

(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 10 月 11 日(11.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/137830 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 5/07 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/059219
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 4 日(04.04.2012)
- (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 2011-084119 2011 年 4 月 5 日(05.04.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目 3
番 2 号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 加藤 幸夫
(KATO Yukio) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南
区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大
学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 平田
伊佐雄(HIRATA Isao) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広

島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島
大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP).
金輪 真佐美(KANAWA Masami) [JP/JP]; 〒
7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号
国立大学法人広島大学 自然科学研究支援開発
センター内 Hiroshima (JP).

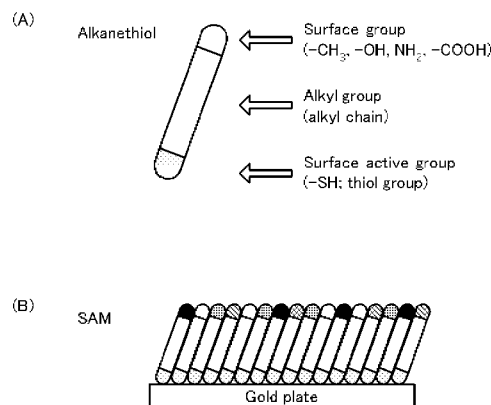
- (74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東
京都千代田区神田錦町二丁目 7 番地 協販ビル
2 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) Title: ANIMAL CELL CULTURE KIT, METHOD FOR CULTURING ANIMAL CELLS, METHOD FOR SELECTIVE CULTURE OF ANIMAL CELLS AND CELL DIFFERENTIATION METHOD

(54) 発明の名称: 動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法

【図1】



(57) Abstract: Provided are an animal cell culture kit which can be favourably used for culture of animal cells, a method for culturing animal cells, a method for selective culture of animal cells, and a cell differentiation method. The animal cell culture kit according to the present invention is provided with: an incubator having on the surface thereof one or more type of functional group from a set comprising hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups in a given proportion; and a serum-free medium. Because the animal cell culture kit is provided with an incubator having on the surface thereof functional groups suitable for culture and proliferation of specified animal cells, proliferation of animal cells can be promoted even with a serum-free medium.

(57) 要約: 動物細胞の培養に好適に用い得る動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法を提供する。本発明に係る動物細胞培養キットは、親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から 1 種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地と、を備える。動物細胞培養キットは、特定の動物細胞の接着・増殖に適した官能基を表面に有する培養器を備えるため、無血清培地でも動物細胞の増殖の促進が可能である。



WO 2012/137830 A1



ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー 添付公開書類:

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：

動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法

技術分野

[0001] 本発明は、動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法に関する。

背景技術

[0002] 動物細胞の培養では、プラズマ照射などで様々なイオン基が導入された組織培養用ポリスチレン培養皿が広く用いられている。しかし、イオン基導入によるイオン化の程度は一定ではなく、表面組成が化学的に規定されていない。このような通常の組織培養用ポリスチレン培養皿でも、不死化した株細胞はよく増殖する場合が多い。

[0003] 一方で、組織から分離された初代動物細胞は、不均質な細胞集団であるため、あるいは培養系に馴化していないため、増殖速度が低いことが多い。このため、組織培養用ポリスチレン培養皿を用いた場合では、動物細胞を用いた基礎研究、再生医療、バイオ医薬品などの開発が困難である。また、組織培養用ポリスチレン培養皿では、成長因子やサイトカインが添加されても、目的細胞を選択的に増殖させ難い。あるいは不均質な細胞集団から目的細胞以外の混入細胞を除去できない。そのため再生医療あるいはバイオ医薬などの研究開発が困難である。

[0004] 上記の通常の組織培養ポリスチレン培養皿の欠点を補うため、コート剤として、フィブロネクチンやコラーゲンなどの接着因子、接着因子の部分ペプチド、ポリリジン、基底膜などの細胞外基質が使用されている。これらのコート剤は、高価であり、また、培養の効果は限られた細胞に限定的であった。

[0005] また、一般的に、動物細胞の培養には、高濃度の血清が添加された血清含

有培養液が用いられる。しかし、血清は天然成分であるため、血清含有培養液では、成分不確定、ロット間のバラツキ、病原体混入リスク、免疫反応リスクなどの欠点がある。このため、血清含有培養液を用いた場合、細胞増殖（分化）にバラツキが生じやすい。これらの欠点を克服するため、無血清培養液が開発されつつある。しかし、無血清培養液には血清中の接着因子が含有されていないため、通常の組織培養用ポリスチレン培養皿で培養しようとすると、細胞が接着／増殖しにくいという問題がある。

[0006] 更には、近年、 NH_2 基や COOH 基を添加したプラスチック培養皿も販売されているが、細胞増殖への影響は十分には明らかになっていない。また、一部の研究では、培養皿表面に自己組織化単分子膜（SAM）を備える培養皿について検討されている。SAMを構成する官能基3種類の組み合わせ（ CH_3/OH 、 CH_3/COOH 、 CH_3/NH_2 ）及び配合比を変えて、2－10%牛胎児血清存在下で、癌細胞や株化（不死化）細胞の接着に及ぼす影響が検討されている（非特許文献1）。

[0007] また、2種類の官能基の組み合わせが癌細胞や株化（不死化）細胞の短期間の増殖に及ぼす影響が検討されている（非特許文献2）。

[0008] また、RGDペプチドのSAMへの血管内皮細胞の接着について報じられている（非特許文献3）。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Arima Y, Iwata H. Biomaterials, 28: 3074－3082, 2007

非特許文献2: Fuse Y, Hirata I, Kurihara H, Okazaki M ; 「Cell adhesion and proliferation patterns on mixed self-assembled monolayers carrying various ratios of hydroxyl and methyl groups.」; Dent Mater J. 2007 26 (6)

: 8 1 4 - 8 1 9 .

非特許文献3: J Am Chem Soc 1998, 120: 6548
- 6555

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかし、非特許文献1及び非特許文献2では、通常の組織培養用ポリスチレン培養皿以上に増殖を促進する官能基配合や不死化株細胞以外についての細胞（初代細胞、幹細胞など）の言及はない。細胞接着を極端に抑制する官能基が存在するのは予想の範囲内である。また、非特許文献3について、RGDペプチドが細胞接着を促進するのは当然である。つまり、従来、細胞接着に及ぼす官能基配合の基礎研究があったが、官能基配合SAMにより、通常培養皿と比較してより高レベルに細胞の増殖をもたらすという産業的な発想や研究および実験結果はなかった。

[0011] また、これまでのSAMの研究では血清が用いられていたが、血清タンパク質はSAMへ接着して、細胞との相互作用に干渉する。したがって、化学的規定化下で培養器表面の官能基配合を至適化できなかった。

[0012] 本発明は、上記事項に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、動物細胞の培養に好適に用い得る動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明の第1の観点に係る動物細胞培養キットは、
親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地と、を備える、
ことを特徴とする。

[0014] また、前記培養器が前記官能基を所定の割合で表面に有する自己組織化単分子膜を備えていてもよい。

[0015] また、前記親水性官能基が水酸基、アミノ基又はカルボキシル基であり、前記疎水性官能基がアルキル基であることが好ましい。

- [0016] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有し、ヒト骨髓間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0017] また、アミノ基：水酸基を40：60、カルボキシル基：メチル基を100：0～80：20、アミノ基：メチル基を20：80～80：20、アミノ基：カルボキシル基を40：60～20：80、或いは、水酸基：メチル基を100：0～80：20の割合で有し、不均質な細胞集団において初代のラット間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0018] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0019] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～60：40の割合で有し、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0020] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60、或いは、水酸基：メチル基を80：20～20：80の割合で有し、ヒト線維芽細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0021] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～0：100、或いは、水酸基：メチル基を80：20～20：80の割合で有し、ラット骨芽細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0022] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～0：100、或いは、カルボキシル基：メチル基を100：0～80：20の割合で有し、ラット骨髓間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0023] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト初代間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0024] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する形態でもよい。
- [0025] 本発明の第2の観点に係る動物細胞の培養方法は、
親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地とを用い、
所定の動物細胞の接着及び増殖を促進させる、

ことを特徴とする。

- [0026] 本発明の第3の観点に係る動物細胞の選択培養方法は、
親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地とを用い、
不均質な細胞集団から選択的に所定の動物細胞の接着及び増殖を促進させる、
ことを特徴とする。

- [0027] 本発明の第4の観点に係る動物細胞の培養方法は、
血清含有培地と、アミノ基：水酸基を100：0～20：80、水酸基：カルボキシル基を80：20～20：80、カルボキシル基：メチル基を100：0～60：40、アミノ基：メチル基を80：20～20：80、或いは、アミノ基：カルボキシル基を80：20～20：80の割合で表面に有する培養器とを用いて、ヒト間葉系幹細胞、ヒト線維芽細胞又はラット間葉系幹細胞の増殖を促進させる、
ことを特徴とする。

- [0028] 本発明の第5の観点に係る細胞分化方法は、
親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清の分化誘導培地とを用い、ヒト骨髓間葉系幹細胞を培養して前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を軟骨細胞又は骨細胞に分化させる、
ことを特徴とする。

- [0029] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有する前記培養器と、無血清の軟骨分化誘導培地とを用い、前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させてもよい。

- [0030] また、水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有する前記培養器と、無血清の骨形成分化誘導培地とを用い、前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を骨細胞に分化させてもよい。

- [0031] 本発明の第6の観点に係る細胞分化方法は、

親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と脂肪分化誘導培地とを用いてヒト骨髄間葉系幹細胞を培養し、前記ヒト骨髄間葉系幹細胞を脂肪細胞に分化させる、

ことを特徴とする。

発明の効果

[0032] 本発明に係る動物細胞培養キットは、特定の動物細胞の接着・増殖に適した官能基を表面に有する培養器を備えるため、無血清培地でも動物細胞の増殖の促進が可能である。

図面の簡単な説明

[0033] [図1] (A) はアルカンチオールのも式図、(B) はSAMの式図である。

[図2]実施例において、(A) はアルカンチオール(NH_2-SH 及び $\text{OH}-\text{SH}$)の配合比に対する作製したSAM表面の官能基の組成を示すグラフ、(B) はアルカンチオール($\text{OH}-\text{SH}$ 及び $\text{COOH}-\text{SH}$)の配合比に対する作製したSAM表面の官能基の組成を示すグラフ、(C) はアルカンチオール($\text{COOH}-\text{SH}$ 及び CH_3-SH)の配合比に対する作製したSAM表面の官能基の組成を示すグラフ、(D) はアルカンチオール(CH_3-SH 及び NH_2-SH)の配合比に対する作製したSAM表面の官能基の組成を示すグラフである。

[図3] (A) は実験1における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、(B) は実験2における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、(C) は実験3における4日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図4]実験1における4日間培養後の細胞の写真であり、(A) はControl、(B) はSAM(A6)、(C) はSAM(A8)、(D) はSAM(A19)の写真である。

[図5]実験2における4日間培養後の細胞の写真であり、(A) はSAM(A1)、(B) はSAM(A8)、(C) はSAM(A14)、(D) はSAM(A20)の写真である。

[図6]実験3における4日間培養後の細胞の写真であり、(A) はSAM(A

1)、(B)はSAM(A7)、(C)はSAM(A16)の写真である。

[図7]実験4における4日間培養後の細胞数測定結果を示す図である。

[図8]実験4における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM(B5)、(C)はSAM(B8)、(D)はSAM(B13)の写真である。

[図9](A)は実験5における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、(B)は実験6における4日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図10]実験5における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM(A1)、(C)はSAM(A15)、(D)はSAM(A21)の写真である。

[図11]実験1における4日間培養後のDNA定量結果を示す図である。

[図12]実験5における4日間培養後のDNA定量結果を示す図である。

[図13](A)は実験1における通常培養皿及びSAM(A8)と、実験5の通常培養皿及びSAM(A5)の4日間培養後のMTT試験結果を示す図、(B)は実験1における通常培養皿及びSAM(A8)と、実験5の通常培養皿及びSAM(A5)の4日間培養後のDNA定量結果を示す図である。

[図14](A)は実験11-1における7日間培養後のMTT試験結果を示す図、(B)は実験11-2における8日間培養後のMTT試験結果を示す図、(C)は実験12における8日間培養後のMTT試験結果を示す図、(D)は実験13における7日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図15]実験11-1における7日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM(A6)、(C)はSAM(A11)、(D)はSAM(A15)、(E)はSAM(A25)の写真である。

[図16]実験11-2における8日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM(A4)、(C)はSAM(A11)、(D)はSAM(A18)、(E)はSAM(A25)の写真である。

[図17]実験12における8日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM(A14)、(C)はSAM(A17)、(D)

はSAM (A 2 5) の写真である。

[図18]実験13における7日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM (A 6)、(C)はSAM (A 9)、(D)はSAM (A 1 1)、(E)はSAM (A 1 9)、(F)はSAM (A 2 8) の写真である。

[図19] (A) は実験21における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、
(B) は実験22における14日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図20]実験21における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はSAM (A 1)、(B)はSAM (A 8)、(C)はSAM (A 1 6)、(D)はSAM (A 1 8) の写真である。

[図21]実験22で14日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM (A 8)、(C)はSAM (A 1 0)、(D)はSAM (A 2 2) の写真である。

[図22]実験23における4日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図23]実験23における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はSAM (A 1)、(B)はSAM (A 7)、(C)はSAM (A 1 6)、(D)はSAM (A 1 8) の写真である。

[図24] (A) は実験31における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、
(B) は実験32における4日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図25]実験31における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM (A 7)、(C)はSAM (A 2 2)、(D)はSAM (A 2 6) の写真である。

[図26]実験33における4日間培養後のMTT試験結果を示す図である。

[図27]実験33における4日間培養後の細胞の写真であり、(A)はControl、(B)はSAM (A 6)、(C)はSAM (A 1 4)、(D)はSAM (A 2 5) の写真である。

[図28] (A) は実験41における4日間培養後のMTT試験結果を示す図、

(B) は実験 4 2 における 4 日間培養後の M T T 試験結果を示す図である。

[図29] (A) は実験 4 1 における 4 日間培養後の D N A 定量結果を示す図、

(B) は実験 4 2 における 4 日間培養後の D N A 定量結果を示す図である。

[図30] 実験 4 1 における 4 日間培養後の細胞の写真であり、(A) は C o n t r o l、(B) は S A M (A 6)、(C) は S A M (A 1 1)、(D) は S A M (A 1 4)、(E) は S A M (A 2 5)、(F) は S A M (A 2 8) の写真である。

[図31] 実験 4 2 における 4 日間培養後の細胞の写真であり、(A) は C o n t r o l、(B) は S A M (A 7)、(C) は S A M (A 1 1)、(D) は S A M (A 1 6)、(E) は S A M (A 2 4)、(F) は S A M (A 2 8) の写真である。

[図32] 実験 5 1 における 1 4 日間培養後の M T T 試験結果を示す図である。

[図33] 実験 5 1 における 1 4 日間培養した細胞の写真であり、(A) は C o n t r o l、(B) は S A M (A 7)、(C) は S A M (A 8) の写真である。

[図34] 実験 5 2 における 1 4 日間培養後の M T T 試験結果を示す図である。

[図35] 実験 6 1 において、S A M (A 1) にて培養した細胞の写真であり、(A) は 1 0 倍拡大写真、(B) は 4 0 倍拡大写真である。

[図36] 実験 6 2 において、S A M (A 6) にて培養した細胞の写真であり、(A) は 1 0 倍拡大写真、(B) は 4 0 倍拡大写真である。

[図37] 実験 6 3 において、S A M (A 8) にて培養した細胞の写真であり、(A) は 1 0 倍拡大写真、(B) は 4 0 倍拡大写真である。

[図38] 実験 6 4 において、S A M (A 1 1) にて培養した細胞の写真であり、(A) は 1 0 倍拡大写真、(B) は 4 0 倍拡大写真である。

[図39] トルイジンブルー染色した通常培養皿で培養した細胞の写真である。

[図40] トルイジンブルー染色した S A M (A 8) で培養した細胞の写真である。

[図41] G A G 産生量の測定結果を示すグラフである。

[図42]通常培養皿で培養しオイルレッドO染色した細胞の写真である。

[図43]SAM (A8) で培養しオイルレッドO染色した細胞の写真である。

[図44]GPDH量の測定結果を示すグラフである。

[図45]ALP活性の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0034] 以下、本実施の形態に係る動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法、動物細胞の選択培養方法及び細胞分化方法について説明する。本実施の形態に係る動物細胞培養キットは、培養器及び無血清培地から構成される。

[0035] 培養器は表面に親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で有する。より具体的には、培養器は表面に自己組織単分子膜 (Self-assembled monolayers) (以下、SAMと記す) を有する。SAMは、親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基が所定の割合で表面に露出した形態である。この場合、一つのSAMが、異なる2種以上の親水性官能基又は疎水性官能基を有していてもよく、その両方を有していてもよい。親水性官能基として、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、ニトロ基等を例示され、疎水性官能基としてはメチル基、エチル基、プロピル基等のアルキル基、フェニル基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基、フルオロ基などが例示される。親水性官能基は正電荷官能基又は負電荷官能基であってもよく、例えば、アミノ基はプロトンにより NH_3^+ に、カルボキシル基は脱プロトンにより COO^- となっていてよい。

[0036] SAMは以下のようにして作製され得る。エタノール等の溶媒にアルカンチオールを溶解し、アルカンチオール溶液を調製する。アルカンチオールは、図1(A)の模式図に示すように、直鎖状のアルキル鎖の一方の末端にチオール基 ($-\text{SH}$) を有し、他方の末端にメチル基 ($-\text{CH}_3$)、水酸基 ($-\text{OH}$)、アミノ基 ($-\text{NH}_2$) 又はカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) を有している。アルキル鎖の炭素数について特に制限はないが、5~20である。

[0037] 調製したアルカンチオール溶液に金蒸着基板等を浸漬する等により、金蒸

着基板にアルカンチオールを結合させる。図1（B）に模式的に示すように、金蒸着基板の上にSAMが形成される。アルカンチオールのチオール基は金と特異的に結合し、さらにアルキル鎖間のファンデルワールス力によって分子同士が高密度・高配向な構造となるため、表面に官能基が露出した単分子膜が金蒸着基板の上に形成する。この金蒸着基板を、ポリスチレン製培養皿等に設置することで培養器が得られる。または、金修飾した培養皿等を用い、直接アルカンチオールを結合させてもよい。

[0038] 上記の各種アルカンチオールを1種又は複数種組み合わせてアルカンチオール溶液を調製し用いることで、様々な官能基を表面に有するSAMが得られる。SAMの表面組成は、用いるアルカンチオール溶液の組成とほぼ同様の組成になる。したがって、増殖させる動物細胞に応じ、上記4種の官能基を有するアルカンチオールを所定の割合で溶媒に溶解させたアルカンチオールを調製しSAMを形成することにより、その動物細胞の増殖に適した培養器が得られる。

[0039] 無血清培地は、血清を含有していない培地であり、未知の要因が少ない。このため、血清含有培地に比べ、一定の性能が得られる、培地からの精製及び後続のプロセスが容易、細胞機能の正確な評価が容易、生理的反応性の制御が容易等の利点を有する。

[0040] 一方で、無血清培地は血清を含有していないため、血清中の接着因子（基質接着性細胞）がほぼない。細胞増殖の過程では、まず、接着因子が培養皿等に接着し、接着因子を介して細胞が接着し増殖するものと考えられる。したがって、無血清培地には、この接着因子がほとんど存在していないため、細胞の接着、増殖が生じにくい。

[0041] しかしながら、本実施の形態に係る動物細胞培養キットでは、種々の官能基が所定の割合で露出した形態のSAMを有する培養器を備えており、培養器の表面組成を所定の動物細胞の接着、伸展、増殖に適した表面組成とすることが可能である。したがって、無血清培地においても、所定の動物細胞の接着・伸展・増殖を促進することができる。更には、複数系統の細胞に分化

できる能力を有する間葉系幹細胞等の幹細胞では、細胞分化も促進され得る。

[0042] 無血清培地として、一般的に使用されている基本培地、例えば、塩類、アミノ酸、糖、ビタミン及びその他の微量必須栄養素を混合した等浸透圧性 pH 平衡溶液等を組み合わせることができ、基本培地に各種添加剤が含有された培地でもよい。例えば、好適な無血清培地として、S T K 1（商品名）、S T K 2（商品名）、S T K 3（商品名）（いずれも D S ファーマバイオメディカル社製）等が挙げられる。

[0043] また、本動物細胞培養キットでは、以上の事から、不均質な細胞集団（例えば、骨髓液中の細胞集団）から、目的とする特定の動物細胞の接着・増殖に適した S A M と無血清培地とを組み合わせることで、特定の動物細胞を選択的に接着・増殖させることが可能である。

[0044] また、上記では金蒸着基板に S A M を形成し、これを培養皿に設置した培養器について説明したが、金蒸着基板のほか、金泊や金コロイドを用いて S A M を形成させた基板であってもよく、金のほか、アルミニウム、チタン、白金、銀等の金属等の基板であってもよい。更には、酸化アルミニウム、酸化ケイ素、酸化チタン等の無機金属酸化物やガラス等のセラミックの基板を用い表面に S A M が形成されていてもよい。

[0045] また、培養皿に応じた形状に加工された上記基板を用い、その表面に S A M を形成させて得られた S A M 形成基板を培養皿に積層して培養器を得ることができる。

[0046] また、金蒸着基板等の基板を備えず、培養皿そのものが上記の素材から形成された形態や、培養皿表面が上記の素材で修飾された形態であり、培養皿表面に直接 S A M が形成された培養器でもよい。

[0047] また、上記では、培養器として培養皿を例にとって説明したが、動物細胞の培養が可能なものであれば培養皿に限られることはない。また、アルカンチオールを用いて S A M を形成することなく、上述した官能基が表面に直接的に付加された形態であってもよい。例えば、移植用生体材料などの表面に

上記の官能基が付加された形態であってもよい。更には、ガラスなどへのシランカップリング法やチタン表面の加工、或いは、各種生体材料ポリマーなどへ直接的に官能基が付加された形態であってもよい。

[0048] 以下、実施例に基づいて種々の動物細胞の増殖に適するSAM組成について説明する。

実施例

[0049] 種々の表面組成のSAMを作製し、種々の動物細胞及び培地を組み合わせ、動物細胞の接着・増殖に作用するSAMの表面組成の影響について検証した。

(SAMの作製)

まず、以下のようにして金蒸着基板上にSAMを作製した。

[0050] 1-dodecanethiol (以下、 $\text{CH}_3\text{-SH}$ と記す) は和光純薬株式会社製を用いた。11-mercapto-1-undecanol (以下、 OH-SH と記す), 11-mercapto-1-undecanoic acid (以下、 COOH-SH と記す), 11-amino-1-undecanethiol (以下、 $\text{NH}_2\text{-SH}$ と記す) はシグマアルドリッチ株式会社製を用いた。

[0051] 金蒸着基板をPiranha Solution (濃硫酸：30%過酸化水素水＝7：3) を用いて表面を洗浄した。窒素ガスで脱酸素化したエタノールに、アルカンチオール ($\text{CH}_3\text{-SH}$ 、 OH-SH 、 COOH-SH 、 $\text{NH}_2\text{-SH}$) を表1に示すように様々な組み合わせ・割合で、合計1mmol/Lになるように溶解し、アルカンチオール溶液を調製した。

[表1]

	NH ₂	OH	COOH	CH ₃
SAM(A1)	100			
SAM(A2)	80	20		
SAM(A3)	60	40		
SAM(A4)	40	60		
SAM(A5)	20	80		
SAM(A6)		100		
SAM(A7)		80	20	
SAM(A8)		60	40	
SAM(A9)		40	60	
SAM(A10)		20	80	
SAM(A11)			100	
SAM(A12)			80	20
SAM(A13)			60	40
SAM(A14)			40	60
SAM(A15)			20	80
SAM(A16)				100
SAM(A17)	20			80
SAM(A18)	40			60
SAM(A19)	60			40
SAM(A20)	80			20
SAM(A21)	80		20	
SAM(A22)	60		40	
SAM(A23)	40		60	
SAM(A24)	20		80	
SAM(A25)		80		20
SAM(A26)		60		40
SAM(A27)		40		60
SAM(A28)		20		80

[0052] 調製したアルカンチオール溶液に、金蒸着基板を24時間浸漬して、種々のSAM（以下、それぞれSAM（A1）～SAM（A28）と記す）を金蒸着基板上に作製した。作製したSAMは、実験に用いるまで2-プロパノール中に保存しておいた。

[0053] （SAMの表面組成解析）

作製したSAM（A1）～（A20）の表面元素組成をX-ray photoelectron spectroscopy（XPS AXIS-HS, Kratos, Manchester, UK）を用いて求めた。測定は 10^{-7} Pa以下の圧力下で行った。Al-K α 単色X線は、加速

電圧が15 kV、フィラメント電流が10 mAの条件で試料表面に照射し、光電子脱離角度が90度の条件における炭素と酸素の元素組成比を測定した。

[0054] 図2 (A) にアルカンチオール溶液中の NH_2-SH と $\text{OH}-\text{SH}$ との配合割合に対する作製したSAM表面の官能基の割合、図2 (B) にアルカンチオール溶液中の $\text{OH}-\text{SH}$ と $\text{COOH}-\text{SH}$ との配合割合に対する作製したSAM表面の官能基の割合、図2 (C) にアルカンチオール溶液中の $\text{COOH}-\text{SH}$ と CH_3-SH との配合割合に対する作製したSAM表面の官能基の割合、図2 (D) にアルカンチオール溶液中の CH_3-SH と NH_2-SH との配合割合に対する作製したSAM表面の官能基の割合をそれぞれ示す。

[0055] 図2 (A) を見ると、アルカンチオール溶液中の水酸基に対するアミノ基の割合が高くなるにつれ、水酸基に対するアミノ基の割合が高い表面最外層を有するSAMが得られている。図2 (B)、図2 (C)、図2 (D) を見ると、他の官能基を末端に有するアルカンチオール溶液を混合した場合においても同じ傾向である。このように、配合するアルカンチオールの混合比に応じて、SAM表面の官能基の組成を調節することが可能であることがわかる。

[0056] 以上のようにして作製したSAMを用い、以下の実験にて動物細胞の培養を行った。

[0057] また、一部の実験では、表2に示す混合比のアルカンチオール溶液を調製し、上記同様に各種SAMを作製して（以下、SAM (B1) ~ (B13) と記す）実験に用いた。

[0058]

[表2]

	OH	COOH
SAM(B1)	100	
SAM(B2)	90	10
SAM(B3)	80	20
SAM(B4)	70	30
SAM(B5)	65	35
SAM(B6)	60	40
SAM(B7)	55	45
SAM(B8)	50	50
SAM(B9)	40	60
SAM(B10)	30	70
SAM(B11)	20	80
SAM(B12)	10	90
SAM(B13)		100

[0059] (使用培養液)

無血清培養液としてSTK1 (商品名) 及びSTK2 (商品名) (いずれもDSファーマバイオメディカル社製) を用いた。なお、STK1 及びSTK2 には、ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、数種類の成長因子の蛋白質が含有されているが、未知物質は一切含有されていない無血清培養液である。

[0060] また、一部の実験では、参考例として、10%牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum) (以下、FBSと記す) (Hyclone, Logan UT, USA) 1%Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含有するDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (以下、血清培養液A、或いは、DMEM+10%FBSと記す) を使用した。

[0061] また、一部の実験では、組織培養用培養皿 (ポリスチレンのプラズマ処理あり) の24well microplate (24 Well Cell Culture Microplate 直径16mm、Corning Life Sciences社製) (以下、通常培養皿或いはControlと記す) を使用した。

[0062] (実験1～6)

SAM表面の官能基の組み合わせが、ヒト骨髓間葉系幹細胞 (h-BM MSC) の接着・増殖に及ぼす影響について検証した。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells) を適宜MSCと称する。

[0063] (使用細胞)

ヒト骨髓間葉系幹細胞 (2株: R-44, R-81) は五十嵐らの方法 (Igarashi A et al. Tissue Eng, 2007) で腸骨から分離した。血清培養液Aにて、3日毎に培養液交換しながら、37℃で5%CO₂条件下にて培養した。そして、実験には4～7代目の細胞を使用した。細胞がほぼコンフルエントになるまで増殖した後、トリプシンとEDTAと5分間インキュベートすることにより細胞を分散した。

そして10%FBS含有培養液にて酵素反応を停止して、細胞を無血清のDMEMで3回洗浄した。その後、無血清培養液 (STK1又はSTK2) あるいは血清培養液Aに細胞を分散させ、SAM上に播種した。

[0064] (SAM上での細胞培養)

保存しておいたSAM基板 (直径約15mm) をPBS (リン酸緩衝生理的食塩水) で3回洗浄後、24Well Suspension Culture Plate (浮遊培養用培養皿、プラズマ処置なし、直径約16mm、Greiner bio-one社) に設置した。

[0065] 予め培養しておいたヒト骨髓間葉系幹細胞を回収後、2000cells/cm²の密度で1培養系あたり0.5mLの細胞懸濁液を播種した。

[0066] 実験に用いたヒト骨髓間葉系幹細胞 (h-BM MSC)、培養液及びSAMの組み合わせを表3に示す。

[0067] [表3]

Exp.	Cells	Media	SAM
1	h-BM MSC(R44-P7)	STK2	SAM(A1)～(A28)
2	h-BM MSC(R44-P5)	STK2	SAM(A1)～(A20)
3	h-BM MSC(R81-P4)	STK2	SAM(A1)～(A20)
4	h-BM MSC(R44-P5)	STK2	SAM(B1)～(B13)
5	h-BM MSC(R44-P7)	DMEM + 10% FBS	SAM(A1)～(A28)
6	h-BM MSC(R44-P5)	DMEM + 10% FBS	SAM(A1)～(A20)

[0068] (評価手法)

細胞を培養後、細胞の状態／形態を位相顕微鏡下で観察して、接着／進展細胞 (Adherent cells, A) と浮遊細胞あるいは弱く接着した球形の細胞 (Floating cells, F) に区分した。

[0069] 細胞増殖の評価は、WSTアッセイによるMTT試験 (色素: WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)、測定吸光度: 450nm) にて測定した。

[0070] 細胞数は、WST-8を用いたCell Counting Kit-8 (Wako)、あるいはコールターカウンター (コールター社) にて測定した。

[0071] 一部の実験では、DNAをPicoGreenDsDNA Quantitation kit (Molecular Probe社) にて測定した。

[0072] (結果)

実験1, 2, 3の4日間培養後のMTT試験結果をそれぞれ図3 (A)、(B)、(C) に、4日間培養後の写真をそれぞれ図4、図5、図6に示している。

[0073] ヒト骨髄間葉系幹細胞 (R44、R81株) は、ドナーの違い、植継ぎ回数 (4から7回) に関わらず、SAM (A5) ~ (A11) に高レベルで接着し、SAM (A12) ~ (A13) にも低レベルで接着したが、他の組成のSAM (A1) ~ (A4)、(A14) ~ (A28) にはほとんど接着しなかった。

[0074] そして、これらの細胞は、ドナー、継代数に関わらず、SAM (A6) ~ (A8) (OH=100からOH:COOH=60:40までの配合) でよく増殖し、SAM (A9)、SAM (A16) でも増殖したが、他のSAM組成では増殖しなかった。なお、細胞増殖はSAM (A7) (OH:COO

H = 80 : 20) あるいはSAM (A8) (OH : COOH = 60 : 40) で最大であった。

[0075] 次に、ヒト骨髓間葉系幹細胞が接着したSAM組成 (OH : COOH) の官能基の割合をより細かくして作製したSAM (B1) ~ (B13) を用いて行った実験4の細胞数測定結果を図7に示すとともに、培養した細胞の写真を図8に示す。なお本実験では、コールターカウンターにて細胞数を直接測定した。

[0076] SAM (B5) ~ SAM (B11) (OH : COOH = 65 : 35 ~ 30 : 70) で、Controlに比べて細胞が増殖していることがわかる。そして、SAM (B5) (OH : COOH = 65 : 35) でヒト骨髓間葉系幹細胞の増殖が最大となった。

[0077] (血清存在下でのSAMの影響)

図9 (A)、(B) は、血清培養液Aを用いて行った実験5, 6の4日間培養後のMTT試験結果であり、また、図10は実験5の4日間培養後の写真であるが、ヒト骨髓間葉系幹細胞 (R44株) はすべてのSAM組成 (A1) ~ (A28) に接着した。血清中の接着因子の存在により、細胞がSAM組成の影響を受けにくく、全てのSAMに接着したものと考えられる。なお、SAM組成によって増殖の程度は異なっており、SAM (A1) から (A5), SAM (A10) ~ (A12), SAM (A17) ~ (A24) 上で顕著に増殖している。

[0078] 注目すべきことに、無血清培養液中での増殖を促進したSAM (A6) ~ (A9) は、血清培養液A中での増殖を抑制している。なんらかの血清蛋白質がSAM (A6) ~ (A8) に接着して、増殖を妨害したものと考えられる。

[0079] また無血清培養液中での接着および増殖を抑制した多くのSAM組成が、血清培養液A中での増殖を促進した。血清中の接着因子や増殖促進因子がこれらのSAM組成に結合したと考えられる。つまり、血清存在下と無血清では、細胞の接着／増殖に及ぼすSAM組成の影響が本質的に異なることが判

明した。

[0080] なお、一部の実験（実験 1、5）では、DNA 定量でも増殖を評価した。

図 11、図 12 に実験 1、実験 5 の 4 日間培養後の DNA 定量結果をそれぞれ示す。MTT 試験結果と DNA 定量結果は一致した。

[0081] また、実験 1 の通常培養皿及び SAM (A8) と、実験 5 の通常培養皿及び SAM (A5) の 4 日間培養後の MTT 試験結果を図 13 (A) に、DNA 定量結果を図 13 (B) にそれぞれ示しているが、無血清培養液中では、SAM (A8) 上で、通常培養皿に比較して細胞数と DNA が培養 4 日目で 2～3 倍に増加していることがわかる。

[0082] 以上の実験結果から、表面の水酸基：カルボキシル基の割合が 100：0～0：100、好ましくは、80：20～20：80、より好ましくは 70：30～60：40 の SAM と、無血清培養液 (STK2) とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、ヒト骨髓間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させられることがわかる。

[0083] (実験 11～13)

ラット初代間葉系幹細胞 (rat-primary MSC) の接着・増殖に及ぼす SAM 表面の官能基配合の影響について検証した。

[0084] 骨髓液には造血系細胞、血管系細胞、間質細胞、間葉系幹細胞などが存在する。すなわち不均質な細胞集団である。骨髓間葉系幹細胞は、骨髓中の培養皿に接着・進展する線維芽細胞様細胞として分離される。しかし通常培養皿では、均質な骨髓間葉系幹細胞を得ることが困難である。そこで、本実験では、ラット骨髓液を直接各種の SAM 培養皿に播種して、間葉系幹細胞（線維芽細胞様細胞）の接着と増殖に及ぼす SAM 組成の影響を検討した。

[0085] 5 匹の生後 5 週目の雄性 Wistar ラットの左右の大腿骨と脛骨から分離した骨髓液を無血清の α MEM にて希釈して計 25 ml（骨髓希釈液）とした。

[0086] そして各種 SAM 基板を装着した培養皿に、骨髓希釈液を 0.06 mL / 16 mm well で播種し、さらに STK1、血清培養液 A、又は、10

%牛胎児血清（FBS）を含有する α MEM（以下、 α MEM+10%FBSと記す）を追加して培養液の総量を0.5ml/wellとした。

[0087] 培養液は3日後より3日毎に交換して7～8日間培養した。

[0088] なお、2代目以降のラット骨髓間葉系幹細胞を得るためには、3mlの骨髓稀釈液を100mm組織培養用培養皿（Corning社）に播種して、8日間培養して、その後サブコンフルエントになった培養系からトリプシンとEDTAにて分散した細胞を、2000/cm²の細胞密度で、各種のSAM基板に播種した。

[0089] 細胞の形態観察と細胞数の評価方法は実験1～6と同様である。また、用いた細胞、培養液、SAMの組み合わせを表4に示す。

[0090] [表4]

Exp.	Cells	Media	SAM
11	rat-primary MSC	STK1	SAM(A1)～(A28)
12	rat-primary MSC	DMEM + 10% FBS	SAM(A1)～(A28)
13	rat-primary MSC	α MEM + 10% FBS	SAM(A1)～(A28)

[0091] (結果)

実験11では7日間培養、及び、8日間培養を行いそれぞれについて評価を行った。以下では、実験11の7日間培養について実験11-1、8日間培養について実験11-2と記す。実験11-1の7日間培養後のMTT試験結果を図14（A）に、実験11-2の8日間培養後のMTT試験結果を図14（B）に、実験12の8日間培養後のMTT試験結果を図14（C）に、実験13の7日間培養後のMTT試験結果を図14（D）に示す。また、実験11-1の7日間培養後の写真を図15に、実験11-2の8日間培養後の写真を図16に、実験12の8日間培養後の写真を図17に、実験13の7日間培養後のMTT試験結果を図18に示す。

[0092] 無血清培養液STK1存在下で、ラット骨髓の線維芽細胞様細胞（間葉系幹細胞を含む）は、異なるグループとして、SAM（A4）、（A6）、（A11）、（A12）、（A17）～（A20）、（A23）～（A25）上で増殖した。しかも培養7～8日目では、通常培養皿に比較して7～11

倍もの細胞数が得られた。SAM接着性の違いを利用して、骨髓の線維芽細胞様細胞（間葉系幹細胞）の分画が可能である。

[0093] なお、血清培養液A或いは α MEM+10%FBS存在下でも、いくつかのSAMで、通常培養皿以上の増殖の亢進が観察された。血清存在下と無血清条件下では、ラット骨髓線維芽細胞様細胞（間葉系幹細胞）の増殖のパターンは異なっていることがわかる。

[0094] 以上の実験結果から、表面のアミノ基：水酸基が40：60、カルボキシル基：メチル基が100：0～80：20、アミノ基：メチル基が20：80～80：20、アミノ基：カルボキシル基が40：60～20：80、或いは、水酸基：メチル基が100：0～80：20のSAMと、無血清培養液（STK1）とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、初代のラット骨髓間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させられることがわかる。

[0095] （実験21～23）

各種組織由来の間葉系幹細胞の接着と増殖に及ぼすSAM表面の官能基配合の影響について検証した。

[0096] ヒト滑膜由来間葉系幹細胞（ヒトの変形性関節症由来の間葉系幹細胞、滑膜線維芽細胞とも呼ばれる（2株）（h-synovial MSC（S6-P2）、h-synovial MSC））は、Cell Applications Inc. から入手した。

[0097] ヒト歯髄間葉系幹細胞（1株）（h-Dental pulp MSC）は、抜歯した智歯の歯髄組織細片より遊走、成長する細胞集団として分離した（Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in Explant Cultures. M. -L. Couble et al., Calcif Tissue Int. 2000）。

[0098] これらの細胞は血清培養液Aにて、3日毎に培養液交換しながら、37℃で5%CO₂条件下にて培養した。植継ぎのためには、サブコンフルエントになった培養系をトリプシンとEDTAと5分間インキュベートした。そして

10% FBS 含有培養液にて酵素反応を停止して、その後遠心して細胞を無血清の DMEM で 3 回洗浄した。そして STK2 あるいは STK1 で懸濁した細胞を SAM 培養皿に実験 21、23 では 2000 / cm²、実験 22 では 500 / cm² の細胞密度で播種して、4 - 14 日間培養した。

[0099] 細胞の形態観察と細胞数の評価方法は実験 1 ~ 6 と同様である。また、用いた細胞、培養液、SAM の組み合わせを表 5 に示す。

[0100] [表5]

Exp.	Cells	Media	SAM
21	h-synovial MSC (S6-P2)	STK2	SAM(A1)~(A20)
22	h-synovial MSC	STK1	SAM(A1)~(A28)
23	h-dental pulp MSC (P5)	STK2	SAM(A1)~(A20)

[0101] (結果)

実験 21 の MTT 試験結果を図 19 (A) に、実験 22 の MTT 試験結果を図 19 (B) にそれぞれ示すとともに、実験 21 の 4 日間培養後の写真を図 20 に、実験 22 の 14 日間培養後の写真を図 21 にそれぞれ示す。

[0102] ヒト滑膜由来間葉系幹細胞 (2 代目) は、ドナーの違い、無血清培養液 (STK2 あるいは STK1) の種類の違いに関わらず、SAM (A6) ~ (A9) によく接着し、SAM (A10), (A11) にも接着したが、他の組成の SAM には接着しなかった。

[0103] そして、これらの細胞は、SAM (A6) ~ (A8)、(OH=100 から OH:COOH=60:40 の配合比) でよく増殖し、SAM (A9) でも増殖したが、他の組成では増殖しなかった。

[0104] なお最大の細胞増殖は SAM (A7) (OH:COOH=80:20) あるいは SAM (A8) (OH:COOH=60:40) で観察された。そして、図 19 (B) に示すように、通常培養皿よりも 7 倍の細胞数が得られた。この結果は、ヒト骨髓間葉系幹細胞の増殖を促進する SAM 組成とほぼ一致した。

[0105] したがって、表面の水酸基:カルボキシル基の割合が 100:0~40:60、好ましくは、80:20~60:40 の SAM と、無血清培養液 (S

TK2あるいはSTK1)とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させられることがわかる。

[0106] また、実験23の4日間培養後のMTT試験結果を図22に、写真を図23に示す。ヒト歯髄由来間葉系幹細胞(5代目)の増殖を促進するSAM組成も、ヒト骨髓およびヒト滑膜由来間葉系幹細胞とほとんど共通していた。したがって、表面の水酸基：カルボキシル基の割合が100：0～60：40のSAMと、無血清培養液(STK2)とを組み合わせることで、無血清培地中でも、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させられることがわかる。

[0107] (実験31～33)

ヒト線維芽細胞(Fibroblast)およびラット骨芽細胞(rat-Osteoblast)の接着と増殖に及ぼす培養皿表面の官能基配合の影響について検証した。

[0108] ヒト皮膚線維芽細胞はクラボー社(大阪)から購入して、上記のように血清培養液Aにて維持した。

[0109] ラット頭蓋骨由来骨芽細胞は、吉子らの方法(A subset of osteoblasts expressing high endogenous levels of PPARgamma switches fate to adipocytes in the rat calvaria cell culture model. Yoshiko Y, Oizumi K, Hasegawa T, Minamizaki T, Tanne K, Maeda N, Aubin JE. PLoS One. 2010 5(7):e11782.)で分離した。

[0110] すなわち胎生21日の雄性Wistarラット頭蓋冠を経時的にコラゲナーゼで消化し、細胞を5分画し、最初の分画(線維芽細胞分画)を除く4分画を別々に10%FBS含有alpha MEMにて培養した。翌日、これらの分画をプールし、アスコルビン酸(50μg/ml)を添加した同培養液で培養した。これらの細胞はほぼコンフルエントまで増殖した後で、上記

のようにトリプシンとEDTAにて植継いだ。

[0111] 細胞の形態観察と細胞数の評価方法は実験1～6と同様である。また、用いた細胞、培養液、SAMの組み合わせを表6に示す。なお、これらの細胞は培養皿に2000/cm²の細胞密度で播種して培養した。

[0112] [表6]

Exp.	Cells	Media	SAM
31	h-fibroblast (1429-P8)	STK2	SAM(A1)～(A28)
32	h-fibroblast (1429-P8)	DMEM + 10% FBS	SAM(A1)～(A28)
33	rat-osteoblasts (PI)	STK2	SAM(A1)～(A28)

[0113] (結果)

実験31のMTT試験結果を図24(A)に、実験32のMTT試験結果を図24(B)にそれぞれ示すとともに、実験31の4日間培養後の写真を図25に示す。

[0114] 図24(A)を見ると、無血清培養液(STK2)存在下で、ヒト線維芽細胞は、SAM(A6)～(A9)とSAM(A25)～SAM(A28)によく接着した。そして、SAM(A6)～SAM(A7)、(OH=100からOH:COOH=80:20)およびSAM(A25)～SAM(A26)(OH:CH₃=80:20からOH:CH₃=60:40)で最もよく増殖した。

[0115] これらのSAM組成上では、4日以内に、通常培養皿より2倍以上の細胞数が得られた。なお、SAM(A8)とSAM(A27)～(A28)でも中レベルに増殖したが、他の組成では増殖しなかった。無血清培養液で、ヒト線維芽細胞が増殖するSAM組成は、ヒト間葉系幹細胞が増殖するSAM組成は部分的に重複していたが、パターンは異なっていた。

[0116] 以上のことから、表面の水酸基：カルボキシル基の割合が100:0～40:60、或いは、水酸基：メチル基の割合が80:20～20:80、好ましくは、水酸基：カルボキシル基の割合が100:0～80:20、或いは、水酸基：メチル基の割合が80:20～60:40のSAMと、無血清培養液(STK2)とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、ヒト線

維芽細胞の接着・増殖を促進させ得ることがわかる。

- [0117] なお、血清培養液Aにて培養すると、ヒト線維芽細胞は、SAM (A 6) , (A 1 4) ~ (A 1 6) 、 (A 2 5) 、 (A 2 6) 以外の配合では接着増殖した。とくにSAM (A 1) ~ (A 5) , (A 8) , (A 1 7) , (A 2 0) ~ (A 2 4) ではよく接着して通常培養皿以上に増殖した。また血清培養液Aを使用すると、各種SAM上でのヒト線維芽細胞の増殖パターンはヒト骨髓間葉系幹細胞とラット骨髓間葉系幹細胞と類似していた。つまり血清存在下では、細胞の種類や動物種を区別することができなかった。
- [0118] また、ラット骨芽細胞を用いた実験33の4日間培養後のMTT試験結果を図26に、写真を図27に示す。ラット骨芽細胞は、無血清培養液 (S T K 2) 存在下で、SAM (A 6) ~ (A 1 2) とSAM (A 2 5) ~ (A 2 8) に接着よくした。そして、すべてのSAM組成で通常培養皿以上の細胞増殖が観察された。特にSAM (A 6) ~ (A 7) 、SAM (A 1 0) ~ (A 1 1) およびSAM (A 2 5) ~ (A 2 8) ($\text{OH} : \text{CH}_3 = 80 : 20$ から $\text{OH} : \text{CH}_3 = 20 : 80$) で最もよく増殖した。無血清培養液で、骨芽細胞が増殖するSAM組成は、間葉系幹細胞あるいは線維芽細胞のパターンとは異なっていた。
- [0119] 以上の結果から、表面の水酸基：カルボキシル基の割合が100：0～0：100、カルボキシル基：メチル基の割合が80：20、或いは、水酸基：メチル基の割合が80：20～20：80のSAMと、無血清培養液 (S T K 2) とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、ラット骨芽細胞の接着・増殖を促進させ得ることがわかる。
- [0120] (実験41～42)
- ラット骨髓間葉系幹細胞 (r a t - B M M S C) の接着と増殖に及ぼす培養皿表面の官能基配合の影響について検証した。
- [0121] ラット骨髓間葉系幹細胞は、実験11～13と同様の手法で分離、培養して用いた。
- [0122] 細胞の形態観察と細胞数の評価方法は実験1～6と同様である。また、用

いた細胞、培養液、SAMの組み合わせを表7に示す。

[0123] [表7]

Exp.	Cells	Media	SAM
41	rat-BM MSC	STK2	SAM(A1)~(A28)
42	rat-BM MSC	DMEM + 10% FBS	SAM(A1)~(A28)

[0124] (結果)

実験41及び実験42の4日間培養後のMTT試験結果を図28(A)、(B)に、実験41及び実験42の4日間培養後のDNA定量結果を図29(A)、(B)に、実験41及び実験42の4日間培養後の写真を図30、図31にそれぞれ示す。

[0125] MTT試験結果とDNA定量結果とはほぼ同じ傾向であることがわかり、無血清培養液(STK2)存在下では、SAM(A6)~(A11)でラット骨髓間葉系幹細胞の顕著な増殖が見られる。表面の水酸基：カルボキシル基の割合が100：0~0：100、カルボキシル基：メチル基の割合が100：0~80：20のSAMと、無血清培養液(STK2)とを組み合わせることで、無血清培地中でも、ラット骨髓間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させ得ることがわかる。なお、図28中の2h-4daysは播種2時間後および4日後での細胞接着の状態を接着が多いもの(A)、非接着細胞が多いもの(F)を示している。つまりSAMによっては初期接着を促進したものの長期的な接着あるいは増殖を維持しなかったもの、初期接着のみならず増殖を促進したものなどが存在した。SAMは接着のみならず増殖にも影響することが示された。

[0126] (実験51、52)

ヒト初代間葉系幹細胞(h-primary MSC)の接着と増殖に及ぼす培養皿表面の官能基配合の影響について検証した。

[0127] ヒト初代骨髓間葉系幹細胞は、広島大学倫理委員会の許可のもとで、腸骨の骨髓液から得た(Kubo H, Shimizu M, Taya Y et al., Gene to Cells 2009, 14:407-424)。

[0128] ヒト骨髓の単核球画分（R 8 2 株）を S T K 1 培地で希釈して、各 1 6 m m 培養皿に有核細胞 7 万個／c m²の細胞密度になるように 0. 5 m L の細胞浮遊液を播種して、播種 3 日後に 0. 2 5 m L の S T K 1 を追加した。そして 3 日毎に 0. 5 m L の S T K 1 にて培地交換した。そして播種から 1 4 日目に細胞の写真撮影をしてから、培養液に W S T - 8 試薬を追加し、M T T a s s a y を行った。また、ヒト骨髓液（R 8 3 株）をそのまま用いた以外は上記と同様にして播種し、M T T a s s a y を行った。

[0129] 細胞の形態観察と細胞数の評価方法は実験 1 ～ 6 と同様である。また、用いた細胞、培養液、S A M の組み合わせを表 8 に示す。

[0130] [表8]

Exp.	Cells	Media	SAM
51	h-primary MSC (R82)	STK1	SAM(A1)～(A28)
52	h-primary MSC (R83)	STK1	SAM(A6),(A7),(A8),(A9)

[0131] (結果)

実験 5 1 の M T T 試験結果を図 3 2 に、培養後の写真を図 3 3 にそれぞれ示す。無血清培養液（S T K 1）存在下では、S A M（A 6）～（A 1 1）でヒト初代間葉系幹細胞の顕著な増殖が見られる。表面の水酸基：カルボキシル基の割合が 1 0 0：0 ～ 4 0：6 0 の S A M と、無血清培養液（S T K 1）とを組み合わせることで、無血清培養液中でも、ヒト初代間葉系幹細胞の接着・増殖を促進させ得ることがわかる。

[0132] また、実験 5 2 の M T T 試験結果を図 3 4 に示す。骨髓液を培養した場合、コントロールではほとんど増殖が見られなかったが、S A M（A 6）～（A 9）では、顕著に増殖した。

[0133] また、実験 1 ～ 4 におけるヒト骨髓間葉系幹細胞の結果、実験 2 1、2 2 におけるヒト滑膜由来間葉系幹細胞の結果、実験 2 3 におけるヒト歯髄間葉系幹細胞の結果を見ると、いずれも同様の傾向を示しており、S A M（A 6）～（A 8）で細胞の増殖が見られる。このことから、S A M 組成が水酸基：カルボキシル基が 1 0 0：0 ～ 6 0：4 0 の割合であれば、他の組織、例えば、脂肪由来、臍帯由来、胎盤由来、羊膜由来、骨膜由来など、ヒト間葉

系幹細胞の接着、増殖にも適用可能である。

[0134] (実験 6 1 ～ 6 7)

続いて、ヒト骨髓間葉系幹細胞 (h-BM MSC) の培養皿表面への接着、伸展性等について検証した。

[0135] 予め培養しておいたヒト骨髓間葉系幹細胞を STK2 に分散させ、16 mm 培養皿に 4000 cells/well の密度で播種し培養した。また、参考例として、共焦点ガラスシャーレと DMEM + 10% FBS 或いは STK2 との組み合わせで上記同様に培養した。用いた培養液と培養皿との組み合わせを表 9 に示す。

[0136] [表9]

Exp.	Cells	Media	培養皿
61	h-BM MSC	STK2	SAM(A1)
62	h-BM MSC	STK2	SAM(A6)
63	h-BM MSC	STK2	SAM(A8)
64	h-BM MSC	STK2	SAM(A11)
65	h-BM MSC	STK2	SAM(A16)
66	h-BM MSC	DMEM + 10% FBS	共焦点用ガラスシャーレ
67	h-BM MSC	STK2	共焦点用ガラスシャーレ

[0137] 培養を開始して 3 時間後及び 24 時間後に、それぞれについて、一次抗体及び二次抗体を添加して染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000D、株式会社オリンパス製) にて観察し、ヒト骨髓間葉系幹細胞の培養皿への接着や伸展等を評価した。用いた一次抗体は、Actin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit (Merck MILLIPORE 社製)、二次抗体は、GOAT ANTI-MOUSE IgG (H&L) FLUORESCCEIN CONJUGATED (タカラバイオ株式会社製) である。

[0138] 図 35 ～ 図 38 に、SAM (A1)、(A6)、(A8)、(A11) の写真を示す。また、それぞれの観察の結果、糸状突起、葉状突起、接着斑及びストレスファイバーの有無、並びに、細胞の大きさ及び形状の評価を表 10 に示す。評価は以下の指標にて行った。

d : 脱着或いは浮遊細胞

S : 小細胞

L : 大細胞

R : 丸まって伸展していない形状

F : 扁平し伸展した形状

－ : 存在していない

± : 存否の判断不能

＋ : 存在している

＋＋ : 多く存在している

[0139] [表10]

	Exp.61		Exp.62		Exp.63		Exp.64		Exp.65		Exp.66	Exp.67
hours	3	24	3	24	3	24	3	24	3	24	24	24
Filopodia (糸状突起)	－	－	±	＋	＋	＋	－	－	－	d	＋	d
Lamellipodia (葉状突起)	±	＋	＋	＋	＋	＋	－	±	－	d	±	d
Adhesion plaque (接着斑)	－	－	＋	＋	±	＋	－	±	－	d	±	d
Stress fiber	－	±	＋	＋	＋	＋	±	±	－	d	＋	d
Cell size	S	S	S	L	L	L	S	S	S	d	L	d
Cell shape	R	R	RF	F	F	F	R	RF	R	d	F	d

d: detached and floating cells S: small L: large R: round F: flat and elongated

[0140] 共焦点用ガラスシャーレに関し、血清を含有するFBS培地（実験66）では、接着因子を有するので、糸状突起等の存在が見られ、細胞が伸展し大きくなっているが、無血清培地であるSTK2（実験67）では、細胞がガラスシャーレに接着せず、糸状突起等の存在がなく細胞の伸展等も見られなかった。

[0141] 一方、実験62、63のSAM（A6）、（A8）では、接着因子を有さない無血清培地であるSTK2であっても、糸状突起等が多く存在し、細胞が伸展し大きくなっている。細胞とSAM（A6）、（A8）との相互作用が活発であり、細胞がSAM表面に良好に接着するとともに伸展も促進され、これにより細胞の増殖も促進され得ることがわかる。

[0142] (実験 7 1)

続いて、SAM (A 8) を用い、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (h-BM MSC) の軟骨細胞、脂肪細胞および骨細胞への分化について検証した

[0143] 予め培養しておいたヒト骨髄間葉系幹細胞を回収後、16mm培養皿に4000 cells/wellの密度で播種し培養した。なお、培養液としてSTK2を用いた。

[0144] ヒト骨髄間葉系幹細胞がコンフルエントに達するまで増殖した後、軟骨細胞、脂肪細胞、骨細胞へ分化させるべく培養液をそれぞれSTK2、脂肪分化誘導培地、STK3に交換して培養した。脂肪分化誘導培地として、1% Antibiotic-Antimycotic, 10% FBS, 2mM L-glutamine, 10^{-6} M Dex, 0.2mM indomethacin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd), 0.01mg/ml insulin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd), 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) を添加したDMEMを用いた。また、それぞれについて、参考例としてSAM (A 8) の代わりに通常培養皿 (Control) を用いて上記同様に細胞を培養した。なお、いずれの実験においても、3検体ずつ行った。

[0145] (軟骨細胞への分化の検証)

培地をSTK2に交換後、顕微鏡で経時的に観察し、培養皿への細胞の接着状態を観察した。また、トルイジンブルー染色 (Toluidine blue staining) を行い、軟骨細胞に分化しているか否かを検証した。

[0146] 図39に、通常培養皿で培養した細胞を染色した写真、図40に、SAM (A 8) で培養した細胞を染色した写真をそれぞれ示す。また、表11に接着状態及びトルイジンブルー染色で染色された細胞の量について示す。

[0147]

[表11]

	Control		SAM(A8)	
	接着状態	トルイジンブルー染色	接着状態	トルイジンブルー染色
Day 0	接着	ND	接着	ND
Day 5	接着	ND	接着	ND
Day 6	接着	±	接着	ND
Day 18	脱着	ND	接着	ND
Day 28	脱着	ND	接着	ND
Day 29	切片	+	接着	+++

ND : not determined

[0148] 通常培養皿では、培地交換して6日後に細胞が培養皿から脱離した。一方、SAM(A8)では、細胞が培養皿に接着した状態を保っていた。このため、トルイジンブルー染色は、SAM(A8)では培地交換して29日目、一方の通常培養皿では培地交換して6日後に細胞が培養皿から脱離したため、6日後に行ったものである。トルイジンブルー染色の結果、SAM(A8)では、多くの細胞が染色されており、軟骨細胞に分化していることがわかる。

[0149] 更に、軟骨が形成された際に産生されるグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan: GAG) の産生量を測定し、軟骨細胞への分化が促進されているかについて検証した。その結果を図41に示す。なお、SAM(A8)及び通常培養皿ともに、培地交換して28日目に、培養皿あたりのGAG産生量を測定した。

[0150] 通常培養皿では、GAGは約60ng/cultureであったが、SAM(A8)では、約160ng/cultureであり、通常培養皿に比べて3倍近くGAGが産生されていた。

[0151] これらの結果から、SAM(A8)でヒト骨髓間葉系幹細胞を培養すると、軟骨細胞への分化が促進されることがわかった。

[0152] (脂肪細胞への分化の検証)

脂肪分化誘導培地に交換した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、培養皿への細胞の接着状態を観察するとともに、オイルレッドO (Oil red O staining) 染色により、軟骨細胞に分化しているか否かを検証した。図42に、通

常培養皿にて培養した細胞を染色した写真、図43に、SAM(A8)にて培養した細胞を染色した写真をそれぞれ示す。また、表12に染色された細胞の量を目視で観察した結果を示す。

[0153] [表12]

	Control	SAM(A8)
Day 1	-	ND
Day 21	+	+++

ND : not determined

[0154] SAM(A8)にて培養した場合、通常培養皿にて培養した場合に比べ、多くの細胞が染色されていることがわかる。

[0155] また、脂肪細胞にて発現するGPDH (Glycerol 3-phosphate dehydrogenase) 量を測定した。その結果を図44に示す。通常培養皿に比べ、SAM(A8)ではGPDH量が多いことがわかる。これらの結果から、ヒト骨髓間葉系幹細胞が脂肪細胞に分化していることが分かった。

[0156] (骨細胞への分化の検証)

STK3に交換した後、骨細胞に発現するALP (Alkaline Phosphatase) 活性を測定した。なお、本実験では、通常培養皿とSTK3とを組み合わせた参考例のほか、他の参考例として、通常培養皿とDMEM+10%FBSとの組み合わせ (Negative Control) についても行った。

[0157] ALP活性測定の結果を図45に示す。通常培養皿に比べ、SAM(A8)ではALP活性が高いことがわかる。この結果から、ヒト骨髓間葉系幹細胞が骨細胞に分化していることが分かった。

[0158] なお、細胞分化は、幹細胞が培養器等に接着、増殖するとともに、適切な分化誘導培地を用いれば生じ得る。それゆえ、実験1～4にて、ヒト骨髓間葉系幹細胞の接着及び増殖が良好であったSAM(A6)～SAM(A10)、即ち、水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で表面に有する培養器についても、実験71同様、ヒト骨髓間葉系幹細胞を分化さ

せ得る。すなわち、軟骨分化誘導培地を用いてヒト骨髓間葉系幹細胞を培養すれば軟骨細胞へと分化させ得る。また、骨形成誘導培地を用いればヒト骨髓間葉系幹細胞を骨細胞へと分化させ得る。また、脂肪分化誘導培地を用いればヒト骨髓間葉系幹細胞を脂肪細胞へと分化させ得る。ここで、軟骨分化誘導培地及び骨形成誘導培地については、無血清の培地であっても細胞分化させ得る。無血清の軟骨分化誘導培地及び骨形成誘導培地はそれぞれ制限されるものではなく、一例として上述したS T K 2 及びS T K 3 がそれぞれ挙げられる。そして、本発明に係る培養器と分化誘導培地を用いて細胞分化させると、通常の培養皿を用いた場合に比べて、多くの細胞が分化しており、本発明に係る培養器を用いた培養方法は細胞の増殖だけでなく、細胞分化に対しても優れていることがわかる。

[0159] なお、本発明は、本発明の範囲を逸脱することなく、様々な実施形態及び変形が可能とされるものである。また、上述した実施形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

[0160] 本出願は、2011年4月5日に出願された日本国特許出願2011-084119号に基づく。本明細書中に、日本国特許出願2011-084119号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

[0161] 本発明に係る動物細胞培養キットでは、接着因子が含有されていない無血清培地でも、特定の動物細胞の接着・増殖を促進できるので、再生医療やバイオ医薬などの研究開発に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地と、を備える、
ことを特徴とする動物細胞培養キット。
- [請求項2] 前記培養器が前記官能基を所定の割合で表面に有する自己組織化単分子膜を備える、
ことを特徴とする請求項1に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項3] 前記親水性官能基が水酸基、アミノ基又はカルボキシル基であり、前記疎水性官能基がアルキル基である、
ことを特徴とする請求項1又は2に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項4] 水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有し、ヒト骨髓間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、
ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項5] アミノ基：水酸基を40：60、カルボキシル基：メチル基を100：0～80：20、アミノ基：メチル基を20：80～80：20、アミノ基：カルボキシル基を40：60～20：80、或いは、水酸基：メチル基を100：0～80：20の割合で有し、不均質な細胞集団において初代のラット間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、
ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項6] 水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、
ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項7] 水酸基：カルボキシル基を100：0～60：40の割合で有し、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、
ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。
- [請求項8] 水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60、或いは、水酸基：メチル基を80：20～20：80の割合で有し、ヒト線維芽細胞

胞の接着及び増殖を促進する、

ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。

[請求項9] 水酸基：カルボキシル基を100：0～0：100、或いは、水酸基：メチル基を80：20～20：80の割合で有し、ラット骨芽細胞の接着及び増殖を促進する、

ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。

[請求項10] 水酸基：カルボキシル基を100：0～0：100、或いは、カルボキシル基：メチル基を100：0～80：20の割合で有し、ラット骨髓間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、

ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。

[請求項11] 水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト初代間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、

ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。

[請求項12] 水酸基：カルボキシル基を100：0～40：60の割合で有し、ヒト間葉系幹細胞の接着及び増殖を促進する、

ことを特徴とする請求項3に記載の動物細胞培養キット。

[請求項13] 親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地とを用い、

所定の動物細胞の接着及び増殖を促進させる、

ことを特徴とする動物細胞の培養方法。

[請求項14] 親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清培地とを用い、

不均質な細胞集団から選択的に所定の動物細胞の接着及び増殖を促進させる、

ことを特徴とする動物細胞の選択培養方法。

[請求項15] 血清含有培地と、アミノ基：水酸基を100：0～20：80、水酸基：カルボキシル基を80：20～20：80、カルボキシル基：メチル基を100：0～60：40、アミノ基：メチル基を80：2

0～20：80、或いは、アミノ基：カルボキシル基を80：20～20：80の割合で表面に有する培養器とを用いて、ヒト間葉系幹細胞、ヒト線維芽細胞又はラット間葉系幹細胞の増殖を促進させる、
ことを特徴とする動物細胞の培養方法。

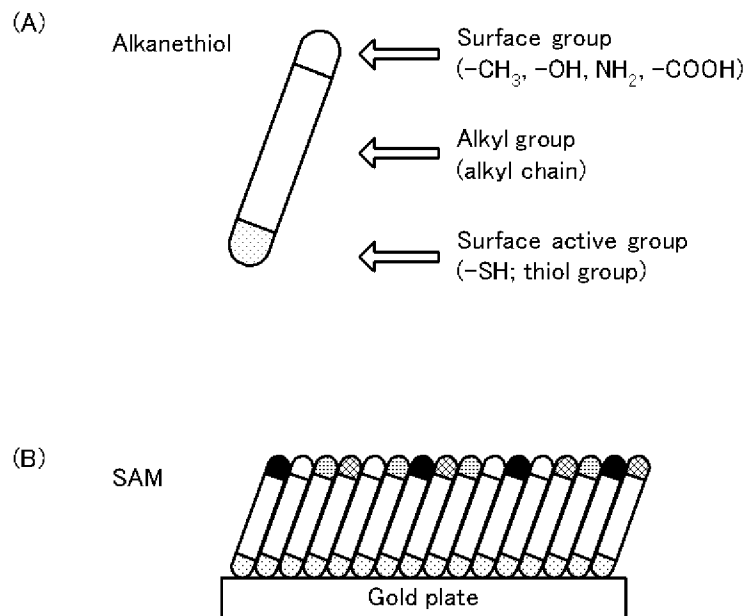
[請求項16] 親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と、無血清の分化誘導培地とを用い、ヒト骨髓間葉系幹細胞を培養して前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を軟骨細胞又は骨細胞に分化させる、
ことを特徴とする細胞分化方法。

[請求項17] 水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有する前記培養器と、無血清の軟骨分化誘導培地とを用い、前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させる、
ことを特徴とする請求項16に記載の細胞分化方法。

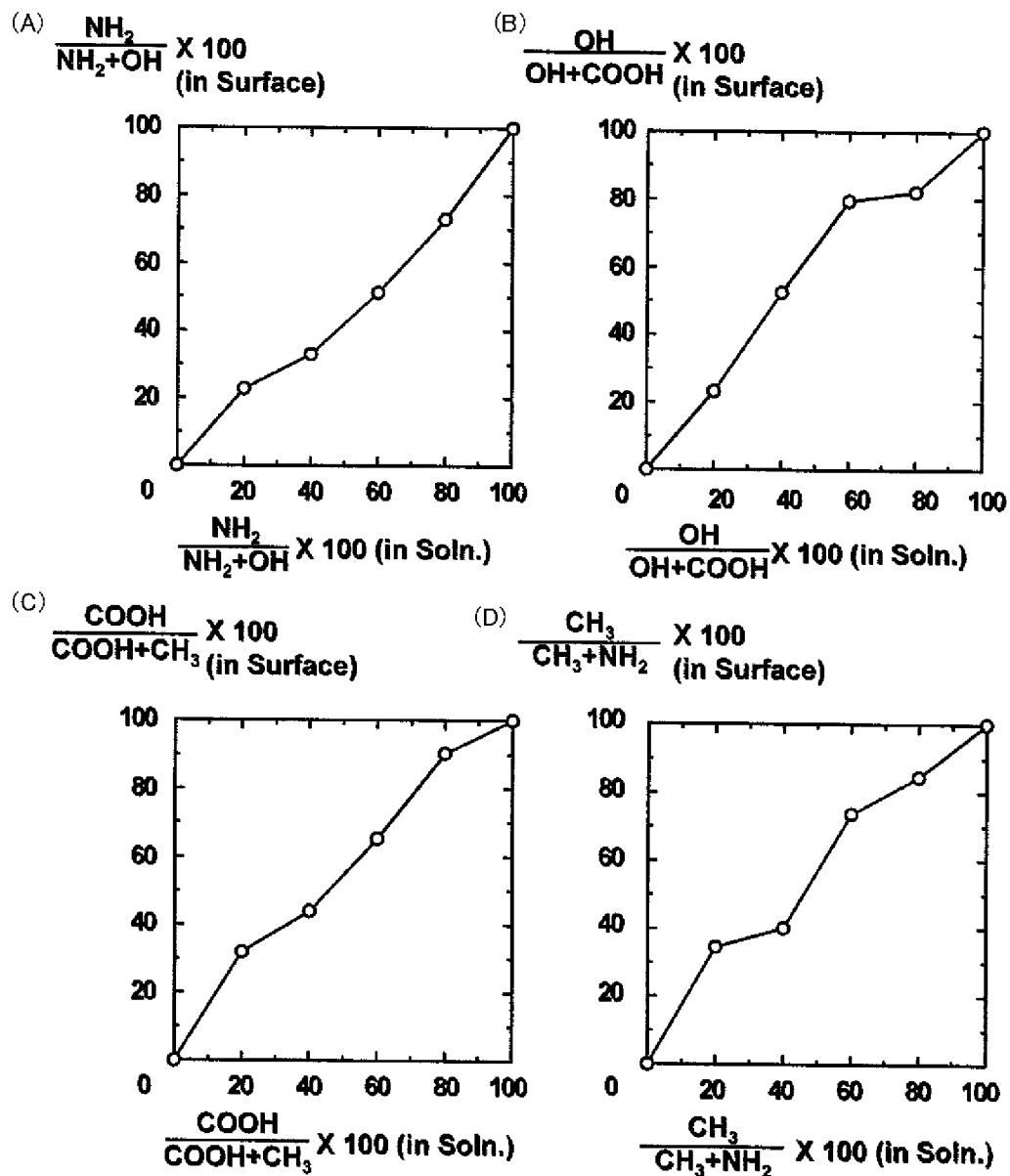
[請求項18] 水酸基：カルボキシル基を100：0～20：80の割合で有する前記培養器と、無血清の骨形成分化誘導培地とを用い、前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を骨細胞に分化させる、
ことを特徴とする請求項16に記載の細胞分化方法。

[請求項19] 親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と脂肪分化誘導培地とを用いてヒト骨髓間葉系幹細胞を培養し、前記ヒト骨髓間葉系幹細胞を脂肪細胞に分化させる、
ことを特徴とする細胞分化方法。

[図1]

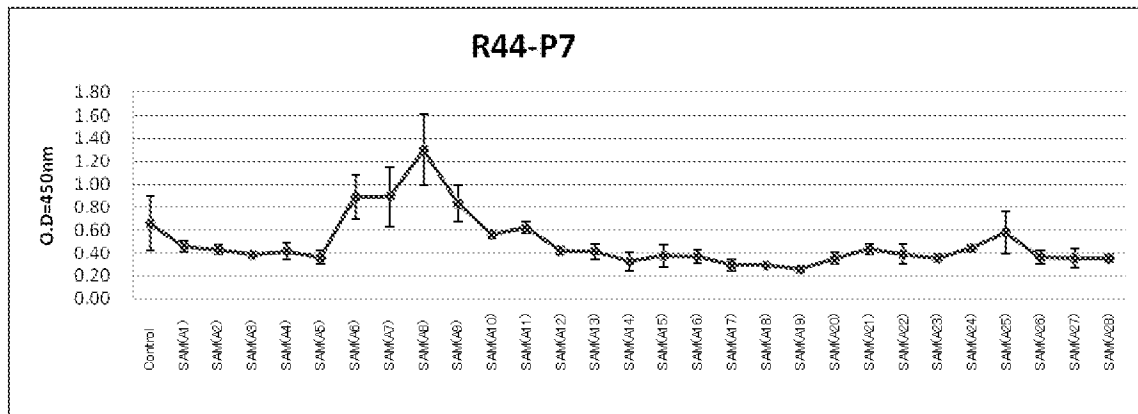


[図2]

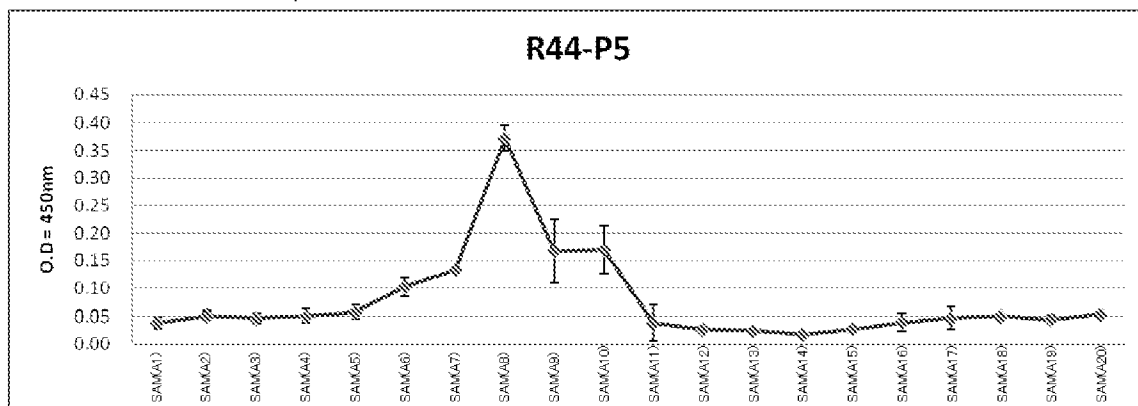


[図3]

(A) Experiment 1. h-BM MSC in serum free medium(STK2)



(B) Experiment 2. h-BM MSC in serum free medium(STK2)



(C) Experiment 3. h-BM MSC in serum free medium(STK2)

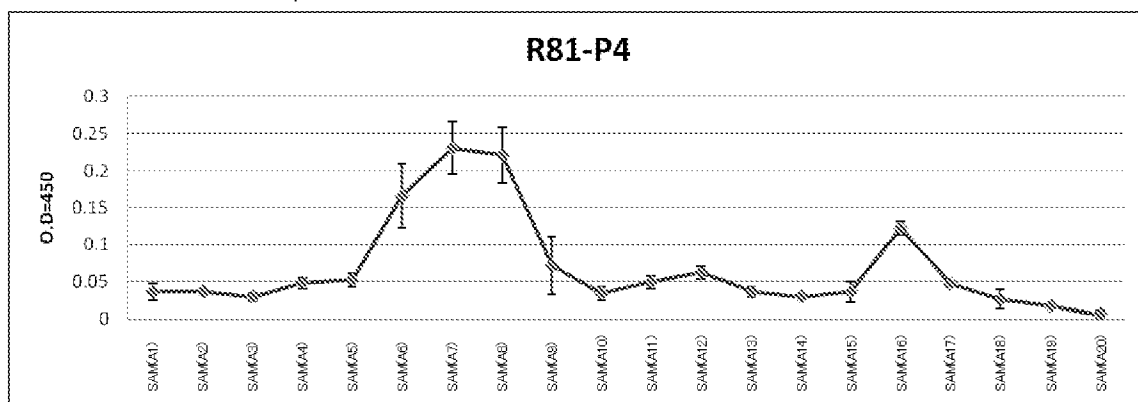
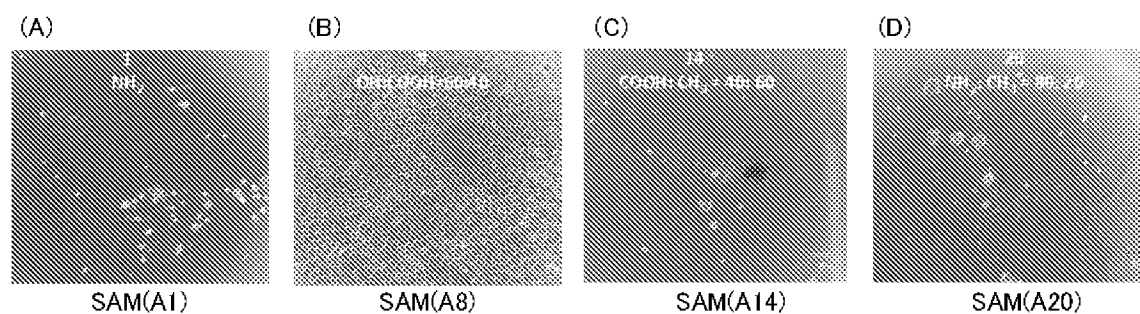
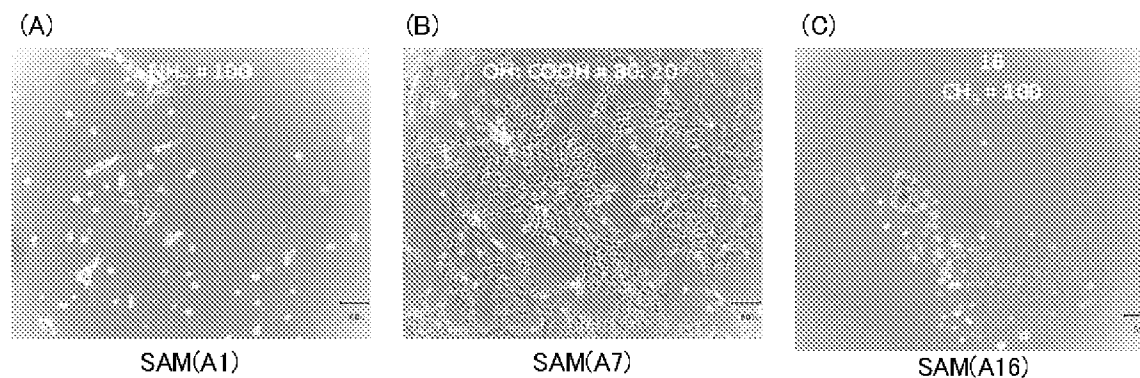


Figure 1 consists of four panels, (A) through (D), each showing two XPS spectra. The top spectrum in each panel is the C1s spectrum, and the bottom spectrum is the N1s spectrum. The chemical composition is indicated in each panel: (A) Control, (B) OH = 100, (C) OH + COOH = 60:40, and (D) NH2:CH2 = 60:40.

[图5]



[図6]

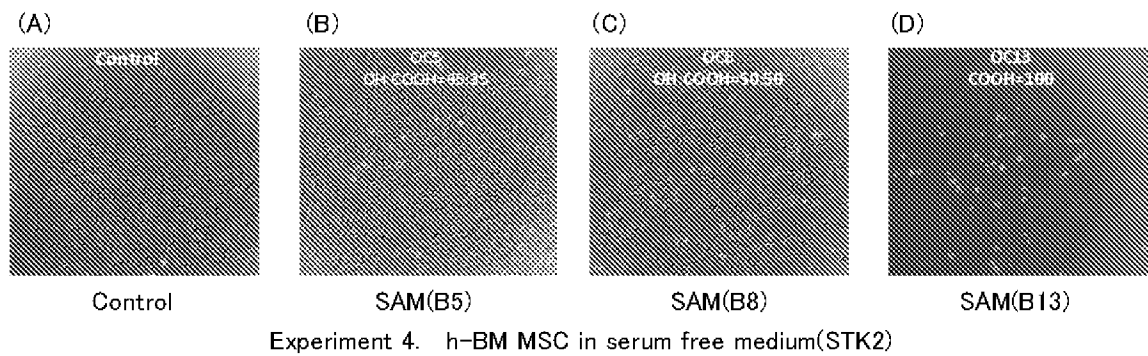


[图7]

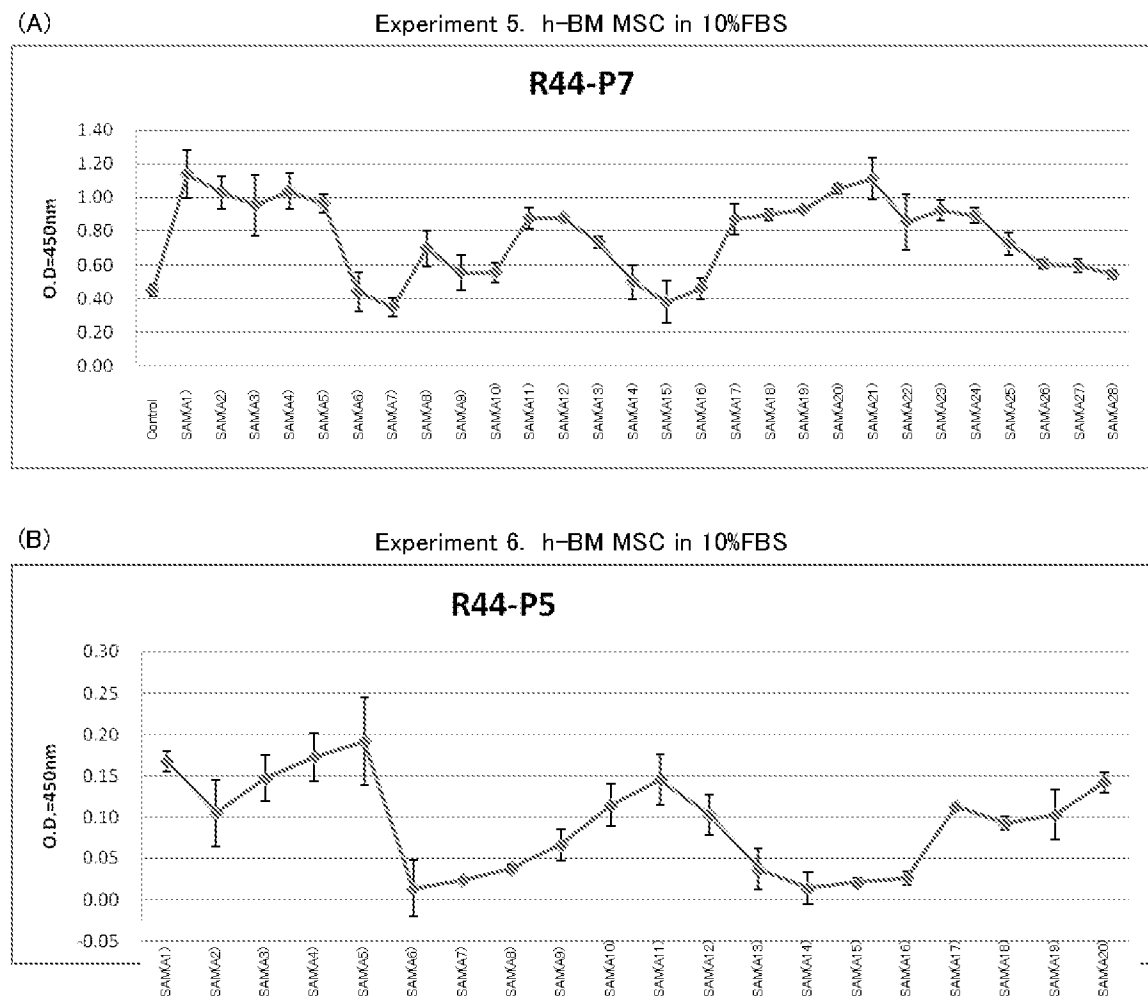
R44-P5

Treatment	Cell number/well (approx.)
Control	7500
SAMB7	3000
SAMB20	4000
SAMB30	4500
SAMB60	5500
SAMB90	14500
SAMB100	11500
SAMB120	7500
SAMB150	6000
SAMB180	9000
SAMB210	9500
SAMB240	8500
SAMB270	3500
SAMB300	1000

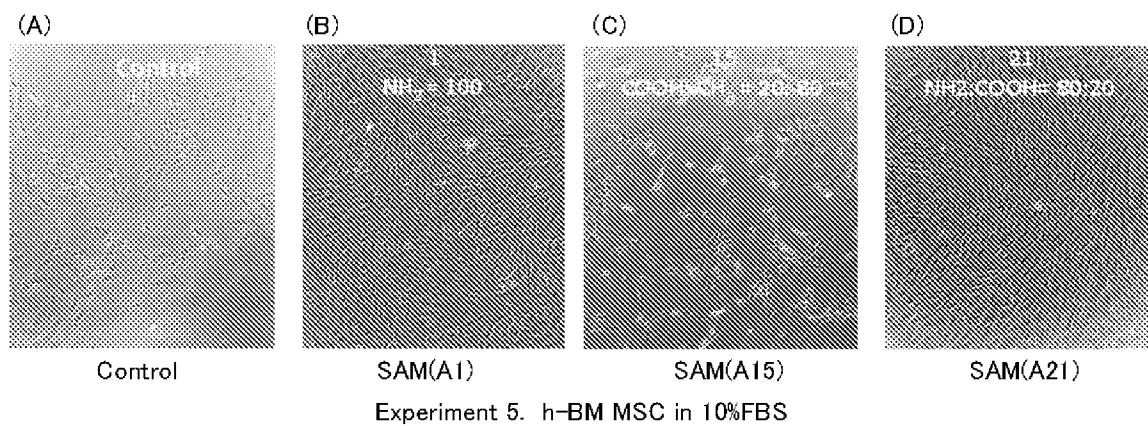
[図8]



[図9]

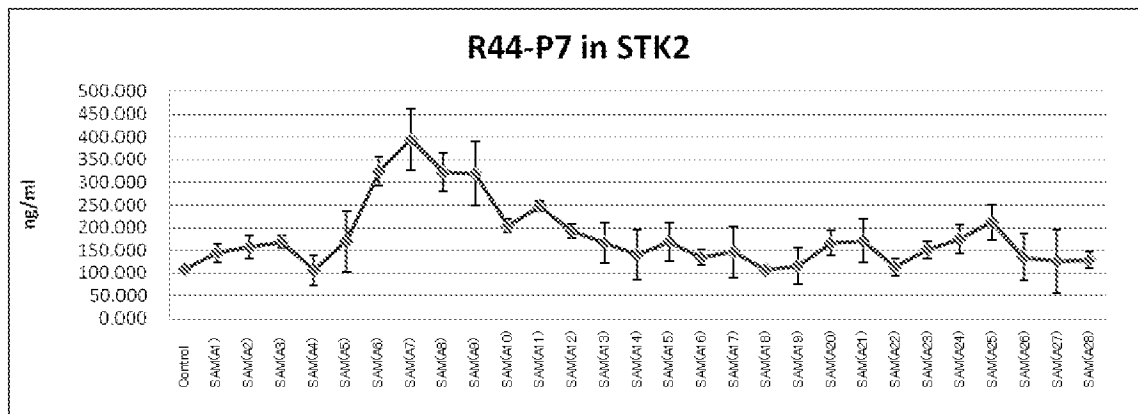


[図10]



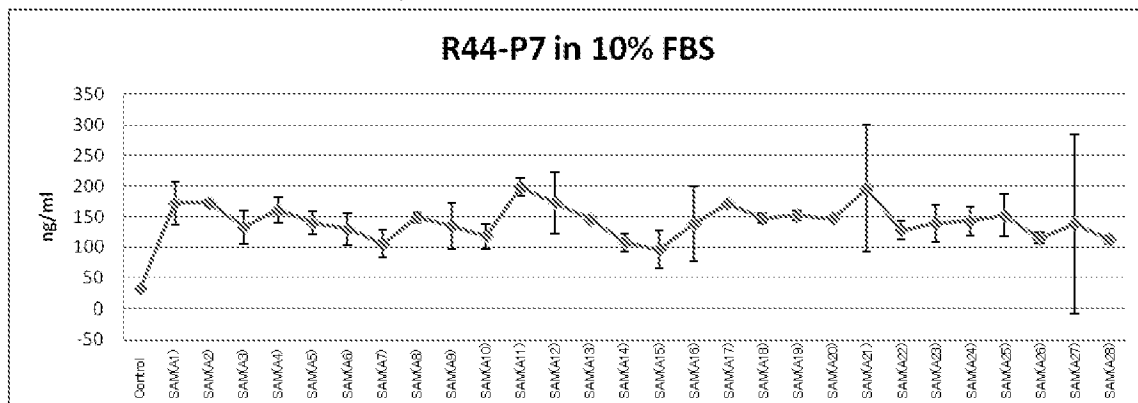
[図11]

Experiment 1. h-BM MSC in serum free medium(STK2)



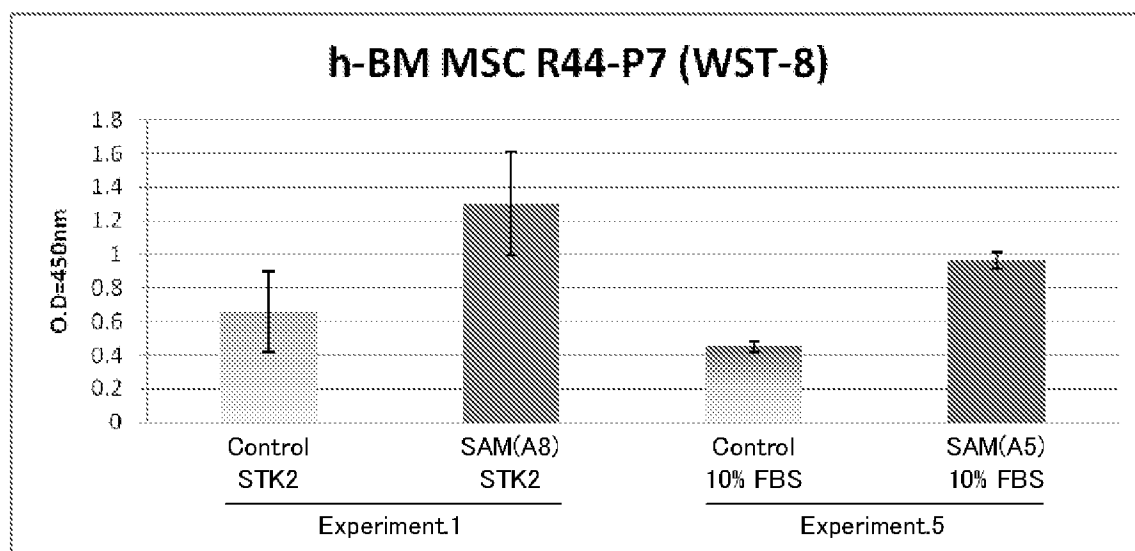
[図12]

Experiment 5. h-BM MSC in 10%FBS

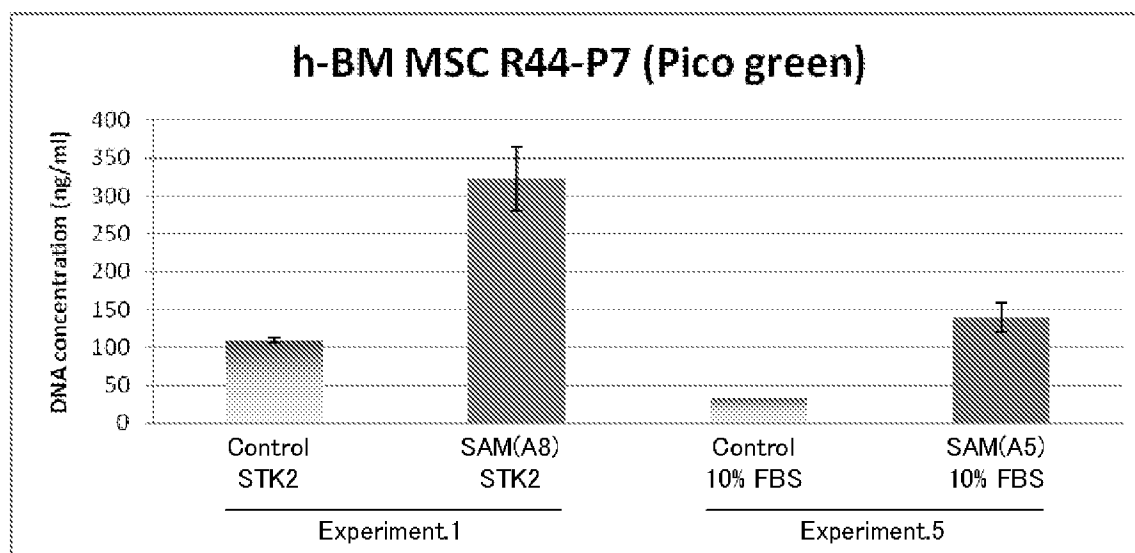


[図13]

(A)

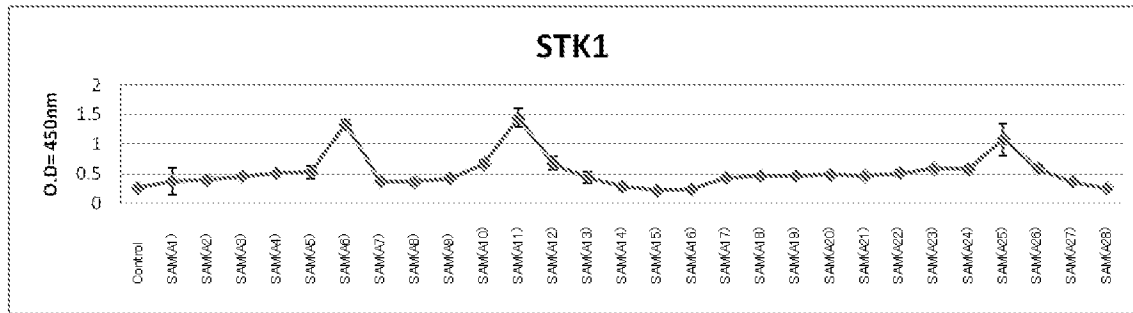


(B)

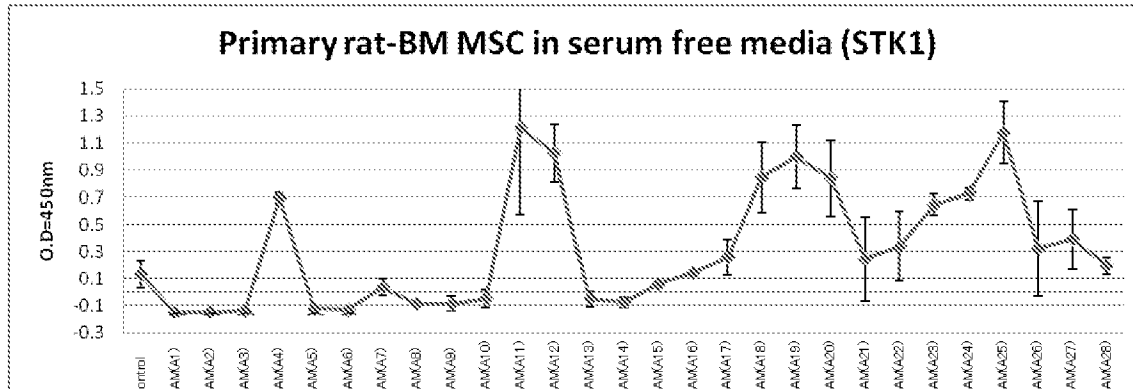


[図14]

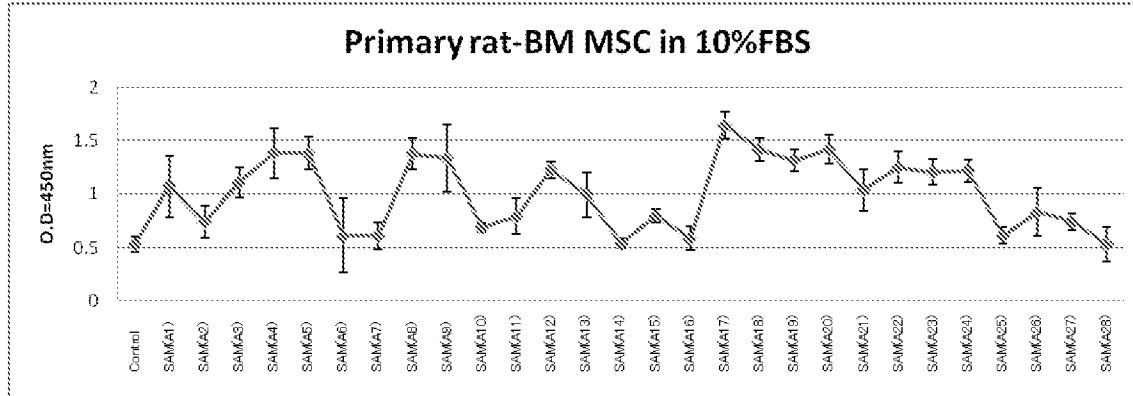
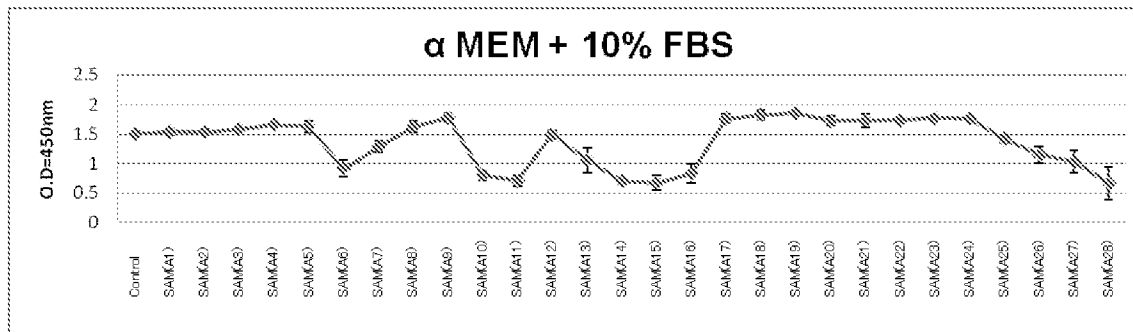
(A) Experiment 11-1. rat-primary MSC in serum free medium (STK1)



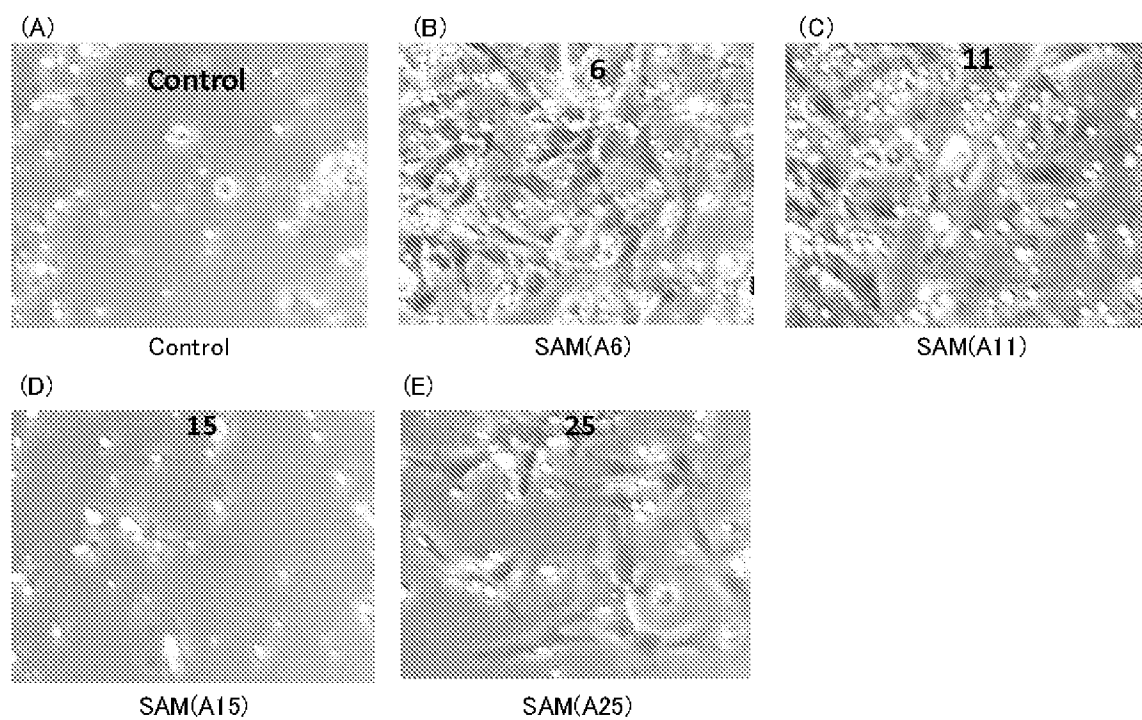
(B) Experiment 11-2. rat-primary MSC in serum free medium (STK1)



(C) Experiment 12. rat-primary MSC in DMEM+10%FBS

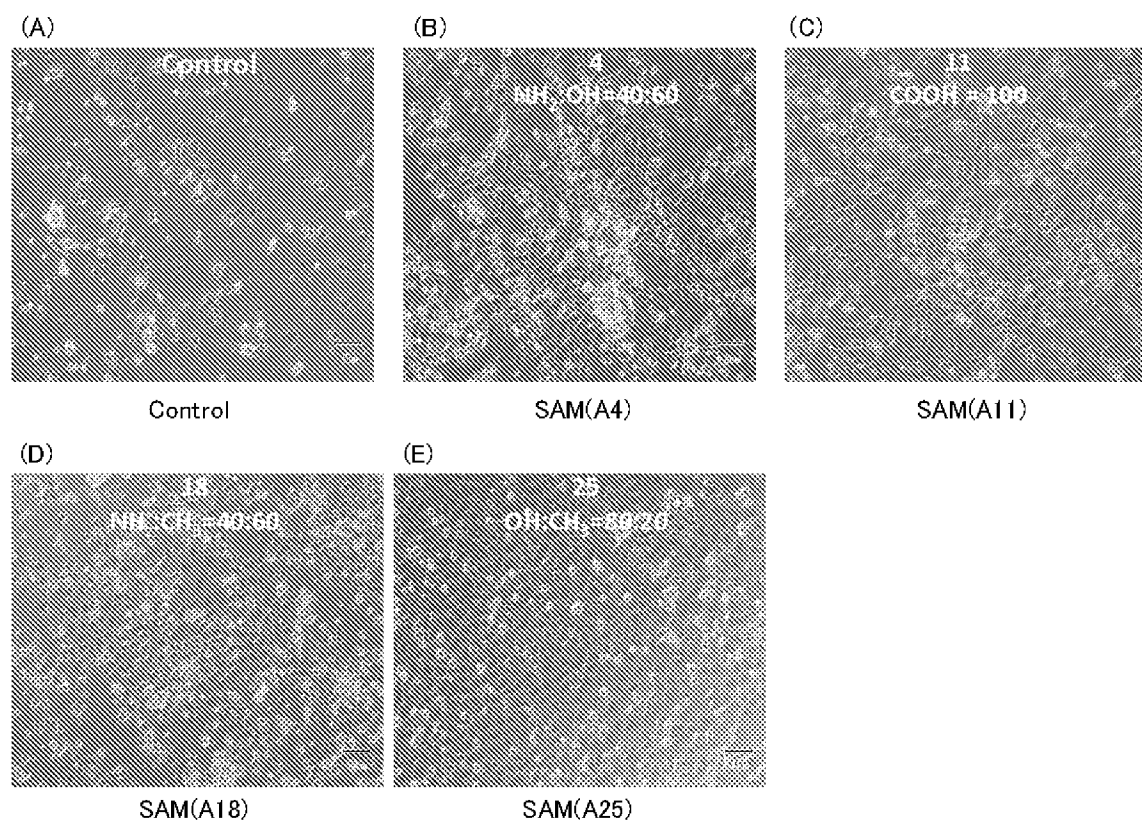
(D) Experiment 13. rat-primary MSC in α MEM+10%FBS

[図15]



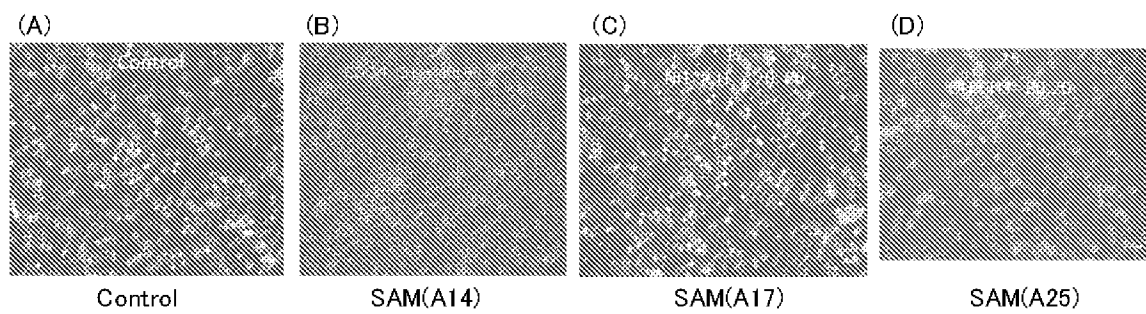
Experiment 11-1. rat-primary MSC in serum free medium (STK1)

[図16]



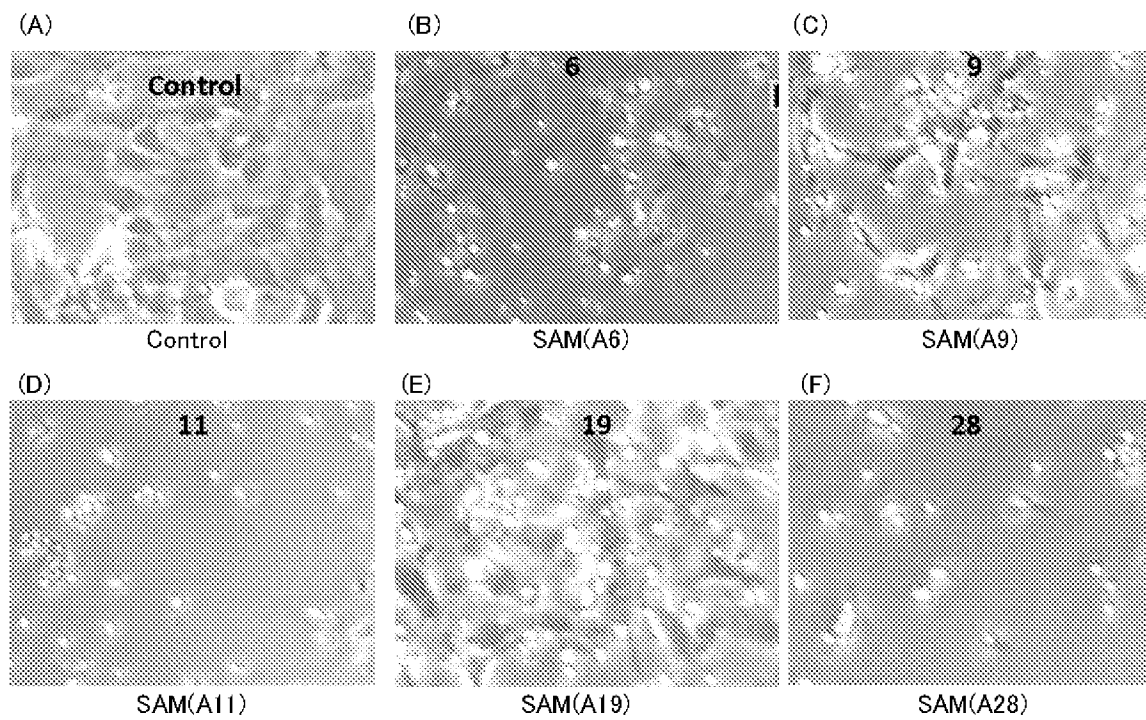
Experiment 11-2. rat-primary MSC in serum free medium (STK1)

[図17]



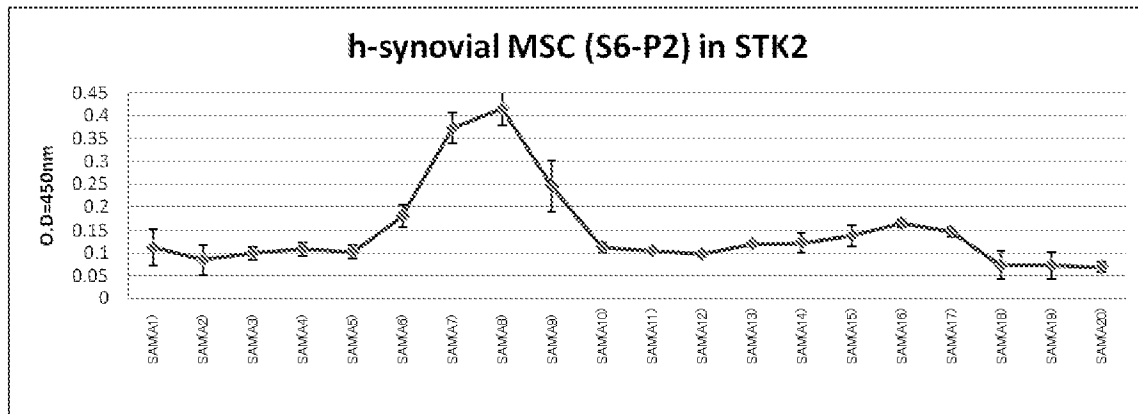
Experiment 12. rat-primary MSC in DMEM+10%FBS

[図18]

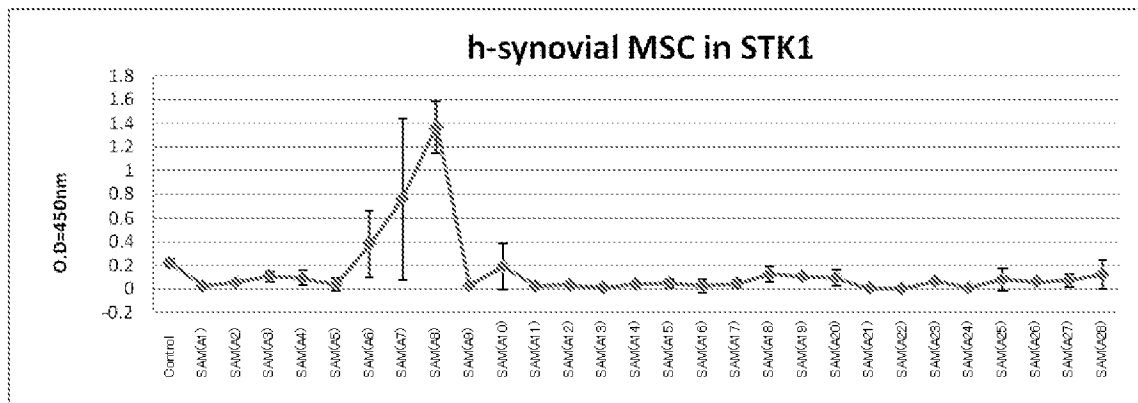
Experiment 13. rat-primary MSC in α MEM+10%FBS

[図19]

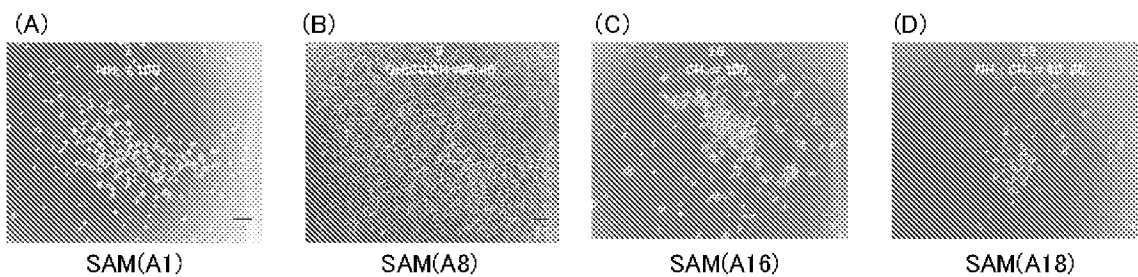
(A) Experiment 21. h-synovial MSC(S6-P2) in serum free medium (STK2)



(B) Experiment 22. h-synovial MSC in serum free medium (STK1)

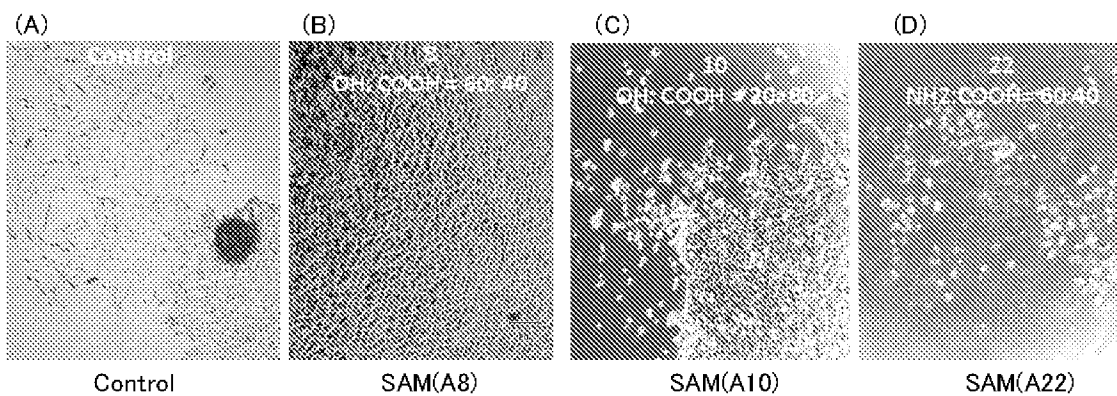


[図20]



Experiment 21. h-synovial MSC(S6-P2) in serum free medium (STK2)

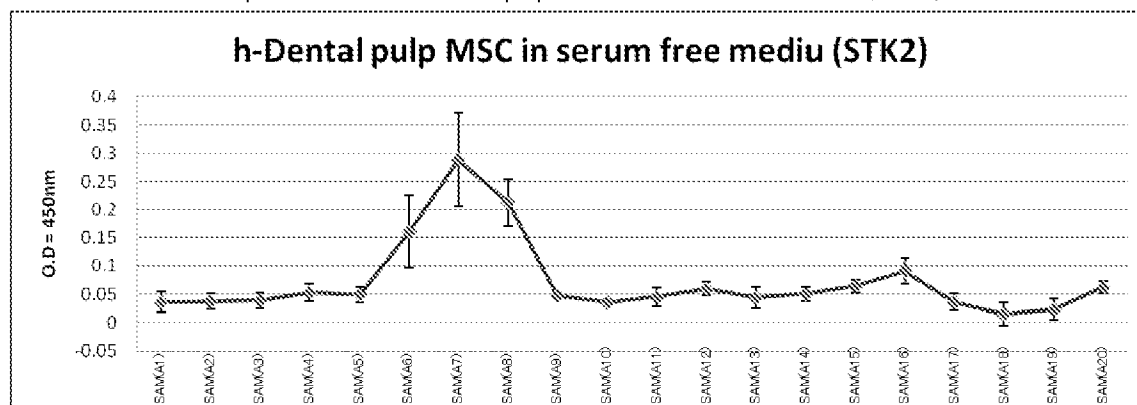
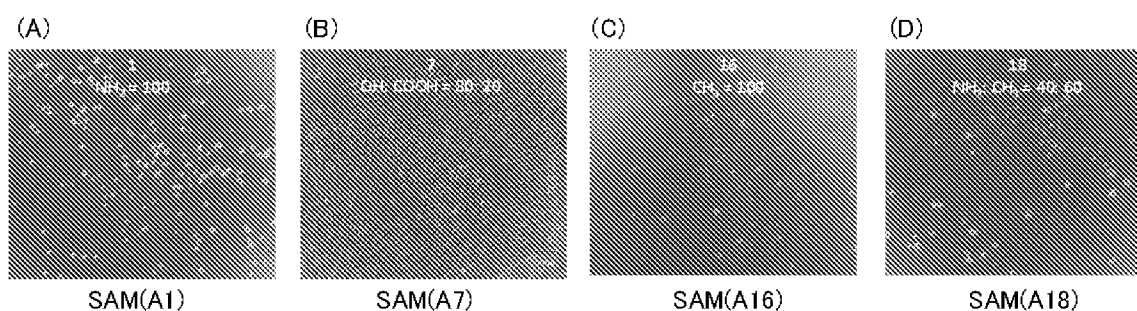
[図21]



Experiment 22. h-synovial MSC in serum free medium (STK1)

[22]

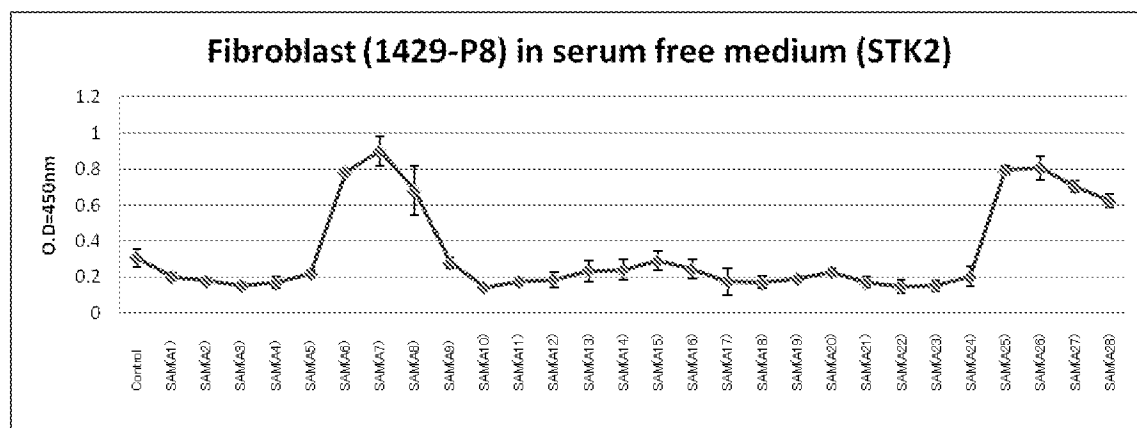
Experiment 23. h-Dental pulp MSC in serum free medium (STK2)

[23]

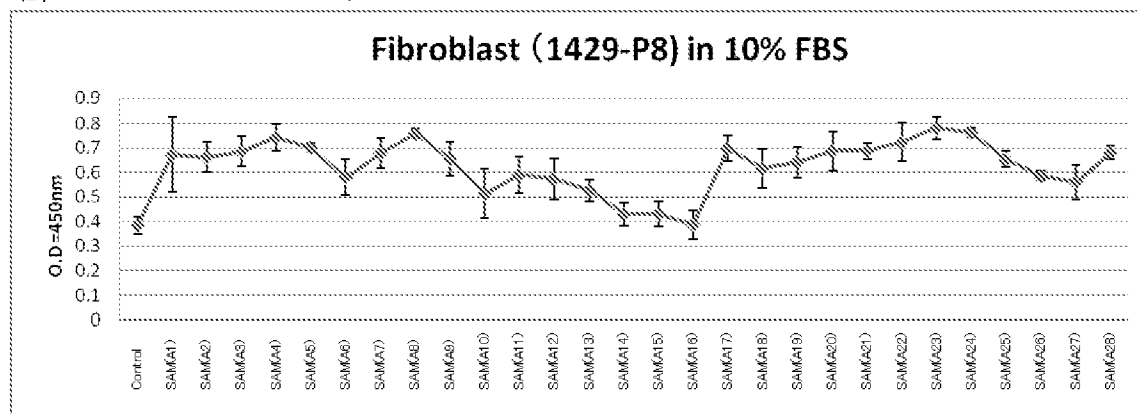
Experiment 23. h-Dental pulp MSC in serum free medium (STK2)

[24]

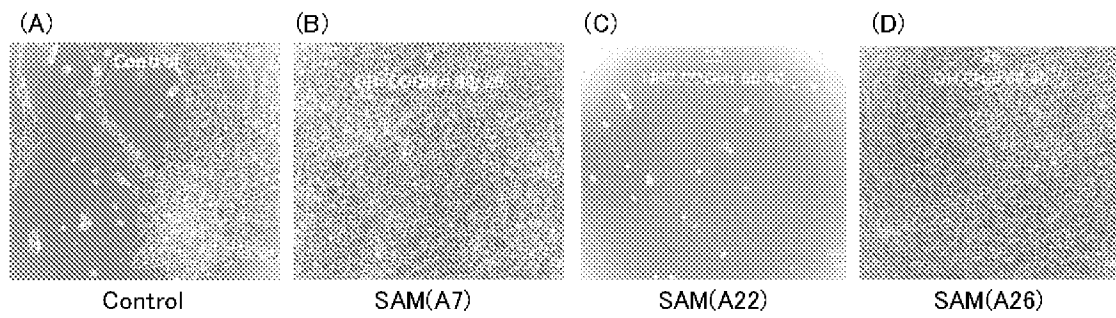
(A) Experiment 31. Fibroblast(1429-P8) in serum free medium (STK2)



(B) Experiment 32. Fibroblast(1429-P8) in 10%FBS



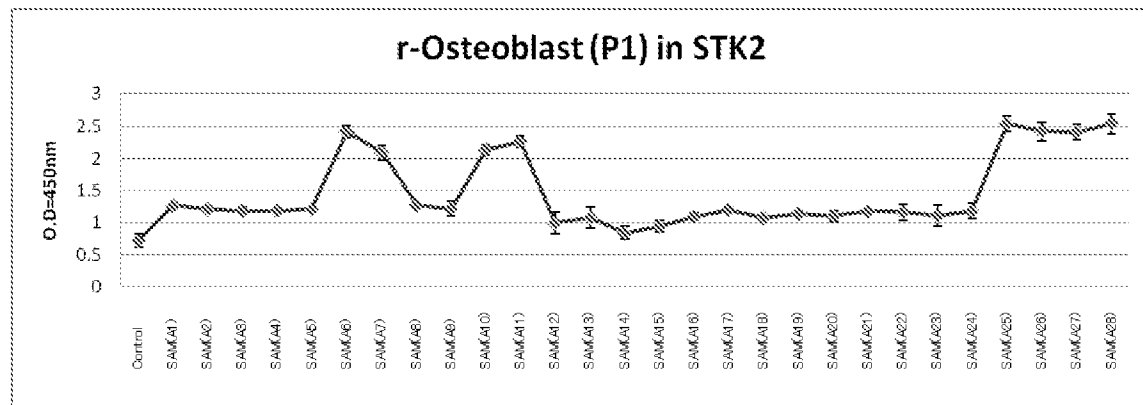
[図25]



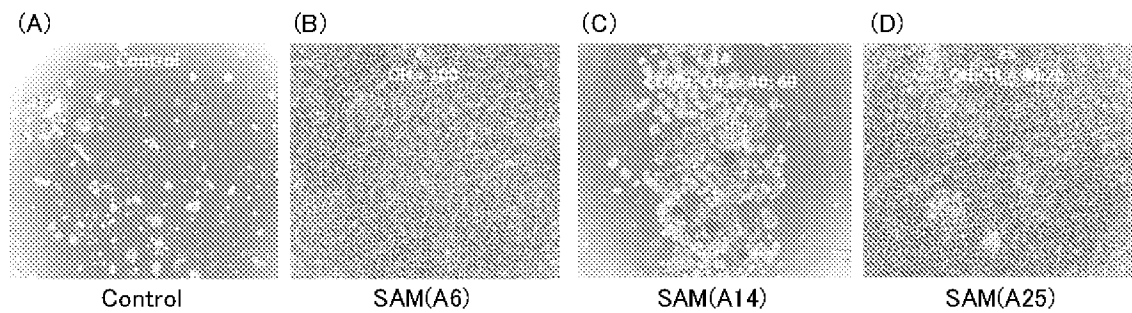
Experiment 31. Fibroblast(1429-P8) in serum free medium (STK2)

[図26]

Experiment 33. rat-Osteoblasts (P1) in serum free medium (STK2)



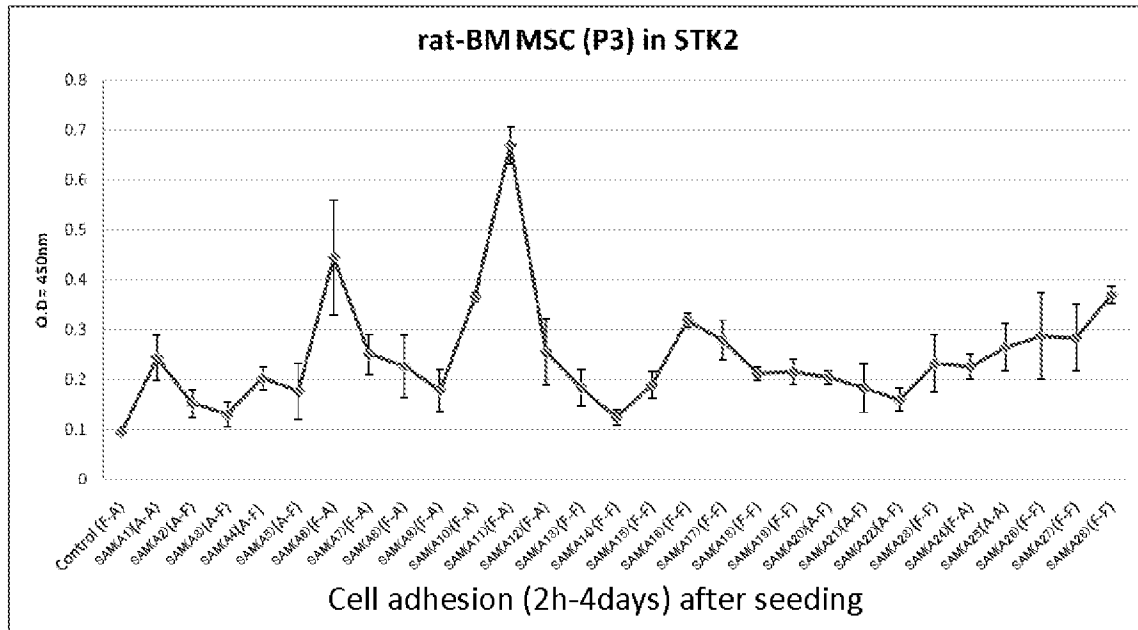
[図27]



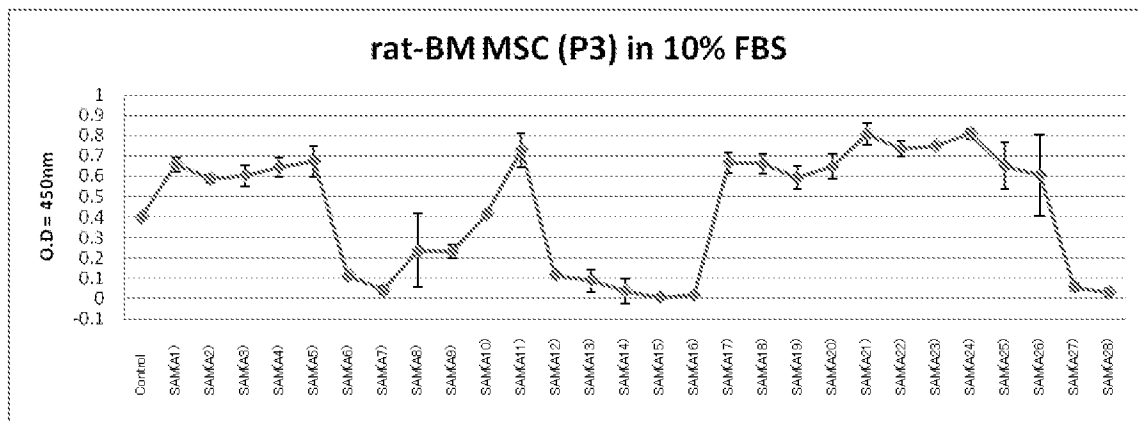
Experiment 33. rat-Osteoblasts (P1) in serum free medium (STK2)

[図28]

(A) Experiment 41. rat-BM MSC (P3) in serum free medium (STK2)

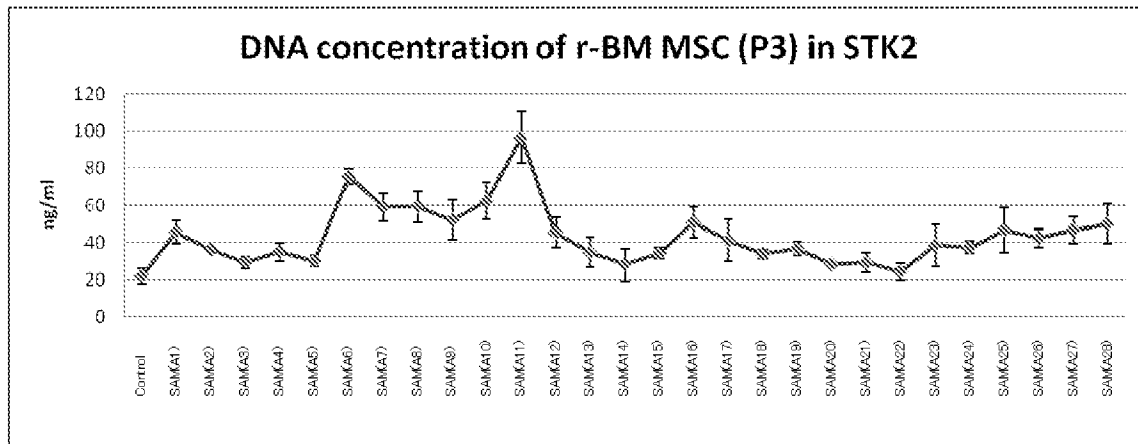


(B) Experiment 42. rat-BM MSC (P3) in 10%FBS

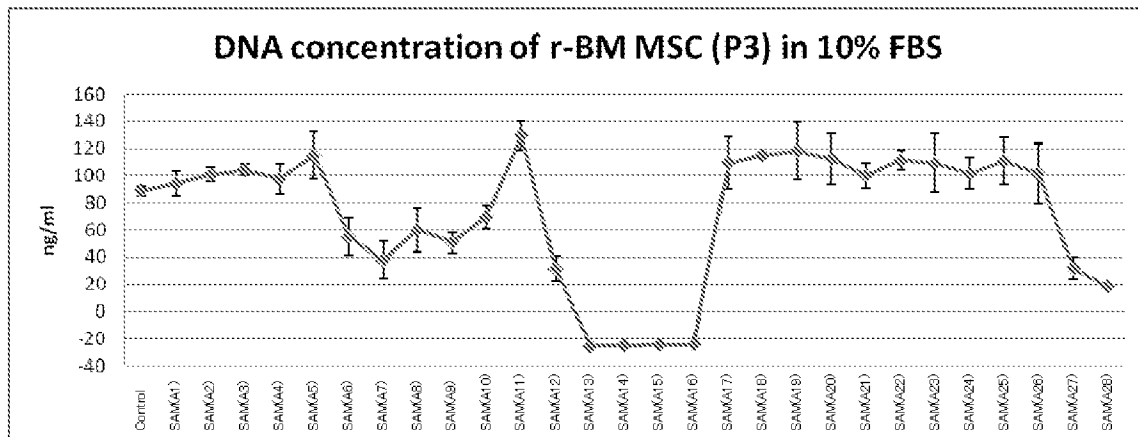


[図29]

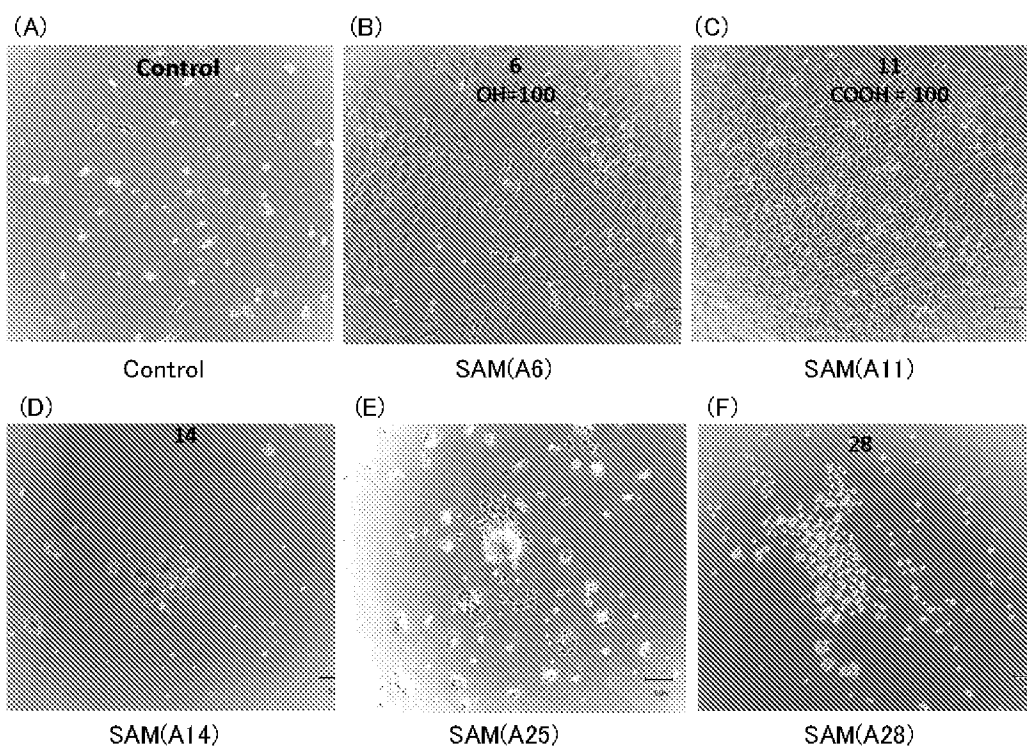
(A) Experiment 41. rat-BM MSC (P3) in serum free medium(STK2)



(B) Experiment 42. rat-BM MSC (P3) in 10%FBS

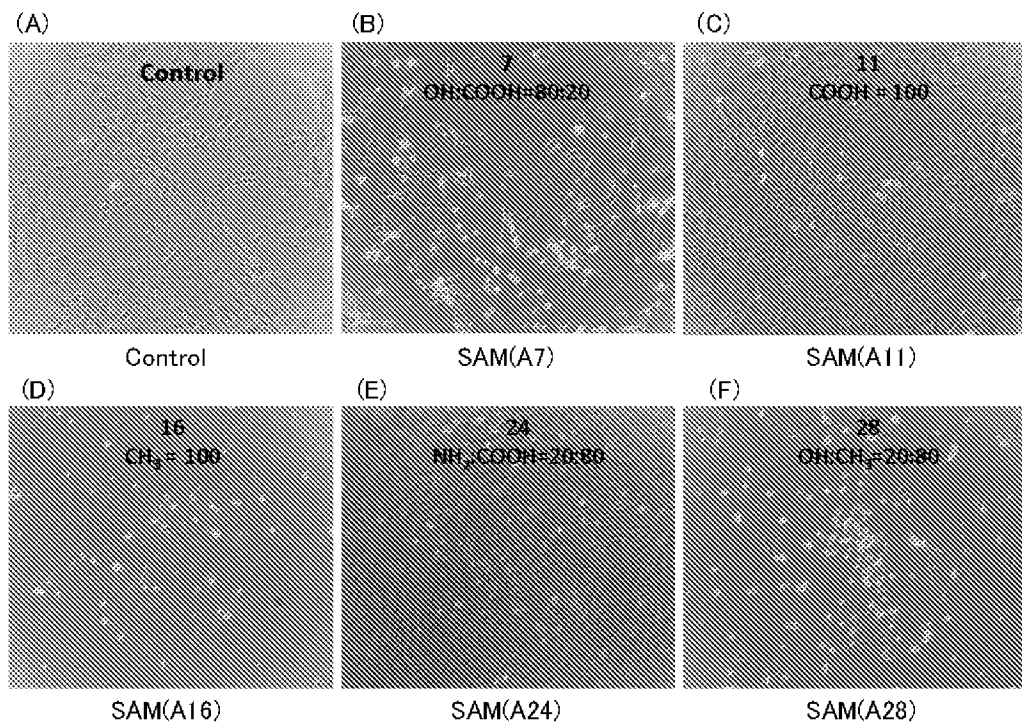


[図30]



Experiment 41. rat-BM MSC (P3) in serum free medium (STK2)

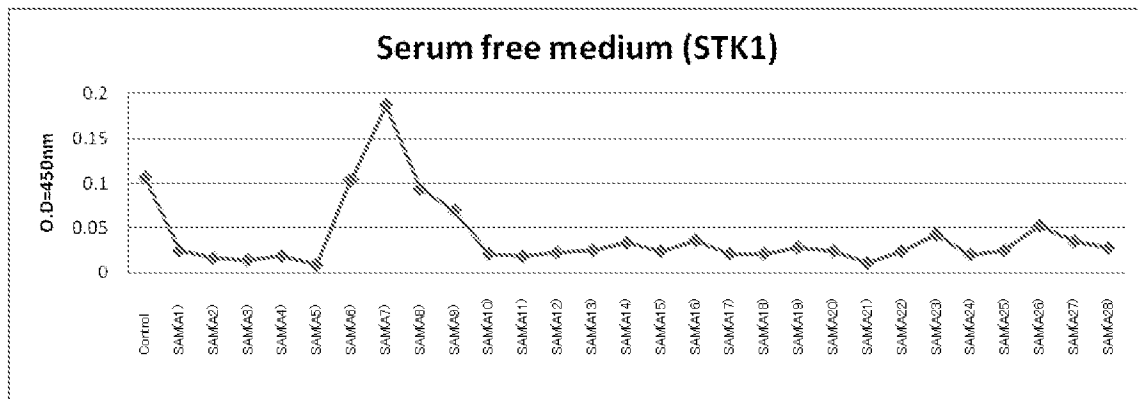
[図31]



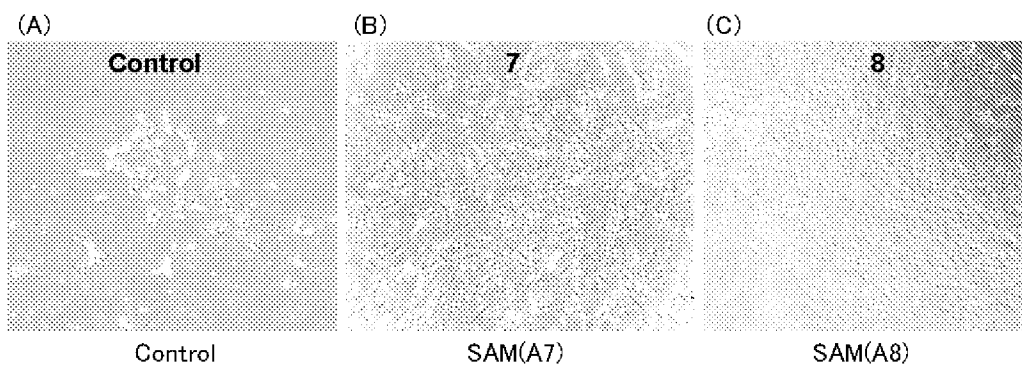
Experiment 42. rat-BM MSC (P3) in 10%FBS

[図32]

Experiment 51. h-primary MSC (R82) in serum free medium (STK1)

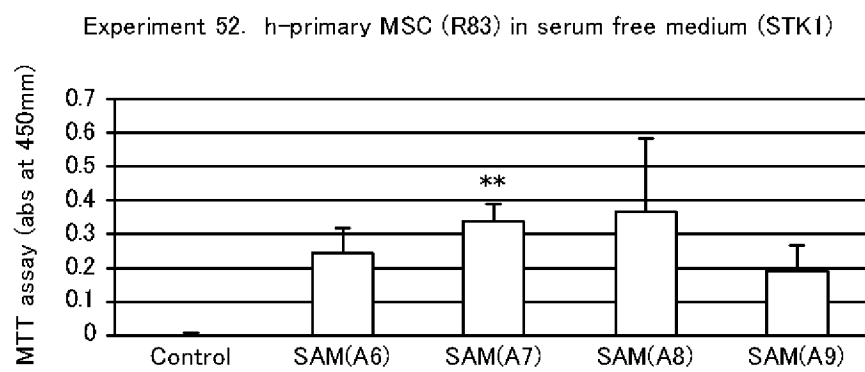


[図33]



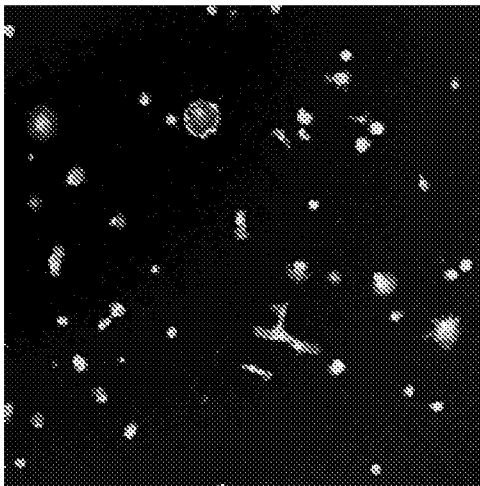
Experiment 51. h-primary MSC (R82) in serum free medium (STK1)

[図34]

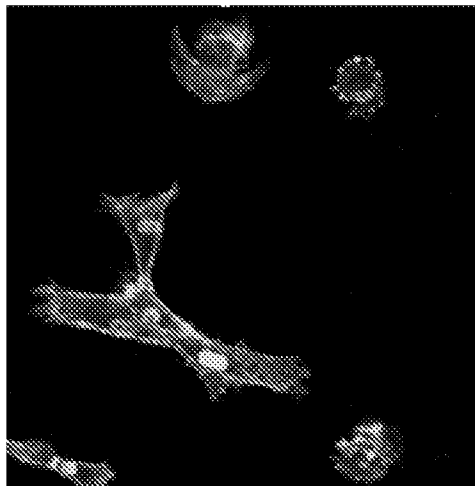


[図35]

(A)

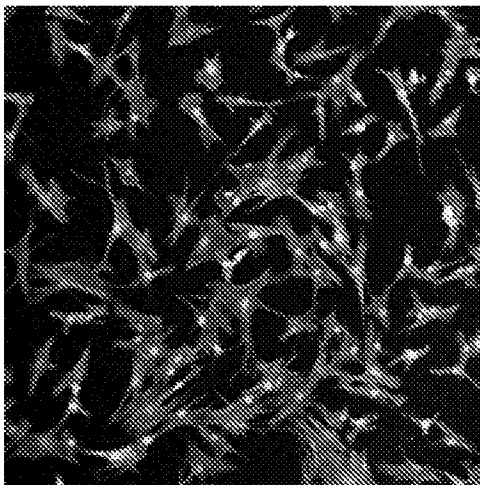


(B)

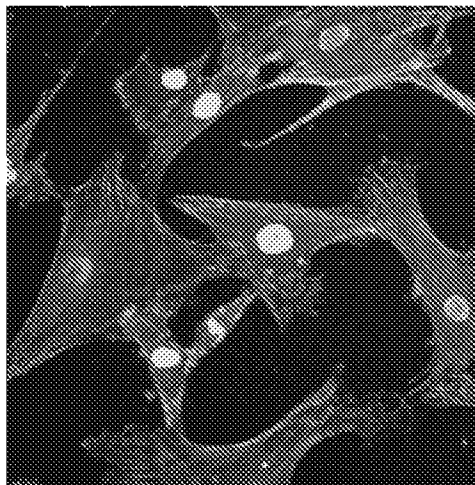


[図36]

(A)

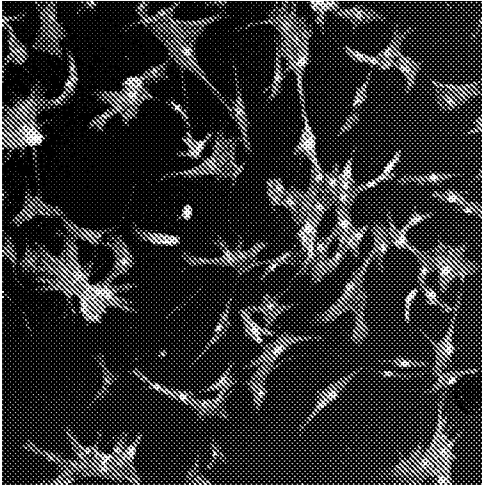


(B)

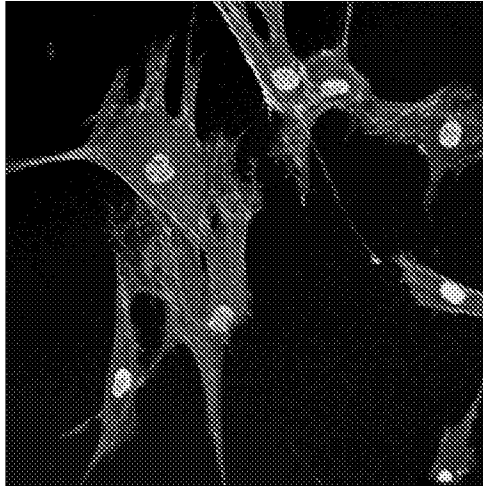


[図37]

(A)

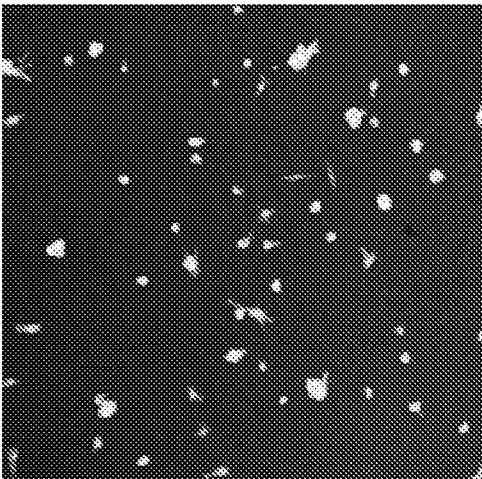


(B)

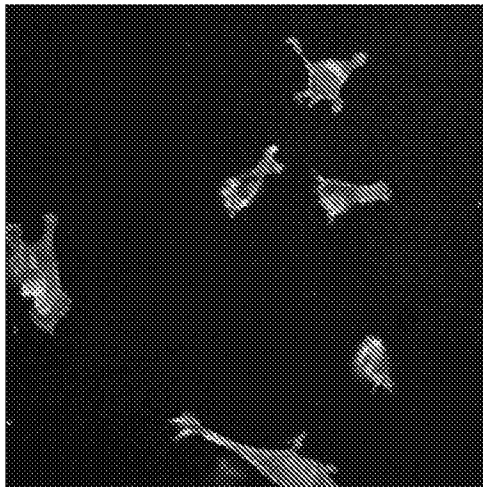


[図38]

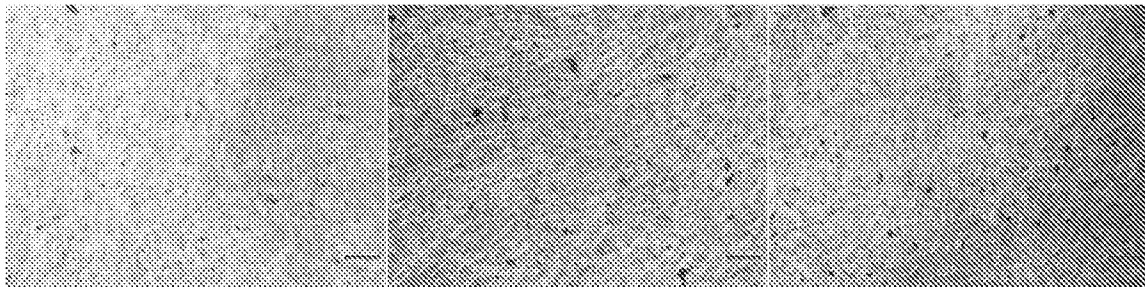
(A)



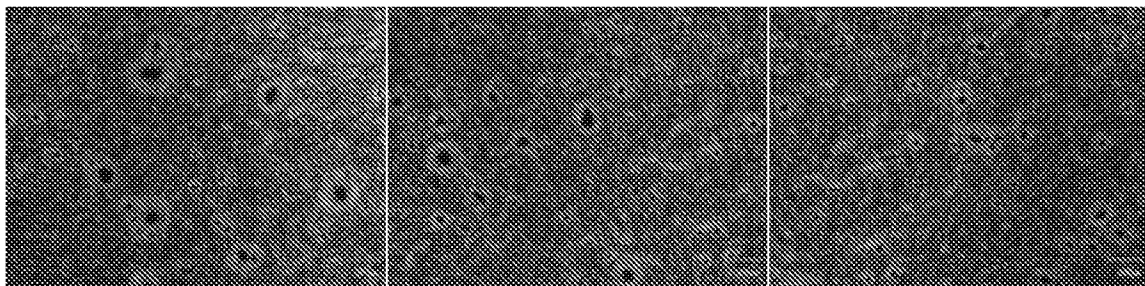
(B)



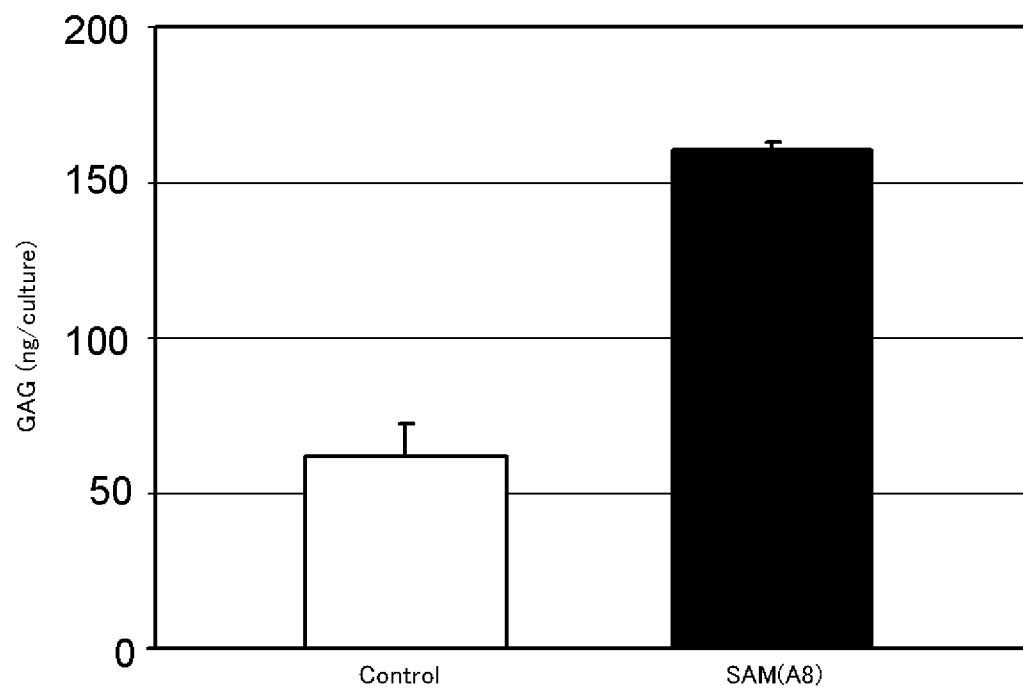
[図39]



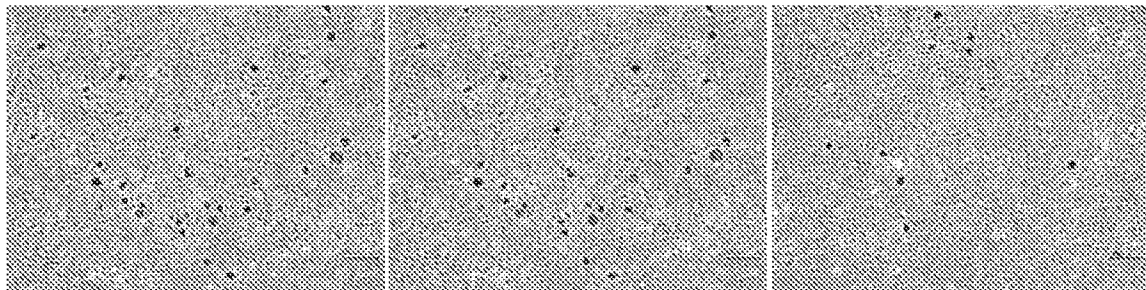
[図40]



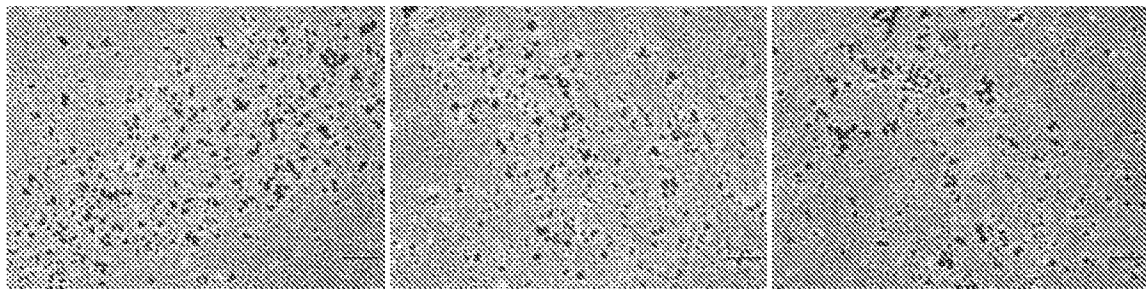
[図41]



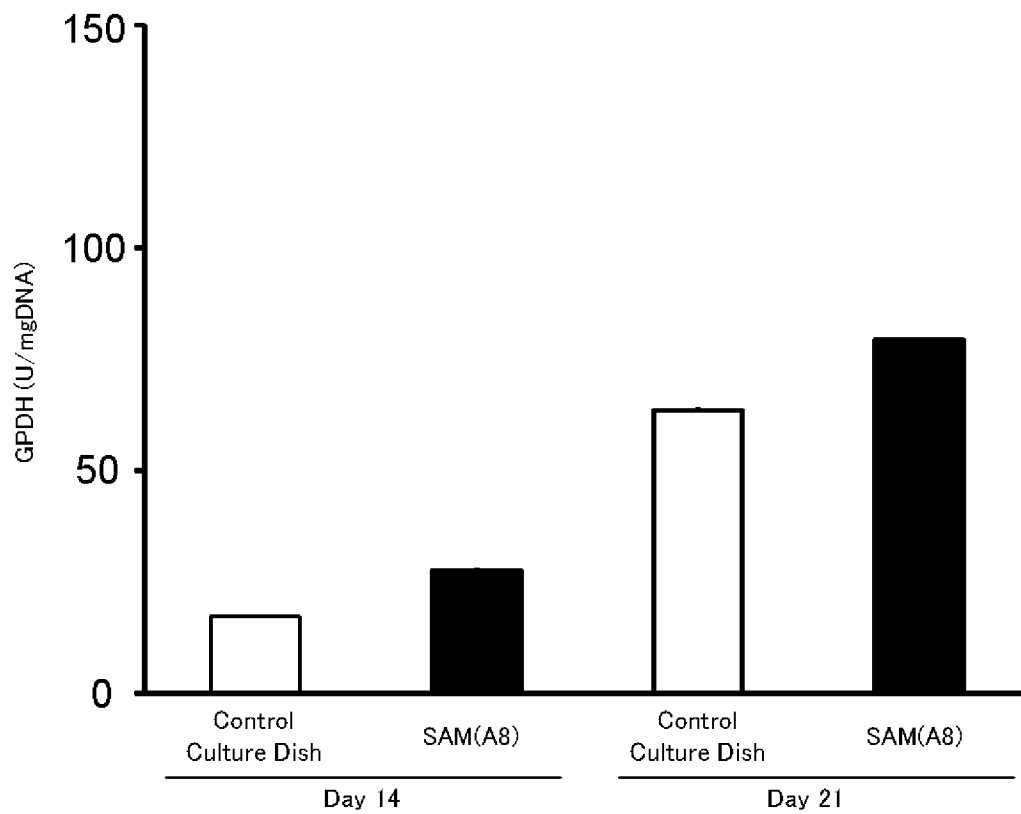
[図42]



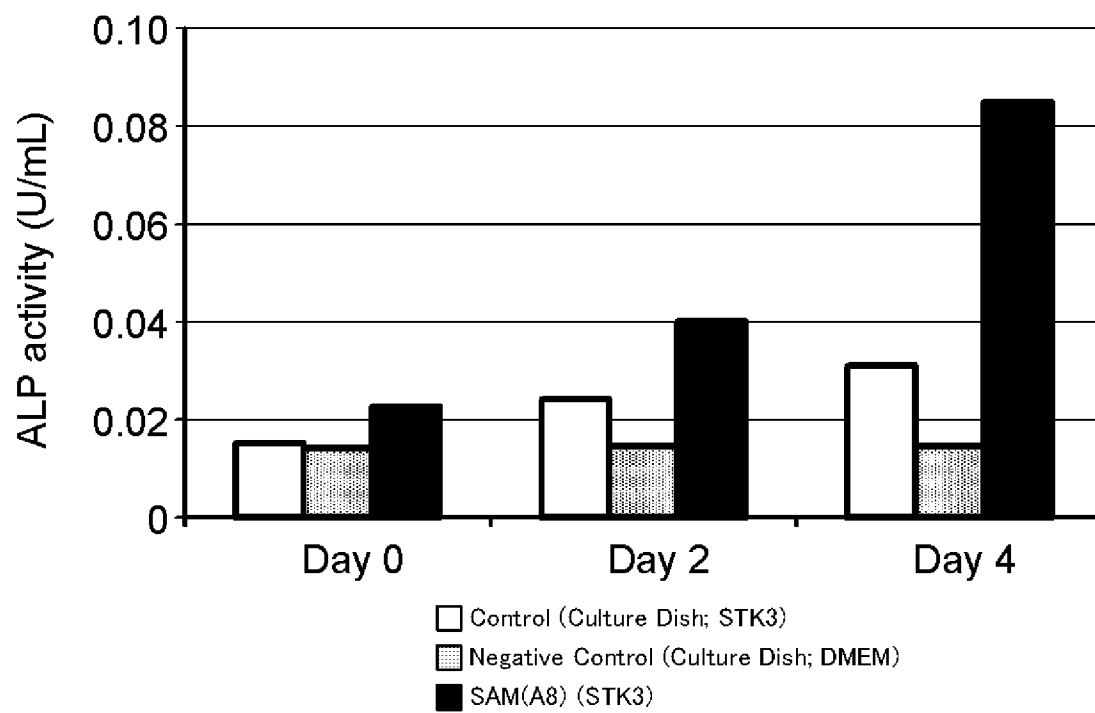
[図43]



[図44]



[図45]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, C12N5/071
(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M3/00, C12M1/00, C12N5/07, C12N5/071, C12N5/0775

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 2010/033925 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 25 March 2010 (25.03.2010), entire text & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2 & JP 2012-052664 A	<u>1-3, 13-14</u> 1-19
<u>X</u> Y	ROBERTS, C. et al., "Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG) ₃ OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces.", J. AM. CHEM. SOC., 1998.07.08, Vol.120, No.26, P.6548-6555	<u>1-3, 13-14</u> 1-19

☒ 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
23 May, 2012 (23.05.12)

Date of mailing of the international search report
05 June, 2012 (05.06.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	FAUCHEUX, N. et al., "The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry.", BIOMATERIALS, 2006.01, Vol.27, No.2, P.234-245	<u>1-3,13-14</u> 1-19
<u>X</u> Y	YOKOTA, S. et al., "Biofunctionality of self-assembled nanolayers composed of cellulosic polymers.", CARBOHYDR. POLYM., 2008.11.04, Vol.74, No.3, P.666-672	<u>1-3,13-14</u> 1-19
Y	JP 2010-166901 A (Riken, Japan), 05 August 2010 (05.08.2010), entire text & US 2010/0167398 A1	1-19
Y	JP 2010-029186 A (Becton, Dickinson and Co.), 12 February 2010 (12.02.2010), entire text & US 2010/0021998 A1 & EP 2147971 A2	1-19
Y	WO 2006/093207 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 08 September 2006 (08.09.2006), entire text (Family: none)	1-19
A	JP 2009-216483 A (Kyushu University), 24 September 2009 (24.09.2009), entire text (Family: none)	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059219

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature common to the inventions of claims 1-19 is being related to "a method for culturing animal cells using an incubator which has one or more functional groups on the surface at a predetermined ratio, said functional groups being selected from the group consisting of hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups".
(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

It is, however, considered that "to culture animal cells using a serum-free culture medium and an incubator which has one or more functional groups on the surface at a predetermined ratio, said functional groups being selected from the group consisting of hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups" had been well known before the priority date of this international application. (See documents 1-4)

Therefore, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 and so on.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Consequently, it is considered that four invention groups are involved in claims.

Invention groups:

Invention group 1: the inventions of claims 1-7, 10-14 and 16-19

Inventions related to mesenchymal stem cells using a serum-free culture medium and an incubator which has one or more functional groups on the surface at a predetermined ratio, said functional groups being selected from the group consisting of hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups>

Invention group 2: the inventions of claims 1-3, 8 and 13-14

Inventions related to human fibroblasts using a serum-free culture medium and an incubator which has one or more functional groups on the surface at a predetermined ratio, said functional groups being selected from the group consisting of hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups>

Invention group 3: the inventions of claims 1-3, 9 and 13-14

Inventions related to rat osteoblasts using a serum-free culture medium and an incubator which has one or more functional groups on the surface at a predetermined ratio, said functional groups being selected from the group consisting of hydrophilic functional groups and hydrophobic functional groups>

Invention group 4: the invention of claim 15

Inventions related to a serum-containing culture medium and an incubator which has amino groups and hydroxyl groups at a ratio of 100:0 to 20:80, hydroxyl groups and carboxyl groups at a ratio of 80:20 to 20:80, carboxyl groups and methyl groups at a ratio of 100:0 to 60:40, amino groups and methyl groups at a ratio of 80:20 to 20:80 or amino groups and carboxyl groups at a ratio of 80:20 to 20:80 on the surface>

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00, C12M1/00, C12N5/07, C12N5/071, C12N5/0775

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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(JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

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
<u>X</u> Y	WO 2010/033925 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 2010.03.25, 全文 & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2 & JP 2012-052664 A	<u>1-3, 13-14</u> 1-19
<u>X</u> Y	ROBERTS, C. et al., "Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG) ₃ OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces.", J. AM. CHEM. SOC., 1998.07.08, Vol.120, No.26, P.6548-6555	<u>1-3, 13-14</u> 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

2 3 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

野村 英雄

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 1 5 5

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
<u>X</u> Y	FAUCHEUX, N. et al., "The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry.", BIOMATERIALS, 2006.01, Vol.27, No.2, P.234-245	<u>1-3, 13-14</u> 1-19
<u>X</u> Y	YOKOTA, S. et al., "Biofunctionality of self-assembled nanolayers composed of cellulosic polymers.", CARBOHYDR. POLYM., 2008.11.04, Vol.74, No.3, P.666-672	<u>1-3, 13-14</u> 1-19
Y	JP 2010-166901 A (独立行政法人理化学研究所) 2010.08.05, 全文 & US 2010/0167398 A1	1-19
Y	JP 2010-029186 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 2010.02.12, 全文 & US 2010/0021998 A1 & EP 2147971 A2	1-19
Y	WO 2006/093207 A1 (国立大学法人 北海道大学) 2006.09.08, 全文 (ファミリーなし)	1-19
A	JP 2009-216483 A (国立大学法人九州大学) 2009.09.24, 全文 (ファミリーなし)	1-19

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1－19に係る発明は、「親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器を用いた、動物細胞の培養方法」に関連するという共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、「親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から1種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と無血清培地とを用いた、動物細胞の培養」は、本願優先日前に周知であったと認められる（文献1－4等参照）。したがって、当該技術的特徴は、文献1等の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そうすると、請求の範囲には4の発明群が含まれると認められる（特別ページ参照）。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第Ⅲ欄のつづき)

発明群

発明群 1 : 請求項 1 - 7、1 0 - 1 4、1 6 - 1 9 に係る発明

＜親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から 1 種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と無血清培地とを用いた、間葉系幹細胞の培養方法＞に関連する発明

発明群 2 : 請求項 1 - 3、8、1 3 - 1 4 に係る発明

＜親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から 1 種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と無血清培地とを用いた、ヒト線維芽細胞の培養方法＞に関連する発明

発明群 3 : 請求項 1 - 3、9、1 3 - 1 4 に係る発明

＜親水性官能基及び疎水性官能基からなる群から 1 種以上の官能基を所定の割合で表面に有する培養器と無血清培地とを用いた、ラット骨芽細胞の培養方法＞に関連する発明

発明群 4 : 請求項 1 5 に係る発明

＜血清含有培地と、アミノ基：水酸基を 1 0 0 : 0 ~ 2 0 : 8 0、水酸基：カルボキシル基を 8 0 : 2 0 ~ 2 0 : 8 0、カルボキシル基：メチル基を 1 0 0 : 0 ~ 6 0 : 4 0、アミノ基：メチル基を 8 0 : 2 0 ~ 2 0 : 8 0、或いは、アミノ基：カルボキシル基を 8 0 : 2 0 ~ 2 0 : 8 0 の割合で表面に有する培養器とを用いて、ヒト間葉系幹細胞、ヒト線維芽細胞又はラット間葉系幹細胞の増殖を促進させる、動物細胞の培養方法＞に関する発明