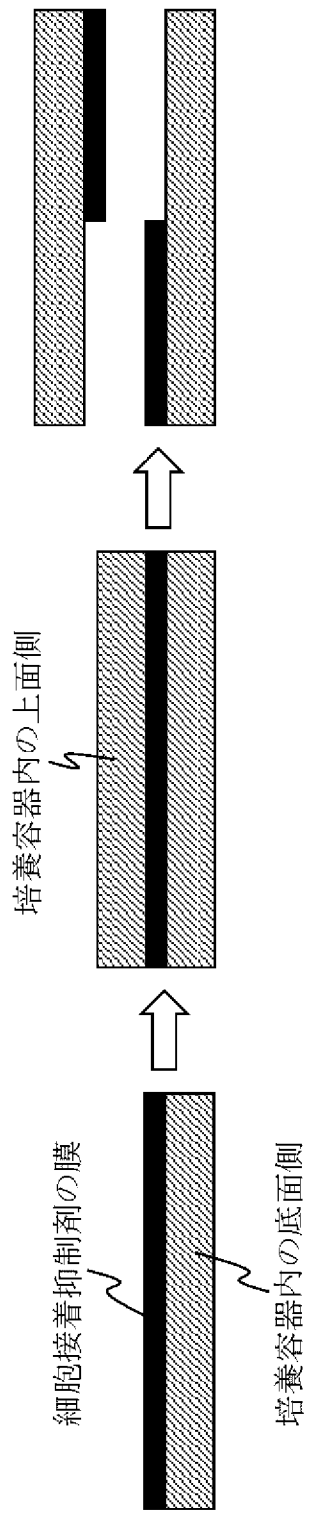


[図7]

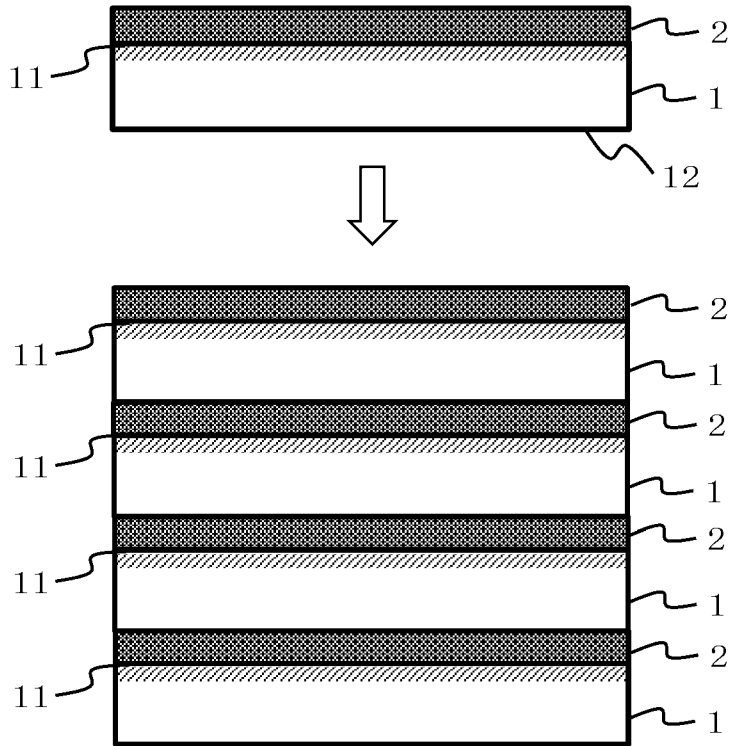
実施例7 (実施例17)



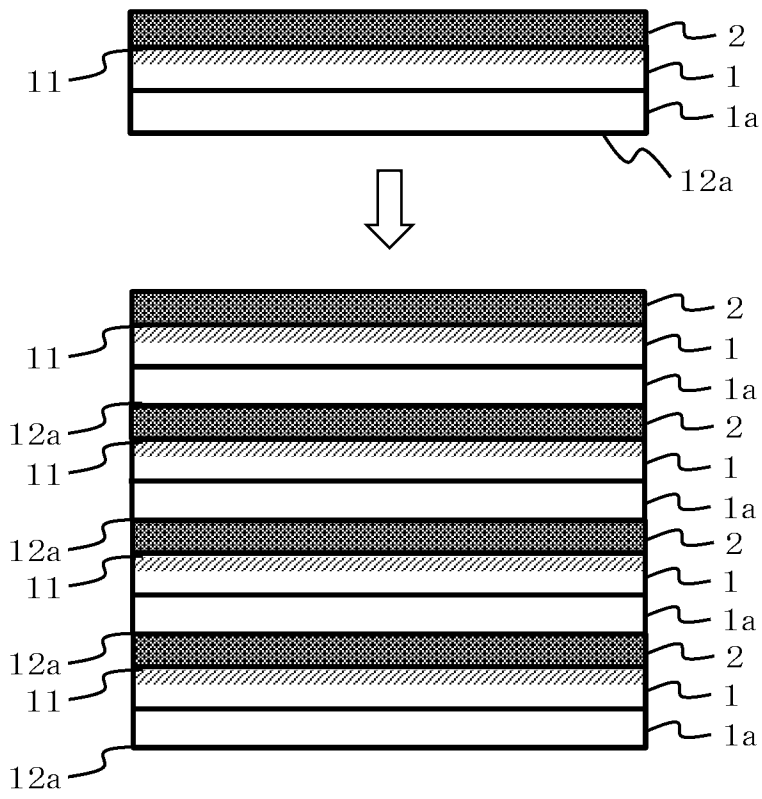
[図8]



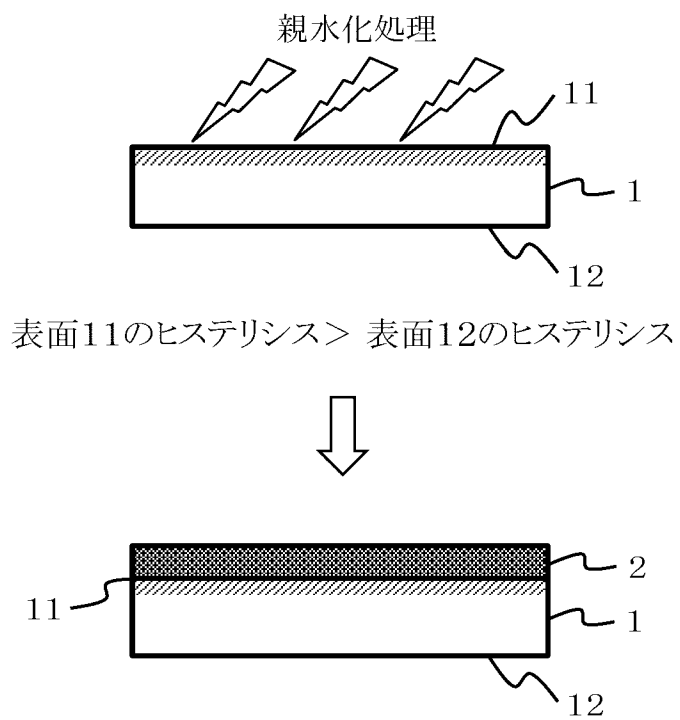
[図9]



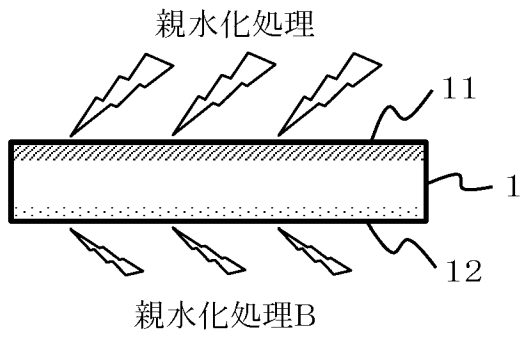
[図10]



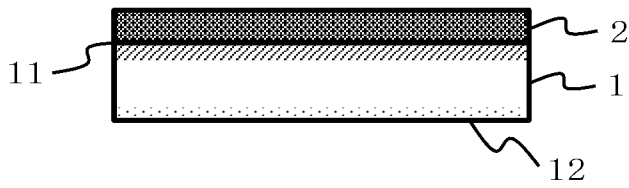
[図11]



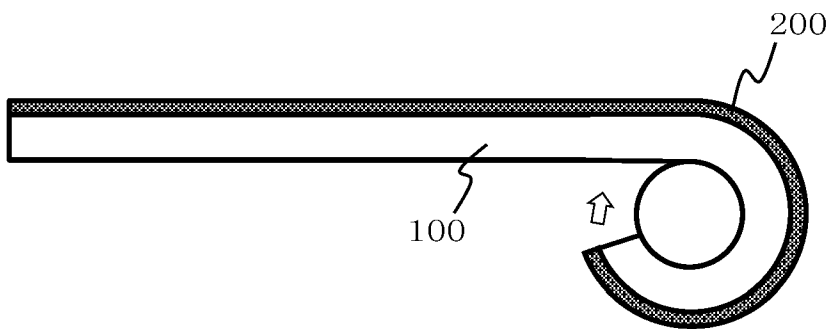
[図12]



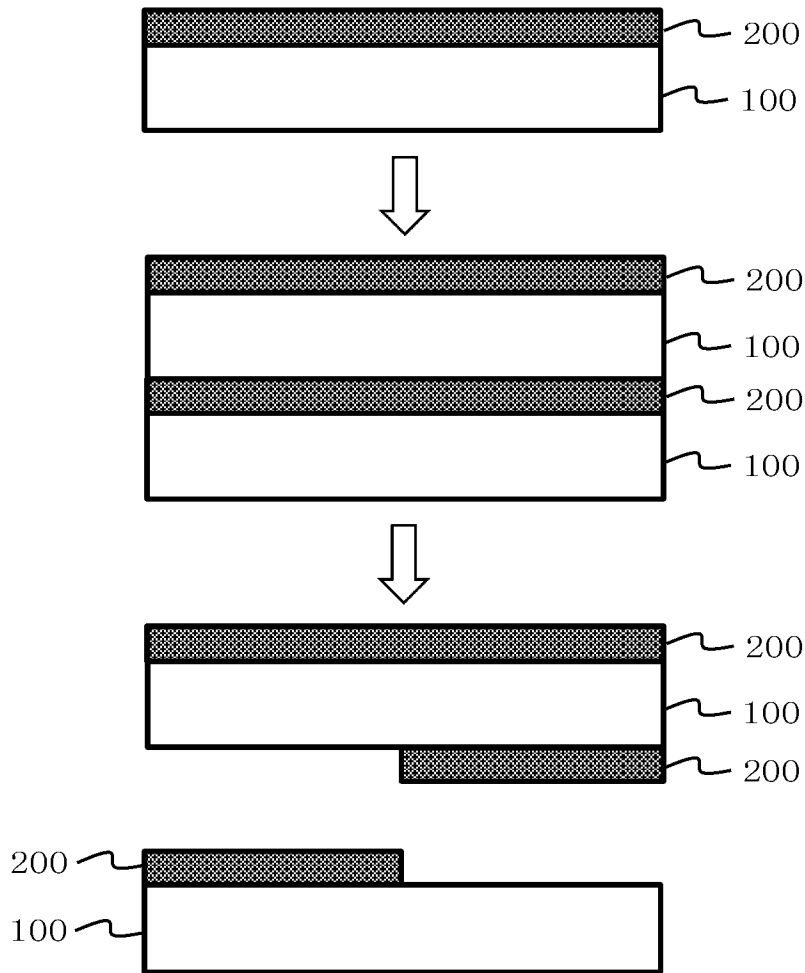
表面11のヒステリシス > 表面12のヒステリシス



[図13]



[図14]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/025017

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12M1/00 (2006.01) i, 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)

Int.Cl. C12M1/00, C12M3/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3-160984 A (KAWASUMI LABORATORIES, INC.) 10 July 1991, entire text (Family: none)	1-19
A	JP 6-98756 A (NISSHO CO., LTD.) 12 April 1994, entire text (Family: none)	1-19
A	WO 2012/036011 A1 (ASAHI GLASS CO., LTD.) 22 March 2012, entire text & US 2013/0203159 A1 & EP 2617807 A1 & CN 103119151 A	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“I” 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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search  
06 August 2018 (06.08.2018)

Date of mailing of the international search report  
21 August 2018 (21.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/025017

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-70636 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 22 April 2013, entire text & WO 2013/047655 A1	1-19
A	JP 2016-47902 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 07 April 2016, entire text (Family: none)	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, 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. C12M1/00, C12M3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)

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	JP 3-160984 A (川澄化学工業株式会社) 1991.07.10, 全文 (ファミリーなし)	1-19
A	JP 6-98756 A (株式会社ニッショー) 1994.04.12, 全文 (ファミリーなし)	1-19
A	WO 2012/036011 A1 (旭硝子株式会社) 2012.03.22, 全文 & US 2013/0203159 A1 & EP 2617807 A1 & CN 103119151 A	1-19

☑ 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

06.08.2018

国際調査報告の発送日

21.08.2018

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

川合 理恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4046

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
A	JP 2013-70636 A (住友ベークライト株式会社) 2013.04.22, 全文 & WO 2013/047655 A1	1-19
A	JP 2016-47902 A (住友ベークライト株式会社) 2016.04.07, 全文 (ファミリーなし)	1-19