

(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9月1日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号  
**WO 2016/136251 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C12M 1/00* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/071* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/000981
- (22) 国際出願日: 2016年2月24日(24.02.2016)
- (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 2015-035439 2015年2月25日(25.02.2015) JP
- (71) 出願人: 荏原実業株式会社(EBARA JITSUGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1048174 東京都中央区銀座7丁目1番1号 Tokyo (JP). 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目1番4号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 高橋 秀一(TAKAHASHI, Shuichi); 〒2150033 神奈川県川崎市麻生区栗木2丁目3番12号荏原実業株式会社 環境計測技術センター内 Kanagawa (JP). 大平 美智男(OHIRA, Michio); 〒2150033 神奈川県川崎市麻生区栗木2丁目3番12号荏原実業株式会社 環境計測技術センター内 Kanagawa (JP). 中田 英夫(NAKATA, Hideo); 〒2150033 神奈川県川崎市麻生区栗木2丁目3番12号荏原実業株式会社 環境計測技術センター内 Kanagawa (JP). 宮田 昌悟(MIYATA, Shogo); 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 遠山 周吾(TOHYAMA, Shugo); 〒1608582 東京都新宿区信濃町3番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 藤田 淳(FUJITA, Jun);

〒1608582 東京都新宿区信濃町3番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 福田 恵一(FUKUDA, Keiichi); 〒1608582 東京都新宿区信濃町3番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 長谷川 洋, 外(HASEGAWA, Hiroshi et al.); 〒2310002 神奈川県横浜市中区海岸通三丁目9番地 横浜郵船ビル2階 長谷川国際特許事務所内 Kanagawa (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, JP, 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: SUBSTRATE FOR CARRYING CELLS AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 細胞担持用基材及びその製造方法

(57) Abstract: [Problem] The present invention has been made in view of the above circumstances, and the purpose thereof is to provide a surface modification method for carrying and culturing cells, wherein hydrophilicity suitable for cell adhesion is more simply and stably imparted. [Solution] The present invention provides a method for producing a substrate for carrying cells, the method comprising: a humidification step for humidifying the area surrounding a substrate containing a non-fluorine resin as a main component; and a UV irradiation step for, during the humidification step and/or after the humidification step, irradiating the substrate with UV in an atmosphere to which oxygen and/or ozone are supplied. The present invention also provides a substrate for carrying cells which comprises a substrate containing a non-fluorine resin as a main component, wherein the substrate has a cell-carrying surface containing a component which generates  $C_7H_5O^+$  molecules by beam irradiation using a time-of-flight secondary ion mass spectrometer, and cells are carried on the cell-carrying surface.

(57) 要約: 【課題】本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、より簡便な方法で安定的に細胞接着に適した親水性を付与することによる、細胞を担持及び培養させるための表面修飾方法を提供することを目的とする。【解決手段】本発明は非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿する加湿工程、並びに、前記加湿工程中及び／又は前記加湿工程の後に、該基材を酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中でUV照射するUV照射工程を含む、細胞担持用基材の製造方法を提供する。また、本発明は、非フッ素系樹脂を主成分とする基材からなる細胞担持用基材であって、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により $C_7H_5O^+$ 分子を生じる成分を含有する細胞担持面を有し、当該細胞担持面において細胞が担持される細胞担持用基材を提供する。

WO 2016/136251 A1

## 明 細 書

発明の名称：細胞担持用基材及びその製造方法

### クロスリファレンス

[0001] 本出願は、2015年2月25日に日本国において出願された特願2015-035439号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。また、本願において引用した全ての特許、特許出願及び文献に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。

### 技術分野

[0002] 本発明は、細胞の担持、接着、保存、培養、及び／又は増殖に適した表面を有する細胞担持用基材及びその製造方法に関する。

### 背景技術

[0003] 接着性細胞は、疎水性表面及び親水性の高い表面に対してはほとんど接着しないのに対し、適切な親水性を有する表面には接着して進展した形態をとることが知られている。特に、水接触角 $40\sim70^\circ$ （非特許文献1）又は $60\sim80^\circ$ （非特許文献2）の中程度の濡れ性を示す表面に細胞が良く接着することが知られている。よって、このような接着性細胞の接着性及び増殖性に優れる適度な親水性表面を得るための手段が開発されている。これまで、高分子材料表面を親水性とする手法として、コロナ放電処理（特許文献1）等の大気圧プラズマ処理（特許文献2）、親水性骨格を含むポリマー鎖のグラフト（特許文献3）、表面上にアミノプロピルエチレン無水マレイン酸を結合させて接触角を約 $10\sim30^\circ$ とした基体（特許文献4）、及び、両親媒性物質の親水基を表面に提示させる方法（特許文献5）等の化合物修飾などが報告されている。また、表面の親水性の程度をコントロールする方法として、一度高い親水性とした表面を酸化処理及び／又は分解処理することにより、その親水性の程度を下げる方法や、親水性分子と表面とをリンカーを介して結合させ、リンカーの密度により親水性の程度を調節する方法が

報告されている（特許文献6）。特にこれらの中でも、コロナ放電処理や大気圧プラズマ処理などの物理的方法は簡便であることから、親水性の細胞培養表面の改質において主要な方法となっている。

[0004] このような親水性表面においては、主に水酸基、カルボニル基、及びカルボキシ基などの酸素原子を有する基が親水性の発揮に寄与していると考えられている。しかし、コロナ放電により導入された酸素原子は急速に除去されるため、表面が劣化しやすいという問題があった。さらに、コロナ放電処理は、約20%の表面酸素しか基材上に提供できないと考えられており、親水性の付与に限界があった。また、プラズマ放電は、コロナ放電よりも高い酸素レベルを達成できるが、基材を真空中で処理することが必要であり、処理工程が複雑であった。更に、プラズマ処理は表面を傷つけやすいという問題があった。

[0005] 高分子材料表面を親水性とするための別のアプローチとして、フッ素樹脂基板等への紫外線レーザー照射（特許文献4）やオゾンが発生させる波長の紫外線を照射する方法（非特許文献3及び4）が報告されている。これらの報告においても、細胞増殖には表面酸素原子の割合が中程度であることが望ましいこと（非特許文献4）が報告されている。また、このようなオゾン／紫外線を用いた方法を改良すべく、オゾン・紫外線処理と生体材料とを組み合わせること（非特許文献5）、超高分子ポリエチレンへ酸素原子を導入すること（非特許文献6）などが検討されている。

[0006] また、特に、親水性表面を未分化細胞培養用の基材として利用する場合、未分化細胞である幹細胞は培養が難しく、フィーダー細胞、LIFなどのサイトカイン、又は、マトリゲル（登録商標）やコラーゲン等の細胞外基質タンパク質によるコーティング等の特殊な環境を必要としていた。しかし、これらの技術はいずれも生体由来材料に依存することから安定性が低くロット差による結果の違いを生じること、潜在的なコンタミネーションが生じ得ること、貯蔵における寿命が短いこと等が問題となっていた。

[0007] そこで、未分化細胞である幹細胞を培養可能な細胞培養表面をより安定的

に化学的改質で作製することが試みられている。例えば、細胞培養表面に膨潤性（メタ）アクリレート層を形成させることにより、これらの問題を解決することが提案されている（特許文献7）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0008] 特許文献1：特開平6－98756号公報

特許文献2：国際公開公報WO2012／144624号

特許文献3：特開2009－17809号公報

特許文献4：特表2012－527896号公報

特許文献5：特開2012－175983号公報

特許文献6：特表2011－510655号公報

特許文献7：特開2010－68755号公報

### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：酒井康行及び民谷栄一監修、「動物実験代替のためのバイオマテリアルデバイス」シーエムシー出版、2014年、133～134頁

非特許文献2：Yasushi Tamadaら、Journal of Biomedical Materials Research；28：783－789（1994）

非特許文献3：D. O. H. Teareら、Kantbmuir；16：2818－2824（2000）

非特許文献4：S. A. Mitchellら、Biomaterials；25：4079－4086（2004）

非特許文献5：Fabio Formosaら、Microvascular Research；75：330－342（2008）

非特許文献6：Alexandra H. C. Poulsessonら、Langmuir；25：3718－3727（2009）

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、より簡便な方法で安定的に細胞接着に適した親水性を付与することによる、細胞を担持及び培養させるための表面修飾方法を提供することを目的とする。あるいは、本発明は、フィーダー細胞、又は、マトリゲル（登録商標）（コーニング インコーポレーティッド、ニューヨーク州、米国）やコラーゲン等の細胞外基質タンパク質によるコーティング等の特殊な環境を必要とすることなく幹細胞を担持又は培養可能な細胞担持用基材を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、種々の方法を用いて樹脂基材表面を処理して細胞増殖との関係を調べた結果、加湿された酸素及び／又はオゾン雰囲気中でUVを照射することにより、細胞接着及び細胞増殖に適した表面が生成されることを見出し、本発明を完成させた。更に、本発明者らは、このような表面で幹細胞を培養したところ、フィーダー細胞、又は、マトリゲル（登録商標）（コーニング インコーポレーティッド、ニューヨーク州、米国、以下同様）やコラーゲン等の細胞外基質タンパク質によるコーティングを施さなくても分化することなく幹細胞としての機能及び性質を維持することを見出し、本発明を完成させた。

[0012] よって、本発明は、以下の発明を含むものである：

[1] 非フッ素系樹脂を主成分とする基材からなる細胞担持用基材であって、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により $C_7H_5O^+$ 分子を生じる成分を含有する細胞担持面を有し、当該細胞担持面において細胞が担持される細胞担持用基材。

[2] 前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記 $C_7H_5O^+$ 分子の割合が0.015以上である、[1]に記載の細胞担持用基材。

[3] 前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記 $C_7H_5O^+$ 分子の割合に対する、

前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記 $C_2H_3O^+$ 分子の割合が、0.485以下である、〔1〕又は〔2〕に記載の細胞担持用基材。

〔4〕 前記細胞担持面にケミカルシフトを生じたC—C結合及び／又はC—H結合を有する、〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔5〕 前記細胞担持面に実質的にカルボキシ基が存在しないことを特徴とする、〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔6〕 前記細胞担持面の水接触角が $40\sim70^\circ$ であることを特徴とする、〔1〕～〔5〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔7〕 前記細胞担持面が、フィーダー細胞の非存在下においても、幹細胞が未分化の状態で接着し又は増殖することができる表面であることを特徴とする、〔1〕～〔6〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔8〕 前記細胞担持面が、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なマトリゲル（登録商標）の濃度の0.2倍の濃度においても、幹細胞が接着し又は増殖することができる表面であることを特徴とする、〔1〕～〔7〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔9〕 前記細胞担持面が、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なラミニンの濃度の0.2倍の濃度においても、幹細胞が接着し又は増殖することができる表面であることを特徴とする、〔1〕～〔8〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

〔10〕 幹細胞が、マウスiPS細胞又はヒトiPS細胞である、〔8〕又は〔9〕に記載の細胞担持用基材。

〔11〕 前記非フッ素系樹脂が、ポリエチレン、アクリル樹脂、ABS樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート、及びポリスチレンからなる群から選択される少なくとも1種類の樹脂である、〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

[12] 前記非フッ素系樹脂がポリスチレンである、[11]に記載の細胞担持用基材。

[13] 接着細胞培養用容器である、[1]～[12]のいずれか1項に記載の細胞担持用基材。

[14] 前記接着細胞培養用容器が、接着細胞培養用ディッシュである、[13]に記載の細胞担持用基材。

[15] 細胞担持面を有する細胞担持用基材の製造方法であって、  
非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿する加湿工程、及び、  
前記加湿工程中、及び／又は前記加湿工程の後に、該基材を酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中で該細胞担持面にUVを照射するUV照射工程を含む、細胞担持用基材の製造方法。

[16] 前記非フッ素系樹脂が、ポリエチレン、アクリル樹脂、ABS樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート、及びポリスチレンからなる群から選択される少なくとも1種類の樹脂である、  
[15]に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[17] 前記非フッ素系樹脂がポリスチレンである、[16]に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[18] 前記UV照射が、平均波長184.9nm及び253.7nmのUVを照射することにより行われることを特徴とする、[15]～[17]のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[19] 前記UV照射が、前記非フッ素系樹脂表面の水接触角が40～70°となるまでの間行われることを特徴とする、[15]～[18]のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[20] 前記UV照射が、1～3分間行われることを特徴とする、[15]～[19]のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[21] 6Wのオゾン発生ランプ2本で184.9及び253.7nmのUVを照射することを特徴とする、[15]～[20]のいずれか1項に記載の製造方法。

〔22〕 UVランプから前記基材までの距離が3～5 cmであることを特徴とする、〔15〕～〔21〕のいずれか1項に記載の製造方法。

〔23〕 〔15〕～〔22〕のいずれか1項に記載の方法により製造された細胞担持用基材。

〔24〕 接着細胞の培養方法であって、〔1〕～〔14〕及び〔23〕のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の細胞担持面上で細胞を培養することを含む培養方法。

〔25〕 前記接着細胞が幹細胞である、〔24〕に記載の培養方法。

〔26〕 前記幹細胞が、マウスiPS細胞又はヒトiPS細胞である、〔25〕に記載の培養方法。

〔27〕 フィーダー細胞の非存在下で培養することを特徴とする、〔25〕又は〔26〕に記載の培養方法。

〔28〕 表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なマトリゲル（登録商標）の濃度の0.2倍の濃度のマトリゲル（登録商標）存在下で培養することを特徴とする、〔25〕～〔27〕のいずれか1項に記載の培養方法。

〔29〕 表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なラミニンの濃度の0.5倍の濃度のラミニン存在下で培養することを特徴とする、〔25〕～〔28〕のいずれか1項に記載の培養方法。

〔30〕 〔24〕～〔29〕のいずれか1項に記載の培養方法で培養された細胞を保存することを含む、接着細胞の保存方法。

[0013] 別の態様において本発明は、以下の発明であっても良い：

（1） 非フッ素系樹脂を主成分とする基材からなる細胞担持用基材であって、少なくとも一部の細胞担持面にケミカルシフトを生じたC—C結合及び／又はC—H結合を有し、当該表面において細胞が担持される細胞担持用基材。

（2） 前記細胞担持面に実質的にカルボキシ基が存在しないことを特徴と

する、(1)に記載の細胞担持用基材。

(3) 前記細胞担持面が、足場細胞及び細胞外基質タンパク質コーティングの非存在下においても、幹細胞を未分化の状態で担持し又は増殖させることができる表面であることを特徴とする、(1)又は(2)に記載の細胞担持用基材。

(4) 細胞担持面を有する細胞担持用基材の製造方法であって、  
非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿する加湿工程、及び、  
前記加湿工程と重複する時間、及び／又は前記加湿工程の後に、該基材を酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中で該細胞担持面にUVを照射するUV照射工程を含む、細胞担持用基材の製造方法。

(5) 前記非フッ素系樹脂が、ポリエチレン、アクリル樹脂、ABS樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート、及びポリスチレンからなる群から選択される少なくとも1種類の樹脂である、(4)に記載の細胞担持用基材の製造方法。

(6) 前記UV照射が、平均波長184.9nm及び253.7nmのUVを照射することにより行われることを特徴とする、(4)又は(5)に記載の細胞担持用基材の製造方法。

(7) 前記UV照射が、前記非フッ素系樹脂表面の水接触角が40～70°となるまでの間行われることを特徴とする、(4)～(6)のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

(8) 前記細胞担持用基材の細胞担持面が、足場細胞及び細胞外基質タンパク質コーティングの非存在下においても、幹細胞を未分化の状態で担持し又は増殖させることができる表面であることを特徴とする、(4)～(7)のいずれか1項に記載の製造方法。

(9) (1)～(3)のいずれか1項に記載の細胞担持用基材、又は、(4)～(8)のいずれか1項に記載の製造方法により製造された細胞担持用基材を備える、接着細胞用細胞培養容器。

(10) (9)に記載の細胞培養容器であって、少なくとも一部において

、足場細胞及び細胞外基質タンパク質コーティングの非存在下においても、幹細胞を未分化の状態で担持し又は増殖させることができる表面であることを特徴とする、細胞培養容器。

(11) 接着性細胞の培養方法であって、(9)又は(10)に記載の細胞培養容器の細胞担持面上で細胞を培養することを含む培養方法。

(12) 前記接着性細胞が幹細胞である、(11)に記載の培養方法。

[0014] 本明細書において「細胞担持用基材」とは、細胞を表面上に担持させて用いられる基材のことであり、細胞の担持、接着、保存、培養、及び／又は増殖を目的とする基材であってもよい。例えば、細胞担持用基材は、細胞培養用基材（例えば、細胞培養用容器）、細胞保存用基材、又はインプラント用基材などを含む。本明細書における細胞担持用基材が担持する細胞は、接着細胞であれば特に制限されるものではなく、例えば、平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、幹細胞などの哺乳類細胞を含み、好ましくは、幹細胞である。本明細書において、幹細胞とは、iPS細胞、ES細胞、間葉系幹細胞などを含み、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、及びヒトの細胞を含むが、好ましくは、マウスiPS細胞及びヒトiPS細胞である。また、本明細書における細胞担持用基材の形状は、その目的に応じて適宜選択することができ、例えば、プレート状、シート状、球状、ディッシュ状、チップ状、又は、所望の組織（例えば、人工骨又はその表面部分）の形状とすることができる。好ましくは、細胞担持用基材は、接着細胞培養用容器又は接着細胞保存用容器であり、より好ましくは、iPS細胞培養用容器又はiPS細胞保存用容器である。

[0015] 本明細書における細胞担持用基材は、主成分として非フッ素系樹脂を含有するが、必要に応じて「他の成分」を含有していても良い。例えば、必要に応じて、マトリゲル（登録商標）、ラミニン、コラーゲン又はフィブロネクチンなどの他の細胞接着に寄与する物質を適宜含んでも良い。好ましくは、本明細書における細胞担持用基材は、このような他の成分を、オゾン／UV未処理を含む物理的処理を施していない（主成分である非フッ素系樹脂

以外の分子を細胞担持面に有していない) 非フッ素系樹脂からなる細胞担持用基材を用いた場合に、接着細胞(例えば、i P S細胞)を培養するために必要となる他の成分の濃度の半分以上の濃度で、当該他の成分を含有する。例えば、本明細書における細胞担持用基材は、オゾン／UV未処理を含む物理的処理を施していない非フッ素系樹脂からなる細胞担持用基材を用いた場合に、i P S細胞(例えば、マウスi P S細胞又はヒトi P S細胞)を培養するために必要となるマトリゲル(登録商標)の濃度の半分以上、好ましくは0.2倍以下の濃度で、マトリゲル(登録商標)を含有していてもよい。また、例えば、本明細書における細胞担持用基材は、オゾン／UV未処理を含む物理的処理を施していない非フッ素系樹脂からなる細胞担持用基材を用いた場合に、i P S細胞(例えば、マウスi P S細胞又はヒトi P S細胞)を培養するために必要となるラミニンの濃度の半分以上の濃度で、ラミニンを含有していてもよい。

[0016] 本明細書において、「非フッ素系樹脂」とは、フッ素を含有しない樹脂を意味し、例えば、ポリエチレン、超高分子ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコール、アクリル樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリアセタール、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリイミド樹脂、フェノール樹脂、アミノ樹脂、エポキシ樹脂、ポリエステル、及びアクリロニトリル-ブタジエンスチレン共重合合成樹脂(ABS樹脂)を挙げることができる。これらのうち、好ましくは、ポリスチレンである。ポリスチレンは立体規則性(タクティシティー、*t a c t i c i t y*)を有し、イソタクチック(アイソタクチック)型、シンジオタクチック型、アタクチック型が存在するが、本発明におけるポリスチレンの型は限定されるものではなく、これらのいずれの型、又はこれらのうち2種類以上の型の混合物であってもよく、通常はアタクチック型が汎用される。またポリスチレンは高分子化合物であるため種々の重合度(平均分子量)の製品が供給されているが、本発明においては限定されない。例えば、重合度が10~100,000、50~10,000とすることができる。従って各社が供

給するポリスチレン製培養用ディッシュには材質・物性上の差異が存在し得るが本発明においては限定されず、いずれの製造元の培養用ディッシュを使用することができる。一例として、I W A K I（登録商標）組織培養用ディッシュ（A G Cテクノグラス株式会社）を挙げることができる。

[0017] 本発明の細胞担持用基材は少なくともその一部に細胞担持面を有する。本明細書において、「細胞担持面」とは、細胞を担持、接着、保存、培養、及び／又は増殖させることができる表面を意味し、必ずしも当該表面上で細胞を培養し又は増殖させることを必要とするものではない。

[0018] 本明細書において、細胞担持面は、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により $C_7H_5O^+$ 分子（例えば、 $(C_6H_5)C^+(=O)$ 分子）を生じる成分を含有する。本明細書全体に亘って、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射によりある分子を生じる成分とは、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により当該分子の分子量スペクトルとして検出される成分であってよい。このような成分を含有する表面は、ポリスチレンからなる表面に対してオゾン存在下かつ加湿環境下でUV照射することにより得られる表面であってもよい。好ましくは、 $C_7H_5O^+$ 分子は、当該細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子を1のうち（当該すべての分子を1とした場合）、0.01以上（すなわち、1%以上）、0.015以上（すなわち、1.5%以上）、0.016以上（すなわち、1.6%以上）、0.017以上（すなわち、1.7%以上）、0.018以上（すなわち、1.8%以上）、0.019以上（すなわち、1.9%以上）、又は0.02以上（すなわち、2%以上）の割合で含まれていてもよい。また、細胞担持面は、好ましくは、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により $C_2H_3O^+$ 分子（例えば、 $+CHO=CH_2$ 分子）を生じる成分を、当該細胞担持面への該ビーム照射により生じる全ての分子のうち（当該すべての分子を1とした場合）、0.45以下（すなわち、45%以下）、0.5以下（すなわち、50%以下）、0.55以下（すなわち、55%以下）、又は0.6以下（

すなわち、60%以下)の割合で含有していてもよい。更に好ましくは、細胞担持面は、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記 $C_7H_5O^+$ 分子の割合に対する、前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記 $C_2H_3O^+$ 分子の割合の比、すなわち、(全ての分子に対する前記 $C_2H_3O^+$ 分子の割合) / (全ての分子に対する前記 $C_7H_5O^+$ 分子の割合)が、0.45以下(すなわち、45%以下)、0.46以下(すなわち、46%以下)、0.47以下(すなわち、47%以下)、0.48以下(すなわち、48%以下)、0.485以下(すなわち、48.5%以下)、0.49以下(すなわち、49%以下)、0.5以下(すなわち、50%以下)、0.55以下(すなわち、55%以下)、又は0.6以下(すなわち、60%以下)であってもよい。本明細書において、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射とは、例えば、飛行時間型二次イオン質量分析装置(例えば、アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II)を用いて、分析用の一次イオンビームとして、30kV  $Bi^{3+}$  6.0~7.0 nA DCを用い、一次イオンビームのパス幅とフレーム数は、12 n秒、64~75回( $1 \times 10^{11}$ 個/cm<sup>2</sup>)として、帯電中和を10 eV電子線+10 eV  $Ar^+$ とする条件下で行われるビーム照射であってよい。

- [0019] 一態様において、本発明の細胞担持用基材の細胞担持面は、ケミカルシフトを生じたC-C結合及び／又はC-H結合を表面に有する。本明細書において「ケミカルシフトを生じたC-C結合及び／又はC-H結合」とは、ポリスチレンの分子構造に酸素原子が組み込まれたことによって結合状態が変化した構造であって、酸素原子を含まない構造である。即ち、ケミカルシフトを生じたC-C結合及び／又はC-H結合とは、ポリスチレンに含まれないC-C結合及び／又はC-Hを意味し、C-H、C-C及びC-Ph以外の構造を意味する。本発明の細胞担持面は、酸素原子の導入された基(OH、COOH、C=Oなど)が極めて少ないにもかかわらず、接触角が減少し

ている。よって、この接触角の減少はケミカルシフトを生じたC—C結合及び／又はC—H結合によりもたらされたものと考えられる。

[0020] 細胞培養表面上のカルボキシ基は細胞にとって良くない影響を及ぼすと考えられている。本発明の細胞担持用基材の細胞担持面は、非加湿下の同条件においてUV／オゾン処理された細胞担持用基材と比較して極めて少ない量のカルボキシ基しか有しない。よって、本発明の細胞担持用基材は、細胞担持面に実質的にカルボキシ基が存在しない。ここで、「実質的に存在しない」とは、全く存在しないことを意味するのではなく、細胞培養に影響を与える程度に存在しないことを意味し、好ましくは、非加湿下の同条件においてUV／オゾン処理された細胞担持用基材と比較して極めて少ないことを意味し、より好ましくは、C(1s)ナローキャンXPSスペクトルにおいてほとんど検出されないか、又は検出されないことを意味してもよい。

[0021] 本発明の細胞担持用基材は、細胞担持面の水接触角が中程度であり、例えば、 $40^{\circ} \sim 90^{\circ}$ 、 $40^{\circ} \sim 80^{\circ}$ 、 $40^{\circ} \sim 70^{\circ}$ 、 $50^{\circ} \sim 90^{\circ}$ 、 $50^{\circ} \sim 80^{\circ}$ 、 $50^{\circ} \sim 70^{\circ}$ 、 $55^{\circ} \sim 65^{\circ}$ 、 $60^{\circ} \sim 90^{\circ}$ 、 $60^{\circ} \sim 80^{\circ}$ 、 $60^{\circ} \sim 70^{\circ}$ 、 $70^{\circ} \sim 90^{\circ}$ 、 $70^{\circ} \sim 80^{\circ}$ である。好ましくは、前記水接触角は、 $70^{\circ} \sim 90^{\circ}$ である。好ましくは、本明細書における接触角は、自動接触角計にて試料に1  $\mu$ Lの純水を滴下し $\theta/2$ 法により測定される接触角である。また、本発明の細胞担持用基材は、細胞接着性表面の保存安定性に優れる。このため、本発明の細胞担持用基材は、好ましくは、UV照射から24時間後及び1週間密閉保管の表面の水接触角がいずれも、前記接触角の範囲内であり、好ましくは、UV照射から24時間後及び1ヶ月密閉保管の表面の水接触角がいずれも、前記接触角の範囲内である。即ち、本発明の細胞担持用基材は、好ましくは、UV照射から1週間密閉保管後又は1ヶ月密閉保管後においても、優れた細胞接着性を維持するものである。

[0022] 一態様において、本発明の細胞担持用基材の細胞担持面は、フィーダー細胞（足場細胞）及び細胞外基質タンパク質コーティングの非存在下又はより低濃度の細胞外基質タンパク質コーティング存在下においても、幹細胞を未

分化の状態で担持し又は増殖させることができる。例えば、本発明の細胞担持用基材の細胞担持面は、フィーダー細胞及び細胞外基質タンパク質コーティングがなくても、129/Ola系統由来マウス胚性幹細胞であるEB3細胞(Mol. Cell Biol. (2002) 22:1526-36; Genes to Cells (2004) 9:471-7)が増殖することができる表面であってもよい。又は、前記細胞担持面は、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なマトリゲル(登録商標)の濃度の0.2倍の濃度においても、幹細胞(例えば、ヒトiPS細胞又はマウスiPS細胞)が接着し又は増殖することができる表面であってもよい。あるいは、前記細胞担持面は、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なラミニンの濃度の0.5倍の濃度においても、幹細胞(例えば、ヒトiPS細胞又はマウスiPS細胞)が接着し又は増殖することができる表面であってもよい。

[0023] 具体的な態様において、本発明は、上記細胞担持用基材を備える、接着細胞用の細胞培養容器に関する。細胞培養容器としては、プレート状、シート状、球状、ディッシュ状、チップ状、繊維状、又はフラスコ状の培養容器を挙げることができる。

### 発明の効果

[0024] 本発明の細胞担持用基材の製造方法は、より簡便な方法で安定的に細胞接着に適した親水性を付与することができる。また、本発明の細胞担持用基材は、生体由来材料を用いる必要が無いが、従来よりは少ない量で幹細胞を含む接着細胞を培養することができることから安定性が高くロット差による結果の違いを生じにくい他、より安価に培養することができる。また、動物由来成分を使用せず、又は使用量を減らすことができ得ることから潜在的なコンタミネーションの問題を減少させることができる。

### 図面の簡単な説明

[0025] [図1]ポリスチレンのオゾン／UV処理時間による接触角の変化を示すグラフ

である。縦軸は接触角（度）を示し、横軸はオゾン／UV処理時間（分）を示す。

[図2]加湿有り／無しにおける、槽内のオゾン濃度の変化を示すグラフである。縦軸はオゾン濃度（ppm）を示し、横軸は経過時間（分）を示す。横軸に表示された経過時間において、0～5分はオゾンパージ処理をした期間、5～15分はUV照射した期間、15～25分は処理槽内オゾンを分解している期間を示す。ひし形は加湿無し、四角は加湿有りのデータを表す。

[図3]長期保存における接触角の変化を示すグラフである。縦軸は接触角（°）を示し、横軸はオゾン／UV処理時間を示す。各群においてグラフは左から、24時間後、1週間後、及び1月後の接触角を表す。

[図4]ポリスチレンディッシュのオゾン／UV処理中のオゾン濃度の変化を示すグラフである。グラフは上から順に、UV処理1分間又は3分間のみ（室内空気、25℃、加湿）、酸素パージ5分間の後UV処理3分間、オゾンパージ5分間の後UV処理3分間を表す。各グラフの縦軸はオゾン濃度（ppm）を表し、横軸は処理時間を表す。一番上のグラフにおいては、UV処理時間は0～1分（UV 1min）又は0～3分（UV 3min）の間であり、下の二つのグラフにおいては、UV処理時間は5～8分の間である。真ん中のグラフの0～5分は酸素パージの時間を表し、一番下のグラフの0～5分はオゾンパージの時間を表す。

[図5]各種ディッシュ上でマウスES細胞であるEB3細胞を3日間培養した後の細胞数を示すグラフである。縦軸は細胞数（ $\times 10^5$ 細胞／ディッシュ）を示す。横軸は、左から順に、UV未処理のポリスチレンディッシュ（陰性対照）（TCPS）；ゼラチンコートされたポリスチレンディッシュ（陽性対照）（Treated PS）；25℃、大気環境下（加湿無し、かつ、オゾンパージ無し）でUVを1分間照射したポリスチレンディッシュ（UVPS（1min））；25℃、大気環境下（加湿無し、かつ、オゾンパージ無し）でUVを3分間照射したポリスチレンディッシュ（UVPS（3min））；40℃、酸素パージ、加湿下で、UVを3分間照射したポリスチレン

ディッシュ ( $O_2H (+) PS$ ) ;  $40^\circ C$ 、酸素パージ、乾燥状態 (加湿無し) で、UVを3分間照射したポリスチレンディッシュ ( $O_2H (-) PS$ ) ;  $40^\circ C$ 、オゾンパージ、加湿下で、UVを3分間照射したポリスチレンディッシュ ( $O_3H (+) PS$ ) ; 及び、 $40^\circ C$ 、オゾンパージ、乾燥状態 (加湿無し) で、UVを3分間照射したポリスチレンディッシュ ( $O_3H (-) PS$ ) を示す。\*\*は、 $P < 0.05$ を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

[図6A]実施例3の(1)の処理を行ったポリスチレンディッシュの表面についてXPS分析を行った結果を示すグラフである。

[図6B]実施例3の(2)の処理を行ったポリスチレンディッシュの表面についてXPS分析を行った結果を示すグラフである。

[図6C]実施例3の(3)の処理を行ったポリスチレンディッシュの表面についてXPS分析を行った結果を示すグラフである。

[図6D]実施例3の(4)の処理を行ったポリスチレンディッシュの表面についてXPS分析を行った結果を示すグラフである。

[図7]各ディッシュ上でマウス iPS細胞を3日間培養した後の写真である。各写真のうち、上の写真は光学顕微鏡写真を示し、下の写真は蛍光顕微鏡写真を示す。上段はオゾン/UV未処理のディッシュで細胞を培養した結果を示し、下段はオゾン/UV処理のディッシュで細胞を培養した結果を示す。上段の左はフィーダー細胞上でマウス iPS細胞を培養した結果を示し、右はフィーダー細胞非存在下、ゼラチン非存在下で培養した結果を示す。下段は左からオゾン/UV処理を1分、3分及び10分を行ったディッシュ上でマウス iPS細胞を培養した結果を示す (いずれもフィーダー細胞非存在下、ゼラチン非存在下)。

[図8]ヒト iPS細胞 (201B7) を、各種濃度のマトリゲル (登録商標) 存在下、各ポリスチレンディッシュ上で5日間培養した後の接着細胞数を表すグラフである。縦軸はマトリゲル (登録商標) 100%存在下で培養した細胞の細胞数を1とした場合の各培養細胞数の割合を表す。横軸上段は、各培養に用いたマトリゲル (登録商標) 濃度を、推奨される濃度を1倍とした

ときの、倍率 (Matrigel) で表し、横軸下段は、ポリスチレンディッシュのオゾン／UV処理 (UV照射) 時間 (秒) (UV radiation [sec]) (下段) を表す。横軸下段のバー (—) は、UV処理を行っていないことを示す。エラーバーは標準偏差を表す。

[図9] ヒト iPS 細胞 (201B7) を、各種濃度のマトリゲル (登録商標) 存在下、各ポリスチレンディッシュ上で5日間培養した後の接着細胞の写真である。上段はオゾン／UV未処理のディッシュ上で培養した結果を示し、左から順に、マトリゲル (登録商標) 濃度を通常培養の0.2倍、0.5倍として培養した結果を示す。二段目左はオゾン／UV未処理のディッシュ上で培養した結果を示し、マトリゲル (登録商標) 濃度を通常培養の1倍として培養した結果を示す。二段目右はオゾン／UV処理を行ったディッシュ上で、マトリゲル (登録商標) 濃度を通常培養の0.2倍として培養した結果を示し、UV照射1分のディッシュを表す。三段目及び四段目は、オゾン／UV処理を行ったディッシュ上で、マトリゲル (登録商標) 濃度を通常培養の0.2倍として培養した結果を示し、三段目は左から順に、UV照射2分及び3分、四段目は左から順にUV照射4分及び5分のディッシュを表す。

[図10] ヒト iPS 細胞 (201B7) を、各種濃度のラミニン511E8存在下、各ポリスチレンディッシュ上で3日間培養した後の接着細胞数を表すグラフである。縦軸は、ラミニン511E8 100%存在下で培養した細胞の細胞数を1とした場合の各培養細胞数の割合 (Fold) を表す。横軸は、ポリスチレンディッシュのオゾン／UV処理 (UV照射) 時間 (分) (UV radiation [min]) (上段)、及び培養に用いたラミニン511E8濃度 (下段) を、推奨される濃度を100%としたときの割合で表す。横軸上段のバー (—) は、UV処理を行っていないことを示す。

[図11] ヒト iPS 細胞 (201B7) を、各種濃度のラミニン存在下、各ポリスチレンディッシュ上で5日間培養した後の接着細胞の写真である。上段はオゾン／UV未処理のディッシュ上で培養した結果を示し、左から順に、ラミニン濃度を通常培養の0.2倍、0.5倍、1倍として培養した結果を

示す。中段はオゾン／UV処理を行ったディッシュ上で、ラミニン濃度を通常培養の0.2倍として培養した結果を示し、左から順に、UV照射1分、3分、5分のディッシュを表す。下段はオゾン／UV処理を行ったディッシュ上で、ラミニン濃度を通常培養の0.5倍として培養した結果を示し、左から順に、UV照射1分、3分、5分のディッシュを表す。

[図12A]UV未処理 (Control)、及びオゾン／UV表面処理を1分間行った (1min) ポリスチレンディッシュの表面を飛行時間型二次イオン質量分析装置 (アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II) を用いて分析した結果を示すグラフである。縦軸はカウント数を、横軸は質量電荷比 ( $m/z$ ) を示す。

[図12B]オゾン／UV表面処理を3分間 (3min)、及び5分間 (5min) 行ったポリスチレンディッシュの表面を飛行時間型二次イオン質量分析装置 (アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II) を用いて分析した結果を示すグラフである。縦軸はカウント数を、横軸は質量電荷比 ( $m/z$ ) を示す。

[図12C]オゾン／UV表面処理を10分間 (10min)、及び20分間 (20min) 行ったポリスチレンディッシュの表面を飛行時間型二次イオン質量分析装置 (アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II) を用いて分析した結果を示すグラフである。縦軸はカウント数を、横軸は質量電荷比 ( $m/z$ ) を示す。

[図13]オゾン／UV処理した表面を、飛行時間型二次イオン質量分析装置 (アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II) を用いて表面分析した結果を表すグラフである。グラフの縦軸は、全ての因子の発現量に対する  $C_7H_5O^+$  の発現量を表す。横軸はUV照射時間 (分) を表す。

[図14]オゾン／UV処理した表面を、飛行時間型二次イオン質量分析装置 (アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II) を用いて表面分析した結果を表すグラフである。グラフの縦軸は、全ての分子に対する前記  $C_7H_5O^+$  分子の割合に対する、全ての分子に対する  $C_2H_3O^+$  分子の割

合を示すグラフである。横軸はUV照射時間（分）を表す。

## 発明を実施するための形態

### [0026] 1. 細胞担持用基材の製造方法

本発明の細胞担持用基材は、非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿し、前記加湿中及び／又は加湿後に、該基材を酸素及び／又はオゾン雰囲気中でUVを照射することにより製造することができる。よって、別の態様において、本発明は、非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿する加湿工程、及び、前記加湿工程中及び／又は前記加湿工程後に、該基材を酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中でUV照射することを含む、細胞担持用基材の製造方法に関する。

### [0027] (加湿工程)

加湿は、非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲に水蒸気を提供することができる方法であれば、いかなる方法を用いて行われても良い。加湿は、UVを照射する基材表面が水蒸気に曝されるように行われる。すなわち、次のUV照射工程は加湿環境下で行われる。また、必ずしも基材の全ての面が水蒸気に曝されることを必要としない。例えば、加湿は、前記樹脂を内包する外界とは遮断された一定容積を有する容器又は装置内において、水を加熱することにより行うことができる。加湿後の湿度（例えば、UV照射時の湿度）としては、例えば、20～60％RHとすることができ、好ましくは、30℃では40～50％RH、40℃では20～30％である。加湿は、UV照射時に基材の周囲に水蒸気が存在する環境、又は、UVが照射される基材表面が水蒸気に曝される環境とすることができればよく、UV照射前及び／又はUV照射中に行うことができるが、好ましくは、UV照射前及びUV照射中に行う。

### [0028] (UV照射工程)

UV照射は、酸素及び／又はオゾン雰囲気中で前記基材に対してUVを照射することにより行う。照射するUVは平均波長が184.9nm及び253.7nmとすることができる。UVの波長は分光放射計を用いて測定する

ことができる。UVは、例えば、UV照度として、 $2000 \sim 5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $2500 \sim 4500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $3000 \sim 4000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $3200 \sim 3800 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、又は $3500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で行うことができる。UVランプから各プレートまでの距離は、 $2 \sim 6 \text{ cm}$ 、 $3 \sim 5 \text{ cm}$ 、 $3.5 \sim 4.5 \text{ cm}$ 、 $3.6 \sim 4.4 \text{ cm}$ 、 $3.7 \sim 4.3 \text{ cm}$ 、 $3.8 \sim 4.2 \text{ cm}$ 、 $3.9 \sim 4.1 \text{ cm}$ 、又は $4 \text{ cm}$ とすることができる。UV照射時間は、非フッ素系樹脂表面の水接触角が、例えば、 $40 \sim 90^\circ$ 、 $40 \sim 80^\circ$ 、 $40 \sim 70^\circ$ 、 $50 \sim 90^\circ$ 、 $50 \sim 80^\circ$ 、 $50 \sim 70^\circ$ 、 $55 \sim 65^\circ$ 、 $60 \sim 90^\circ$ 、 $60 \sim 80^\circ$ 、 $60 \sim 70^\circ$ 、 $70 \sim 90^\circ$ 、又は $70 \sim 80^\circ$ となるまでの間行うことができる。あるいは、UV照射時間は、 $0.2 \sim 8$ 分間、 $0.2 \sim 5$ 分間、 $0.2 \sim 3$ 分間、 $0.5 \sim 8$ 分間、 $0.5 \sim 5$ 分間、 $0.5 \sim 3$ 分間、 $0.8 \sim 8$ 分間、 $0.8 \sim 5$ 分間、 $0.8 \sim 3$ 分間、 $1 \sim 8$ 分間、 $1 \sim 5$ 分間、又は $1 \sim 3$ 分間とすることができる。

[0029] 酸素雰囲気とは、基材周辺の酸素濃度が80%以上（好ましくは90%以上）であることを意味する。酸素（例えば、99%酸素）（例えば、乾燥酸素）を一定時間（例えば、5分間）基材を保持する環境に供給することにより酸素雰囲気とすることができる。また、オゾン雰囲気とは、オゾン濃度が400 ppm以上（好ましくは450 ppm以上）であることを意味する。酸素を放電方式オゾン発生器に通気することにより、オゾンを発生させて基材を保持する環境に供給することにより、オゾン雰囲気とすることができる。酸素雰囲気中でもUV照射によりオゾンは発生するが、オゾン雰囲気中でUV照射することにより、基材表面上にケミカルシフトを生じたC-C結合及び／又はC-H結合が増加することから、好ましくは、オゾン雰囲気中（酸素及びオゾン雰囲気中を含む）でUVを照射する。

[0030] UV照射工程は、基材表面にケミカルシフトを生じたC-C結合及び／又はC-H結合を導入することに加え、基材表面の水接触角を減少させて親水性を付与する。また、カルボキシ基は、基材表面を親水性にするものの反応

性が高いことから細胞培養には適さないが、本発明のUV照射工程は基材表面にほとんどカルボキシ基を導入しないことから、細胞培養に適した親水性表面を提供する。

[0031] 本発明の細胞担持用基材への細胞の担持は、用いる細胞に適した培地中、該細胞担持用基材表面に細胞を添加し、用いる細胞に適した条件下で一定時間静置して付着させることにより行うことができる。また、本発明の細胞担持用基材を用いた細胞の増殖は、前記方法により担持させた細胞を更に用いる細胞に適した条件下で一定時間静置して培養することにより行うことができる。

[0032] 2. 細胞担持用基材を用いた細胞培養方法

一態様において、本発明は接着性細胞の培養方法であって、上述の細胞培養容器の細胞担持面上で細胞を培養することを含む培養方法に関する。細胞の培養は、通常、細胞培養容器に培地を添加すること、当該培地中に所望の細胞を播種すること、及び、当該培地と細胞との混合物をインキュベータ（通常は、5%CO<sub>2</sub>、37℃）内で静置することにより行うことができる。培養は、細胞が接着するまでの期間又は細胞が所望の数まで分裂するまでの期間行うことができ、例えば、数時間～数週間行うことができる。培養が長期間の場合、必要に応じて培地交換することが望ましい。

[0033] 本明細書における細胞の培養方法において、使用する「培地」は、当業者に知られた培地の中から使用する細胞の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、幹細胞（例えば、iPS細胞）を培養する場合、間葉系細胞用DMEM、間葉系細胞用MSCBM、EC細胞用培地、間葉系細胞用培地、ES細胞用培地、iPS細胞用培地、幹細胞用の培地、iSTEM、Cellartis（登録商標）DEF-CS 500 Xeno-Free Culture Medium、GS2-M（登録商標）、GS1-R（登録商標）（以上、タカラバイオ株式会社）、Poweredby10、Plusoid-M、G031101、M061101、SODATT201（以上、株式会社グライコテクニカ）、ReproFF2、ReproNa

ive、RCHEMD001、RCHEMD001A、RCHEMD001B、ReproStem、ReproXF、ReproFF2、ReproFF、NutriStem（以上、株式会社リプロセル）、StemFit（登録商標）AK02N等のStem fit培地（AJINOMOTO）を使用することができる。

[0034] 本明細書における細胞の培養方法において、培養する接着性細胞は特に限定されるものではないが、好ましくは幹細胞（iPS細胞を含む）である。幹細胞は、本発明の培養方法を用いることにより、フィーダー細胞及び細胞外基質タンパク質コーティング（ラミニン、マトリゲル（登録商標）等）非存在下又は従来より低濃度の細胞外基質タンパク質コーティングにおいても培養することができることから、生体由来材料を用いることによる安定性の低下やロット差による結果の違い、又はコンタミネーションを生じにくい。また、本発明に細胞培養方法により幹細胞を培養する場合、幹細胞としての性質（分化能、及び自己増殖能）を維持することができる。よって、本発明の細胞培養方法は、生体由来材料を用いることなく、幹細胞を培養することができることから、より安定的に安全な再生医療材料を調製することができる。

[0035] 例えば、本発明の培養方法は、上述の細胞培養容器の細胞担持面上で細胞を培養することを含む培養方法であって、フィーダー細胞の非存在下で培養することを特徴とする培養方法であってもよい。また、本発明の培養方法は、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために通常必要なマトリゲル（登録商標）の濃度の0.2倍以上1倍未満（例えば、0.2倍～0.9倍、0.2倍～0.8倍、0.2倍～0.7倍、0.2倍～0.6倍、0.2倍～0.5倍、0.2倍～0.4倍、0.2倍～0.3倍、0.2倍、0.3倍～0.9倍、0.3倍～0.8倍、0.3倍～0.7倍、0.3倍～0.6倍、0.3倍～0.5倍、0.3倍～0.4倍、0.3倍、0.4倍～0.9倍、0.4倍～0.8倍、0.4倍～0.7倍、0.4倍～0.6倍、0.4倍～0.5倍、0.4倍、0

、 5 倍～0. 9 倍、0. 5 倍～0. 8 倍、0. 5 倍～0. 7 倍、0. 5 倍～0. 6 倍、又は0. 5 倍) の濃度のマトリゲル (登録商標) 存在下で培養することを特徴とする、前記培養方法であってもよい。本明細書において、「表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材」とは、表面が当該基材の主成分である前記非フッ素系樹脂のみからなる基材を意味する。また、本明細書において、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために通常必要なマトリゲル (登録商標) の濃度のマトリゲル (登録商標) (1 倍) とは、マトリゲル (登録商標) Growth factor reduced (Corning) 170  $\mu$ l に対してDMEM-F12培地 (Life Technologies) 10ml の割合でとかし、培養皿表面を常温1時間でコーティングしたものを意味する。

[0036] 更に、本発明の培養方法は、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために通常必要なラミニンの濃度の0. 2 倍以上1 倍未満 (例えば、0. 2 倍～0. 9 倍、0. 2 倍～0. 8 倍、0. 2 倍～0. 7 倍、0. 2 倍～0. 6 倍、0. 2 倍～0. 5 倍、0. 2 倍～0. 4 倍、0. 2 倍～0. 3 倍、0. 2 倍、0. 3 倍～0. 9 倍、0. 3 倍～0. 8 倍、0. 3 倍～0. 7 倍、0. 3 倍～0. 6 倍、0. 3 倍～0. 5 倍、0. 3 倍～0. 4 倍、0. 3 倍、0. 4 倍～0. 9 倍、0. 4 倍～0. 8 倍、0. 4 倍～0. 7 倍、0. 4 倍～0. 6 倍、0. 4 倍～0. 5 倍、0. 4 倍、0. 5 倍～0. 9 倍、0. 5 倍～0. 8 倍、0. 5 倍～0. 7 倍、0. 5 倍～0. 6 倍、又は0. 5 倍) の濃度のラミニン存在下で培養することを特徴とする、前記培養方法であってもよい。本明細書において表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために通常必要なラミニンの濃度 (1 倍) とは、最終的に0. 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> になるように、iMatrix (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) をPBS希釈した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータで1時間インキュベートしコートしたものを意味する。また、本明細書において、ラミニンは、代表的にはラミニン511

E 8である。

[0037] 更に、本発明は、接着性細胞の保存方法であって、上述の細胞培養容器の細胞担持面上に細胞を担持させることを含む保存方法に関する。細胞の保存は、上述の方法に従って細胞担持面上で細胞を培養して担持させた後、適切な保存条件下に細胞培養容器を設置することにより行うことができる。保存は、移動等のための一時的な保存であっても良いし、将来の利用を目的とした長期的な保存であってもよいが、好ましくは一時的な保存である。保存の目的及び期間に応じて、適切な保存条件は適宜選択することができる。

## 実施例

[0038] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

[0039] (実施例 1) 各種樹脂材料へのオゾン／UV 処理による接触角の変化

ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) (50×50 mm、厚さ 1 mm、ニチアス株式会社)、ポリエチレン (50×50 mm、厚さ 1 mm、白色)、アクリル樹脂 (30×30 mm、厚さ 3 mm、クリア)、ABS 樹脂 (50×50 mm、厚さ 0.5 mm、白色)、ポリエチレンテレフタレート (50×50 mm、厚さ 0.3 mm、クリア)、ポリプロピレン (50×50 mm、厚さ 0.5 mm、クリア)、ポリカーボネート (50×50 mm、厚さ 0.5 mm、クリア)、ポリスチレン (50×50 mm、厚さ 0.45 mm、クリア、株式会社 光栄堂) のプレートをオゾン／UV 表面処理装置 EKBIO-1100 (荏原実業株式会社、オゾン発生ランプ (6W×2 本)、槽内寸法 W240×H170×D175 (mm)／有効寸法 W150×H80×D150 (mm)) に設置し、40℃、酸素パージ、加湿条件下、10 分間、184.9 及び 253.7 nm の UV を照射した。UV ランプから各プレートまでの距離は 4 cm (UV 照度として、約 3500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) とした。処理後、接触角を自動接触角計 DMS-200 (協和界面科学株式会社) にて試料に 1  $\mu\text{L}$  の純水を滴下し  $\theta/2$  法により測定した。

[0040] 結果を表 1 に示す。PTFE 以外のいずれの材料も、加湿環境下のオゾン／UV 処理により接触角が増加することが確認された。

[0041] [表1]

| 材料            | 未処理   | UV 10分処理 |
|---------------|-------|----------|
| PTFE          | 109.2 | 107.5    |
| ポリエチレン        | 90.9  | 68.5     |
| アクリル樹脂        | 65.8  | 56.2     |
| ABS 樹脂        | 97.5  | 70.1     |
| ポリエチレンテレフタレート | 80.2  | 34.0     |
| ポリプロピレン       | 96.0  | 81.3     |
| ポリカーボネート      | 89.0  | 45.9     |
| ポリスチレン        | 87.6  | 21.6     |

(単位:°)

[0042] (実施例 2) ポリスチレンのオゾン／UV 処理時間による接触角の変化

ポリスチレン 50×50mm、厚さ0.45mm、型式:TP-45、クリア(株式会社 光栄堂)のプレートをオゾン／UV 表面処理装置 EKBIO-1100 (荏原実業株式会社)に設置し、30℃、空気、加湿条件下で1分～30分間、184.9及び253.7nmのUVを照射した。UV ランプから各プレートまでの距離は4cm (UV 照度として、約3500μW/cm<sup>2</sup>)とした。処理後、接触角を実施例 1 と同じ方法で自動接触角計 DMS-200 (協和界面科学株式会社)にて試料に1μLの純水を滴下し、θ/2法により測定した。

[0043] 結果を図 1 に示す。オゾン／UV 処理時間により接触角が低下することが確認された。オゾン／UV 処理時間が1分～3分間の場合、水接触角は40～70°の範囲内であった。

[0044] (実施例 3) ポリスチレンディッシュのUV 処理による接触角の変化に与える加湿及びオゾンの影響の検討

ポリスチレンディッシュ (No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国) 4枚をオゾン／UV 表面処理装置 EKBIO-1100 (

荏原実業株式会社）に設置し、以下の群に分けて処理を行い接触角の違いを検討した。（１）４０℃、放電式オゾン発生環境下で５分間オゾンをパージし、加湿条件下で１０分間、１８４．９及び２５３．７ｎｍのＵＶを照射した群；（２）４０℃、放電式オゾン発生環境下で５分間オゾンをパージし、非加湿条件下で１０分間、１８４．９及び２５３．７ｎｍを照射した群；（３）４０℃、５分間酸素をパージし、加湿条件下で１０分間、１８４．９及び２５３．７ｎｍを照射した群（放電式オゾン発生無し）；（４）４０℃、５分間酸素をパージし、非加湿条件下で１０分間、１８４．９及び２５３．７ｎｍを照射した群（放電式オゾン発生無し）；（５）オゾン／ＵＶ未処理群。ＵＶランプから各プレートまでの距離は４ｃｍ（ＵＶ照度として、３５００μＷ／ｃｍ<sup>２</sup>）とした。処理後、接触角を実施例１と同じ自動接触角計ＤＭｓ－２００（協和界面科学株式会社）にて試料に１μＬの純水を滴下しθ／２法により測定した。

[0045] 各処理群の平均値を表２に示す。この結果から、ポリスチレンの同一時間のＵＶ処理では、オゾン発生かつ加湿環境下において最も接触角が変化することが示された。

[0046] [表２]

|                       | (１)  | (２)  | (３)  | (４)  | (５)  |
|-----------------------|------|------|------|------|------|
| 酸素供給                  | ＋    | ＋    | ＋    | ＋    | －    |
| 放電式オゾン発生器による<br>オゾン供給 | ＋    | ＋    | －    | －    | －    |
| 加湿                    | ＋    | －    | ＋    | －    | －    |
| UV照射                  | ＋    | ＋    | ＋    | ＋    | －    |
| 接触角(°)                | 18.3 | 26.0 | 15.8 | 24.0 | 90.4 |

[0047] （実施例４）槽内オゾン濃度を与える加湿の影響の検討

槽内のオゾン濃度に与える加湿の影響を検討するため、加湿有り及び加湿無しの両条件下について以下の実験を行った。オゾン／UV表面処理装置EKBIO-1100（荏原実業株式会社）を用いて、放電式オゾン発生器からのオゾン供給（オゾンパージ）を5分間行った。続いて、オゾン供給を維持しながら、10分間184.9nm及び253.7nmのUVを照射した。その後、オゾン供給とUV照射を停止した。オゾンパージ開始時点から、オゾン供給とUV照射の停止から10分後までの間、オゾン濃度を測定した。オゾン濃度の測定は、紫外線吸収式オゾン濃度計PG-620型（荏原実業株式会社）により行った。また、全ての工程において、槽内温度は40℃に設定した。

[0048] オゾン濃度の推移を図2に示す。加湿が無い場合には、UV照射によりオゾン濃度が上昇するのに対し、加湿がある場合には、UV波長がオゾン発生波長（184.9nm）を含むにもかかわらず、UV照射後に逆にオゾン濃度が低下することが示された。よって、加湿環境下でのUV照射のエネルギーがオゾン発生以外の反応に利用され、それにより接触角や細胞接着性・増殖性が変化することが示唆された。例えば、水蒸気を構成する水分子は、UV照射により水素原子とヒドロキシラジカルを生成させることが知られている。ヒドロキシラジカルは非常に反応性が高いことから、生成したヒドロキシラジカルがポリスチレン表面の分子と相互作用して表面の性質を変えられとされる。

[0049] （実施例5）加湿条件下における槽内湿度の測定

オゾン／UV表面処理装置EKBIO-1100（荏原実業株式会社）の槽内温度40℃、又は30℃で、加湿条件とし、1分毎に30分間槽内の湿度を温湿度センサーWATCH LOGGER KT-300/KT-275（株式会社藤田電機製作所）により測定した。

[0050] いずれの温度条件下においても加湿条件下における槽内の相対湿度はほぼ一定であり、槽内温度が40℃の場合には相対湿度は20～40%の範囲内であり、槽内温度が30℃の場合には相対湿度は30～50%の範囲内であ

った。

[0051] (実施例6) オゾン／UV処理ポリスチレンディッシュの接触角の経時変化  
オゾン／UV処理により得られた接触角が一定時間経過後においても保存されるかを確認するため、オゾン／UV処理から1日後、1週間後、及び1月後の接触角を測定した。オゾン／UV表面処理装置E K B I O - 1 1 0 0 (荏原実業株式会社)を用いて、40℃、酸素パージ5分間の後、加湿下、UVランプからの距離4cmで、直径60mm無処理ポリスチレンディッシュ(No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国)にUVを1分、2分、3分、5分、10分、20分又は30分間照射した。処理後のプレートをビニール袋に封入して密閉し、室温で24時間、1週間、及び1月間保存して、保存後の接触角を実施例1と同様の方法により測定した。

[0052] また、それぞれのディッシュについて、細胞接着性および増殖性について検討した。マウスES細胞として、理研セルバンク(日本)より入手した129/Ola系統由来マウス胚性幹細胞であるEB3細胞(Mol. Cell Biol. (2002) 22:1526-36; Genes to Cells (2004) 9:471-7)を使用した。この細胞は、未分化細胞特異的遺伝子の一つであるOct3/4遺伝子の片方(一方の遺伝子座)がires-blasticidin S耐性遺伝子と置換されていることから、Oct3/4遺伝子の転写活性でblasticidin S耐性遺伝子が発現する。このため、EB3細胞は、分化してOct3/4遺伝子が発現しなくなると、ブラストサイジン存在下で増殖しない。

[0053] EB3細胞の凍結アンプルを恒温槽で2.5分間解凍し、遠心分離して細胞懸濁液10mlを調製した。0.1%のゼラチン溶液を各5ml添加した25cm<sup>2</sup>フラスコ2個を5%CO<sub>2</sub>、37℃のインキュベータ内で30分以上静置し、パスツールピペットを用いてゼラチン溶液を吸引して、フラスコの培養面をゼラチンでコートした。ゼラチンコートしたフラスコに調製したEB3細胞の細胞懸濁液を各5ml播種し、これを初代細胞(P0)とした。得られた初代細胞は、毎日新鮮なES細胞用培養液(100ml中の組成

として：GMEM培地 100 ml、MEM用非必須アミノ酸（NEAA）1 ml、ピルビン酸ナトリウム 1 ml、2-メルカプトエタノール 1 ml、白血球増殖抑制因子 100  $\mu$ l、ブラストサイジン S溶液 100  $\mu$ l、以下同じ）200 mlで培地交換を行いながら、インキュベータ内で3日間培養した。

[0054] 培養3日後、各フラスコ内の培養液を除去して、PBSを各5 mlで洗浄した後、0.25%トリプシンを各2.5 ml加え、インキュベータ内で2分間静置した。ピペティングして培養面に残った細胞をトリプシン中に完全に懸濁させた。得られたフラスコ2個分の細胞懸濁トリプシン溶液と培養液5 mlを50 mlチューブに加え、全量を10 mlとした。このチューブを、1500 rpmで5分間遠心分離して、細胞を沈殿物として回収した。回収した細胞に新鮮な培養液加え、ピペティングして細胞懸濁液を調製した。培養ディッシュ24枚に培養液を3 mlずつ添加し、 $3.1 \times 10^5$  cells/dishとなるように希釈した前述の細胞懸濁液を2 mlずつ播種してインキュベータ内で3日間培養した。培養期間中、毎日培養ディッシュの顕微鏡写真を撮像して、EB3細胞の増殖の様子を観察した。その後、各ディッシュは培養液を除去してPBS 5 mlで洗浄し、トリプシン 1 mlを加えて、インキュベータ内で5分間静置してからピペティングして培養面に残った細胞をトリプシン中に完全に懸濁させた。各ディッシュから得られた細胞懸濁トリプシン溶液のそれぞれをマイクロチューブ（合計24本）に移し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

[0055] 翌日マイクロチューブを超音波処理しながら細胞を解凍させることにより細胞膜を破壊し、サンプル中のDNA含有量を測定して細胞数を算出した。DNA含有量は、蛍光分光光度計（Qubit（登録商標）2.0 Fluorometer, LIFE TECHNOLOGIES, Japan）を用いて、製造者提供のプロトコルに従い蛍光強度を測定し、標準検体を用いて作成した検量線から各サンプルの総DNA含有量を得た。算出された総DNA含有量を1細胞あたりのDNA含有量である7.7 pgで除して、培

養3日目の各培養ディッシュ内の細胞数を算出した。細胞数の有意差検定は、Turkey-Kramerの検定法を利用して、有意水準0.05で行った。

[0056] 接触角の変化を図3に示す。オゾン／UV処理後1日後、1週間後、1か月後と時間の経過とともに接触角は徐々に上昇する傾向は認められたが、急激な上昇はほとんど確認されなかった。また、細胞の接着性状を検討した結果、保存1日後、及び1週間後のディッシュは、親水化処理当日（0日後）のディッシュと全く同様の接着性を示すことを確認した。一方で、保存1ヶ月後のディッシュにおいてはわずかに細胞の形態変化が確認されたものの、十分な細胞接着性が維持されていることを確認した。

[0057] （実施例7）各種処理プレート上におけるES細胞の培養

（1）プレートの用意

陰性対照として、UV未処理の直径60mm無処理ポリスチレンディッシュ（No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国）を用いた（TCPS）。陽性対象として、ゼラチンコートされたポリスチレンディッシュ（AGCテクノグラス株式会社、日本；3010-060）（Treated PS）を用いた。UV処理群として、直径60mm無処理ポリスチレンディッシュ（No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国）を、オゾン／UV表面処理装置EKBIO-1100（荏原実業株式会社）を用いて、以下の条件で184.9nm及び253.7nmのUVを照射したディッシュを用意した：25℃、大気雰囲気下（加湿無し、かつ、オゾンパージ無し）で、UVを1分間照射（UVPS（1m））；25℃、大気雰囲気下（加湿無し、かつ、オゾンパージ無し）で、UVを3分間照射（UVPS（3m））；40℃、酸素パージ5分間の後、加湿下で、UVを3分間照射（O<sub>2</sub>H（+）PS）；40℃、酸素パージ5分間の後、乾燥状態（加湿無し）で、UVを3分間照射（O<sub>2</sub>H（-）PS）；40℃、オゾンパージ5分間の後、加湿下で、UVを3分間照射（O<sub>3</sub>H（+）PS）；40℃、オゾンパージ5分間の後、乾燥状態（加湿無し）で、UVを3分間照射

( $O_3$ H(-)PS)。オゾン／UV処理中のオゾン濃度を実施例4と同じ方法により測定した。

[0058] (2) 接触角の測定

上記実施例7(1)で用意したプレート((Treated PSを除く)の接触角を実施例1と同じ方法により測定した。接触角は、同一プレート上の5箇所で測定し、その平均値として求めた。

[0059] (3) マウスES細胞の培養

実施例6と同様にしてマウスES細胞を培養し、培養後のDNA含有量から細胞数を算出した。

[0060] (4) 結果

各プレート処理中のオゾン濃度の推移を図4に示す。また、各プレートの条件及び測定された接触角を表3に示す。培養3日目の細胞数を計算した結果を図5に示す。細胞増殖は、オゾン環境下で加湿した場合が最も多かった。よって、ポリスチレンプレートをオゾン環境下、加湿条件下でUV照射することにより、より多くの接着細胞が接着する表面が得られることが示された。

[0061] [表3]

| プレート              | TCPS | UVPS(1m) | UVPS(3m) | $O_2$ H(+)PS | $O_2$ H(-)PS | $O_3$ H(+)PS | $O_3$ H(-)PS |
|-------------------|------|----------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| UV照射              | -    | +        | +        | +            | +            | +            | +            |
| 照射時間(分)           | -    | 1        | 3        | 3            | 3            | 3            | 3            |
| 雰囲気               | -    | 大気       | 大気       | $O_2$        | $O_2$        | $O_3$        | $O_3$        |
| 加湿                | -    | -        | -        | +            | -            | +            | -            |
| 接触角( $^{\circ}$ ) | 82.2 | 77.2     | 47.9     | 49.2         | 58.5         | 39.6         | 48.3         |
| SD                | 0.5  | 1.5      | 1.0      | 1.0          | 0.5          | 0.7          | 1.3          |

[0062] (実施例8) 各種処理プレート表面上の官能基の分析

細胞接着と表面官能基との関係を調べるため、ポリスチレンプレートの表面官能基がオゾン環境の有無、加湿条件の有無、及びUV照射の有無によりどのように変化するかを分析した。

UV照射時間を3分間とする他は実施例3の(1)～(4)と同様に処理したポリスチレンディッシュ(コーニング、マサチューセッツ州、米国; 430589)を作製した。各ディッシュから8mm各のプレートを切り出して、光電子分光装置(日本電子株式会社、JPS-9010)を用いて表面分析を行った。各試料を試料台に貼付し、試料台を準備室に入れて真空引きを行った後、試料台を測定室に挿入した。本分析で使用する試料はポリスチレン製であるため、構成元素は炭素および酸素である(水素も構成元素ではあるが、水素は電子が1個しか存在しないので、XPSでは測定ができない)。従って、本分析では、ワイドスキャンは行わず、炭素の1s軌道の電子のナロースキャンスペクトルを取得した。X線はAl K $\alpha$ 線(1486.6 eV)を用い、炭素のナロースキャンの測定範囲は294.0～280.0 eVとした。また、ステップ幅は0.1 eV、積算回数は10回とした。スペクトルを取得後、ステップ数5でスムージングによるスペクトルの平滑化を行った。非弾性散乱した電子やノイズが原因で発生するスペクトルのバックグラウンドの除去は、シャリーバックグラウンド除去を利用して行った。スペクトルの波形分離は、成分波形をガウスローレンツ関数の正規分布型の関数で近似して行った。

[0063] 実施例3の(1)～(4)の処理を行ったポリスチレンディッシュの表面分析の結果を、それぞれ図6A～図6Dに示す。これらの結果から、親水性の発揮に寄与していると考えられている、水酸基、カルボニル基、及びカルボキシ基などの酸素原子を有する基が、加湿がない条件でのUV照射群において認められた。一方で、加湿条件でのUV照射群では予想外にも酸素原子を有する基がほとんど変化しなかった。さらに、加湿条件でのUV照射群のみにケミカルシフトしたC-C結合、C-H結合(C-C、C-H (Modified))が認められた。このため、通常のおゾン/UV処理では導入されないが、加湿とおゾンの供給を併せてすることにより導入された、このようなケミカルシフトしたC-C結合、C-H結合(C-C、C-H (Modified))が、細胞の接着性及び増殖性の向上に寄与していることが

示された。

[0064] (実施例 9) オゾン／UV 処理されたプレートでのマウス i P S 細胞の培養

上記検討からオゾン環境下、加湿条件下で UV 照射することが接着細胞の接着に適した表面の形成に重要であることが示されたことから、更に、i P S 細胞の培養に適した表面を与えるために適した UV 処理時間を調べるため、各種 UV 処理時間で処理したポリスチレンプレート上へのマウス i P S 細胞の接着を検討した。

(1) プレートの調製

オゾン／UV 表面処理装置 E K B I O - 1 1 0 0 (荏原実業株式会社) を用いて、直径 6 0 m m のポリスチレン製の細胞培養用ディッシュ (N o . 4 3 0 5 8 9、コーニング、マサチューセッツ州、米国) に、以下の条件で 1 8 4 . 9 n m 及び 2 5 3 . 7 n m の UV を照射した：4 0 °C、酸素パージ 5 分間の後、加湿下で、UV を 0 分 (陰性対象)、1 分、3 分又は 1 0 分間照射。

[0065] (2) マウス i P S 細胞の培養

N a n o g プロモーターに制御された G F P 遺伝子を有するマウス i P S 細胞 (理研セルバンク、A P S 0 0 0 1 株、6 回継代) を、(1) で調製したポリスチレンディッシュ中の D M E M (1 5 % F B S、0 . 1 m M N E A A、0 . 1 m M 2 -メルカプトエタノール、1 0 0 0 U / m l マウス L I F) に播種した (フィーダー細胞フリー、ゼラチンフリー)。3 日間培養後、非接着細胞を除去し、顕微鏡観察により接着細胞を確認した。また、陽性対象として、オゾン／UV 表面改質処理していないディッシュを用いること、及びフィーダー細胞 (M E F 細胞) 上で培養すること以外は同じ条件で同じマウス i P S 細胞を培養した。

[0066] (3) 結果

オゾン／UV 表面処理したポリスチレンディッシュに接着したマウス i P S 細胞の顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真を図 7 に示す。ほぼ全ての細胞が G F P を発現していることから、細胞が未分化能を維持していることが示され

た。接着細胞数は、オゾン／UV表面処理時間が1分及び3分の場合に、フィーダー細胞及びゼラチンが含まれていないにもかかわらず、フィーダー細胞上で培養した場合と同等の細胞接着数となることが示された。

[0067] (実施例10) オゾン－UV処理されたプレートでのヒトiPS細胞の培養  
(マトリゲル(登録商標)濃度検討)

オゾン／UV表面処理したポリスチレンディッシュは、フィーダー細胞及びゼラチン非存在下でもマウスiPS細胞の培養が可能であったことから、ヒトのiPS細胞についてもマトリゲル(登録商標)濃度を減少させることができるか否かについて検討した。

#### (1) プレートの調製

オゾン／UV表面処理装置EKBIO-1100(荏原実業株式会社)を用いて、直径60mmのポリスチレン製の細胞培養用ディッシュ(IWAKI)に、以下の条件で184.9nm及び253.7nmのUVを照射した：25℃、酸素パージ5分間の後、加湿下で、UVを0分(陰性対象)、1分、2分、3分、4分、又は5分間照射。オゾン／UV表面処理した全てのプレートを5倍希釈(×0.2)したマトリゲル(登録商標)(BD biosciences、#354277)でコーティングした。また、オゾン／UV表面処理していないディッシュを陽性対象として、5倍希釈(×0.2)、2倍希釈(×0.5)、又は希釈していないマトリゲル(登録商標)でコーティングした。なお、本実施例において、1倍のマトリゲル(登録商標)とは、マトリゲル(登録商標)Growth factor reduced(Corning)170μlに対してDMEM-F12培地(Life Technologies)10mlの割合でとかし、培養皿表面を常温1時間でコーティングしたものとした。

[0068] (2) ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞(201B7)を(1)で調製したポリスチレンディッシュ中のStem fit培地(AJINOMOTO)(Scientific Reports 4, Article number: 3594

(2014) doi: 10.1038/srep03594) (Y27364 含有) に  $5.0 \times 10^4$  細胞/ディッシュで播種した。37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%の条件下で、5日間培養した。培養後、非接着細胞を除去し、ALP染色及びVice IIにより細胞数をカウントすることにより接着細胞数を評価した。

[0069] (3) 結果

培養後の接着細胞数をVice IIでカウントした結果を図8に示す。オゾン/UV未処理のポリスチレンディッシュにおいては、マトリゲル(登録商標)の濃度の減少に応じて接着細胞数も減少した。オゾン/UV処理を1～2分行うことにより、5倍希釈のマトリゲル(登録商標)(×0.2)濃度で1倍のマトリゲル(登録商標)と同じ数の細胞が接着し、オゾン/UV処理時間が長くなるに従って接着細胞数が減少することが示された。また、ALP染色においても同じ傾向が確認された(図9)。よって、オゾン/UV処理を1～2分行うことにより、マトリゲル(登録商標)濃度を5分の1(0.2倍)に減少させてもヒトiPS細胞の接着培養が可能であることが示された。

[0070] (実施例11) オゾン-UV処理されたプレートでのヒトiPS細胞の培養(ラミニン濃度検討)

オゾン/UV表面処理したポリスチレンディッシュは、マトリゲル(登録商標)濃度が低い条件下でもヒトiPS細胞が効率的に接着することが示されたことから、マトリゲル(登録商標)と同様にiPS細胞の培養基材として用いられるラミニン濃度を減少させることができるか否かについて検討した。

(1) プレートの調製

オゾン/UV表面処理装置EKBIO-1100(荏原実業株式会社)を用いて、直径60mmのポリスチレン製の細胞培養用ディッシュ(IWAKI)に、以下の条件で184.9nm及び253.7nmのUVを照射した: 25℃、酸素パージ5分間の後、加湿下で、UVを0分(陰性対象)、1

分、3分、又は5分間照射。オゾン／UV表面処理した全てのプレートを5倍希釈（×0.2）、及び2倍希釈（×0.5）したラミニンでコーティングした。また、オゾン／UV表面処理していないディッシュを陽性対象として、5倍希釈（×0.2）、2倍希釈（×0.5）、又は希釈していないラミニン511E8でコーティングした。なお、本実施例において1倍のラミニンとは、最終的に0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるように、iMatrix（1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）をPBS希釈した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータで1時間インキュベートしコートしたものとした。

[0071] (2) ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞（201B7）を（1）で調製したポリスチレンディッシュ中のStem fit培地（AJINOMOTO）（Scientific Reports 4, Article number: 3594（2014）doi:10.1038/srep03594）（Y27364含有）に5.0×10<sup>4</sup>細胞／ディッシュで播種した。37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%の条件下で、5日間培養した。培養後、非接着細胞を除去し、ALP染色及びViCellにより細胞数をカウントすることにより接着細胞数を評価した。

[0072] (3) 結果

培養後の接着細胞数をViCellでカウントした結果を図10に示す。オゾン／UV未処理のポリスチレンディッシュにおいては、ラミニンの濃度の減少に応じて接着細胞数も減少した。オゾン／UV処理を1～3分行うことにより、2倍希釈のラミニン（50%）濃度で1倍のラミニンを超える数の細胞が接着し、オゾン／UV処理時間が長くなるに従って接着細胞数が減少することが示された。また、ラミニン濃度を5倍希釈とした場合も、オゾン／UV処理を1分行うことにより1倍のラミニンを超える数の細胞が接着した。また、培養後の接着細胞をALP染色した結果を図11に示す。オゾン／UV未処理のポリスチレンディッシュにおいては、ラミニンの濃度の減少に応じて接着細胞数も減少する傾向がみられた（図11上段）。オゾン／

UV処理ディッシュにおいては、ラミニン濃度を0.2倍とした場合には、オゾン／UV処理を施してもコントロール（ラミニン濃度1倍）と比較して接着細胞数が減少した。一方、ラミニン濃度を0.5倍とした場合には、オゾン／UV処理を1～3分行うことにより、ラミニン濃度1倍の場合と同等数の細胞が接着した。よって、オゾン／UV処理を1～3分行うことにより、ラミニン濃度を2分の1（0.5倍）に減少させてもヒトiPS細胞の接着培養が可能であることが示された。

[0073] （実施例12）オゾン－UV処理されたプレート表面分析

（1）プレートの用意

直径60mmポリスチレン製（No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国）の細胞培養用ディッシュにオゾン／UV表面改質処理として、オゾン／UV表面処理装置EKBIO-1100（荏原実業株式会社）を用いて、以下の条件で184.9nm及び253.7nmのUVを照射した：40℃、酸素パージ5分間の後、加湿下で、UVを1分、3分、5分、10分又は20分間照射。対照として、UV未処理の直径60mm無処理ポリスチレンディッシュ（No. 430589、コーニング、マサチューセッツ州、米国）を用いた（Control）。

[0074] （2）表面分析

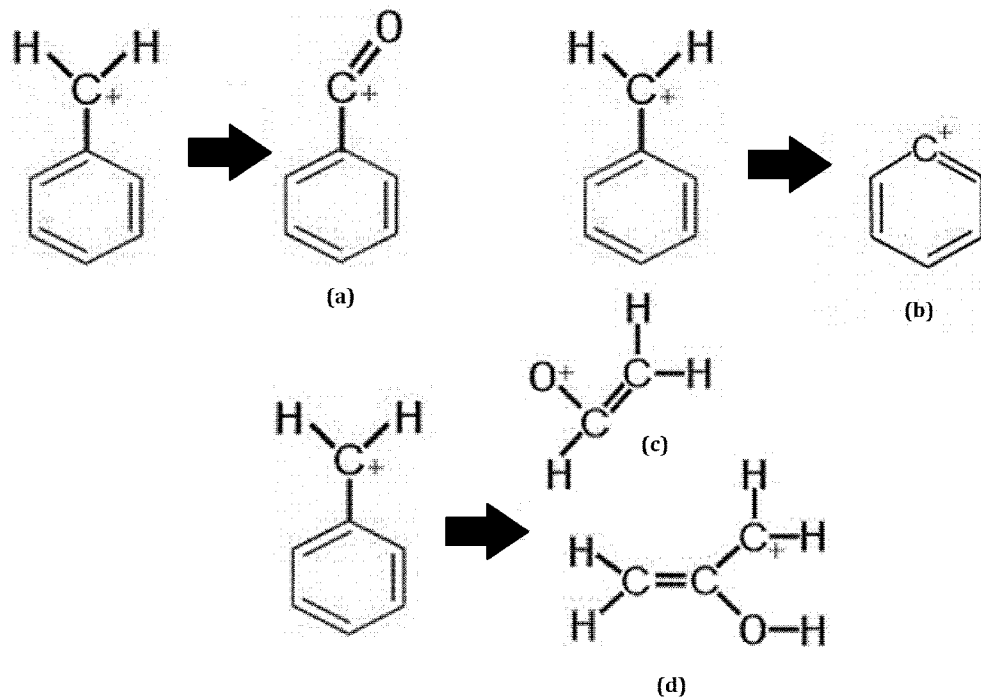
各ディッシュから15mm各のプレートを切り出して、飛行時間型二次イオン質量分析装置（アルバック・ファイ株式会社、PHI nanoTOF II）を用いて表面分析を行った。分析用の一次イオンビームは、30kV  $\text{Bi}_3^{++}$  6.0～7.0nA DCとした。走査範囲は、 $500 \times 500 \mu\text{m}$ （画素数： $256 \times 256 \mu\text{m}$ 、表示範囲 $128 \times 128 \mu\text{m}$ ）とした。一次イオンビームのパス幅とフレーム数は、12n秒、64～75回（ $1 \times 10^{11}$ 個/ $\text{cm}^2$ ）として、帯電中和は10eV電子線+10eV  $\text{Ar}^+$ とした。ポリスチレンから生成可能なイオンは全て陽イオンであることから、正のイオン分子量スペクトルのみを検出した。

[0075] （3）結果

結果を図10A～Cに示す。表面分子をJing Yang, et al. *Biomaterials*, 31:8827-8838, (2010)に従い接着促進因子と接着阻害因子に分類して評価した。具体的には、ポリスチレンから生成する分子のうち、 $C_3H_7^+$  (分子量43.0554)、 $C_5H_7^+$  (分子量67.0556)、及び $C_7H_5O^+$  (分子量105.0317)は接着促進因子、 $C_3H_5^+$  (分子量41.0395)、 $C_2H_3O^+$  (分子量43.0191)、 $C_3H_5O^+$  (分子量57.0347)、 $C_3H_7O^+$  (分子量59.0498)、及び $C_6H_5^+$  (分子量77.0364)は接着阻害因子として分析した。なお、 $C_3H_7^+$  (分子量43.0554)と $C_2H_3O^+$  (分子量43.0191)については、Oの含有の有無を調べていずれの分子であるかを同定した。これらのうち、表面分析の結果、際立って変動が見られた $C_7H_5O^+$  (分子量約105)をオゾン／UV表面改質処理により増加する代表的な接着促進因子とし、 $C_2H_3O^+$  (分子量約43)をオゾン／UV表面改質処理により増加する代表的な接着阻害因子として、UV照射時間とこれらの分子の変動を分析した。 $C_7H_5O^+$  (分子量約105)は以下の化学式の(a)であり、 $C_2H_3O^+$  (分子量約43)は以下の化学式の(c)の物資であると考えられる。

[0076]

[化1]



[0077] 具体的には、ディッシュ表面を構成する分子のうち、これらの因子の割合を（接着促進因子の割合）＝（接着促進因子の発現量）／{（全ての因子の発現量）－（外部因子の発現量）}、及び、（接着促進阻害因子の割合）＝（接着阻害因子の発現量）／{（全ての因子の発現量）－（外部因子の発現量）}として算出し、UV照射時間に対するそれぞれの因子の割合の変化を調べた（図11）。「外部因子」は、オゾン・UV処理の過程及びディッシュの裁断過程で付着する可能性のある汚染要因となる外部因子であり、具体的には、 $\text{Na}^+$ （分子量22.9932）、 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$ （分子量73.0518）、及び $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2^+$ とした。その結果、 $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$ はUV照射1分から増え始め、3分で最大に達した。また、 $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$ は、UV照射3分から徐々に増え始め、UV照射20分まで増加し続けることがわかった。

[0078] iPS細胞の実験結果においては、現在iPSの培養で使用されている濃度（1倍）のマトリゲル（登録商標）コーティングディッシュと同等の接着

細胞数を達成できるUV照射時間は、1～3分間であった。よって、ディッシュ表面の $C_7H_5O^+$ の割合が0.015以上の場合、1倍のマトリゲル（登録商標）コーティングディッシュと同等かそれ以上の接着細胞数となること  
が示された。また、ディッシュ表面の $C_7H_5O^+$ はUV照射時間が3分経過後  
に最大に達した後、5分で一度減少し、その後5～20分にかけて増加する  
傾向にあった。一方で、接着細胞数はUV照射時間が1～3分で最大に達し  
た後は減少した。よって、接着促進因子以外に接着阻害因子についても検討  
を行ったところ、 $C_2H_3O^+$ は、UV照射5分を経過した後急激に増加するこ  
とから、（接着促阻害因子の割合）／（接着促進因子の割合）を計算したと  
ころ（図12）、この割合が0.485以下であれば、接着細胞数の増加に  
寄与することが示された。

## 請求の範囲

- [請求項1] 非フッ素系樹脂を主成分とする基材からなる細胞担持用基材であって、飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により  $C_7H_5O+$  分子を生じる成分を含有する細胞担持面を有し、当該細胞担持面において細胞が担持される細胞担持用基材。
- [請求項2] 前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記  $C_7H_5O+$  分子の割合が 0.015 以上である、請求項 1 に記載の細胞担持用基材。
- [請求項3] 前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記  $C_7H_5O+$  分子の割合に対する、前記細胞担持面への飛行時間型二次イオン質量分析装置によるビーム照射により生じる全ての分子に対する前記  $C_2H_3O+$  分子の割合が、0.485 以下である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞担持用基材。
- [請求項4] 前記細胞担持面にケミカルシフトを生じた C—C 結合及び／又は C—H 結合を有する、請求項 1～請求項 3 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。
- [請求項5] 前記細胞担持面に実質的にカルボキシ基が存在しないことを特徴とする、請求項 1～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。
- [請求項6] 前記細胞担持面の水接触角が  $40\sim 70^\circ$  であることを特徴とする、請求項 1～請求項 5 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。
- [請求項7] 前記細胞担持面が、フィーダー細胞の非存在下においても、幹細胞が未分化の状態に接合し又は増殖することができる表面であることを特徴とする、請求項 1～請求項 6 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。
- [請求項8] 前記細胞担持面が、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接合させるために必要なマトリゲル（登録商標）の濃度の 0.2 倍の濃度においても、幹細胞が接合し又は増殖す

ることができる表面であることを特徴とする、請求項 1 ～請求項 7 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。

[請求項9] 前記細胞担持面が、表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なラミニンの濃度の 0.2 倍の濃度においても、幹細胞が接着し又は増殖することができる表面であることを特徴とする、請求項 1 ～請求項 8 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。

[請求項10] 幹細胞が、マウス i P S 細胞又はヒト i P S 細胞である、請求項 8 又は請求項 9 に記載の細胞担持用基材。

[請求項11] 前記非フッ素系樹脂が、ポリエチレン、アクリル樹脂、A B S 樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート、及びポリスチレンからなる群から選択される少なくとも 1 種類の樹脂である、請求項 1 ～請求項 1 0 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。

[請求項12] 前記非フッ素系樹脂がポリスチレンである、請求項 1 1 に記載の細胞担持用基材。

[請求項13] 接着細胞培養用容器である、請求項 1 ～請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載の細胞担持用基材。

[請求項14] 前記接着細胞培養用容器が、接着細胞培養用ディッシュである、請求項 1 3 に記載の細胞担持用基材。

[請求項15] 細胞担持面を有する細胞担持用基材の製造方法であって、  
非フッ素系樹脂を主成分とする基材の周囲を加湿する加湿工程、及び、

前記加湿工程中、及び／又は前記加湿工程の後に、該基材を酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中で該細胞担持面に U V を照射する U V 照射工程を含む、細胞担持用基材の製造方法。

[請求項16] 前記非フッ素系樹脂が、ポリエチレン、アクリル樹脂、A B S 樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート

、及びポリスチレンからなる群から選択される少なくとも1種類の樹脂である、請求項15に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[請求項17] 前記非フッ素系樹脂がポリスチレンである、請求項16に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[請求項18] 前記UV照射が、平均波長184.9nm及び253.7nmのUVを照射することにより行われることを特徴とする、請求項15～請求項17のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[請求項19] 前記UV照射が、前記非フッ素系樹脂表面の水接触角が40～70°となるまでの間行われることを特徴とする、請求項15～請求項18のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[請求項20] 前記UV照射が、1～3分間行われることを特徴とする、請求項15～請求項19のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の製造方法。

[請求項21] 6Wのオゾン発生ランプ2本で184.9及び253.7nmのUVを照射することを特徴とする、請求項15～請求項20のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項22] UVランプから前記基材までの距離が3～5cmであることを特徴とする、請求項15～請求項21のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項23] 請求項15～請求項22のいずれか1項に記載の方法により製造された細胞担持用基材。

[請求項24] 接着細胞の培養方法であって、請求項1～請求項14及び請求項23のいずれか1項に記載の細胞担持用基材の細胞担持面上で細胞を培養することを含む培養方法。

[請求項25] 前記接着細胞が幹細胞である、請求項24に記載の培養方法。

[請求項26] 前記幹細胞が、マウスiPS細胞又はヒトiPS細胞である、請求項25に記載の培養方法。

[請求項27] フィーダー細胞の非存在下で培養することを特徴とする、請求項25又は請求項26に記載の培養方法。

[請求項28] 表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞

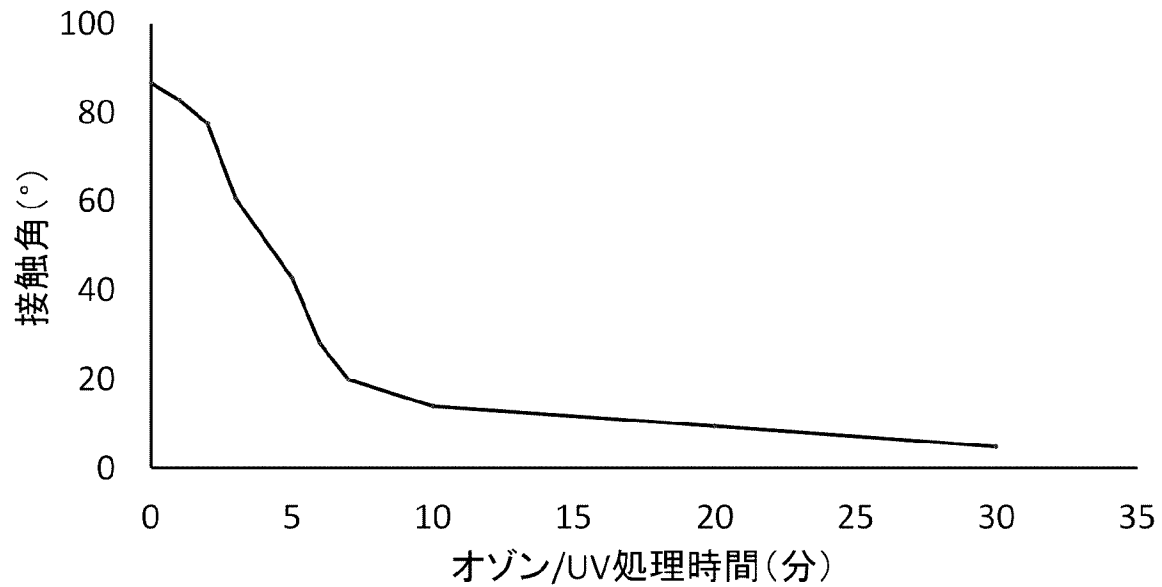
胞を接着させるために必要なマトリゲル（登録商標）の濃度の0.2倍の濃度のマトリゲル（登録商標）存在下で培養することを特徴とする、請求項25～請求項27のいずれか1項に記載の培養方法。

[請求項29] 表面未処理の前記非フッ素系樹脂を主成分とする基材において幹細胞を接着させるために必要なラミニンの濃度の0.5倍の濃度のラミニン存在下で培養することを特徴とする、請求項25～請求項28のいずれか1項に記載の培養方法。

[請求項30] 請求項24～請求項29のいずれか1項に記載の培養方法で培養された細胞を保存することを含む、接着細胞の保存方法。

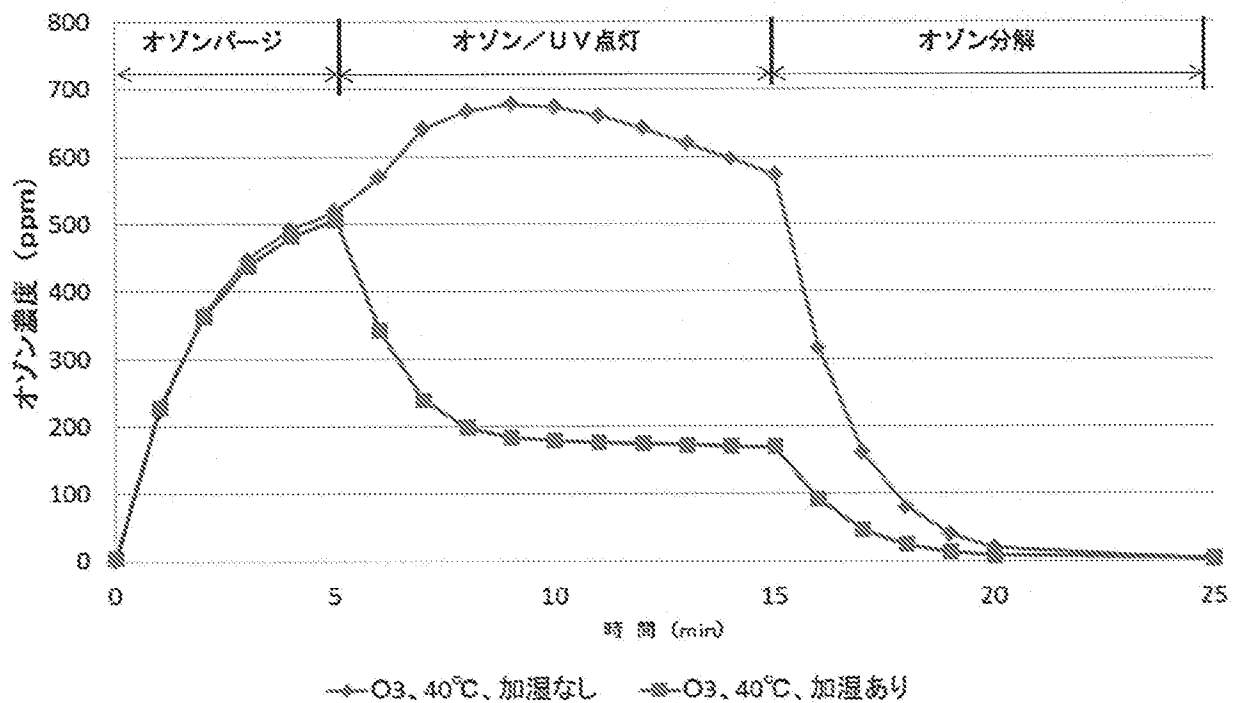
[図1]

## ポリスチレンのオゾン／UV処理の効果

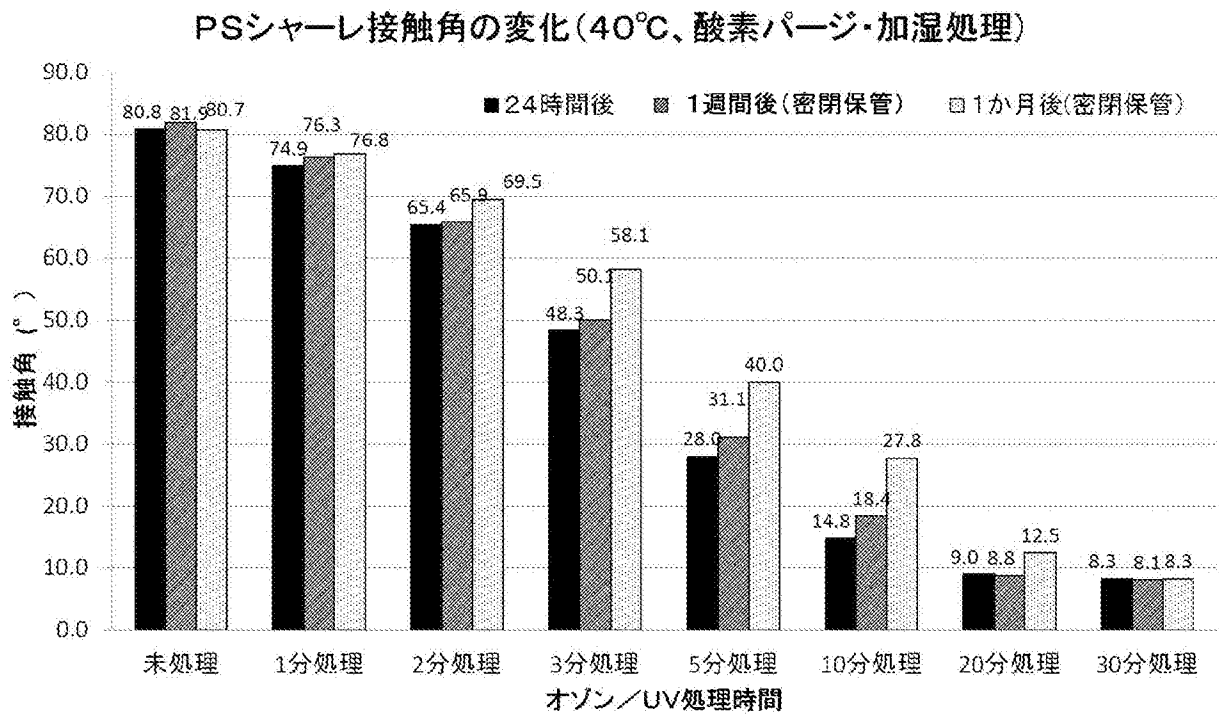


[図2]

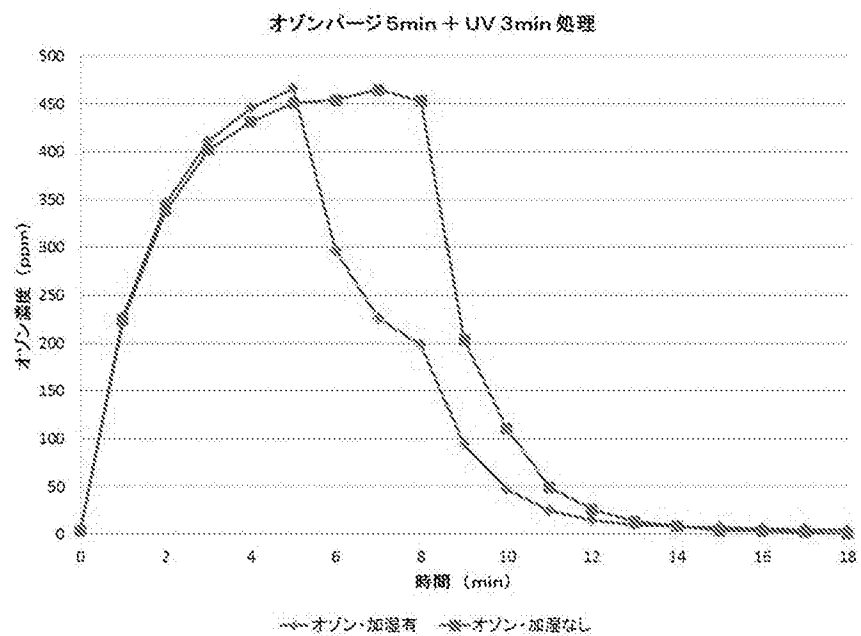
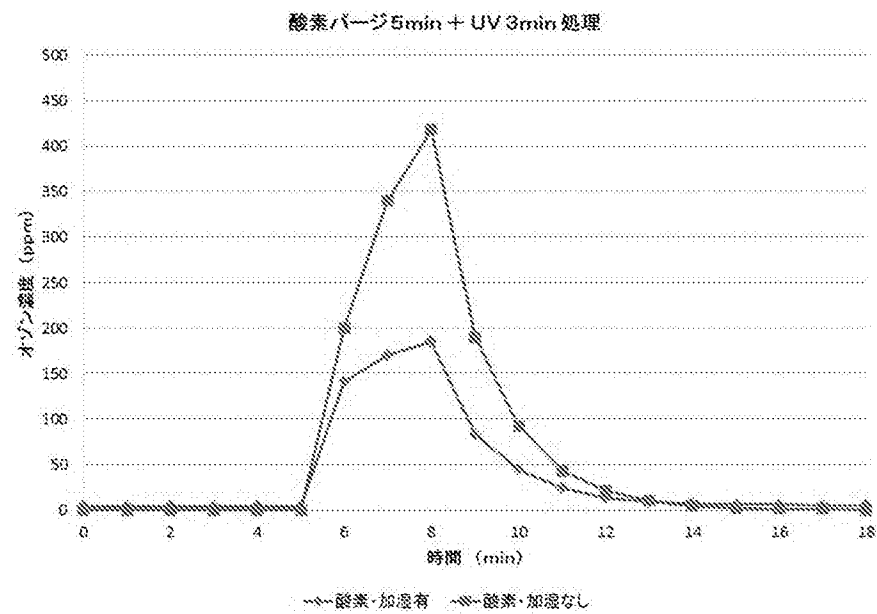
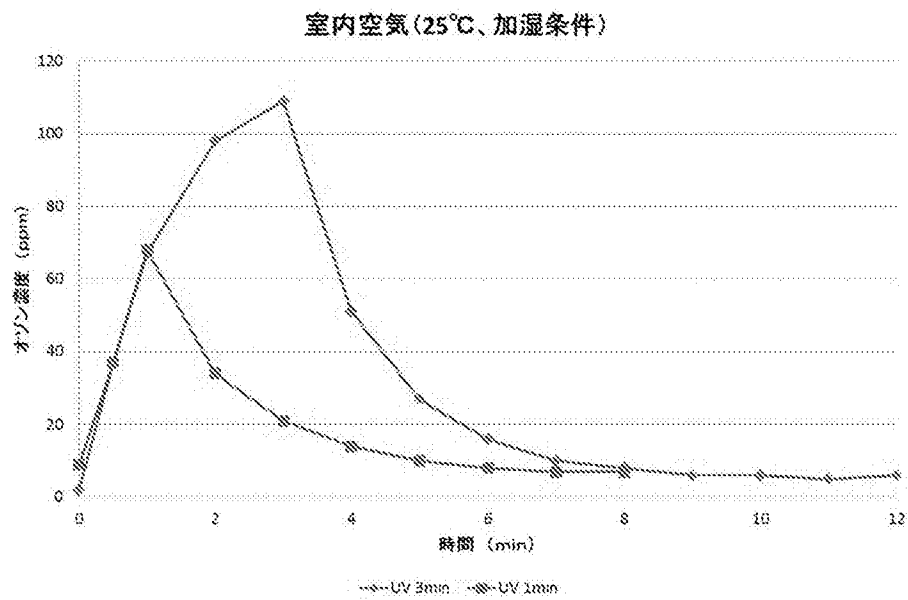
オゾン濃度の推移(加湿の有無による比較)  
 (40℃、酸素原料ガージ : 5min、オゾン/UV : 10min)



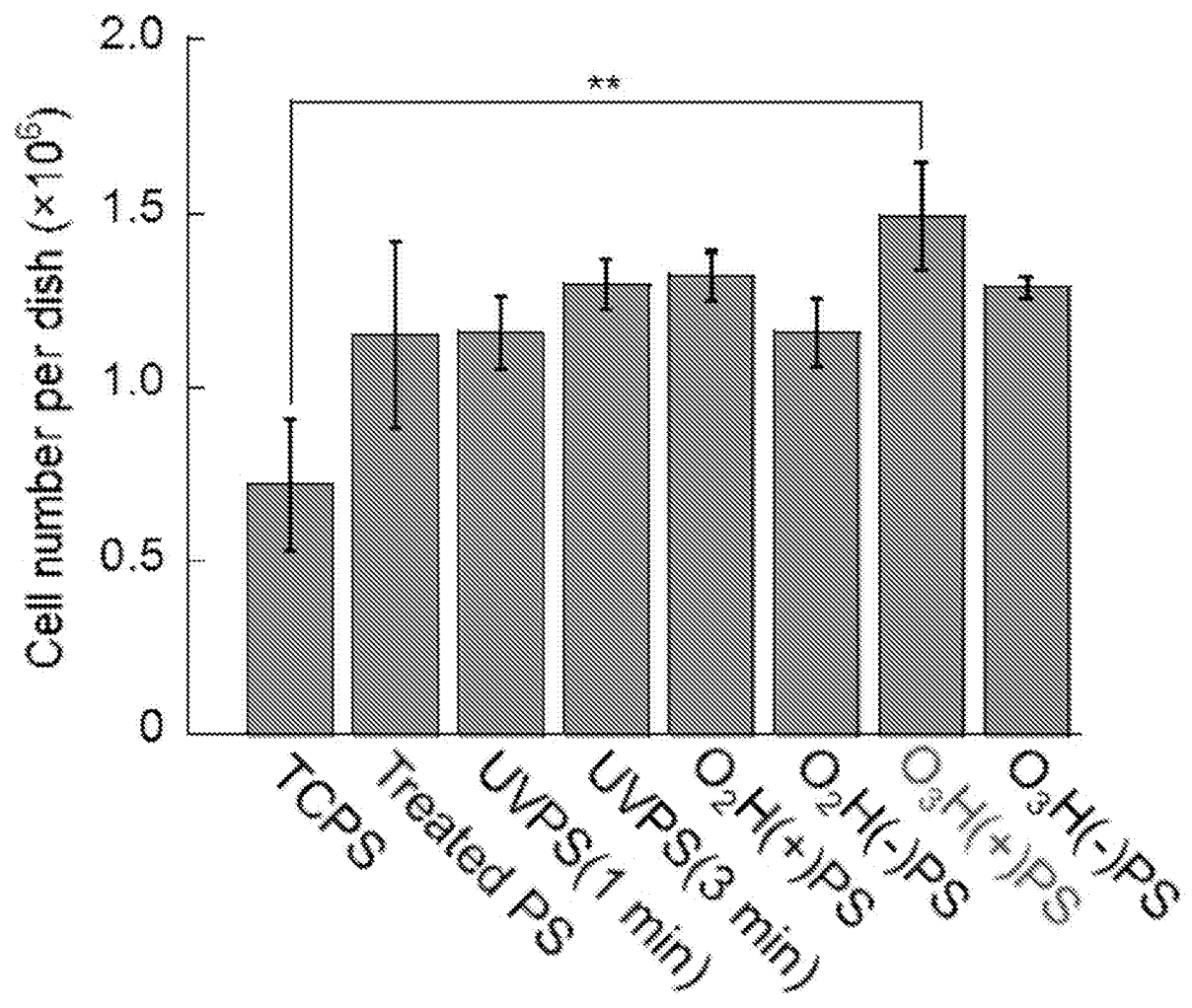
[図3]



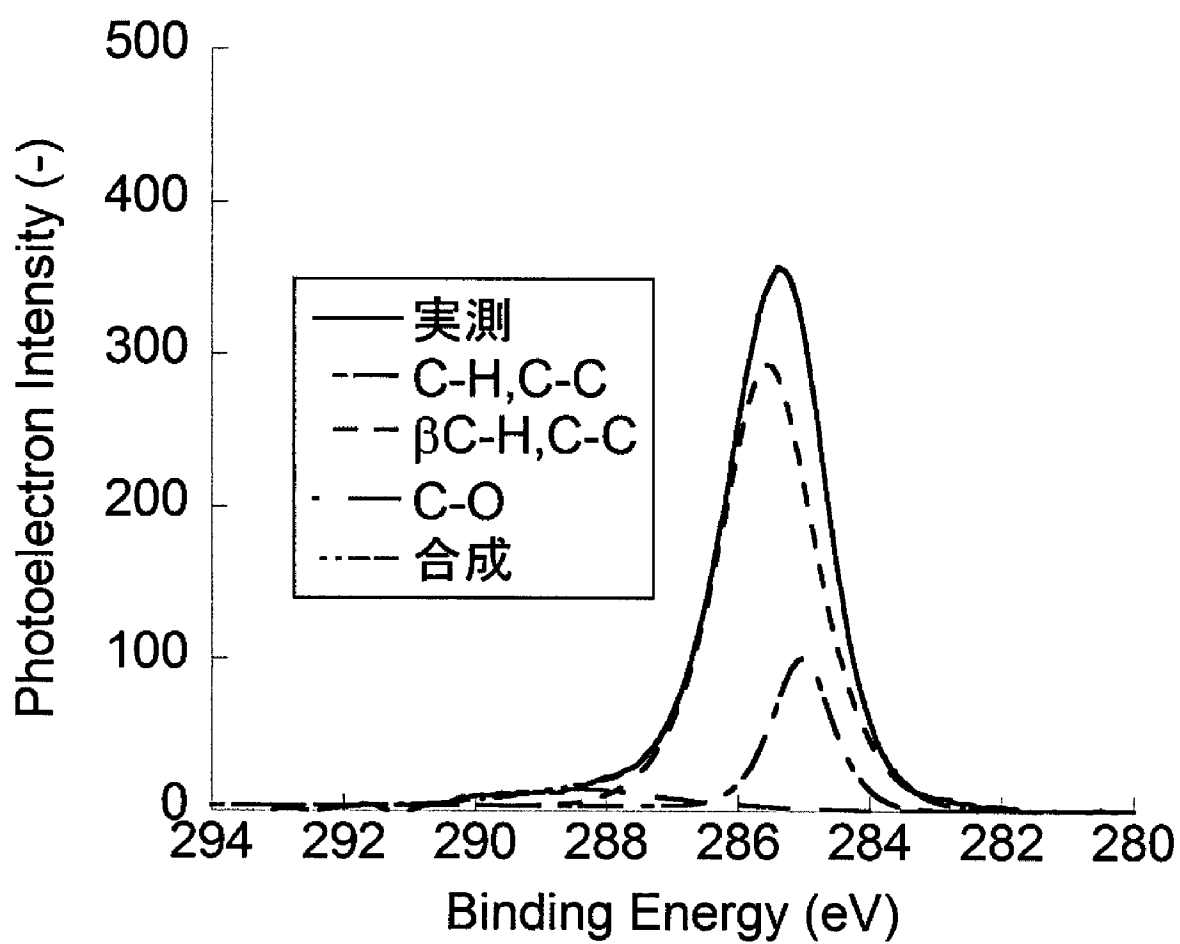
[図4]



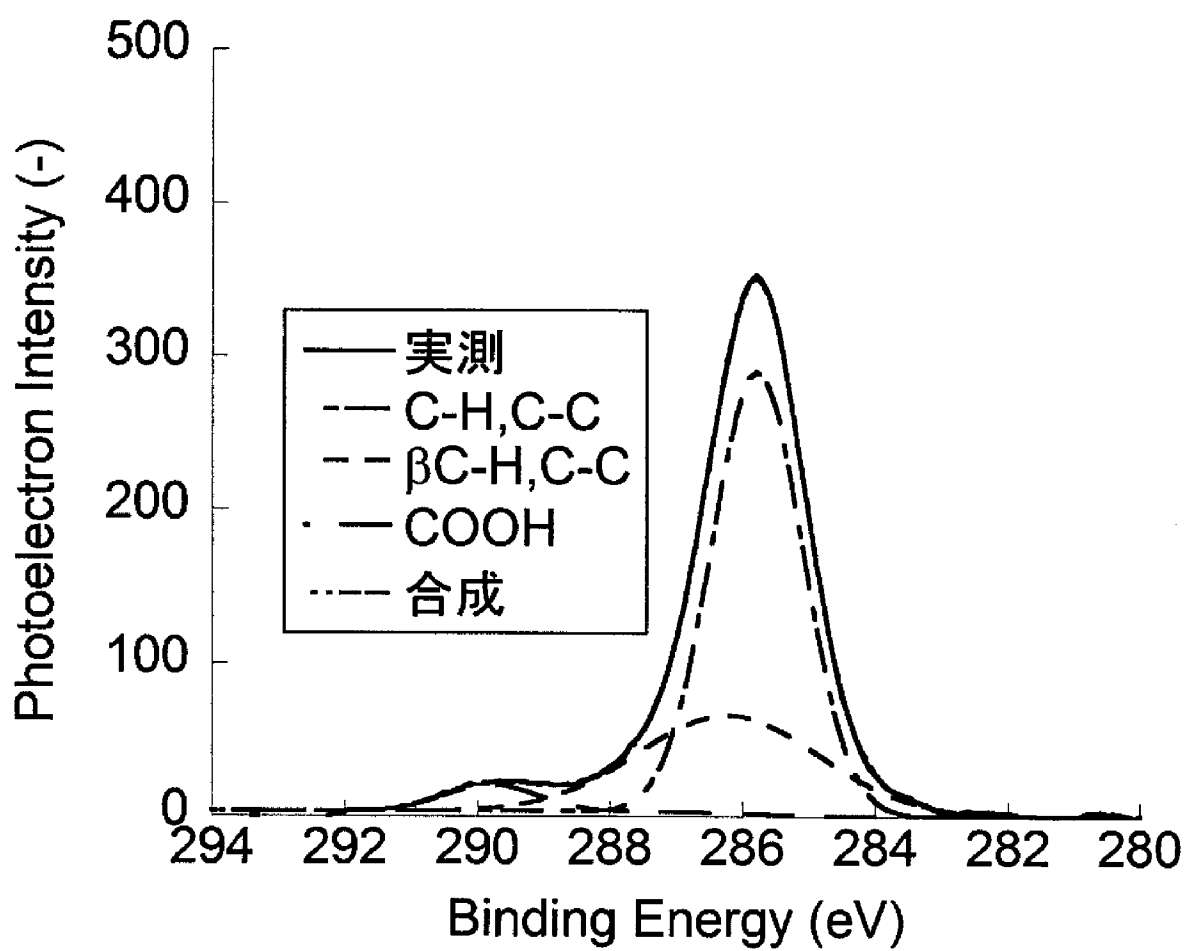
[図5]



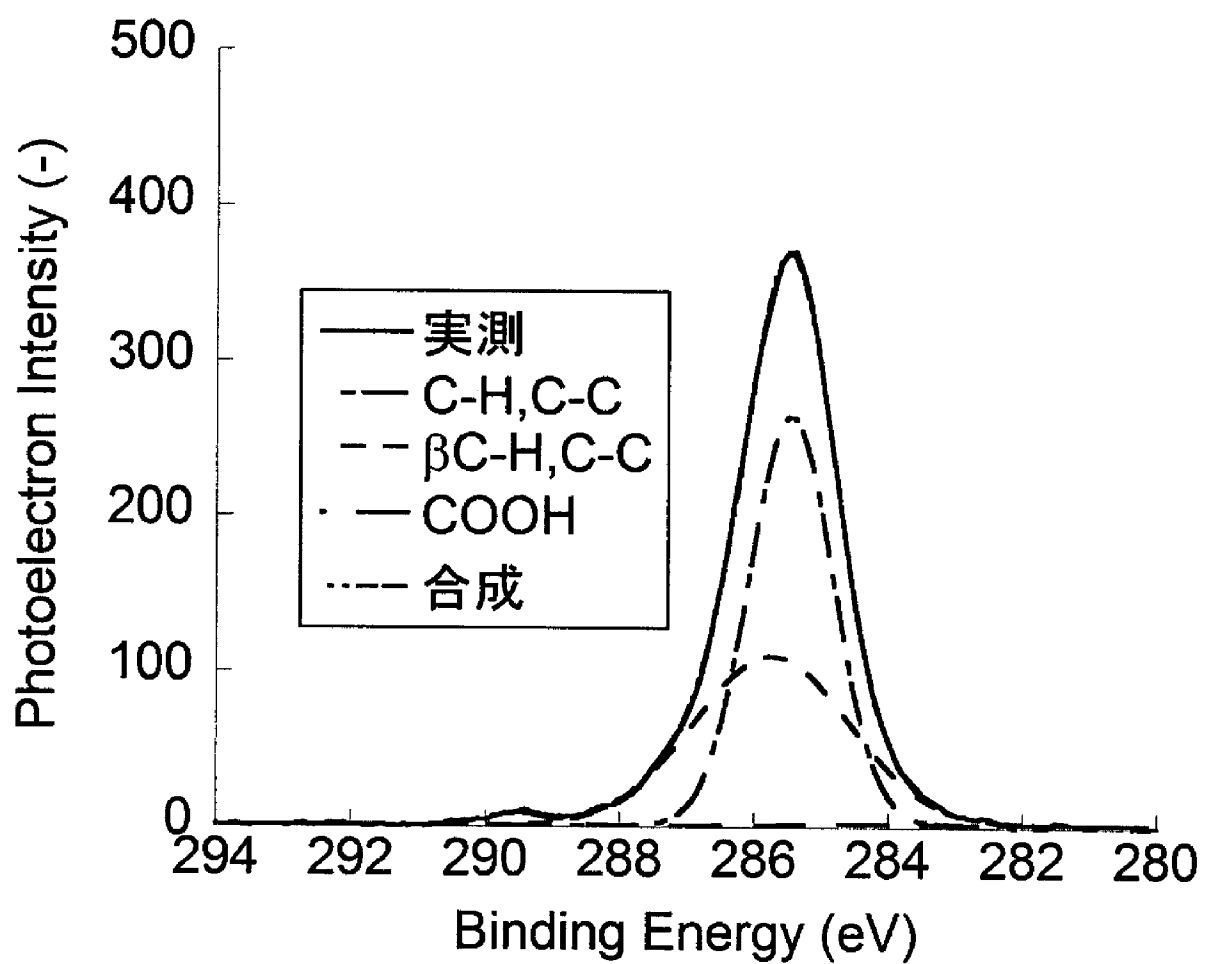
[図6A]



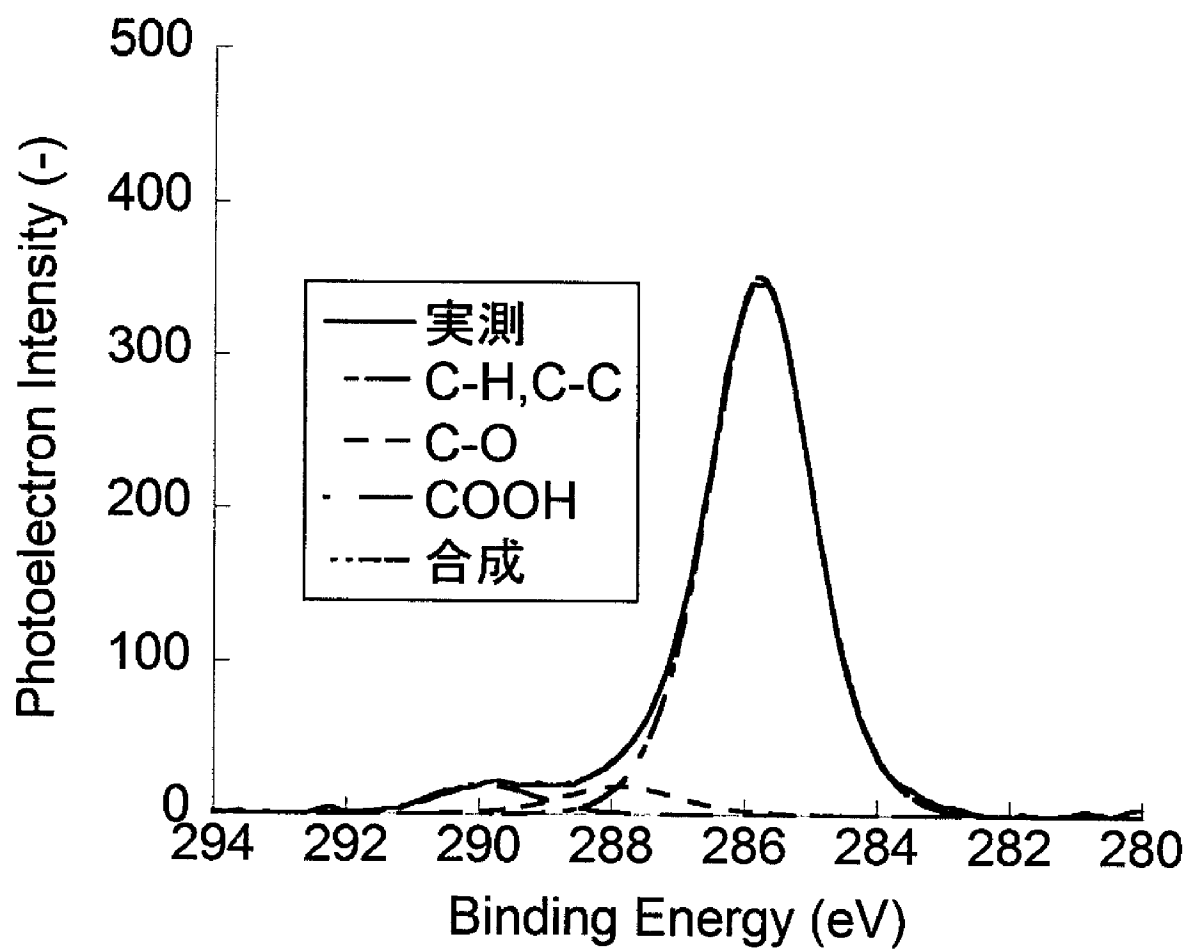
[図6B]



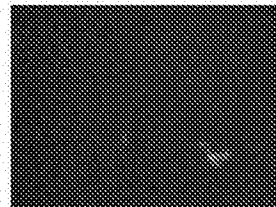
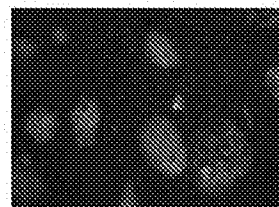
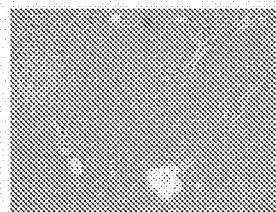
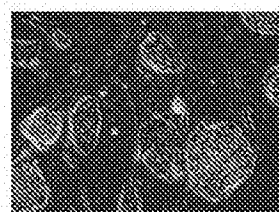
[図6C]



[図6D]

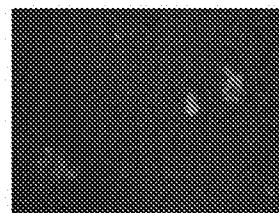
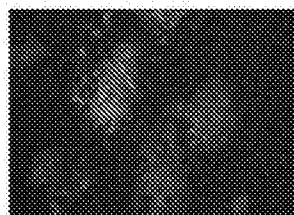
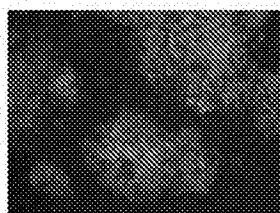
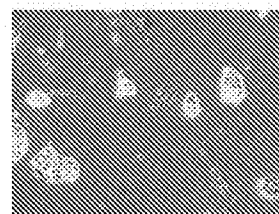
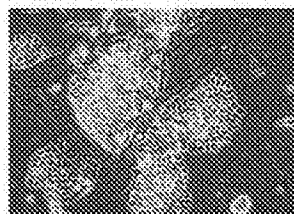
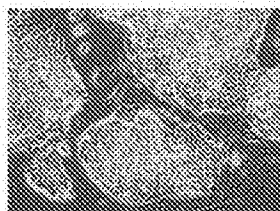


[図7]



miPSCs cultured  
on feeder layer

miPSCs cultured  
on non-treated dish  
(feeder- and gelatin-free)

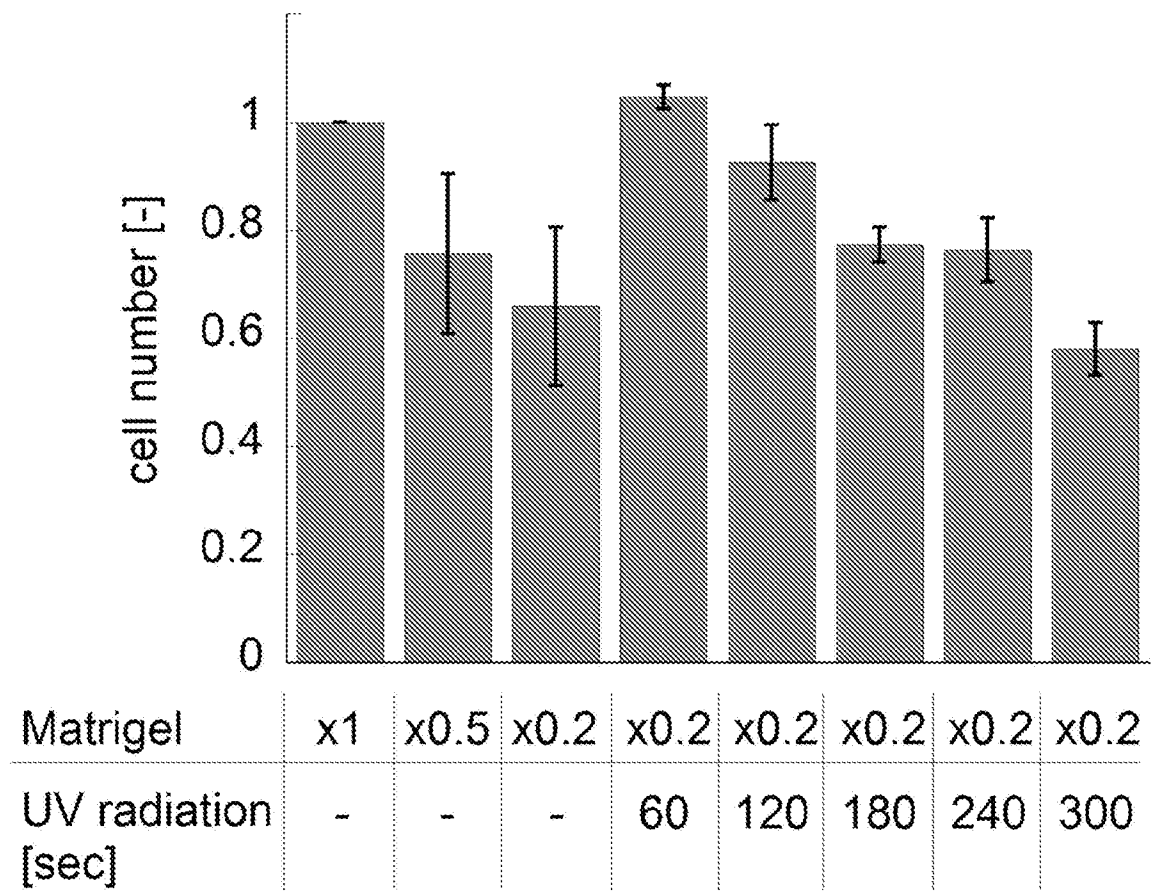


miPSCs cultured on  
ozone/UV (1min)-modified  
substrate  
(feeder- and gelatin-free)

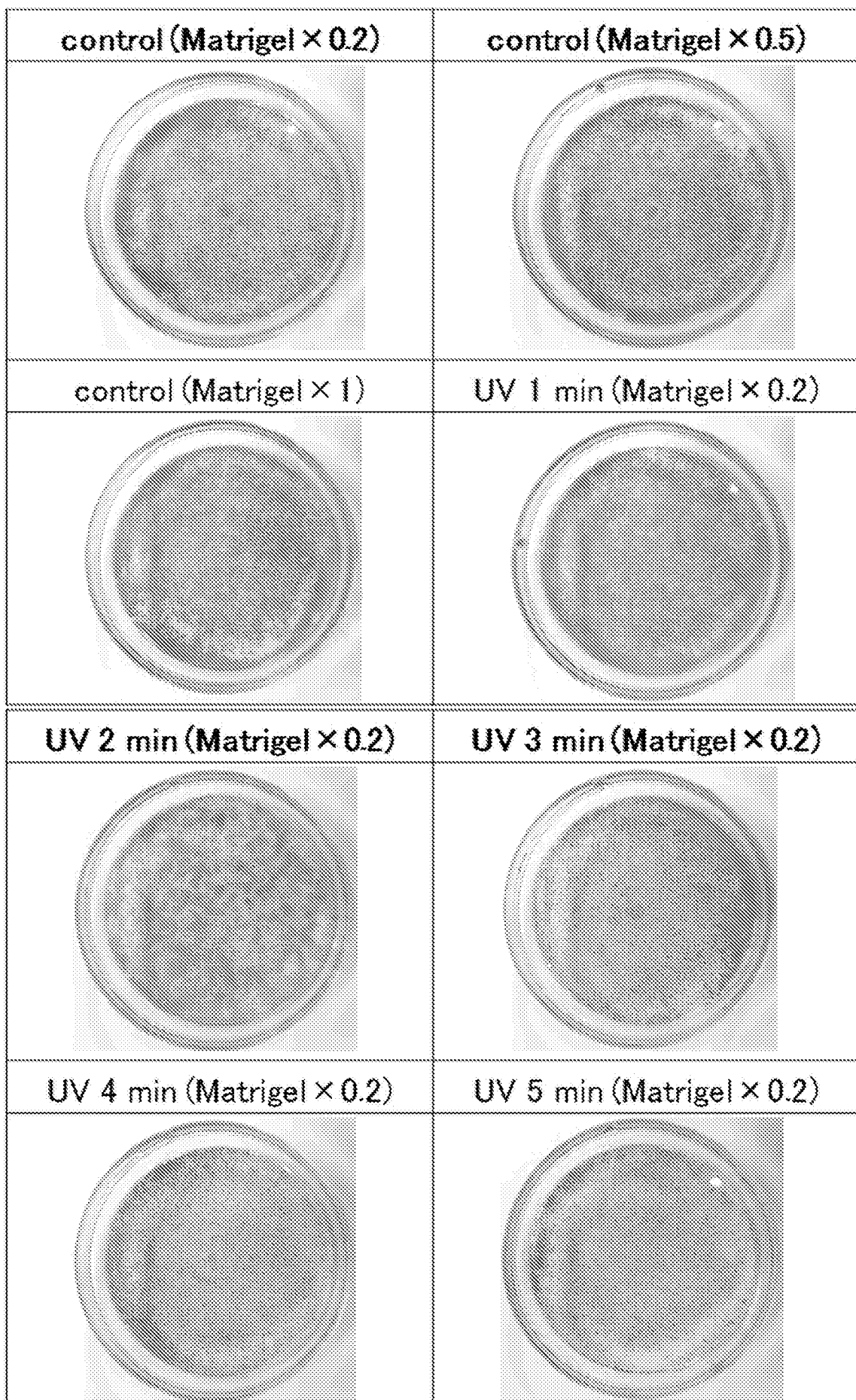
miPSCs cultured on  
ozone/UV (3min)-modified  
substrate  
(feeder- and gelatin-free)

miPSCs cultured on  
ozone/UV (10min)-modified  
substrate  
(feeder- and gelatin-free)

[図8]

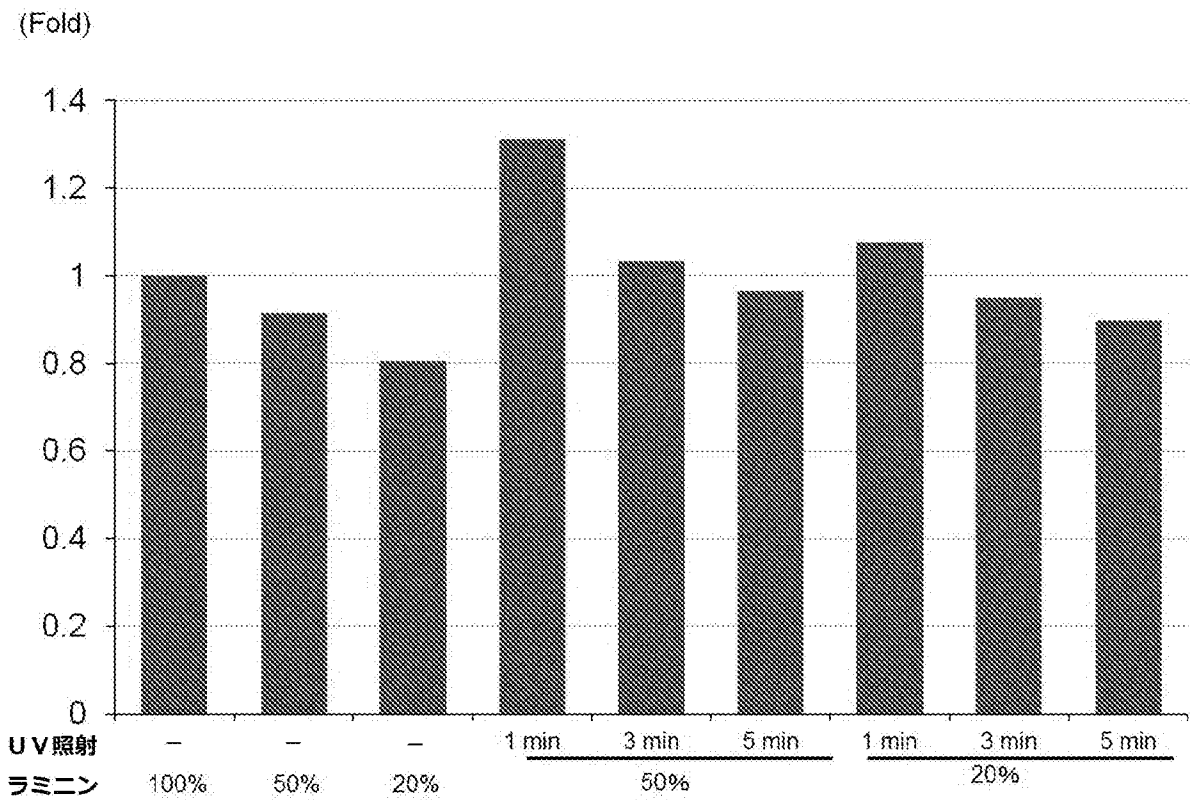


[図9]

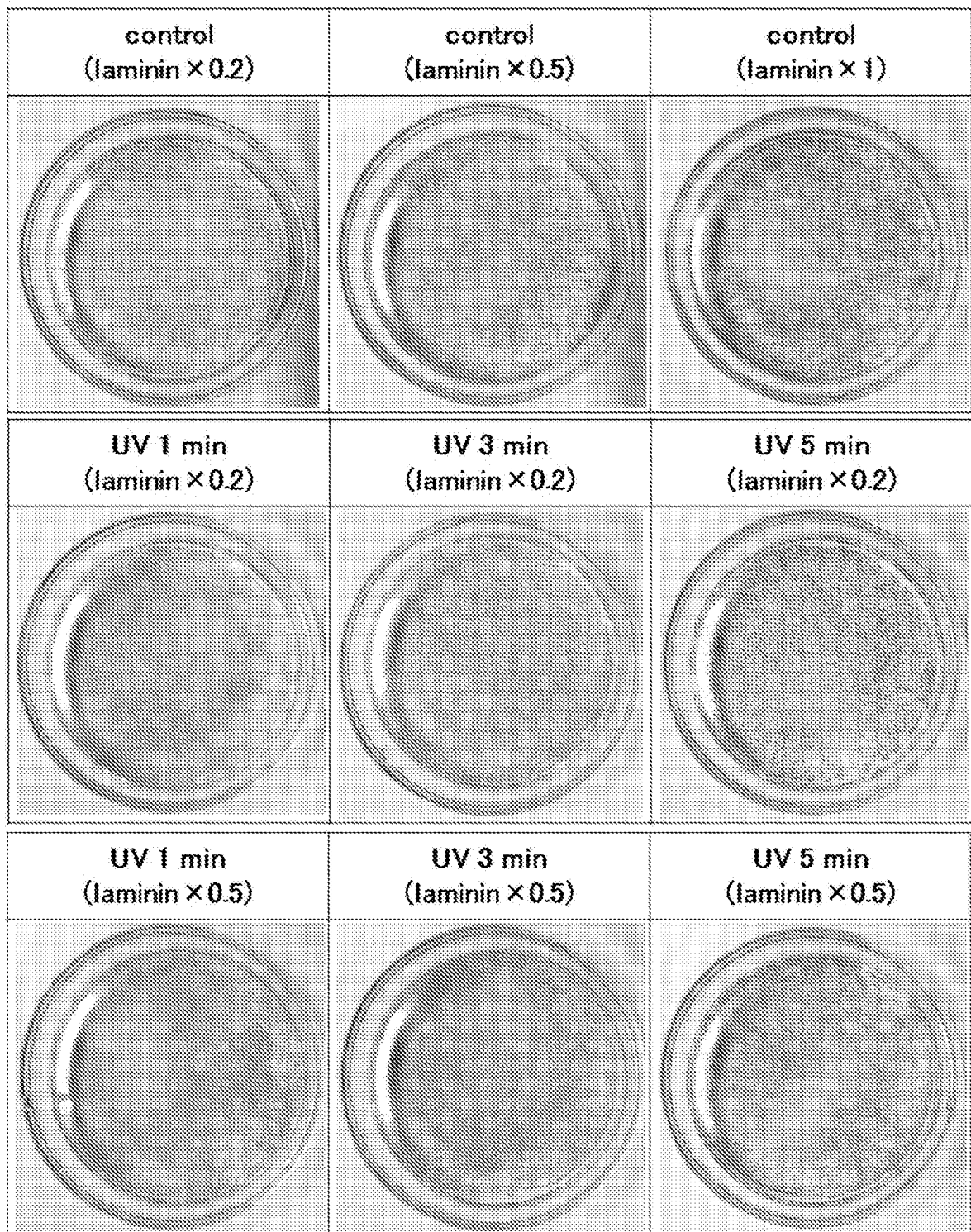


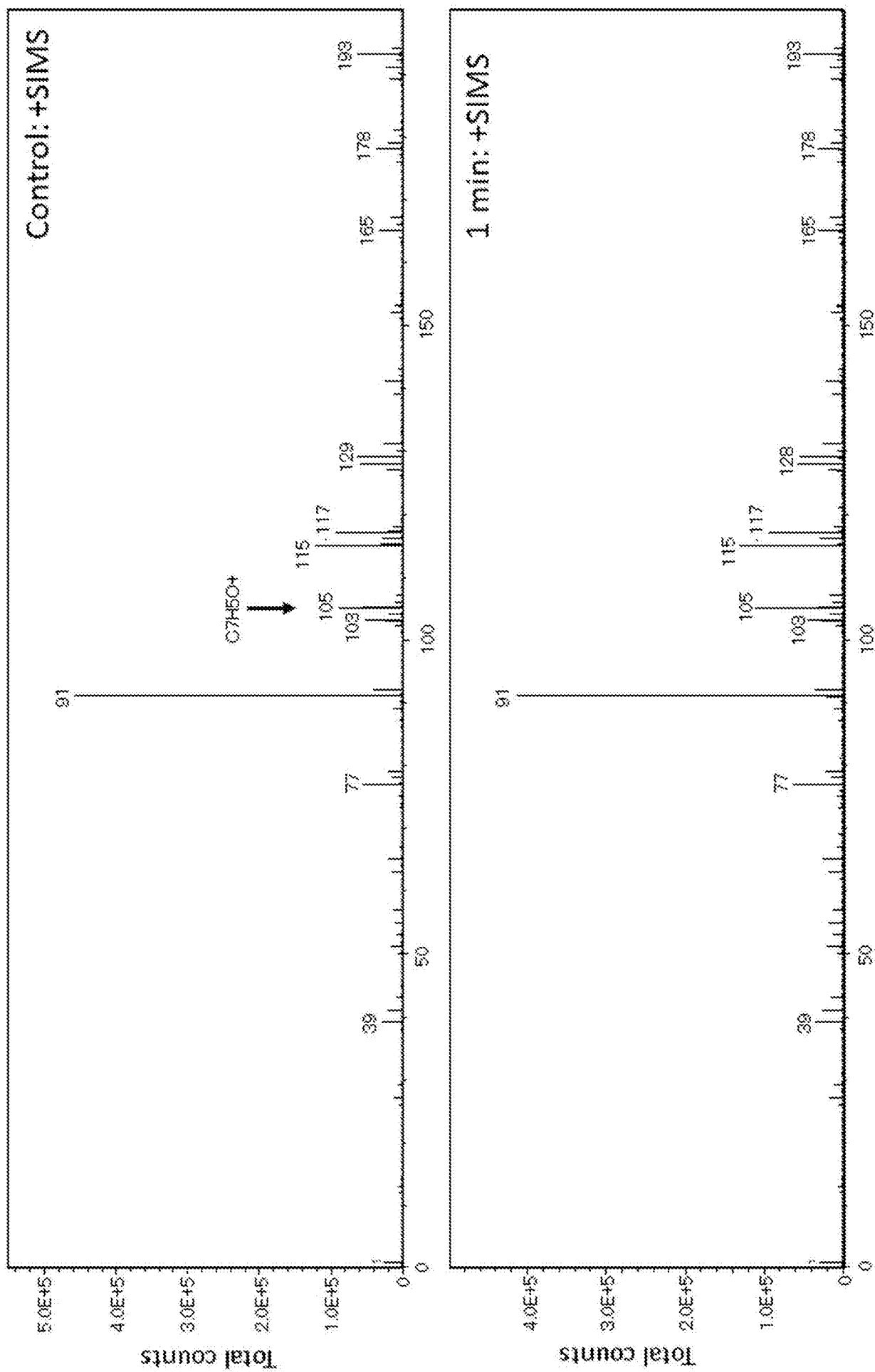
[図10]

LN511E8を用いたヒトiPS細胞(201B7)の増殖率

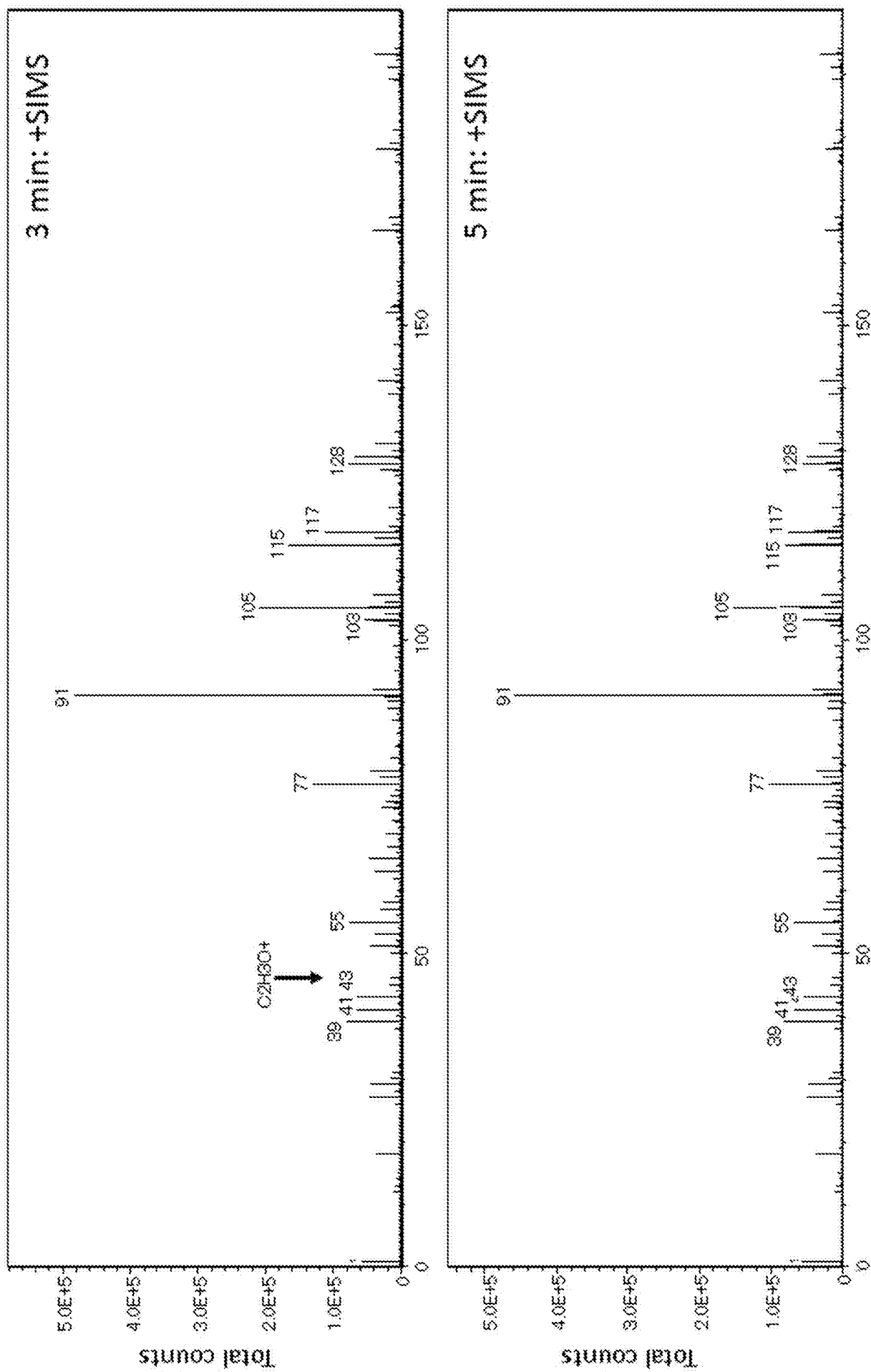


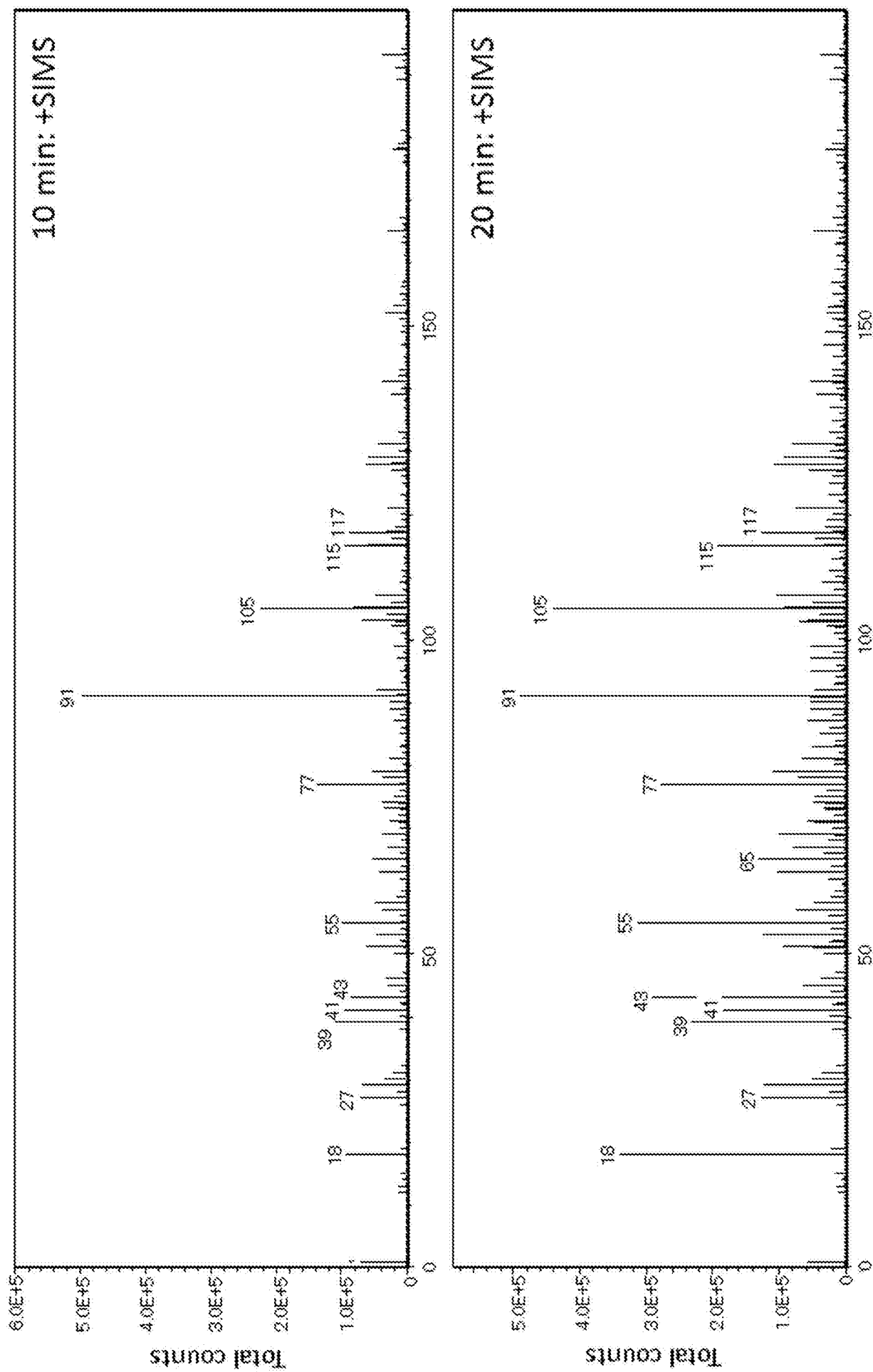
[図11]



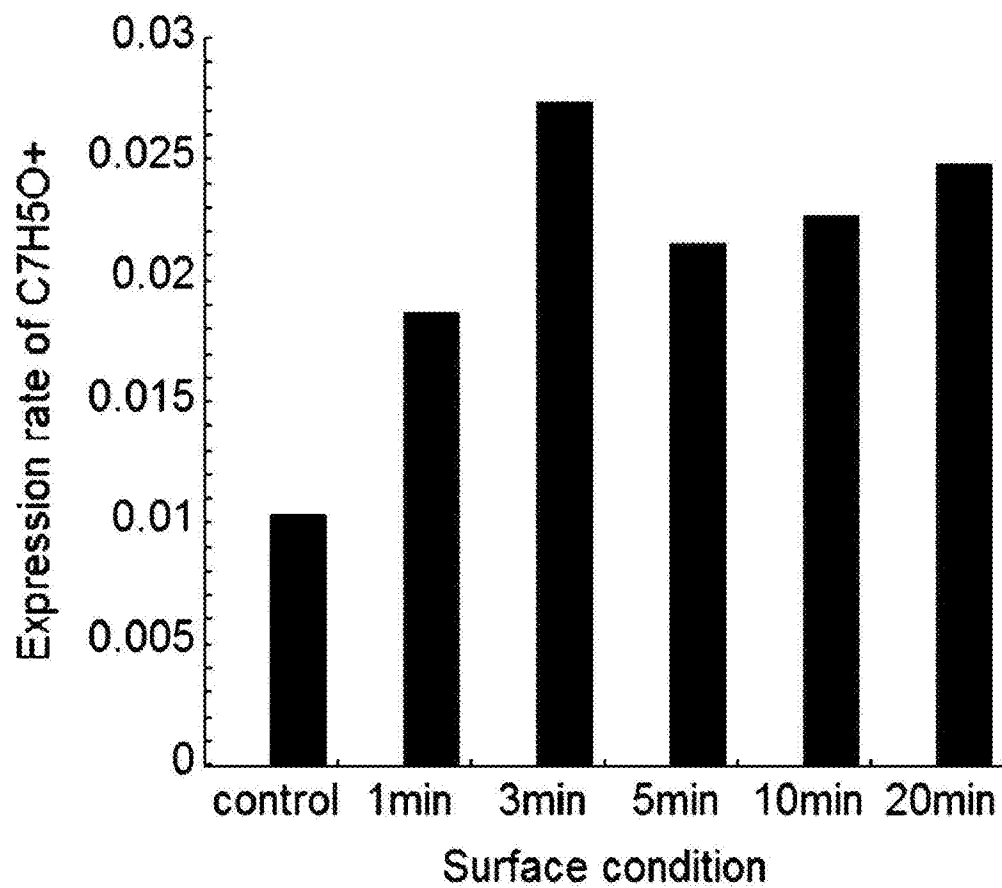
[ 12A]

[圖12B]

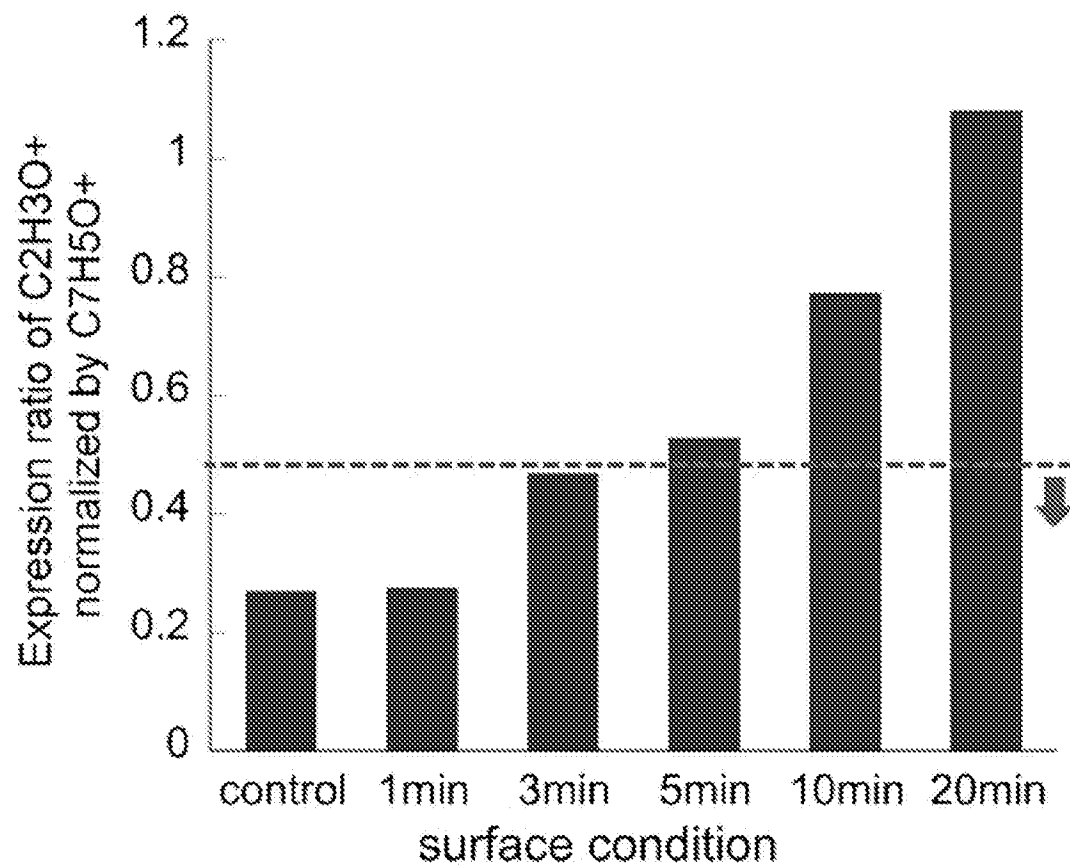


[ 12C]

[図13]



[図14]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/000981

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/10(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)

C12M1/00, C12N5/071, C12N5/10

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE, DWPI(Thomson Innovation)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*                 | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                         | Relevant to claim No.                       |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <u>X</u><br><u>Y</u><br>A | JP 2007-267673 A (Nitto Denko Corp.),<br>18 October 2007 (18.10.2007),<br>paragraphs [0013] to [0016]; examples 1 to 2<br>(Family: none)                   | <u>1-14, 23-24</u><br><u>24-30</u><br>15-22 |
| <u>X</u><br><u>Y</u><br>A | JP 63-152973 A (Kabushiki Kaisha Shinsozai<br>Sogo Kenkyusho),<br>25 June 1988 (25.06.1988),<br>example 1; table 1<br>& US 5023026 A<br>example 1; table 1 | <u>1-14, 23-24</u><br><u>24-30</u><br>15-22 |

☒ 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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"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  
12 May 2016 (12.05.16)

Date of mailing of the international search report  
24 May 2016 (24.05.16)

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/JP2016/000981

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                               | Relevant to claim No.       |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <u>Y</u><br><u>A</u> | JP 2009-017809 A (Nitto Denko Corp.),<br>29 January 2009 (29.01.2009),<br>claims 2, 8; examples<br>& US 2010/0273260 A1<br>claims 2, 8; examples<br>& WO 2009/008547 A1 & EP 2173857 A1<br>& CA 2686588 A & KR 10-2010-0049532 A | <u>24-30</u><br><u>1-23</u> |
| <u>Y</u><br><u>A</u> | JP 2004-254516 A (Olympus Corp.),<br>16 September 2004 (16.09.2004),<br>claims 1 to 3<br>(Family: none)                                                                                                                          | <u>24-30</u><br><u>1-23</u> |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/000981

### Subject to be covered by this search

With respect to claims 1-11, 13-16, and 18-30, the subject matter to be searched for was limited to that including a polystyrene resin among fluorine-free resins, for the following reasons.

It is not specifically supported by the description that a cell-supporting surface capable of generating  $C_7H_5O^+$  molecules with a TOF-SIMS was able to be produced even in cases when use was made of a substrate which comprised a fluorine-free resin as the main component and which was not a substrate comprising a polystyrene resin as the main component.

Even when taking account of the statements of the description and technical knowledge common in this technical field, it is not considered that a cell-supporting surface in which a fluorine-free resin that is not a polystyrene resin generates  $C_7H_5O^+$  molecules with a TOF-SIMS upon irradiation with UV in an atmosphere which has an elevated humidity and to which oxygen and/or ozone is being supplied is obtained as in the case of a polystyrene resin.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00, C12N5/071, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE, DWPI (Thomson Innovation)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー*           | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                               | 関連する<br>請求項の番号                              |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <u>X</u><br><u>Y</u><br>A | JP 2007-267673 A (日東電工株式会社)<br>2007.10.18, 段落13-16、実施例1-2<br>(ファミリーなし)          | <u>1-14, 23-24</u><br><u>24-30</u><br>15-22 |
| <u>X</u><br><u>Y</u><br>A | JP 63-152973 A (株式会社新素材総合研究所)<br>1988.06.25, 実施例1、表1<br>& US 5023026 A, 実施例1、表1 | <u>1-14, 23-24</u><br><u>24-30</u><br>15-22 |

☑ 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

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.2016

国際調査報告の発送日

24.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 英雄

4 B

4155

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                             |                      |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号       |
| <u>Y</u><br>A         | JP 2009-017809 A (日東電工株式会社)<br>2009.01.29, 請求項 2、8、実施例<br>& US 2010/0273260 A1, 請求項 2、8、実施例<br>& WO 2009/008547 A1 & EP 2173857 A1 & CA 2686588 A<br>& KR 10-2010-0049532 A | <u>24-30</u><br>1-23 |
| <u>Y</u><br>A         | JP 2004-254516 A (オリンパス株式会社)<br>2004.09.16, 請求項 1 - 3<br>(ファミリーなし)                                                                                                          | <u>24-30</u><br>1-23 |

調査対象について

請求項 1-11、13-16、18-30 について、以下の理由から調査対象を、非フッ素系樹脂のうちポリスチレン樹脂に限定した。

ポリスチレン樹脂を主成分とする基材以外の非フッ素系樹脂を主成分とする基材を用いても、TOF-SIMSで $C_7H_5O+$ 分子を生じる細胞担持面を製造できたことが本願明細書には具体的に裏付けられていない。そして、本願明細書の記載及び当該技術分野の技術常識を勘案しても、ポリスチレン樹脂以外の非フッ素系樹脂に対して、加湿条件下、酸素及び／又はオゾン供給雰囲気中でUVを照射することにより、TOF-SIMSで $C_7H_5O+$ 分子を生じる細胞担持面がポリスチレン樹脂の場合と同様に得られるとは認められない。