



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113166313 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980081707.0 森下加奈 松本润一

(22) 申请日 2019.12.13 (74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(30) 优先权数据 代理人 苏萌 侯婧
2018-233382 2018.12.13 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 (51) Int.Cl.
2021.06.09 C08F 20/56 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据 C12M 1/28 (2006.01)

PCT/JP2019/048865 2019.12.13 C12M 3/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据 C12N 1/02 (2006.01)

W02020/122225 JA 2020.06.18

(71) 申请人 国立研究开发法人产业技术综合研
究所
地址 日本东京
申请人 株式会社片冈制作所

(72) 发明人 须丸公雄 高木俊之 金森敏幸 权利要求书4页 说明书23页 附图9页

(54) 发明名称
细胞培养器具和细胞的处理方法

(57) 摘要
提供一种可剥离期望位置的细胞的细胞培养器具和使用该器具的细胞处理方法。本发明的细胞培养器具具备基板以及具有光溶解性和光热转换性的光反应层,所述光反应层层叠于所述基板,所述光反应层包含具有光溶解性和光热转换性的聚合物。

1. 一种细胞培养器具,具备基板以及具有光溶解性和光热转换性的光反应层,所述光反应层层叠于所述基板,所述光反应层包含具有光溶解性和光热转换性的聚合物。

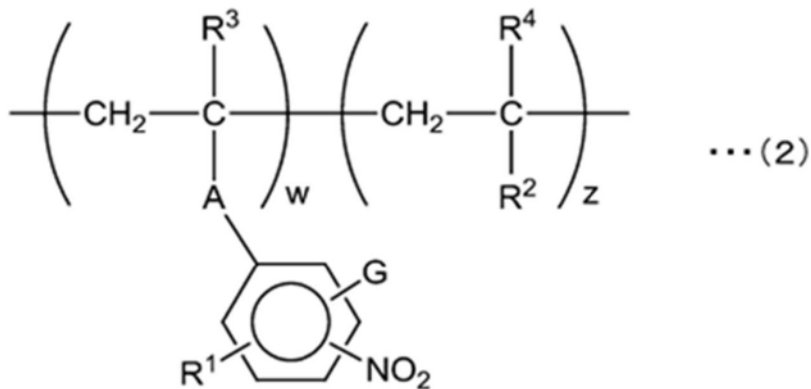
2. 根据权利要求1所述的细胞培养器具,其中所述光反应层具备具有光溶解性的光溶解层和具有光热转换性的光热转换层,所述光溶解层包含光溶解性聚合物,所述光热转换层包含光热转换性聚合物。

3. 根据权利要求2所述的细胞培养器具,其中所述光溶解性聚合物具有主链和侧链,所述侧链包含芳香环,所述芳香环包含被硝基取代的第1碳原子,和被醛基或下述化学式(1)表示的官能团取代的第2碳原子,

所述第1碳原子和所述第2碳原子在相同苯环内邻接
[化1]



4. 根据权利要求3所述的细胞培养器具,其中所述光溶解性聚合物包含下述化学式(2)表示的聚合物:
[化2]



在所述化学式(2)中,

A是单键或官能团,

R¹是醛基或所述化学式(1)表示的官能团,

R¹和NO₂分别键合至相邻的碳原子,

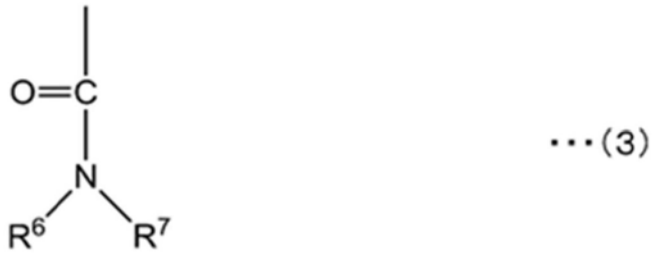
R²是选自氢原子、烷基、下述化学式(3)表示的官能团以及下述化学式(4)表示的官能团中的至少一种,

R³和R⁴可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,

G是可以与苯环的氢进行取代的3个以下的烷基,

w和z表示摩尔百分比,为0 < w ≤ 100, 0 ≤ z < 100,

[化3]



[化4]



在所述化学式(3)中,

R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

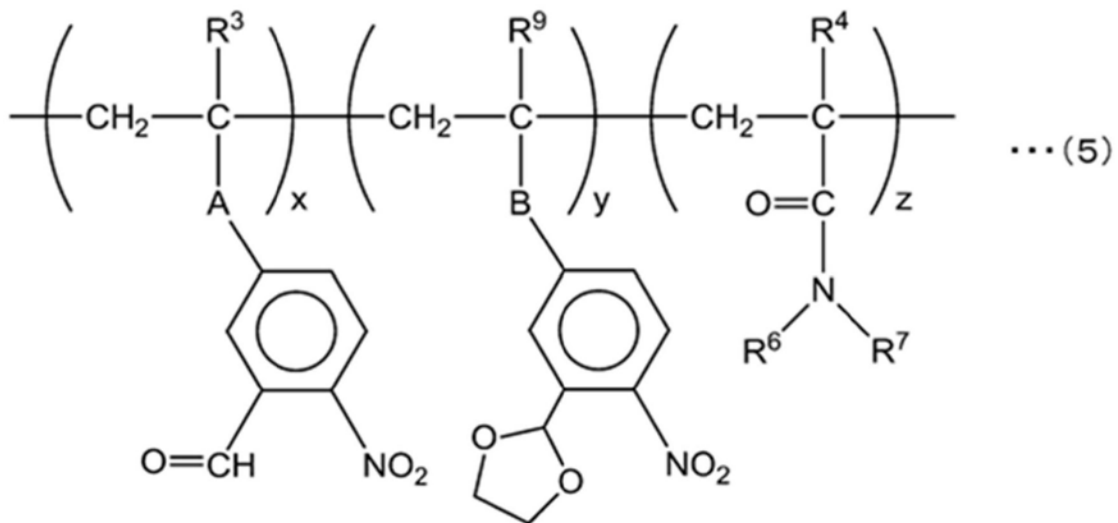
在所述化学式(4)中,

R^8 是烷基。

5. 根据权利要求3或4所述的细胞培养器具,其中

所述光溶解性聚合物包含下述化学式(5)表示的聚合物:

[化5]



在所述化学式(5)中,

A和B可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团,

R^3 、 R^4 和 R^9 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,

R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

x 、 y 和 z 表示摩尔百分比,为 $0 \leq x < 100$, $0 \leq y < 100$, $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

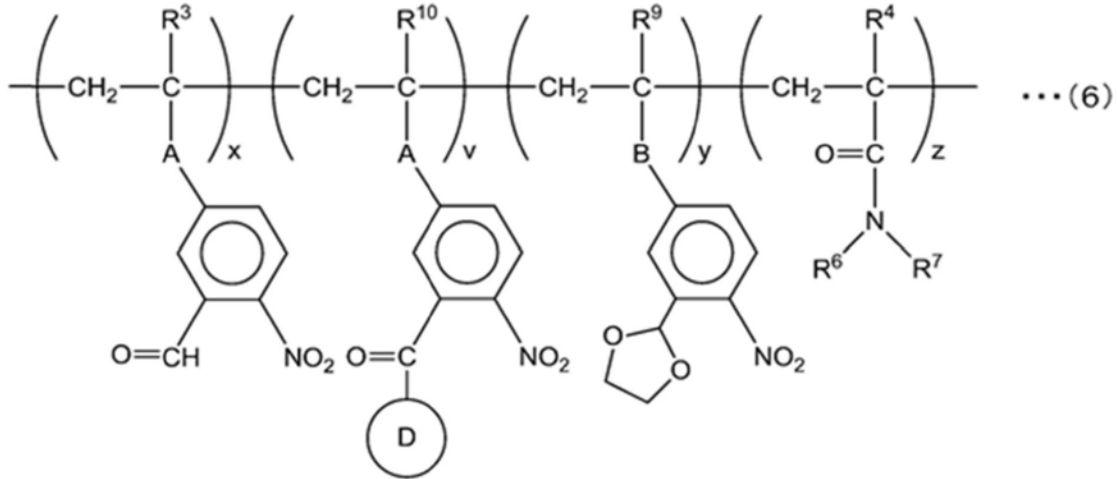
6. 根据权利要求2至5中任一项所述的细胞培养器具,其中

所述光热转换性聚合物包含主链和侧链,

所述侧链具有在350nm以上的波长中具有预定吸光度的发色团。

7. 根据权利要求6所述的细胞培养器具, 其中所述发色团包含偶氮苯骨架。

8. 根据权利要求1所述的细胞培养器具, 其中具有所述光溶解性和光热转换性的聚合物用下述化学式(6)表示:
[化6]



在所述化学式(6)中,

A和B可以相同, 也可以不同, 分别独立地为单键或官能团,

R^3 、 R^4 、 R^9 和 R^{10} 可以相同, 也可以不同, 分别独立地为氢原子或烷基,

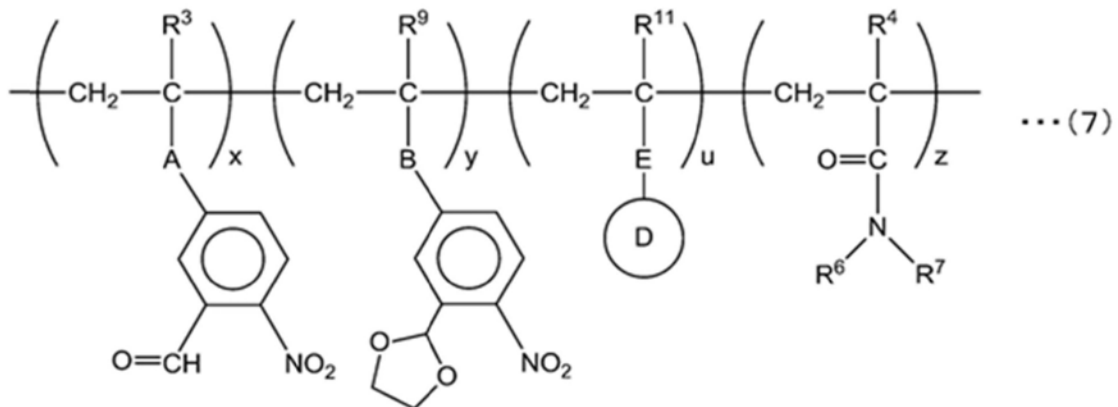
R^6 和 R^7 可以相同, 也可以不同, 分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

D为在350nm以上的波长中具有预定吸光度的发色团,

v 、 x 、 y 和 z 表示摩尔百分比, 为 $0 < v < 100$ 、 $0 \leq x < 100$ 、 $0 \leq y < 100$ 、 $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

9. 根据权利要求1所述的细胞培养器具, 其中

具有所述光溶解性和光热转换性的聚合物用下述化学式(7)表示:
[化7]



在所述化学式(7)中,

A、B和E可以相同, 也可以不同, 分别独立地为单键或官能团,

R^3 、 R^4 、 R^9 和 R^{11} 可以相同, 也可以不同, 分别独立地为氢原子或烷基,

R^6 和 R^7 可以相同, 也可以不同, 分别独立地为氢原子、烷基或芳香环。

D为在350nm以上的波长中具有预定吸光度的发色团，

u、x、y和z表示摩尔百分率，为 $0 < u < 100$ 、 $0 \leq x < 100$ 、 $0 \leq y < 100$ 、 $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的细胞培养器具，其具备与所述光反应层和所述基板连接的连接层，

所述连接层层叠于所述基板，

所述光反应层层叠于所述连接层。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的细胞培养器具，其中可在所述光反应层上培养细胞。

12. 一种细胞处理方法，包含：

培养步骤，在权利要求1至11中任一项所述的细胞培养器具中培养细胞；

第1照射步骤，向所述光反应层照射产生光溶解的第1光；以及

第2照射步骤，向所述光反应层照射产生光热转换的第2光。

13. 根据权利要求12所述的细胞处理方法，其中

在所述第1照射步骤中，向与所述细胞中的处理对象细胞对应的光反应层照射所述第1光，

在所述第2照射步骤中，向与所述细胞中的所述处理对象细胞和非处理对象细胞之间的边界对应的光反应层照射所述第2光。

14. 根据权利要求12或13所述的细胞处理方法，

在所述第2照射步骤中，使与照射所述第2光的光反应层对应的细胞死亡。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的细胞处理方法，其中

所述第2光的光照量比所述第1光的光照量多。

细胞培养器具和细胞的处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞培养器具和细胞的处理方法。

背景技术

[0002] 在回收培养皿等细胞培养器具中培养的附着性细胞时,在胰蛋白酶等蛋白酶和EDTA等螯合剂共存条件下,切断细胞和培养器具的粘附,剥离并回收游离的细胞(专利文献1)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:国际公开第2017/010100号

发明内容

[0006] 发明要解决的课题

[0007] 但是,使用蛋白酶的方法虽然可以回收培养器具整个表面的细胞,但无法限定蛋白酶的作用位置,因此无法剥离和回收期望位置的细胞。

[0008] 另外,在培养器具中培养细胞时,细胞之间粘附,形成片状等的细胞块。在该种情况下,使用蛋白酶的方法可以回收培养器具整个表面的细胞,但也无法限定蛋白酶的作用位置,因此无法回收期望位置的细胞。

[0009] 因此,本发明的目的是提供一种可剥离期望位置的细胞的细胞培养器具和使用该细胞培养器具的细胞的处理方法。

[0010] 解决课题的方法

[0011] 为达成上述目的,本发明的细胞培养器具(下文也称“培养器具”)具备基板和具有光溶解性和光热转换性的光反应层,

[0012] 所述光反应层层叠于所述基板,

[0013] 所述光反应层包含具有光溶解性和光热转换性的聚合物。

[0014] 本发明的细胞的处理方法(下文也称为“处理方法”)包括培养步骤,在所述本发明的细胞培养器具中培养细胞,

[0015] 第1照射步骤,向所述光反应层照射产生光溶解的第1光,以及第2照射步骤,向所述光反应层照射产生光热转换的第2光。

[0016] 发明的效果

[0017] 通过本发明可剥离期望位置的细胞。

附图说明

[0018] [图1]图1是示出实施方式1的培养器具结构的一例的示意图,(A)是实施方式1的培养器具的示意立体图,(B)是从(A)中的I-I方向观察的实施方式1的培养器具的示意截面图,(C)是在培养器具100中培养有细胞的状态下,从(A)中的I-I方向观察的培养器具

100的示意截面图。

[0019] [图2]图2是示出实施方式1的细胞处理方法的一例的示意图。

[0020] [图3]图3是示出实施方式2的培养器具构成的一例的示意图，(A)是实施方式2的培养器具的示意立体图，(B)是从(A)中的II—II方向观察的实施方式2的培养器具的示意截面图，(C)是在培养器具200中培养有细胞的状态下，从(A)中的II—II方向观察的培养器具200的示意截面图。

[0021] [图4]图4是示出实施方式2的细胞处理方法的一例的示意图。

[0022] [图5]图5示出实施例1中作为处理对象的细胞区域和处理后的结果，(A)示出培养器具中作为处理对象的细胞的区域，(B)是示出通过处理方法处理后的培养器具的结果的照片。

[0023] [图6]图6示出实施例2中作为处理对象的细胞区域和处理后的结果，(A)示出培养器具中作为处理对象的细胞的区域，(B)是示出通过处理方法处理后的培养器具的结果的照片。

[0024] [图7]图7示出实施例3中作为处理对象的细胞区域和处理后的结果，(A)示出培养器具中作为处理对象的细胞的区域，(B)是示出通过处理方法处理后的培养器具的结果的照片。

[0025] [图8]图8示出实施例3中作为处理对象的细胞区域和处理后的结果，(A)示出培养器具中作为处理对象的细胞的区域，(B)是示出通过处理方法处理后的培养器具的结果的照片。

[0026] [图9]图9示出实施例4中作为处理对象的细胞区域和处理后的结果，(A)示出培养器具中作为处理对象的细胞的区域，(B)是示出通过处理方法处理后的培养器具的结果的照片。

具体实施方式

[0027] 在本发明中，“细胞”例如是指分离的细胞，由细胞构成的细胞块、组织或脏器。所述细胞例如可以是培养细胞，也可以是从生物体分离的细胞。另外，所述细胞块、组织或脏器例如可以是由所述细胞制造的细胞块、细胞层、组织或脏器，也可以是从生物体分离的细胞块、组织或脏器。

[0028] 在本发明中，“细胞的处理”例如是指细胞的剥离，细胞的回收，去除不需要的细胞，以及保持或维持必要的细胞中的任一种。

[0029] 下文参照附图，对本发明的细胞培养器具和细胞的处理方法进行详细说明。但是，本发明不限于以下的说明。另外，在下文的图1至图9中，有对相同部分付与相同符号，并省略其说明的情况。并且，在附图中，有为了方便说明而适当简化示出各部分的结构的情况，并有各部分的尺寸比等与实际不同而示意性示出的情况。另外，各实施方式如无特殊说明，可互相引用其说明。

[0030] (实施方式1)

[0031] 本实施方式是细胞培养器具和细胞的处理方法的一例。图1是示出实施方式1的培养器具100结构的示意图，(A)是培养器具100的示意立体图，(B)是从(A)中的I—I方向观察的培养器具100的示意截面图，(C)是在培养器具100中培养有细胞的状态下，从(A)中的I—I

I方向观察的培养器具100的示意截面图。如图1(A)和(B)所示,培养器具100具有容器11和光反应层12。容器11具有圆形基板11a和包围基板11a外周的侧壁11b。光反应层12包含具有光溶解性和光热转换性的聚合物(下文也称为“光反应性聚合物”)。光反应层12层叠于基板11a上。并且,如图1(C)所示,在培养器具100中,细胞C在光反应层12上培养,即,在被光反应层12和侧壁11b包围的区域培养。如图1(C)所示,细胞C可以与光反应层12接触,也可以介由其他层等与光反应层12接触。另外,在图1(C)中,省略培养基(下同)。

[0032] 容器11可培养所述细胞。在容器11中,基板11a和侧壁11b包围的空间是可培养所述细胞的区域(细胞培养区域)。容器11可举例细胞培养容器,作为具体例,可举例培养皿、培养板、烧瓶(细胞培养烧瓶)等。容器11的大小、形状、容积、材质、粘附处理的有无等可根据在培养器具100中培养的细胞的种类和数量适当决定。在培养器具100中,容器11具有侧壁11b,但侧壁11b是任意结构,可有可无。没有侧壁11b的容器11例如可举例所述培养板,标本等。基板11a可以是平面的,也可以具有凹凸。

[0033] 容器11及构成容器11的基板11a和侧壁11b的材料(材质)可以相同,也可以不同。所述材料例如可使用可用于细胞培养容器的材料,优选具有透光性的材料。所述材料例如可举例聚苯乙烯、聚甲基戊烯、聚碳酸酯、环烯烃聚合体等塑料,玻璃,石英,硅酮树脂,纤维素类材料等。

[0034] 容器11具有1个所述细胞培养区域,也可以具有多个。在后者的情况下,容器11例如可以具有多个孔。另外,在后者的情况下,可以在多个细胞培养区域中,任意一个区域形成有光反应层12,也可以多个区域中形成有光反应层12,也可以全部形成有光反应层12。即,在容器11的多个孔中,可以任1个、2个以上或全部的孔中形成有光反应层12。

[0035] 在本实施方式中,光反应层12层叠于基板11a上的整个表面,但也可以层叠于一部分。在光反应层12层叠于基板11a的一部分时,其大小和形状可设定为期望的大小和形状。光反应层12例如可以形成为与要剥离的细胞的大小和形状相对应。

[0036] 在本实施方式中,容器11可以包括盖。所述盖例如可装卸地覆盖容器11的上表面,所述盖例如以与基板11a相对的方式配置。所述盖例如可举例所述细胞培养容器的盖、罩(cap)等。

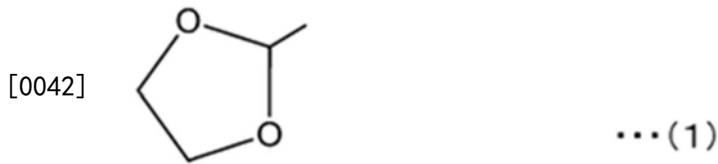
[0037] 光反应层12如上所述,包含所述光反应性聚合物。所述光反应性聚合物分散于光反应层12的一部分或全部,但优选分散于全部。光反应层12例如可包含具有光热转换性的聚合物和光溶解性聚合物作为具有光溶解性和光热转换性的聚合物,也可以包含具有光溶解性和光热转换性两种特性的聚合物。下文对各聚合物进行说明。

[0038] (1) 光溶解性聚合物

[0039] 所述光溶解性聚合物例如是溶剂溶解性通过光照而变化的聚合物,例如是通过光照,对水性溶剂(例如水、培养基等)的溶解性显著变化的聚合物。因此,光反应层12包含所述光溶解性聚合物时,如图1(C)所示,在光反应层12上培养细胞C时,通过光照使光反应层12溶解在溶剂中,可以解除细胞C对基板11a的间接的固定(粘附)。

[0040] 所述光溶解性聚合物例可举例这样的聚合物,其具有主链和侧链,所述侧链包含芳香环,所述芳香环包含被硝基取代的第1碳原子和被醛基或下述化学式(1)表示的官能团取代的第2碳原子,所述第1碳原子和所述第2碳原子在同一苯环内相邻。通过使用上述聚合物,可通过所述光照使对水性溶剂的溶解性显著变化,可适宜地表达光溶解性。

[0041] [化1]

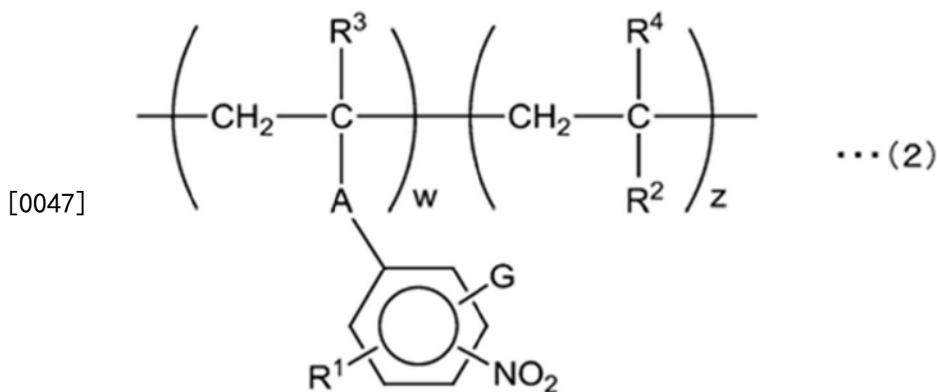


[0043] 所述主链例如可称为构成聚合物的骨架。所述构成聚合物的骨架例如可举例丙烯酸酰胺类聚合物等丙烯酸类聚合物,聚苯乙烯类聚合物,聚烯烃类聚合物,聚乙酸乙烯酯或聚氯乙烯,聚烯烃类聚合物,聚碳酸酯类聚合物,环氧类聚合物等。

[0044] 在本发明中,所述芳香环例如可以是芳香烃,也可以是杂芳族化合物。所述芳香环例如可举例苯环,萘环,蒽环,并四苯环等。所述芳香环例如直接或间接地键合至所述主链(后述A)。在所述直接地键合中,所述芳香环以单键与所述主链直接键合。所述间接地键合例如可以是经由酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基等键合,也可以经由具备酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基的其他官能团等键合。

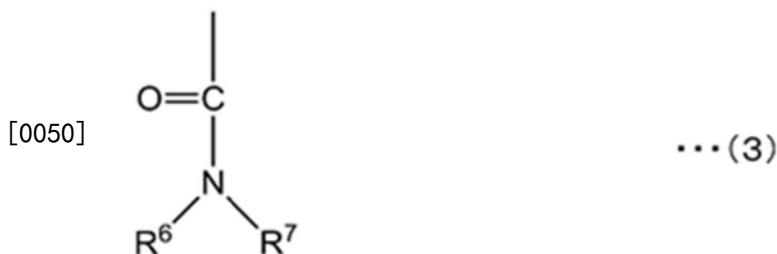
[0045] 所述光溶解性聚合物优选包含下述化学式(2)表示的聚合物。

[0046] [化2]



[0048] 在所述化学式(2)中,A是单键或官能团, R^1 是醛基或所述化学式(1)表示的官能团, R^1 和 NO_2 分别键合至相邻的碳原子, R^2 为选自氢原子、烷基、下述化学式(3)表示的官能团及下述化学式(4)表示的官能团中的至少1种, R^3 和 R^4 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,G是可以与苯环的氢发生取代的3个以下的烷基,w和z表示摩尔百分比,为 $0 < w \leq 100, 0 \leq z < 100$ 。

[0049] [化3]



[0051] [化4]



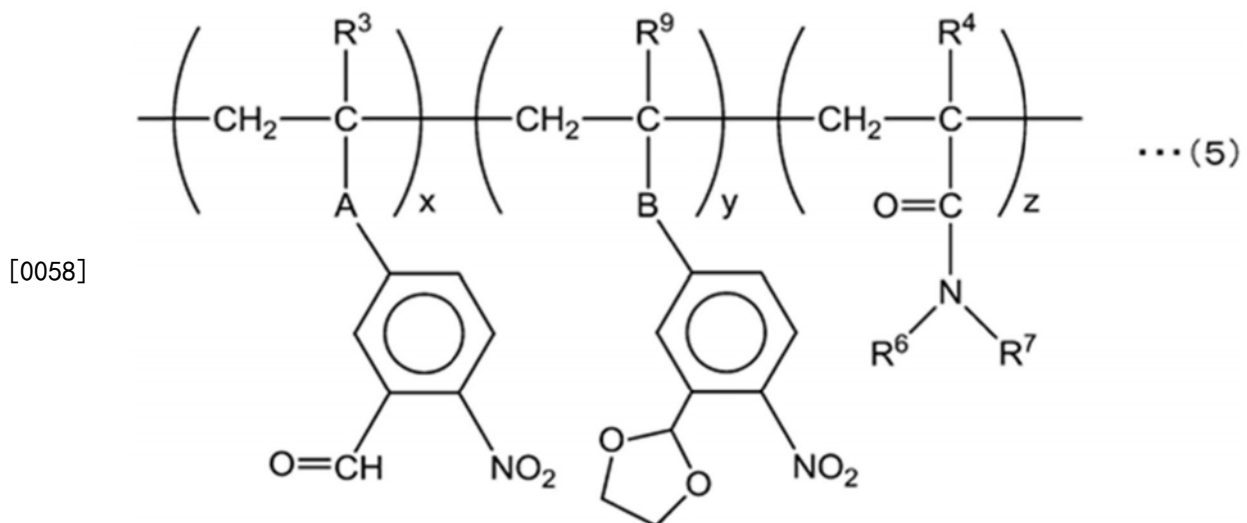
[0053] 另外,在所述化学式(3)中, R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环。在所述化学式(4)中, R^8 是烷基。

[0054] 在本发明中,所述烷基例如是包含1~6个碳原子的直链、支链或环状的烷基,作为具体例,为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、仲丁基、异丁基、戊基、新戊基、异戊基、仲戊基、叔戊基、环戊基、或己基。

[0055] 连结所述主链和苯环的A的结构没有特殊限制,例如可举例单键,或具有酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酸酯键,氨基甲酸酯键或亚烷基的官能团等。即,所述主链和苯环可以是以单键直接键合,也可以经由酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酸酯键,氨基甲酸酯键或亚烷基键合,也可以经由具备酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酸酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基的其他官能团键合。

[0056] 所述光溶解性聚合物更优选包括下述化学式(5)表示的聚合物。在下述化学式(5)中,各单体可以随机聚合,也可以有规律地聚合。

[0057] [化5]



[0059] 在所述化学式(5)中,A和B可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团, R^3 、 R^4 、 R^9 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基, R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环, x 、 y 、 z 表示摩尔百分比,为 $0 \leq x < 100$, $0 \leq y < 100$, $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0060] 在 R^6 和 R^7 是烷基时, R^6 和 R^7 优选异丙基或叔丁基。

[0061] x 、 y 例如从可更高效处理细胞的角度,优选满足 $x > y$ 。另外, x 、 y 、 z 优选 $x/(x+y+z)$ 在0.04以上。

[0062] 所述化学式(2)或(5)表示的聚合物例如可举例后述化学式(11)或(12)的聚合物。

[0063] 连结所述主链和苯环的A和B的结构可援用连结所述主链和苯环的A的结构的说明。由A连结的侧链例如可通过水解由B连结的侧链的缩醛基来生成。因此,优选连结所述主链和苯环的A和B的结构相同。

[0064] 所述光溶解性聚合物的制造方法例如可参照国际公开第2017/013226号的说明,可作为本说明书的一部分进行援用。

[0065] (2) 光热转换性聚合物

[0066] 所述光热转换性聚合物是通过光照产生热的聚合物。因此,光反应层12包含所述光热转换性聚合物时,如图1(C)所示,在光反应层12上培养细胞C时,通过光照在光反应层12中产生热,由此,与被光照的光反应层12邻接的细胞C,即存在于光照部正上方的细胞C死亡。由此,可解除经由死亡的细胞C间接地粘附着的细胞C间的固定(粘附)。

[0067] 所述光热转换性聚合物例如是包含吸收照射光的波长的发色团的聚合物。所述光热转换性聚合物例如包含主链和侧链,所述侧链具有所述发色团。所述发色团例如包含具有偶氮苯骨架的化合物或其衍生物,二芳基乙烯,螺吡喃,螺噁嗪,俘精酸酐,无色染料,靛蓝,类胡萝卜素(胡萝卜素等),黄酮类化合物(花青素等),醌型(蒽醌等)等有机化合物的衍生物。

[0068] 所述主链例如也可以称为构成聚合物的骨架。构成所述聚合物的骨架例如可举例丙烯酰胺类聚合物等丙烯酸类聚合物,聚苯乙烯类聚合物,聚烯烃类聚合物,聚乙酸乙烯酯或聚氯乙烯、聚烯烃类聚合物,聚碳酸酯类聚合物,环氧类聚合物等。

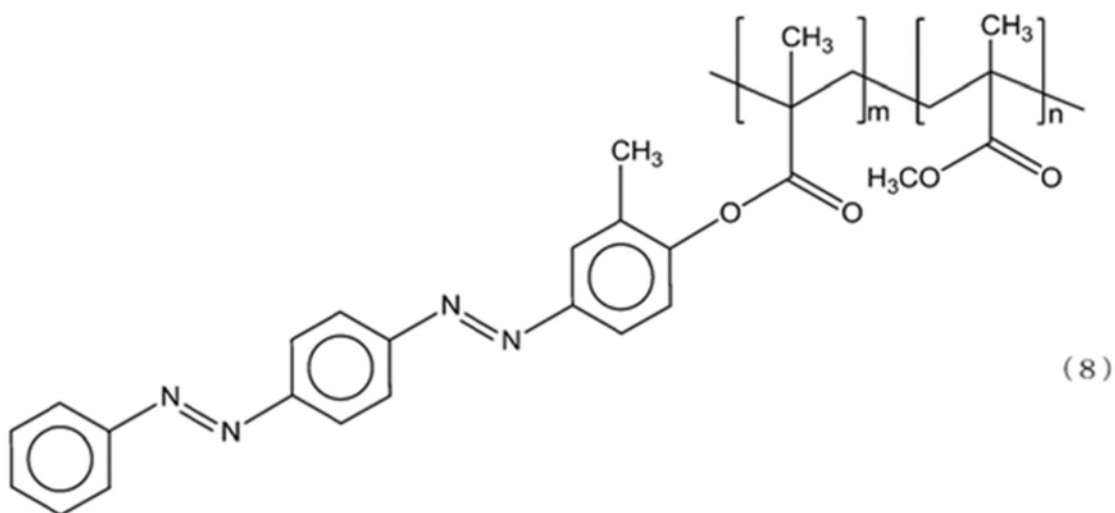
[0069] 所述侧链优选具备在350nm以上的波长中,具有预定吸光度的发色团。所述预定吸光度例如吸光度在0.01以上,优选0.1以上。所述侧链例如优选在350nm以上、1300nm以下的范围内,吸光度在0.01以上,优选0.1以上。所述吸光度可使用吸光光度计测定。所述具有预定吸光度的发色团可举例偶氮类(例如具有偶氮苯骨架的色素)、荧光素类、无色染料、酚色素、多环芳香族类、靛类等焦油色素类,具有类胡萝卜素、黄酮类化合物、卟啉类、花青素类、茜素类、藻胆色素类、醌类的天然色素类似骨架的色素类等。作为具体例,所述具有预定吸光度的发色团例如可举例分散黄7,分散橙3,4-(4-硝基苯基偶氮)酚等。

[0070] 所述发色团例如直接或间接地键合至所述主链。在所述直接地键合中,所述芳香环以单键直接与所述主链键合。所述间接地键合例如可以是经由酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酸酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基等键合,也可以经由具备酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酸酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基的其他官能团等键合。

[0071] 作为具体例,所述光热转换性聚合物例如可举例下述化学式(8)~(10)表示的聚合物。

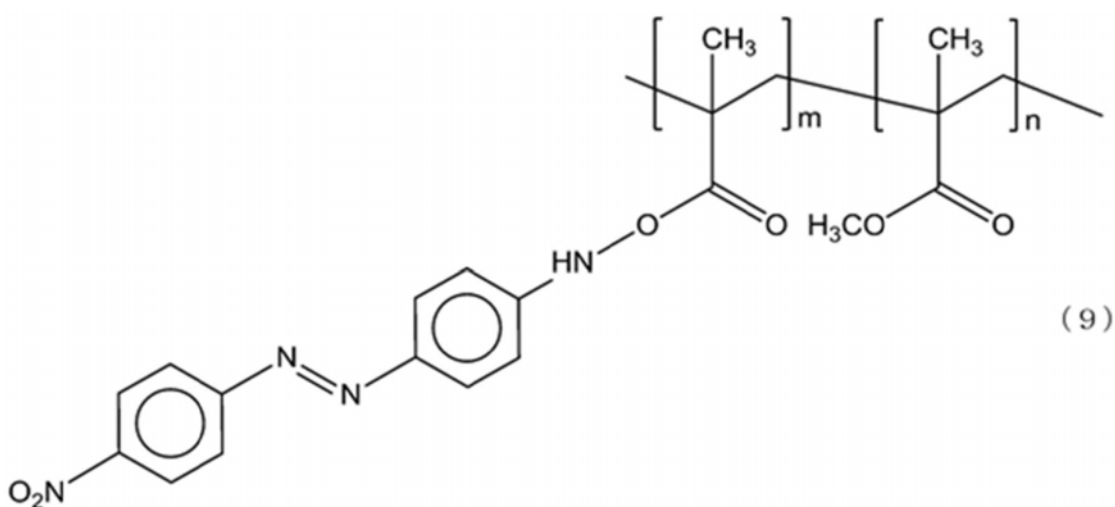
[0072] [化8]

[0073]



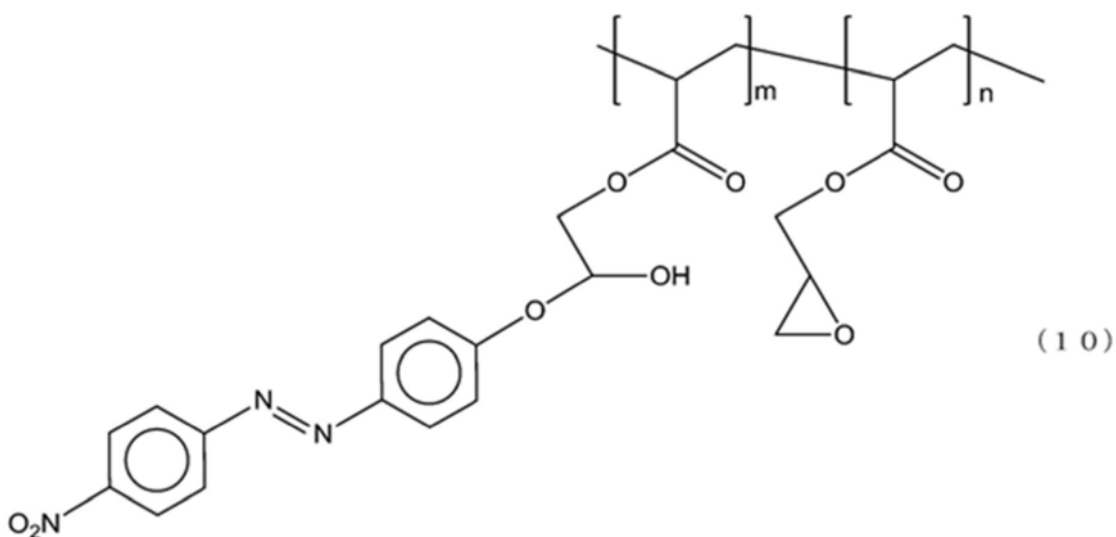
[0074] [化9]

[0075]



[0076] [化10]

[0077]



[0078] 在所述化学式(8)~(10)中,m和n表示摩尔百分比,为 $0 < m \leq 100$, $0 \leq n < 100$ 。在所述化学式(8)~(10)中,聚合物中的偶氮苯结构除无取代的偶氮苯外,也可以采用由硝基、氨基、甲基等修饰的各种变化的结构。

[0079] 所述光热转换性聚合物例如可以通过使构成光热转换性聚合物的主链的官能团和所述发色团的官能团反应来制造。另外,所述光热转换性聚合物例如可以通过使由所述主链的单体的官能团和所述发色团的官能团反应得到的具有发色团的单体与所述主链的单体聚合来制造。

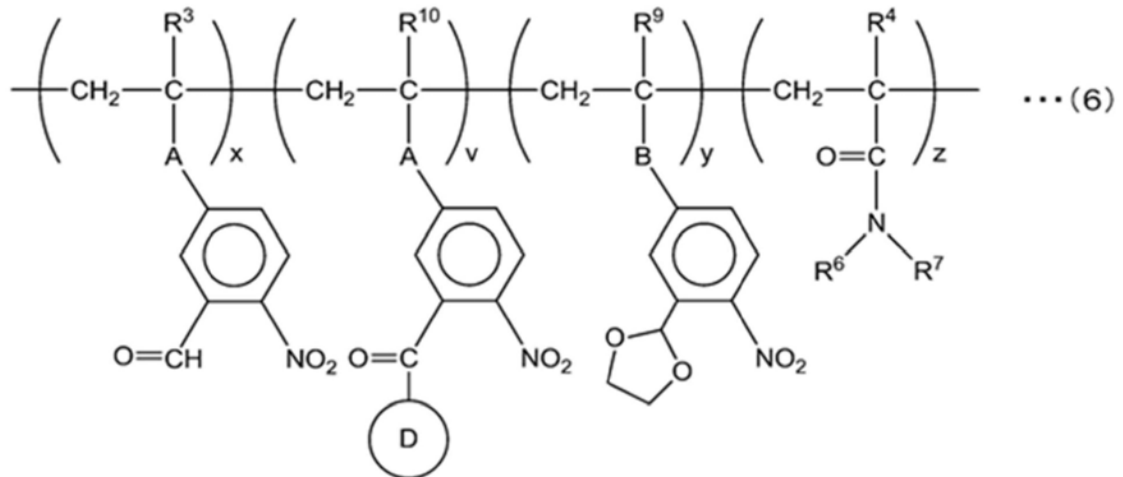
[0080] (3) 光溶解性和光热转换性聚合物

[0081] 所述光溶解性和光热转换性聚合物是具有所述光溶解性聚合物和光热转换性聚合物二者特性的聚合物。在所述光溶解性和光热转换性聚合物中,承担光溶解性的原子团和承担光热转换性的原子团例如通过具有不同特性的光来表达其特性。具体而言,所述承担光溶解性的原子团和所述承担光热转换性的原子团例如通过不同能量(光照量)的光来表达其特性,所述承担光热转换性的原子团优选与所述承担光溶解性的原子团相比,通过更高能量的光发挥其特性。因此,通过向光反应层12照射各原子团发挥其特性的光,可实施通过光反应层12中的光溶解性和光热转换性聚合物的溶解而解除细胞C和基板11a之间的间接固定,以及通过细胞C的死亡而解除经由死亡的细胞C间接地粘附着的细胞C之间的固定。

[0082] 所述光溶解性和光热转换性聚合物例如包含主链和侧链,所述侧链包含第1侧链和第2侧链,所述第1侧链是所述光溶解性聚合物的侧链,所述第2侧链是所述光热转换性聚合物的侧链。所述光溶解性聚合物的侧链和所述光热转换性聚合物的侧链的说明可援用上述说明。

[0083] 所述光溶解性和光热转换性聚合物优选包含下述化学式(6)表示的聚合物。在下述化学式(6)中,各单体可以随机聚合,也可以有规律地聚合。

[0084] [化6]



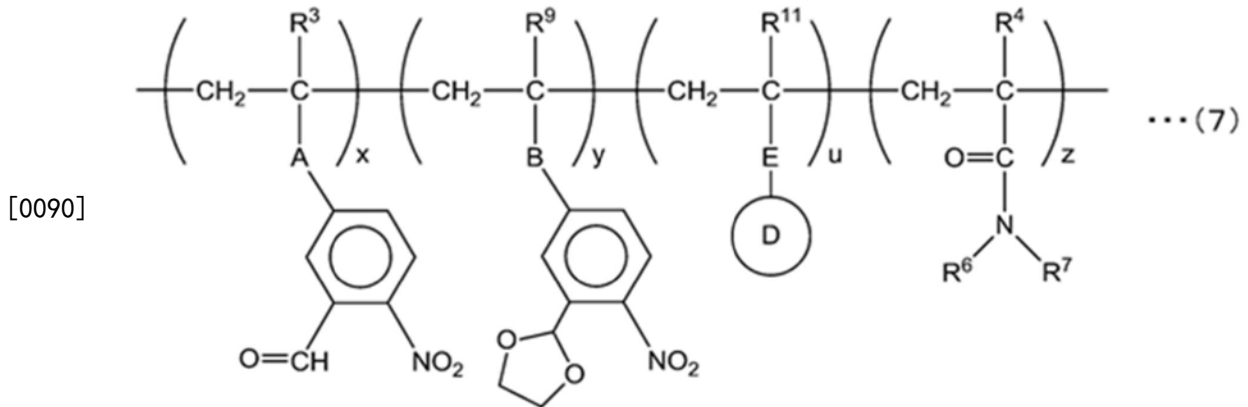
[0086] 在所述化学式(6)中,A和B可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团, R^3 、 R^4 、 R^9 和 R^{10} 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基, R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,D是在350nm以上的波长中,具有预定吸光度的发色团, v 、 x 、 y 、 z 表示摩尔百分比,为 $0 < v < 100$, $0 \leq x < 100$, $0 \leq y < 100$, $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0087] 所述化学式(6)表示的聚合物例如可举例后述化学式(13)的聚合物。

[0088] 所述光溶解性和光热转换性聚合物优选包含下述化学式(7)表示的聚合物。在下

述化学式(7)中,各单体可以随机聚合,也可以有规律地聚合。

[0089] [化7]



[0091] 在所述化学式(7)中,A、B和E可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团, R^3 、 R^4 、 R^9 和 R^{11} 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基, R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,D是在350nm以上的波长中,具有预定吸光度的发色团,u、x、y、z表示摩尔百分比,为 $0 < u < 100$, $0 \leq x < 100$, $0 \leq y < 100$, $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0092] 所述化学式(6)和(7)中的A、B和各取代基的说明可援用所述“(1)光溶解性聚合物”和“(2)光热转换性聚合物”中相对应的说明。

[0093] 连结所述主链与具有预定吸光度的发色团的E的结构没有特殊限制,例如可举例单键,或具备酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基的官能团等。即,所述主链和苯环可以以单键直接键合,也可以经由酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基等键合,也可以经由具备酯键、醚键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、氨基甲酸酯键或亚烷基的其他官能团键合。

[0094] 所述光溶解性和光热转换性聚合物例如可以通过使所述光热溶解性聚合物的醛基和所述发色团的官能团反应来制造,也可以通过使所述光溶解性聚合物的各单体、导入了所述发色团的主链的单体和所述主链的单体聚合来制造。

[0095] 光反应层12除所述光反应性聚合物以外,还可以包含其他成分。所述其他成分例如可举例光融解性材料。所述光融解性材料例如是指可通过不同波长的光,诱导固化或液化的光响应性材料。

[0096] 本实施方式的培养器具100的制造方法例如包含在基板11a上形成光反应层12的光反应层形成步骤。光反应层12例如可通过公知的膜形成方法形成,作为具体例,可通过涂覆法,印刷法(丝网印刷),蒸镀法,溅射法,流延法,旋涂法等来实施。在光反应层12中的光反应性聚合物包含所述光溶解性聚合物和所述光热转换性聚合物时,可混合所述光溶解性聚合物和所述光热转换性聚合物,通过使用得到的混合物形成光反应层12。在所述光溶解性聚合物和所述光热转换性聚合物分散至溶剂中时,优选具有在基板11a上形成光反应层12后去除所述溶剂的步骤。由此,可制造本实施方式的培养器具100。

[0097] 本实施方式的培养器具100例如可以具备连接光反应层12和基板11a的连接层。此时,所述连接层层叠于基板11a,光反应层12层叠于所述连接层,即,所述连接层配置于基板11a与光反应层12之间。培养器具100通过具有所述连接层,从而例如在进行长期细胞培养

时,也可以维持光反应层12的响应性,由此在长期培养后也可良好地剥离细胞C。

[0098] 所述连接层例如包含水合性高且富含羟基的聚合物。作为具体例,所述连接层例如包含羟丙基纤维素、羟丁基纤维素等纤维素衍生物,聚(甲基丙烯酸羟乙酯)及其共聚物的交联物。所述纤维素衍生物的交联物例如可举例聚(乙二醇)双(羧甲基)醚与羟丙基纤维素交联的产物。

[0099] 在所述培养器具100具有所述连接层时,本实施方式的培养器具100的制造方法优选包含在所述光反应层形成步骤前,在基板11a上形成连接层的步骤,在所述光反应层形成步骤中,在所述连接层上形成光反应层12。所述连接层的形成例如可以与光反应层12的形成相同的方式实施。

[0100] 本实施方式的培养器具100例如可以在光反应层12上具有细胞培养基材层。即,可以在光反应层12上层叠所述细胞培养基材层。由此,在培养器具100中,例如可良好地实施细胞C对基板11a的间接固定。所述细胞培养基材例如可举例细胞外基质(matrix)或具有作为细胞支持物的功能的物质。所述细胞外基质例如可举例弹性蛋白,巢蛋白,I型胶原蛋白、II型胶原蛋白、III型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、V型胶原蛋白、VII型胶原蛋白等胶原蛋白,肌腱蛋白,原纤维蛋白,纤连蛋白,层粘连蛋白,玻连蛋白(Vitronectin),由硫酸软骨素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸皮肤素等硫酸化糖胺聚糖和核心蛋白构成的蛋白聚糖,硫酸软骨素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸皮肤素、透明质酸等糖胺聚糖,Synthemax(注册商标,玻连蛋白衍生物),Matrigel(注册商标,层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖、巢蛋白(Entactin/Nidogen)等的混合物),优选层粘连蛋白。所述细胞培养基材可以包含所述蛋白质的肽段或所述糖链的片段。作为具体例,所述蛋白质的肽段例如可举例层粘连蛋白的片段。所述层粘连蛋白的片段(fragment)例如可举例层粘连蛋白211-E8,层粘连蛋白311-E8,层粘连蛋白411-E8,层粘连蛋白511-E8。所述层粘连蛋白211-E8由层粘连蛋白的 $\alpha 2$ 链、 $\beta 1$ 链和 $\gamma 1$ 链的片段构成。所述层粘连蛋白311-E8由层粘连蛋白的 $\alpha 3$ 链、 $\beta 1$ 链和 $\gamma 1$ 链的片段构成。所述层粘连蛋白411-E8由层粘连蛋白的 $\alpha 4$ 链、 $\beta 1$ 链和 $\gamma 1$ 链的片段构成。所述层粘连蛋白511-E8例如由层粘连蛋白的 $\alpha 5$ 链、 $\beta 1$ 链和 $\gamma 1$ 链的片段构成。

[0101] 在培养器具100具有所述细胞培养基材层时,本实施方式的培养器具100的制造方法优选包括在所述光反应层形成步骤后,在光反应层12上形成细胞培养基材层的步骤。所述细胞培养基材层的形成例如可以与光反应层12的形成相同的方式实施。

[0102] 接着,基于图2,对使用本实施方式的培养器具100的细胞处理方法进行说明。图2是示出使用培养器具100的细胞处理方法的一例的示意图。如图2所示,在本实施方式的处理方法中,可通过向存在培养的细胞C的培养器具100照射第1光(L1)和第2光(L2),剥离期望的细胞。

[0103] 首先,在本实施方式的处理方法中,如图2(A)和(B)所示,在培养器具100中培养细胞(培养步骤)。培养对象细胞例如可通过向培养器具100内导入细胞悬浮液从而导入。所述培养步骤的培养条件(培养温度,培养湿度,气体分压,培养时间等)例如可根据所述细胞的种类适当决定,作为具体例,可举例5%CO₂,25~40℃的湿润环境。

[0104] 接着,向光反应层12照射产生光溶解的第1光(L1)(第1照射步骤)。更具体而言,在所述第1照射步骤中,向与细胞C中的作为处理(剥离)对象的细胞C1对应的光反应层12,即处理对象细胞C1正下方的光反应层12照射L1。由此,如图2(C)所示,处理对象细胞C1正下方

的光反应层12溶解,解除细胞C1对基板11a的间接固定(粘附)。L1的波长是在所述光反应性聚合物中,承担光溶解性的原子团发挥光溶解性的波长。作为具体例,L1的波长例如为310~410nm,优选350~410nm,360~370nm。另外,L1的光照量(J/cm²)例如可根据照射波长和其能量适当设定。作为具体例,在L1的波长为365nm时,所述光照量例如为0.05~1J/cm²,优选0.1~0.5J/cm²。另外,在L1的波长为405nm时,所述光照量例如为0.5~10J/cm²,优选1~5J/cm²。在本实施方式中,L1为激光,即点状光,但L1不限于此,可以是面状光。

[0105] 接着,向光反应层12照射产生光热转换的第2光(L2)(第2照射步骤)。具体而言,在所述第2照射步骤中,向与细胞C中的作为处理(剥离)对象的细胞C1和作为非处理(剥离)对象的细胞C2之间的边界对应的光反应层12,即在非处理对象细胞C2中与处理对象细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。所述边界例如也可称为与照射L1的区域的外周邻接的区域。由此,如图2(D)所示,与L2照射的光反应层12邻接的细胞C2死亡,处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2间的固定解除。因此,如图2(E)所示,可剥离处理对象细胞C1。所述死亡可以在L2照射时被诱导,也可以在L2照射后被诱导。L2的波长是在所述光反应性聚合物中,承担光热转换性的原子团(发色团)发挥光热转换性的波长。作为具体例,L2的波长例如为300nm以上,优选300~1300nm,350~1300nm。L2的波长例如可以与L1的波长相同,也可以不同。另外,L2的光照条件例如为使与L2的照射部邻接的细胞C死亡的光照量,可根据照射的L2的输出,L2的照射尺寸大小(光斑直径)和L2照射波长中的光反应层的吸光度适当设定。作为具体例,在激光的输出为0.6W,直径(光斑直径)为50μm,照射光波长(激光波长)中光反应层12的吸光度为0.25时,所述激光的扫描速度可设定为10~500mm/秒,优选50~200mm/秒。所述L2的光照条件可基于该光照条件进行适当变更。作为具体例,在所述激光的输出为2倍,且激光的直径和光反应层12的吸光度相同时,所述激光的扫描速度例如可设定为约2倍,即20~1000mm/秒。在所述第2照射步骤中,为使L2的照射部瞬间或持续地升温至约100℃(例如80~120℃),优选照射L2。通过如上的光照条件,本实施方式的处理方法例如可在第2照射步骤中,有效地使细胞死亡。在本实施方式中,L2为激光,即点状光,但L2不限于此,也可以是面状光。

[0106] 由此,本实施方式的处理方法可剥离处理对象细胞C1。

[0107] 另外,在本实施方式中,因为在所述第1照射步骤后实施所述第2照射步骤,因此向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2,但L2的照射对象不限于此。即,在本实施方式的处理方法中,可以在所述第2照射步骤后实施所述第1照射步骤,也可以一起实施上述两个步骤。作为具体例,在L2照射后照射L1时,在所述第2照射步骤中,例如向与处理对象细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12,或与非处理对象细胞C2邻接的细胞C1的正下方的光反应层12照射L2。并且,可以在所述第1照射步骤中,向细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。

[0108] 另外,在本实施方式的处理方法中,使存在于边界的1个细胞C死亡,但也可以使与边界邻接的多个细胞C死亡。由此,本实施方式的处理方法例如可以有效防止处理对象细胞C1残存于非处理对象细胞C2,以及非处理对象细胞C2与处理对象细胞C1一起被剥离。

[0109] (实施方式2)

[0110] 本实施方式是细胞培养器具和细胞处理方法的其他例。图3是示出实施方式2的培养器具200的结构示意图,(A)是培养器具200的示意立体图,(B)是从(A)中的II-II方向

观察的培养器具200的示意截面图，(C)是在培养器具200中培养有细胞的状态下，从(A)中的II—II方向观察的培养器具200的示意截面图。如图3所示，在培养器具200中，实施方式1的培养器具100的结构中的光反应层12由2层构成。即，光反应层12具有光热转换层12a和光溶解层12b。另外，光热转换层12a层叠于基板11a，光溶解层12b层叠于光热转换层12a。如图3(C)所示，细胞C可以与光溶解层12b接触，也可以经由其他层等与光溶解层12b接触。除此以外，实施方式2的培养器具200的结构与实施方式1的培养器具100的结构相同，可援用其说明。

[0111] 光热转换层12a是具有光热转换性的层。即，光热转换层12a是通过光照产生热的层。光热转换层12a包含所述光热转换性聚合物。所述光热转换性聚合物可援用所述实施方式1中“(2)光热转换性聚合物”的说明。光热转换层12a例如形成于基板11a上的一部分或整个表面。

[0112] 光溶解层12b是具有光溶解性的层。即，光溶解层12b是通过光照，溶剂溶解性变化的层。光溶解层12b包含所述光溶解性聚合物。所述光溶解性聚合物可援用所述实施方式1中“(1)光溶解性聚合物”的说明。

[0113] 在培养器具200中，光溶解层12b层叠于光热转换层12a上，但培养器具200中的光热转换层12a和光热溶解层12b的层叠顺序不限于此，光热转换层12a可以层叠在光溶解层12b上。培养器具200例如通过光溶解层12b层叠在光热转换层12a上，可在后述第1照射步骤和第2照射步骤后，简便地剥离处理对象的细胞。

[0114] 培养器具200例如可以包含所述连接层和细胞培养基材层中的至少一种。在培养器具200具有所述连接层时，所述连接层层叠在基板11a上，光热转换层12a层叠在所述连接层上。另外，在培养器具200具有所述细胞培养基材层时，所述细胞培养基材层层叠在光溶解层12b上。

[0115] 本实施方式的培养器具200的制造方法例如包括在基板11a上形成光热转换层12a的光热转换层形成步骤，和在光热转换层12a上形成光溶解层12b的光溶解层形成步骤。光热转换层12a和光溶解层12b层例如可通过公知的膜形成方法形成，可援用所述实施方式1中光反应层12的形成方法的说明。由此，可制造本实施方式的培养器具200。

[0116] 接着，基于图4说明使用本实施方式的培养器具200的细胞处理方法。图4是示出使用培养器具200的细胞处理方法的一例的示意图。如图4所示，在本实施方式的处理方法中，可通过向存在培养的细胞C的培养器具100照射第1光(L1)和第2光(L2)，剥离期望的细胞。

[0117] 首先，在本实施方式的处理方法中，如图4(A)和(B)所示，在培养器具200中培养细胞(培养步骤)。培养对象细胞例如可通过向培养器具200内导入细胞悬浮液从而导入。所述培养步骤的培养条件(培养温度，培养湿度，气体分压，培养时间等)例如可根据所述细胞的种类进行适当决定，作为具体例，可举例5%CO₂，25~40℃的湿润环境下。

[0118] 接着，向光溶解层12b照射产生光溶解的第1光(L1)(第1照射步骤)。更具体而言，在所述第1照射步骤中，向与细胞C中的处理(剥离)对象细胞C1对应的光溶解层12b，即处理对象细胞C1正下方的光溶解层12b照射L1。由此，如图4(C)所示，处理对象细胞C1的正下方的光溶解层12b溶解，解除细胞C1对基板11a的间接固定(粘附)。L1的波长是在所述光反应性聚合物中，承担光溶解性的原子团发挥光溶解性的波长。作为具体例，L1的波长和光照量例如可援用所述实施方式1的说明。在本实施方式中，L1为激光，即点状光，但L1不限于此，

可以是面状光。

[0119] 接着,向光热转换层12a照射产生光热转换的第2光(L2)(第2照射步骤)。具体而言,在所述第2照射步骤中,向与细胞C中的处理(剥离)对象细胞C1和非处理(剥离)对象细胞C2之间的边界对应的光热转换层12a,即向非处理对象细胞C2中与处理对象细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光热转换层12a照射L2。由此,如图4(D)所示,与L2照射的光热转换层12a邻接的细胞C2死亡,处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2间的固定解除。因此,如图4(E)所示,可剥离处理对象细胞C1。L2的波长是在所述光反应性聚合物中,承担光热转换性的原子团(发色团)发挥光热转换性的波长。作为具体例,L2的波长和光照量可援用所述实施方式1的说明。L2的光照量例如可以与L1的光照量相同,也可以不同,但优选不同。另外,L2的光照量优选比L1光照量多。通过设定这样的光照量,本实施方式的处理方法例如可在第2照射步骤中,有效地使细胞死亡。在本实施方式中,L2为激光,即点状光,但L2不限于此,也可以是面状光。

[0120] 由此,本实施方式的处理方法可剥离处理对象细胞C1。

[0121] 另外,在本实施方式中,因为在所述第1照射步骤后实施所述第2照射步骤,因此向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光热转换层12a照射L2,但L2的照射对象不限于此。即,本实施方式的处理方法可以在所述第2照射步骤后实施所述第1照射步骤,也可以一起实施上述两个步骤。作为具体例,在L2照射后照射L1时,在所述第2照射步骤中,例如向与处理对象细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光热转换层12a、或与非处理对象细胞C2邻接的细胞C1的正下方的光热转换层12a照射L2。并且,可以在所述第1照射步骤中,向细胞C1的正下方的光溶解层12b照射L1。

[0122] 另外,在本实施方式的处理方法中,使存在于边界的1个细胞C死亡,但也可以使与边界邻接的多个细胞C死亡。由此,本实施方式的处理方法例如可以有效防止处理对象细胞C1残存于非处理对象细胞C2,以及非处理对象细胞C2与处理对象细胞C1一起被剥离。

[0123] 实施例

[0124] 接着,对本发明的实施例进行说明。但是,本发明不受下述实施例限制。市售的试剂如无特别说明,均基于其说明使用。

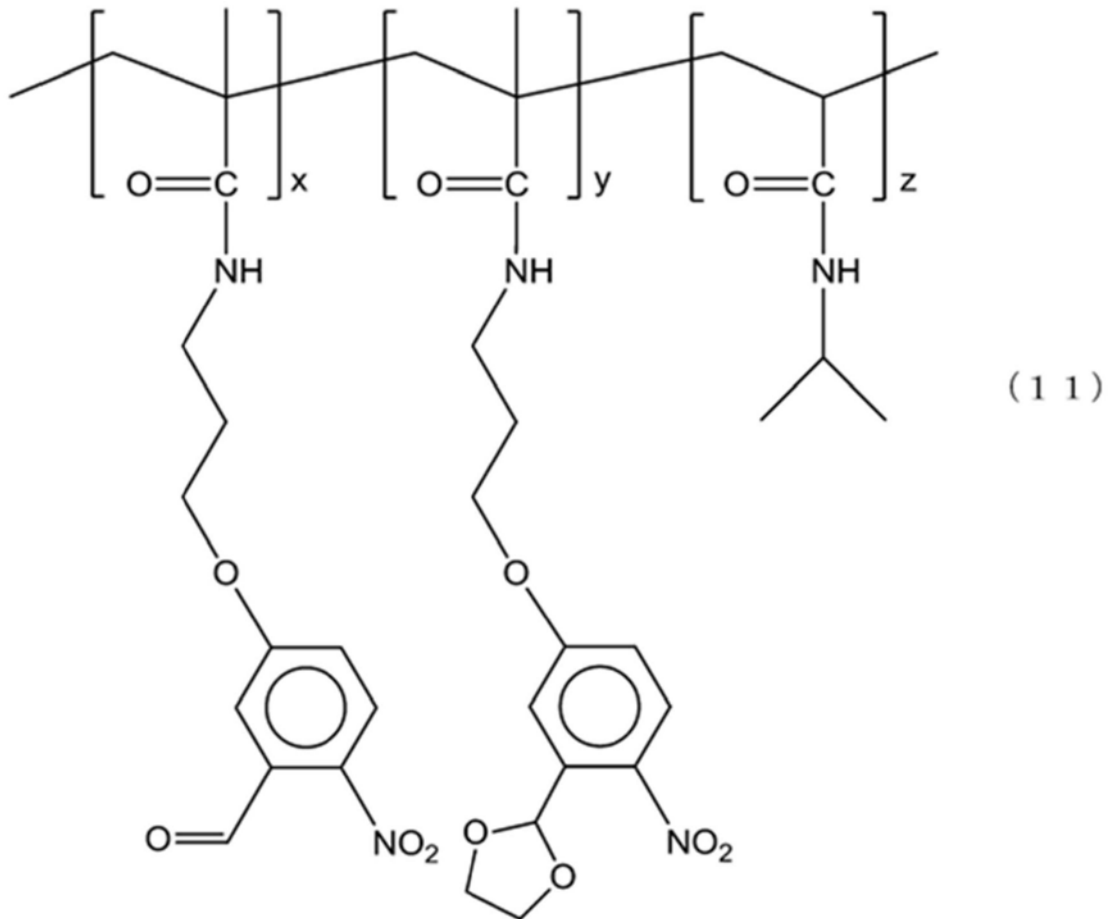
[0125] [实施例1]

[0126] 制造本发明的培养器具,确认通过本发明的处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0127] (1) 培养器具的制造

[0128] 制备实施方式1的培养器具100。首先,作为所述光溶解性聚合物,合成下述化学式(11)表示的聚合物。下述化学式(11)的聚合物是以与国际公开第2017/013226号的化合物12相同的步骤合成的。另外,侧链(2-硝基苯甲醛)的导入率为10mol%。另外,作为所述光热转换性聚合物,合成所述化学式(8)的聚合物。

[0129] [化11]



[0131] 接着,制备包含1.0% (w/w) 光溶解性聚合物和0.085% (w/w) 光热转换性聚合物的2,2,2-三氟乙醇 (TFE) 溶液,将得到的溶液旋涂于聚苯乙烯制的基板11a的表面,从而形成光反应层12。由此,制造培养器具100 (实施例1)。

[0132] (2) 细胞的处理

[0133] 将MDCK细胞 (从RIKEN BioResource Center取得) 分散至培养基,接种至实施例1的培养器具100,培养半天。MDCK细胞的培养基使用含有10%胎牛血清 (FBS) 的MEM培养基。另外,培养条件设定为5%CO₂, 37℃及湿润条件下。在所述培养后,确认了在基板11a整个表面上细胞粘附和伸展。然后,使用可照射激光的细胞处理装置 (株式会社片冈制作所制造),从基板11a的底面侧 (图1中的下侧) 向光反应层12上的细胞C照射L1和L2。具体而言,如图5 (A) 所示,向处理对象细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。L1是波长405nm、直径25μm、能量强度0.2W的激光,以1000mm/s的速度、20μm间距在宽0.6mm的范围内扫描,由此诱导光反应层12的溶解。接着,如图5 (A) 所示,在处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2中,向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。L2是波长405nm,直径25μm,能量强度0.8W的激光,以300mm/s的速度扫描。重复4回L2的照射,诱导细胞单层死亡。将培养器具100旋转约90°后,同样地照射L1和L2。在所述照射后,在培养箱中保存一段时间后,将培养基轻轻喷在表面上,如图5 (B) 所示,处理对象细胞C1剥离。由上述结果可知,通过本发明的培养器具和处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0134] [实施例2]

[0135] 制造本发明的培养器具,确认通过本发明的处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0136] (1) 培养器具的制造

[0137] 制备了在实施方式1的培养器具100中,在光反应层12和基板11a之间设置连接层,在光反应层12上层叠细胞培养基材层的培养器具。首先,作为所述光溶解性聚合物,使用了在所述实施例1(1)中合成的化学式(11)的聚合物。另外,作为所述光热转换性聚合物,合成了所述化学式(9)的聚合物。

[0138] 首先,制备了包含0.49% (w/w) 羟丙基纤维素 (MW=10万)、0.047% (w/w) 聚(乙二醇)双(羧甲基)醚 (MW=600) 以及0.49mol/kg硫酸的甲醇溶液,将得到的溶液旋涂于聚苯乙烯制基板11a的表面。接着,将得到的培养器具在85℃温度下加热18小时后,用乙醇洗净,进一步干燥。

[0139] 在进行所述干燥后,制备包含1.9% (w/w) 光溶解性聚合物和0.088% (w/w) 光热转换性聚合物的TFE溶液,将得到的溶液旋涂于聚苯乙烯制基板11a的表面。在进行所述旋涂后,通过照射波长365nm、能量密度0.9mW/cm²的紫外线15秒,形成光反应层12。

[0140] 接着,向具有光反应层12的培养器具使用将9.6μL的iMatrix511(株式会社Nippi社制)稀释至2mLPBS的稀释液,遵循所附的说明,形成细胞培养基材层。由此,制造培养器具(实施例2)。

[0141] (2) 细胞的处理

[0142] 将悬浮于培养基的人iPS细胞(201B7株,从RIKEN BioResource Center取得)接种至所述实施例2的培养器具,培养5天。iPS细胞的培养基使用了StemFitAK02N(味之素株式会社)。另外,培养条件设定为5%CO₂,37℃及湿润条件下。在所述培养后,确认了在基板11a整个表面上细胞粘附和伸展。然后,使用所述细胞处理装置,从基板11a的底面侧(图1中的下侧)向光反应层12上的细胞C照射L1和L2。具体而言,如图6(A)所示,向处理对象细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。L1是波长405nm、直径25μm、能量强度0.2W或0.3W的激光,通过以1000mm/s的速度、10μm间距,在宽0.6mm的范围内扫描1次(0.3W时)或2次(0.2W时),诱导光反应层12的溶解。接着,如图6(A)所示,在处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2中,向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。L2是波长405nm、直径25μm、能量强度0.8W的激光,以200mm/s的速度扫描,诱导细胞单层死亡。在所述照射后,在培养箱中保存一段时间后,将培养基轻轻喷在表面上,如图6(B)所示,处理对象细胞C1剥离。另外,图6(B)是L1为0.2W时的照片,但在L1为0.3W时,也同样观察到处理对象细胞C1的剥离。由结果可知,通过本发明的培养器具和处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0143] [实施例3]

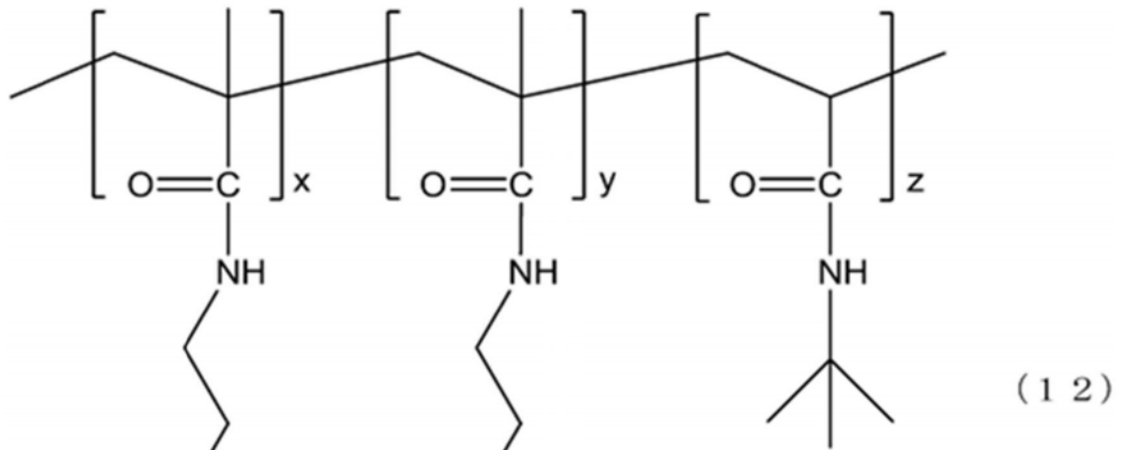
[0144] 制造本发明的培养器具,确认通过本发明的处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0145] (1) 培养器具的制造

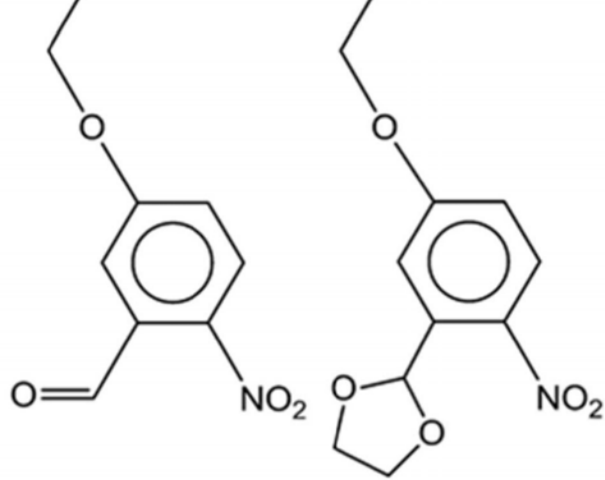
[0146] 制备实施方式1的培养器具100。首先,作为所述光溶解性聚合物,合成下述化学式(12)表示的聚合物。进一步,使用下述化学式(12)的聚合物,合成下述化学式(13)的聚合物作为所述光反应性聚合物(具有光溶解性和光热转换性的聚合物)。除了在国际公开第2017/013226号中的化合物12的合成步骤中,使用N-叔丁基丙烯酰胺代替N-异丙基丙烯酰胺外,以同样的步骤合成下述化学式(12)的聚合物。另外,侧链(2-硝基苯甲醛)的导入率为19mol%。接着,将分散橙3添加至包含1.8% (w/w) 下述化学式(12)的聚合物的TFE溶液中,,使其达到0.016 (w/w) %,然后搅拌。由此,下述化学式(12)的聚合物的醛基和分散橙3的氨

基反应,溶液的颜色由橙色变为红色,合成下述化学式(13)的聚合物。

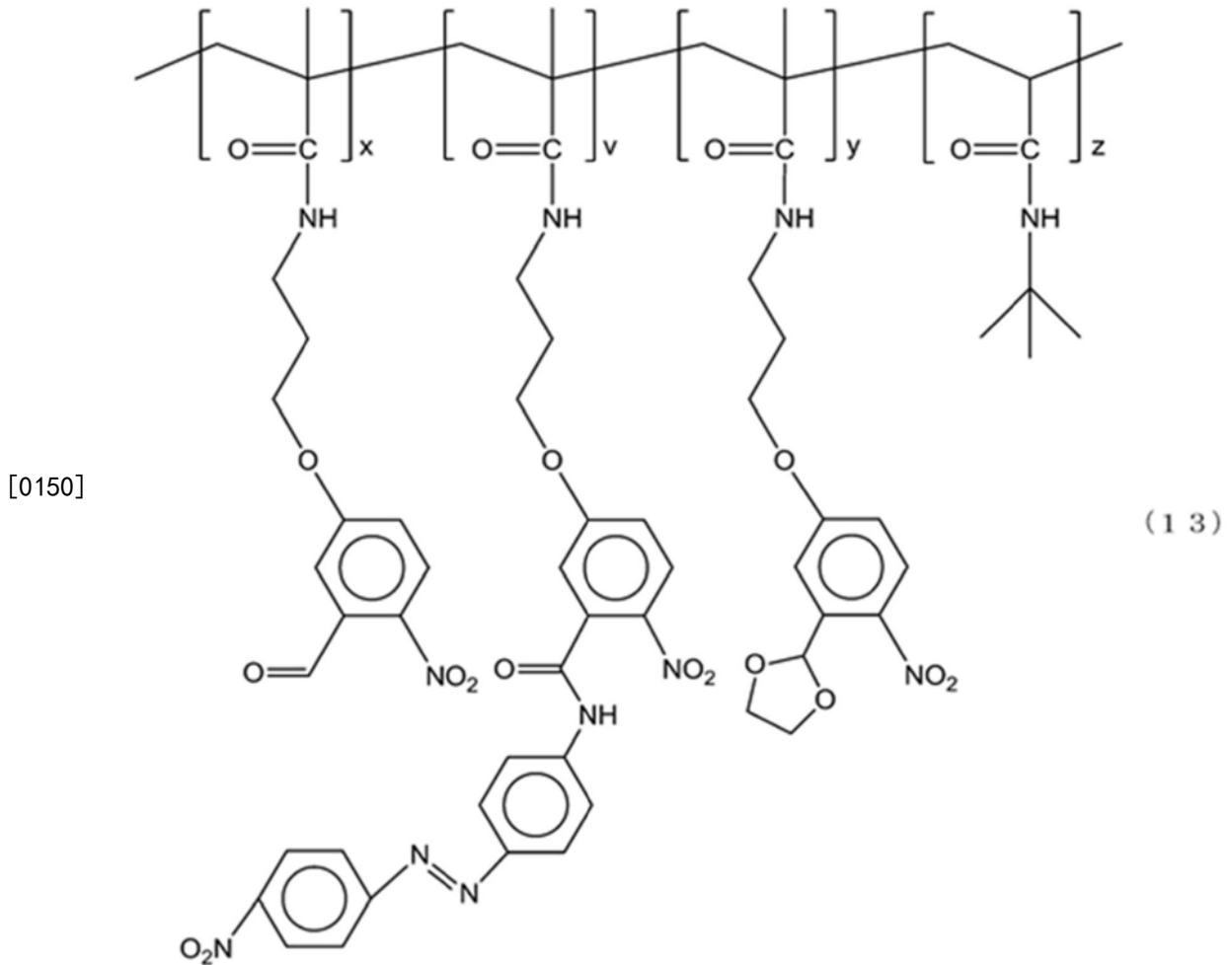
[0147] [化12]



[0148]



[0149] [化13]



[0151] 接着,通过将得到的溶液旋涂于聚苯乙烯制基板11a的表面,形成光反应层12。由此,制造培养器具100(实施例3-1)。

[0152] 进一步,向实施例3-1的培养器具100使用将0.2 μ L的iMatrix 511(株式会社Nippi社制)稀释至1.5mLPBS的稀释液,遵循所附的说明,形成细胞培养基材层。由此,制造培养器具(实施例3-2)。

[0153] (2) 细胞的处理1

[0154] 将HeLa细胞(从RIKEN BioResource Center取得)分散至培养基,接种至所述实施例3-1的培养器具100,培养半天。HeLa细胞的培养基使用了含有10%FBS的MEM培养基。另外,培养条件设定为5%CO₂,37℃以及湿润条件下。在所述培养后,确认了在基板11a整个表面上细胞粘附和伸展。然后,使用所述细胞处理装置,从基板11a的底面侧(图1中的下侧)向光反应层12上的细胞C照射L1和L2。具体而言,如图7(A)所示,向处理对象细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。L1是波长405nm、直径25 μ m、能量强度0.2W或0.3W的激光,以1000mm/s的速度、10 μ m间距在宽0.6mm的范围内扫描,由此诱导光反应层12的溶解。接着,如图7(A)所示,在处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2中,向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。L2是波长405nm、直径25 μ m、能量强度0.8w的激光,以200mm/s的速度扫描,诱导细胞单层的死亡。在所述照射后,在培养箱中保存一段时间后,将培养基轻轻喷在表面上,如图7(B)所示,处理对象细胞C1剥离。另外,图7(B)是L1为0.2W时的照片,但在L1为0.3W时,也同样观察到处理对象细胞C1的剥离。

[0155] (3) 细胞的处理2

[0156] 将悬浮于培养基的所述人iPS细胞接种至所述实施例3-2的培养器具100,在与所述实施例2相同的条件下培养5天。在所述培养后,确认了在基板11a整个表面上细胞粘附和伸展。然后,使用所述细胞处理装置,从基板11a的底面侧(图1中的下侧)向光反应层12上的细胞C照射L1和L2。具体而言,如图8(A)所示,向处理对象细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。L1是波长405nm、直径25 μ m、能量强度0.2W或0.3W的激光,以1000mm/s的速度、10 μ m间距在宽0.6mm的范围内扫描,由此诱导光反应层12的溶解。接着,如图8(A)所示,在处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2中,向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。L2是波长405nm、直径25 μ m、能量强度0.8w的激光,以200mm/s的速度扫描,诱导细胞单层的死亡。在所述照射后,在培养箱中保存一段时间后,将培养基轻轻喷在表面上,如图8(B)所示,处理对象细胞C1剥离。另外,图8(B)是L1为0.2W时的照片,但在L1为0.3W时,也同样观察到处理对象细胞C1的剥离。由上述结果可知,通过本发明的培养器具和处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0157] 由上述结果可知,通过本发明的培养器具和处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0158] [实施例4]

[0159] 制造本发明的培养器具,确认通过本发明的处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0160] (1) 培养器具的制造

[0161] 制备实施方式2的培养器具200。首先,作为光热转换性聚合物,合成所述化学式(10)的聚合物。具体而言,将0.0035g的4-(4-硝基苯基偶氮)酚和0.008g的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)溶解至0.457g的丙酮中。向得到的溶液添加0.0086g包含2.8% (w/w) 二氮杂二环十一碳烯(DBU)的1,2-二氯乙烷溶液后进行搅拌,在60 $^{\circ}$ C温度下反应5天,由橙色变为深红色。由此,确认了将4-(4-硝基苯基偶氮)酚引入到聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)的缩水甘油基,合成了所述化学式(10)的聚合物。光溶解性聚合物使用了所述实施例3(1)合成的化学式(12)的聚合物。

[0162] 从所述化学式(10)的聚合物溶液分出0.164g溶液,通过喷氮气去除丙酮后,重新溶解至0.0478g的TFE中。进一步,向得到的溶液添加0.0041g包含0.05% (w/w) 的1,12-二氨基十二烷的TFE溶液并搅拌。接着,将得到的溶液旋涂于聚苯乙烯制的基板11a的表面后,在85 $^{\circ}$ C温度下加热4小时,进一步用乙醇洗净,进行再次干燥,由此形成光热转换层12a。接着,将包含1.8% (w/w) 所述化学式(12)的聚合物的TFE溶液旋涂至光热转换层12a的表面后,照射波长365nm、能量强度1.5mW/cm²的紫外线4秒,由此制造培养器具200。

[0163] (2) 细胞的处理

[0164] 将HeLa细胞分散至培养基,接种至实施例4的培养器具200,培养半天。HeLa细胞的培养基使用含有10%FBS的MEM培养基。另外,培养条件为5%CO₂、37 $^{\circ}$ C以及湿润条件下。在所述培养后,确认了在基板11a整个表面上细胞粘附和伸展。然后,使用所述细胞处理装置,从基板11a的底面侧(图3中的下侧)向光反应层12上的细胞C照射L1和L2。具体而言,如图9(A)所示,向处理对象细胞C1的正下方的光反应层12照射L1。L1是波长405nm、直径25 μ m、能量强度0.2W或0.3W的激光,以1000mm/s的速度、10 μ m间距在宽0.6mm的范围内扫描,由此诱导光反应层12的溶解。接着,如图9(A)所示,在处理对象细胞C1和非处理对象细胞C2中,向与细胞C1邻接的细胞C2的正下方的光反应层12照射L2。L2是波长405nm、直径25 μ m、能量强

度0.8W的激光,以750mm/s的速度扫描2次,诱导细胞单层的死亡。在所述照射后,在培养箱中保存一段时间后,将培养基轻轻喷在表面上,如图9(B)所示,处理对象细胞C1剥离。另外,图9(B)是L1为0.2W时的照片,但在L1为0.3W时,也同样观察到处理对象细胞C1的剥离。由上述结果可知,通过本发明的培养器具和处理方法,可剥离期望位置的细胞。

[0165] 上文参照实施方式说明了本发明,但本发明不限于上述实施方式。本发明的构成和细节可在本发明的范围内做出本领域技术人员能够理解的各种改变。

[0166] 本申请主张2018年12月13日提交的日本专利申请2018-233382为基础的优先权,其公开的所有内容纳入于本文。

[0167] <附记>

[0168] 上述实施方式和实施例的一部分或全部可以下述附记的方式记载,但不限于此。

[0169] (附记1)

[0170] 一种细胞培养器具,具备基板以及具有光溶解性和光热转换性的光反应层,

[0171] 所述光反应层层叠于所述基板,

[0172] 所述光反应层包含具有光溶解性和光热转换性的聚合物。

[0173] (附记2)

[0174] 根据附记1所述的细胞培养器具,其中

[0175] 所述光反应层具备具有光溶解性的光溶解层和具有光热转换性的光热转换层,

[0176] 所述光溶解层包含光溶解性聚合物,

[0177] 所述光热转换层包含光热转换性聚合物。

[0178] (附记3)

[0179] 根据附记2所述的细胞培养器具,

[0180] 所述光溶解性聚合物具有主链和侧链,

[0181] 所述侧链包含芳香环,

[0182] 所述芳香环包含被硝基取代的第1碳原子,和被醛基或下述化学式(1)表示的官能团取代的第2碳原子,

[0183] 所述第1碳原子和所述第2碳原子在相同苯环内邻接。

[0184] [化1]

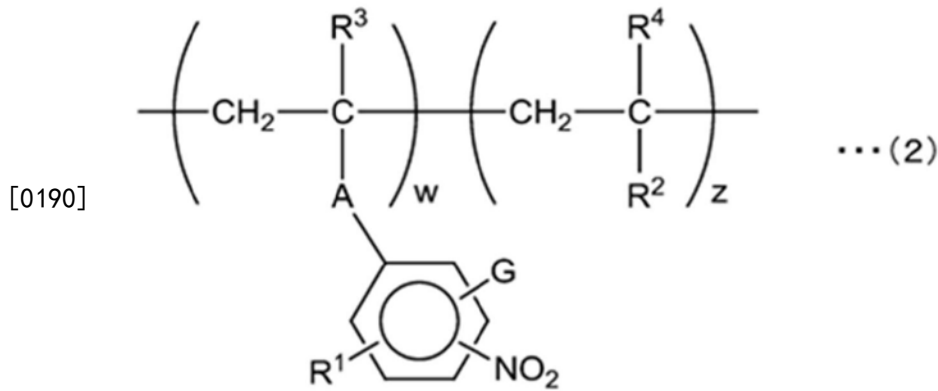


[0186] (附记4)

[0187] 根据附记3所述的细胞培养器具,其中

[0188] 所述光溶解性聚合物包含下述化学式(2)表示的聚合物:

[0189] [化2]



[0191] 在所述化学式(2)中,

[0192] A是单键或官能团,

[0193] R¹是醛基或所述化学式(1)表示的官能团,

[0194] R¹和NO₂分别键合至相邻的碳原子,

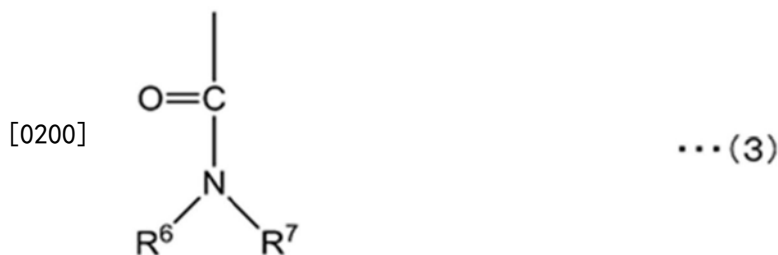
[0195] R²是选自氢原子、烷基、下述化学式(3)表示的官能团以及下述化学式(4)表示的官能团中的至少一种,

[0196] R³和R⁴可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,

[0197] G是可以与苯环的氢进行取代的3个以下的烷基,

[0198] w和z表示摩尔百分比,为0 < w ≤ 100, 0 ≤ z < 100,

[0199] [化3]



[0201] [化4]



[0203] 在所述化学式(3)中,

[0204] R⁶和R⁷可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

[0205] 在所述化学式(4)中,

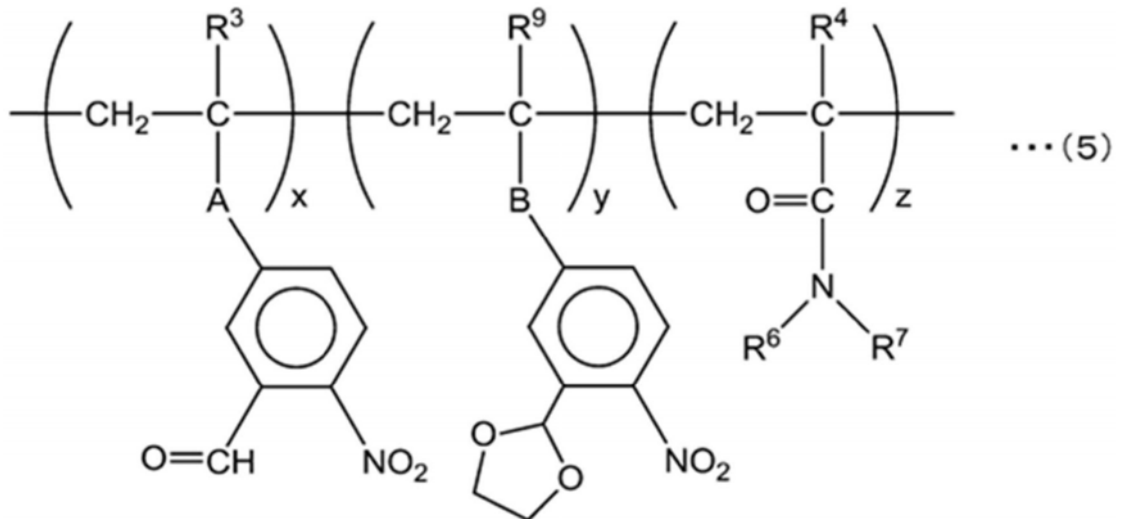
[0206] R⁸是烷基。

[0207] (附记5)

[0208] 根据附记3或4所述的细胞培养器具,其中

[0209] 所述光溶解性聚合物包含下述化学式(5)表示的聚合物:

[0210] [化5]



[0211]

[0212] 在所述化学式(5)中,

[0213] A和B可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团,

[0214] R^3 、 R^4 、 R^9 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,[0215] R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,[0216] x 、 y 、 z 表示摩尔百分比,为 $0 \leq x < 100$, $0 \leq y < 100$, $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0217] (附记6)

[0218] 根据附记2至5任一项所述的细胞培养器具,其中

[0219] 所述光热转换性聚合物包含主链和侧链,

[0220] 所述侧链具有在350nm以上波长中具有预定吸光度的发色团。

[0221] (附记7)

[0222] 根据附记6所述的细胞培养器具,其中

[0223] 所述发色团包含偶氮苯骨架。

[0224] (附记8)

[0225] 根据附记1所述的细胞培养器具,其中

[0226] 具有所述光溶解性和光热转换性的聚合物具有主链和侧链,

[0227] 所述侧链具有第1侧链和第2侧链,

[0228] 所述第1侧链包含芳香环,

[0229] 所述芳香环包含被硝基取代的第1碳原子,和被醛基或所述化学式(1)表示的官能团取代的第2碳原子,

[0230] 所述第1碳原子和所述第2碳原子在相同苯环内邻接,

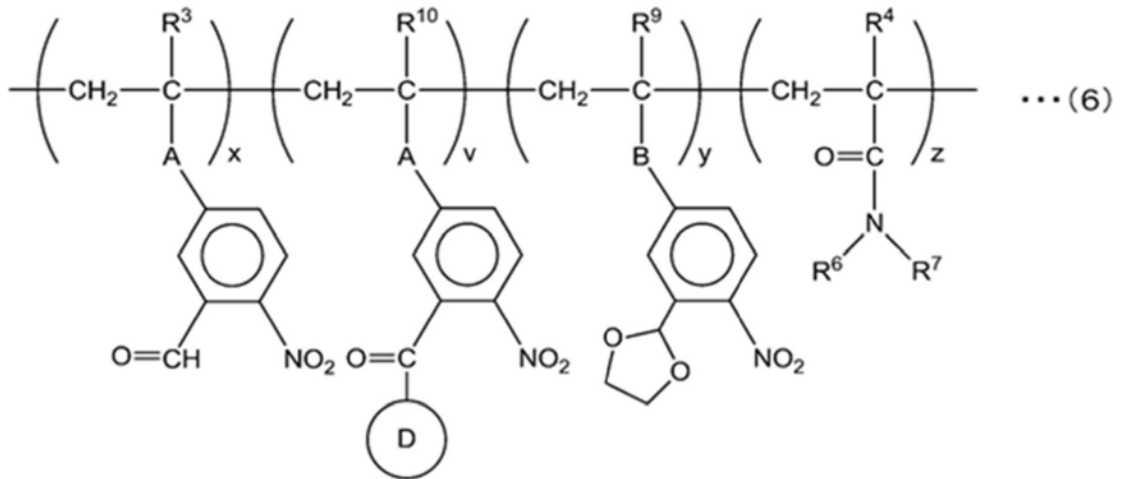
[0231] 所述第2侧链具有在350nm以上的波长中具有预定吸光度的发色团。

[0232] (附记9)

[0233] 根据附记1或附记8所述的细胞培养器具,其中

[0234] 具有所述光溶解性和光热转换性的聚合物用下述化学式(6)表示:

[0235] [化6]



[0237] 在所述化学式(6)中,

[0238] A和B可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团,

[0239] R^3 、 R^4 、 R^9 、 R^{10} 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,

[0240] R^6 和 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

[0241] D为在350nm以上的波长中,具有预定吸光度的发色团,

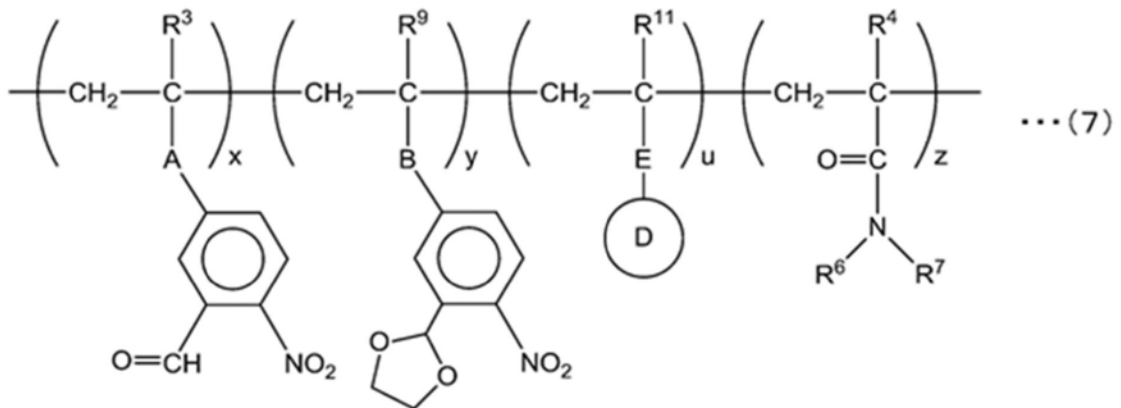
[0242] v 、 x 、 y 、 z 表示摩尔百分比,为 $0 < v < 100$ 、 $0 \leq x < 100$ 、 $0 \leq y < 100$ 、 $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0243] (附记10)

[0244] 根据附记1所述的细胞培养器具,其中

[0245] 具有所述光溶解性和光热转换性的聚合物用下述化学式(7)表示:

[0246] [化7]



[0248] 在所述化学式(7)中,

[0249] A、B和E可以相同,也可以不同,分别独立地为单键或官能团,

[0250] R^3 、 R^4 、 R^9 、 R^{11} 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子或烷基,

[0251] R^6 、 R^7 可以相同,也可以不同,分别独立地为氢原子、烷基或芳香环,

[0252] D为在350nm以上的波长中,具有预定吸光度的发色团,

[0253] u 、 x 、 y 、 z 表示摩尔百分率,为 $0 < u < 100$ 、 $0 \leq x < 100$ 、 $0 \leq y < 100$ 、 $0 \leq z < 100$ ($x=y=0$ 除外)。

[0254] (附记11)

- [0255] 根据附记1至10任一项所述的细胞培养器具,其中
- [0256] 具备与所述光反应层和所述基板连接的连接层,
- [0257] 所述连接层层叠于所述基板,
- [0258] 所述光反应层层叠于所述连接层。
- [0259] (附记12)
- [0260] 根据附记1至11任一项所述的细胞培养器具,其中
- [0261] 可在所述光反应层上培养细胞。
- [0262] (附记13)
- [0263] 一种细胞处理方法,包含
- [0264] 培养步骤,在附记1至12中任一项所述的细胞培养器具中培养细胞;
- [0265] 第1照射步骤,向所述光反应层照射产生光溶解的第1光;以及
- [0266] 第2照射步骤,向所述光反应层照射产生光热转换的第2光。
- [0267] (附记14)
- [0268] 根据附记13所述的细胞处理方法,其中
- [0269] 在所述第1照射步骤中,向与所述细胞中的处理对象细胞对应的光反应层照射所述第1光,
- [0270] 在所述第2照射步骤中,向与所述细胞中的所述处理对象细胞和非处理对象细胞之间的边界对应的光反应层照射所述第2光。
- [0271] (附记15)
- [0272] 根据附记13或14所述的细胞处理方法,
- [0273] 在所述第2照射步骤中,使与照射所述第2光的光反应层对应的细胞死亡。
- [0274] (附记16)
- [0275] 根据附记13至15任一项所述的细胞处理方法,其中
- [0276] 所述第2光的光照量比所述第1光的光照量多。
- [0277] 产业上利用可能性
- [0278] 通过本发明,能够剥离期望位置的细胞。因此,本发明在加工细胞、组织等的生命科学领域、医疗领域等极为有用。
- [0279] 符号说明
- | | | |
|--------|---------|-------|
| [0280] | 100、200 | 培养器具 |
| [0281] | 11 | 容器 |
| [0282] | 11a | 基板 |
| [0283] | 11b | 侧壁 |
| [0284] | 12 | 光反应层 |
| [0285] | 12a | 光热转换层 |
| [0286] | 12b | 光溶解层 |

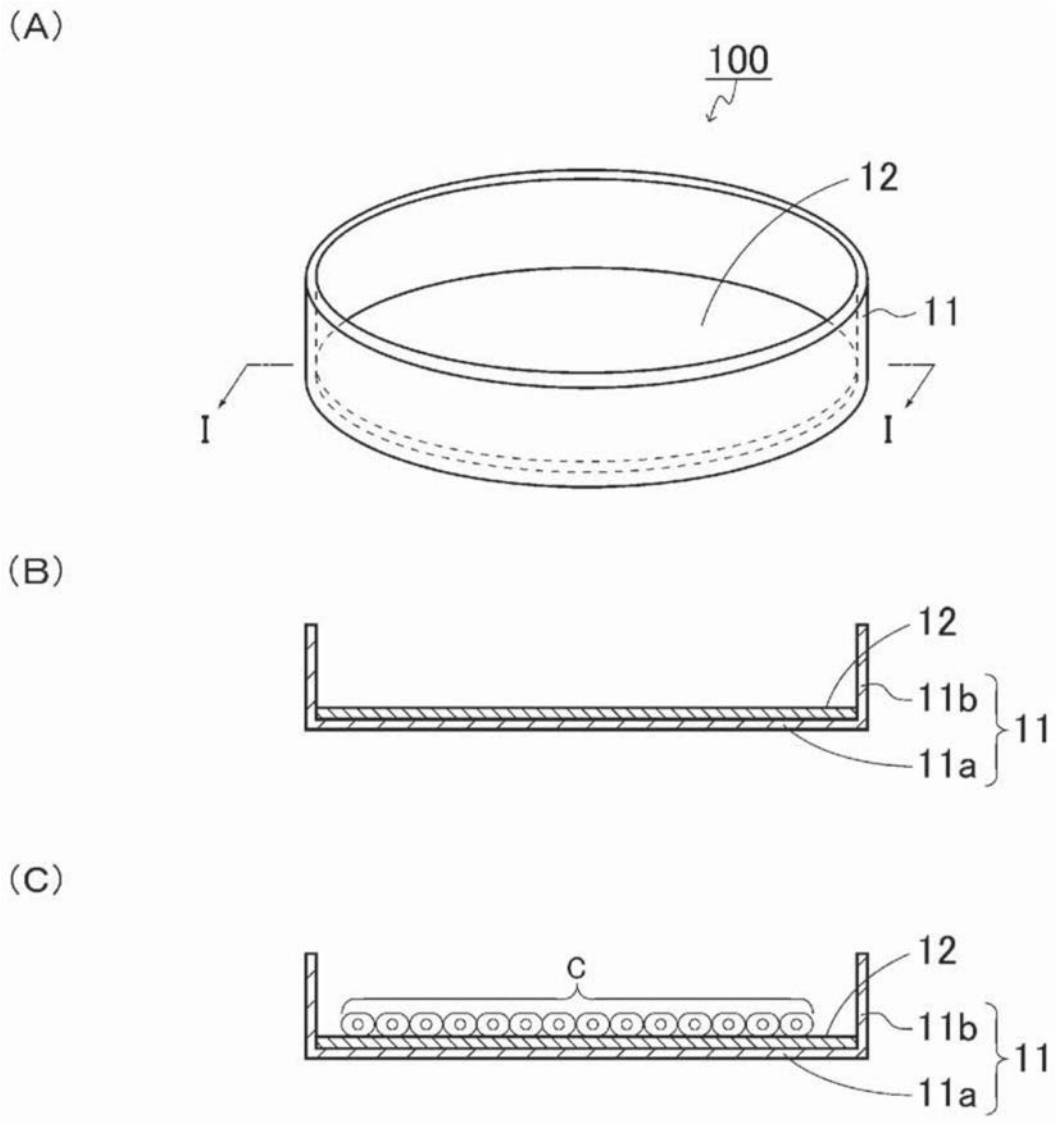


图1

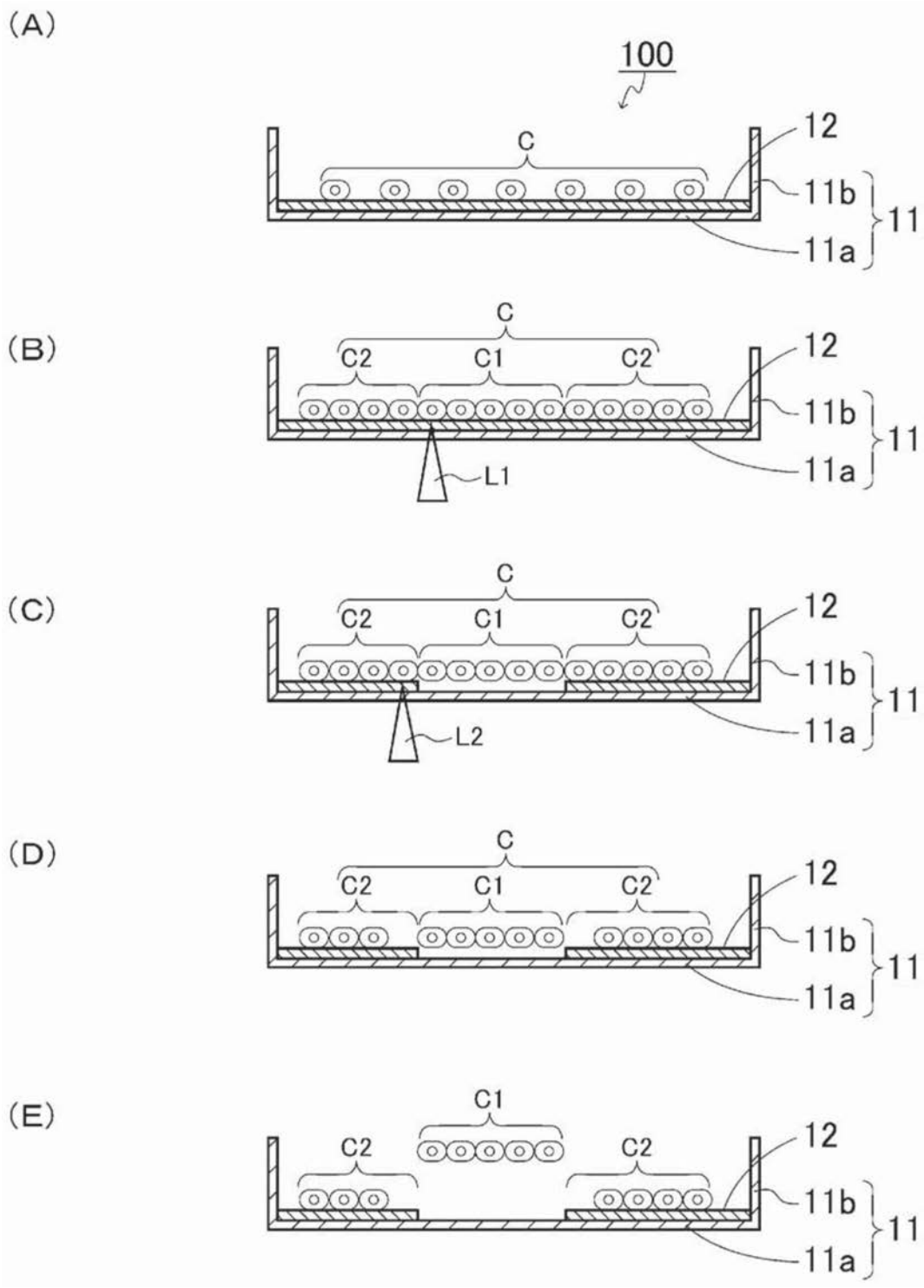


图2

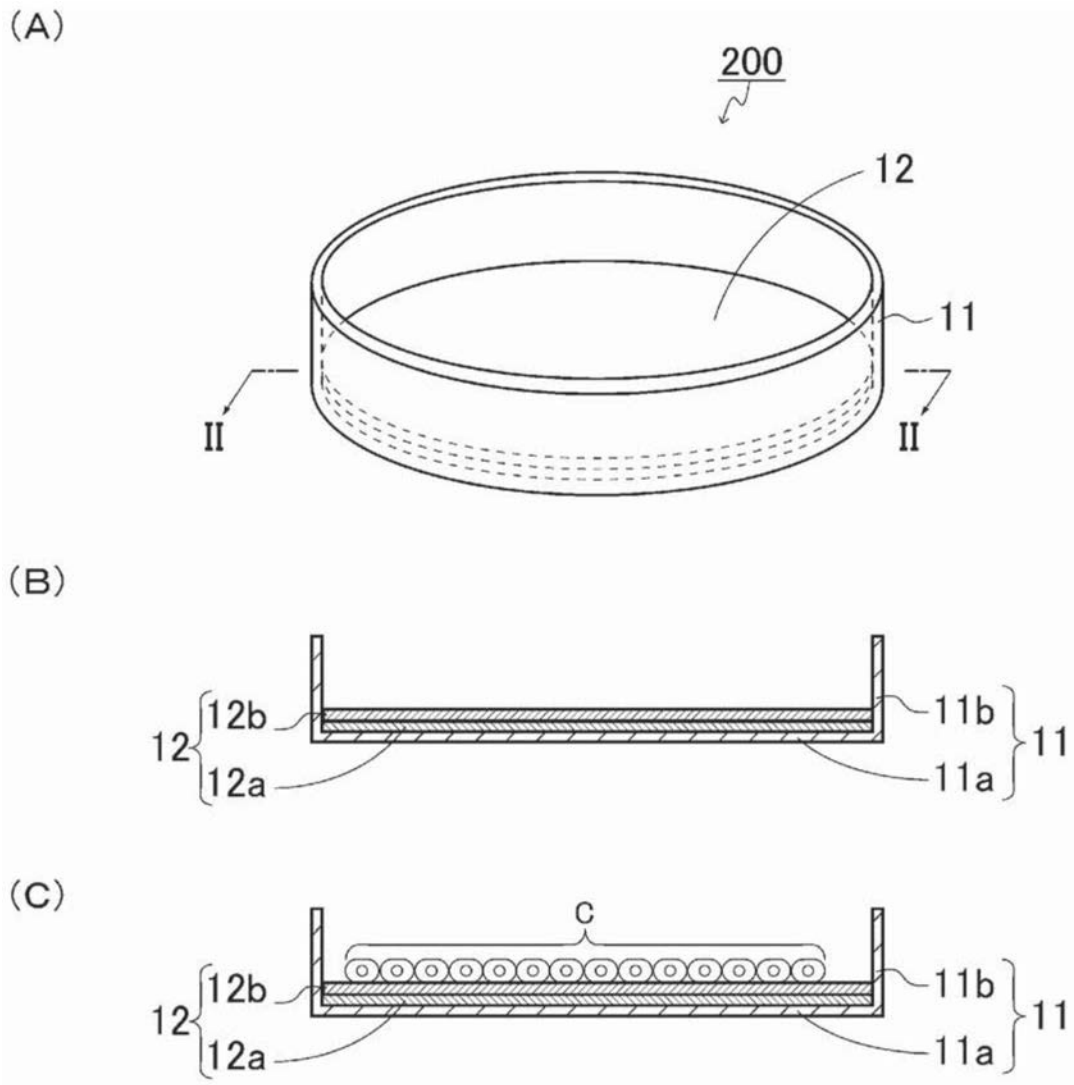


图3

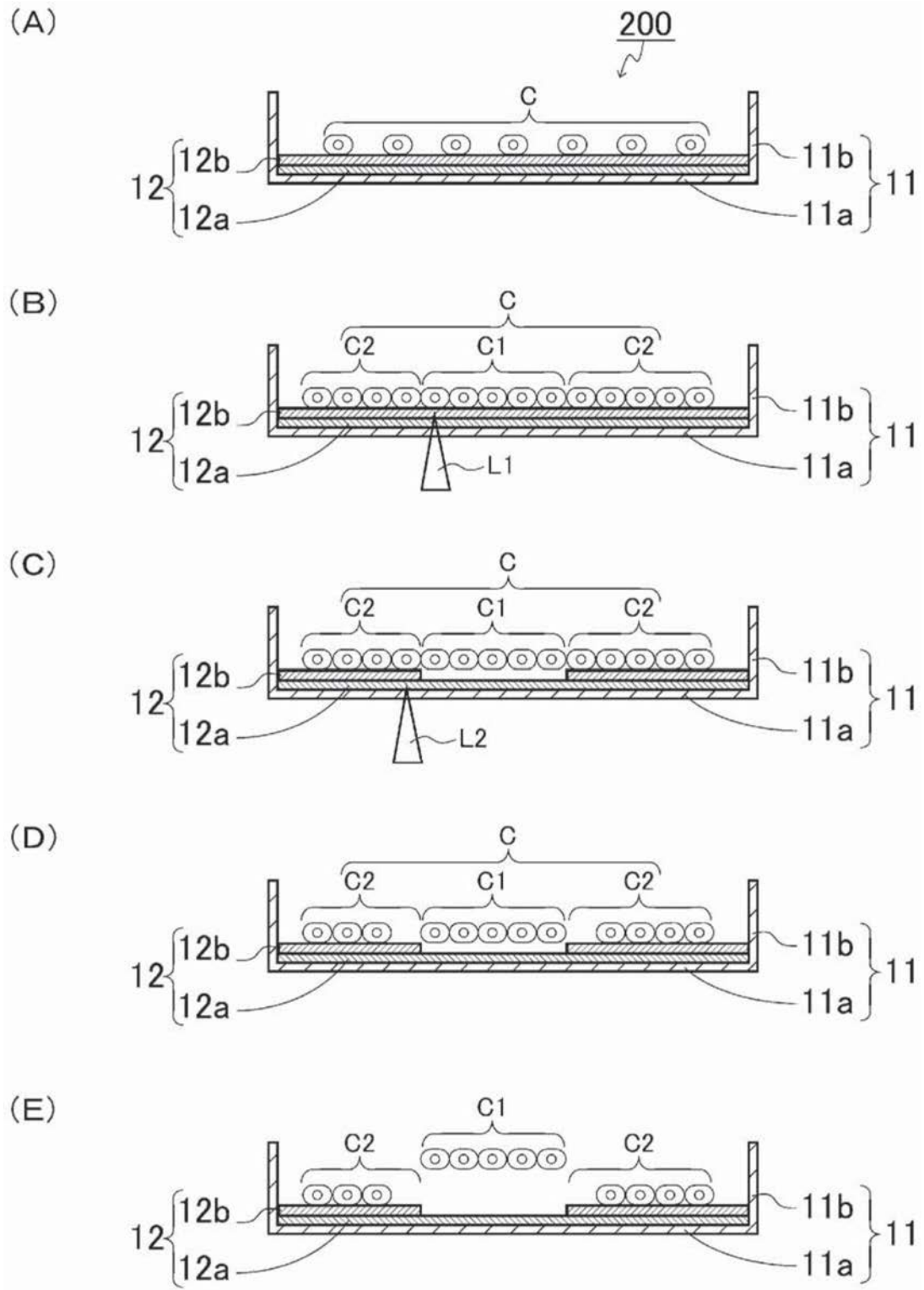
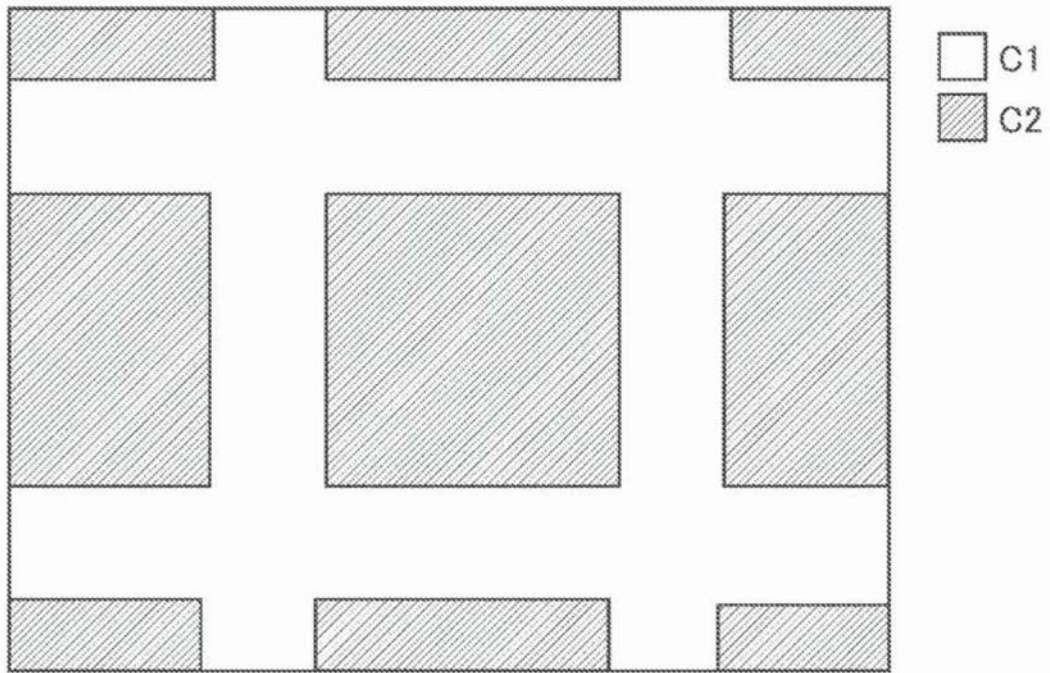


图4

(A)



(B)

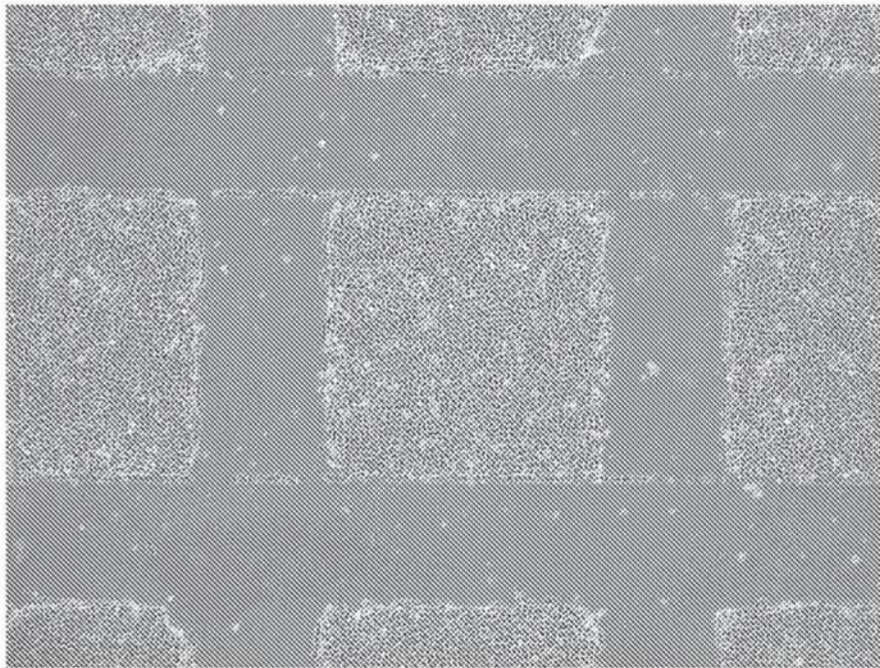


图5

(A)



(B)



图6

(A)

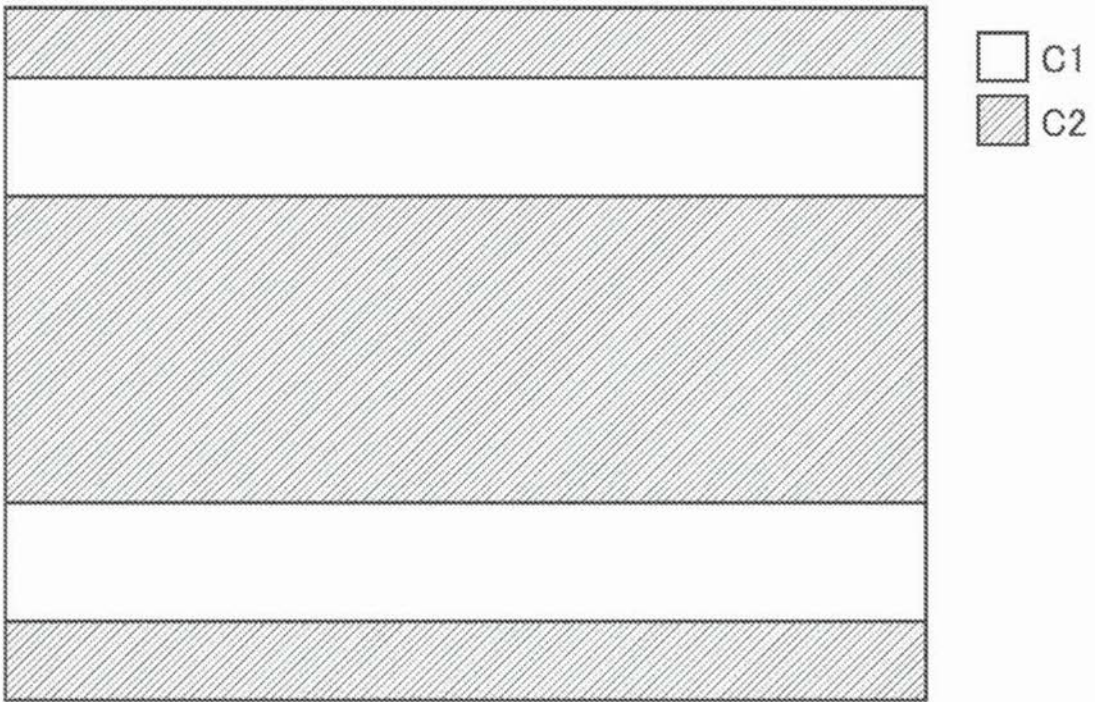


(B)



图7

(A)



(B)

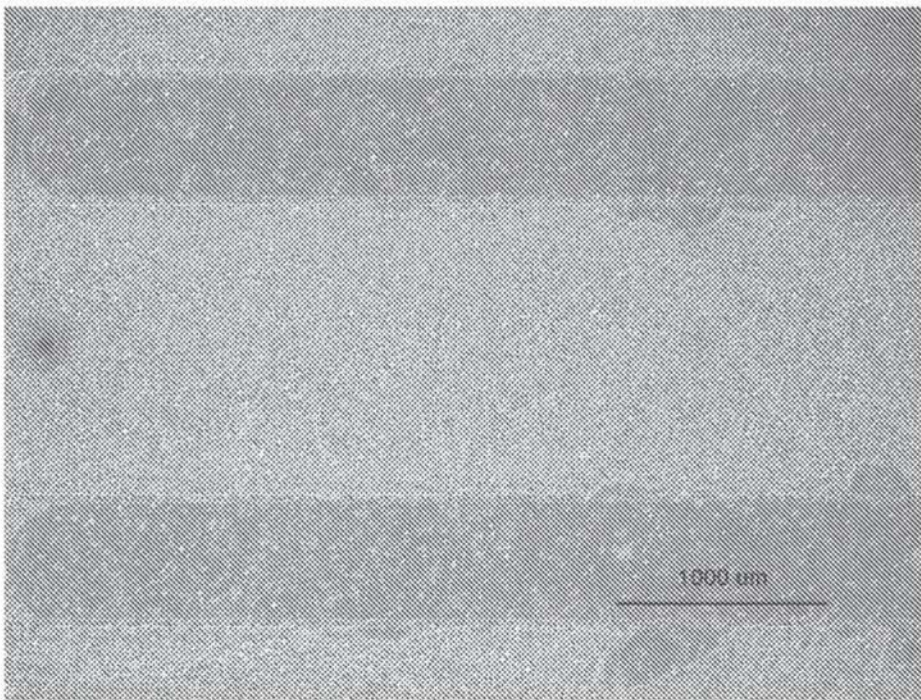


图8

(A)



(B)

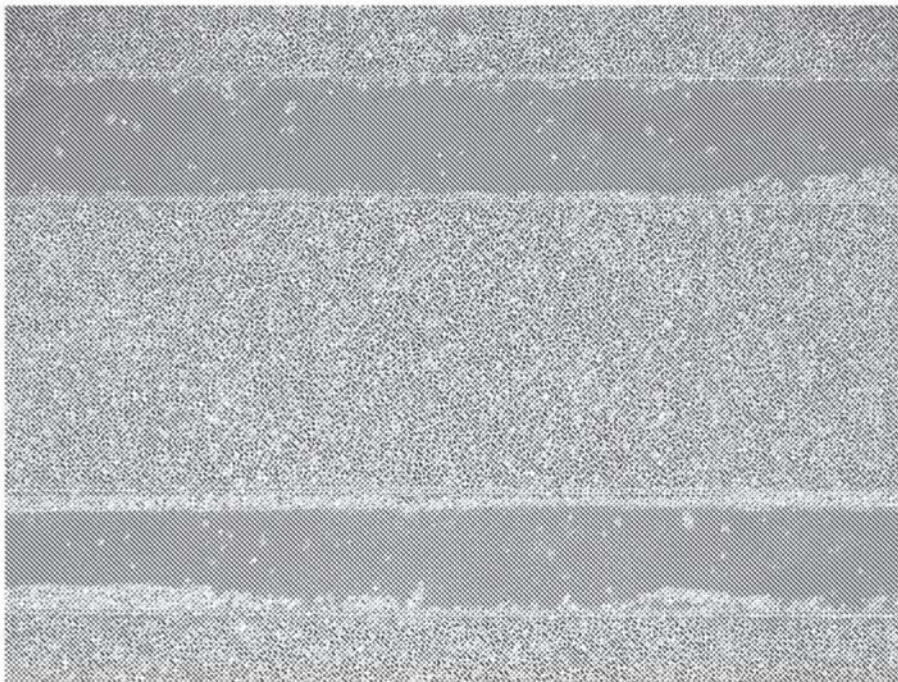


图9