

(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
2022年6月2日(02.06.2022)



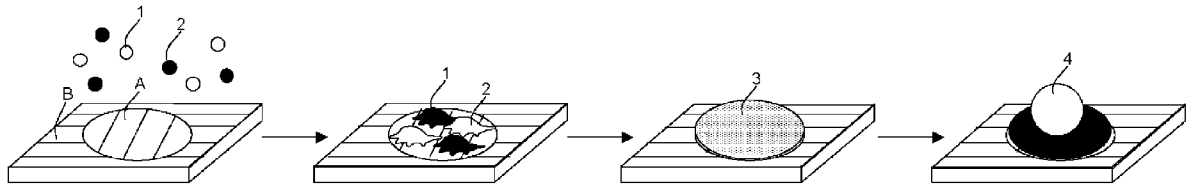
(10) 国際公開番号

WO 2022/114074 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 1/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/043257
- (22) 国際出願日: 2021年11月25日(25.11.2021)
- (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 2020-195707 2020年11月26日(26.11.2020) JP
- (71) 出願人: 東ソ一株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町4 5 6 0番地 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 久野 豪士(KUNO Goshi); 〒5108540 三重県四日市市霞 1 丁目 8 番地 東ソ一株式会社 四日市事業所内 Mie (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, IT, JO, JP, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR MANUFACTURING CELL MASS

(54) 発明の名称: 細胞塊の製造方法



(57) Abstract: A method for manufacturing a cell mass adhesion-cultured on a cell culture substrate, the cell culture substrate having two regions (A) and (B), and the method having steps (1) to (3). (A) Island-shaped region having a cell-proliferating property and having an area of 0.001-1 mm². (B) Region that is adjacent to region (A) and that does not have a cell-proliferating property. (1) Step for preparing a cell suspension containing mesenchymal cells and ectoderm-derived cells. (2) Step for bringing the cell suspension into contact with the cell culture substrate and bringing the above two types of cells randomly into contact with region (A), the total number of the above two types of cells on the surface of contact between the cell suspension and the cell culture substrate being 100 to 100,000 per cm². (3) Step for culturing the cells adhered to region (A) and forming a cell mass including the above two types of cells.

(57) 要約: 細胞培養基材上で接着培養された細胞塊の製造方法であって、細胞培養基材は (A) 及び (B) の 2 領域と、(1) ~ (3) 工程とを有する製造方法。(A) 細胞増殖性を有し、面積 0.001 ~ 1 mm² の島状の領域 (B) (A) 領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域 (1) 間葉系細胞と外胚葉由来細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程 (2) 細胞懸濁液を細胞培養基材と接触させ、上記 2 種の細胞を (A) 領域に無作為に接着させ、細胞懸濁液と細胞培養基材との接触面における、上記 2 種の細胞の合計細胞数が、100 ~ 100000 細胞/cm² である工程 (3) (A) 領域に接着した細胞を培養し、上記 2 種の細胞を含む細胞塊を形成する工程

WO 2022/114074 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：細胞塊の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系細胞及び外胚葉由来細胞を含む2種類以上の細胞を含有する細胞塊であって、外胚葉由来細胞の含有量が多い部位と、前記細胞の含有量が少ない（間葉系細胞の含有割合が多い）部位の少なくとも2つの部位を有する細胞塊を効率的に製造可能にすると共に、安定的に輸送が可能な細胞塊の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、生体外で培養した細胞を人体に移植することによって、損傷した臓器などを再生させる試みが活発に行われている。再生医療の細胞ソースとしては、iPS細胞等の多能性幹細胞を活用する方法の他に、器官原基と呼ばれる上皮系細胞と間葉系細胞から作製した細胞塊を移植する方法が報告されている。

器官原基の製造方法として、上皮系細胞の細胞塊と、間葉系細胞の細胞塊の2種類の細胞塊をコラーゲンゲル内で隣接するように配置する方法が報告されている（例えば、特許文献1参照。）。しかしながら、この方法では器官原基を1つずつゲル内に個別に作製する必要があり、器官原基の量産性に乏しいという問題があった。

[0003] 器官原基を作製する別の方法として、細胞が接着しないU底形状の細胞培養基材を用い、上皮系細胞と間葉系細胞を混合した状態で培養することで、上皮系細胞と間葉系細胞がそれぞれ寄り集まった細胞塊を自発的に形成させる方法が知られている（例えば、特許文献2参照。）。この方法は器官原基の量産性に優れるものの、細胞塊が浮遊した状態で存在することから、培養作業中や器官原基の輸送時に、培地の揺動によって細胞塊が動きやすく、器官原基が傷つきやすいという問題があった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第5932671号公報

特許文献2：特許第6425319号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、2種類以上の細胞を含有する細胞塊であって、細胞が基材に接着した状態で外胚葉由来細胞の含有量が多い部位と、前記細胞の含有量が少ない（間葉系細胞の含有割合が多い）部位の少なくとも2つの部位を有する細胞塊を効率的に製造可能にすると共に、安定的に輸送が可能な細胞塊の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、以上の点を鑑み鋭意研究を重ねた結果、細胞接着領域がパターンニングされた細胞培養基材上で2種類以上の細胞を接着培養することによって上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

<1>細胞培養基材上で接着培養された細胞塊の製造方法であって、前記細胞培養基材は下記（A）及び（B）の2つの領域を有し、下記（1）～（3）工程を有することを特徴とする細胞塊の製造方法。

（A）細胞増殖性を有し、面積0.001～1mm²の島状の領域。

（B）前記（A）領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。

（1）間葉系細胞と外胚葉由来細胞を含有する細胞懸濁液を調製する工程。

（2）前記（1）工程で調製された細胞懸濁液を前記細胞培養基材と接触させ、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞を前記（A）領域に無作為に接着させる工程であって、前記細胞懸濁液と前記細胞培養基材との接触面における、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との合計細胞数が、単位面積当たり100～100000細胞である工程。

（3）前記（A）領域に接着した細胞を培養し、前記間葉系細胞と前記外胚

葉由来細胞とを含む細胞塊を形成する工程。

<2>前記細胞懸濁液中の、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との細胞数の比が1:10~10:1である、<1>に記載の製造方法。

<3>前記(3)工程において、前記細胞塊が、前記外胚葉由来細胞より前記間葉系細胞の含有割合が多い部位と、前記間葉系細胞より前記外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位とを含み、前記外胚葉由来細胞より前記間葉系細胞の含有割合が多い部位の基材面内方向の最大断面積と、前記間葉系細胞より前記外胚葉由来細胞の割合が多い部位の基材面内方向の最大断面積との比が、2:1~1:20であることを特徴とする<1>又は<2>に記載の細胞塊の製造方法。

<4>下記(4)工程をさらに有することを特徴とする請求項<1>~<3>のいずれかに記載の細胞塊の製造方法。

(4)前記(3)工程で形成した前記細胞塊を培養し、器官原基を形成する工程。

<5>前記器官原基にVersicanが存在していることを特徴とする、<4>に記載の細胞塊の製造方法。

<6>下記(A)及び(B)の2つの領域を有する細胞培養基材を含む、毛包原基の分化誘導キット。

(A)細胞増殖性を有し、面積0.001~1mm²の円形の領域。

(B)前記(A)領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。

<7>間葉系細胞及び上皮系細胞が増殖性を有する培地を更に含む、<6>に記載の毛包原基の分化誘導キット。

発明の効果

[0007] 本発明の細胞塊の製造方法は、間葉系細胞及び外胚葉由来細胞を含む2種類以上の細胞を含有する細胞塊であって、外胚葉由来細胞の含有量が多い部位と、前記細胞の含有量が少ない(間葉系細胞の含有割合が多い)部位の少なくとも2つの部位を有する細胞塊を効率的に製造可能にすると共に、安定的に輸送が可能な細胞塊の製造方法を提供することができる。

更に、本発明の細胞塊の製造方法は、外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位及び間葉系細胞の含有割合が多い部位を形成することにより、生体内と同じような組織構造が生まれ、製造した細胞塊が人体再生能を有する成熟状態に分化が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1]本発明の細胞塊の製造方法を示す模式図。
- [図2]実施例1の培養1日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図3]実施例1の培養6日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図4]実施例1の培養11日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図5]実施例3の培養1日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図6]実施例3の培養1日目における細胞塊の蛍光顕微鏡画像。
- [図7]実施例3の培養7日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図8]実施例3の培養7日目における細胞塊の蛍光顕微鏡画像。
- [図9]実施例4の培養7日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図10]実施例4の培養7日目における細胞塊の蛍光顕微鏡画像。
- [図11]実施例5の培養7日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。
- [図12]実施例5の培養7日目における細胞塊の蛍光顕微鏡画像。
- [図13]比較例4の培養6日目における細胞塊の位相差顕微鏡画像。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を実施するための形態（以下、単に「本実施の形態」という。）について詳細に説明する。以下の本実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明を以下の内容に限定する趣旨ではない。本発明は、その趣旨の範囲内で適宜に変形して実施できる。

[0010] 本明細書において、「細胞塊」とは、複数の細胞が集まって形成される細胞の三次元凝集塊を示す。また、「器官原基」とは、上皮系細胞と間葉系細胞から形成される細胞塊で、生体に移植することで組織や臓器の再生が可能となる細胞塊を示す。

[0011] また、本明細において、「共培養」とは、2種類以上の細胞を混合して培

養することを示す。

- [0012] また、本明細書において、「刺激応答性」とは、外部刺激によって構造が変化又は親水性／疎水性の程度が変化することを示す。ここで、本明細書において「外部刺激」とは、超音波や振動、対流等の力学的刺激、光や電気、磁気等の電磁気学的刺激、加温や冷却等の熱力学的刺激を示し、酵素反応等の生物反応によるものを除く。
- [0013] また、本明細書において、「温度応答性」とは、温度変化によって親水性／疎水性の程度が変化することを示す。さらに、親水性／疎水性の程度が変化する境界温度を「応答温度」と表記する。
- [0014] また、本明細書において、「細胞接着性」とは、細胞を培養する温度における細胞培養基材への接着しやすさを示す。「細胞接着性を有する」とは、細胞が培養温度において基材又は細胞培養基材に直接又は生体由来物質を介して接着可能であることを示す。また、「細胞接着性を有しない」とは、培養温度において細胞が基材又は細胞培養基材に接着できないことを示す。
- [0015] また、本明細書において、「細胞増殖性」とは、培養温度における細胞の増殖しやすさを示し、「細胞増殖性を有する」とは、細胞が培養温度において基材又は細胞培養基材に直接又は生体由来物質を介して接着し、さらに増殖可能であることを示す。また、「細胞増殖性を有しない」とは、培養温度において細胞が基材又は細胞培養基材に接着できないか、又は、接着はするが増殖できないことを示す。さらに、「細胞増殖性が高い」とは、同一の培養期間で比較した際により多くの細胞へと増殖することを示す。
- [0016] また、本明細書において、「生体由来物質」とは、生物の体内に存在する物質であるが、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成したものであってもよく、また、前記生体由来物質をベースとして化学的に合成した物質であっても良い。生体由来物質に特に限定はないが、例えば、生体を構成する基本材料である核酸、タンパク質、多糖や、これらの構成要素であるヌクレオチドやヌクレオシド、アミノ酸、各種の糖、あるいは脂質やビタミン、ホルモンである。

[0017] 本発明の一側面は、細胞培養基材上で接着培養された細胞塊の製造方法であって、前記細胞培養基材は下記（A）及び（B）の2つの領域を有し、下記（1）～（3）工程を有することを特徴とする細胞塊の製造方法に関する。

（A）細胞増殖性を有し、面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の島状の領域

（B）前記（A）領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域

（1）間葉系細胞と外胚葉由来細胞を含有する細胞懸濁液を調製する工程

（2）前記（1）工程で調製された細胞懸濁液を細胞培養基材と接触させ、間葉系細胞と外胚葉由来細胞を前記（A）領域に無作為に接着させる工程であって、前記細胞懸濁液と前記細胞培養基材との接触面における、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との合計細胞数が、単位面積当たり $100 \sim 100000$ 細胞である工程

（3）前記（A）領域に接着した細胞を培養し、間葉系細胞と外胚葉由来細胞とを含む細胞塊を形成する工程

[0018] 本発明で用いる細胞培養基材は、下記（A）及び（B）の2つの領域を有する。

（A）細胞増殖性を有し、面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の島状の領域。

（B）前記（A）領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。

[0019] 前記（A）領域は、細胞増殖性を有する。細胞増殖性を有することによって、本発明の細胞培養基材は細胞を培養して細胞塊を製造することができる。細胞増殖性を有しない場合、細胞を培養して細胞塊を形成することができない。

[0020] （A）領域はまた、面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の島状の領域である。面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の島状の領域であることにより、2種類以上の細胞を接着培養した際に、1種類の細胞が自発的に集合し、その含有割合が多い部位を形成できる。面積 0.001 mm^2 未満である場合、全ての（A）領域で均一に細胞を共培養することができない。また、面積 1 mm^2 を超える場合、2種類以上の細胞を共培養した際に、全ての細胞が均一に分散した細胞塊となり

、1種類の細胞が自発的に集合し、その含有割合が多い部位を有する細胞塊を製造することができない。また、器官原基等の人体再生能を有する細胞塊を形成するのに好適であることから、面積 $0.005\sim 0.5\text{ mm}^2$ が好ましく、面積 $0.01\sim 0.5\text{ mm}^2$ がさらに好ましく、面積 $0.015\sim 0.25\text{ mm}^2$ が特に好ましく、面積 $0.02\sim 0.2\text{ mm}^2$ が最も好ましい。また、毛包原基の培養においては面積 $0.001\sim 0.2\text{ mm}^2$ が好ましく、面積 $0.001\sim 0.1\text{ mm}^2$ がさらに好ましく、面積 $0.001\sim 0.05\text{ mm}^2$ が特に好ましく、面積 $0.005\sim 0.05\text{ mm}^2$ が最も好ましい。

[0021] また、均一なサイズ及び形状の細胞塊を製造するのに好適であることから、(A)領域の面積の標準偏差／平均面積が80%以下であることが好ましく、50%以下であることがさらに好ましく、20%以下であることが特に好ましく、5%以下であることが最も好ましい。前記(A)領域の形状としては特に限定はなく、目的とする細胞塊の形状に応じて適宜設定可能であるが、例えば、円や楕円、多角形、不定形の直線又は曲線からなる閉じた形状等を挙げることができる。また、球に近い形状の細胞塊を製造するのに好適であることから、円又は楕円、多角形が好ましく、円又は楕円、長方形がさらに好ましく、円又は楕円、正方形が特に好ましく、円又は楕円が最も好ましい。

[0022] 前記(B)領域は、前記(A)領域に隣接し、細胞増殖性を有しない。(A)領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域であることにより、細胞を培養した際に、(A)領域のみに細胞を増殖させることができる。(B)領域が(A)領域に隣接していないか、又は細胞増殖性を有する場合、細胞を培養した際に、(A)領域の周囲にも細胞が広がっていくため、1種類の細胞が自発的に集合し、その含有割合が多い部位を有する細胞塊を製造することができない。また、製造される細胞塊のサイズ及び形状を均一化するのに好適であることから、(B)領域が細胞増殖性だけでなく細胞接着性も有しないものであることが好ましい。

[0023] (B)領域の形状としては、(A)領域に隣接すること以外に限定はない

が、均一なサイズ及び形状の細胞塊を製造するのに好適であることから、（A）領域との境界線の20%以上の長さに（B）領域が隣接していることが好ましく、50%以上がさらに好ましく、80%以上が特に好ましく、（A）領域の周囲が全て（B）領域であることが最も好ましい。

[0024] （A）領域及び（B）領域の面積比としては、特に限定はないが、培養基材の単位面積当たりに製造可能な細胞塊の量を高めるのに好適であることから、（A）領域の面積が基材全体の10%以上であることが好ましく、30%以上がさらに好ましく、50%以上が特に好ましく、70%以上が最も好ましい。また、複数の（A）領域の間に十分な距離を設け、複数の（A）領域の細胞塊が融合して不均一な形状となることを抑制するのに好適であることから、（B）領域の面積が基材全体の20%以上であることが好ましく、40%以上がさらに好ましく、60%以上が特に好ましく、80%以上が最も好ましい。

[0025] 本発明で用いる細胞培養基材は、均一サイズの細胞塊を形成するのに好適であることから、親水性高分子による層を表面に含有し、（A）領域がプラズマ処理、紫外線処理、コロナ放電処理のいずれか、またはこれらの組み合わせによって前記親水性高分子による層の一部を分解又は改質した領域であることが好ましい。細胞培養基材が親水性高分子による層を表面に有することにより、（B）領域における基材-細胞間接着に寄与するタンパク質の吸着を抑制し、細胞接着性又は細胞増殖性を有しない領域とすることができる。また、親水性高分子による層の一部が分解又は改質されていることで、（A）領域に細胞接着性又は細胞増殖性を付与することができる。また、前記（A）領域の細胞接着性及び細胞増殖性を高め、短時間で細胞塊を形成するのに好適のため、（A）領域がプラズマ処理領域であることがさらに好ましい。

[0026] また、本発明で用いる細胞培養基材の別の作製方法としては、フォトリソグラフィ法やインクジェット法、スクリーン印刷法等により、細胞培養基材上の一部の領域のみに細胞接着性を促進又は阻害する物質を被覆する方法

を挙げることができる。

[0027] 前記親水性高分子による層の層厚は、(B)領域を細胞接着性又は細胞増殖性を有しない領域とするのに好適のため、10nm以上が好ましく、50nm以上がさらに好ましく、100nm以上が特に好ましく、500nm以上が最も好ましい。また、(A)領域を細胞接着性及び細胞増殖性を有する領域とするのに好適のため、層厚1000nm以下が好ましく、500nm以下がさらに好ましく、100nm以下が特に好ましく、50nm以下が最も好ましい。

[0028] 前記親水性高分子による層の形成方法としては、化学的な結合を形成させる方法、及び物理的な相互作用による方法の内、少なくとも一つを用いて行うことができる。化学的な結合を形成させる方法としては、紫外線照射、電子線照射、ガンマ線照射、プラズマ処理、コロナ処理等の反応性官能基を形成させる手法が挙げられる。また、イオンやラジカルを反応源とした有機反応による基材表面への架橋反応も可能である。物理的な相互作用による方法としては、対象とする親水性高分子との相溶性に優れたマトリクスを塗材とした、塗布、はけ塗り、ディップコーティング、スピコーティング、バーコーティング、流し塗り、スプレー塗装、ロール塗装、エアナイフコーティング、ブレードコーティング、グラビアコーティング、マイクログラビアコーティング、スロットダイコーティング等の手法を用いることが可能である。

[0029] 前記親水性高分子の種類としては特に限定はないが、ヒドロキシ基、アミノ基、ポリエチレングリコール基等の極性基を有するもの、ベタイン構造、ホスホリルコリン基等の両性イオン構造を有するものが挙げられる。(B)領域を細胞接着性及び細胞増殖性を有しない領域とするのに好適のため、ヒドロキシ基、ホスホリルコリン基、又はポリエチレングリコール基が好ましく、ヒドロキシ基又はホスホリルコリン基がさらに好ましく、ホスホリルコリン基が特に好ましい。市販品としては例えば、BIOSURFINE-AWP(東洋合成(株)製)、Lipidure-CM5206(日油(株))

製)等を好適に用いることができる。

[0030] 前記親水性高分子は、細胞培養基材から親水性高分子が溶出するのを抑制し、細胞凝集体や細胞塊に高分子が混入することによる品質への影響を抑制するのに好適であることから、親水性の単量体単位と疎水性／反応性の単量体単位の両方を有するランダム共重合体又はブロック共重合体であることが好ましく、親水性の単量体単位と疎水性／反応性の単量体単位の両方を有するランダム共重合体であることがさらに好ましい。また、前記共重合体の組成比としては、(B)領域を細胞接着性及び細胞増殖性を有しない領域とするのに好適のため、親水性の単量体単位が30wt%以上であることが好ましく、40wt%以上がさらに好ましく、50wt%以上が特に好ましく、60wt%以上が最も好ましい。さらに、親水性高分子が溶出するのを抑制するのに好適のため、親水性の単量体単位が80wt%以下であることが好ましく、50wt%以下がさらに好ましく、30wt%以下が特に好ましく、10wt%以下が最も好ましい。

[0031] 前記親水性の単量体単位としては、親水性であること以外に特に限定はないが、例えば、2-ジメチルアミノエチルアクリレート、2-ジメチルアミノエチルメタクリレート、2-ジエチルアミノエチルアクリレート、2-ジエチルアミノエチルメタクリレート、N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]アクリルアミド等のアミノ基を有するもの；N-(3-スルホプロピル)-N-メタクロイルオキシエチル-N、N-ジメチルアンモニウムベタイン、N-メタクリロイルオキシエチル-N、N-ジメチルアンモニウム- α -N-メチルカルボキシベタイン等のベタインを有するもの；ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、N-(2-ヒドロキシエチル)アクリルアミド、ポリエチレングリコールモノアクリレート、ポリエチレングリコールモノメタクリレート、ポリプロピレングリコールモノアクリレート、ポリプロピレングリコールモノメタクリレート、メトキシポリエチレングリコールモノアクリレート、メトキシポリエチレングリコールモノメタクリレート、ジエチレングリコールモノメチルエーテルアクリレー

ト、ジエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレート、ジエチレングリコールモノエチルエーテルアクリレート、ジエチレングリコールモノエチルエーテルメタクリレート、2-メトキシエチルアクリレート、2-メトキシエチルメタクリレート、2-エトキシエチルアクリレート、2-エトキシエチルメタクリレート、3-ブトキシエチルアクリレート、3-ブトキシエチルメタクリレート、3-ブトキシエチルアクリルアミド、フルフリルアクリレート、フルフリルメタクリレート、テトラヒドロフルフリルアクリレート、テトラヒドロフルフリルメタクリレート等のポリエチレングリコール基、メトキシエチル基を有するもの；メトキシメチルアクリレート、メトキシメチルメタクリレート、2-エトキシメチルアクリレート、2-エトキシメチルメタクリレート、3-ブトキシメチルアクリレート、3-ブトキシメチルメタクリレート、3-ブトキシメチルアクリルアミド等のアクリレート基を有するもの；2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルホスホリルコリン、4-(メタ)アクリロイルオキシブチルホスホリルコリン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-(メタ)アクリロイルオキシデシルホスホリルコリン、 ω -(メタ)アクリロイル(ポリ)オキシエチレンホスホリルコリン、2-アクリルアミドエチルホスホリルコリン、3-アクリルアミドプロピルホスホリルコリン、4-アクリルアミドブチルホスホリルコリン、6-アクリルアミドヘキシルホスホリルコリン、10-アクリルアミドデシルホスホリルコリン、 ω -(メタ)アクリルアミド(ポリ)オキシエチレンホスホリルコリン等のホスホリルコリン基を有するものを挙げることができる。

[0032] 前記疎水性の単量体単位としては、疎水性であること以外に特に限定はないが、例えば、*n*-ブチルアクリレート、*n*-ブチルメタクリレート、イソブチルアクリレート、イソブチルメタクリレート、*t*-ブチルアクリレート、*t*-ブチルメタクリレート、*n*-ヘキシルアクリレート、*n*-ヘキシルメタクリレート、*n*-オクチルアクリレート、*n*-オクチルメタクリレート、

n-デシルアクリレート、n-デシルメタクリレート、n-ドデシルアクリレート、n-ドデシルメタクリレート、n-テトラデシルアクリレート、n-テトラデシルメタクリレート等を挙げることができる。前記反応性の単量体単位としては、短時間の処理で親水性高分子を基材に固定化することが可能であることからUV反応性を有する単量体単位が好ましく、例えば、4-アジドフェニルアクリレート、4-アジドフェニルメタクリレート、2-((4-アジドベンゾイル)オキシ)エチルアクリレート、2-((4-アジドベンゾイル)オキシ)エチルメタクリレート等を挙げることができる。

[0033] 本発明で用いる細胞培養基材はまた、刺激応答性を有していてもよい。細胞培養基材が刺激応答性を有することにより、外部刺激により細胞塊を細胞培養基材から剥離することができ、細胞へのダメージを抑制しつつ細胞を回収可能である。前記刺激応答性としては、外部刺激によって細胞塊を剥離可能であれば特に限定はないが、温度応答性、光応答性、pH応答性、磁気応答性、電場応答性、力学的刺激応答性を挙げることができ、温度応答性、光応答性、pH応答性、力学的刺激応答性のいずれか、又はこれらの複数の組み合わせであることが好ましく、温度応答性、光応答性、力学的刺激応答性のいずれか、又はこれらの複数の組み合わせであることがさらに好ましく、温度応答性、力学的刺激応答性のいずれか、又はこれらの複数の組み合わせであることが特に好ましく、温度応答性が最も好ましい。

[0034] また、細胞培養基材上で細胞を培養する際に、体温に近い温度で細胞を培養可能であることから、前記温度応答性としては、特に限定はないが応答温度50℃以下が好ましく、35℃以下がさらに好ましく、また、培養中に培地交換等の作業を行う際に細胞が剥離してしまうことを抑制するのに好適であることから、25℃以下が特に好ましく、15℃以下が最も好ましい。さらに、細胞にダメージを与えない温度での冷却操作によって細胞塊を形成することが可能であることから、応答温度の下限値は0℃以上が好ましく、1℃以上がさらに好ましく、3℃以上が特に好ましく、4℃以上が最も好ましい。前記温度応答性を細胞培養基材に付与する方法としては、細胞培養基材

の量産性に優れることから、温度応答性高分子による層を基材表面に設ける方法が好ましい。高分子の種類としては特に限定はないが、基材に疎水性相互作用等の物理的作用によって固定化されたブロック共重合体、アジド基等の反応性基を介して基材に固定化された共重合体、モノマーを基材に塗布して基材上で電子線重合又はラジカル重合を行うことにより基材上に固定化された重合体等を好適に用いることができる。

[0035] 前記温度応答性高分子の種類に特に限定はないが、温度応答性を付与するための単量体単位としては例えば、アクリルアミド、メタクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物；N，N-ジエチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N-シクロプロピルメタクリルアミド、N-t-ブチルアクリルアミド、N-エトキシエチルアクリルアミド、N-エトキシエチルメタクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド等のN-アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体；N，N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N，N-エチルメチルアクリルアミド、N，N-ジエチルアクリルアミド等のN，N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体；1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等の環状基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体；メチルビニルエーテル等のビニルエーテル；N-プロリンメチルエステルアクリルアミド等のプロリン誘導体を挙げることができ、応答温度を0~50℃とするのに好適であることから、N，N-ジエチルアクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-

エトキシエチルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミドが好ましく、N-n-プロピルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドがさらに好ましく、N-イソプロピルアクリルアミドが特に好ましい。また、培養操作における培地交換の際に室温の培地を用いる場合においては、ブロック共重合体の応答温度を室温よりも低い温度とするのに好適であることから、N-n-プロピルアクリルアミド、N-プロリンメチルエステルアクリルアミドが好ましい。

[0036] 本発明において、温度応答性高分子に含まれる温度応答性の構成単位比率は、細胞塊から細胞塊を形成する工程を迅速に行うのに好適であることから、70wt%以上が好ましく、80wt%以上がさらに好ましく、90wt%以上が特に好ましく、92wt%以上が最も好ましい。

[0037] 前記温度応答性高分子としては、細胞培養基材から温度応答性高分子が溶出するのを抑制し、細胞凝集体や細胞塊に高分子が混入することによる品質への影響を抑制するのに好適であることから、温度応答性の単量体単位と疎水性の単量体単位の両方を有するランダム共重合体又はブロック共重合体であることが好ましく、親水性の単量体単位と疎水性の単量体単位の両方を有するブロック共重合体であることがさらに好ましい。疎水性の単量体単位は前述の親水性高分子の場合と同じものを好適に用いることができる。

[0038] 本発明において、温度応答性高分子はまた、応答温度を制御するための単量体単位を含んでいてもよい。例えば、親水性又は疎水性の単量体単位を挙げることができ、特に限定はないが例えば、2-ジメチルアミノエチルアクリレート、2-ジメチルアミノエチルメタクリレート、2-ジエチルアミノエチルアクリレート、2-ジエチルアミノエチルメタクリレート、N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]アクリルアミド等のアミノ基を有するもの；N-(3-スルホプロピル)-N-メタクロイルオキシエチル-N、N-ジメチルアンモニウムベタイン、N-メタクロイルオキシエチル-N、N-ジメチルアンモニウム- α -N-メチルカルボキシベタイン等のベタイン

を有するもの；ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、N-(2-ヒドロキシエチル)アクリルアミド、ポリエチレングリコールモノアクリレート、ポリエチレングリコールモノメタクリレート、ポリプロピレングリコールモノアクリレート、ポリプロピレングリコールモノメタクリレート、メトキシポリエチレングリコールモノアクリレート、メトキシポリエチレングリコールモノメタクリレート、ジエチレングリコールモノメチルエーテルアクリレート、ジエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレート、ジエチレングリコールモノエチルエーテルアクリレート、ジエチレングリコールモノエチルエーテルメタクリレート、2-メトキシエチルアクリレート、2-メトキシエチルメタクリレート、2-エトキシエチルアクリレート、2-エトキシエチルメタクリレート、3-ブトキシエチルアクリレート、3-ブトキシエチルメタクリレート、3-ブトキシエチルアクリルアミド、フルフリルアクリレート、フルフリルメタクリレート、テトラヒドロフルフリルアクリレート、テトラヒドロフルフリルメタクリレート等のポリエチレングリコール基、メトキシエチル基を有するもの；メトキシメチルアクリレート、メトキシメチルメタクリレート、2-エトキシメチルアクリレート、2-エトキシメチルメタクリレート、3-ブトキシメチルアクリレート、3-ブトキシメチルメタクリレート、3-ブトキシメチルアクリルアミド等のアクリレート基を有するもの；2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルホスホリルコリン、4-(メタ)アクリロイルオキシブチルホスホリルコリン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-(メタ)アクリロイルオキシデシルホスホリルコリン、 ω -(メタ)アクリロイル(ポリ)オキシエチレンホスホリルコリン、2-アクリルアミドエチルホスホリルコリン、3-アクリルアミドプロピルホスホリルコリン、4-アクリルアミドブチルホスホリルコリン、6-アクリルアミドヘキシルホスホリルコリン、10-アクリルアミドデシルホスホリルコリン、 ω -(メタ)アクリルアミド(ポリ)オキシエ

チレンホスホリルコリン等のホスホリルコリン基を有するものを挙げることができる。

[0039] 本発明における温度応答性高分子の分子量としては特に制限はないが、温度応答性高分子の強度を高めるのに好適のため、数平均分子量で1000～100万であることが好ましく、2000～50万であることがさらに好ましく、5000～30万であることが特に好ましく、1万～20万であることが最も好ましい。

[0040] 本発明において、温度応答性高分子が細胞塊へ混入することを抑制するのに好適であることから、温度応答性高分子が含有する数平均分子量5000以下の成分が、50%以下であることが好ましく、30%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることが特に好ましく、5%以下であることが最も好ましい。また、数平均分子量10000以下の成分が、50%以下であることが好ましく、30%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることが特に好ましく、5%以下であることが最も好ましい。さらに、数平均分子量30000以下の成分が、50%以下であることが好ましく、30%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることが特に好ましく、5%以下であることが最も好ましい。さらに、数平均分子量30000以下の成分が、50%以下であることが好ましく、30%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることが特に好ましく、5%以下であることが最も好ましい。ブロック共重合体に含まれる特定分子量以下の成分の含有量は、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定することができる。

[0041] 本発明における親水性／温度応答性高分子は、必要に応じて連鎖移動剤や重合開始剤、重合禁止剤等を含んでいてもよい。連鎖移動剤としては特に制限はなく、一般に使用されるものを好適に用いることができるが、例えば、ジチオベンゾエート、トリチオカルボナート、4-シアノー4-[(ドデシルスルフォニルチオカルボニル)スルフォニル]ペンタノイックアシッド、2-シアノプロパン-2-イル N-メチル-N-(ピリジン-4-イル)カルバモジチオアート、2-プロピオン酸メチルメチル(4-ピリジニル)カルバモジチオアートを挙げることができる。また、重合開始剤としては特に制限はなく、一般に使用されるものを好適に用いることができるが、例え

ば、アゾビスイソブチロニトリル、1, 1'-アゾビス(シクロヘキサンカルボニトリル)、ジ-tert-ブチルペルオキシド、tert-ブチルヒドロペルオキシド、過酸化水素、ペルオキシ二硫酸カリウム、過酸化ベンゾイル、トリエチルボラン、ジエチル亜鉛等を挙げることができる。さらに、重合禁止剤としては特に制限はなく、一般に使用されるものを好適に用いることができるが、ヒドロキノン、p-メトキシフェノール、トリフェニルフェルダジル、2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシド、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシド等を挙げることができる。

[0042] 本発明における親水性／温度応答性高分子の合成方法としては、特に限定はないが、(株)エヌ・ティー・エス発行、“ラジカル重合ハンドブック”、p. 161~225(2010)に記載のリビングラジカル重合技術を用いることができる。

[0043] 本発明において、細胞増殖性を高めるのに好適であることから、温度応答性高分子による層の層厚が、1000nm以下を有することが好ましく、200nm以下がさらに好ましく、100nm以下が特に好ましく、50nm以下が最も好ましい。また、細胞塊から細胞塊を形成する工程を迅速に行うのに好適であることから、温度応答性高分子による層の層厚が、5nm以上を有することが好ましく、20nm以上がさらに好ましく、30nm以上が特に好ましく、35nm以上が最も好ましい。

[0044] 本発明において、細胞培養基材は、必要に応じて生体由来物質を表面に含有していてもよい。前記生体由来物質としては特に限定はないが、例えば、マトリゲル、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン等を挙げることができる。

[0045] これら生体由来物質は、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成したものであってもよく、制限酵素等で切断した断片や、これら生体由来物質をベースとした合成タンパク質あるいは合成ペプチドであっても良い。

- [0046] 本発明において、前記マトリゲルとしては、入手容易性から、市販品としては例えば、Matrigel (Corning Incorporated製) や Geltrex (Thermo Fisher Scientific製) を好適に用いることができる。
- [0047] 前記ラミニンの種類は特に限定されるものではないが、例えば、ヒトiPS細胞の表面に発現している $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに対して高活性を示すことが報告されているラミニン511、ラミニン521又はラミニン511-E8フラグメントを用いることができる。前記ラミニンは、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成したものであってもよく、また、前記ラミニンをベースとした合成タンパク質あるいは合成ペプチドであっても良い。入手容易性から、市販品としては例えば、iMatrix-511 ((株)ニッピ製) を好適に用いることができる。
- [0048] 前記ビトロネクチンは、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成したものであってもよく、また、前記ビトロネクチンをベースとした合成タンパク質あるいは合成ペプチドであっても良い。入手容易性から、市販品としては例えば、ビトロネクチン、ヒト血漿由来(和光純薬工業(株)製) やsynthemax (Corning Incorporated製)、Vitronectin (VTN-N) (Thermo Fisher Scientific製) を好適に用いることができる。
- [0049] 前記フィブロネクチンは、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成したものであってもよく、また、前記フィブロネクチンをベースとした合成タンパク質あるいは合成ペプチドであっても良い。入手容易性から、市販品としては例えば、フィブロネクチン溶液、ヒト血漿由来(和光純薬工業(株)製) やRetronectin (タカラバイオ(株)製) を好適に用いることができる。
- [0050] 前記コラーゲンの種類は特に限定されるものではないが、例えば、type Iコラーゲンやtype IVコラーゲンをを用いることができる。前記コラーゲンは、天然物であってもよく、遺伝子組み換え技術等で人工的に合成し

たものであってもよく、また、前記コラーゲンをベースとした合成ペプチドであっても良い。入手容易性から、市販品としては例えば、コラーゲンⅠ，ヒト（Corning Incorporated製）やコラーゲンⅣ，ヒト（Corning Incorporated製）を好適に用いることができる。

[0051] 本発明において、生体由来物質の変性を抑制することができ、細胞増殖性を高めることができるため、生体由来物質は共有結合ではなく非共有結合により細胞培養基材上に固定化されていることが好ましい。ここで、本発明において「非共有結合」とは、静電相互作用、水不溶性相互作用、水素結合、 π - π 相互作用、双極子-双極子相互作用、ロンドン分散力、その他のファンデルワールス相互作用等、分子間力に由来する共有結合以外の結合力を示す。生体由来物質のブロック共重合体への固定化は、単一の結合力によるものであっても、複数の組み合わせであってもよい。

[0052] 本発明において、生体由来物質の固定化方法は特に限定されるものではないが、例えば、細胞培養基材に生体由来物質の溶液を所定時間塗布することで固定化させる方法や、細胞を培養する際に培養液中に生体由来物質を添加することで生体由来物質を細胞培養基材に吸着させ固定化する方法を好適に用いることができる。

[0053] 本発明において、基材の材質は特に限定されるものではないが、通常細胞培養に用いられるガラス、ポリスチレン等の物質のみならず、一般に形態付与が可能である物質、例えば、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート等の高分子化合物や、セラミックス、金属類などを用いることができる。培養操作の容易性から、基材の材質がガラス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレン、ポリプロピレンの内少なくとも1種類を含むことが好ましく、ガラス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンの内少なくとも1種類を含むことがさらに好ましく、

可撓性を高めるのに好適であることからポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンが特に好ましい。また、後述する親水化処理によるパターンングによって細胞増殖性を付与するのに好適であることから、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレートが最も好ましい。

[0054] 基材の形状としては特に制限はなく、板、フィルムのような平面形状であってもよいし、ファイバー、多孔質粒子、多孔質膜、中空糸であってもよい。また、一般に細胞培養等に用いられる容器（ペトリ皿等の細胞培養皿、フラスコ、プレート、バッグ等）であっても差し支えない。培養操作の容易性から、板、フィルムのような平面形状、又は平膜の多孔質膜であることが好ましい。また、必要に応じて基材上に仕切り板を設ける等により、各細胞塊を区分するための構造を設けてもよい。

[0055] 本発明において、細胞塊から細胞塊を形成する工程を迅速に行うのに好適であり、さらに、大きな細胞塊を製造する場合にも、細胞塊の内部まで万遍なく栄養を行き渡らせることが可能であることから、基材が多孔質基材であり、多孔質基材の細孔径が細胞よりも小さなものであることが好ましい。また、細胞塊から細胞塊を形成する工程を迅速に行うのに好適であることから、前記細孔径が $0.01 \sim 8 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 3 \mu\text{m}$ であることがさらに好ましく、 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ であることが特に好ましく、 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ であることが最も好ましい。ここで、本発明において多孔質基材の「細孔径」とは、多孔質基材が有する細孔の、多孔質基材の面内方向に沿った直径の平均値を示し、多孔質基材のレーザー顕微鏡像や走査型電子顕微鏡像、透過型電子顕微鏡像において20点以上の細孔について該直径を測定し、平均値を求めることによって算出することができる。

[0056] 前記多孔質基材としてはまた、細胞塊から細胞塊を形成する工程を迅速に行うのに好適であることから、空隙率が $0.01 \sim 60\%$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 20\%$ がさらに好ましく、 $0.01 \sim 4\%$ が特に好ましく、 $0.01 \sim 1.5\%$ が最も好ましい。ここで、本発明において多孔質基材

の「空隙率」とは、多孔質基材の表面の一主面について、細孔部分の合計面積を基材面積で割った値で、面積割合で基材面にどの程度の空隙が存在するのかわかり、多孔質基材のレーザー顕微鏡像や走査型電子顕微鏡像、透過型電子顕微鏡像において、多孔質基材の細孔の孔径の200倍以上の長さを一辺とする正方形の領域を観察することによって測定することができる。

[0057] 本発明の細胞培養基材は、滅菌を施してあってもよい。滅菌の方法に特に限定はないが、高圧蒸気滅菌、UV滅菌、 γ 線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌等を用いることができる。ブロック共重合体の変性を抑制するのに好適であることから、高圧蒸気滅菌、UV滅菌、エチレンオキシドガス滅菌が好ましく、基材の変形を抑制するために好適であることからUV滅菌又はエチレンオキシドガス滅菌がさらに好ましく、量産性に優れることからエチレンオキシドガス滅菌が特に好ましい。

[0058] 本発明の細胞塊の製造方法で用いる細胞としては、細胞培養基材に接着可能なものであれば特に限定されるものではない。例えばチャイニーズハムスター卵巣由来CHO細胞やマウス結合組織L929、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞やヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞等の種々の株化細胞に加え、例えば生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の代謝に関与する肝実質細胞、肝非実質細胞や脂肪細胞、分化能を有する細胞として、間葉系幹細胞、骨髄細胞、Muse細胞のように種々の組織に存在する幹細胞、さらにはES細胞、iPS細胞等の分化多能性を有する幹細胞（多能性幹細胞）、それらから分化誘導した細胞等を用いることができる。器官原基を形成するのに好適であることから、上皮系細胞及び間葉系細胞を用いることが好ましい。

[0059] 本発明の細胞塊の製造方法は、下記（1）～（3）工程を有する。

（1）間葉系細胞と外胚葉由来細胞を含有する細胞懸濁液を調製する工程。

（2）前記（1）工程で調製された細胞懸濁液を細胞培養基材と接触させ、間葉系細胞と外胚葉由来細胞を（A）領域に無作為に接着させる工程であつ

て、前記細胞懸濁液と前記細胞培養基材との接触面における、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との合計細胞数が、単位面積当たり100~10000細胞である工程。

(3) 前記(A)領域に接着した細胞を培養し、間葉系細胞と外胚葉由来細胞とを含む細胞塊を形成する工程。

[0060] また、本発明の細胞塊の製造方法は、下記(4)工程を有していてもよい。

(4) 前記(3)工程で形成した細胞塊を培養し、器官原基を形成する工程。

[0061] 前記(1)工程では、間葉系細胞と外胚葉由来細胞の2種類の細胞を含有する細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液の調整方法として特に限定はなく、別々に予め培養しておいた2種類以上の細胞を酵素などにより単一細胞の状態で剥離回収し、培地中で所望の割合で混合する。2種類以上の細胞の混合比としては、1種類の細胞の含有割合が多い部位を形成するのに好適であることから、細胞数で各細胞が全て均一割合で混合された場合の細胞割合を基準として、0.5~1.5倍の範囲にあることが好ましく、0.8~1.2倍の範囲がさらに好ましく、0.9~1.1倍の範囲が特に好ましく、0.95~1.05倍の範囲が最も好ましい。細胞懸濁液中の、間葉系細胞と外胚葉由来細胞との細胞数の比は1:10~10:1であってよく、1:5~5:1であってよく、1:1が好ましい。細胞懸濁液中の、間葉系細胞と外胚葉由来細胞との細胞数の比がこれらの範囲にあると、間葉系細胞又は外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位を形成するのにより好適となる。

[0062] 前記(2)工程では、前記(1)工程で調製された細胞懸濁液を細胞培養基材と接触させ、間葉系細胞と外胚葉由来細胞を(A)領域に無作為に接着させる。ここで、細胞懸濁液と細胞培養基材との接触面における、間葉系細胞と外胚葉由来細胞との合計細胞数は、単位面積当たり100~10000細胞である。細胞を接着させることで、細胞塊が細胞培養基材に固定化されるため、培養作業や輸送時において揺動による細胞塊へのダメージを低減

することができる。細胞を接着させない場合、培養作業や輸送時において細胞塊が細胞培養基材の壁面や他の細胞塊と衝突することで傷つきやすい。十分な量の細胞を（A）領域に接着させ、1種類の細胞の含有割合が多い部位を形成しやすくするため、細胞培養基材の面積当たりの播種細胞数（細胞懸濁液と細胞培養基材との接触面における、間葉系細胞と外胚葉由来細胞との合計細胞数）としては、 1000 cells/cm^2 以上が好ましく、 3000 cells/cm^2 以上がさらに好ましく、 5000 cells/cm^2 以上が特に好ましく、 10000 cells/cm^2 以上が最も好ましい。また、細胞が浮遊状態で凝集することを抑制するため、細胞培養基材の面積当たりの播種細胞数（細胞懸濁液と細胞培養基材との接触面における、間葉系細胞と外胚葉由来細胞との合計細胞数）としては、 100000 cells/cm^2 以下が好ましく、 80000 cells/cm^2 以下がさらに好ましく、 50000 cells/cm^2 以下が特に好ましく、 20000 cells/cm^2 以下が最も好ましい。

[0063] 前記（3）工程では、前記（A）領域に接着した細胞を培養し、間葉系細胞と外胚葉由来細胞とを含む細胞塊を形成する。また、本願構成の細胞培養基材を採用することで外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位と、前記細胞の含有量が少ない（間葉系細胞の含有割合が多い）部位の少なくとも2つの部位を有する細胞塊を形成する。2種類以上の細胞を前述の面積を有する領域内で培養することで、1種類の細胞のみが自発的に集合し、1種類の細胞の含有割合が多い部位を形成することができる。

[0064] 前記（3）工程において、器官原基の形成に好適であることから、細胞塊が、間葉系細胞より外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位（単に外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位ともいう。）を含んでいてよい。また、細胞塊は、外胚葉由来細胞より間葉系細胞の含有割合が多い部位（単に間葉系細胞の含有割合が多い部位ともいう。）を更に含んでいてよい。細胞塊が間葉系細胞の含有割合が多い部位と、外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位と、を含む場合、器官原基の形成により好適であることから、間葉系細胞の含有割合

が多い部位の基材面内方向の最大断面積と、外胚葉由来細胞の割合が多い部位の基材面内方向の最大断面積との比が、2 : 1 ~ 1 : 20 であることが好ましく、2 : 1 ~ 1 : 10 がさらに好ましく、1 : 1 ~ 1 : 5 が特に好ましく、1 : 1 ~ 1 : 2 が最も好ましい。

[0065] 前記(4)工程では、前記(3)工程で形成した細胞塊を培養し、器官原基を形成する。器官原基には、毛乳頭細胞のマーカである *Versican* タンパク質が発現している。

[0066] 前記細胞塊は、前記(A)領域に接着している細胞からなる部位と、前記接着した細胞に接着している略球状の部位の少なくとも2つの部位を有し、前記略球状の部位の直径は、前記(A)領域の直径よりも小さなものであることが好ましい。細胞塊が前記形状であることにより、毛包原基等の器官原基への分化が起こりやすくなる。

[0067] 本発明で用いる培地の種類に特に制限はなく、培養する細胞に応じて適宜選択可能である。例えば、培養する細胞として間葉系細胞と上皮系細胞の2種類を用いる場合、DMEM(タカラバイオ株式会社(株)製)と角化細胞増殖培地(タカラバイオ(株)製)を1 : 1で混合した培地が好ましい。

[0068] 2種類以上の細胞(例えば間葉系細胞及び外胚葉由来細胞)を共培養した際に、1種類の細胞(例えば外胚葉由来細胞)の含有割合が多い、とは、特定の細胞のみに蛍光標識が可能な処理(免疫染色)を施した後、位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡を使用して細胞塊を観察した場合に、ある領域における細胞塊の断面中に含まれる細胞数に対する、1種類の細胞(例えば外胚葉由来細胞)の細胞数の割合が50%以上であることを意味する。2種類以上の細胞(例えば間葉系細胞及び外胚葉由来細胞)を共培養した際に、1種類の細胞(例えば外胚葉由来細胞)の含有割合が少ないとは、上記割合が50%未満であることを意味する。

[0069] 本発明の別の一側面は、下記(A)及び(B)の2つの領域を有する細胞培養基材を含む、毛包原基の分化誘導キットに関する。本キットに含まれる細胞培養基材としては、細胞塊の製造方法で使用する細胞培養基材と同じ基

材を用いることができる。

(A) 細胞増殖性を有し、面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の円形の領域。

(B) 前記(A)領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。

[0070] 毛包原基の分化誘導キットは、間葉系細胞及び上皮系細胞が増殖性を有する培地を更に含んでもよい。間葉系細胞及び上皮系細胞が増殖性を有する培地としては、細胞塊の製造方法で使用する培地（例えば、DMEM（タカラバイオ株式会社（株）製）と角化細胞増殖培地（タカラバイオ（株）製）を1：1で混合した培地）と同じ培地を用いることができる。

実施例

[0071] 以下、本発明を実施するための形態を挙げて本発明について詳細に説明するが、本発明を説明するための例示であり、本発明を以下の内容に限定する趣旨ではない。また本発明の要旨の範囲内で適宜に変更して実施することができる。なお、断りのない限り、試薬は市販品を用いた。

[実施例1]

直径35mmの親水性高分子を表面に被覆したディッシュ（住友ベークライト（株）製、商品名：Prime Surface）を直径0.2mmの円形の孔を複数有するメタルマスク（ミタニマイクロニクス（株）製）で覆い、プラズマ照射装置（（株）真空デバイス製、商品名：プラズマイオンボンバードPIB-20）を用いてメタルマスク上部からプラズマ処理（20Paガス圧下、導電電流20mA、照射時間30秒間）を行うことで、細胞接着性及び細胞増殖性の領域を有する細胞培養基材を作製した。

[0072] ポリスチレン製のフラスコで培養した間葉系細胞（骨髄由来の間葉系幹細胞）と上皮系細胞（ヒト歯肉上皮細胞）を $0.5 \times \text{TrypLE-EDTA}$ 溶液で剥離し、遠心分離して細胞をDMEM（タカラバイオ株式会社（株）製）と角化細胞増殖培地（タカラバイオ（株）製）を1：1で混合した培地に再分散させた。細胞数を計測し、間葉系細胞と上皮系細胞を1：1で混合した細胞懸濁液を作製した。

[0073] 前記パターンニングした細胞培養基材に前記細胞懸濁液を添加し、4500

cells/cm²で細胞を播種した。37°C、CO₂濃度5%の環境下で12日間培養した。位相差顕微鏡観察により、培養1日目の時点では(A)領域内で細胞が無作為に接着していたが、培養4日目の時点で上皮系細胞が集まり、上皮系細胞の割合が多い部位を有する細胞塊を形成することを確認した。また、培養11日目の時点で前記細胞塊が、前記(A)領域に接着している細胞からなる部位と、前記接着した細胞に接着している略球状の部位の少なくとも2つの部位を有していた。

[0074] 上記細胞塊を形成した細胞培養基材を振とう器にて1時間振とうさせたところ、全ての細胞が接着した状態で固定化されており、細胞塊の損傷は見られなかった。

[0075] [実施例2]

実施例1における直径0.2mmの円形の孔を複数有するメタルマスクの代わりに、直径0.5mmの円形の孔を複数有するメタルマスクを使用した。また、実施例1における細胞播種密度4500cells/cm²の代わりに、細胞播種密度15000cells/cm²で培養を実施した。培養1日目の時点では(A)領域内で細胞が無作為に接着していたが、培養6日目の時点で上皮系細胞が集まり、上皮系細胞の割合が多い部位を有する細胞塊を形成した。

[0076] 上記細胞塊を形成した細胞培養基材を振とう器にて1時間振とうさせたところ、全ての細胞が接着した状態で固定化されており、細胞塊の損傷は見られなかった。

[0077] [実施例3]

間葉系細胞としてVybrant DiO Cell-Labeling Solutionで蛍光染色したヒト毛乳頭細胞を用い、その他は実施例1と同様にして培養を実施した。

[0078] 培養した細胞を位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察し、培養1日目の時点では間葉系細胞と上皮系細胞が無作為に(A)領域に存在し、培養7日目では間葉系細胞の割合が多い部位(上皮系細胞の割合が少ない部位)と、間葉

系細胞の割合が少ない部位（上皮系細胞の割合が多い部位）とを含む細胞塊を形成していることを確認した。細胞塊を細胞培養基材の垂直方向から位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で撮像した画像を取得した。当該画像において、間葉系細胞の含有割合が多い部位（上皮系細胞の割合が少ない部位）の基材面内方向の最大断面積と、間葉系細胞の割合が少ない部位（上皮系細胞の割合が多い部位）の基材面内方向の最大断面積の比は、1：8.5であった。

[0079] [実施例4]

間葉系細胞としてヒト毛乳頭細胞を用い、その他は実施例1と同様にして培養を実施した後、Human Versican Isoform V0 Antibody (R&D SYSTEMS製) 及びDonkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher製) を用いてVersicanの蛍光染色を行った。

[0080] 培養した細胞を位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察し、培養1日目の時点では間葉系細胞と上皮系細胞が無作為に(A)領域に存在し、培養7日目では間葉系細胞の割合が多い部位（上皮系細胞の割合が少ない部位）と、間葉系細胞の割合が少ない部位（上皮系細胞の割合が多い部位）を含む細胞塊を形成していることを確認した。また、培養した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、Versicanを発現していることを確認した。細胞塊を細胞培養基材の垂直方向から位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で撮像した画像を取得した。当該画像において、間葉系細胞の含有割合が多い部位（上皮系細胞の割合が少ない部位）の基材面内方向の最大断面積と、間葉系細胞の割合が少ない部位（上皮系細胞の割合が多い部位）の基材面内方向の最大断面積の比は、1：4.9であった。

[0081] [実施例5]

実施例1における直径0.2mmの円形の孔を複数有するメタルマスクの代わりに、直径0.1mmの円形の孔を複数有するメタルマスクを使用し、

細胞接着性及び細胞増殖性の領域を有する細胞培養基材を作製した。間葉系細胞としてヒト毛乳頭細胞を用い、その他は実施例4と同様にして培養を実施した。

[0082] 培養した細胞を位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察し、培養1日目の時点では間葉系細胞と上皮系細胞が無作為に(A)領域に存在し、培養7日目では間葉系細胞の割合が多い部位(上皮系細胞の割合が少ない部位)と、間葉系細胞の割合が少ない部位(上皮系細胞の割合が多い部位)を含む細胞塊を形成していることを確認した。また、培養した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、Versicanを発現していることを確認した。細胞塊を細胞培養基材の垂直方向から位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で撮像した画像を取得した。当該画像において、間葉系細胞の含有割合が多い部位(上皮系細胞の割合が少ない部位)の基材面内方向の最大断面積と、間葉系細胞の割合が少ない部位(上皮系細胞の割合が多い部位)の基材面内方向の最大断面積の比は、1.5:1であった。

[0083] [比較例1]

実施例1における間葉系細胞を用いず、代わりに上皮系細胞のみで培養を行い、その他は実施例1と同様にして培養を行った。培養を12日間継続しても、全ての細胞が均一に分布した細胞塊のみが形成されており、1種類の細胞の割合が多い部位を有する細胞塊は形成されなかった。

[0084] [比較例2]

実施例1における上皮系細胞を用いず、代わりに間葉系細胞のみで培養を行い、その他は実施例1と同様にして培養を行った。培養を12日間継続しても、全ての細胞が均一に分布した細胞塊のみが形成されており、1種類の細胞の割合が多い部位を有する細胞塊は形成されなかった。

[0085] [比較例3]

実施例1における直径0.2mmの円形の孔を複数有するメタルマスクの代わりに、直径1.5mmの円形の孔を複数有するメタルマスクを使用した。また、実施例1における細胞播種密度4500cells/cm²の代わり

に、細胞播種密度 15000 cells/cm^2 で培養を実施した。培養を12日間継続しても、全ての細胞が均一に分布した細胞塊のみが形成されており、1種類の細胞の割合が多い部位を有する細胞塊は形成されなかった。

[0086] [比較例4]

細胞培養基材として細胞非接着のU底容器（住友ベークライト（社）製、商品名：PrimeSurface 96ウェルプレート）を用い、 2400 cells/well の細胞播種密度で、その他は実施例1と同様にして培養を実施した。培養4日目の時点で上皮系細胞が集まり、上皮系細胞の割合が多い部位を有する細胞塊を形成することを確認した。

[0087] 上記細胞塊を直径35mmの親水性高分子を表面に被覆したディッシュ（住友ベークライト（株）製、商品名：PrimeSurface）に全て回収し、細胞培養基材を振とう器にて1時間振とうさせたところ、細胞塊が損傷し、元の形状を保っていなかった。

[0088] [比較例5]

実施例1における細胞播種密度 4500 cells/cm^2 の代わりに、細胞播種密度 $150000 \text{ cells/cm}^2$ で培養を実施した。培養7日目では細胞が浮遊した状態で細胞塊を形成していた。細胞培養基材を振とう器にて1時間振とうさせたところ、細胞塊が損傷し、元の形状を保っていなかった。

[0089]

[表1]

	細胞培養基材の特性		(1)工程 間葉系細胞 :上皮系細胞 の細胞数の比	(2)工程 基材単位面積当 たりの合計細胞数 (cells/cm ²)	間葉系細胞の割合 が多い部位及び上皮 系細胞の割合が多 い部位の形成	(3)工程 間葉系細胞の含有割合が多 い部位の最大面積:間葉系 細胞の割合が少ない部位の 最大面積の比	評価 培養基材 の振とう後 の細胞塊 の様子
	(A)領域の形状	(A)領域の面積 (mm ²)					
実施例1	直径0.2mm, 円形	0.03	1:1	4500	あり	-	損傷なし
実施例2	直径0.5mm, 円形	0.20	1:1	15000	あり	-	損傷なし
実施例3	直径0.2mm, 円形	0.03	1:1	4500	あり	1:8.5	-
実施例4	直径0.2mm, 円形	0.03	1:1	4500	あり	1:4.9	-
実施例5	直径0.1mm, 円形	0.01	1:1	4500	あり	1.5:1	-
比較例1	直径0.2mm, 円形	0.03	0:1	4500	なし	-	-
比較例2	直径0.2mm, 円形	0.03	1:0	4500	なし	-	-
比較例3	直径0.15mm, 円形	7.07	1:1	4500	なし	-	-
比較例4	(A)領域なし	0	1:1	2400cells/well	あり	-	損傷あり
比較例5	直径0.2mm, 円形	0.03	1:1	150000	なし	-	損傷あり

符号の説明

- [0090] A (A) 領域
- B (B) 領域
- 1 上皮系細胞
- 2 間葉系細胞
- 3 細胞塊
- 4 上皮系細胞の含有割合が多い部位（間葉系細胞の含有割合が少ない）
と、前記細胞の含有割合が少ない部位（間葉系細胞の含有割合が多い）の少
なくとも2つの部位を有する細胞塊

請求の範囲

- [請求項1] 細胞培養基材上で接着培養された細胞塊の製造方法であって、前記細胞培養基材は下記（A）及び（B）の2つの領域を有し、下記（1）～（3）工程を有することを特徴とする細胞塊の製造方法。
- （A）細胞増殖性を有し、面積 $0.001 \sim 1 \text{ mm}^2$ の島状の領域。
- （B）前記（A）領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。
- （1）間葉系細胞と外胚葉由来細胞を含有する細胞懸濁液を調製する工程。
- （2）前記（1）工程で調製された細胞懸濁液を前記細胞培養基材と接触させ、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞を前記（A）領域に無作為に接着させる工程であって、前記細胞懸濁液と前記細胞培養基材との接触面における、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との合計細胞数が、単位面積当たり $100 \sim 100000$ 細胞である工程。
- （3）前記（A）領域に接着した細胞を培養し、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞とを含む細胞塊を形成する工程。
- [請求項2] 前記細胞懸濁液中の、前記間葉系細胞と前記外胚葉由来細胞との細胞数の比が $1 : 10 \sim 10 : 1$ である、請求項1に記載の細胞塊の製造方法。
- [請求項3] 前記（3）工程において、前記細胞塊が、前記外胚葉由来細胞より前記間葉系細胞の含有割合が多い部位と、前記間葉系細胞より前記外胚葉由来細胞の含有割合が多い部位とを含み、
- 前記外胚葉由来細胞より前記間葉系細胞の含有割合が多い部位の基材面内方向の最大断面積と、前記間葉系細胞より前記外胚葉由来細胞の割合が多い部位の基材面内方向の最大断面積との比が、 $2 : 1 \sim 1 : 20$ であることを特徴とする請求項1又は2に記載の細胞塊の製造方法。
- [請求項4] 下記（4）工程をさらに有することを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞塊の製造方法。

(4) 前記(3)工程で形成した前記細胞塊を培養し、器官原基を形成する工程。

[請求項5] 前記器官原基にVersicanが存在していることを特徴とする、請求項4に記載の細胞塊の製造方法。

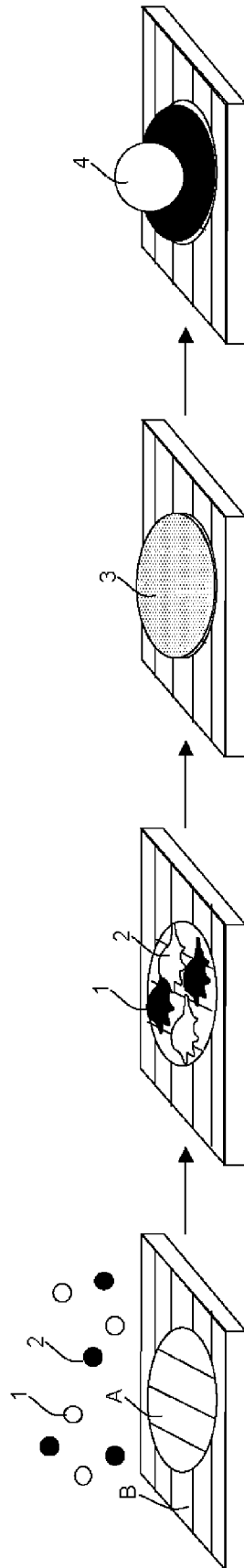
[請求項6] 下記(A)及び(B)の2つの領域を有する細胞培養基材を含む、毛包原基の分化誘導キット。

(A) 細胞増殖性を有し、面積0.001～1mm²の円形の領域。

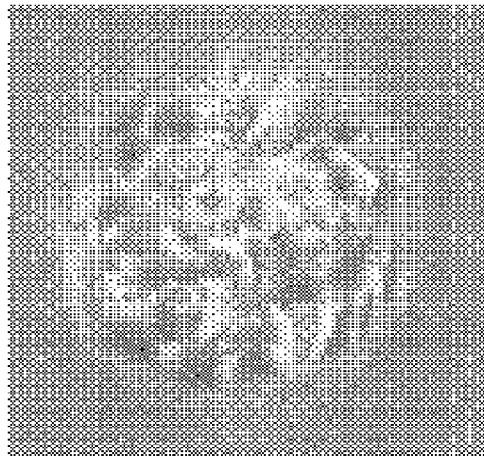
(B) 前記(A)領域に隣接し、細胞増殖性を有しない領域。

[請求項7] 間葉系細胞及び上皮系細胞が増殖性を有する培地を更に含む、請求項6に記載の毛包原基の分化誘導キット。

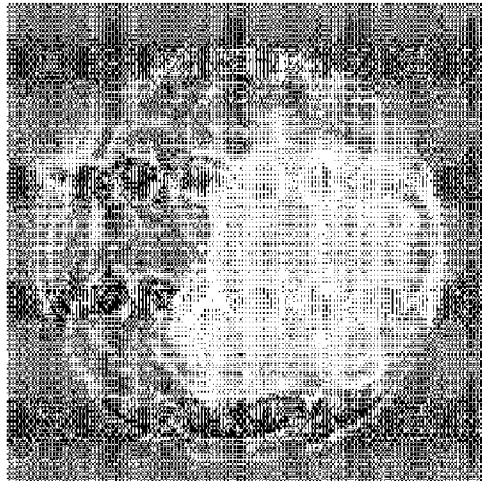
[図1]



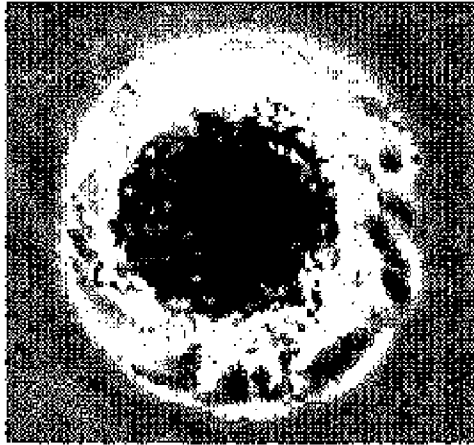
[図2]



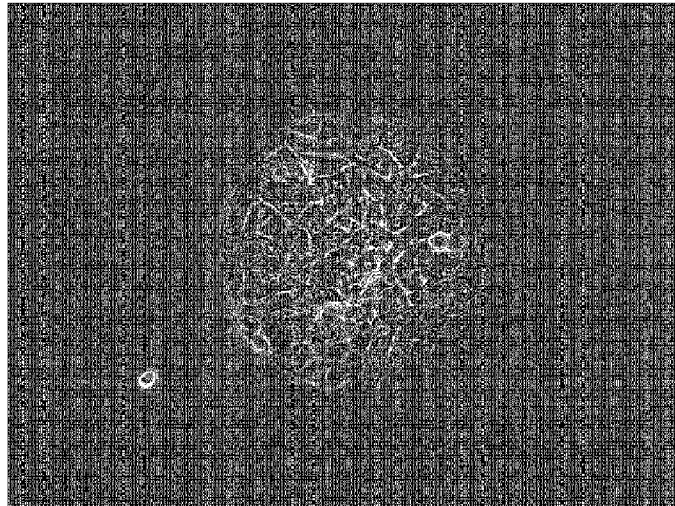
[図3]



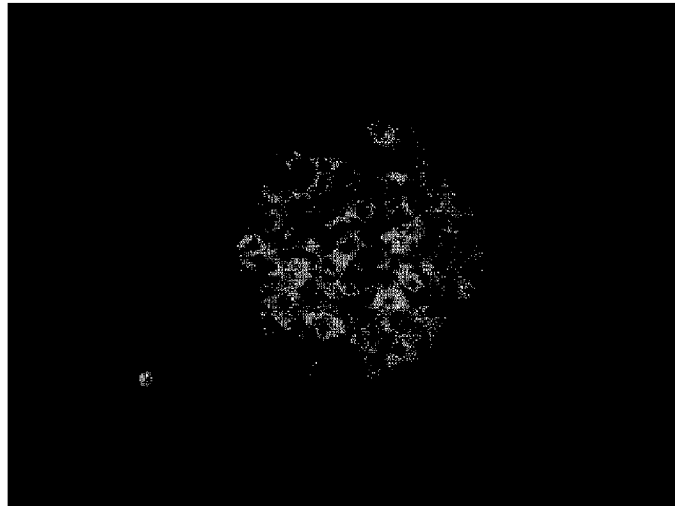
[図4]



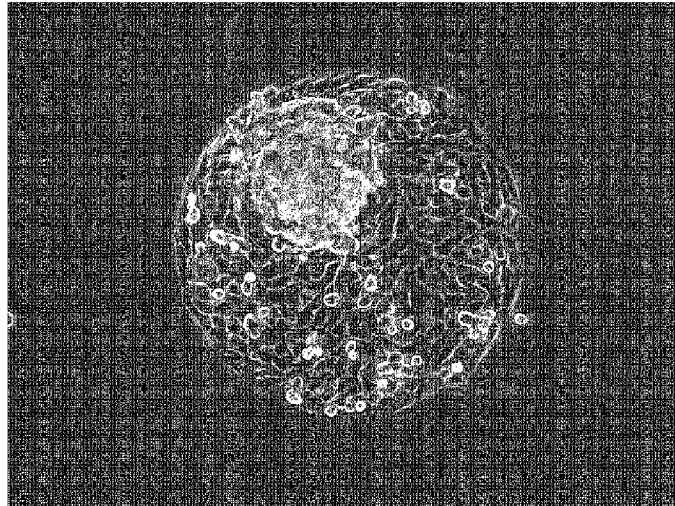
[図5]



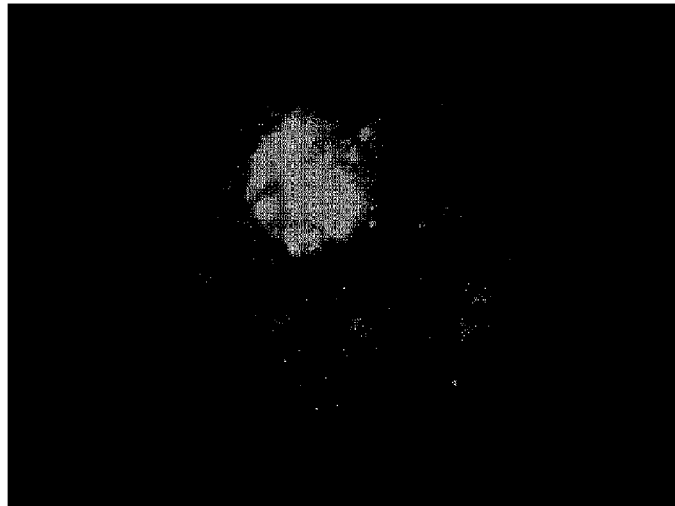
[図6]



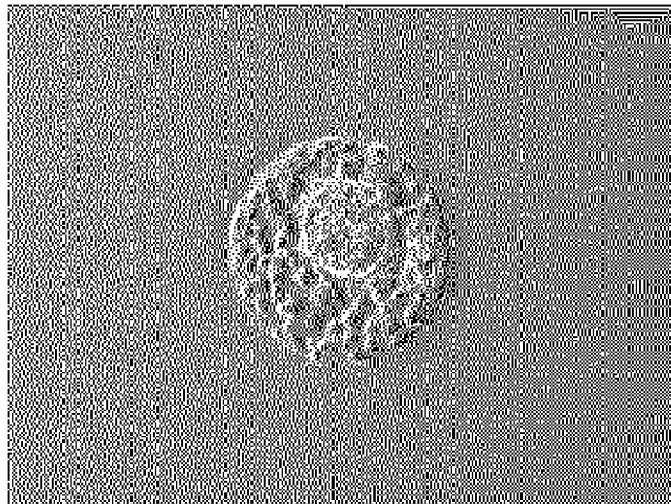
[図7]



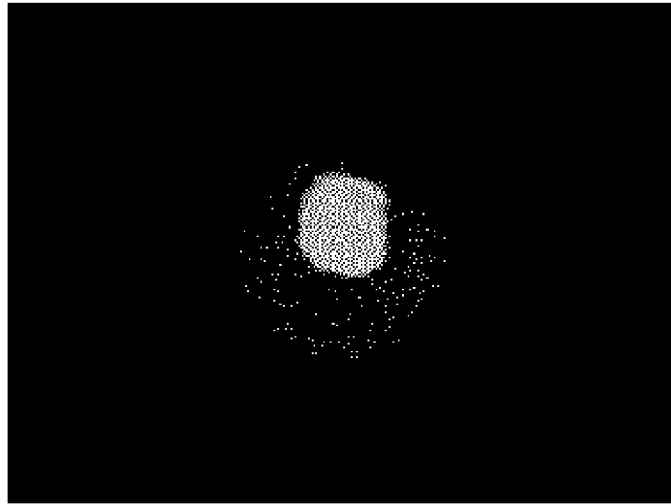
[図8]



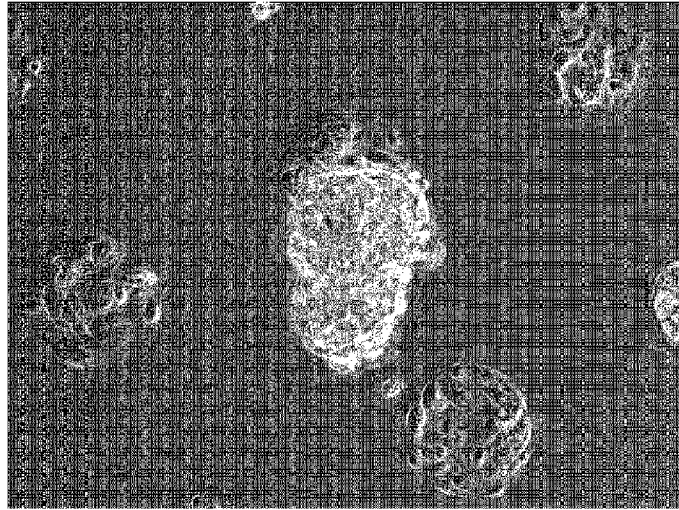
[図9]



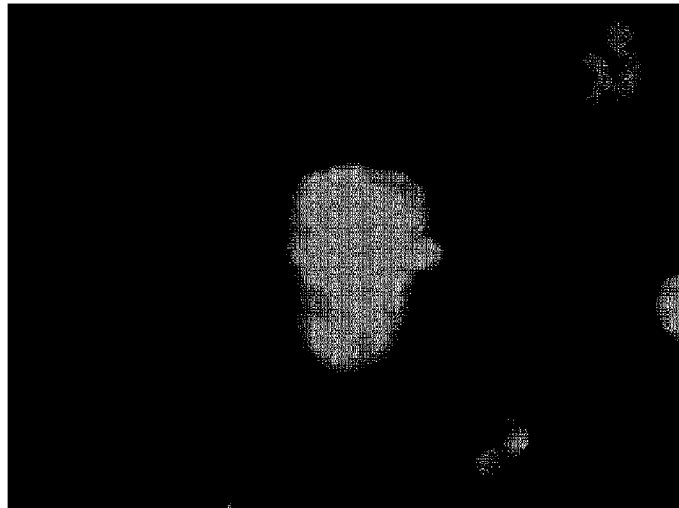
[図10]



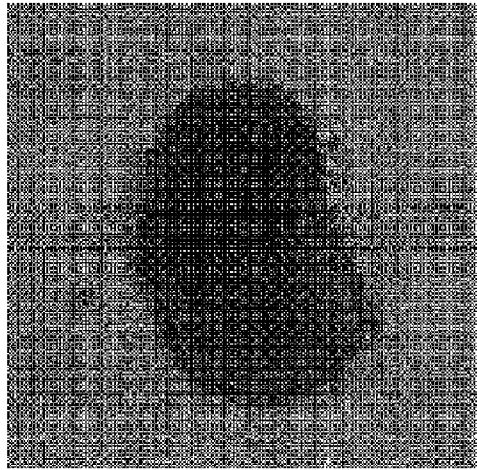
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/043257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/04</i> (2006.01)i FI: C12N5/00; C12N1/04; C12M1/00 A; C12M3/00 A		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/00; C12M1/00; C12M3/00; C12N1/04		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/080364 A1 (TOSOH CORP) 23 April 2020 (2020-04-23) claims, examples, fig. 1-5, paragraphs [0009]-[0092]	1-7
Y	JP 2015-15943 A (DAINIPPON PRINTING CO LTD, etc.) 29 January 2015 (2015-01-29) claims, examples, paragraphs [0001]-[0046]	1-7
Y	WO 2017/073625 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA NATIONAL UNIVERSITY) 04 May 2017 (2017-05-04) claims, examples	1-7
A	WO 2013/047639 A1 (PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) 04 April 2013 (2013-04-04) claims, examples	1-7
A	WO 2015/182159 A1 (KURARAY CO, etc.) 03 December 2015 (2015-12-03) claims, examples	1-7
A	JP 2019-193666 A (CORNING INC, etc.) 07 November 2019 (2019-11-07) claims, examples	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 31 January 2022		Date of mailing of the international search report 15 February 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/043257

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020/080364	A1	23 April 2020	CN	112840016	A	
JP	2015-15943	A	29 January 2015	(Family: none)			
WO	2017/073625	A1	04 May 2017	US	2019/0062687	A1	
				claims, examples			
				EP	3351621	A1	
WO	2013/047639	A1	04 April 2013	US	2014/0289877	A1	
				claims, examples			
				EP	2762558	A1	
WO	2015/182159	A1	03 December 2015	US	2017/0183621	A1	
				claims, examples			
				EP	3150704	A1	
JP	2019-193666	A	07 November 2019	US	2017/0183621	A1	
				claims, examples			
				EP	3150704	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 1/04(2006.01)i FI: C12N5/00; C12N1/04; C12M1/00 A; C12M3/00 A		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/00; C12M1/00; C12M3/00; C12N1/04 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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2020/080364 A1 (東ソー株式会社) 23.04.2020 (2020-04-23) 特許請求の範囲、実施例、図1~5、[0009] - [0092]	1-7
Y	JP 2015-15943 A (大日本印刷株式会社ほか) 29.01.2015 (2015-01-29) 特許請求の範囲、実施例、[0001] - [0046]	1-7
Y	WO 2017/073625 A1 (国立大学法人横浜国立大学) 04.05.2017 (2017-05-04) 特許請求の範囲、実施例	1-7
A	WO 2013/047639 A1 (公立大学法人横浜市立大学) 04.04.2013 (2013-04-04) 特許請求の範囲、実施例	1-7
A	WO 2015/182159 A1 (株式会社クラレほか) 03.12.2015 (2015-12-03) 特許請求の範囲、実施例	1-7
A	JP 2019-193666 A (コーニング インコーポレイテッドほか) 07.11.2019 (2019-11-07) 特許請求の範囲、実施例	1-7
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 31.01.2022	国際調査報告の発送日 15.02.2022	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 林 康子 4N 1195 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2021/043257

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/080364 A1	23.04.2020	CN 112840016 A	
JP 2015-15943 A	29.01.2015	(ファミリーなし)	
WO 2017/073625 A1	04.05.2017	US 2019/0062687 A1 Claims, Examples	
		EP 3351621 A1	
WO 2013/047639 A1	04.04.2013	US 2014/0289877 A1 Claims, Examples	
		EP 2762558 A1	
WO 2015/182159 A1	03.12.2015	US 2017/0183621 A1 Claims, Examples	
		EP 3150704 A1	
JP 2019-193666 A	07.11.2019	US 2017/0183621 A1 Claims, Examples	
		EP 3150704 A1	