

(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
2016 年 10 月 6 日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/159153 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C08F 297/00 (2006.01) *C12M 3/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/060513
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 30 日(30.03.2016)
- (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 2015-072908 2015 年 3 月 31 日(31.03.2015) JP
- (71) 出願人: 東ソー株式会社(TOSOH CORPORATION)
[JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町 4 5 6 0
番地 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 山田 悟(YAMADA Satoru); 〒5108540 三重
県四日市市霞 1 丁目 8 番地 東ソー株式会社
四日市事業所内 Mie (JP). 今富伸哉(IMATOMI
Shinya); 〒5108540 三重県四日市市霞 1 丁目 8 番
地 東ソー株式会社 四日市事業所内 Mie (JP).
近藤聡(KONDOU Satoru); 〒5108540 三重県四日市
市霞 1 丁目 8 番地 東ソー株式会社 四日市事
業所内 Mie (JP). 前島雪絵(MAEJIMA Yukie); 〒
5108540 三重県四日市市霞 1 丁目 8 番地 東
ソー株式会社 四日市事業所内 Mie (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: BASE MEMBER FOR CELL CULTURING USE, METHOD FOR PRODUCING SAME, AND CELL CULTURING METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 細胞培養基材、その製造方法、およびそれを用いた細胞培養方法

(57) Abstract: When the above-mentioned temperature-responsive polymer is used in a base member for cell culturing use, it is needed to lower the temperature of the base member for cell culturing use to a temperature equal to or lower than the critical solution of the polymer. In this case, however, the temperature of cells is also lowered simultaneously. In addition, since cells detached from the base member have a sheet-like form, it is needed to disperse the cells by pipetting or the like while keeping the cells at a low temperature, for the processing of the cells. As a result, the time of cooling of the cells is prolonged. The lowering of the temperature of the cells may induce the reduction in activity of the cells, and therefore it is needed to shorten the time of cooling of the cells. [Solution] The problem can be solved by providing: a base member for cell culturing use, which has a surface coated with a block copolymer, wherein the block copolymer contains a temperature-responsive polymer block (A) that has a lower critical solution temperature (LCST) against water of 0 to 50°C and a hydrophilic polymer block (B) that does not have a LCST ranging in the range from 0 to 50°C and has an HLB value (a Griffin method) of 9 to 20; and a base member for cell culturing use, which has a surface coated with a block copolymer, wherein the block copolymer contains a temperature-responsive polymer block (A) that has a lower critical solution temperature (LCST) against water of 0 to 50°C and a block (B) that meets such a requirement (i) that the block (B) does not have an LCST in the range from 0 to 50°C, such a requirement (ii) that the block (B) comprises a hydrophilic polymer of a monomer having at least one hydrophilic group selected from a carboxylic acid group, a carboxylic acid ester group, a carboxylic acid metal salt, a sulfonic acid group, a sulfonic acid ester group, a sulfonic acid metal salt, a hydroxy group, an alkoxy group, a phenoxy group, an amide group, a carbamoyl group, a sulfonamide group, a sulfamoyl group, a carbamate group, a phosphoric acid group, a metal salt of a phosphoric acid group, an oxyphosphoric acid group, a metal salt of an oxyphosphoric acid group, a phosphobetaine group, a sulfobetaine group, a carbobetaine group, a polyethylene glycol group and a pyrrolidone group and such a requirement (iii) the block (B) comprises the polymer mentioned in (ii) wherein the polymer contains at least one monomer unit selected from a monomer unit capable of forming an aromatic vinyl compound, a monomer unit capable of forming a (meth)acrylamide compound, a monomer unit capable of forming a fumaric acid diester compound, a monomer unit capable of forming vinyl chloride, a monomer unit capable of forming vinyl acetate, a monomer unit capable of forming (meth)acrylonitrile, a monomer unit capable of forming N-vinylimidazole and a monomer unit capable of forming N-vinylcarbazole.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/159153 A1



上記温度応答性ポリマーを細胞培養基材に用いる場合、臨海溶解以下に細胞培養 基材の温度を下げる必要があるが、同時に細胞を低温化してしまう。また、剥離してくる細胞はシート状であり、その後、細胞を加工するためには、低温を維持したまま、ピペッティング等で細胞を分散させる必要があり、さらに冷却時間が長くなってしまう。細胞の低温化は細胞の活性低下を及ぼすため、冷却時間の短縮が必要である。 解決手段：下記（Ａ）および（Ｂ） （Ａ）水に対する下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）が０℃～５０℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。 （Ｂ）０℃～５０℃の範囲にＬＣＳＴを持たない、ＨＬＢ値（グリフィン法）が９～２０の範囲にある親水性重合体のブロック。 のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材、ならびに下記（Ａ）および（Ｂ） （Ａ）水に対する下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）が０℃～５０℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。 （Ｂ）下記（ｉ）～（ｉｉｉ）の要件を満たすブロック。 （ｉ）０℃～５０℃の範囲にＬＣＳＴを持たない。 （ｉｉ）カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも１種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。 （ｉｉｉ）（ｉｉ）の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、（メタ）アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが生成するモノマー単位、Ｎービニルイミダゾールが生成するモノマー単位、Ｎービニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも１種のモノマー単位を含有する。 のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材を提供することにより前記課題を解決する。

明 細 書

発明の名称：

細胞培養基材、その製造方法、およびそれを用いた細胞培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、短時間での細胞剥離を可能にする細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法に関する。さらに本発明は、細胞を最大直径 $5\ \mu\text{m}$ ～ $300\ \mu\text{m}$ の大きさに剥離することを可能にする細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞培養は生化学的な現象の理解や有用物質の産生などに用いられ、また近年、幹細胞の発見や培養技術の進歩により、再生医療を始めとする細胞を用いた治療に大きな注目が寄せられている。

[0003] 細胞の多くは接着性を有しており、体内においてはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの生体高分子に接着し、増殖・分化することが知られている。同様に、細胞培養においても接着性を有する細胞の多くは、培養する際に何らかの基材に接着する必要がある。従来、基材としては表面処理したガラスあるいは高分子が用いられていた。例えば、ポリスチレンに γ 線照射あるいはシリコンコーティングを行なった基材がある。また、コラーゲンやフィブロネクチンのような生体高分子を表面に塗布した支持体も用いられる。

[0004] 増殖する細胞は基材上で培養後、一般的に別の基材に植え継ぐ必要があり、多くの場合にはタンパク質分解酵素が用いられている。タンパク質分解酵素は細胞表面にあるタンパク質を分解し、細胞と基材の間の結合および細胞間の結合を切る役目を担っている。一方、タンパク質分解酵素は細胞の生存率に大きな影響を与えることが知られており、タンパク質分解酵素を用いずに細胞を基材から分離する手法は細胞にダメージを与えない方法として重要である。再生医療においても同様に、体外で培養した細胞にダメージを与え

ずに、さらに細胞間の結合を切断しない方法で細胞又は組織化した細胞を基材から分離し、体内に戻すことが求められており、タンパク質分解酵素を用いずに基材から分離する方法が求められている。

[0005] 上記問題を解決するために、温度応答性ポリマーを基材表面に被覆した細胞培養基材が開示されている。（特許文献1）。このような基材によれば、周囲環境の温度降下による温度応答性ポリマーのゾル転移で基材表面の接着力を弱めて、細胞を剥離させ、ダメージを与えることなく細胞を分別回収することができる。通常、細胞は体温付近で接着・培養する必要があるため、培養後、体温以下で細胞を剥離できる基材が必要となる。

[0006] 水中におけるゾル転移温度〔臨界溶解温度（T）〕が体温以下の範囲にある温度応答性ポリマーとして、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（T = 32℃）、ポリ-N-n-プロピルアクリルアミド（T = 21℃）、ポリ-N-n-プロピルメタクリルアミド（T = 32℃）、ポリ-N-エトキシエチルアクリルアミド（T = 約35℃）、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド（T = 約28℃）、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド（T = 約35℃）、及びポリ-N, N-ジエチルアクリルアミド

（T = 32℃）等が記載されている（特許文献2、3）。

[0007] 上記温度応答性ポリマーを細胞培養基材に用いる場合、臨界溶解温度以下に細胞培養基材の温度を下げる必要があるが、同時に細胞を低温化してしまう。さらに、剥離してくる細胞はシート状であり、その後、細胞を加工するためには、低温を維持したまま、ピペッティング等で細胞を分散させる必要があるが、冷却時間が長くなってしまっていた。細胞の低温化は細胞の活性低下を及ぼすため、冷却時間の短縮が必要であった。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第01／068799号

特許文献2：日本国特公平06104061号公報

特許文献3：日本国特開平5－244938号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の目的は、短時間での細胞剥離を可能にする細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法を提供することにある。さらに、もう一つの目的は、細胞を最大直径 $5\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ の大きさに剥離し、細胞の分散化作業を省略できる細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、以上の点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、温度応答性の重合体を、親水性の重合体でブロック共重合させたブロック共重合体を基材上に被覆し成膜することで、短時間での細胞剥離を可能にすること、細胞を最大直径 $5\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ の大きさに剥離できることを見出し、本発明を完成した。

- [0011] すなわち本発明によれば、以下のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材が提供される。

[1] 下記(A)および(B)のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度(LCST)が $0^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) $0^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲にLCSTを持たない、HLB値(グリフィン法)が9～20の範囲にある親水性重合体のブロック。

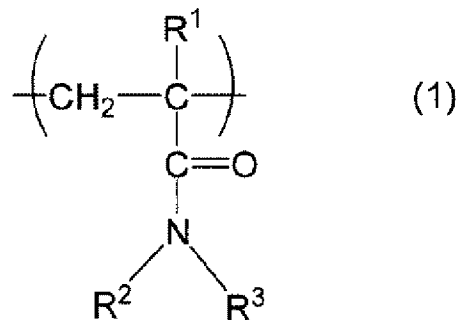
[2] ブロック(B)が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリ

コール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも１種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする〔１〕に記載の細胞培養基材。

[0012] 〔３〕ブロック（Ｂ）が水に対して溶解性を示すブロックであることを特徴とする〔１〕または〔２〕に記載の細胞培養基材。

〔４〕ブロック（Ａ）の繰り返し単位が下記一般式（１）

[0013] [化1]

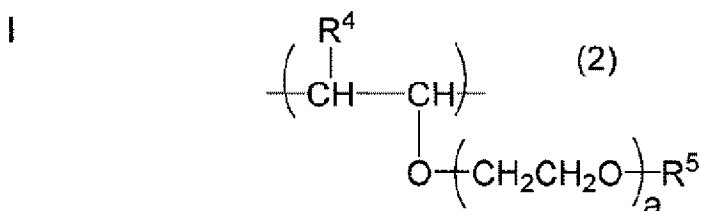


[0014] （式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 R^2 および R^3 は各々独立して、水素基、炭素数１～６の炭化水素基、フルフリル基またはテトラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも１種類のブロック単位（ a ）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔３〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔５〕ブロック（Ａ）の繰り返し単位が下記一般式（２）

[0015] [化2]



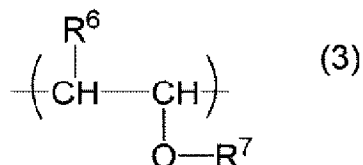
[0016] （式中、 R^4 は水素原子またはメチル基を表し、 R^5 は、水素原子、炭素数１～６の炭化水素基であり、 a は１～１０の整数を表す。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも１種類のブロック単位（ a ）から

なる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔３〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔６〕ブロック（Ａ）の繰り返し単位が下記一般式（３）

[0017] [化3]

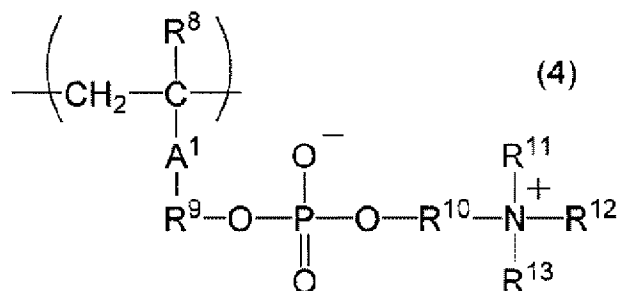


[0018] （式中、 R^6 は水素原子またはメチル基を表し、 R^7 は炭素数１～６の炭化水素基を表す。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも１種類のブロック単位（ａ）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔３〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔７〕ブロック（Ｂ）の繰り返し単位が下記一般式（４）

[0019] [化4]



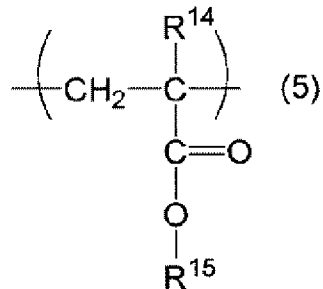
[0020] （式中、 R^8 は水素原子又はメチル基であり、 R^9 は、炭素数１～１０の２価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基であり、 R^{10} は、炭素数１～４の２価の炭化水素基であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、互いに独立して、水素原子又は炭素数１～４の炭化水素基であり、 A^1 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される２価の結合である。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも１種類のブロック単位（ｂ）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔６〕の何れ

か 1 項に記載の細胞培養基材。

[0021] [8] ブロック (B) の繰返し単位が下記一般式 (5)

[0022] [化5]

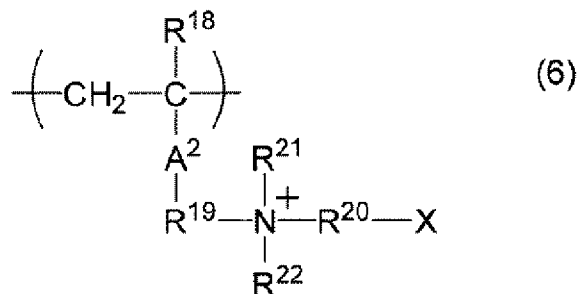


[0023] [式中、 R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、 R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c-\text{R}^{16}$ (式中、 R^{16} は水素原子、炭素数 1 ～ 30 のアルキル基であり、 b は 1 ～ 300 の整数であり、 c は 0 ～ 60 の整数である。) で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ (式中、 R^{17} は水素原子、炭素数 1 ～ 5 のアルキル基である。) で表される置換基、フルフリル基、テトラヒドロフルフリル基、水素原子を示す。]

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする [1] ～ [6] の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[9] ブロック (B) の繰返し単位が下記一般式 (6)

[0024] [化6]



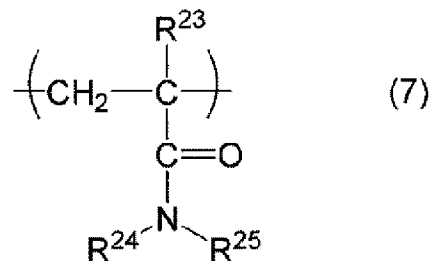
[0025] (式中、 R^{18} は水素原子又はメチル基であり、 R^{19} は、炭素数 1 ～ 10 の 2 価の炭化水素基、又は (ポリ) オキシエチレン基であり、 R^{20} は、炭素数 1 ～ 4 の 2 価の炭化水素基であり、 R^{21} 、 R^{22} は各々独立して、水素原子又は

炭素数 1 ～ 4 の炭化水素基であり、 A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される 2 価の結合であり、 X はスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基ある。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする [1] ～ [6] の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[10] ブロック (B) の繰り返し単位が下記一般式 (7)

[0026] [化7]

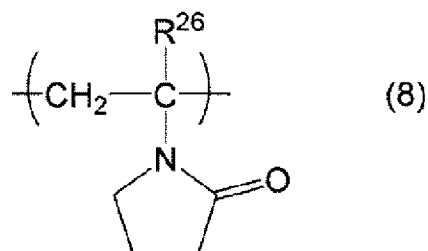


[0027] (式中、 R^{23} は水素原子又はメチル基であり、 R^{24} 、 R^{25} は各々独立して水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする [1] ～ [6] の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[11] ブロック (B) の繰り返し単位が下記一般式 (8)

[0028] [化8]



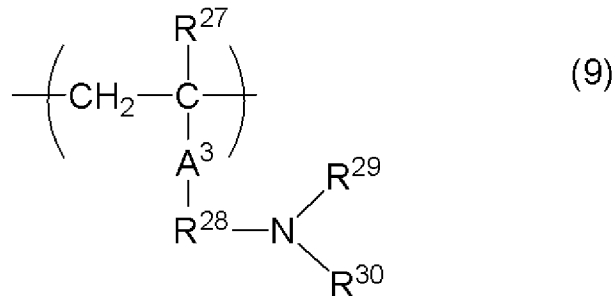
[0029] (式中、 R^{26} は水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) から

なる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔６〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔１２〕 ブロック（Ｂ）の繰り返し単位が下記一般式（９）

[0030] [化9]



[0031] （式中、 R^{27} は水素原子又はメチル基であり、 R^{28} は、炭素数１～１０の２価の炭化水素基であり、 R^{29} 、 R^{30} は各々独立して、水素原子又は炭素数１～４の炭化水素基であり、 A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される２価の結合である。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも１種類のブロック単位（ｂ）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする〔１〕～〔６〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

[0032] 〔１３〕 全ブロック単位〔（ａ）＋（ｂ）〕に対するブロック単位（ａ）の比率が５～９５ｍｏｌ％であることを特徴とする〔１〕～〔１２〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔１４〕 ブロック共重合体の数平均分子量（ M_n ）が３，０００以上１，０００，０００以下であることを特徴とする〔１〕～〔１３〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

〔１５〕 数平均分子量（ M_n ）が５，０００以上１００，０００以下であることを特徴とする〔１〕～〔１３〕の何れか１項に記載の細胞培養基材。

[0033] また、本発明によれば、以下の細胞培養基材が提供される。

〔１６〕 下記（Ａ）および（Ｂ）のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材。

（Ａ）水に対する下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）が０℃～５０℃の範囲にあ

る温度応答性重合体のブロック。

(B) 下記 (i) ~ (iii) の要件を満たすブロック。

(i) 0℃~50℃の範囲にLCSTを持たない。

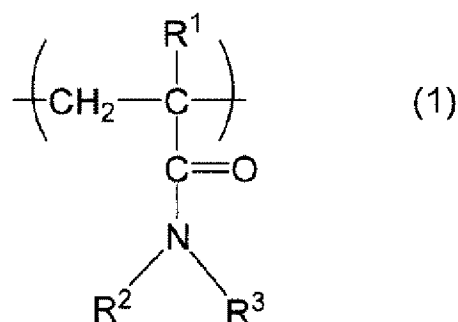
(ii) カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

(iii) (ii) の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、(メタ)アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、(メタ)アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

[17] ブロック(B) が水に対して溶解性を示すブロックであることを特徴とする[16]に記載の細胞培養基材。

[18] ブロック(A) の繰り返し単位が下記一般式(1)

[0034] [化10]

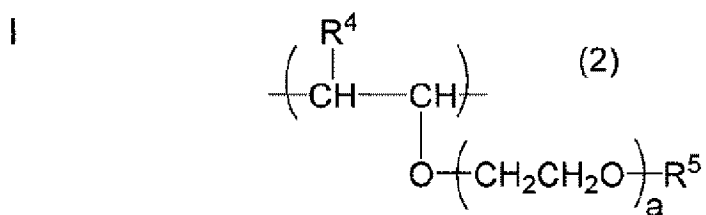


[0035] (式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 R^2 および R^3 は各々独立して、水素基、炭素数1～6の炭化水素基、フルフリル基またはテトラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(a)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]または[17]に記載の細胞培養基材。

[19] ブロック(A)の繰り返し単位が下記一般式(2)

[0036] [化11]

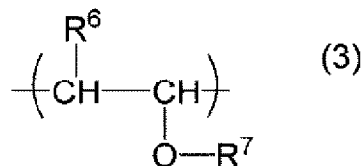


[0037] (式中、 R^4 は水素原子またはメチル基を表し、 R^5 は、水素原子、炭素数1～6の炭化水素基であり、aは1～10の整数を表す。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(a)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]または[17]に記載の細胞培養基材。

[20] ブロック(A)の繰り返し単位が下記一般式(3)

[0038] [化12]

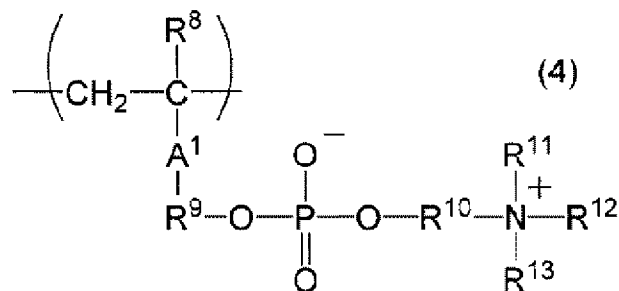


[0039] (式中、 R^6 は水素原子またはメチル基を表し、 R^7 は炭素数1～6の炭化水素基を表す。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(a)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]または[17]に記載の細胞培養基材。

[2 1] ブロック (B) の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式 (4)

[0040] [化13]

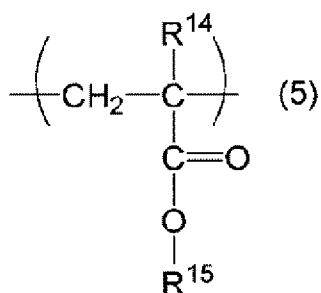


[0041] (式中、 R^8 は水素原子又はメチル基であり、 R^9 は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は(ポリ)オキシエチレン基であり、 R^{10} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、互いに独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^1 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする [1 6] ～ [2 0] の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[2 2] ブロック (B) の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式 (5)

[0042] [化14]



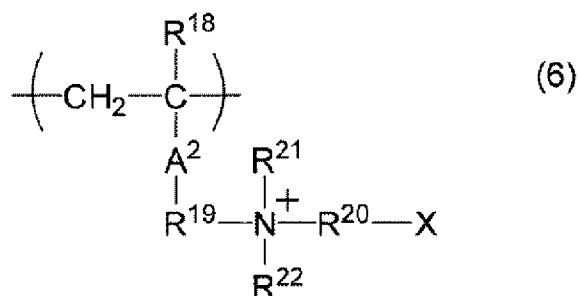
[0043] [式中、 R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、 R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b - (\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c - \text{R}^{16}$ (式中、 R^{16} は水素原子、炭素数1～30のアルキル基であり、 b は1～300の整数であり、 c は0～60の整数である。) で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ (式中

、 R^{17} は水素原子、炭素数1～5のアルキル基である。)で表される置換基、フルフリル基、テトラヒドロフルフリル基、水素原子を示す。]

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]～[20]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[23] ブロック(B)の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式(6)

[0044] [化15]



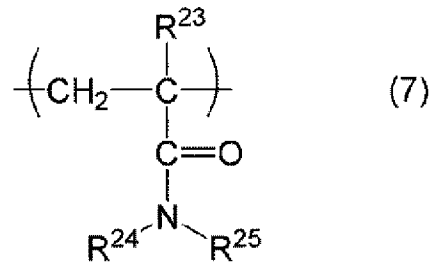
[0045] (式中、 R^{18} は水素原子又はメチル基であり、 R^{19} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は(ポリ)オキシエチレン基であり、 R^{20} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、 R^{21} 、 R^{22} は各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、 X はスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基ある。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]～[20]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[24] ブロック(B)の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式(7)

[0046]

[化16]

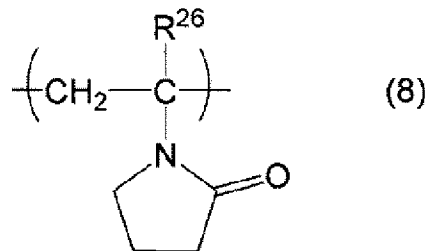


[0047] (式中、 R^{23} は水素原子又はメチル基であり、 R^{24} 、 R^{25} は各々独立して水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]～[20]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[25] ブロック(B)の親水性重合体の繰返し単位が下記一般式(8)

[0048] [化17]



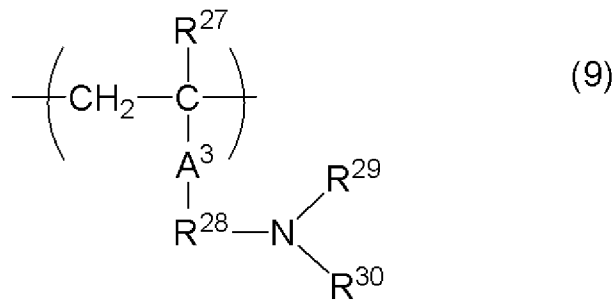
[0049] (式中、 R^{26} は水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]～[20]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[26] ブロック(B)の親水性重合体の繰返し単位が下記一般式(9)

[0050]

[化18]



[0051] (式中、 R^{27} は水素原子又はメチル基であり、 R^{28} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基であり、 R^{29} 、 R^{30} は各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする[16]～[20]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[27] 全ブロック単位[(a)+(b)]に対するブロック単位(a)の比率が5～95mol%であることを特徴とする[16]～[26]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[28] ブロック共重合体の数平均分子量(Mn)が3,000以上1,000,000以下であることを特徴とする[16]～[27]の何れか1項に記載の細胞培養基材。

また、本発明によれば、以下の製造方法が提供される。

[29] 下記(A)および(B)のブロックを含むブロック共重合体を、溶媒に溶解させ、基材に塗布後、乾燥することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度(LCST)が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない、HLB値(グリフィン法)が9～20の範囲にある親水性重合体のブロック。

[30] ブロック(B)が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボ

ン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする〔29〕に記載の製造方法。

〔31〕下記（A）および（B）のブロックを含むブロック共重合体を、溶媒に溶解させ、基材に塗布後、乾燥することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

（A）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

（B）下記（i）～（iii）の要件を満たすブロック。

（i）0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

（ii）カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

（iii）（ii）の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、（メタ）アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種の

モノマー単位を含有する。

[32] 下記 (A) および (B) のブロックを含むブロック共重合体を、基材に化学結合で固定化することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度 (LCST) が 0°C ~ 50°C の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 0°C ~ 50°C の範囲に LCST を持たない、HLB 値 (グリフィン法) が 9 ~ 20 の範囲にある親水性重合体のブロック。

[33] ブロック (B) が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも 1 種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする [32] に記載の製造方法。

[34] 下記 (A) および (B) のブロックを含むブロック共重合体を、基材に化学結合で固定化することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度 (LCST) が 0°C ~ 50°C の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 下記 (i) ~ (iii) の要件を満たすブロック。

(i) 0°C ~ 50°C の範囲に LCST を持たない。

(ii) カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも 1 種の親水性基を有するモノマーの親水性重

合体である。

(i i i) (i i) の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、(メタ) アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、(メタ) アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

また、本発明によれば、以下の細胞培養方法が提供される。

[35] [1] ~ [28] の何れか1項に記載の細胞培養基材を用いて、下限臨界溶解温度(LCST)より高い温度で細胞を培養し、細胞増殖後に温度をLCSTより低くして増殖細胞を基材から剥離することを特徴とする細胞培養方法。

[36] 培養した細胞が最大直径5 μm ~ 300 μm の大きさに剥離することを特徴とする[35]に記載の細胞培養方法。

[37] 培養した細胞が単一細胞で剥離することを特徴とする[35]または[36]に記載の細胞培養方法。

[38] [35] ~ [37] のいずれか1項に記載の細胞培養方法で剥離した細胞を用いて、細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。

発明の効果

[0052] 温度応答性の重合体を、親水性の重合体でブロック共重合させた、ブロック共重合体から得られる膜を細胞培養基材に被覆すれば、細胞培養後、温度降下による基材表面の親水化が促進され短時間での細胞剥離が可能になる。また、細胞を最大直径5 μm ~ 300 μm の大きさに剥離することによって、シート状で剥離する場合に必要であった細胞の分散化作業を簡素化できる。具体的には、酵素消化による細胞剥離の工程を省略することにより、作業に要する時間、工程の削減、操作者毎の誤差の軽減につなげることができる。またこれによって、細胞培養後、冷却処理を施しても、細胞にダメージを

与えることなく、短時間で細胞を分別回収できる細胞培養基材が得られるようになる。

発明を実施するための最良の形態

[0053] 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。

[0054] 本発明の細胞培養基材は、特定の（Ａ）および特定の（Ｂ）のブロックを含むブロック共重合体が表面に被覆された基材である。

本発明の細胞培養基材の一つ（第一の発明）は、下記（Ａ）および（Ｂ）

（Ａ）水に対する下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）が０℃～５０℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

（Ｂ）０℃～５０℃の範囲にＬＣＳＴを持たない、ＨＬＢ値（グリフィン法）が９～２０の範囲にある親水性重合体のブロック。

のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材である。

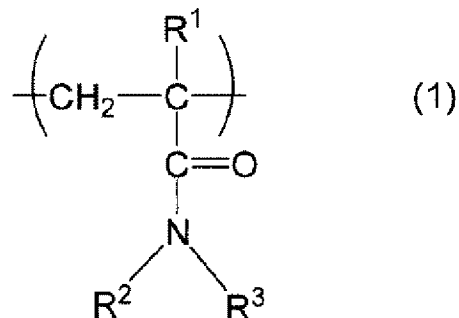
[0055] 本明細書において、下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ；Lower Critical Solution Temperature）とは、この温度よりも低い温度では高分子が水に溶解して透明の溶液になるが、この温度よりも高い温度では不溶化して白濁するか沈殿が生じ、相分離する温度である。

[0056] 第一の発明におけるブロック（Ａ）はＬＣＳＴが０℃～５０℃の範囲にある温度応答性重合体のブロックである。本発明の培養基材を用いた場合に、体温付近で細胞接着性を付与すると共に、温度降下で細胞を剥離し、ダメージを与えることなく細胞を分別回収することを目的に、ブロック（Ａ）のＬＣＳＴは２５℃～４５℃の範囲にあることが好ましく、２８℃～４０℃の範囲にあることがさらに好ましい。ＬＣＳＴが０℃未満であれば細胞にダメージを与えることなく剥離することが困難となり、５０℃を超えれば体温付近で細胞を接着できなくなり、細胞培養が困難となる。

[0057] 第一の発明におけるブロック（Ａ）は、特に限定は無いが、下記一般式（

1)

[0058] [化19]



[0059] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（a）からなる（共）重合体のブロックを用いることができる。

[0060] R^1 は水素原子又はメチル基であり、LCSTを $25^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ の範囲にするために、水素原子が用いられる。

[0061] R^2 および R^3 は各々独立して、水素基、炭素数1～6の炭化水素基、フルフリル基またはテトラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。

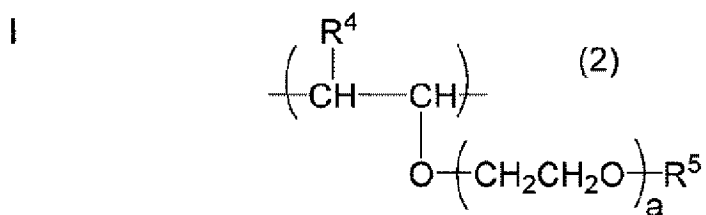
[0062] 炭素数1～6の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、LCSTを $25^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ の範囲にするために、好ましくは*n*-プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

[0063] 第一の発明における一般式（1）で表されるブロック（A）としては、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-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、1-（1-オキソ-2-プロペニル）ピロリジン、1-（1-オキソ

ー２－メチルー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、１－（１－オキソ－２－メチルー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、４－（１－オ
 キソ－２－メチルー２－プロペニル）モルホリンから選ばれる少なくとも１
 つのモノマーの（共）重合体を例示できるが、ＬＣＳＴを２５℃～４５℃の
 範囲にするために、好ましくは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
 ミドの重合体を、ＬＣＳＴを２８℃～４０℃の範囲にするために、さらに好
 ましくはＮ，Ｎ－ジエチルアクリルアミド、Ｎ－イソプロピルアクリルアミ
 ドの重合体を用いることができる。

[0064] 第一の発明におけるブロック（A）は、特に限定は無いが、下記一般式（2）

[0065] [化20]



[0066] で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックを用いることができる。

[0067] R⁴は水素原子またはメチル基を表し、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、水素原子が用いられる。

[0068] R⁵は、水素原子、炭素数1～6の炭化水素基であり、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、炭素数1～3のアルキル基が用いられる。

[0069] 炭素数 1 ～ 6 の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、L

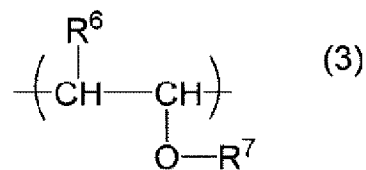
CSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基が用いられる。

[0070] aは1～10の整数であり、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、1～3の整数が用いられる。

[0071] 第一の発明における一般式(2)で表されるブロック(A)としては、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくは2-(2-エトキシ)エトキシエチルビニルエーテルの重合体を用いることができる。

[0072] 第一の発明におけるブロック(A)は、特に限定は無いが、下記一般式(3)

[0073] [化21]



[0074] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(a)からなる(共)重合体のブロックを用いることができる。

[0075] R⁶は水素原子またはメチル基を表し、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、水素原子が用いられる。

[0076] R⁷は炭素数1～6の炭化水素基を表し、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert.-ブチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチル基、エチル基が用いられる。

[0077] 第一の発明における一般式(3)で表されるブロック(A)としては、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチルビニルエーテルの重合体を用いることができる。

[0078] 本明細書において、HLB値(HLB; Hydrophile-Lipophile Balance)とは、W. C. Griffin, J. Soc. Cosmetic Chemists, 1, 311 (1949

）。に記載の、水と油への親和性の程度を表す値であり、0から20までの値を取り、0に近いほど親油性が高く、20に近いほど親水性が高くなる。計算によって決定する方法として、アトラス法、グリフィン法、デイビス法、川上法があるが、本発明においてはグリフィン法で計算した値を使用し、ブロック単位中の親水部の式量とブロック単位の総式量を元に、下記の計算式で求めた。

$$\text{HLB値} = 20 \times (\text{親水部の式量}) \div (\text{総式量})$$

第一の発明におけるブロック（B）は、0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない、特定範囲のHLB値を有する親水性重合体のブロックである。

第一の発明におけるブロック（B）としては、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの（共）重合体を例示することができる。

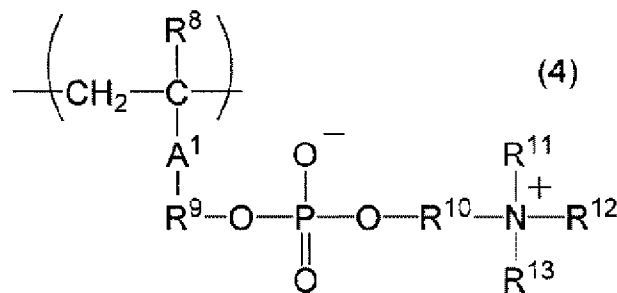
[0079] 第一の発明におけるブロック（B）は、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはタンパク質、ペプチド、糖タンパク質等の生体高分子と親和性の無いブロックまたは細胞と親和性の無いブロックであり、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、メトキシエチレン基、フルフリル基、ジアルキルアミノアルキル基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの重合体である。

[0080] 第一の発明におけるHLB値は9～20の範囲にあるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは11～20の範囲にあり、さらに好ましくは13～20の範囲にある。HLB値が9未満である場合は、細胞剥離に必要な冷却時間が長くなり、細胞の活性低下を招く。

また、第一の発明におけるブロック（B）は、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは水に対して溶解性を示すブロックであり、より好ましくは20℃の水100mLに0.5g以上溶解するブロックであり、さらに好ましくは20℃の水100mLに1g以上溶解するブロックである。

[0081] 第一の発明におけるブロック（B）は、特に限定は無いが、下記一般式（4）

[0082] [化22]



[0083] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックを用いることができる。

[0084] R⁸は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的にメチル基が用いられる。

[0085] R⁹は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基：－（OCH₂CH₂）_n－（式中、nは本発明のブロック共重合体に適切な親水性と生体適合性を付与するブロック（B）の機能を損なわない限り特に限定されず、例えば1～10である。なお、該（ポリ）オキシエチレン基は－O－を介して基A¹と結合する。）であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数1～6の2価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0086] R¹⁰は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン等のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0087] R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

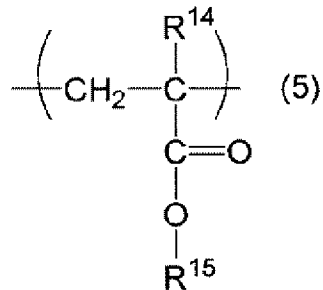
[0088] A^1 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

[0089] 第一の発明における一般式(4)で表されるブロック(B)としては、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、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルエタノールアミン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルエタノールアミン、3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルホスホリルエタノールアミン、4-(メタ)アクリロイルオキシブチルホスホリルエタノールアミン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルエタノールアミン、10-(メタ)アクリロイルオキシデシルホスホリルエタノールアミン、 ω -(メタ)アクリロイル(ポリ)オキシエチレンホスホリルエタノールアミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの(共)重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体を用い

ることができる。

[0090] 第一の発明におけるブロック（B）は、特に限定は無いが、下記一般式（5）

[0091] [化23]



[0092] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックを用いることができる。

[0093] R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的にメチル基が用いられる。

[0094] R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c-\text{R}^{16}$ （式中、 R^{16} は水素原子、炭素数1～30のアルキル基であり、 b は1～300の整数であり、 c は0～60の整数である。）で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ （式中、 R^{17} は水素原子、炭素数1～6の炭化水素基である。）で表される置換基、フルフリル基、テトラヒドロフルフリル基、水素原子を示す。

[0095] R^{16} に用いられる炭素数1～30のアルキル基としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 tert. -ブチル基、 n -ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に好ましくはメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

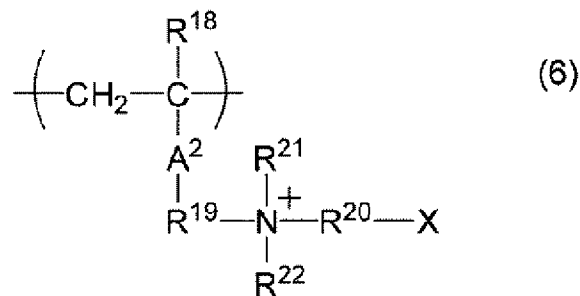
[0096] R^{17} に用いられる炭素数1～6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 tert. -ブチル基、 n -ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に好ましく

はメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

[0097] 第一の発明における一般式(5)で表されるブロック(B)としては、ポリエチレングリコールメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシメチルアクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、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、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またはテトラヒドロフルフリルメタクリレートから選ばれる少なくとも1つのモノマーの(共)重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはポリエチレングリコールメタクリレート、2-メトキシエチルアクリレートまたはテトラヒドロフルフリルアクリレートから選ばれる少なくとも1つのモノマーの(共)重合体を用いることができる。

[0098] 第一の発明におけるブロック(B)は、特に限定は無いが、下記一般式(6)

[0099] [化24]



[0100] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックを用いることができる。

[0101] R^{18} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的にメチル基が用いられる。

[0102] R^{19} は、炭素数1~10の2価の炭化水素基、又は(ポリ)オキシエチレン基： $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ (式中、*n*は本発明のブロック共重合体に適切な親水性と生体適合性を付与するブロック(B)の機能を損なわない限り特に限定されず、例えば1~10である。なお、該(ポリ)オキシエチレン基

は－Ｏ－を介して基 A^1 と結合する。)であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数１～６の２価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0103] R^{20} は、炭素数１～４の２価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン等のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0104] R^{21} 及び R^{22} は、各々独立して、水素原子又は炭素数１～４の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくは、 R^{21} 及び R^{22} が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

[0105] A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される２価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

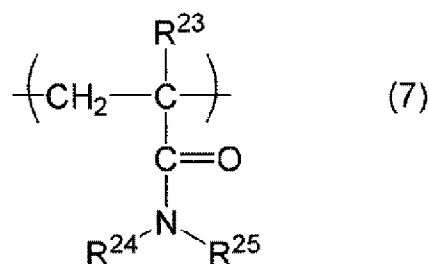
[0106] X はスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基である。

[0107] 第一の発明における一般式(６)で表されるブロック(B)としては、ジメチル(２－メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム、ジメチル(２－メタクリロイルオキシエチル)(２－カルボキシラトエチル)アミニウム、ジメチル(２－アクリロイルオキシエチル)(２－カルボキシラトエチル)アミニウム、ジメチル(２－メタクリロイルオキシエチル)(３－カルボキシラトプロピル)アミニウム、ジメチル(２－アクリロイルオキシエチル)(３－カルボキシラトプロピル)アミニウム、ジメチル(２－メタクリロイルアミノプロピル)(３－スルホナトプロピル)アミニウム、ジメチル(２－メタクリロイルアミノプロピル)(４－スルホナトブチル)アミニウム、ジメチル(２－メタクリロイルオキシエチル)(２－スルホナトエチル)アミニウム、ジメチル(２－アクリロイルオキシエチル)

ル) (2-スルホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-ホスホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (2-ホスホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (3-ホスホナトプロピル) アミニウム、またはジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (3-ホスホナトプロピル) アミニウムから選ばれる少なくとも1つのモノマーの (共) 重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (カルボキシラトメチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-カルボキシラトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (4-スルホナトブチル) アミニウムまたはジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-スルホナトエチル) アミニウムから選ばれる少なくとも1つのモノマーの (共) 重合体を用いることができる。

[0108] 第一の発明におけるブロック (B) は、特に限定は無いが、下記一般式 (7)

[0109] [化25]



[0110] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックを用いることができる。

[0111] R^{23} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮

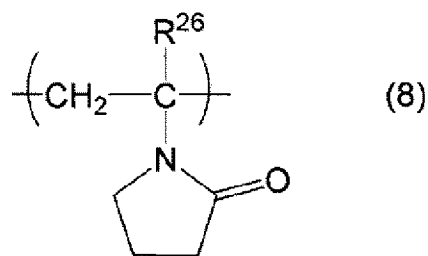
することを目的にメチル基が用いられる。

[0112] R^{24} 、 R^{25} は各々独立して水素原子又はメチル基である。

[0113] 第一の発明における一般式(7)で表されるブロック(B)としては、アクリルアミドまたはN,N-ジメチルアクリルアミドから選ばれる少なくとも1つのモノマーの(共)重合体を用いることができる。

[0114] 第一の発明におけるブロック(B)は、特に限定は無いが、下記一般式(8)

[0115] [化26]



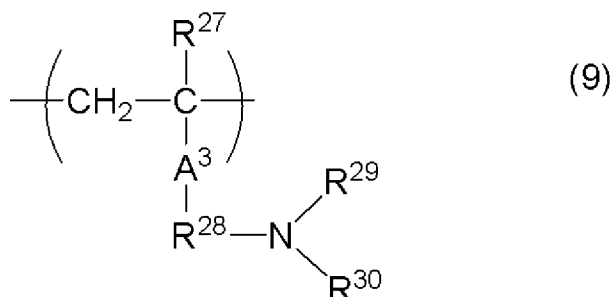
[0116] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックを用いることができる。

[0117] R^{26} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的にメチル基が用いられる。

[0118] 第一の発明における一般式(8)で表されるブロック(B)としては、N-ビニルピロリドンの(共)重合体を用いることができる。

第一の発明におけるブロック(B)は、特に限定は無いが、下記一般式(9)

[0119] [化27]



[0120] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)から

なる重合体のブロックを用いることができる。

R^{27} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

R^{28} は炭素数1～10の2価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数1～6の2価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0121] R^{29} 及び R^{30} は、各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、 R^{29} 及び R^{30} が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

[0122] 第一の発明における一般式(9)で表されるブロック(B)としては、アミノメチル(メタ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノメチル(メタ)アクリレート、N,N-ジエチルアミノメチル(メタ)アクリレート、アミノエチル(メタ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N,N-ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、3-アミノプロピル(メタ)アクリレート、3-(N,N-ジメチルアミノ)-プロピル(メタ)アクリレート、3-(N,N-ジエチルアミノ)-プロピル(メタ)アクリレート、(メタ)アクリルアミドメチルアミン、ジメチル[(メタ)アクリルアミドメチル]アミン、ジエチル[(メタ)アクリルアミドメチル]アミン、(メタ)アクリルアミドエチルアミン、ジメチル[(メタ)アクリルアミドエチル]アミン、ジエチル[(メタ)アクリルアミドエチル]アミン、3-(メタ)アクリルアミドプロピルアミン、ジメチル[3-(メタ)アクリルアミドプロピル]アミン、ジエチル[3-(メタ)アクリルアミドプロピル]アミン、

リルアミドエチル] アミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの(共)重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはN, N-ジメチルアミノメチル(メタ)アクリレート、N, N-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、ジメチル[(メタ)アクリルアミドメチル]アミン、ジメチル[(メタ)アクリルアミドエチル]アミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体である。

[0123] 第一の発明の細胞培養基材に用いるブロック共重合体は、基材に被覆した場合に、細胞接着性を付与すると共に、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはブロック単位(a)からなる(共)重合体のブロック(A)、およびブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロック(B)を含むブロック共重合体を用いることができる。さらに好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミドの重合体のブロック(A)と2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体のブロック(B)を含むブロック共重合体を用いることができる。

[0124] 全ブロック単位[(a)+(b)]に対する(a)の比率は1~95mol%であり、基材に被覆した場合に、細胞接着性を付与すると共に、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、5~85mol%であることが好ましい。1mol%未満であれば細胞接着性が低下し、95mol%を超えれば細胞剥離に必要な冷却時間が長くなる。

[0125] 第一の発明に用いるブロック共重合体は、ブロック(A)または(B)中に、ブロック単位(a)または(b)以外のモノマー単位を含有できる。ブロック単位(a)または(b)以外のモノマー単位を生成するモノマーとしては、スチレン、1-ビニルナフタレン、2-ビニルナフタレン、9-ビニルアントラセン、1-ビニルピレンおよびその誘導体等の芳香族ビニル化合物、N-n-オクチル(メタ)アクリルアミド、N-n-デシル(メタ)アクリルアミド、N-n-ドデシル(メタ)アクリルアミド、N-n-ヘキサデシル(メタ)アクリルアミド、N-n-オクタデシル(メタ)アクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物、N-ビニル-n-オクチルアミ

ド、N-ビニル-n-デシルアミド、N-ビニル-n-ドデシルアミド、N-ビニル-n-ヘキサデシルアミド等のN-ビニルアミド化合物、N-シクロヘキシルマレイミド、N-フェニルマレイミド等のN-アルキルマレイミド化合物、フマル酸ジ-tert-ブチル、フマル酸ジ-n-ブチル等のフマル酸ジエステル化合物、塩化ビニル、酢酸ビニル、(メタ)アクリロニトリル、N-ビニルイミダゾール、N-ビニルカルバゾールを例示できる。

[0126] さらに、第一の発明に用いるブロック共重合体は、ブロック(A)または(B)以外の重合体ブロックを含むことができる。

[0127] ブロック(A)または(B)以外の重合体ブロックを生成するモノマーとしては、前記ブロック単位(a)または(b)以外のモノマー単位を生成するモノマーを例示できる。

第一の発明に用いるブロック共重合体の数平均分子量(M_n)は3,000以上1,000,000以下の範囲にあり、好ましくは4,000以上500,000以下、さらに好ましくは5,000以上100,000以下である。3,000未満の場合は細胞培養基材に被覆しても細胞培養中に基材から培地中に溶出してしまう。また、1,000,000を越える場合は溶液粘度が高くなり、細胞培養基材への被覆が困難になる。

[0128] 第一の発明に用いるブロック共重合体の合成方法としては、特に限定はないが、株式会社エヌ・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て、共重合する方法を用いることができる。

[0129] 重合するモノマーの順番としては、ブロック単位(b)を生成するモノマーを(共)重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを(共)重合する方法、ブロック単位(a)を生成するモノマーを(共)重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(b)を生成するモノマーを(共)重合する方法、ブロック単位(b)を生成するモノマーを(共)重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを(共)重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単

位（b）を生成するモノマーを（共）重合する方法、ブロック単位（a）を生成するモノマーを（共）重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（b）を生成するモノマーを（共）重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを（共）重合する方法、ブロック単位（b）を生成するモノマーを（共）重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）または（b）以外のモノマー単位を生成するモノマーを（共）重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを（共）重合する方法、ブロック単位（a）を生成するモノマーを（共）重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）または（b）以外のモノマー単位を生成するモノマーを（共）重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（b）を生成するモノマーを（共）重合する方法を例示することができる。

[0130] 本発明のもう一つの細胞培養基材（第二の発明）は、下記（A）および（B）

（A）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

（B）下記（i）～（iii）の要件を満たすブロック。

（i）0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

（ii）カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

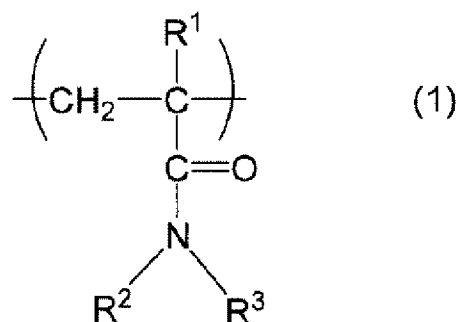
（iii）（ii）の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、（メタ）アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジ

エステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材である。第二の発明におけるブロック（A）はLCSTが0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロックである。本発明の培養基材を用いた場合に、体温付近で細胞接着性を付与すると共に、温度降下で細胞を剥離し、ダメージを与えることなく細胞を分別回収するために、ブロック（A）のLCSTは25℃～45℃の範囲にあることが好ましく、28℃～40℃の範囲にあることがさらに好ましい。LCSTが0℃未満であれば細胞にダメージを与えることなく剥離することが困難となり、50℃を超えれば体温付近で細胞培養が困難となる。

第二の発明におけるブロック（A）は、特に限定は無いが、下記一般式（1）

[0131] [化28]



[0132] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（a）からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0133] R¹は水素原子又はメチル基であり、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、水素原子が用いられる。

[0134] R²およびR³は各々独立して、水素基、炭素数1～6の炭化水素基、フル

フリル基またはテトラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。

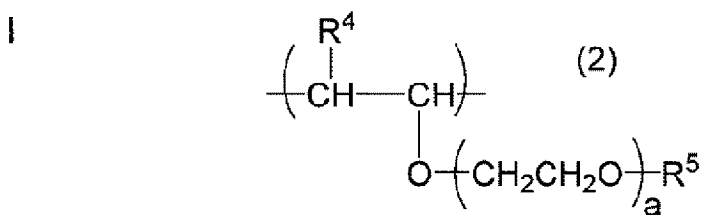
[0135] 炭素数1～6の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくは*n*-プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

[0136] 第二の発明における一般式(1)で表されるブロック(A)としては、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-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、1-(1-オキソ-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)ピロリジン、1-(1-オキソ-2-プロペニル)ピペリジン、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-プロペニル)モルホリン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)モルホリンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を例示できるが、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくは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の重合体を、LCSTを28℃～40℃の範囲にするために、さらに好ましくはN, N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドの重合体を用いる。

[0137] 第二の発明におけるブロック(A)は、特に限定は無いが、下記一般式(

2)

[0138] [化29]



[0139] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（a）からなる重合体のブロックを用いることができる。

R⁴は水素原子またはメチル基を表し、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、水素原子が用いられる。

R⁵は、水素原子、炭素数1～6の炭化水素基であり、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、炭素数1～3のアルキル基が用いられる。

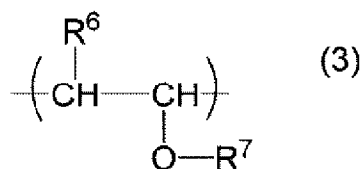
炭素数1～6の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基が用いられる。

aは1～10の整数であり、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、1～3の整数が用いられる。

[0140] 第二の発明における一般式（2）で表されるブロック（A）としては、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくは2-（2-エトキシ）エトキシエチルビニルエーテルの重合体を用いられる。

第二の発明におけるブロック（A）は、特に限定は無いが、下記一般式（3）

[0141] [化30]



[0142] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (a) からなる重合体のブロックを用いることができる。

R⁶は水素原子またはメチル基を表し、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、水素原子が用いられる。

R⁷は炭素数1～6の炭化水素基を表し、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチル基、エチル基が用いられる。

第二の発明における一般式(3)で表されるブロック(A)としては、LCSTを25℃～45℃の範囲にするために、好ましくはメチルビニルエーテルの重合体を用いられる。

[0143] 第二の発明におけるブロック(B)は、下記(i)～(iii)

(i) 0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

(ii) カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

(iii) (ii)の重合体中に、芳香族ビニル化合物モノマーが生成するモノマー単位、(メタ)アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、(メタ)アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくと

も 1 種のモノマー単位を含有する。

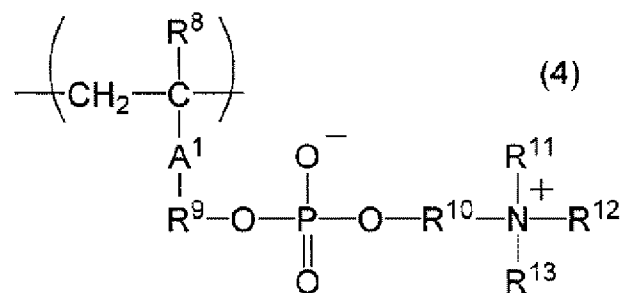
の要件を満たすブロックである。

[0144] 第二の発明におけるブロック（B）は、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはタンパク質、ペプチド、糖タンパク質等の生体高分子と親和性の無いブロックまたは細胞と親和性の無いブロックであり、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、メトキシエチレン基、フルフリル基、ジアルキルアミノアルキル基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも 1 種の親水性基を有するモノマーの重合体を親水性重合体に用いたブロックである。

[0145] また、第二の発明におけるブロック（B）は、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは水に対して溶解性を示すブロックであり、より好ましくは 20℃の水 100 mL に 0.5 g 以上溶解するブロックであり、さらに好ましくは 20℃の水 100 mL に 1 g 以上溶解するブロックである。

[0146] 第二の発明におけるブロック（B）の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式（4）

[0147] [化31]



[0148] で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位（b）からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0149] R⁸は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0150] R⁹は、炭素数 1～10 の 2 価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基：—(OCH₂CH₂)_n—（式中、n は本発明のブロック共重合体に適切な

親水性と生体適合性を付与するブロック（B）の機能を損なわない限り特に限定されず、例えば1～10である。なお、該（ポリ）オキシエチレン基は－O－を介して基A¹と結合する。）であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数1～6の2価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0151] R¹⁰は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン等のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0152] R¹¹、R¹²、及びR¹³は、各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、R¹¹、R¹²、及びR¹³が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

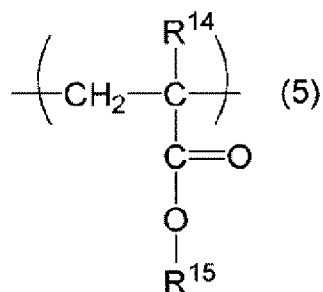
[0153] A¹は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

第二の発明における一般式（4）で表される親水性重合体としては、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、2－メタクリロイルオキシ

エチルホスホリルエタノールアミン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルエタノールアミン、3-(メタ)アクリロイルオキシプロピルホスホリルエタノールアミン、4-(メタ)アクリロイルオキシブチルホスホリルエタノールアミン、6-(メタ)アクリロイルオキシヘキシルホスホリルエタノールアミン、10-(メタ)アクリロイルオキシデシルホスホリルエタノールアミン、 ω -(メタ)アクリロイル(ポリ)オキシエチレンホスホリルエタノールアミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体を用いることができる。

[0154] 第二の発明におけるブロック(B)の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式(5)

[0155] [化32]



[0156] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0157] R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0158] R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c-\text{R}^{16}$ (式中、 R^{16} は水素原子、炭素数1~30のアルキル基であり、bは1~300の整数であり、cは0~60の整数である。)で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ (式中、 R^{17} は水素原子、炭素数1~6の炭化水素基である。)で表される置換基、フルフリル基、テトラヒドロフルフリル基、水素原子を示す。

[0159] R^{16} に用いられる炭素数1~30のアルキル基としては、メチル基、エチ

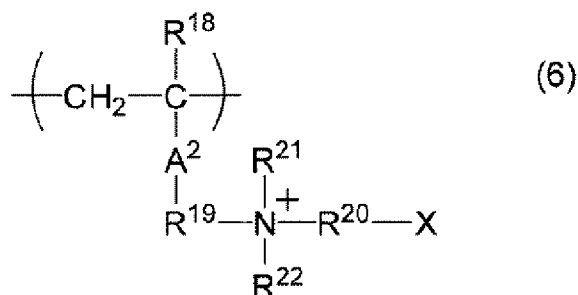
ル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*tert.*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために好ましくはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

[0160] R^{17} に用いられる炭素数1～6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*tert.*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために好ましくはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

[0161] 第二の発明における一般式(5)で表される親水性重合体としては、ポリエチレングリコールメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシメチルアクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、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、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またはテトラヒドロフルフリルメタクリレートから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはポリエチレングリコールメタクリレート、2-メトキシエチルアクリレートまたはテトラヒドロフルフリルアクリレートから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を用いることができる。

[0162] 第二の発明におけるブロック(B)の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式(6)

[0163] [化33]



[0164] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0165] R^{18} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0166] R^{19} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基： $-(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 n は本発明のブロック共重合体に適切な親水性と生体適合性を付与するブロック（B）の機能を損なわない限り特に限定されず、例えば1～10である。なお、該（ポリ）オキシエチレン基は $-O-$ を介して基 A^1 と結合する。）であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数1～6の2価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

R^{20} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン等のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0167] R^{21} 及び R^{22} は、各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、 R^{21} 及び R^{22} が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

Xはスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基ある。

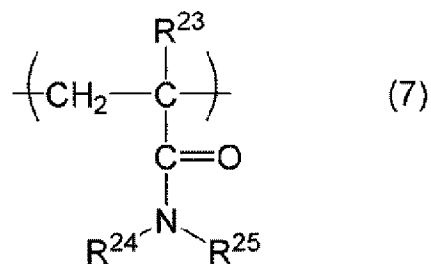
[0168] 第二の発明における一般式（6）で表される親水性重合体としては、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（カルボキシラトメチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（2-カルボキシラト

エチル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (2-カルボキシラトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (3-カルボキシラトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (3-カルボキシラトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (4-スルホナトブチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-スルホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (2-スルホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-ホスホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (2-ホスホナトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (3-ホスホナトプロピル) アミニウム、またはジメチル (2-アクリロイルオキシエチル) (3-ホスホナトプロピル) アミニウムから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、好ましくはジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (カルボキシラトメチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-カルボキシラトエチル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (3-スルホナトプロピル) アミニウム、ジメチル (2-メタクリロイルアミノプロピル) (4-スルホナトブチル) アミニウムまたはジメチル (2-メタクリロイルオキシエチル) (2-スルホナトエチル) アミニウムから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を用いることができる。

[0169] 第二の発明におけるブロック (B) の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式 (7)

[0170]

[化34]



[0171] で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) からなる重合体のブロックを用いることができる。

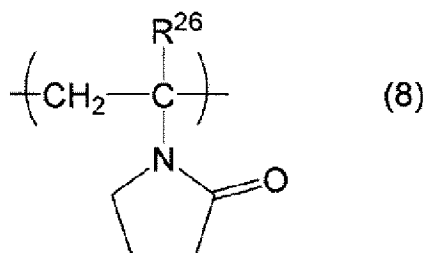
[0172] R²³は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0173] R²⁴、R²⁵は各々独立して水素原子又はメチル基である。

第一の発明における一般式（７）で表される親水性重合体としては、アクリルアミドまたはN，N－ジメチルアクリルアミドから選ばれる少なくとも１つのモノマーの重合体を用いることができる。

[0174] 第二の発明におけるブロック（Ｂ）の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式（８）

[0175] [1735]



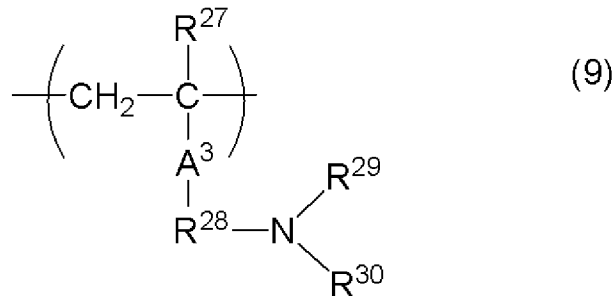
[0176] で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b) からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0177] R²⁶は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0178] 第二の発明における一般式（８）で表される親水性重合体としては、N-ビニルピロリドンの重合体を用いることができる。

第二の発明におけるブロック（B）の親水性重合体は、特に限定は無いが、下記一般式（9）

[0179] [化36]



[0180] で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる重合体のブロックを用いることができる。

[0181] R^{27} は水素原子またはメチル基を表し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するためにメチル基が用いられる。

[0182] R^{28} は炭素数1～10の2価の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン等の炭素数1～6の2価のアルキレン基であり、更に好ましくはエチレンである。

[0183] R^{29} 及び R^{30} は、各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくは、 R^{29} 及び R^{30} が同時に水素原子またはメチル基であり、更に好ましくは同時にメチル基である。

[0184] A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、特に好ましくはエステル結合である。

[0185] 第二の発明における一般式（9）で表される親水性重合体としては、アミノメチル（メタ）アクリレート、N，N-ジメチルアミノメチル（メタ）アクリレート、N，N-ジエチルアミノメチル（メタ）アクリレート、アミノエチル（メタ）アクリレート、N，N-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、

リレート、N，N－ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、3－アミノプロピル（メタ）アクリレート、3－（N，N－ジメチルアミノ）－プロピル（メタ）アクリレート、3－（N，N－ジエチルアミノ）－プロピル（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミドメチルアミン、ジメチル〔（メタ）アクリルアミドメチル〕アミン、ジエチル〔（メタ）アクリルアミドメチル〕アミン、（メタ）アクリルアミドエチルアミン、ジメチル〔（メタ）アクリルアミドエチル〕アミン、ジエチル〔（メタ）アクリルアミドエチル〕アミン、3－（メタ）アクリルアミドプロピルアミン、ジメチル〔3－（メタ）アクリルアミドプロピル〕アミン、ジエチル〔3－（メタ）アクリルアミドエチル〕アミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を例示できるが、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、好ましくはN，N－ジメチルアミノメチル（メタ）アクリレート、N，N－ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジメチル〔（メタ）アクリルアミドメチル〕アミン、ジメチル〔（メタ）アクリルアミドエチル〕アミンから選ばれる少なくとも1つのモノマーの重合体を用いることができる。

[0186] 第二の発明において上述の親水性重合体中に更に含有するモノマー単位としては、スチレン、1－ビニルナフタレン、2－ビニルナフタレン、9－ビニルアントラセン、1－ビニルピレンおよびその誘導体等の芳香族ビニル化合物が重合することによって生成するモノマー単位、N－n－オクチル（メタ）アクリルアミド、N－n－デシル（メタ）アクリルアミド、N－n－ドデシル（メタ）アクリルアミド、N－n－ヘキサデシル（メタ）アクリルアミド、N－n－オクタデシル（メタ）アクリルアミド等の（メタ）アクリルアミド化合物が重合することによって生成するモノマー単位、N－ビニル－n－オクチルアミド、N－ビニル－n－デシルアミド、N－ビニル－n－ドデシルアミド、N－ビニル－n－ヘキサデシルアミド等のN－ビニルアミド化合物が重合することによって生成するモノマー単位、N－シクロヘキシルマレイミド、N－フェニルマレイミド等のN－アルキルマレイミド化合物が重合することによって生成するモノマー単位、フマル酸ジ－t e r t－ブチ

ル、フマル酸ジ-*n*-ブチル等のフマル酸ジエステル化合物が重合することによって生成するモノマー単位、塩化ビニルが重合することによって生成するモノマー単位、酢酸ビニルが重合することによって生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが重合することによって生成するモノマー単位、*N*-ビニルイミダゾールが重合することによって生成するモノマー単位、*N*-ビニルカルバゾールが重合することによって生成するモノマー単位を用いることができる。

[0187] 第二の発明において、ブロック単位〔（*a*）＋（*b*）〕に対する（*a*）の比率は1～95mol％であり、基材に被覆した場合に、細胞接着性を付与すると共に、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、5～85mol％であることが好ましい。1mol％未満であれば細胞接着性が低下し、95mol％を超えれば細胞剥離に必要な冷却時間が長くなる。

[0188] 第二の発明において、ブロック共重合体を構成する全ブロック単位の量に対するブロックAを構成するブロック単位（*a*）の量が4～94mol％であり、基材に被覆した場合に、細胞接着性を付与すると共に、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮するために、10～85mol％であることが好ましい。4mol％未満であれば細胞接着性が低下し、94mol％を超えれば細胞剥離に必要な冷却時間が長くなる。

[0189] 第二の発明に用いるブロック共重合体の数平均分子量（*M_n*）は3,000以上1,000,000以下の範囲にあり、好ましくは4,000以上500,000以下、さらに好ましくは5,000以上100,000以下である。3,000未満の場合は細胞培養基材に被覆しても細胞培養中に基材から培地中に溶出してしまう。また、1,000,000を超える場合は溶液粘度が高くなり、細胞培養基材への被覆が困難になる。

[0190] 第二の発明に用いるブロック共重合体の合成方法としては、特に限定はないが、株式会社エヌ・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て、共重合する方法を用いることができる。

[0191] 第二の発明において重合するモノマーの順番としては、1) 親水性基を有するモノマーと芳香族ビニル化合物を共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合する方法、2) ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと芳香族ビニル化合物を共重合する方法、3) 親水性基を有するモノマーと芳香族ビニル化合物を共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、更に未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと芳香族ビニル化合物を共重合する方法、4) ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと芳香族ビニル化合物を共重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合する方法、5) 親水性基を有するモノマーと(メタ)アクリルアミド化合物を共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合する方法、6) ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと(メタ)アクリルアミド化合物を共重合する方法、7) 親水性基を有するモノマーと(メタ)アクリルアミド化合物を共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、更に未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと(メタ)アクリルアミド化合物を共重合する方法、8) ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと(メタ)アクリルアミド化合物を共重合し、更に未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合する方法、9) 親水性基を有するモノマーとフマル酸ジエステル化合物を共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合する方法、10) ブロック単位(a)を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーとフマル酸ジエステル化合物を共重合する方法、11) 親水性基を有するモノマーと塩化ビニルを共重合し、未反応モノマーを除いた後、プロ

ック単位（a）を生成するモノマーを重合する方法、12）ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと塩化ビニルを共重合する方法、13）親水性基を有するモノマーと酢酸ビニルを共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合する方法、ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと酢酸ビニルを共重合する方法、14）親水性基を有するモノマーと（メタ）アクリロニトリルを共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合する方法、15）ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーと（メタ）アクリロニトリルを共重合する方法、16）親水性基を有するモノマーとN-ビニルイミダゾールを共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合する方法、17）ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーとN-ビニルイミダゾールを共重合する方法、18）親水性基を有するモノマーとN-ビニルカルバゾールを共重合し、未反応モノマーを除いた後、ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合する方法、19）ブロック単位（a）を生成するモノマーを重合し、未反応モノマーを除いた後、親水性基を有するモノマーとN-ビニルカルバゾールを共重合する方法を例示することができる。

[0192] 本発明の細胞培養基材は、上記ブロック共重合体を例えば、各種溶媒に溶解させ、基材に塗布後、乾燥することによって製造することができる。

塗布に用いる溶媒としては残留していても培養細胞に及ぼす影響が小さい、エタノール、水とエタノールの混合溶媒が好ましく用いられる。

[0193] 基材としては、特に限定はないが、好ましくは各種疎水性ポリマー材料が用いられる。疎水性ポリマー材料としては、例えば、ポリメタクリル酸メチル等のアクリル系ポリマー、ポリジメチルシロキサン等の各種シリコーンゴム、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート等が挙

げられる。また、金属基材、セラミックス基材あるいはガラス基材にシランカップリング剤で表面処理したものも用いることができる。

[0194] また、基材の形状は、特に限定はないが、例えば、板状、ビーズ状および繊維状の形状のほか、板状の基材に設けられた穴や溝や突起なども挙げられる。

[0195] 基材に塗布する方法としては、例えば、はけ塗り、ディップコーティング、スピンコーティング、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など通常知られている各種の方法を用いることが可能である。

[0196] 本発明の培養基材に被覆されたブロック共重合体の厚さは1 nm以上10 μ m以下であり、好ましくは10 nm以上5 μ m以下であり、より好ましくは30 nm以上500 nm以下であり、さらに好ましくは50 nm以上200 nm以下である。1 nm未満の場合は細胞培養基材に被覆した時に細胞剥離に必要な冷却時間が長くなってしまう。10 μ mを越える場合は細胞培養基材に被覆した時に細胞の接着性が低下する。

[0197] 本発明の培養基材の表面は、細胞培養後、温度降下による基材表面の親水化を促進し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、ミクロ相分離構造を有することが好ましい。

[0198] ミクロ相分離構造のドメイン径およびドメイン間隔は、各ブロック単位の比率、ブロック共重合体の分子量、塗布方法および塗布条件で任意に制御できる。細胞培養後、温度降下による基材表面の親水化を促進し、細胞剥離に必要な冷却時間を短縮することを目的に、ドメイン径およびドメイン間隔を細胞増殖因子よりも大きく、細胞よりも小さいことが好ましい。

[0199] 本発明の細胞培養基材の製造方法としては、特に限定はないが、ブロック共重合体を前記塗布／乾燥する方法に加え、ブロック共重合体を化学結合で固定化する方法を用いることができる。

[0200] 化学結合で固定化する方法としては、特に限定はないが、ブロック共重合体を合成後、化学固定する方法と、ブロック重合体の合成と同時に固定化す

る方法を用いることができる。

- [0201] ブロック共重合体を合成後、化学固定する方法としては、特に限定はないが、ブロック共重合体中に予め特定の官能基を含有するモノマー単位を導入しておき、基材上の特定官能基と化学結合させる方法、ブロック共重合体を基材に塗布した後、電子線を照射して固定化する方法、ブロック共重合体の溶液中にラジカル発生剤（ベンゾフェノン等）を添加しておき、塗布した後、紫外線を照射する方法を例示することができる。
- [0202] ブロック共重合体中の官能基と基材上の官能基との化学結合で固定化する場合に用いる官能基の組み合わせとしては、特に限定は無いが、水酸基とアミノ基、メルカプト基とアミノ基、メルカプト基とマレイミド基、メルカプト基とメルカプト基、カルボキシル基とアミノ基、カルボキシル基と水酸基、水酸基と水酸基を例示することができる。
- [0203] ブロック共重合体中の官能基と基材上の官能基との反応において、特に限定はないが縮合試薬または架橋剤を添加することができる。
- [0204] ブロック共重合体の合成と同時に基材に固定化する方法としては、表面開始リビングラジカル重合技術を用いることができる。
- [0205] 表面開始リビングラジカル重合は、ブロック共重合体鎖の起点となる基材表面に、重合開始剤を化学結合させ、該重合開始剤を始点として、リビングラジカル重合を行うことで、ブロック共重合体鎖を形成する手法であり、たとえば、特開2009-59659号公報や特開2010-218984号公報に記載された方法などを適用することができる。
- [0206] 表面開始リビングラジカル重合で用いる基材としては、特に限定はないが、鋳鉄、鋼、ステンレス鋼などの鉄や鉄合金、アルミニウム、銅などの非鉄及び非鉄合金、さらには、シリコンウエハ、ガラス、石英などの非金属などを用いることができるが、本発明の細胞培養基材を、表面開始リビングラジカル重合で製造するために必要となる、重合開始剤をその表面に化学結合可能な材料、具体的には、シリコンウエハ、雲母の剥離片などの劈開性の鉱物、表面上に水酸基などの反応性置換基が存在する平面基材などが好ましく用

いられる。

[0207] 重合開始剤としては、特に限定されないが、基材に化学結合可能な基と、ラジカル発生基とを有する化合物が好ましく、たとえば、特開2010-218984号公報に開示されている重合開始剤、すなわち、TEMPO系、ATRP系、RAFT系、RTCP系の重合開始剤を用いることができる。これらのなかでも、TEMPO系、RAFT系、RTCP系の重合開始剤がより好ましい。また、TEMPO系の重合開始剤の中では、特にDEPN系の重合開始剤が好ましい。なお、基材に化学結合可能な基としては、たとえば、 $-\text{SiCl}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)\text{Cl}_2$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ 、 $-\text{Si}(\text{OR})_3$ （これらの式中、Rはメチル、エチル、プロピルまたはブチルを示す。）などが挙げられる。

[0208] 基材表面に上記重合開始剤を化学結合させる方法としては、特に限定されないが、重合開始剤を溶剤に溶解あるいは分散することで、重合開始剤溶液を調製し、調製した重合開始剤溶液中に基材を浸漬する方法などが挙げられる。

[0209] 重合開始剤を化学結合させた基材を、モノマーを含有する重合反応溶液に浸漬し、必要に応じて加熱することで、基材表面に、ブロック共重合体鎖を形成することができる。なお、重合反応溶液には、モノマーの他、各種ラジカル開始剤や、溶剤など重合反応に必要な成分を含有させることができる。

[0210] 本発明の細胞培養基材による細胞培養は、培養基材の表面に被覆されたブロック共重合体のLCSTよりも高い温度で行われるが、ヒト由来細胞を用いる場合は、高い培養効率を得ることを目的に体温付近で行うことが好ましく、 $35\sim39^\circ\text{C}$ の温度範囲で行うことがより好ましく、 $36\sim38^\circ\text{C}$ の温度範囲で行うことがさらに好ましい。その他の培養条件は特に限定されず、当分野において通常行われる条件下で培養を行ってよい。例えば、培地としては、ウシ胎児血清等の血清が添加されているものでもよいし、無血清培地でもよい。

[0211] 培養後、増殖細胞を細胞培養基材から剥離するには、周囲の温度をLCST

Tよりも低い温度、好ましくはLCSTより10℃低い温度以下に変化させるだけでよく、細胞を培養していた培養液中においても、その他の培地溶液中においても可能であり、目的に応じて選択することができる。その際、増殖細胞を効果的にかつ容易に剥離させるため、細胞培養基材を軽くたたいたり、揺らしたり、更にはピペット等を使用して培地を攪拌するなどしてもよい。

[0212] 本発明の培養方法において、好ましくは培養した細胞が冷却のみで最大径5 μm ～300 μm の大きさで剥離することができる。さらに好ましくは冷却のみで単一細胞の形状で剥離することができる。剥離細胞の大きさ、形状は、ブロック共重合体の組成および分子量、細胞培養基材の構造、細胞培養基材の製造方法、細胞培養方法、培養される細胞の種類を選択することによって調整できる。例えば、ブロック共重合体の中のブロック(B)の比率を上げること、細胞培養基材の製造方法によってブロック共重合体の厚さを増加させること、培養基材表面の凹凸を増加させることによって、細胞凝集塊の大きさを小さくでき、さらに単一細胞で剥離することができる。

[0213] 本発明の細胞培養基材を用いて培養される細胞としては、温度降下による刺激付与前の表面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巢由来CHO細胞やマウス結合組織L929細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞HEK293細胞やヒト子宮頸癌由来HeLa細胞等の種々の培養細胞株に加え、例えば生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の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、種々の組織に存在する幹細胞、さらにはそれらから分化誘導した細胞等を用いることができる。これら以外でも、血液、リンパ液、髄液、喀痰、尿又は便に含まれる細胞(生細胞)や、体内あるいは環境中に存在する微生物、ウイルス、原虫等を例示できる。

実施例

[0214] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら制限されるものではない。なお、断りのない限り、試薬は市販品を用いた。

[0215] <本ポリマーの組成>

核磁気共鳴測定装置（日本電子製、商品名JNM-GX270）を用いたプロトン核磁気共鳴分光（ $^1\text{H-NMR}$ ）スペクトル分析、およびフーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）（Perkin Elmer社製、商品名SPECTRUM ONE）より求めた。

[0216] <樹脂の物性>

重量平均分子量（ M_w ）、数平均分子量（ M_n ）および重量平均分子量（ M_w ）と数平均分子量の比（ M_w/M_n ）は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）によって測定した。GPC装置としては東ソー（株）製 HLC-8120 GPCを用い、カラムとしては、東ソー製 TSK Gel α -Mを用い、カラム温度を40℃に設定し、溶離液として10 mM-LiBr メタノール／水溶液（メタノール：水=70 vol%：30 vol%）を用いて測定した。測定試料は2.0 mg/mLで調製し、0.1 mL注入して測定した。分子量の検量線は、分子量既知のポリエチレンオキサイド試料を用いて校正した。なお、 M_n と M_w はポリエチレンオキサイド換算の値として求めた。

[0217] <膜の物性>

膜の厚さは細胞培養基材断面の透過型電子顕微鏡（TEM）観察により求めた。

[0218] 実施例 1

[ガラス製シャーレ表面への重合開始剤の導入]

固定化開始剤としての3-（3-（トリエトキシシリル）プロピルチオ）プロピル-2-ブロモ-2-メチルプロパネート0.5 g、エタノール50 g、およびアンモニア2.8 gを混合した溶液に、 ϕ 25 mmガラス製シャーレを浸漬し、24時間静置した。その後、エタノールで洗浄・乾燥を行うことで、表面に重合開始剤が導入されたシャーレを得た。

[0219] [重合体ブロック (B) の合成]

100 mL の 2 口ナス型フラスコ中において、窒素ガス雰囲気下で、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを 2.0 g、塩化銅 (I) 18.5 mg、塩化銅 (II) 2.8 mg、およびビピリジル 65 mg を、エタノール 10 g に溶解することで、重合反応溶液を調製した。

[0220] 次いで、上記にて製造した表面に重合開始剤が導入されたガラス製シャーレを、上記にて調製した重合反応溶液に浸漬させ、65℃に加熱し、攪拌することで反応を開始した。反応時間は6時間とし、反応終了後エタノールにて洗浄を行うことで、表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを得た。得られた2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロックを単離し、20℃の水100 mL に溶解させた結果、10 g を不溶部無しに溶解できた。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) のブロック単位中の親水部の式量は炭素8個、水素17個、窒素1個、酸素6個、リン1個の合計 (254.2) であり、ブロック単位の総式量は295.3であり、HLB値 (グリフィン法) は17であった。

[0221] [細胞培養基材の合成]

100 mL の 2 口ナス型フラスコ中において、窒素ガス雰囲気下で、N-イソプロピルアクリルアミド 1.2 g、塩化銅 (I) 18.5 mg、塩化銅 (II) 2.8 mg、およびビピリジル 65 mg を、エタノール 10 g に溶解することで、重合反応溶液を調製した。

[0222] 次いで、上記にて製造した表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを、上記にて調製した重合反応溶液に浸漬させ、65℃に加熱し、攪拌することで反応を開始した。反応時間は6時間とし、反応終了後エタノールにて洗浄を行うことで、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは

450nmであった。

[0223] 得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0224] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用い、マウス結合組織L929細胞（100個/mm²）を、37℃、CO₂濃度5%で培養した。培養液は10vol%ウシ胎児血清を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地（10vol%FBS/DMEM）を用いた。細胞増殖が確認され、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養したところで、10×10倍の顕微鏡で細胞数を確認した。基材を10℃に冷却後、アスピレーターで剥離した細胞を除去し、再度10×10倍の顕微鏡で細胞数を確認した。15分冷却することで細胞は最大直径20μmの単一細胞の形状で100%剥離した。

[0225] [剥離細胞の培養評価]

上記細胞培養評価で基材の100%を覆うまで増殖した細胞から培地成分を除いた後、新たにDMEM培地を添加して、10℃に冷却した。15分間で細胞は最大直径20μmの単一細胞の形状で100%剥離した。コーニング製の細胞培養表面処理φ35mmディッシュを用いて、上述にて剥離したL929細胞（50個/mm²）を、37℃、CO₂濃度5%で培養した。培養液は10vol%FBS/DMEMを用いた。細胞は24時間後に95個/mm²に、72時間後に660個/mm²まで増加した。

[0226] 参考例1

[細胞培養評価]

実施例1 [重合体ブロック（B）の合成] で合成した表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック（B）のみが導入されたガラス製シャーレ（基材）を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0227] 実施例 2

[重合体ブロック (B) の合成]

反応時間を 48 時間としたこと以外は実施例 1 [重合体ブロック (B) の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを得た。得られた 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロックを単離し、20℃の水 100 mL に溶解させた結果、10 g を不溶部無しに溶解できた。

[0228] [細胞培養基材の合成]

上記重合体ブロック (B) を用い、反応時間を 48 時間としたこと以外は実施例 1 [細胞培養基材の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは 500 nm であった。

[0229] 得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、および Mw/Mn を評価した結果を表 1 に示す。

[0230] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の 100% を覆うまで培養した後、基材を 10℃ に冷却することによって、15 分で細胞は最大直径 19 μm の単一細胞の形状で 100% 剥離した。

[0231] [剥離細胞の培養評価]

上記細胞培養評価で基材の 100% を覆うまで増殖した細胞から培地成分を除いた後、新たに DMEM 培地を添加して、10℃ に冷却した。15 分間で細胞は最大直径 19 μm の単一細胞の形状で 100% 剥離した。剥離した 9.29×10^4 細胞 (50 個/ mm^2) を、実施例 1 [剥離細胞の培養評価] と同様の方法で培養した。細胞は 24 時間後に 95 個/ mm^2 に、72 時間後に 700 個/ mm^2 まで増加した。

[0232] 参考例 2

[細胞培養評価]

実施例 2 [重合体ブロック (B) の合成] で合成した表面に 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体ブロック (B) のみが導入されたガラス製シャーレ (基材) を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の細胞培養評価を 5 日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0233] 実施例 3

[重合体ブロック (B) の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン 2.0 g の代わりに 2-メトキシエチルアクリレート 2.0 g を用いたこと以外は実施例 1 [重合体ブロック (B) の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に 2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを得た。得られた 2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロックを単離し、20℃の水 100 mL に溶解させた結果、1.5 g を不溶部無しに溶解できた。2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロック (B) のブロック単位中の親水部の式量は炭素 3 個、水素 4 個、酸素 3 個の合計 (88.1) であり、ブロック単位の総式量は 130.1 であり、HLB 値 (グリフィン法) は 14 であった。

[0234] [細胞培養基材の合成]

上記 2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレ、N-イソプロピルアクリルアミド 1.2 g の代わりに 1-(1-オキソ-2-プロペニル)ピロリジン 1.2 g を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養基材の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは 400 nm であった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマ

一組成、 M_w 、 M_n 、および M_w/M_n を評価した結果を表1に示す。

[0235] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20 μm の単一細胞の形状で85%剥離した。

[0236] 参考例3

[細胞培養評価]

実施例3 [重合体ブロック(B)の合成]で合成した表面に2-メトキシエチルアクリレート重合体ブロック(B)のみが導入されたガラス製シャーレ(基材)を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0237] 実施例4

[重合体ブロック(B)の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン2.0gの代わりにジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム2.0gを用いたこと以外は実施例1 [重合体ブロック(B)の合成]と同様の方法で合成を行い、表面にジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレを得た。得られたジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、ジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロックを単離し、20℃の水100mLに溶解させた結果、10gを不溶部無しに溶解できた。2-メトキシエチルアクリレートジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロック(B)のブ

ロック単位中の親水部の式量は炭素6個、水素10個、窒素1個、酸素4個の合計(160.1)であり、ブロック単位の総式量は215.2であり、HLB値(グリフィン法)は15であった。

[0238] [細胞培養基材の合成]

上記ジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレ、N-イソプロピルアクリルアミド1.2gの代わりに1-(1-オキソ-2-プロペニル)ピペリジン1.2gを用いたこと以外は、実施例1[細胞培養基材の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは350nmであった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0239] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1[細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20μmの単一細胞の形状で90%剥離した。

[0240] 参考例4

[細胞培養評価]

実施例4[重合体ブロック(B)の合成]で合成した表面にジメチル(2-メタクリロイルオキシエチル)(カルボキシラトメチル)アミニウム重合体ブロック(B)のみが導入されたガラス製シャーレ(基材)を用いたこと以外は、実施例1[細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0241] 実施例5

[重合体ブロック(B)の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン2.0gの代わりにジメ

チル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム 2.0 g を用いたこと以外は実施例 1 [重合体ブロック（B）の合成] と同様の方法で合成を行い、表面にジメチル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレを得た。得られたジメチル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、ジメチル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム重合体ブロックを単離し、20℃の水 100 mL に溶解させた結果、10 g を不溶部無しに溶解できた。ジメチル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム重合体ブロック（B）のブロック単位中の親水部の式量は炭素 5 個、水素 11 個、窒素 1 個、酸素 4 個、硫黄 1 個の合計（181.2）であり、ブロック単位の総式量は 278.4 であり、HLB 値（グリフィン法）は 13 であった。

[0242] [細胞培養基材の合成]

上記ジメチル（２－メタクリロイルアミノプロピル）（３－スルホナトプロピル）アミニウム重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレ、N－イソプロピルアクリルアミド 1.2 g の代わりに 4－（１－オキソ－２－プロペニル）モルホリン 1.2 g を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養基材の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは 380 nm であった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、および Mw/Mn を評価した結果を表 1 に示す。

[0243] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の 100% を覆うまで培養した後、基材を 10℃ に冷却することによって、15 分で細胞は最大直径 21

μm の単一細胞の形状で80%剥離した。

[0244] [剥離細胞の培養評価]

上述の細胞培養評価で基材の100%を覆うまで増殖した細胞から培地成分を除いた後、新たにDMEM培地を添加して、10℃に冷却した。30分間で細胞は最大直径20 μm の単一細胞の形状で100%剥離した。剥離したL929細胞(50個/ mm^2)を、実施例1[剥離細胞の培養評価]と同様の方法で培養した。細胞は24時間後に93個/ mm^2 に、72時間後に640個/ mm^2 まで増加した。

[0245] 参考例5

[細胞培養評価]

実施例5[重合体ブロック(B)の合成]で合成した表面にジメチル(2-メタクリロイルアミノプロピル)(3-スルホナトプロピル)アミニウム重合体ブロック(B)のみが導入されたガラス製シャーレ(基材)を用いたこと以外は、実施例1[細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0246] 実施例6

[重合体ブロック(B)の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン2.0gの代わりにポリエチレングリコールメタクリレート($b=8.5$, $c=0$, $R^{16}=\text{メチル基}$)2.0gを用いたこと以外は実施例1[重合体ブロック(B)の合成]と同様の方法で合成を行い、表面にポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレを得た。得られたポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、ポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロックを単離し、20℃の水100mLに溶解させた結果、10gを不溶部無しに溶解できた。ジメチル(2-メタクリロイルアミノプロピル)(3-スルホナトプロピル)アミニウムポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロック(B)のブロック単位中の親水部の式量は炭素18個、

水素34個、酸素10.5個の合計(418.5)であり、ブロック単位の総式量は474.6であり、HLB値(グリフィン法)は18であった。

[0247] [細胞培養基材の合成]

上記ポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロック(B)が導入されたガラス製シャーレ、N-イソプロピルアクリルアミド1.2gの代わりにN-n-プロピルメタクリルアミド1.2gを用いたこと以外は、実施例1[細胞培養基材の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは400nmであった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0248] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1[細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20μmの単一細胞の形状で100%剥離した。

[0249] 参考例6

[細胞培養評価]

実施例6[重合体ブロック(B)の合成]で合成した表面にポリエチレングリコールメタクリレート重合体ブロック(B)のみが導入されたガラス製シャーレ(基材)を用いたこと以外は、実施例1[細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0250] 実施例7

[重合体ブロック(B)の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン2.0gの代わりに2-ヒドロキシエチルメタクリレート2.0gを用いたこと以外は実施例1[重合体ブロック(B)の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に2-ヒド

ロキシエチルメタクリエート重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレを得た。得られた2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロックを単離し、20℃の水100mLに溶解させた結果、5gを不溶部無しに溶解できた。2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロック（B）のブロック単位中の親水部の式量は炭素3個、水素5個、酸素3個の合計（89.1）であり、ブロック単位の総式量は130.1であり、HLB値（グリフィン法）は14であった。

[0251] [細胞培養基材の合成]

上記2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレ、N-イソプロピルアクリルアミド1.2gの代わりにN,N-ジエチルアクリルアミド1.2gを用いたこと以外は、実施例1

[細胞培養基材の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは250nmであった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0252] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20μmの単一細胞の形状で90%剥離した。

[0253] 参考例7

[細胞培養評価]

実施例7 [重合体ブロック（B）の合成]で合成した表面に2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロック（B）が導入されたガラス製シャーレ（基材）を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確

認できなかった。

[0254] 実施例 8

[重合体ブロック (B) の合成]

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン 2.0 g の代わりに N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート 2.0 g を用いたこと以外は実施例 1 [重合体ブロック (B) の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを得た。得られた N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレを硫酸処理して、N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロックを単離し、20℃の水 100 mL に溶解させた結果、5 g を不溶部無しに溶解できた。N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロック (B) のブロック単位中の親水部の式量は炭素 5 個、水素 10 個、窒素 1 個、酸素 2 個の合計 (116.1) であり、ブロック単位の総式量は 157.2 であり、HLB 値 (グリフィン法) は 15 であった。

[0255] [細胞培養基材の合成]

上述の N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレ、N-イソプロピルアクリルアミド 1.2 g の代わりに N, N-ジエチルアクリルアミド 1.2 g を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養基材の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは 200 nm であった。

得られた細胞培養基材を硫酸処理して、ブロック共重合体を単離し、ポリマー組成、Mw、Mn、および Mw/Mn を評価した結果を表 1 に示す。

[0256] [細胞培養評価および剥離評価]

上述にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の 100% を覆うまで培養し

た後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20 μm の単一細胞の形状で90%剥離した。

[0257] 参考例8

[細胞培養評価]

実施例7 [重合体ブロック (B) の合成] で合成した表面にN, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体ブロック (B) が導入されたガラス製シャーレ (基材) を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0258] 実施例9

[重合体ブロック (B) の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコに2-ヒドロキシエチルメタクリエレート2.0 g、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0.073 g、アゾビスイソブチルニトリル0.004 gを加え、1, 4-ジオキサン/エタノール=1:1混合溶液10 mLに溶解した。窒素バブリングを30分行った後、65℃で12時間反応させた。反応後ジエチルエーテルで再沈し、2-ヒドロキシエチルメタクリエートの重合体ブロック (B) を得た。得られた2-ヒドロキシエチルメタクリエート重合体ブロック (B) を20℃の水100 mLに溶解させた結果、5 gを不溶部無しに溶解できた。

[0259] [ブロック共重合体の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコに上記重合体ブロック (B) 1.2 g、N, N-ジエチルアクリルアミド1.2 g、アゾビスイソブチルニトリル0.004 gを加え、1, 4-ジオキサン/エタノール=1:2混合溶液15 mLに溶解した。窒素バブリングを30分行った後、65℃で12時間反応させた。反応後ヘキサンで再沈し、ブロック共重合体を得た。ポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0260] [細胞培養基材の合成]

上記にて製造したブロック共重合体 100 重量部と、架橋剤としてヘキサメトキシメチルメラミン 30 重量部と。光酸発生剤としてトリフェニルスルホニウムトリフレート 10 重量部を、溶媒としてジアセトンアルコール 250 部に溶解し、塗布溶液とした。ガラス基板上に上記塗布溶液をスピンの回転速度 3000 rpm でスピンコートした。塗布後 80℃ で 5 分間加熱処理して溶媒を揮発させ、膜厚 1.8 μ m の塗膜を得た。高圧水銀ランプを用いて、塗膜への露光を行った。露光後、120℃ で 5 分間加熱処理を行い、露光によって発生した酸による酸触媒反応によって架橋反応を進行させた。その後、水で洗浄し、120℃ で 30 分間加熱乾燥した。膜の厚さは 25 nm であった。

[0261] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造したガラス基板をガラス製シャーレに入れ、細胞培養基材として用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認され、細胞増殖後の細胞剥離評価では、3 分冷却することで細胞はシート状で 24% 剥離した。また 15 分冷却することで細胞は最大直径 5 mm のシート状で 90% 剥離した。

[0262] 参考例 9

[細胞培養基材の合成]

実施例 9 [重合体ブロック (B) の合成] で合成した表面に 2-ヒドロキシエチルメタクリレート重合体ブロック (B) のみをブロック共重合体の代わりに用いたこと以外は、実施例 9 [細胞培養基材の合成] と同様の方法でガラス基材を合成した。

[0263] [細胞培養評価]

上述のガラス基板を用いたこと以外は、実施例 8 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の細胞培養評価を 5 日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0264] 実施例 10

[重合体ブロック (B) の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコにN-ビニルピロリドンを1.0 g、スチレン1.3 g、RAFT剤として4-シアノ-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0.073 g、アゾビスイソブチルニトリル0.004 gを加え、1,4-ジオキサン/エタノール=1:1混合溶液10 mLに溶解した。窒素バブリングを30分行った後、65℃で12時間反応させた。反応後ジエチルエーテルで再沈し、N-ビニルピロリドンとスチレンのランダム共重合体ブロック(B)を得た。得られたN-ビニルピロリドンとスチレンのランダム共重合体ブロック(B)を20℃の水100 mLに溶解させた結果、0.5 gを不溶部無しに溶解できた。

[0265] [ブロック共重合体の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコに上記ランダム共重合体ブロック(B) 1.2 g、N-エトキシエチルアクリルアミド1.2 g、アゾビスイソブチルニトリル0.004 gを加え、1,4-ジオキサン/エタノール=1:2混合溶液15 mLに溶解した。窒素バブリングを30分行った後、65℃で12時間反応させた。反応後ヘキサンで再沈し、ブロック共重合体を得た。

[0266] 得られたブロック共重合体のポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0267] [細胞培養基材の合成]

上記にて製造したブロック共重合体0.10 gをエタノール49.90 gに溶解し、ブロック共重合体の0.2 wt %エタノール溶液を作成した。φ25 mmガラス製シャーレにブロック共重合体の0.2 wt %エタノール溶液を2.5 mL加え、30分間静置した。その後ブロック共重合体の0.2 wt %エタノール溶液をピペットで抜き取り、デシケータで乾燥することで表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を合成した。膜の厚さは65 nmであった。

[細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこ

と以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の 100%を覆うまで培養した後、基材を 10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径 20 μm の単一細胞の形状で 75%剥離した。

[0268] 参考例 10

[細胞培養基材の合成]

実施例 10 [重合体ブロック (B) の合成] で合成した N-ビニルピロリドンとスチレンのランダム共重合体ブロック (B) をブロック共重合体の代わりに用いたこと以外は実施例 10 [細胞培養基材の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に N-ビニルピロリドンとスチレンのランダム共重合体ブロックが導入された細胞培養基材を合成した。

[0269] [細胞培養評価]

上述にて製造した表面に N-ビニルピロリドンとスチレンのランダム共重合体ブロックが導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を 5 日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0270] 実施例 11

[重合体ブロック (B) の合成]

100 mL の 2 口ナス型フラスコに 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを 1.5 g、スチレン 1.3 g、RAFT 剤として 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 6 mg、アゾビスイソブチルニトリル 1 mg を加え、1,4-ジオキサン/エタノール=1:1 混合溶液 10 mL に溶解した。窒素バブリングを 30 分行った後、65℃で 72 時間反応させた。反応後アセトンで再沈し、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロック (B) を得た。得られた 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロック (B) を 20℃の水 100 mL に溶解させた結果、1.0 g を不溶部無しに溶解できた。

[0271] [ブロック共重合体の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコに上記ランダム共重合体ブロック (B) 0.8 g、N-イソプロピルアクリルアミド0.9 g、アゾビスイソブチルニトリル0.003 gを加え、1,4-ジオキサン/エタノール=1:1混合溶液10 mLに溶解した。窒素バブリングを30分行った後、65℃で24時間反応させた。反応後ヘキサンで再沈し、ブロック共重合体を得た。得られたブロック共重合体のポリマー組成、Mw、Mn、およびMw/Mnを評価した結果を表1に示す。

[0272] [細胞培養基材の合成]

上述のブロック共重合体0.01 gをエタノール4.99 gに溶解し、ブロック共重合体の0.2 wt %エタノール溶液を作製した。さらに、0.2 wt %エタノール溶液1 mLとエタノール9 mLを混合し、0.02 wt %エタノール溶液を調製した。コーニング社製直径35 mm細胞培養表面処理ディッシュ (No. 430165) に0.02 wt %エタノール溶液を0.44 mL加え、室温で乾燥した。さらに、減圧乾燥を6時間行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を合成した。膜の厚さは100 nmであった。

[0273] [細胞培養評価および剥離評価]

上述にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径20 μ mの単一細胞の形状で90%剥離した。

[0274] 参考例11

[細胞培養基材の合成]

実施例11 [重合体ブロック (B) の合成] で合成した2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロック (B) をブロック共重合体の代わりに用いたこと以外は実施例11 [細胞培養基

材の合成]と同様の方法で合成を行い、表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロックが導入された細胞培養基材を合成した。

[0275] [細胞培養評価]

上述にて製造した表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロックが導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0276] 実施例12

[細胞培養評価および剥離評価]

実施例11 [細胞培養基材の合成]で製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用い、正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF細胞) (1.14×10^4 個/ mm^2) を、 37°C 、 CO_2 濃度5%で培養した。培養液はDSファーマバイオメディカル(株)製CS-C培地キット (No. CS4Z0500R) を用いた。細胞増殖が確認され、72時間培養したところで、 1.0×10^5 倍の顕微鏡で細胞数を確認し、 4.25×10^5 個/ mm^2 まで増殖していた。基材を 10°C に冷却後、アスピレーターで剥離した細胞を除去し、再度 1.0×10^5 倍の顕微鏡で細胞数を確認した。15分冷却することで細胞は最大直径 $22 \mu\text{m}$ の単一細胞の形状で100%剥離した。

[0277] [剥離細胞の培養評価]

上述の細胞培養評価で72時間培養した細胞から培地成分を除いた後、新たにDSファーマバイオメディカル(株)製CS-C培地キット (No. CS4Z0500R) 基礎培地を添加して、 10°C に冷却した。15分間で細胞は最大直径 $22 \mu\text{m}$ の単一細胞の形状で100%剥離した。コーニング社製直径35mm細胞培養表面処理ディッシュ (No. 430165) を用いて、上記にて剥離したNHDF細胞 (5.0×10^4 個/ mm^2) を、 37°C 、 CO_2 濃度5%で培養した。培養液はDSファーマバイオメディカル(株)製CS-C培地キット (No. CS4Z0500R) を用いた。細胞は24時間後に1

50個/mm²に、72時間後に460個/mm²まで増加した。

[0278] 実施例13

[細胞培養評価および剥離評価]

実施例11 [細胞培養基材の合成] で製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用い、マウス結合組織L929細胞 (100個/mm²) の代わりにチャイニーズハムスター卵巣由来CHO細胞 (100個/mm²) を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認された。また、培養細胞が基材の100%を覆うまで培養した後、基材を10℃に冷却することによって、15分で細胞は最大直径18μmの単一細胞の形状で70%剥離した。

[0279] 参考例12

[細胞培養評価]

参考例11 [細胞培養基材の合成] で製造した表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロックのみが導入された細胞培養基材を用い、マウス結合組織L929細胞 (100個/mm²) の代わりにチャイニーズハムスター卵巣由来CHO細胞 (100個/mm²) を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の細胞培養評価を5日間行ったが、細胞は基材に接着せず、増殖は確認できなかった。

[0280] 実施例14

[細胞培養基材の合成]

実施例11 [ブロック共重合体の合成] で合成したブロック共重合体0.04gをエタノール20gに溶解し、ブロック共重合体の0.2wt%エタノール溶液を作製した。さらに、0.2wt%エタノール溶液20mLとエタノール180mLを混合し、0.02wt%エタノール溶液を調製した。300mLガラス製フラスコに上述のブロック共重合体0.02wt%エタノール溶液を180mL添加した後、エタノール溶液をスターラーで攪拌しながら、Corning(R) Untreated Microcarrie

rs (No. 4625) 10gを添加し、室温で30分間攪拌した。得られた培養基材懸濁液から、減圧下でエタノールを除去し、減圧下、室温で乾燥することによって、表面に2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとスチレンのランダム共重合体ブロック(B)とN-イソプロピルアクリルアミド重合体ブロック(A)からなるブロック共重合体からなる温度応答性膜が導入された細胞培養基材を合成した。

[0281] [細胞培養評価および剥離評価]

上記細胞培養基材をリン酸緩衝整理食塩水(PBS)溶液に分散させ、オートクレーブ滅菌を行った。その後、血球計算盤上に0.5 μ Lを添加し、ビーズ濃度を計算した。(株)セルシード製HydroCell(R) 3.5cmディッシュに細胞培養基材を 1×10^4 ビーズ/mL、L929細胞を100 cells/ビーズとなるように加え、37°Cで培養を行った。72時間培養後、培養液をチューブに移し、培養液を2 mL加え、10分間静置した後、上澄みを捨てることで、未接着の浮遊細胞および細胞凝集塊を除いた。さらにセルストレーナー(メッシュサイズ40 μ m)で浮遊細胞をろ過し、ろ物を培地2 mL中で再分散させた。その後、10°Cのインキュベーターで15分間インキュベートし、細胞は最大直径20 μ mの単一細胞の形状で剥離した。セルストレーナー(メッシュサイズ40 μ m)で剥離した細胞をろ過し、血球計算盤を用いて細胞数を計算した。また、対照実験として、トリプシン-EDTA溶液中で処理を行った際の細胞剥離数を計測した。10°Cへの温度低下により剥離した細胞は 4×10^5 個で、トリプシン-EDTA溶液中での処理により剥離した細胞(4×10^5 個)とほぼ同等であり、温度低下によってほぼ100%細胞を回収することができた。

[0282] 比較例1

[重合体ブロック(A)の合成]

100 mLの2口ナス型フラスコにn-ブチルメタクリレート2.240 g、RAFT剤として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0.073 g、アゾビスイソ

ブチルニトリル 0.004 g を加え、1, 4-ジオキサン 10 mL に溶解した。窒素バブリングを 30 分行った後、65℃で 12 時間反応させた。反応後、メタノールで再沈し、n-ブチルメタクリレートの重合体を得た。得られた n-ブチルメタクリレート重合体ブロック 0.5 g を 20℃の水 100 mL に添加した結果、不溶部が存在し完全に溶解できなかった。

[0283] さらに 100 mL の 2 口ナス型フラスコに n-ブチルメタクリレート重合体 1.200 g、N-イソプロピルアクリルアミド 1.210 g、アゾビスイソブチルニトリル 0.004 g を加え、1, 4-ジオキサン/エタノール = 1 : 2 混合溶液 15 mL に溶解した。窒素バブリングを 30 分行った後、65℃で 12 時間反応させた。反応後、純水で再沈し、n-ブチルメタクリレートと N-イソプロピルアクリルアミドがブロック共重合したポリマーを得た。

[0284] [細胞培養基材の合成]

上記にて製造した重合体を用いたこと以外は、実施例 10 [細胞培養基材の合成] と同様の方法で合成を行い、表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を得た。膜の厚さは 100 nm であった。

[0285] [細胞培養評価および剥離評価]

上記にて製造した表面に温度応答性膜が導入された細胞培養基材を用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認され、細胞増殖後の細胞剥離評価では、3 分冷却することで細胞はシート状で 24 % 剥離した。また 15 分冷却することで細胞は最大直径 8 mm のシート状で 60 % 剥離した。

[0286] 比較例 2

[細胞培養評価および剥離評価]

セルシード (株) 製 UpCell (R) 35 mm φ ディッシュを用いたこと以外は、実施例 1 [細胞培養評価および剥離評価] と同様の評価を行い、細胞増殖が確認され、細胞増殖後の細胞剥離評価では、3 分冷却することで細胞はシート状で 30 % 剥離した。また 15 分冷却することで細胞は最大直径

1 cmのシート状で65%剥離した。

[0287] [剥離細胞の培養評価]

上述の細胞培養評価で基材の100%を覆うまで増殖した細胞から培地成分を除いた後、新たにDMEM培地を添加して、10℃に冷却した。1時間で細胞は最大直径1 cmのシート状で100%剥離した。剥離したL929細胞をピペettingで分散化させた後、50個/mm²の細胞密度で播種し、実施例1 [剥離細胞の培養評価]と同様の方法で培養した。細胞は24時間後に80個/mm²に、72時間後に450個/mm²まで増加し、本発明の細胞培養基材から剥離した細胞よりも増殖速度が遅かった。

[0288] 比較例3

[細胞培養評価および剥離評価]

コーニング製の細胞培養表面処理φ35 mmディッシュを用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認されたが、細胞増殖後の細胞剥離評価では、15分冷却しても細胞は全く剥離しなかった。

[トリプシンによる剥離および剥離細胞の評価]

上述の細胞培養評価で基材の100%を覆うまで増殖した細胞から培地成分を除いた後、トリプシンEDTA溶液（和光純薬工業（株）製）1 mLを添加し、37℃、CO₂濃度5%で10分間放置し、細胞を剥離した。剥離した細胞とトリプシンEDTA溶液の混合物を遠心管中に移送し、10 vol % FBS / DMEM培地1 mLを追加し、1000 rpmで3分間遠心分離した。上澄みを除去した後、新たに10 vol % FBS / DMEM培地を添加して、トリプシン処理で剥離したL929細胞を回収した。回収したL929細胞（50個/mm²）を、実施例1 [剥離細胞の培養評価]と同様の方法で培養した。細胞は24時間後に80個/mm²に、72時間後に480個/mm²まで増加し、本発明の細胞培養基材から冷却により剥離した細胞よりも増殖速度が遅かった。

[0289] 比較例4

[細胞培養評価および剥離評価]

セルシード（株）製UpCell^(R) 35 mm φディッシュを用いたこと以外は、実施例12 [細胞培養評価および剥離評価]と同様に評価を行い、細胞増殖が確認され、72時間培養したところで384個/mm²まで増殖していた。基材を10℃に冷却し、15分冷却することで細胞は最大直径1.2 cmのシート状で90%剥離した。

[剥離細胞の培養評価]

上述の細胞培養評価で得られた細胞をピペティングで分散化させた後、用いたこと以外は、実施例12 [剥離細胞の培養評価]と同様の方法で評価を行った。細胞は24時間後に210個/mm²に、72時間後に880個/mm²まで増加した。

[0290] 比較例5

[細胞培養評価および剥離評価]

コーニング製の細胞培養表面処理φ35 mmディッシュを用いたこと以外は、実施例12 [細胞培養評価および剥離評価]と同様に評価を行い、細胞増殖が確認され、72時間培養したところで266個/mm²まで増殖していた。基材を10℃に冷却し、60分冷却したが細胞は剥離しなかった。

[トリプシンによる剥離および剥離細胞の評価]

上述の細胞培養評価で得られた細胞から培地成分を除いた後、0.25%トリプシンEDTA溶液（和光純薬工業（株）製）1.5 mLを添加し、37℃、CO₂濃度5%で2分間放置し、細胞を剥離した。剥離した細胞とトリプシンEDTA溶液の混合物を遠心管中に移送し、DSファーマバイオメディカル（株）製CS-C培地キット（No. CS4Z0500R）基礎培地2 mLを追加し、1000 rpmで3分間遠心分離した。上澄みを除去した後、新たに、DSファーマバイオメディカル（株）製CS-C培地キット（No. CS4Z0500R）基礎培地を添加して、トリプシン処理で剥離したNHDF細胞を回収した。回収したNHDF細胞（50個/mm²）を用いたこと以外は、実施例12 [剥離細胞の培養評価]と同様の方法で評価を行

った。細胞は24時間後に150個/mm²に、72時間後に690個/mm²まで増加した。

[0291] 比較例6

[細胞培養評価および剥離評価]

セルシード（株）製UpCell^(R)35mmφディッシュを用い、マウス結合組織L929細胞（100個/mm²）の代わりにチャイニーズハムスター卵巢由来CHO細胞（100個/mm²）を用いたこと以外は、実施例1 [細胞培養評価および剥離評価]と同様の評価を行い、細胞増殖が確認され、細胞増殖後の細胞剥離評価では、3分冷却することで細胞はシート状で15%剥離した。また15分冷却することで細胞は最大直径1.2cmのシート状で50%剥離した。

[表1]

実施例	ブロック(A)	LDS1/℃	ブロック(B)	F100値	水蒸気透過率	組成(mole%)		Mn	Mw/Mn	培養細胞	発酵性(%) 冷却15分後	発酵細胞 形状
						(a)	(b)					
実施例1	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	17	≥10	64	46	1.1×10 ⁴	1.4	L929	100	単一 細胞
実施例2	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	17	≥10	84	16	3.3×10 ⁴	1.5	L929	100	単一 細胞
実施例3	1-(1-オキシ-2-プロペニル) ピロリジン重合体	28	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	14	≥15	50	50	2.2×10 ⁴	1.6	L929	85	単一 細胞
実施例4	1-(1-オキシ-2-プロペニル) ピロリジン重合体	25	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	15	≥10	50	50	2.5×10 ⁴	1.5	L929	90	単一 細胞
実施例5	4-(1-オキシ-2-プロペニル) ピロリジン重合体	28	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	13	≥10	50	50	2.3×10 ⁴	1.5	L929	80	単一 細胞
実施例6	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	18	≥10	50	50	2.8×10 ⁴	1.5	L929	100	単一 細胞
実施例7	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	14	≥5	50	50	2.4×10 ⁴	1.5	L929	90	単一 細胞
実施例8	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	15	≥5	48	52	2.2×10 ⁴	1.4	L929	80	単一 細胞
実施例9	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	14	≥5	50	50	6.6×10 ⁴	1.5	L929	90	単一 細胞
実施例10	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	35	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	—	≥0.5	35	35	10.6×10 ⁴	1.6	L929	75	単一 細胞
実施例11	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	—	≥1	84	11	16.0×10 ⁴	1.5	L929	90	単一 細胞
実施例12	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	—	≥1	84	11	16.0×10 ⁴	1.5	MHDF	100	単一 細胞
実施例13	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	—	≥1	64	11	18.0×10 ⁴	1.5	CHO	70	単一 細胞
実施例14	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	2-メタクリロイルオキシエチル ホスホコリン重合体	—	≥1	84	11	16.0×10 ⁴	1.5	L929	100	単一 細胞
比較例1	N-イソプロピルアクリルアミド 重合体	32	—	—	<0.5	50	0	1.2×10 ⁴	1.5	L929	60	単一 細胞
比較例2	セルシード(株)製UpCell35mmφディッシュ					100	0	—	—	L929	65	単一 細胞
比較例3	コーニング製細胞培養器(35mmφディッシュ)					—	—	—	—	L929	0	—
比較例4	セルシード(株)製UpCell35mmφディッシュ					100	0	—	—	MHDF	90	単一 細胞
比較例5	コーニング製細胞培養器(35mmφディッシュ)					—	—	—	—	MHDF	0	—
比較例6	セルシード(株)製UpCell35mmφディッシュ					100	0	—	—	CHO	90	単一 細胞

1) 20℃の水100mLに溶解できる重合体濃度(g/100mL)

[0292] なお、2015年3月31日に出願された日本特許出願2015-072908の明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

産業上の利用可能性

[0293] 本発明によれば、短時間での細胞剥離を可能にする細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法を提供することができる。さらに、細胞を最大直径 $5\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$ の大きさで剥離し、細胞の分散化作業を省略できる細胞培養基材、その製造方法およびそれを用いた細胞培養方法を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 下記（Ａ）および（Ｂ）のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材。

（Ａ）水に対する下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）が０℃～５０℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

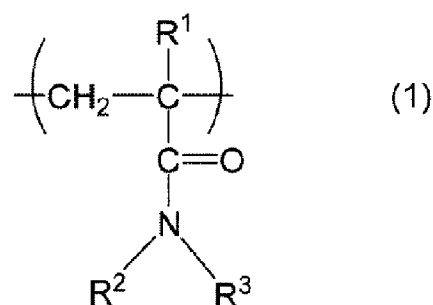
（Ｂ）０℃～５０℃の範囲にＬＣＳＴを持たない、ＨＬＢ値（グリフィン法）が９～２０の範囲にある親水性重合体のブロック。

[請求項2] ブロック（Ｂ）が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも１種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする請求項１に記載の細胞培養基材。

[請求項3] ブロック（Ｂ）が水に対して溶解性を示すブロックであることを特徴とする請求項１または２に記載の細胞培養基材。

[請求項4] ブロック（Ａ）の繰り返し単位が下記一般式（１）

[化1]

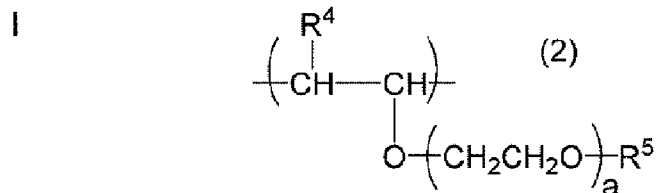


（式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 R^2 および R^3 は各々独立して、水素基、炭素数１～６の炭化水素基、フルフリル基またはテ

トラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。) で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項5] ブロック (A) の繰り返し単位が下記一般式 (2)

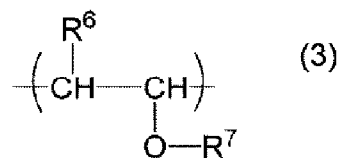
[化2]



(式中、 R^4 は水素原子またはメチル基を表し、 R^5 は、水素原子、炭素数1～6の炭化水素基であり、 a は1～10の整数を表す。) で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項6] ブロック (A) の繰り返し単位が下記一般式 (3)

[化3]

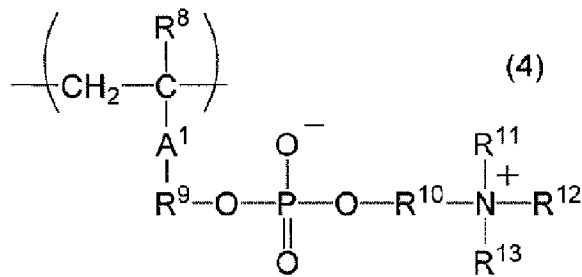


(式中、 R^6 は水素原子またはメチル基を表し、 R^7 は炭素数1～6の炭化水素基を表す。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項7] ブロック (B) の繰り返し単位が下記一般式 (4)

[化4]



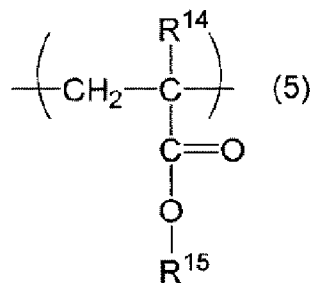
(式中、 R^8 は水素原子又はメチル基であり、 R^9 は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は(ポリ)オキシエチレン基であり、 R^{10} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、互いに独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^1 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位(b)からなる(共)重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項8]

ブロック(B)の繰り返し単位が下記一般式(5)

[化5]



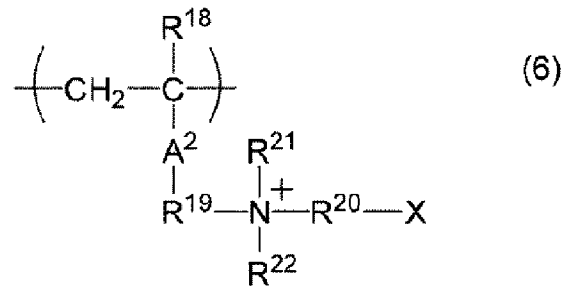
[式中、 R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、 R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c-\text{R}^{16}$ (式中、 R^{16} は水素原子、炭素数1～30のアルキル基であり、 b は1～300の整数であり、 c は0～60の整数である。)で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ (式中、 R^{17} は水素原子、炭素数1～5のアルキル基である。)で表される置換基、フルフリル基、テトラヒド

ロフルフリル基、水素原子を示す。]

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項9] ブロック（B）の繰り返し単位が下記一般式（6）

[化6]

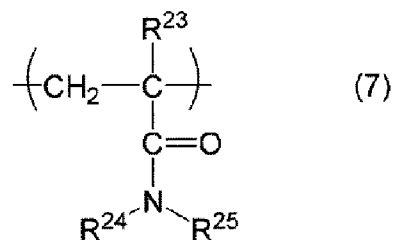


（式中、 R^{18} は水素原子又はメチル基であり、 R^{19} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基であり、 R^{20} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、 R^{21} 、 R^{22} は各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、 X はスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基ある。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項10] ブロック（B）の繰り返し単位が下記一般式（7）

[化7]

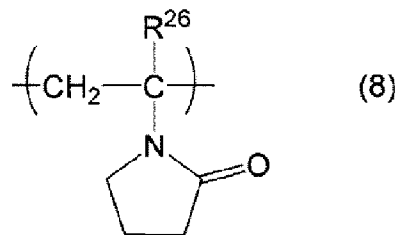


(式中、 R^{23} は水素原子又はメチル基であり、 R^{24} 、 R^{25} は各々独立して水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項11] ブロック (B) の繰り返し単位が下記一般式 (8)

[化8]

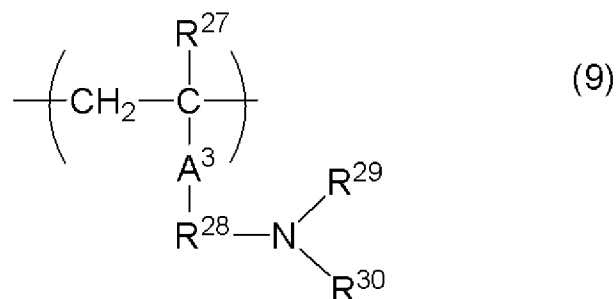


(式中、 R^{26} は水素原子又はメチル基である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項12] ブロック (B) の繰り返し単位が下記一般式 (9)

[化9]



(式中、 R^{27} は水素原子又はメチル基であり、 R^{28} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基であり、 R^{29} 、 R^{30} は各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位 (b) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項13] 全ブロック単位 [(a) + (b)] に対するブロック単位 (a) の比率が5～95 mol %であることを特徴とする請求項1～12の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項14] ブロック共重合体の数平均分子量 (M_n) が3,000以上1,000,000以下であることを特徴とする請求項1～13の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項15] 数平均分子量 (M_n) が5,000以上100,000以下であることを特徴とする請求項1～13の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項16] 下記 (A) および (B) のブロックを含むブロック共重合体で表面を被覆した細胞培養基材。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度 (LCST) が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 下記 (i) ～ (iii) の要件を満たすブロック。

(i) 0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

(ii) カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸、エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

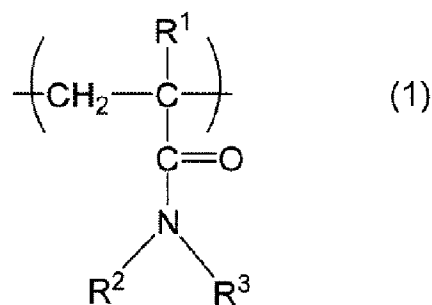
(iii) (ii) の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、(メタ) アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが

生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

[請求項17] ブロック（B）が水に対して溶解性を示すブロックであることを特徴とする請求項16に記載の細胞培養基材。

[請求項18] ブロック（A）の繰り返し単位が下記一般式（1）

[化10]

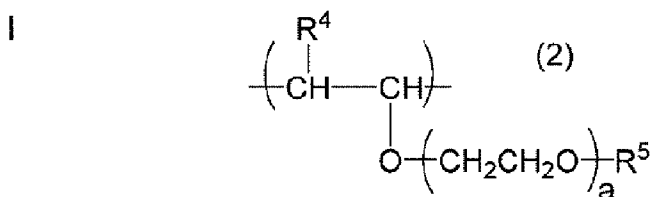


（式中、 R^1 は水素原子又はメチル基であり、 R^2 および R^3 は各々独立して、水素基、炭素数1～6の炭化水素基、フルフリル基またはテトラヒドロフルフリル基であり、 R^2 と R^3 は互いに結合してピロリジン環、ピペリジン環もしくはモルホリン環を形成しても良い。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（a）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項16または17に記載の細胞培養基材。

[請求項19] ブロック（A）の繰り返し単位が下記一般式（2）

[化11]

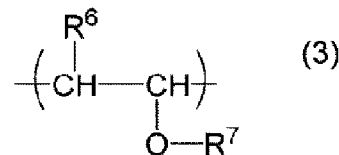


（式中、 R^4 は水素原子またはメチル基を表し、 R^5 は、水素原子、

炭素数 1 ～ 6 の炭化水素基であり、 a は 1 ～ 10 の整数を表す。）
 で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項 16 または 17 に記載の細胞培養基材。

[請求項20] ブロック (A) の繰り返し単位が下記一般式 (3)

[化12]

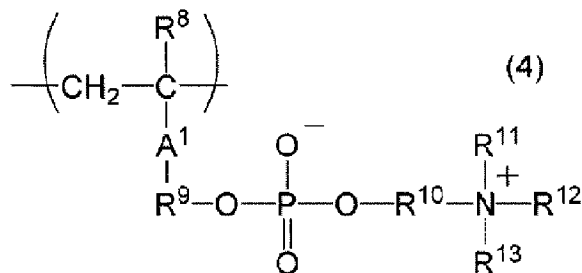


(式中、 R^6 は水素原子またはメチル基を表し、 R^7 は炭素数 1 ～ 6 の炭化水素基を表す。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (a) からなる (共) 重合体のブロックであることを特徴とする請求項 16 または 17 に記載の細胞培養基材。

[請求項21] ブロック (B) の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式 (4)

[化13]

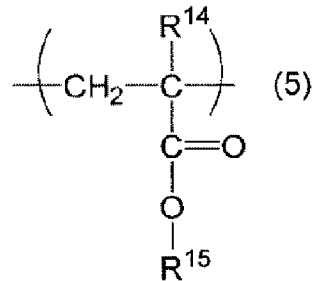


(式中、 R^8 は水素原子又はメチル基であり、 R^9 は、炭素数 1 ～ 10 の 2 価の炭化水素基、又は (ポリ) オキシエチレン基であり、 R^{10} は、炭素数 1 ～ 4 の 2 価の炭化水素基であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、互いに独立して、水素原子又は炭素数 1 ～ 4 の炭化水素基であり、 A^1 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される 2 価の結合である。)

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位 (b)

）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項 1
6～20の何れか1項に記載の細胞培養基材。

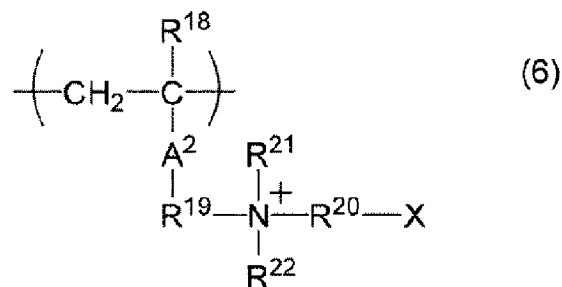
[請求項22] ブロック（B）の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式（5）
[化14]



[式中、 R^{14} は水素原子またはメチル基を表し、 R^{15} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_c-\text{R}^{16}$ （式中、 R^{16} は水素原子、炭素数1～30のアルキル基であり、 b は1～300の整数であり、 c は0～60の整数である。）で表されるポリオキシアルキレン基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{17}$ （式中、 R^{17} は水素原子、炭素数1～5のアルキル基である。）で表される置換基、フルフリル基、テトラヒドロフルフリル基、水素原子を示す。]

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（ b ）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項 1
6～20の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項23] ブロック（B）の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式（6）
[化15]

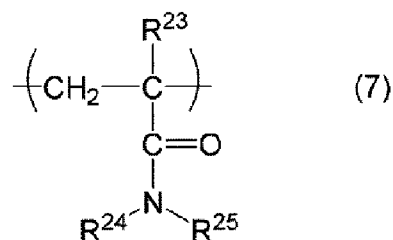


（式中、 R^{18} は水素原子又はメチル基であり、 R^{19} は、炭素数1～10の2価の炭化水素基、又は（ポリ）オキシエチレン基であり、 R

R^{20} は、炭素数1～4の2価の炭化水素基であり、 R^{21} 、 R^{22} は各々独立して、水素原子又は炭素数1～4の炭化水素基であり、 A^2 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される2価の結合であり、 X はスルホン酸アニオン基、カルボン酸アニオン基、リン酸アニオン基ある。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項16～20の何れか1項に記載の細胞培養基材。

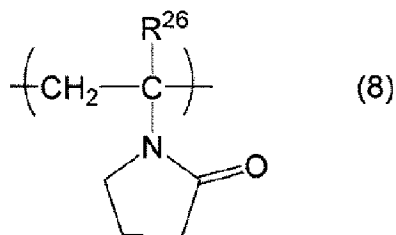
[請求項24] ブロック（B）の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式（7）
[化16]



（式中、 R^{23} は水素原子又はメチル基であり、 R^{24} 、 R^{25} は各々独立して水素原子又はメチル基である。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項16～20の何れか1項に記載の細胞培養基材。

[請求項25] ブロック（B）の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式（8）
[化17]

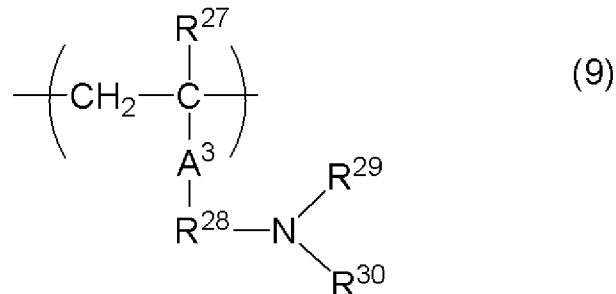


（式中、 R^{26} は水素原子又はメチル基である。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも1種類のブロック単位（b）

）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項 16～20 の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[請求項26] ブロック（B）の親水性重合体の繰り返し単位が下記一般式（9）
[化18]



（式中、 R^{27} は水素原子又はメチル基であり、 R^{28} は、炭素数 1～10 の 2 価の炭化水素基であり、 R^{29} 、 R^{30} は各々独立して、水素原子又は炭素数 1～4 の炭化水素基であり、 A^3 は、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合からなる群から選択される 2 価の結合である。）

で表されるブロック単位の内、少なくとも 1 種類のブロック単位（b）からなる（共）重合体のブロックであることを特徴とする請求項 16～20 の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[請求項27] 全ブロック単位〔（a）＋（b）〕に対するブロック単位（a）の比率が 5～95 mol %であることを特徴とする請求項 16～26 の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[請求項28] ブロック共重合体の数平均分子量（ M_n ）が 3,000 以上 1,000,000 以下であることを特徴とする請求項 16～27 の何れか 1 項に記載の細胞培養基材。

[請求項29] 下記（A）および（B）のブロックを含むブロック共重合体を、溶媒に溶解させ、基材に塗布後、乾燥することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

（A）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が 0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない、HLB値（グリフィン法）が9～20の範囲にある親水性重合体のブロック。

[請求項30] ブロック(B)が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする請求項29に記載の製造方法。

[請求項31] 下記(A)および(B)のブロックを含むブロック共重合体を、溶媒に溶解させ、基材に塗布後、乾燥することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

(A) 水に対する下限臨界溶解温度(LCST)が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

(B) 下記(i)～(iii)の要件を満たすブロック。

(i) 0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

(ii) カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

(iii) (ii)の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、(メタ)アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位

、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、（メタ）アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

[請求項32] 下記（A）および（B）のブロックを含むブロック共重合体を、基材に化学結合で固定化することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

（A）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

（B）0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない、HLB値（グリフィン法）が9～20の範囲にある親水性重合体のブロック。

[請求項33] ブロック（B）が、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキシ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの重合体であることを特徴とする請求項32に記載の製造方法。

[請求項34] 下記（A）および（B）のブロックを含むブロック共重合体を、基材に化学結合で固定化することを特徴とする細胞培養基材の製造方法。

（A）水に対する下限臨界溶解温度（LCST）が0℃～50℃の範囲にある温度応答性重合体のブロック。

（B）下記（i）～（iii）の要件を満たすブロック。

（i）0℃～50℃の範囲にLCSTを持たない。

（ii）カルボン酸基、カルボン酸エステル基、カルボン酸金属塩、スルホン酸基、スルホン酸エステル基、スルホン酸金属塩、ヒドロキ

シ基、アルコキシ基、フェノキシ基、アミド基、アミノアルキル基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、カルバメート基、リン酸基、リン酸基の金属塩、オキシリン酸基、オキシリン酸基の金属塩、ホスホベタイン基、スルホベタイン基、カルボベタイン基、ポリエチレングリコール基、ピロリドン基から選ばれる少なくとも1種の親水性基を有するモノマーの親水性重合体である。

(i i i) (i i) の重合体中に、芳香族ビニル化合物が生成するモノマー単位、(メタ)アクリルアミド化合物が生成するモノマー単位、フマル酸ジエステル化合物が生成するモノマー単位、塩化ビニルが生成するモノマー単位、酢酸ビニルが生成するモノマー単位、(メタ)アクリロニトリルが生成するモノマー単位、N-ビニルイミダゾールが生成するモノマー単位、N-ビニルカルバゾールが生成するモノマー単位から選ばれる少なくとも1種のモノマー単位を含有する。

[請求項35] 請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞培養基材を用いて、下限臨界溶解温度(LCST)より高い温度で細胞を培養し、細胞増殖後に温度をLCSTより低くして増殖細胞を基材から剥離することを特徴とする細胞培養方法。

[請求項36] 培養した細胞が最大直径5 μm ～300 μm の大きさを剥離することを特徴とする請求項35に記載の細胞培養方法。

[請求項37] 培養した細胞が単一細胞で剥離することを特徴とする請求項35または36に記載の細胞培養方法。

[請求項38] 請求項35～37のいずれか1項に記載の細胞培養方法で剥離した細胞を用いて、細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C08F297/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(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, C08F297/00, C12M1/00, C12M3/04

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-343451 A (Yamato KUBOTA), 20 December 1994 (20.12.1994), claims; paragraphs [0036] to [0050], [0056],	1-4, 10-12, 16-18, 24-26, 29-31, 35
Y	[0059]; examples (Family: none)	1-38
X	JP 2014-100123 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 05 June 2014 (05.06.2014),	1-4, 6, 11, 16-18, 20, 25, 32-35
Y	claims; paragraphs [0005], [0012], [0024], [0041]; examples (Family: none)	1-38

☒ 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
22 June 2016 (22.06.16)

Date of mailing of the international search report
05 July 2016 (05.07.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060513

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/022581 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 06 February 2014 (06.02.2014), paragraphs [0051], [0057] & JP 2015-523100 A & US 2015/0260710 A1 & EP 2880444 A1 & CN 104662424 A	5, 19
Y	JP 2014-180255 A (Kinki University), 29 September 2014 (29.09.2014), paragraph [0053] (Family: none)	7, 21
Y	JP 2013-13368 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 24 January 2013 (24.01.2013), paragraph [0055] & WO 2013/005780 A1	8, 22
Y	JP 2014-62798 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 10 April 2014 (10.04.2014), claims; paragraph [0028] (Family: none)	9, 23
A	JP 2-211865 A (Kao Corp.), 23 August 1990 (23.08.1990), entire text & US 5284766 A & EP 382214 A1	1-38
A	JP 2008-194363 A (President of National Cardiovascular Center), 28 August 2008 (28.08.2008), entire text (Family: none)	1-38
A	JP 2010-35528 A (President of National Cardiovascular Center), 18 February 2010 (18.02.2010), entire text (Family: none)	1-38
A	WO 2012/029882 A1 (Tokyo Women's Medical University), 08 March 2012 (08.03.2012), entire text & JP 5846584 B & US 2014/0212973 A1 & EP 2612902 A1 & CN 103080295 A	1-38

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, C08F297/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(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, C08F297/00, C12M1/00, C12M3/04

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 6-343451 A (窪田倭) 1994. 12. 20, 特許請求の範囲、[0036] - [0050]、[0056]、[0059]、実施例 (ファミリーなし)	1-4, 10-12, 16-18, 24-26, 29-31, 35
Y		1-38
X	JP 2014-100123 A (大日本印刷株式会社) 2014. 06. 05, 特許請求の範囲、[0005]、[0012]、[0024]、[0041]、実施例 (ファミリーなし)	1-4, 6, 11, 16-18, 20, 25, 32-35
Y		1-38

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 6 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 7 . 2 0 1 6

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)

川合 理恵

4 N

4 0 4 6

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2014/022581 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014.02.06, [0051]、[0057] & JP 2015-523100 A & US 2015/0260710 A1 & EP 2880444 A1 & CN 104662424 A	5, 19
Y	JP 2014-180255 A (学校法人近畿大学) 2014.09.29, [0053] (ファミリーなし)	7, 21
Y	JP 2013-13368 A (大日本印刷株式会社) 2013.01.24, [0055] & WO 2013/005780 A1	8, 22
Y	JP 2014-62798 A (住友ベークライト株式会社) 2014.04.10, 特許請求の範囲、[0028] (ファミリーなし)	9, 23
A	JP 2-211865 A (花王株式会社) 1990.08.23, 全文 & US 5284766 A & EP 382214 A1	1-38
A	JP 2008-194363 A (国立循環器病センター総長) 2008.08.28, 全文 (ファミリーなし)	1-38
A	JP 2010-35528 A (国立循環器病センター総長) 2010.02.18, 全文 (ファミリーなし)	1-38
A	WO 2012/029882 A1 (学校法人東京女子医科大学) 2012.03.08, 全文 & JP 5846584 B & US 2014/0212973 A1 & EP 2612902 A1 & CN 103080295 A	1-38