

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2007 年 9 月 27 日 (27.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/108205 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 3/00 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)  
C12N 5/06 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/000217
- (22) 国際出願日: 2007 年 3 月 13 日 (13.03.2007)
- (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2006-074009 2006 年 3 月 17 日 (17.03.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三洋化成工業株式会社 (SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒川 祐人 (KUROKAWA, Masato) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三洋化成工業株式会社 Kyoto (JP). 高橋一裕 (TAKAHASHI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三洋化成工業株式会社 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 櫻井 健一 (SAKURAI, Ken-ichi); 〒5200044 滋賀県大津市京町 4 丁目 5 - 1 3 澤基第一ビルさくらい特許事務所 Shiga (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL CULTURE SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 細胞培養用担体

(57) Abstract: Disclosed is a cell culture substrate which can improve the cell-proliferation properties in a serum-free culture and has no risk of contamination of any infection factor. The cell culture carrier comprises a crosslinked poly(meth)acrylate (salt) particle (A) and an artificial polypeptide (P) having at least one cellular adhesive minimal amino acid sequence (X) in the molecule, and has a water retention value of 2 to 50 g/g. The component (A) is preferably a particle produced by performing reverse phase suspension polymerization of an aqueous monomer solution comprising (meth)acrylic acid and/or an alkali metal salt of (meth)acrylic acid. The component (P) preferably has at least one auxiliary amino acid sequence (Y) in the molecule. The sequence (X) preferably comprises a sequence Arg-Gly-Asp.

(57) 要約: 無血清培養での細胞増殖性を向上させると共に、感染因子混入の危険性のない細胞培養用担体を提供する。すなわち、本発明の特徴は、架橋ポリ(メタ)アクリル酸(塩)粒子(A)と、細胞接着性最小アミノ酸配列(X)を1分子中に少なくとも1個有する人工ポリペプチド(P)とからなり、保水量が2~50 g/gであることを要旨とする。(A)は(メタ)アクリル酸及び/又は(メタ)アクリル酸のアルカリ金属塩を含む単量体水溶液を逆相懸濁重合して製造される粒子であることが好ましい。(P)は補助アミノ酸配列(Y)を(P)の1分子中に少なくとも1個有してなることが好ましい。(X)はArg Gly Asp配列が好ましい。

WO 2007/108205 A1

## 明 細 書

### 細胞培養用担体

### 技術分野

[0001] 本発明は細胞培養用担体に関する。さらに詳しくは、無血清培養の細胞増殖性に特に効果的な細胞培養用担体に関する。

### 背景技術

[0002] 細胞培養用担体としては、動物由来のコラーゲンを有するデキストランビーズ（非特許文献1）、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を有するポリペプチドを配したポリスチレンビーズ（特許文献1）等が知られている。

[0003] 非特許文献1：Microcarrier cell culture principles & methods（ファルマシアバイオテク（株）、1996年10月10日発行）27～31頁等  
特許文献1：特開2003-189848号公報

### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、上記のビーズでは、無血清培養での細胞増殖性が不十分である。また、上記のデキストランビーズでは、動物由来成分を有するためウイルス等の感染因子の混入の危険性があるという問題がある。すなわち、本発明の目的は、無血清培養での細胞増殖性を向上させると共に、感染因子混入の危険性のない細胞培養用担体を提供することである。

#### 課題を解決するための手段

[0005] 本発明の細胞培養担体の特徴は、架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）〔以下、粒子（A）と略する場合がある。〕と、細胞接着性最小アミノ酸配列（X）を1分子中に少なくとも1個有する人工ポリペプチド（P）とからなり、保水量が2～50 g/gである点を要旨とする。

[0006] また、本発明の細胞培養用担体の製造方法の特徴は、粒子（A）と、細胞接着性最小アミノ酸配列（X）を1分子中に少なくとも1個有する人工ポリ

ペプチド（P）とを溶媒中で混合して細胞培養用担体を得る工程を含み、細胞培養用担体の保水量が2～50 g/gである点を要旨とする。

[0007] また、本発明の有用物質の生産方法は、上記の細胞培養用担体及び無血清培地を用いて、細胞を培養する工程を含む点を要旨とする。

[0008] また、本発明の組織又は臓器の生産方法は、上記の細胞培養用担体及び無血清培地を用いて、細胞を培養する工程を含む点を要旨とする。

### 発明の効果

[0009] 本発明の細胞培養担体は、優れた細胞増殖性を発揮する。また、動物由来成分を含まないため、ウイルス等の感染因子混入の危険性がない。

本発明の細胞培養用担体の製造方法によると、上記の細胞培養用担体を容易に得ることができる。

[0010] 本発明の有用物質の生産方法によると、優れた細胞増殖性を発揮するため、有用物質を大量に得ることができる。また、ウイルス等の感染因子の混入されていない有用物質を容易に得ることができる。

[0011] 本発明の組織又は臓器の生産方法によると、優れた細胞増殖性を発揮するため、目的の組織や臓器を容易に得ることができる。また、ウイルス等の感染因子の混入されていない組織や臓器を容易に得ることができる。

### 発明を実施するための最良の形態

[0012] <架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）>

（メタ）アクリル酸（塩）としては、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸塩及びメタクリル酸塩を意味する。アクリル酸塩及びメタクリル酸塩としては、アクリル酸又はメタクリル酸のアルカリ金属（リチウム、カリウム及びナトリウム等）塩、アルカリ土類金属（マグネシウム及びカルシウム等）塩及びアンモニウム塩等が用いられる。これらのうち、アルカリ金属塩が好ましく、さらに好ましくはナトリウム塩、リチウム塩及びカリウム塩、特に好ましくはナトリウム塩及びリチウム塩、最も好ましくはナトリウム塩である。

[0013] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）は、（メタ）アクリル酸（

塩)を主構成単位としてなるものであれば、(メタ)アクリル酸(塩)と共重合可能なその他のビニルモノマーとを共重合することができる。共重合可能なその他のビニルモノマーとしては、共重合性単量体(親水性ビニルモノマー及び疎水性ビニルモノマー)及び架橋性単量体等が含まれる。

[0014] 共重合性単量体及び架橋性単量体としては、公知のもの〔特開平11-5808号公報(対応米国特許;第5,998,553号:これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。)、特開2001-2935号公報、特開2003-165883号公報、特開2005-247931号公報、特開2005-186015号公報等〕が使用できる。

[0015] 共重合性単量体を使用する場合、共重合性単量体単位の含有量(重量%)は、(メタ)アクリル酸(塩)単位の重量に基づいて、0.001~10が好ましく、さらに好ましくは0.01~7、特に好ましくは0.03~5、最も好ましくは0.05~3である。細胞増殖性の観点等から、共重合性単量体単位を含まないことが好ましい。

[0016] 架橋性単量体のうち、細胞増殖性の観点等から、エチレン性不飽和基を2個以上有する架橋性単量体及び反応性官能基を2個以上有する架橋性単量体が好ましく、さらに好ましくは反応性官能基を2個以上有する架橋性単量体であり、特に好ましくはポリエチレンイミン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、グリセリン(ジ又はトリ)グリシジルエーテル、最も好ましくはエチレングリコールジグリシジルエーテルである。

[0017] 架橋性単量体を使用する場合、架橋性単量体単位の含有量(重量%)は、(メタ)アクリル酸(塩)単位の重量に基づいて、0.001~50が好ましく、さらに好ましくは0.005~15、特に好ましくは0.02~5、最も好ましくは0.1~2である。この範囲であると、細胞増殖性がさらに向上する。

[0018] 粒子(A)は、疎水性有機溶媒に、攪拌下、(メタ)アクリル酸(塩)、並びに必要により、共重合可能なその他のビニルモノマー、重合開始剤、連

鎖移動剤及び／又はグラフト基材を連続的に供給して、公知の逆相懸濁重合させる方法〔特開平１１－５８０８号公報（対応米国特許；第５，９９８，５５３号：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）、特開２００１－２９３５号公報、２００３－１６５８８３号公報、特開２００５－２４７９３１号公報及び特開２００５－１８６０１５号公報等〕；（メタ）アクリル酸（塩）、並びに必要により、共重合可能なその他のビニルモノマー、重合開始剤、連鎖移動剤及び／又はグラフト基材を、公知の水溶液重合させる方法〔特開２００５－０７５９８２号公報、特開２００５－０９５７５９号公報（対応米国特許出願；US 2006/0282052 A1：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）、特開２００５－０９７５６９号公報、特開２００５－１８６０１５号公報及び特開２００５－１８６０１６号公報等〕等により製造することができる。

[0019] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（Ａ）は、必要に応じて、表面架橋剤により表面架橋処理を行うことができる。架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子の表面近傍を表面架橋剤で架橋処理することは、細胞増殖性の観点等で好適である。

[0020] 表面架橋剤としては、例えば、特開昭５９－１８９１０３号公報等に記載の多価グリシジル（エチレングリコールジグリシジルエーテル及びグリセリンジグリシジルエーテル等が好ましい。）、特開昭５８－１８０２３３号公報（対応米国特許；第４，６６６，９８３号：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）及び特開昭６１－１６９０３号公報（対応米国特許；第４，７３４，４７８号：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）等に記載の多価アルコール、多価アミン、多価アジリジン及び多価イソシアネート、特開昭６１－２１１３０５号公報（対応米国特許；第４，７５５，５６０号：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）及び特開昭６１－２５２２１２号公報等に記載のシランカップリング剤、並びに特開昭５１－１３６５８８号公報（対応米国特許；第４，０４３，９５２号：これに開示された開示内容を参照により本出願

に取り込む。) 及び特開昭 6 1 - 2 5 7 2 3 5 号公報等に記載の多価金属等が挙げられる。これらの表面架橋剤のうち、カルボキシル(塩)基と強い共有結合を形成して耐熱性に優れるという観点から、多価グリシジル、多価アミン及びシランカップリング剤が好ましく、さらに好ましくは多価グリシジル及びシランカップリング剤、特に好ましくは多価グリシジルである。

[0021] 表面架橋処理をする場合、表面架橋剤の量(重量%)は、表面架橋剤の種類、架橋させる条件等により種々変化するが、表面架橋処理前の架橋ポリ(メタ)アクリル酸(塩)の重量に基づいて、0.002~8が好ましく、さらに好ましくは0.01~4、特に好ましくは0.05~2、最も好ましくは0.05~1である。

[0022] 表面架橋処理を行う方法としては、従来公知の方法が適用できる(たとえば、特開平 1 1 - 5 8 0 8 号公報(対応米国特許; 第 5, 9 9 8, 5 5 3 号: これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。)、特開 2 0 0 1 - 2 9 3 5 号公報、特開 2 0 0 3 - 1 6 5 8 8 3 号公報、特開 2 0 0 5 - 2 4 7 9 3 1 号公報及び特開 2 0 0 5 - 1 8 6 0 1 5 号公報)。

[0023] 粒子(A)は、必要により乾燥処理、粉碎処理及び/又は分級処理される。乾燥処理する方法は特に限定されず、50~230℃の温度の熱風で乾燥する方法、50~230℃に加熱されたドラムドライヤー等の使用による薄膜乾燥法、(加熱)減圧乾燥法、凍結乾燥法及び赤外線による乾燥法等が使用できる。粉碎処理する方法は特に限定されず、通常の装置(ハンマー式粉碎机、衝撃式粉碎机、ロール式粉碎机及びジェット気流式粉碎机等)を用いて粉碎できる。また分級処理する方法も特に限定されず、通常の装置(乾式振動篩い機、湿式振動篩い機及び風力分球機等)を用いて分級できる。

[0024] 粒子(A)の外形状は、球状、針状、扁平(楕円)状(紡錘状)、薄片状、ブドウ房状、不定形破碎状及び繊維状のいずれでもよいが、細胞増殖性の観点等から、球状及び扁平(楕円)状(紡錘状)が好ましく、さらに好ましくは球状である。すなわち、粒子(A)の好ましい形態は、ビーズである。

[0025] 粒子(A)を生理食塩水で膨潤させて得た膨潤粒子の体積平均粒子径( $\mu$

m) は、細胞増殖性の観点等から、10～2000が好ましく、さらに好ましくは25～1000、特に好ましくは50～500、最も好ましくは100～300である。

[0026] なお、膨潤粒子の体積平均粒子径は、粒子(A) 1重量部を生理食塩水(0.9重量%) 100重量部中に、25℃で60分間浸漬させることにより調製される膨潤粒子を、JIS Z8825-1:2001 {対応国際規格; ISO13320-1:1999" Particle size analysis-Laser diffraction methods-Part1: General principles": これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。} に準拠して、レーザー式粒度分布測定装置(例えば、堀場製作所製LA-920、分散媒: 生理食塩水、測定温度: 25℃) により測定できる。

[0027] 粒子(A) の生理食塩水に対する保水量(g/g) (以下、保水量) は、細胞増殖性の観点等から、2～50が好ましく、さらに好ましくは5～40、特に好ましくは10～30であり、最も好ましくは10～25である。

[0028] なお、保水量は、次の方法により測定される。生理食塩水約100mLを入れたビーカーに、攪拌しながら乾燥した架橋ポリ(メタ)アクリル酸(塩)粒子1.0gを投入してあらかじめ膨潤させて膨潤粒子を得た後、目開き53μmのナイロン網で作製したティーバッグ(縦20cm、横10cm)に移し、過剰の生理食塩水中に60分間浸漬する。次いで、膨潤粒子をティーバッグごと遠心脱水機に入れて、150Gで90秒間遠心脱水を行い、余剰水を取り除く。遠心脱水後の重量(g2)を測定し、次式から算出した値を保水量とする(参考: JIS K7223-1996)。なお、乾燥した架橋ポリ(メタ)アクリル酸(塩)粒子は、未乾燥粒子を120℃、0.1kPa以下の条件で1時間乾燥して得る。

$$(\text{保水量}) = (g2) - 1.0$$

[0029] 粒子(A) としては、市場から容易に入手でき、アクアパールシリーズ{サンダイヤポリマー(株)}、サンフレッシュシリーズ{三洋化成工業(株)}、アクアキープシリーズ{住友精化(株)}、アロンザップシリーズ(

東亜合成（株））及びアクアリックシリーズ（（株）日本触媒）等が挙げられる。これらのうち、アクアパールシリーズ及びアクアキープシリーズが好ましく、さらに好ましくはアクアパールシリーズである。なお、“アクアパール”、“サンフレッシュ”、“アクアキープ”、“アロンザップ”及び“アクアリック”は、日本国における登録商標である（この中のいくつかの商標は、米国、中国等において、対応する英語表記が商標登録されている。）

。

[0030] <人工ポリペプチド（P）>

「細胞接着性」とは、特定の最小アミノ酸配列が細胞のインテグリンレセプターに認識され、細胞が基材に接着しやすくなる性質を意味する（大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年）。

[0031] 細胞接着性最小アミノ酸配列（X）としては、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」や「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されているもの等が用いられる。

[0032] これらの最小アミノ酸配列（X）の中で、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Leu Arg Glu配列、His Ala Val配列、Arg Glu Asp Val配列（1）、Tyr Ile Gly Ser Arg配列（2）、Pro Asp Ser Gly Arg配列（3）、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列（4）、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列（5）、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列（6）、Ile Lys Val Ala Val配列（7）、Asp Gly Glu Ala 配列（8）、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列（9）、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys配列（10）、Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列（11）、Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys配列（12）、Asn Arg Trp His Ser Ile Tyr Ile Thr Arg Phe Gly配列（13）、Thr Trp Tyr Lys Ile Ala Phe Gln Arg Asn Arg Lys配列（14）、Arg Lys Arg Leu Gln Val Gln Leu Ser Ile Arg Thr（15）及びPro His Ser Arg Asn（16）からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく、細胞接着性の観点等から

、さらに好ましくはArg Gly Asp配列、Tyr Ile Gly Ser Arg配列（２）、Ile Lys Val Ala Val配列（７）、Arg Lys Arg Leu Gln Val Gln Leu Ser Ile Arg Thr（１５）及びPro His Ser Arg Asn（１６）からなる群より選ばれる少なくとも１種、特に好ましくはArg Gly Asp配列である。

[0033] これらの最小アミノ酸配列（X）の両端には、他のアミノ酸 {アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、システイン（Cys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）、プロリン（Pro）、トリプトファン（Trp）、アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）、アルギニン（Arg）、リジン（Lys）及びヒスチジン（His）等} を含んでもよい。

[0034] 人工ポリペプチド（P）は、最小アミノ酸配列（X）を１分子中に少なくとも１個有すればよいが、細胞接着性の観点等から、１分子中に１～５０個有するものが好ましく、さらに好ましくは２～５０個、つぎに好ましくは３～３０個、特に好ましくは４～２０個有するもの、最も好ましくは５～１５個有するものである。なお、２種以上の最小アミノ酸配列（X）が一分子中に含まれてもよい。

[0035] 人工ポリペプチド（P）は、最小アミノ酸配列（X）以外に、人工ポリペプチド（P）の熱安定性向上の観点等から、補助アミノ酸配列（Y）を有することが好ましい。

[0036] 補助アミノ酸配列（Y）としては、最小アミノ酸配列（X）以外のアミノ酸配列が使用でき、人工ポリペプチド（P）の熱安定性の観点等から、Gly及び／又はAlaを有する配列が好ましい。補助アミノ酸配列（Y）としては、（Gly Ala）a配列、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）b配列、（Gly Ala Gly Ala Gly Tyr）c配列、（Gly Ala Gly Val Gly Tyr）d配列、（Gly Ala Gly Tyr Gly Val）e配列、{Asp Gly Gly（Ala）f Gly Gly Ala} g配列、（Gly Val Pro Gly Val）h配列、（Gly）i配列、（Ala）j配列、（Gly Gly Ala）k配列、（Gly Val Gly Val Pro）m配列、（Gly Pro Pro）n配列、（Gly Ala Gln

Gly Pro Ala Gly Pro Gly) o配列、(Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln) p配列及び／又は(Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro) q配列を有する配列等が含まれる。これらのうち、(Gly Ala) a配列、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b配列、(Gly Ala Gly Ala Gly Tyr) c配列、(Gly Ala Gly Val Gly Tyr) d配列、(Gly Ala Gly Tyr Gly Val) e、{Asp Gly Gly (Ala)f Gly Gly Ala} g配列、(Gly Val Pro Gly Val) h配列、(Gly Val Gly Val Pro) m配列及び／又は(Gly Pro Pro) n配列を有するものが好ましく、さらに好ましくは(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b配列、(Gly Val Pro Gly Val) h配列、(Gly Val Gly Val Pro) m配列及び／又は(Gly Pro Pro) n配列を有するもの、特に好ましくは(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b配列を有するものである。

[0037] なお、aは5～100の整数、bは1～33の整数、c、d及びeは2～33の整数、fは1～194の整数、gは{1}～{200/(6+f)}の小数点以下を切り捨てた整数、hは2～40の整数、i及びjは10～200の整数、kは3～66の整数、mは2～40の整数、nは3～66の整数、oは1～22の整数、p及びqは1～13の整数である。

[0038] 補助アミノ酸配列(Y)は、グリシン(Gly)及び／又はアラニン(Ala)を含むことが好ましい。グリシン(Gly)及びアラニン(Ala)を含む場合、これらの合計含有割合(%)は、補助アミノ酸配列(Y)の全アミノ酸個数に基づいて、10～100が好ましく、さらに好ましくは20～95、特に好ましくは30～90、最も好ましくは40～85である。この範囲であると、熱安定性がさらに良好となる。

[0039] グリシン(Gly)及びアラニン(Ala)の両方を含む場合、これらの含有個数割合(Gly/Ala)は、0.03～40が好ましく、さらに好ましくは0.08～13、特に好ましくは0.2～5である。この範囲であると、熱安定性がさらに良好となる。

[0040] 補助アミノ酸配列(Y)には、以上の例示の他に、他のアミノ酸{アラニン(Ala)、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、バリン

(Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、プロリン (Pro)、トリプトファン (Trp)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、アルギニン (Arg)、リジン (Lys) 及びヒスチジン (His) 等] を含んでいてもよい。

[0041] (Gly Ala) a配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (17) ~ (19) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (20) ~ (22) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Ala Gly Tyr) c配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (23) ~ (25) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Val Gly Tyr) d配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (26) ~ (28) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Tyr Gly Val) e配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (29) ~ (31) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

{Asp Gly Gly (Ala)f Gly Gly Ala} g配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (32) ~ (34) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Val Pro Gly Val) h配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (35) ~ (38) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly) i配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (39) ~ (41) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Ala) j配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (42) ~ (44) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Gly Ala) k配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (45) ~ (47) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Val Gly Val Pro) m配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号 (48) ~ (50) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Pro Pro)<sub>n</sub>配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号(51)～(53)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly)<sub>o</sub>配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号(54)～(56)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln)<sub>p</sub>配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号(57)～(59)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro)<sub>q</sub>配列を有する補助アミノ酸配列としては、配列番号(60)～(62)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

[0042] これらの補助アミノ酸配列のうち、配列番号(17)、(18)、(20)、(21)、(22)、(23)、(24)、(26)、(27)、(29)、(30)、(32)、(33)、(34)、(35)、(36)、(38)、(39)、(40)、(42)、(43)、(45)、(46)、(48)、(49)、(51)、(52)、(54)、(55)、(57)、(58)、(60)又は(61)で表されるアミノ酸配列が好ましく、さらに好ましくは配列番号(18)、(20)、(21)、(22)、(24)、(27)、(30)、(34)、(35)、(36)、(37)、(38)、(40)、(43)、(46)、(49)、(52)、(55)、(58)又は(61)で表されるアミノ酸配列、特に好ましくは配列番号(20)、(21)又は(38)で表されるアミノ酸配列である。

[0043] 補助アミノ酸配列(Y)を含む場合、(Y)の含有個数は、熱安定性の観点等から、人工ポリペプチド(P)1分子中に、2～50が好ましく、さらに好ましくは3～30、特に好ましくは4～20、最も好ましくは5～15である。また、人工ポリペプチド(P)は、2種以上の補助アミノ酸配列(Y)を含んでもよい。

[0044] 人工ポリペプチド(P)は、分岐鎖を含んでいてもよく、一部が架橋され

ていてもよく、環状構造を含んでいてもよい。しかし、人工ポリペプチド（P）は、架橋されていないことが好ましく、さらに好ましくは架橋されていない直鎖構造、特に好ましくは環状構造を持たず架橋されていない直鎖構造である。なお、直鎖構造には、 $\beta$ 構造（直鎖状ペプチドが折れ曲がってこの部分同士が平行に並び、その間に水素結合が作られる二次構造）も含まれる。

[0045] 人工ポリペプチド（P）は、細胞接着性及び熱安定性の観点等から、最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）とが交互に化学結合してなる構造であることが好ましい。この場合、最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）との繰り返し単位（X-Y）の数（個）は、細胞接着性の観点等から、1～50が好ましく、さらに好ましくは2～40、特に好ましくは3～30、最も好ましくは4～20である。

[0046] また、最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）との含有個数は同じでも異なってもよい。異なっている場合は、いずれかの含有個数が他方の含有個数より1個少ないことが好ましい〔この場合、補助アミノ酸配列（Y）が少ないことが好ましい〕。人工ポリペプチド（P）中の最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）との含有個数割合（X/Y）は、0.5～2が好ましく、さらに好ましくは0.9～1.4、特に好ましくは1～1.3である。

[0047] また、人工ポリペプチド（P）の末端部分（最小アミノ酸配列（X）又は補助アミノ酸配列（Y）からペプチド末端まで）に他のアミノ酸を含んでもよい。他のアミノ酸を含む場合、その含有個数は、人工ポリペプチド（P）1個当たり、1～1000個が好ましく、さらに好ましくは3～300、特に好ましくは10～100である。

[0048] 人工ポリペプチド（P）の重量平均分子量（以下、Mw）は、1,000～1,000,000が好ましく、さらに好ましくは2,000～700,000、特に好ましくは3,000～400,000、最も好ましくは4,000～200,000である。

なお、人工ポリペプチド（P）のMwは、SDS-PAGE（SDSポリ  
アクリルアミドゲル電気泳動）法により、測定サンプル {ポリペプチド等}  
を分離し、泳動距離を標準物質と比較する方法等の公知の方法によって求め  
られる（以下、同じ）。

[0049] 好ましい人工ポリペプチド（P）の一部を以下に例示する。

（１）最小アミノ酸配列（X）がArg Gly Asp配列（x 1）の場合

Arg Gly Asp配列（x 1）の１３個と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>9</sub>配列（  
2 1）（y 1）の１２個とを有し、これらが交互に化学結合してなる構造を  
有するMw約１１万のポリペプチド {「プロネクチンF」、プロネクチンは  
三洋化成工業（株）の登録商標（日本及び米国）である。三洋化成工業（株）  
製<以下同じ>}；（x 1）の５個と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>3</sub>配列  
（2 0）（y 2）の５個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有  
するMw約２万のポリペプチド（「プロネクチンF 2」）；（x 1）の３個  
と（Gly Val Pro Gly Val）<sub>2</sub> Gly Gly （Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>3</sub>配列（  
3 8）（y 3）の３個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有す  
るMw約１万のポリペプチド（「プロネクチンF 3」）等。

[0050] （２）最小アミノ酸配列（X）がIle Lys Val Ala Val配列（x 2）の場合

プロネクチンF、プロネクチンF 2又はプロネクチンF 3のArg Gly Asp配  
列（x 1）をIle Lys Val Ala Val配列（7）（x 2）に変更した「プロネク  
チンL」、「プロネクチンL 2」、又は「プロネクチンL 3」等。

[0051] （３）最小アミノ酸配列（X）がTyr Ile Gly Ser Arg配列（x 3）の場合

プロネクチンF、プロネクチンF 2又はプロネクチンF 3のArg Gly Asp配列  
（x 1）をTyr Ile Gly Ser Arg配列（x 3）に変更した「プロネクチンY」  
、「プロネクチンY 2」、又は「プロネクチンY 3」等。

[0052] また、（１）～（３）のポリペプチドの他、宝酒造（株）製R e t r o N  
e c t i n（リコンビナントヒトフィブロネクチンCH-296） {最小ア  
ミノ酸配列（X）としてArg Gly Asp配列（x 1）及びLeu Asp Val配列を  
含有するMw約6万のポリペプチド}、同R G D S - P r o t e i n A {最小

アミノ酸配列（X）としてArg Gly Asp配列（x 1）を含有するMw約3万のポリペプチド} も好ましく使用できる {ただし、これらのポリペプチドは天然に由来し、補助アミノ酸配列（Y）が含まれていない。よって、熱安定性等が上記の（1）～（3）よりも劣る。また、これらのポリペプチドのアミノ酸配列は特開平2-311498号公報（対応米国特許；第5, 198, 423号：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）に開示されている。}。

[0053] 人工ポリペプチド（P）は、人工的に合成されるものであり、例えば、有機合成法（固相合成法、液相合成法等）及び生化学的合成法〔遺伝子組換え微生物（酵母、細菌、大腸菌等）〕等によって製造する。すなわち、人工ポリペプチド（P）は、動物由来のコラーゲンやフィブロネクチン等の細胞接着性蛋白質を含まない。

[0054] 有機合成法に関しては、例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2、タンパク質の化学（下）」第641～694頁（昭和62年5月20日；株式会社東京化学同人発行）に記載されている方法等が用いられる。生化学的合成法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報（対応国際特許出願；WO90/05177パンフレット：これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。）に記載されている方法等が用いられる。人工ポリペプチド（P）を容易に合成できる点で、遺伝子組換え微生物による生化学的合成法が好ましく、特に好ましくは遺伝子組換え大腸菌を用いて合成する方法である。

[0055] 本発明の細胞培養用担体において、粒子（A）と人工ポリペプチド（P）とは、通常、化学結合（イオン結合、水素結合及び／又は共有結合等）及び／又は物理吸着（ファンデルワールス力による吸着）によって結合される。粒子（A）と人工ポリペプチド（P）とが強固に結合される点で、化学結合が好ましく、さらに好ましくは共有結合である。

[0056] 粒子（A）に人工ポリペプチド（P）を共有結合させる方法としては、例えば、「ペプチド合成の基礎と実験、平成9年10月5日、丸善株式会社発

行」に記載の方法等が挙げられ、具体的には、以下の（１）～（３）の通りである。

- [0057] （１）人工ポリペプチド（Ｐ）のうち１級アミノ基又は２級アミノ基を有するものと粒子（Ａ）のカルボキシル基とを反応させる場合、カルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素  $\{R' - N = C(OCOR) - NH - R'\}$ （ $-OCOR$ が細胞培養用担体に由来する部分）を得た後、人工ポリペプチド（Ｐ）のうち１級アミノ基又は２級アミノ基を有するものをこのアシルイソ尿素に加えることによって、粒子（Ａ）と人工ポリペプチド（Ｐ）とをアミド結合できる。カルボジイミド化合物としては、 $N, N'$ －ジシクロヘキシルカルボジイミド及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩等が挙げられる。
- [0058] （２）人工ポリペプチド（Ｐ）のうち１級アミノ基又は２級アミノ基を有するものと粒子（Ａ）のうちヒドロキシル基を有するもの〔共重合単量体として、ヒドロキシル基含有モノマーを用いたもの〕とを反応させる場合、粒子（Ａ）のヒドロキシル基を予めカルボニルジイミダゾール化合物と反応させ、イミダゾール誘導体  $\{R - Im, Im$ はイミダゾリン環、 $R$ が粒子（Ａ）に由来〕を得た後、人工ポリペプチド（Ｐ）のうち１級アミノ基又は２級アミノ基を有するものをこのイミダゾール誘導体に加えることによって、粒子（Ａ）と人工ポリペプチド（Ｐ）とを $N - C$ 結合できる。カルボニルジイミダゾール化合物としては、 $N, N'$ －カルボニルジイミダゾール等が挙げられる。
- [0059] （３）人工ポリペプチド（Ｐ）のうちヒドロキシル基を有するものと粒子（Ａ）のカルボキシル基とを反応させる場合、粒子（Ａ）のカルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素を得た後、人工ポリペプチド（Ｐ）のうちヒドロキシル基を有するものをこのアシルイソ尿素に加えることによって、粒子（Ａ）とポリペプチドとをエステル結合できる。
- [0060] 人工ポリペプチド（Ｐ）を粒子（Ａ）に、物理吸着、イオン結合及び／又

は水素結合させる方法としては、溶媒等に人工ポリペプチド（P）と粒子（A）とを投入し、混合して作製する方法等が挙げられる。溶媒としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、酸及び／又は塩基を0.001～50重量%（好ましくは0.005～30重量%、さらに好ましくは0.01～10重量%）含有する水溶液等（特開2003-189848等に記載）が使用できる。これらの溶媒の中で、無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液、並びに水が好ましく、さらに好ましくは無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液、並びにイオン交換蒸留水、特に好ましくは無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液である。

[0061] 人工ポリペプチド（P）の含有量は、細胞接着性を向上させる観点等より、細胞培養用担体の乾燥重量あたり、5 ng/g～500 mg/gが好ましく、さらに好ましくは50 ng/g～50 mg/g、次に好ましくは500 ng/g～50 mg/g、次に好ましくは500 ng/g～20 mg/g、特に好ましくは500 ng/g～5 mg/g、最も好ましくは5 μg～5 mg/gである。

[0062] なお、細胞培養用担体の乾燥単位重量あたりの人工ポリペプチド（P）の含有量は、人工ポリペプチド（P）の含有量が500 μg/gを超える場合、例えば、Biuret法（日本生化学会編「生化学実験講座1、タンパク質の化学I」第45～55頁（1979年12月11日；株式会社東京化学同人発行）等により求められる。

[0063] 一方、人工ポリペプチド（P）の含有量が500 μg/g以下の場合、例えば、Kjeldahl法（日本生化学会編「生化学実験講座1、タンパク質の化学I」第45～55頁（1979年12月11日；株式会社東京化学同人発行）等により求められる。

[0064] また、免疫学的測定法（特開2004-049921号公報等に記載）を利用して測定することもできる。具体的には、（1）人工ポリペプチド（P）の含有量が既知である細胞培養用担体〔Biuret法やKjeldahl法等で人工ポリペプチド（P）の含有量が既知になった細胞培養担体〕を

生理食塩水に浸漬し、人工ポリペプチド（P）と結合する抗体に酵素を標識したもの（以下、酵素標識抗体）とを反応させ、この反応した酵素標識抗体の酵素量を吸光度測定し、検量線（人工ポリペプチド（P）の含有量とそれに対する吸光度）を作成する。（２）同様に検体（人工ポリペプチド（P）の含有量が未知である細胞培養用担体）の吸光度を測定する。（１）で得られた検量線と（２）で得られた吸光度から、検体の人工ポリペプチド（P）の含有量を求めることができる。乾燥重量は、測定試料 1 g を減圧乾燥機の中に入れ、120℃、0.1 kPa 以下の条件で 1 時間乾燥して、計量することにより得られる。

[0065] 本発明の細胞培養用担体は、細胞増殖性を高めるため、細胞増殖因子を含有させてもよい。細胞増殖因子としては、細胞の増殖を促進する物質、例えば、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、神経成長因子、幹細胞因子、白血病阻害因子、骨形成因子、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、神経栄養因子、結合組織成長因子、アンジオポエチン、コンドロモジュリン、テノモジュリン、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、コロニー刺激因子、アドレナモジュリン及びナトリウム利尿ペプチド等の生理活性ポリペプチド等が挙げられる（例えば、財団法人名古屋大学出版会発行「上田実編ティッシュエンジニアリング」（1999年）に記載）。これらの細胞増殖因子の中で、適用できる組織細胞の範囲が広く、細胞増殖性がより高くなるという観点等から、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、骨形成因子、インターロイキン及び腫瘍壊死因子が好ましく、さらに好ましくは線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、インターロイキン及び腫瘍壊死因子である。

[0066] 細胞増殖因子は、粒子（A）に結合していることが好ましい。この結合は

、粒子（A）と人工ポリペプチド（P）との結合と同様に、化学結合及び／又は物理吸着が使用でき、好ましい化学結合及び／又は物理吸着も同様である。

[0067] 細胞増殖因子を含む場合、この含有量は、細胞増殖性を向上させる観点等より、細胞培養用担体の乾燥重量あたり、 $10 \text{ pg/g} \sim 1000 \mu\text{g/g}$  が好ましく、さらに好ましくは  $100 \text{ pg/g} \sim 100 \mu\text{g/g}$ 、特に好ましくは  $1000 \text{ pg/g} \sim 10 \mu\text{g/g}$  である。

[0068] 本発明の細胞培養用担体の外形状、体積平均粒子径及び保水量の好ましい範囲は、粒子（A）の好ましい範囲と一致する。

[0069] 本発明の細胞培養用担体は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法としては、放射線、エチレンオキサイドガス、プラズマ、 $\gamma$ 線、アルコール、オートクレーブ、乾熱等を用いた滅菌方法が適用できる。これらは、1種の方法のみで行ってもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。

[0070] 本発明の細胞培養用担体に接着できる細胞（CE）としては細胞であれば制限がないが、本発明の細胞培養用担体を用いると細胞増殖性が高いため、医薬品等の有用物質生産や治療等に用いられる哺乳動物由来の正常細胞、哺乳動物由来の株化細胞及び昆虫細胞が適している。

[0071] 哺乳動物由来の正常細胞としては、皮膚に關与する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び平滑筋細胞等）、血管に關与する細胞（血管内皮細胞、平滑筋細胞及び線維芽細胞等）、筋肉に關与する細胞（筋肉細胞等）、脂肪に關与する細胞（脂肪細胞等）、神経に關与する細胞（神経細胞等）、肝臓に關与する細胞（肝細胞等）、脾臓に關与する細胞（脾ラ島細胞等）、腎臓に關与する細胞（腎上皮細胞、近位尿細管上皮細胞及びメサンギウム細胞等）、肺・気管支に關与する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び平滑筋細胞等）、目に關与する細胞（視細胞、角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞等）、前立腺に關与する細胞（上皮細胞、間質細胞及び平滑筋細胞等）、骨に關与する細胞（骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞等）、軟骨に關与する細胞（軟骨芽細胞及び軟骨細胞等）、歯に關与する細胞（歯根膜細胞及

び骨芽細胞等）、血液に関与する細胞（白血球及び赤血球等）及び幹細胞（例えば、骨髓未分化間葉系幹細胞、骨格筋幹細胞、造血系幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞（oval cell、small hepatocyte等）、脂肪組織幹細胞、胚性幹（ES）細胞、表皮幹細胞、腸管幹細胞、精子幹細胞、胚生殖幹（EG）細胞、膀胱幹細胞（膀胱上皮幹細胞等）、白血球系幹細胞、リンパ球系幹細胞、角膜系幹細胞、前駆細胞（脂肪前駆細胞、血管内皮前駆細胞、軟骨前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、NK前駆細胞等）等）等が挙げられる。

[0072] 哺乳動物由来の株化細胞としては、3T3細胞、A549細胞、AH130細胞、B95-8細胞、BHK細胞、BOSC23細胞、BS-C-1細胞、C3H10T1/2細胞、C-6細胞、CHO細胞、COS細胞、CV-1細胞、F9細胞、FL細胞、FL5-1細胞、FM3A細胞、G-361細胞、GP+E-86細胞、GP+envAm12細胞、H4-II-E細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、HEp-2細胞、HL-60細胞、HTC細胞、HUVEC細胞、IMR-32細胞、IMR-90細胞、K562細胞、KB細胞、L細胞、L5178Y細胞、L-929細胞、MA104細胞、MDBK細胞、MDCK細胞、MIA PaCa-2細胞、N18細胞、Namlwa細胞、NG108-15細胞、NRK細胞、OC10細胞、OTT6050細胞、P388細胞、PA12細胞、PA317細胞、PC-12細胞、PER.C6細胞、PG13細胞、QGH細胞、Raji細胞、RPMI-1788細胞、SGE1細胞、Sp2/O-Ag14細胞、ST2細胞、THP-1細胞、U-937細胞、V79細胞、VERO細胞、WI-38細胞、 $\psi$ 2細胞及び $\psi$ CRE細胞等が挙げられる〔細胞培養の技術（日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年）〕。

[0073] 昆虫細胞としては、カイコ細胞（BmN細胞及びBommo細胞等）、クワコ細胞、サクサン細胞、シンジュサン細胞、ヨトウガ細胞（Sf9細胞及びSf21細胞等）、クワゴマダラヒトリ細胞、ハマキムシ細胞、ショウジョウバエ細胞、センチクバエ細胞、ヒトスジシマカ細胞、アゲハチョウ細胞

、ワモンゴキブリ細胞及びイラクサキンウバ細胞（T<sub>n</sub>-5細胞、HIGH FIVE細胞及びMG1細胞等）等が挙げられる〔昆虫バイオ工場（木村滋 編著、株式会社工業調査会 発行、2000年）〕。

[0074] これらの細胞のうち、医薬品等の有用物質生産や治療等の観点から、哺乳動物由来の正常細胞及び哺乳動物由来の株化細胞が好ましい。そして、治療に有用な点で、さらに好ましくは平滑筋細胞、肝細胞、骨芽細胞、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び幹細胞、特に好ましくは上皮細胞である。また、医薬品等の有用物質生産に有用な点で、さらに好ましくは3T3細胞、BHK細胞、CHO細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、L-929細胞、MDCK細胞、PER. C6細胞、VERO細胞及びWI-38細胞、特に好ましくはMDCK細胞及びVERO細胞である。

[0075] 本発明の細胞培養用担体を用いる細胞培養方法に用いる培地（ME）としては、無血清培地（Grace培地、IPL-41培地、Schneider's培地、Opti-PRO™SFM培地、Opti-MEM™I培地、VP-SFM培地、CD293培地、293SFMI I培地、CD-CHO培地、CHO-S-SFMI I培地、FreeStyle™293培地、CD-CHO ATG™培地及びこれらの混合培地等）；一般の培地（RPMI培地、MEM培地、Eagle's MEM培地、BME培地、DME培地、αMEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地、ASF103培地、ASF104培地、ASF301培地、TC-100培地、Sf-900II培地、Ex-cel I 405培地、Express-Five培地、Drosophila培地及びこれらの混合培地）；及びこれらの混合培地が挙げられる。

[0076] これらのうち、ヒトへの感染の可能性がある物質（血清に由来するウイルス等）の混入防止の観点等から、無血清培地が好ましく、さらに好ましくはOpti-PRO™SFM培地、Opti-MEM™I培地、VP-SFM培地、CD293培地、293SFMI I培地、CD-CHO培地、CHO-S-SFMI I培地、FreeStyle™293培地、CD-CHO A

TG™培地及びこれらの混合培地、特に好ましくはOpti-PRO™SFM培地、VP-SFM培地、CD293培地、293SFMI I培地、FreeStyle™293培地及びこれらの混合培地である。

[0077] また、これらの培地には、血清を添加することができるが、ヒトへの感染の可能性のある物質（血清に由来するウイルス等）の混入防止の観点等から、血清を添加しないことが好ましい。血清としては、ヒト血清及び動物血清（ウシ血清、ウマ血清、ヤギ血清、ヒツジ血清、ブタ血清、ウサギ血清、ニワトリ血清、ラット血清及びマウス血清等）が含まれる。血清を添加する場合、これらのうち、ヒト血清、ウシ血清及びウマ血清が好ましい。また、動物血清の由来は、成体由来の血清、仔由来の血清、新生由来の血清及び胎児由来の血清等が挙げられる。血清を添加する場合、これらのうち、仔由来の血清、新生由来の血清及び胎児由来の血清が好ましく、さらに好ましくは新生由来の血清及び胎児由来の血清、特に好ましくは胎児由来の血清である。血清を添加する場合、さらに血清は、非働化处理や、抗体の除去処理等を行ってもよい。血清を使用する場合、血清の使用量（重量%）は、培地の重量に基づいて、0.1～50が好ましく、さらに好ましくは0.3～30、特に好ましくは1～20である。

[0078] 培地中には、必要に応じて、細胞増殖因子を含有させることができる。細胞増殖因子を含有させることにより、細胞の増殖速度を高めたり、細胞活性を高めたりすることができる。細胞増殖因子としては、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮増殖因子、神経成長因子、幹細胞因子、白血病阻害因子、骨形成因子、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、神経栄養因子、結合組織成長因子、アンジオポエチン、サイトカイン、インターロイキン、アドレナモジュリン及びナトリウム利尿ペプチド等の生理活性ペプチドが含まれる。これらのうち、適用できる細胞の範囲が広く、治癒期間がより短縮できるという観点から、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インシュリン様増殖因子及び骨形成因子が好ま

しく、さらに好ましくは線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子及びインシュリン様増殖因子である。細胞増殖因子を使用する場合、細胞増殖因子の含有量（重量％）は細胞増殖因子の種類によって異なるが、培地の重量に基づいて、 $10^{-16} \sim 10^{-3}$ が好ましく、さらに好ましくは $10^{-14} \sim 10^{-5}$ 、特に好ましくは $10^{-12} \sim 10^{-7}$ である。

[0079] これらの培地には、さらに抗菌剤（アンホテリシンB、ゲンタマイシン、ペニシリン及びストレプトマイシン等）を含有させることができる。抗菌剤を含有させる場合、この含有量（重量％）は抗菌剤の種類によって異なるが、培地の重量に基づいて、 $10^{-6} \sim 10$ が好ましく、さらに好ましくは $10^{-5} \sim 1$ 、特に好ましくは $10^{-4} \sim 0.1$ である。

[0080] 培地に分散させる細胞の濃度（個/mL）としては特に制限はないが、培地1 mL当たり、 $100 \sim 1$ 億が好ましく、さらに好ましくは $1000 \sim 1$ 千万、特に好ましくは1万 $\sim 100$ 万である。細胞の個数の計数方法は公知の方法が使用でき、例えば、クリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法で測定することができる〔細胞培養の技術（日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年）〕。

[0081] また、培地に投入する細胞培養用担体の乾燥重量（g）は、培養する細胞の種類等によって適宜決定できるが、培地1 L当たり、 $0.005 \sim 800$ が好ましく、さらに好ましくは $0.02 \sim 200$ 、特に好ましくは $0.1 \sim 40$ である。

[0082] 培養条件としては、特に制限は無く、二酸化炭素（ $\text{CO}_2$ ）濃度 $1 \sim 20$ 体積％、 $5 \sim 45^\circ\text{C}$ で1時間 $\sim 100$ 日間、必要に応じて $1 \sim 10$ 日毎に培地交換しなら培養する条件等が適用できる。好ましい条件としては、 $\text{CO}_2$ 濃度 $3 \sim 10$ 体積％、 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、 $1 \sim 20$ 日間、 $1 \sim 3$ 日毎に培地交換しながら培養する条件である。

[0083] 細胞培養用担体から、細胞を剥離する方法は、公知の方法が使用でき、例えば、キレート剤（EDTA等）、非動物由来の蛋白質分解酵素〔植物由来の蛋白質分解酵素（パパイン等）〕、遺伝子組換えによる合成酵素（商品名

: TrypLE™ Select、インビトロジェン（株）製等）及び／又は動物由来の蛋白質分解酵素（トリプシンやコラゲナーゼ等）によって剥離させる方法が利用できる。

## 実施例

[0084] 以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。なお、特記しない限り、部は重量部、％は重量％を意味する。

### <実施例 1>

#### <架橋ポリアクリル酸塩粒子（A1）の準備>

攪拌機、モノマー供給管、窒素ガス導入管、温度計、還流冷却器を備えた反応容器にシクロヘキサン 62.4 部、重合分散剤としてソルビタンモノステアレート 3.1 部を仕込み、窒素バブリングを 30 分以上行って、溶存空気を追い出し 75℃まで昇温した。

別の反応器に 80%アクリル酸水溶液 17.3 部を仕込み、冷却しながら 28%水酸化ナトリウム水溶液 20.7 部を加えて中和した。この水溶液に架橋性単量体 {エチレングリコールジグリシジルエーテル} 4.52 部及び重合開始剤 {過硫酸カリウム} 0.278 部、連鎖移動剤 {次亜リン酸ナトリウム} 0.053 部を添加した後、窒素バブリングを行い、溶存空気を追い出しモノマー水溶液を得た。

[0085] 得られたモノマー水溶液を上記の重合反応器のモノマー供給管より 6.5 mL/分の割合で連続的に重合反応器内の攪拌中（攪拌速度は 500 rpm）のシクロヘキサン液中に約 1 時間かけて供給してシクロヘキサン還流下で重合を行った。次に共沸脱水によって 160 部の水を抜き出した後、含水ゲルポリマーを取り出し、更に 120℃で 2 時間乾燥して、乾燥架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩を得た。乾燥架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩を、目開きが 63  $\mu\text{m}$  のふるい及び 53  $\mu\text{m}$  のふるい {JIS Z8801-1:2000（対応国際規格 ISO 3310-1 "Test sieves-Technical requirements and testing Part1: Test sieves of metal wire cloth" :これに開

示された開示内容を参照により本出願に取り込む。) } により分級して、粒子径  $5.3 \sim 6.3 \mu\text{m}$  の粒子 { 架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩粒子 } を得た。次に、得られた粒子に対して、エチレングリコールジグリシジルエーテルを溶液濃度として 2% 含むメタノール/イオン交換水 (体積比 70/30) 溶液 7.5 部を添加し均一混合した。次いで、メタノールを風乾した後に密閉容器に入れ、 $80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保持し、表面架橋を行った。その後、順風乾燥機中で  $120^{\circ}\text{C}$  で 30 分間乾燥させて、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A1) を得た。

[0086] < 人工ポリペプチド (P1) の準備 >

特表平 3-502935 号公報 (対応国際特許出願; WO 90/05177 パンフレット: これに開示された開示内容を参照により本出願に取り込む。) 中の実施例記載の方法に準じて、Arg Gly Asp 配列の 13 個と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 9 配列 (21) の 12 個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有する Mw 約 11 万のペプチド「プロネクチン F」を製造し、人工ポリペプチド (P1) とした。

[0087] < 細胞培養用担体 (C1) の調製 >

架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A1) の 1 g に、塩化ナトリウムを 0.85% で含有する 0.02 M, pH 7.2 のリン酸緩衝液 (以下、PBS) の 50 mL を加え、30 分間放置して、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A1) を膨潤させた後、アスピレーターで余分な PBS を吸引除去した。水溶性カルボジイミド (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド ハイドロクロライド、(株) 同仁化学研究所製) を 60 mM の濃度で含む PBS 溶液の 40 mL を加え、ポリフッ化エチレン樹脂製攪拌羽で攪拌し、2 時間反応させた。反応溶液を吸引除去した後、PBS の 40 mL を添加、吸引除去する洗浄操作を 5 回行った。

[0088] 次に、人工ポリペプチド (P1) を  $600 \mu\text{g/mL}$  の濃度で含む PBS 溶液の 40 mL を加え、ポリフッ化エチレン樹脂製攪拌羽で攪拌し、2 時間反応させた。反応溶液を吸引除去した後、PBS の 40 mL を添加、吸引除

去する洗浄操作を5回行い、さらにイオン交換水の40mLを添加、吸引除去する洗浄操作を2回行った。

[0089] 最後に、減圧乾燥機の中に入れ、120℃、0.1kPa以下の条件での乾燥を4時間行い、本発明の細胞培養用担体(C1)を得た。この担体(C1)の保水量は13g/gであった。また、この担体(C1)には、2mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。なお、人工ポリペプチドの含有量は、B i u r e t法により作成した検量線を用いて、免疫学的測定法によって測定した。ただし、含有量が500μg以下となることが予測される場合、K j e l d a h l法により作成した検量線を用いた〔以下、同様である。〕。

[0090] <実施例2>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から1.81部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A2)及び細胞培養用担体(C2)を得た。この担体(C2)の保水量は18g/gであった。また、この担体(C2)には、4mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0091] <実施例3>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A3)及び細胞培養用担体(C3)を得た。この担体(C3)の保水量は21g/gであった。また、この担体(C3)には、5mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0092] <実施例4>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.09部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A4)及び細胞培養用担体(C4)を得た。この担体(C4)の保水量は23g/gであった。また、この担体(C4)には、6mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

## [0093] &lt;実施例 5&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4.52 部から 0.90 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P2) {特表平 3-502935 号公報中の実施例記載の方法に準じて製造した、Arg Gly Asp 配列 (x1) の 5 個と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 3 配列 (20) (y2) の 5 個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有する Mw 約 2 万のポリペプチド (「プロネクチン F2」)} を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A3) 及び細胞培養用担体 (C5) を得た。この担体 (C5) の保水量は 21 g/g であった。また、この担体 (C5) には、2 mg/g の人工ポリペプチド (P2) が含まれていた。

## [0094] &lt;実施例 6&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4.52 部から 0.90 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P3) {特表平 3-502935 号公報中の実施例記載の方法に準じて製造した、Arg Gly Asp 配列 (x1) の 3 個と (Gly Val Pro Gly Val) 2 Gly Gly (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 3 配列 (38) (y3) の 3 個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有する Mw 約 1 万のポリペプチド (「プロネクチン F3」)} を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A3) 及び細胞培養用担体 (C6) を得た。この担体 (C6) の保水量は 21 g/g であった。また、この担体 (C6) には、1 mg/g の人工ポリペプチド (P3) が含まれていた。

## [0095] &lt;実施例 7&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4.52 部から 0.90 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P4) {Arg Gly Asp 配列 (x1) を有する Mw 490 のポリペプチド; Gly Arg Gly Asp Ser 配列 (63)、株

式会社ペプチド研究所製}を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A3)及び細胞培養用担体(C7)を得た。この担体(C7)の保水量は21 g/gであった。また、この担体(C7)には、0.1 mg/gの人工ポリペプチド(P4)が含まれていた。

[0096] <実施例8>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」以外、実施例1に記載の方法と同様にして粒子(架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩粒子)を得た。この粒子を表面架橋処理せずこのまま、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A5)とした。また、「細胞培養用担体の調製において、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A1)の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子(A5)を使用すること」以外、実施例1と同様にして、細胞培養用担体(C8)を得た。この担体(C8)の保水量は22 g/gであった。また、この担体(C8)には、5 mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0097] <実施例9>

<人工ポリペプチド(P5)の準備>

(1) 人工ポリペプチド(P5A)の調製

「ペプチド合成の基礎と実験」第114~117頁(昭和60年1月20日、丸善株式会社発行)等に記載されているDCC法に準じて、人工ポリペプチド(P4)同士で反応させた架橋ポリペプチドを約5%の濃度で含む溶液を作製した。この溶液の10 mLを、0.45  $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した後、ゲルろ過カラム(商品名: Superdex 30 pg、アマシャムバイオサイエンス(株)製)を用いて、濾液を分画した後、Mw約1000の分画を得た{流速: 1 mL/分、溶出液: PBS、予め同じ条件でゲルろ過した分子量マーカーの溶出時間を指標に、Mw約1000の分画を分取した。}。このMw約1000の分画を、イオン交換水中で透析して脱塩した後、-20℃、0.1 kPa以下の条件で、凍結乾燥を24時間行い、人工ポリペプチド(P5A) {Gly Arg Gly Asp Ser配列(63)を約2

個有する。}を得た。

[0098] (2) 人工ポリペプチド (P 5 C) の調製

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 5 A) 同士で反応させること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約2000の分画を分取すること」以外、人工ポリペプチド (P 5 A) の調製と同様にして、人工ポリペプチド (P 5 B) {Gly Arg Gly Asp Ser配列 (6 3) を約4個有する。}を得た。

[0099] ついで、「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 5 B) 同士で反応させること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約4000の分画を分取すること」以外、人工ポリペプチド (P 5 A) の調製と同様にして、人工ポリペプチド (P 5 C) {Gly Arg Gly Asp Ser配列 (6 3) を約8個有する。}を得た。

[0100] (3) 人工ポリペプチド (P 5) の調製

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 5 A) と人工ポリペプチド (P 5 C) とをモル比1 : 1で反応させること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約5000の分画を分取すること」以外、人工ポリペプチド (P 5 A) の調製と同様にして、人工ポリペプチド (P 5) {Gly Arg Gly Asp Ser配列 (6 3) を約10個有する。}を得た。

[0101] <細胞培養用担体 (C 9) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P 1) の代わりに、人工ポリペプチド (P 5) を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 3) 及び細胞培養用担体 (C 9) を得た。この担体 (C 9) の保水量は21 g/gであった。また、この担体 (C 9) には、0.5 mg/gの人工ポリペプチド (P 5) が含まれていた。

[0102] <実施例10>

#### <人工ポリペプチド（P6）の準備>

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P5）同士で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名：Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約10000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P6） {Gly Arg Gly Asp Ser配列（63）を約20個有する。}を得た。

#### [0103] <細胞培養用担体（C10）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P6）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C10）を得た。この担体（C10）の保水量は21 g/gであった。また、この担体（C10）には、2 mg/gの人工ポリペプチド（P6）が含まれていた。

#### [0104] <実施例11>

##### <人工ポリペプチド（P7）の準備>

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P5）と人工ポリペプチド（P6）とをモル比1：1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約15000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P7） {Gly Arg Gly Asp Ser配列（63）を約30個有する。}を得た。

#### [0105] <細胞培養用担体（C11）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド

(P 1) の代わりに、人工ポリペプチド (P 7) を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 3) 及び細胞培養用担体 (C 1 1) を得た。この担体 (C 1 1) の保水量は  $21 \text{ g/g}$  であった。また、この担体 (C 1 1) には、 $2 \text{ mg/g}$  の人工ポリペプチド (P 7) が含まれていた。

[0106] <実施例 1 2>

<人工ポリペプチド (P 8) の準備>

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 6) 同士で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名 *Superdex 30 pg* を使用する代わりに、商品名 *Superdex 75 pg* を使用すること」及び「 $M_w$  約 1000 の分画の代わりに、 $M_w$  約 20000 の分画を分取すること」以外、実施例 9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P 8) {Gly Arg Gly Asp Ser 配列 (6 3) を約 40 個有する。} を得た。

[0107] <細胞培養用担体 (C 1 2) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4.52 部から 0.90 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P 1) の代わりに、人工ポリペプチド (P 8) を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 3) 及び細胞培養用担体 (C 1 2) を得た。この担体 (C 1 2) の保水量は  $21 \text{ g/g}$  であった。また、この担体 (C 1 2) には、 $3 \text{ mg/g}$  の人工ポリペプチド (P 8) が含まれていた。

[0108] <実施例 1 3>

<人工ポリペプチド (P 9) の準備>

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 4) と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (6 4) からなるポリペプチドとをモル比 1 : 1 で反応させること」以外、実施例 9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P 9) {Gly Arg Gly Asp Ser 配列 (6 3) の約 1 個と Gly

Ala Gly Ala Gly Ser配列（64）の約1個とを有する。}を得た。

[0109] <細胞培養用担体（C13）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P9）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C13）を得た。この担体（C13）の保水量は21g/gであった。また、この担体（C13）には、0.2mg/gの人工ポリペプチド（P9）が含まれていた。

[0110] <実施例14>

<人工ポリペプチド（P10）の準備>

（1）人工ポリペプチド（P10A）の調製

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（64）同士で反応させること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P10A）{Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（64）を約2個有する。}を得た。

[0111] （2）人工ポリペプチド（P10D）の調製

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P10A）同士で反応させること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約2000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P10B）{Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（64）を約4個有する。}を得た。

[0112] ついで、「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P10B）同士で反応させること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約3000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P10C）{Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（64）を約8個有する。}を得た。

[0113] ついで、「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポ

リペプチド（P 1 0 A）と人工ポリペプチド（P 1 0 C）とをモル比 1 : 1 で反応させること」及び「Mw約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw約 4 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 0 D） {Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（6 4）を約 1 0 個有する。} を得た。

[0114] （3）人工ポリペプチド（P 1 0）の調製

「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 4）と人工ポリペプチド（P 1 0 D）とをモル比 1 : 1 で反応させること」及び「Mw約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw約 5 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 0） {Gly Arg Gly Asp Ser配列（6 3）の約 1 個とGly Ala Gly Ala Gly Ser配列（6 4）の約 1 0 個とを有する。} を得た。

[0115] <細胞培養用担体（C 1 4）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 0）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）及び細胞培養用担体（C 1 4）を得た。この担体（C 1 4）の保水量は 2 1 g / g であつた。また、この担体（C 1 4）には、0. 3 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 0）が含まれていた。

[0116] <実施例 1 5>

<人工ポリペプチド（P 1 1）の準備>

「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 1 0 D）同士で反応させること」及び「Mw約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw約 8 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 1 A） {Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（6 4）を約 2 0 個有する。} を得た。

[0117] ついで、「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポ

リペプチド（P 4）と人工ポリペプチド（P 1 1 A）とをモル比 1 : 1 で反応させること」及び「Mw 約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw 約 9 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 1） {Gly Arg Gly Asp Ser 配列（6 3）の約 1 個と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列（6 4）の約 2 0 個とを有する。} を得た。

[0118] <細胞培養用担体（C 1 5）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 1）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）及び細胞培養用担体（C 1 5）を得た。この担体（C 1 5）の保水量は 2 1 g / g であった。また、この担体（C 1 5）には、1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 1）が含まれていた。

[0119] <実施例 1 6>

<人工ポリペプチド（P 1 2）の準備>

「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 1 0 D）と人工ポリペプチド（P 1 1 A）とをモル比 1 : 1 で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名 Superdex 3 0 p g を使用する代わりに、商品名 Superdex 7 5 p g を使用すること」及び「Mw 約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw 約 1 3 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 2 A） {Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列（6 4）を約 3 0 個有する。} を得た。

[0120] ついで、「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 4）と人工ポリペプチド（P 1 2 A）とをモル比 1 : 1 で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名 Superdex 3 0 p g を使用する代わりに、商品名 Superdex 7 5 p g を使用すること」及び「Mw 約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw 約 1 3 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 2）

{Gly Arg Gly Asp Ser配列 (63) の約1個とGly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (64) の約30個とを有する。} を得た。

[0121] <細胞培養用担体 (C16) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P12) を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A3) 及び細胞培養用担体 (C16) を得た。この担体 (C16) の保水量は21 g/gであった。また、この担体 (C16) には、2 mg/gの人工ポリペプチド (P12) が含まれていた。

[0122] <実施例17>

<人工ポリペプチド (P13) の準備>

「人工ポリペプチド (P4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P11A) と人工ポリペプチド (P12A) とをモル比1:1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約21000の分画を分取すること」以外、実施例9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P13A) {Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (64) を約50個有する。} を得た。

[0123] ついで、「人工ポリペプチド (P4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P4) と人工ポリペプチド (P13A) とをモル比1:1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約21000の分画を分取すること」以外、実施例9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P13) {Gly Arg Gly Asp Ser配列 (63) の約1個とGly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (64) の約50個とを有する。} を得た。

[0124] <細胞培養用担体 (C17) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P13）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C17）を得た。この担体（C17）の保水量は21 g/gであった。また、この担体（C17）には、2 mg/gの人工ポリペプチド（P13）が含まれていた。

[0125] <実施例18>

<架橋ポリアクリル酸塩粒子（A6）の準備>

アクリル酸ナトリウム88部、アクリル酸22.85部、N,N'-メチレンビスアクリルアミド0.2部及び脱イオン水293、ジクロロトリス（トリフェニルフォスフィン）ルテニウム0.001部を攪拌・混合しながら、1~2℃に保った。そして、この混合液中に窒素を流入して、混合液中の溶存酸素濃度を0.5 ppm以下とした。引き続き、この混合液に、1%過酸化水素水溶液0.3部、0.2%アスコルビン酸水溶液0.8部及び2%の2,2'-アゾビスアミジノプロパンジハイドロクロライド水溶液0.8部を添加・混合して重合を開始させた。そして、反応液が80℃に達した後、重合温度80±2℃で約5時間重合することにより、含水樹脂（ゲル）を得た。この含水樹脂（ゲル）400部をミンチ機（目皿穴径：6mm、飯塚工業社製 12VR-400K）にて25℃で5分間細断した後、通気型バンド乾燥機（135℃、2.0m/秒；井上金属工業（株）製）で乾燥し、乾燥重合体を得た。この乾燥重合体をジューサーミキサー（National MX-X53、松下電器（株）製）で粉碎し、目開きが63μmのふるい及び53μmのふるい（JIS Z8801-1：2000）により分級して、粒子径53~63μmの粒子〔架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩粒子〕を得た。この100部を高速攪拌（細川ミクロン製 高速攪拌タービュライザーミキサー：回転数2000rpm）しながらエチレングリコールジグリシジルエーテルの1%水/メタノール混合溶液（水/メタノールの重量比

＝60／40)の1部をスプレー噴霧しながら添加・混合し、140℃で30分間静置し加熱架橋(表面架橋)することにより架橋ポリアクリル酸塩粒子(A6)を得た。

[0126] <細胞培養用担体(C18)の調製>

「架橋ポリアクリル酸塩粒子(A1)の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子(A6)を使用すること」以外、実施例1と同様にして、細胞培養用担体(C18)を得た。この担体(C18)の保水量は21g/gであった。また、この担体(C18)には、10mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0127] <実施例19>

「28%水酸化ナトリウム水溶液の使用量を207部から110部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A7)及び細胞培養用担体(C19)を得た。この担体(C19)の保水量は4g/gであった。また、この担体(C19)には、0.1mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0128] <実施例20>

「架橋性単量体{エチレングリコールジグリシジルエーテル}の使用量を4.52部から6.91部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A8)及び細胞培養用担体(C20)を得た。この担体(C20)の保水量は7g/gであった。また、この担体(C20)には、0.5mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0129] <実施例21>

「架橋性単量体{エチレングリコールジグリシジルエーテル}の使用量を4.52部から0.0166部に変更すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子(A9)及び細胞培養用担体(C21)を得た。この担体(C21)の保水量は28g/gであった。また、この担体(C21)には、8mg/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0130] <実施例22>

「架橋性単量体 {エチレングリコールジグリシジルエーテル} の使用量を 4.52 部から 0.0111 部に変更すること」及び「エチレングリコールジグリシジルエーテルを溶液濃度として 2% 含むメタノール／イオン交換水溶液の使用量を 7.5 から 2.5 に変更すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 10) 及び細胞培養用担体 (C 22) を得た。この担体 (C 22) の保水量は 39 g/g であった。また、この担体 (C 22) には、10 mg/g の人工ポリペプチド (P 1) が含まれていた。

[0131] <実施例 23>

<架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 11) の準備>

「架橋性単量体 {エチレングリコールジグリシジルエーテル} の使用量を 4.52 部から 0.0111 部に変更すること」及び「表面架橋しなかったこと {エチレングリコールジグリシジルエーテルを溶液濃度として 2% 含むメタノール／イオン交換水溶液を添加せず、80℃で 1 時間保持しなかったこと}」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 11) を得た。

[0132] <細胞培養用担体 (C 23) の調製>

「架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 1) の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 11) を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体 (C 23) を得た。この担体 (C 23) の保水量は 48 g/g であった。また、この担体 (C 23) には、12 mg/g の人工ポリペプチド (P 1) が含まれていた。

[0133] <実施例 24>

「80%アクリル酸水溶液 173 部の代わりに 80%メタクリル酸水溶液 207 部を使用すること」以外、実施例 18 と同様にして、架橋ポリメタクリル酸塩粒子 (A 12) 及び細胞培養用担体 (C 24) を得た。この担体 (C 24) の保水量は 20 g/g であった。また、この担体 (C 24) には、4 mg/g の人工ポリペプチド (P 1) が含まれていた。

## [0134] &lt;実施例 2 5&gt;

「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）〔特表平 3－5 0 2 9 3 5 号公報中の実施例記載の方法に準じて製造した、Ile Lys Val Ala Val 配列（7）（x 2）の 1 3 個と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）9 配列（2 1）（y 1）の 1 2 個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有する Mw 約 1 1 万のポリペプチド（「プロネクチン L」）〕を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 2 5）を調製した。この担体（C 2 5）の保水量は 1 3 g／g であった。また、この担体（C 2 5）には、1 m g／g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

## [0135] &lt;実施例 2 6&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 1. 8 1 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 2）及び細胞培養用担体（C 2 6）を調製した。この担体（C 2 6）の保水量は 1 8 g／g であった。また、この担体（C 2 6）には、3 m g／g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

## [0136] &lt;実施例 2 7&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）及び細胞培養用担体（C 2 7）を調製した。この担体（C 2 7）の保水量は 2 1 g／g であった。また、この担体（C 2 7）には、5 m g／g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

## [0137] &lt;実施例 2 8&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使

用量を4.52部から0.09部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P14）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A4）及び細胞培養用担体（C28）を調製した。この担体（C28）の保水量は23 g/gであった。また、この担体（C28）には、5 mg/gの人工ポリペプチド（P14）が含まれていた。

[0138] <実施例29>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P15）〔特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて製造した、Ile Lys Val Ala Val配列（7）（x2）の5個と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）9配列（21）（y1）の5個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有するMw約2万のポリペプチド（「プロネクチンL2」）〕を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C29）を調製した。この担体（C29）の保水量は21 g/gであった。また、この担体（C29）には、1 mg/gの人工ポリペプチド（P15）が含まれていた。

[0139] <実施例30>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P16）〔特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて製造した、Ile Lys Val Ala Val配列（7）（x2）の3個と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）9配列（21）（y1）の3個とを有しこれらが交互に化学結合してなる構造を有するMw約1万のポリペプチド（「プロネクチンL3」）〕を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C30）を調製した。この担体（C30）の保水量は21 g/gであった。

また、この担体（C 3 0）には、1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 6）が含まれていた。

[0140] <実施例 3 1>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 7）〔Ile Lys Val Ala Val 配列（x 2）を有する Mw 5 2 9 のポリペプチド；Ile Lys Val Ala Val 配列（7）、NEOSYSTEM 社製〕を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）及び細胞培養用担体（C 3 1）を調製した。この担体（C 3 1）の保水量は 2 1 g / g であった。また、この担体（C 3 1）の人工ポリペプチド（P 1 7）の含有量は 0. 1 m g / g であった。

[0141] <実施例 3 2>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 5）及び細胞培養用担体（C 3 2）を調製した。この担体（C 3 2）の保水量は 2 2 g / g であった。また、この担体（C 3 2）には、6 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0142] <実施例 3 3>

<人工ポリペプチド（P 1 8）の準備>

「人工ポリペプチド（P 4）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 7）を使用すること」以外、実施例 9 の「人工ポリペプチド（P 5）の準備」と同様にして、人工ポリペプチド（P 1 8）〔Ile Lys Val Ala Val 配列（7）を約 1 0 個有するポリペプチド〕を得た。

[0143] <細胞培養用担体（C 3 3）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使

用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P18）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C33）を調製した。この担体（C33）の保水量は21 g/gであった。また、この担体（C33）には、0.3 mg/gの人工ポリペプチド（P18）が含まれていた。

[0144] <実施例34>

<人工ポリペプチド（P19）の準備>

「人工ポリペプチド（P4）の代わりに、人工ポリペプチド（P18）を使用すること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名：Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約10000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P19）〔Ile Lys Val Ala Val配列（7）を約20個有する。〕を得た。

[0145] <細胞培養用担体（C34）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P19）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C34）を調製した。この担体（C34）の保水量は21 g/gであった。また、この担体（C34）には、0.7 mg/gの人工ポリペプチド（P19）が含まれていた。

[0146] <実施例35>

<人工ポリペプチド（P20）の準備>

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P18）と人工ポリペプチド（P19）とをモル比1：1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex 30 pgを使用する代わりに、商品名Superdex 75 pgを使用すること」及び「M

w約1000の分画の代わりに、Mw約15000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P20）{Ile Lys Val Ala Val配列（7）を約30個有する。}を作製した。

[0147] <細胞培養用担体（C35）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P20）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C35）を調製した。この担体（C35）の保水量は21g/gであった。また、この担体（C35）には、1mg/gの人工ポリペプチド（P20）が含まれていた。

[0148] <実施例36>

<人工ポリペプチド（P21）の準備>

「人工ポリペプチド（P4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P19）同士で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex30pgを使用する代わりに、商品名Superdex75pgを使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約20000の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P21）{Ile Lys Val Ala Val配列（7）を約40個有する。}を作製した。

[0149] <細胞培養用担体（C36）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P1）の代わりに、人工ポリペプチド（P21）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）及び細胞培養用担体（C36）を調製した。この担体（C36）の保水量は21g/gであった。また、この担体（C36）には、2mg/gの人工ポリペプチド（P21）が含まれていた。

## [0150] &lt;実施例 3 7&gt;

## &lt;人工ポリペプチド (P 2 2) の準備&gt;

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 1 7) と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (6 4) からなるポリペプチドとをモル比 1 : 1 で反応させること」以外、実施例 9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P 2 2) {Ile Lys Val Ala Val 配列 (7) の約 1 個と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (6 4) の約 1 個とを有する。} を作製した。

## [0151] &lt;細胞培養用担体 (C 3 7) の調製&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P 1) の代わりに、人工ポリペプチド (P 2 2) を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 3) 及び細胞培養用担体 (C 3 7) を調製した。この担体 (C 3 7) の保水量は 2 1 g / g であった。また、この担体 (C 3 7) には、0. 2 m g / g の人工ポリペプチド (P 2 2) が含まれていた。

## [0152] &lt;実施例 3 8&gt;

## &lt;人工ポリペプチド (P 2 3) の準備&gt;

「人工ポリペプチド (P 4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P 1 7) と人工ポリペプチド (P 1 0 D) とをモル比 1 : 1 で反応させること」及び「Mw 約 1 0 0 0 の分画の代わりに、Mw 約 5 0 0 0 の分画を分取すること」以外、実施例 9 (1) と同様にして、人工ポリペプチド (P 2 3) {Ile Lys Val Ala Val 配列 (7) の約 1 個と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (6 4) の約 1 0 個とを有する。} を作製した。

## [0153] &lt;細胞培養用担体 (C 3 8) の調製&gt;

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を 4. 5 2 部から 0. 9 0 部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P 1) の代わりに、人工ポリペプチド (P 2 3) を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A 3) 及び細胞培養用

担体（C 3 8）を調製した。この担体（C 3 8）の保水量は2 1 g / gであった。また、この担体（C 3 8）には、0. 5 m g / gの人工ポリペプチド（P 2 3）が含まれていた。

[0154] <実施例 3 9>

<人工ポリペプチド（P 2 4）の準備>

「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 1 7）と人工ポリペプチド（P 1 1 A）とをモル比1 : 1で反応させること」及び「Mw約1 0 0 0の分画の代わりに、Mw約9 0 0 0の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 2 4） {Ile Lys Val Ala Val配列（7）の約1個とGly Ala Gly Ala Gly Ser配列（6 4）の約2 0個とを有する。} を作製した。

[0155] <細胞培養用担体（C 3 9）の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4. 5 2部から0. 9 0部に変更すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 2 4）を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）及び細胞培養用担体（C 3 9）を調製した。この担体（C 3 9）の保水量は2 1 g / gであった。また、この担体（C 3 9）には、1 m g / gの人工ポリペプチド（P 2 4）が含まれていた。

[0156] <実施例 4 0>

<人工ポリペプチド（P 2 5）の準備>

「人工ポリペプチド（P 4）同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド（P 1 7）と人工ポリペプチド（P 1 2 A）とをモル比1 : 1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名Superdex 3 0 p gを使用する代わりに、商品名Superdex 7 5 p gを使用すること」及び「Mw約1 0 0 0の分画の代わりに、Mw約1 3 0 0 0の分画を分取すること」以外、実施例9（1）と同様にして、人工ポリペプチド（P 2 5） {Ile Lys Val Ala Val配列（7）の約1個とGly Ala Gly Ala Gly Ser配列（6 4）

の約30個とを有する。} を作製した。

[0157] <細胞培養用担体 (C40) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P25) を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A3) 及び細胞培養用担体 (C40) を調製した。この担体 (C40) の保水量は21 g/gであった。また、この担体 (C40) には、1 mg/g の人工ポリペプチド (P25) が含まれていた。

[0158] <実施例41>

<人工ポリペプチド (P26) の準備>

「人工ポリペプチド (P4) 同士で反応させる代わりに、人工ポリペプチド (P17) と人工ポリペプチド (P13A) とをモル比1:1で反応させること」、「ゲルろ過カラムとして、商品名 Superdex 30 pg を使用する代わりに、商品名 Superdex 75 pg を使用すること」及び「Mw約1000の分画の代わりに、Mw約21000の分画を分取すること」以外、実施例9(1)と同様にして、人工ポリペプチド (P26) {Ile Lys Val Ala Val 配列 (7) の約1個と Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (64) の約50個とを有する。} を作製した。

[0159] <細胞培養用担体 (C41) の調製>

「重合時の架橋性単量体のエチレングリコールジグリシジルエーテルの使用量を4.52部から0.90部に変更すること」及び「人工ポリペプチド (P1) の代わりに、人工ポリペプチド (P26) を使用すること」以外、実施例1と同様にして、架橋ポリアクリル酸塩粒子 (A3) 及び細胞培養用担体 (C41) を調製した。この担体 (C41) の保水量は21 g/gであった。また、この担体 (C41) には、2 mg/g の人工ポリペプチド (P26) が含まれていた。

[0160] <実施例42>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 6）を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 2）を調製した。この担体（C 4 2）の保水量は 2 1 g / g であった。また、この担体（C 4 2）には、8 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0161] <実施例 4 3>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 7）〔実施例 1 9〕を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 3）を調製した。この担体（C 4 3）の保水量は 4 g / g であった。また、この担体（C 4 3）には、0. 1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0162] <実施例 4 4>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 8）〔実施例 2 0〕を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 4）を調製した。この担体（C 4 4）の保水量は 7 g / g であった。また、この担体（C 4 4）には、0. 2 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0163] <実施例 4 5>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 9）〔実施例 2 1〕を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 5）を調製した。この担体（C 4 5）の保水量は 2 8 g / g であった。また、この担体（C 4 5）には、6 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0164] <実施例 4 6>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1 0）【実施例 2 2】を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 6）を調製した。この担体（C 4 6）の保水量は 3 9 g / g であった。また、この担体（C 4 6）には、1 0 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0165] <実施例 4 7>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1 1）【実施例 2 3】を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 7）を調製した。この担体（C 4 7）の保水量は 4 8 g / g であった。また、この担体（C 4 7）には、1 0 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0166] <実施例 4 8>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1 2）【実施例 2 4】を使用すること」及び「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、細胞培養用担体（C 4 8）を調製した。この担体（C 4 8）の保水量は 2 0 g / g であった。また、この担体（C 4 8）には、2 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0167] <実施例 4 9>

水溶性カルボジイミド {1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド ハイドロクロライド、(株) 同仁化学研究所製} を 0. 1 m M の濃度で P B S に溶解させ、噴霧液（1）を得た。また、人工ポリペプチド（P 1）を 1  $\mu$  g / m L の濃度で P B S に溶解させ、噴霧液（2）を得た。

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 3）の 1 g に、噴霧液（1）0. 4 m L をスプレー噴霧しながら、約 2 5 °C で約 2 分間、スパチュラを用いて混合・攪

拌した後、静置下で1時間反応させて、カルボジイミド結合粒子を得た。

[0168] 引き続き、カルボジイミド結合粒子に、噴霧液(2) 0.4 mLをスプレー噴霧しながら、約25℃で混合・攪拌して1時間反応させて、人工ポリペプチド結合粒子を得た。その後、人工ポリペプチド結合粒子をPBS 40 mLを添加、吸引除去する洗浄操作を5回行い、さらにイオン交換水40 mLを添加、吸引除去する洗浄操作を2回行った。

[0169] 最後に、減圧乾燥機の中に入れ、120℃、0.1 kPa以下の条件での乾燥を4時間行い、本発明の細胞培養用担体(C49)を得た。この担体(C49)の保水量は21 g/gであった。また、この担体(C49)には、5 ng/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0170] <実施例50>

「水溶性カルボジイミドの濃度を0.1 mMから0.5 mMに変更したこと」及び「人工ポリペプチド(P1)の濃度を1 µg/mLから5 µg/mLに変更したこと」以外、実施例49と同様にして、本発明の細胞培養用担体(C50)を得た。この担体(C50)の保水量は21 g/gであった。また、この担体(C50)には、50 ng/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0171] <実施例51>

「水溶性カルボジイミドの濃度を0.1 mMから2 mMに変更したこと」及び「人工ポリペプチド(P1)の濃度を1 µg/mLから20 µg/mLに変更したこと」以外、実施例49と同様にして、本発明の細胞培養用担体(C51)を得た。この担体(C51)の保水量は21 g/gであった。また、この担体(C51)には、500 ng/gの人工ポリペプチド(P1)が含まれていた。

[0172] <実施例52>

「架橋ポリアクリル酸塩粒子(A1)の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子(A3)を使用すること」、「水溶性カルボジイミドの濃度を60 mMから500 mMに変更したこと」及び「人工ポリペプチド(P1)の濃度を6

00  $\mu$ g/mLから5 mg/mLに変更したこと」以外、実施例1と同様にして、本発明の細胞培養用担体（C52）を得た。この担体（C52）の保水量は19 g/gであった。また、この担体（C52）には、50 mg/gの人工ポリペプチド（P1）が含まれていた。

[0173] <実施例53>

「架橋ポリアクリル酸塩粒子（A1）の代わりに架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）を使用すること」、「水溶性カルボジイミドの濃度を60 mMから500 mMに変更したこと」及び「人工ポリペプチド（P1）の濃度を600  $\mu$ g/mLから25 mg/mLに変更したこと」以外、実施例1と同様にして、本発明の細胞培養用担体（C53）を得た。この担体（C53）の保水量は14 g/gであった。また、この担体（C53）には、500 mg/gの人工ポリペプチド（P1）が含まれていた。

[0174] <比較例1>

架橋ポリアクリル酸塩粒子（A3）を比較用の細胞培養用担体（C54）とした。この担体（C54）の保水量は21 g/gであった。

[0175] <比較例2>

市販のコラーゲン結合デキストランビーズ（商品名：Cytodex 3、アマシャムバイオサイエンス（株）製）を比較用の細胞培養用担体（C55）とした。この担体（C55）の保水量は9 g/gであった。

[0176] <比較例3>

特開2003-189848号公報の実施例1の記載を参考にして、以下のようにして、比較用の細胞培養用担体（C56）を得た。スチレン99%、ジビニルベンゼン1%を懸濁重合して得られたポリスチレンビーズを目開きが63  $\mu$ mのふるい及び53  $\mu$ mのふるい（JIS Z8801-1:2000）により分級して、粒子径53~63  $\mu$ mの粒子を得た。

[0177] 次いで、人工ポリペプチド（P1）の4.5規定の過塩素酸リチウム水溶液〔人工ポリペプチド（P1）の濃度；1 mg/mL〕をリン酸バッファー液（PBS）で人工ポリペプチド（P1）の濃度が15  $\mu$ g/mLとなるよ

うに希釈し、人工ポリペプチド（P 1）溶液を作製した。

[0178] 人工ポリペプチド（P 1）溶液の25 mLに上記で得られたビーズを5 g 加え、ポリフッ化エチレン樹脂〔テフロン（登録商標）〕製攪拌子で12時間攪拌した。得られたビーズスラリーを振盪器上にセットしたステンレス製バットに移し、100℃の熱風を吹きつけながら、24時間振盪乾燥した。得られた乾燥ビーズをPBS 50 mLで2回洗浄し、乾燥することにより、比較用の細胞培養用担体（C 5 6）を得た。この担体（C 5 6）の保水量は0 g / gであった。また、この担体（C 5 6）には、1 mg / gの人工ポリペプチド（P 1）が含まれていた。

[0179] <比較例 4>

攪拌機、モノマー供給管、窒素ガス導入管、温度計、還流冷却器を備えた反応容器にシクロヘキサン624部、重合分散剤としてソルビタンモノステアレート3.1部を仕込み、窒素バブリングを30分以上行って、溶存空気を追い出し75℃まで昇温した。別の反応器にアクリルアミド138部及び水242部を仕込んだ。この水溶液に架橋性単量体〔N, N' -メチレンビスアクリルアミド〕0.0098部及び重合開始剤〔過硫酸カリウム〕0.278部、連鎖移動剤〔次亜リン酸ナトリウム〕0.053部を添加した後、窒素バブリングを行い、溶存空気を追い出しモノマー水溶液を得た。

[0180] 得られたモノマー水溶液を上記の重合反応器のモノマー供給管より6.5 mL / 分の割合で連続的に重合反応器内の攪拌中（攪拌速度は500 rpm）のシクロヘキサン液中に約1時間かけて供給してシクロヘキサン還流下で重合を行った。次に共沸脱水によって160部の水を抜き出した後、含水ゲルポリマーを取り出し、更に120℃で2時間乾燥して、乾燥架橋ポリアクリルアミドを得た。乾燥架橋ポリアクリルアミドを、目開きが63 μmのふるい及び53 μmのふるい（JIS Z 8801-1:2000）により分級して、粒子径53~63 μmの粒子〔架橋ポリアクリルアミド粒子〕を得た。

[0181] 「架橋ポリアクリル酸塩粒子（A 1）の代わりに架橋ポリアクリルアミド

粒子を使用すること」以外、実施例 1 と同様にして、比較用の細胞培養用担体（C 5 7）を得た。この担体（C 5 7）の保水量は 4 g / g であった。また、この担体（C 5 7）には、0. 1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1）が含まれていた。

[0182] <比較例 5>

「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、比較例 3 と同様にして、比較用の細胞培養用担体（C 5 8）を得た。この担体（C 5 8）の保水量は 0 g / g であった。また、この担体（C 5 8）には、1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0183] <比較例 6>

「人工ポリペプチド（P 1）の代わりに、人工ポリペプチド（P 1 4）を使用すること」以外、比較例 4 と同様にして、比較用の細胞培養用担体（C 5 9）を調製した。この担体（C 5 9）の保水量は 4 g / g であった。また、この担体（C 5 9）には、0. 1 m g / g の人工ポリペプチド（P 1 4）が含まれていた。

[0184] <細胞増殖性評価 1>

実施例 1 ～ 2 4、4 9 ～ 5 3 及び比較例 1 ～ 4 の細胞培養用担体（C 1）～（C 2 4）及び（C 4 9）～（C 5 7）について、生理食塩水で膨潤した細胞培養用担体を 1 5 0 G で 9 0 秒間遠心脱水を行い余剰水を取り除いたものの重量が 4 g になるように、各々の担体を作動容量 1 0 0 m L のスピナーフラスコに投入した。すなわち、担体（C 1）は 0. 2 9 g、担体（C 2）は 0. 2 1 g、担体（C 3）は 0. 1 8 g、担体（C 4）は 0. 1 7 g、担体（C 5）～（C 7）は 0. 1 8 g、担体（C 8）は 0. 1 7 g、担体（C 9）～（C 1 7）は 0. 1 8 g、担体（C 1 8）は 0. 1 8 g、担体（C 1 9）は 0. 8 0 g、担体（C 2 0）は 0. 5 0 g、担体（C 2 1）は 0. 1 4 g、担体（C 2 2）は 0. 1 0 g、担体（C 2 3）は 0. 0 8 g、担体（C 2 4）は 0. 1 9 g、担体（C 4 9）～（C 5 1）は 0. 1 8 g、担体

(C52)は0.20g、担体(C53)は0.27g、担体(C54)は0.18g、担体(C55)は0.40g、担体(C56)は4g、担体(C57)は0.80gを各々スピナーフラスコに投入した。

[0185] 次に、各々のスピナーフラスコへ、生理食塩水を100mL／フラスコで加え、オートクレーブ滅菌(121℃、20分間)した。オートクレーブ滅菌後、生理食塩水をアスピレータで吸引除去した後、無血清培地(商品名：VP-SFM、インビトロジェン(株)製)に抗菌剤(商品名：PSA、カスケード社製)を0.2%で含有させた無血清培地を50mL／フラスコで添加し、1時間放置した後、培地を吸引除去し、再度、同じ無血清培地を100mL／フラスコで添加した。スピナーフラスコを37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中に2時間放置した後、予めプレ培養していたVERO細胞(大日本住友製薬(株)製)を細胞濃度が20万個／mLになるように無血清培地に播種した。37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中で、30rpmの攪拌をしながら、7日間の培養を行った。尚、培養4日目、5日目及び6日目に培地の半分を交換した。培養7日目にサンプリングし、単位体積当たりの細胞核数をクリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法により計数し、培地中の細胞濃度(万個／mL)を測定した。これらの結果を、細胞培養用担体の保水量と共に表1に示した。

[0186]

[表1]

|    |    | 人工ポリペプチド(F) |         | 保水量<br>(g/g) | 細胞濃度<br>(万個/mL) |
|----|----|-------------|---------|--------------|-----------------|
|    |    | 配列(X)の数     | 配列(Y)の数 |              |                 |
| 実  | 1  | 13          | 12      | 13           | 88              |
|    | 2  | 13          | 12      | 18           | 113             |
|    | 3  | 13          | 12      | 21           | 146             |
|    | 4  | 13          | 12      | 23           | 61              |
|    | 5  | 5           | 5       | 21           | 130             |
|    | 6  | 3           | 3       | 21           | 77              |
|    | 7  | 1           | 0       | 21           | 30              |
|    | 8  | 13          | 12      | 22           | 107             |
|    | 9  | 10          | 0       | 21           | 43              |
|    | 10 | 20          | 0       | 21           | 36              |
| 施  | 11 | 30          | 0       | 21           | 26              |
|    | 12 | 40          | 0       | 21           | 26              |
|    | 13 | 1           | 1       | 21           | 40              |
|    | 14 | 1           | 10      | 21           | 41              |
|    | 15 | 1           | 20      | 21           | 31              |
|    | 16 | 1           | 30      | 21           | 25              |
|    | 17 | 1           | 50      | 21           | 23              |
|    | 18 | 13          | 12      | 21           | 82              |
|    | 19 | 13          | 12      | 4            | 29              |
|    | 20 | 13          | 12      | 7            | 29              |
| 例  | 21 | 13          | 12      | 28           | 60              |
|    | 22 | 13          | 12      | 39           | 29              |
|    | 23 | 13          | 12      | 48           | 28              |
|    | 24 | 13          | 12      | 20           | 94              |
|    | 49 | 13          | 12      | 21           | 20              |
|    | 50 | 13          | 12      | 21           | 32              |
|    | 51 | 13          | 12      | 21           | 87              |
|    | 52 | 13          | 12      | 19           | 54              |
|    | 53 | 13          | 12      | 14           | 25              |
|    | 1  | —           | —       | 21           | 6               |
| 比較 | 2  | —           | —       | 9            | 15              |
|    | 3  | 13          | 12      | 0            | 14              |
|    | 4  | 13          | 12      | 4            | 10              |

[0187] 表1の結果から、比較例1～4の細胞培養用担体はVERO細胞が全く増殖していないのに対し、本発明の細胞培養用担体（実施例1～24及び49～53）はVERO細胞が良く増殖していることが判明した。

[0188] <細胞増殖性評価2>

「無血清培地（商品名：VP-SFM、インビトロジェン（株）製）を無血清培地（商品名：Opti-PRO™SFM、インビトロジェン（株）製）に変更したこと」及び「VERO細胞をMDCK細胞（大日本住友製薬（株）製）」に変更したこと以外、<細胞増殖性評価1>と同様にして、培地中の細胞濃度（万個/mL）を測定した。これらの結果を、細胞培養用担体の保水量と共に表2に示した。

[0189]

[表2]

|   |    | 人工ポリペプチド(P) |         | 保水量<br>(g/g) | 細胞濃度<br>(万個/mL) |
|---|----|-------------|---------|--------------|-----------------|
|   |    | 配列(X)の数     | 配列(Y)の数 |              |                 |
| 実 | 1  | 13          | 12      | 13           | 158             |
|   | 2  | 13          | 12      | 18           | 180             |
|   | 3  | 13          | 12      | 21           | 227             |
|   | 4  | 13          | 12      | 23           | 182             |
|   | 5  | 5           | 5       | 21           | 220             |
|   | 6  | 3           | 3       | 21           | 189             |
|   | 7  | 1           | 0       | 21           | 111             |
|   | 8  | 13          | 12      | 22           | 207             |
|   | 9  | 10          | 0       | 21           | 121             |
|   | 10 | 20          | 0       | 21           | 105             |
| 施 | 11 | 80          | 0       | 21           | 90              |
|   | 12 | 40          | 0       | 21           | 83              |
|   | 13 | 1           | 1       | 21           | 128             |
|   | 14 | 1           | 10      | 21           | 128             |
|   | 15 | 1           | 20      | 21           | 120             |
|   | 16 | 1           | 30      | 21           | 90              |
|   | 17 | 1           | 50      | 21           | 60              |
|   | 18 | 13          | 12      | 21           | 154             |
| 例 | 19 | 13          | 12      | 4            | 68              |
|   | 20 | 13          | 12      | 7            | 68              |
|   | 21 | 13          | 12      | 28           | 108             |
|   | 22 | 13          | 12      | 39           | 74              |
|   | 23 | 13          | 12      | 48           | 66              |
|   | 24 | 13          | 12      | 20           | 158             |
|   | 49 | 13          | 12      | 21           | 45              |
|   | 50 | 13          | 12      | 21           | 49              |
|   | 51 | 13          | 12      | 21           | 131             |
|   | 52 | 13          | 12      | 19           | 81              |
|   | 53 | 13          | 12      | 14           | 46              |
|   | 1  | -           | -       | 21           | 12              |
|   | 2  | -           | -       | 9            | 39              |
|   | 3  | 13          | 12      | 0            | 37              |
|   | 4  | 13          | 12      | 4            | 18              |

[0190] 表2の結果から、本発明の細胞培養用担体（実施例1～24及び49～53）は、比較例1～4の細胞培養用担体に比べ、MDCK細胞が格段に増殖していることが判明した。

[0191] <細胞増殖性評価3>

実施例1～24、49～53及び比較例1～4の細胞培養用担体（C1）～（C24）及び（C49）～（C57）について、生理食塩水で膨潤した細胞培養用担体を150Gで90秒間遠心脱水を行い余剰水を取り除いたものの重量が0.4gになるように、各々の担体を作動容量10mLのスピナーフラスコに投入した。すなわち、担体（C1）は0.029g、担体（C2）は0.021g、担体（C3）は0.018g、担体（C4）は0.017g、担体（C5）～（C7）は0.018g、担体（C8）は0.017g、担体（C9）～（C17）は0.018g、担体（C18）は0.018g、担体（C19）は0.080g、担体（C20）は0.050g、担体（C21）は0.014g、担体（C22）は0.010g、担体（C23）は0.008g、担体（C24）は0.019g、担体（C49）～（C51）は0.18g、担体（C52）は0.20g、担体（C53）は0.27g、担体（C54）は0.018g、担体（C55）は0.04

0 g、担体（C56）は0.4 g、担体（C57）は0.080 gを各々スピンナーフラスコに投入した。

[0192] 次に、各々のスピンナーフラスコへ、生理食塩水を10 mL／フラスコで加え、オートクレーブ滅菌（121℃、20分間）した。オートクレーブ滅菌後、生理食塩水をアスピレータで吸引除去した後、血清培地 {Opti-MEM™ I 培地（インビトロジェン（株）製）に、牛インスリン（シグマアルドリッチ社製）を5  $\mu$ g/mL、ヒドロコルチゾン（シグマアルドリッチ社製）を400 ng/mL、イソプロテレノール（シグマアルドリッチ社製）を250 ng/mL、rhEGF（シグマアルドリッチ社製）を10 ng/mL、牛胎児血清（インビトロジェン（株）製）を10容量%及び抗菌剤（商品名：PSA、カスケード社製）を0.2重量%で含有させた血清培地} を5 mL／フラスコで添加し、1時間放置した後、培地を吸引除去し、再度、同じ血清培地を10 mL／フラスコで添加した。スピンナーフラスコを37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中に2時間放置した後、予めプレ培養していた上皮細胞（商品名：NHEK（F）、倉敷紡績（株）製）を細胞濃度が20万個/mLになるように血清培地に播種した。37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中で、30 rpmの攪拌をしながら、7日間の培養を行った。尚、培養4日目、5日目及び6日目に培地の半分を交換した。培養7日目にサンプリングし、単位体積当たりの細胞核数をクリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法により計数し、培地中の細胞濃度（万個/mL）を測定した。これらの結果を、細胞培養用担体の保水量と共に表3に示した。

[0193]

[表3]

|             |    | 人工ポリペプチド(P) |         | 保水量<br>(g/g) | 細胞濃度<br>(万個/mL) |
|-------------|----|-------------|---------|--------------|-----------------|
|             |    | 配列(X)の数     | 配列(Y)の数 |              |                 |
| 実<br>施<br>例 | 1  | 13          | 12      | 13           | 61              |
|             | 2  | 13          | 12      | 18           | 65              |
|             | 3  | 13          | 12      | 21           | 75              |
|             | 4  | 13          | 12      | 23           | 62              |
|             | 5  | 5           | 5       | 21           | 66              |
|             | 6  | 3           | 3       | 21           | 56              |
|             | 7  | 1           | 0       | 21           | 44              |
|             | 8  | 13          | 12      | 22           | 67              |
|             | 9  | 10          | 0       | 21           | 49              |
|             | 10 | 20          | 0       | 21           | 35              |
| 比<br>較<br>例 | 11 | 30          | 0       | 21           | 29              |
|             | 12 | 40          | 0       | 21           | 24              |
|             | 13 | 1           | 1       | 21           | 54              |
|             | 14 | 1           | 10      | 21           | 54              |
|             | 15 | 1           | 20      | 21           | 49              |
|             | 16 | 1           | 30      | 21           | 28              |
|             | 17 | 1           | 50      | 21           | 24              |
|             | 18 | 13          | 12      | 21           | 48              |
|             | 19 | 13          | 12      | 4            | 25              |
|             | 20 | 13          | 12      | 7            | 25              |
| 比<br>較<br>例 | 21 | 13          | 12      | 28           | 48              |
|             | 22 | 13          | 12      | 39           | 27              |
|             | 23 | 13          | 12      | 48           | 22              |
|             | 24 | 13          | 12      | 20           | 47              |
|             | 49 | 13          | 12      | 21           | 13              |
|             | 50 | 13          | 12      | 21           | 24              |
|             | 51 | 13          | 12      | 21           | 48              |
|             | 52 | 13          | 12      | 19           | 40              |
|             | 53 | 13          | 12      | 14           | 15              |
|             | 1  | —           | —       | 21           | 1               |
| 比<br>較<br>例 | 2  | —           | —       | 9            | 11              |
|             | 3  | 13          | 12      | 0            | 3               |
|             | 4  | 13          | 12      | 4            | 6               |

[0194] 表3の結果から、比較例1～4の細胞培養用担体は上皮細胞が全く増殖していないのに対し、本発明の細胞培養用担体（実施例1～24及び49～53）は上皮細胞が良く増殖していることが判明した。

[0195] <細胞増殖性評価4>

実施例25～48、比較例1～2及び比較例5～6の細胞培養用担体（C25）～（C48）、（C54）～（C55）及び（C58）～（C59）について、生理食塩水で膨潤した細胞培養用担体を150Gで90秒間遠心脱水を行い余剰水を取り除いたものの重量が4gになるように、各々の担体を作動容量100mLのスピナーフラスコに投入した。すなわち、担体（C25）は0.29g、担体（C26）は0.21g、担体（C27）は0.18g、担体（C28）は0.17g、担体（C29）～（C31）は0.18g、担体（C32）は0.17g、担体（C33）～（C41）は0.18g、担体（C42）は0.18g、担体（C43）は0.80g、担体（C44）は0.50g、担体（C45）は0.14g、担体（C46）は0.10g、担体（C47）は0.08g、担体（C48）は0.19g、担体（C54）は0.18g、担体（C55）は0.40g、担体（C58）は4g、担体（C59）は0.80gを各々スピナーフラスコに投入

した。各々のスピナーフラスコへ、生理食塩水を100mL／フラスコで加え、オートクレーブ滅菌（121℃、20分間）した。オートクレーブ滅菌後、生理食塩水をアスピレータで吸引除去した後、PBSを50mL／フラスコで添加し、1時放置した。

[0196] 次に、PBSを、アスピレータで吸引除去し、MEMダルベッコ液体培地（大日本住友製薬（株）製）に1容量%の牛胎児血清（インビトロジェン（株）製）を加えた血清培地を50mL／フラスコで添加し、1時間放置した後、培地を吸引除去し、再度、同じ血清培地を100mL／フラスコで添加した。スピナーフラスコを37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中に2時間放置した後、予めプレ培養していたHT-1080細胞（大日本住友製薬（株）製）を細胞濃度が20万個／mLになるように培地に播種した。37℃、二酸化炭素ガス濃度5容量%のCO<sub>2</sub>インキュベーターの中で、30rpmの攪拌をしながら、7日間の培養を行った。尚、培養4日目、5日目および6日目に培地の半分を交換した。培養7日目にサンプリングし、単位体積当たりの細胞核数をクリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法により計数し、培地中の細胞濃度（個／mL）を測定した。これらの結果を、細胞培養用担体の保水量と共に表4に示した。

[0197] [表4]

|             | 人工ポリペプチド(P) |         | 保水量<br>(g/g) | 細胞濃度<br>(万個/mL) |
|-------------|-------------|---------|--------------|-----------------|
|             | 配列(X)の数     | 配列(Y)の数 |              |                 |
| 実<br>施<br>例 | 25          | 13      | 12           | 7.1             |
|             | 26          | 13      | 12           | 9.6             |
|             | 27          | 13      | 12           | 8.9             |
|             | 28          | 13      | 12           | 7.4             |
|             | 29          | 5       | 5            | 7.9             |
|             | 30          | 3       | 3            | 7.4             |
|             | 31          | 1       | 0            | 5.0             |
|             | 32          | 13      | 12           | 7.9             |
|             | 33          | 10      | 0            | 5.9             |
|             | 34          | 20      | 0            | 5.1             |
| 比<br>較<br>例 | 35          | 30      | 0            | 3.9             |
|             | 36          | 40      | 0            | 3.1             |
|             | 37          | 1       | 1            | 6.1             |
|             | 38          | 1       | 10           | 6.4             |
|             | 39          | 1       | 20           | 5.1             |
|             | 40          | 1       | 30           | 3.3             |
|             | 41          | 1       | 50           | 3.3             |
|             | 42          | 13      | 12           | 5.0             |
|             | 43          | 13      | 12           | 2.3             |
|             | 44          | 13      | 12           | 3.1             |
| 比<br>較<br>例 | 45          | 13      | 12           | 5.3             |
|             | 46          | 13      | 12           | 2.7             |
|             | 47          | 13      | 12           | 2.6             |
|             | 48          | 13      | 12           | 4.1             |
|             | 1           | -       | -            | 2.1             |
|             | 2           | -       | -            | 9               |
| 比<br>較<br>例 | 5           | 13      | 12           | 0               |
|             | 6           | 13      | 12           | 4               |

[0198] 表4の結果から、比較例1～2及び比較例5～6の細胞培養用担体はHT-1080細胞が全く増殖していないのに対し、本発明の細胞培養用担体（

実施例 25～48) は HT-1080 細胞が良く増殖していることが判明した。

### 産業上の利用可能性

- [0199] 本発明の細胞培養用担体は、無血清培養において優れた細胞増殖性を発揮することができ、またウイルス等の感染因子の混入の危険性がないため、細胞が関係する、研究開発、有用物質生産及び治療等に極めて有用である。
- [0200] 研究開発用としては、分化機能等の細胞機能評価用細胞の培養、動物実験（毒性試験、刺激性試験及び代謝機能試験等）の代替用細胞の培養、遺伝子や蛋白質導入用細胞の培養等に利用できる。
- [0201] 有用物質生産用としては、サイトカイン、血栓溶解剤、血液凝固因子製剤、ワクチン、ホルモン、抗生物質、抗体及び増殖因子等の生産用細胞の培養に利用できる。これらのうち、ワクチンの生産用細胞の培養に好適である。
- [0202] 治療用としては、皮膚、頭蓋骨、筋肉、皮膚組織、骨、軟骨、血管、神経、腱、靱帯、毛胞組織、粘膜組織、歯周組織、象牙質、骨髄、網膜、漿膜、胃腸管及び脂肪等の組織、並びに肺、肝、脾及び腎等の臓器の細胞培養に利用できる。

### 請求の範囲

- [1] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）と、細胞接着性最小アミノ酸配列（X）を1分子中に少なくとも1個有する人工ポリペプチド（P）とからなり、保水量が2～50 g/gであることを特徴とする細胞培養用担体。
- [2] 細胞培養用担体の保水量が、5～40 g/gである請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [3] 細胞培養用担体の保水量が、10～30 g/gである請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [4] 細胞培養用担体の外形状が、球状である請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [5] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）が、（メタ）アクリル酸及び／又は（メタ）アクリル酸のアルカリ金属塩を含む単量体水溶液を逆相懸濁重合して製造される粒子である請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [6] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）が、表面架橋剤で架橋処理されている粒子である請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [7] 人工ポリペプチド（P）1分子中の細胞接着性最小アミノ酸配列（X）の個数が1～50個である請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [8] 細胞接着性最小アミノ酸配列（X）が、Arg Gly Asp配列である請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [9] 人工ポリペプチド（P）が、さらに、補助アミノ酸配列（Y）を1分子中に少なくとも1個有してなる人工ポリペプチドである請求項1に記載の細胞培養用担体。
- [10] 人工ポリペプチド（P）1分子中の補助アミノ酸配列（Y）の個数が4～20個である請求項9に記載の細胞培養用担体。
- [11] 補助アミノ酸配列（Y）が、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>n</sub>配列である請求項9に記載の細胞培養用担体。
- [12] 人工ポリペプチド（P）が、細胞接着性最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）とを交互に化学結合してなる構造を有する請求項9に記載の細胞培養用担体。

- [13] 人工ポリペプチド（P）が、化学結合及び／又は物理吸着で架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）に結合している請求項 1 に記載の細胞培養用担体。
- [14] 人工ポリペプチド（P）の含有量が、細胞培養用担体の乾燥重量を基準として、 $500 \text{ ng/g} \sim 50 \text{ mg/g}$  である請求項 1 に記載の細胞培養用担体。
- [15] 架橋ポリ（メタ）アクリル酸（塩）粒子（A）と、細胞接着性最小アミノ酸配列（X）を 1 分子中に少なくとも 1 個有する人工ポリペプチド（P）とを溶媒中で混合して細胞培養用担体を得る工程を含み、細胞培養用担体の保水量が  $2 \sim 50 \text{ g/g}$  であることを特徴とする細胞培養用担体の製造方法。
- [16] 請求項 1 に記載の細胞培養用担体及び無血清培地を用いて、細胞を培養する工程を含む有用物質の生産方法。
- [17] 有用物質が、サイトカイン、血栓溶解剤、血液凝固因子製剤、ワクチン、ホルモン、抗生物質、抗体又は増殖因子である請求項 16 に記載の生産方法。
- [18] 請求項 1 に記載の細胞培養用担体及び無血清培地を用いて、細胞を培養する工程を含む組織又は臓器の生産方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000217

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M3/00, C12N5/06, C12P21/00, C12P21/08

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 | 1996-2007 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2007 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2007 |

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/Caplus (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 04-135481 A (Earthnics Corp.),<br>08 May, 1992 (08.05.92),<br>Full text (particularly, page 2, upper left column, lines 3 to 9, lower left column, line 12 to lower right column, lines 2, 7 to 10;<br>page 3, upper left column, lines 12 to 20,<br>upper right column, lines 4 to 10)<br>(Family: none) | 1-18                  |
| Y         | JP 2002-191353 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.),<br>09 July, 2002 (09.07.02),<br>Full text (particularly, Claims 1 to 3, 5;<br>Par. No. [0003])<br>(Family: none)                                                                                                                                         | 1-18                  |

☒ 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  
11 June, 2007 (11.06.07)

Date of mailing of the international search report  
19 June, 2007 (19.06.07)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000217

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | SHIVAKUMAR, K. et al., "Cell adhesion and growth on synthetic hydrogel beads", Bull. Mater. Sci., (1989), Vol.12, No.1, pp.27-32, full text                                                       | 17                    |
| Y         | JP 11-5808 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 12 January, 1999 (12.01.99), Full text (particularly, Par. Nos. [0031], [0033])<br>& EP 874002 A2 & US 5998553 A                                        | 5,6                   |
| Y         | JP 2001-2935 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 09 January, 2001 (09.01.01), Full text (particularly, Claim 4; Par. No. [0009])<br>(Family: none)                                                     | 5,6                   |
| Y         | JP 2003-165883 A (San-DiaPolymers, Inc.), 10 June, 2003 (10.06.03), Full text (particularly, Par. Nos. [0037], [0051] to [0056])<br>(Family: none)                                                | 5,6                   |
| A         | JAYAKRISHNAN, A. et al., "Hydrogel microspheres from crosslinked poly(methyl methacrylate): synthesis and biocompatibility studies", Bull. Mater. Sci., (1989), Vol.12, No.1, pp.17-25, full text | 1-18                  |
| A         | ESTY, A., "Receptor-specific serum-free cell attachment using a highly stable engineered protein polymer", American Biotechnology Laboratory, (1991), Vol.9, No.3, p.44, full text                | 1-18                  |
| A         | CAPPELLO, J. and CRISSMAN, J.W., "The design and production of bioactive protein polymers for biomedical applications", Polymer Preprints, (1994), Vol.31, No.1, pp.193-194, full text            | 1-18                  |
| A         | JP 03-502935 A (Syntro Corp.), 04 July, 1991 (04.07.91), Full text<br>& WO 1990/005177 A & EP 406357 A                                                                                            | 1-18                  |

## 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, C12N5/06(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00, C12N5/06, C12P21/00, C12P21/08

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 0 7 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 0 7 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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Y               | JP 04-135481 A, (アースニクス株式会社), 1992.05.08,<br>全文(特に、第 2 頁: 左上欄 第 3-9 行, 左下欄 第 12 行-右下欄 第 2 行, 右下<br>欄 第 7-10 行, 第 3 頁: 左上欄 第 12-20 行, 右上欄 第 4-10 行参照)。<br>(ファミリーなし) | 1-18             |
| Y               | JP 2002-191353 A, (三洋化成工業株式会社), 2002.07.09,<br>全文(特に、請求項 1-3, 請求項 5, 段落【0003】参照)。<br>(ファミリーなし)                                                                     | 1-18             |

☒ 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

1 1 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 6 . 2 0 0 7

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)

佐藤 巖

4 B

3 3 3 4

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

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                  |                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | SHIVAKUMAR, K. et al.,<br>"Cell adhesion and growth on synthetic hydrogel beads",<br>Bull. Mater. Sci., (1989), Vol.12, No.1, pp.27-32, 全文                                                       | 17               |
| Y                     | JP 11-5808 A, (三菱化学株式会社), 1999.01.12,<br>全文(特に、段落【0031】 , 【0033】 参照)。<br>& EP 874002 A2<br>& US 5998553 A                                                                                        | 5,6              |
| Y                     | JP 2001-2935 A, (三菱化学株式会社), 2001.01.09,<br>全文(特に、請求項 4, 段落【0009】 参照)。<br>(ファミリーなし)                                                                                                               | 5,6              |
| Y                     | JP 2003-165883 A, (サンダイヤポリマー株式会社), 2003.06.10,<br>全文(特に、段落【0037】 , 【0051～0056】 参照)。<br>(ファミリーなし)                                                                                                 | 5,6              |
| A                     | JAYAKRISHNAN, A. et al., "Hydrogel microspheres from crosslinked<br>poly(methyl methacrylate): synthesis and biocompatibility studies",<br>Bull. Mater. Sci., (1989), Vol.12, No.1, pp.17-25, 全文 | 1-18             |
| A                     | ESTY, A., "Receptor-specific serum-free cell attachment using a highly<br>stable engineered protein polymer",<br>American Biotechnology Laboratory, (1991), Vol.9, No.3, p.44, 全文                | 1-18             |
| A                     | CAPPELLO, J. and CRISSMAN, J.W., "The design and production of<br>bioactive protein polymers for biomedical applications",<br>Polymer Preprints, (1994), Vol.31, No.1, pp.193-194, 全文            | 1-18             |
| A                     | JP 03-502935 A, (シントロ コーポレーション), 1991.07.04, 全文<br>& WO 1990/005177 A<br>& EP 406357 A                                                                                                           | 1-18             |