

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 11 月 3 日 (03.11.2005)

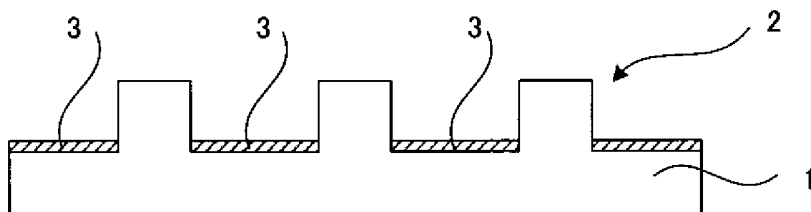
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/103227 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 3/00 (74) 代理人: 山下 昭彦, 外(YAMASHITA, Akihiko et al.);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目16番10号
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007775 オークビル京橋4階 東京セントラル特許事務所内
Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2005 年 4 月 25 日 (25.04.2005) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
(25) 国際出願の言語: 日本語 BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
(26) 国際公開の言語: 日本語 ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
(30) 優先権データ: NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
特願2004-129721 2004 年 4 月 26 日 (26.04.2004) JP UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大日本
印刷株式会社 (DAI NIPPON PRINTING CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目
1 番 1 号 Tokyo (JP). (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
(72) 発明者; および OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三宅 秀之
(MIYAKE, Hideyuki) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿
区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会
社内 Tokyo (JP). 服部 秀志 (HATTORI, Hideshi) [JP/JP];
〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番
1 号 大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 小林 弘典
(KOBAYASHI, Hironori) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新
宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式
会社内 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PATTERNING SUBSTRATE FOR CELL CULTURE AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 細胞培養用パターンニング基板およびその製造方法



(57) Abstract: A patterning substrate for cell culture that is used to culture cells into a desired morphology on a base material; and a process for producing the same. There is provided a patterning substrate for cell culture, comprising a base material having protrudent portions and, disposed on a surface of the base material, cell culture regions adapted to culture cells, characterized in that the cell culture regions are partitioned by the protrudent portions of the base material having protrudent portions.

(57) 要約: 本発明は、基材上に目的とする形状に細胞を培養するために用いられる細胞培養用パターンニング基板、およびその製造方法を提供することを主目的としている。上記目的を達成するために、本発明は、凸部を有する基材と、前記基材表面に形成された細胞を培養する領域である細胞培養領域とを有し、前記細胞培養領域が、凸部を有する基材の前記凸部によって区画されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板を提供する。

明 細 書

細胞培養用パターンニング基板およびその製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は、細胞を高精細なパターン状に接着させさせることが可能な細胞培養用パターンニング基板の製造方法に関するものである。

背景技術

- [0002] 現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。
- [0003] 一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスチック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。
- [0004] 一方、培養細胞を基材上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような表面がパターンをなしているような基材を用い、この表面で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。
- [0005] 例えば、特許文献1には、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特許文献2では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィ法によりパターンニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。

[0006] さらに、特許文献3では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質がパターンニングされた細胞培養用基材と、この基材をフォトリソグラフィ法によって作製する方法について開示している。このような基材の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターンニングされた表面により多くの細胞を接着させ、細胞のパターンニングを実現している。

[0007] しかしながら、上記の方法等により、細胞をパターンニングしても、パターン間の細胞が結合してしまうこと等により、パターンの維持ができない場合等があった。

[0008] 特許文献1:特開平2-245181号公報

特許文献2:特開平3-7576号公報

特許文献3:特開平5-176753号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] そこで、基材上に目的とする形状に細胞を培養するために用いられる細胞培養用パターンニング基板、およびその製造方法の提供が望まれている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、凸部を有する基材と、上記基材表面に形成された細胞を培養する領域である細胞培養領域とを有し、上記細胞培養領域が、凸部を有する基材の上記凸部によって区画されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板を提供する。

[0011] 本発明によれば、上記細胞培養領域が、上記凸部によって区画されていることから、この凸部の高さや幅等によって隣接する細胞培養領域に付着した細胞が結合することを防止することができ、目的とするパターン状に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。

[0012] 上記発明においては、上記凸部を有する領域は、細胞と接着阻害性を有する細胞接着阻害部であり、上記細胞培養領域は、細胞と接着性を有する細胞接着部であることが好ましい。これにより、上記凸部を有する領域においては、細胞が付着する可能性を低いものとすることができ、より目的とするパターン状に細胞を培養することが可能となるからである。

[0013] このような細胞培養用パターンニング基板は、以下の6つの態様とすることができる。

第1の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されているものである。

[0014] 第2の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0015] この第1の態様および第2の態様においては、上記光触媒を含有する光触媒含有細胞接着層または光触媒含有細胞接着阻害層にエネルギーを照射することにより、これらの層自体に含有される光触媒の作用により、上記細胞接着材料または上記細胞接着阻害材料を分解または変性して、容易に上記細胞接着部および細胞接着阻害部を形成することができる。そのため、別途他の層等を形成する必要がなく、層形成が容易であり、製造効率等の面から好ましいものとすることができる。

[0016] また、第3の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されているものである。

[0017] 第4の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0018] 上記第3の態様および第4の態様によれば、上記光触媒含有細胞接着層または光触媒含有細胞接着阻害層にエネルギーを照射することにより、隣接する光触媒含有

層中の光触媒が励起されて、細胞接着材料または細胞接着阻害材料を分解または変性することができ、上記細胞接着部や細胞接着阻害部を容易に形成することが可能となるのである。また、これらの態様においては、表面に光触媒が露出している可能性が低いため、細胞培養領域上に細胞を付着させて細胞を培養する際に、経時で細胞が光触媒の影響を受ける可能性を低いものとすることができる、という利点も有する。

[0019] また、第5の態様としては、少なくとも細胞と接着する細胞接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されているものである。

[0020] またさらに、第6の態様としては、上記基材上に、少なくとも細胞と接着することを阻害する細胞接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0021] 上記第5の態様、および第6の態様としては、上記細胞接着層または細胞接着阻害層に、例えば少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層を有する光触媒含有層側基板等を用いて、エネルギーを照射することにより、光触媒含有層中に含有される光触媒の作用により、容易に上記細胞接着材料または細胞接着阻害材料を分解または変性させることができ、細胞接着部または細胞接着阻害部を形成することができる。またこの場合、細胞接着層または細胞接着阻害層中に光触媒を含有させる必要がないことから、細胞が経時で光触媒の影響を受けることがないものとすることができ、細胞を付着させて高品質な細胞培養基板とすることができる、という利点も有する。

[0022] ここで、本発明は、凸部を有する基材および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、上記細胞接着層と上記光触媒含有層とが対向するように配置した後、上記凸部を有する領域に所定の方法からエネルギー照射し、

上記細胞接着層中に含有される細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、エネルギーが未照射であり、細胞との接着性を有する細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とする細胞培養用パターンニング基板の製造方法を提供する。

[0023] 本発明によれば、上記細胞接着層に、上記光触媒含有層側基板を用いてエネルギー照射することにより、上記凸部を有する領域の細胞接着材料が分解または変性されて、細胞との接着性を有しない細胞接着阻害部とすることができる。したがって本発明により製造された細胞培養用パターンニング基板の細胞接着部、すなわち細胞培養領域に付着させた際、基材が有する凸部の高さや幅、および細胞との接着阻害性により隣接する細胞培養領域の細胞どうしが結合することを防ぐことができ、高精細なパターン状に細胞を培養させることが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。

[0024] また、本発明は、凸部を有する基材および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着阻害層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、上記細胞接着層と上記光触媒含有層とが対向するように配置した後、上記凸部を有する領域以外に所定の方向からエネルギー照射し、上記細胞接着阻害層中に含有される細胞接着阻害材料が分解または変性されて、細胞との接着性を有する細胞接着部と、エネルギーが未照射であり、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する細胞接着阻害部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とする細胞培養用パターンニング基板の製造方法を提供する。

[0025] 本発明によれば、上記細胞接着阻害層上の細胞培養領域に、上記光触媒含有層側基板を用いてエネルギー照射することにより、細胞接着阻害材料が分解または変性されて細胞との接着性が良好な細胞接着部とすることができる。一方、エネルギーが照射されていない凸部が形成されている領域は、細胞接着阻害材料が残存しているため、細胞接着阻害部とすることができる。したがって、本発明により製造された細胞培養用パターンニング基板の細胞接着部、すなわち細胞培養領域に細胞を付着さ

せて細胞を培養する際、上記凸部の高さや幅、および細胞接着阻害層の細胞接着阻害性によって、隣接する細胞培養領域に付着した細胞が結合することを防ぐことができ、高精細なパターン状に細胞を培養することが可能なものとすることができるのである。

発明の効果

- [0026] 本発明によれば、上記細胞培養領域が、上記凸部によって区画されていることから、この凸部の高さによって隣接する細胞培養領域に付着した細胞が結合することを防止することができ、目的とするパターン状に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。

図面の簡単な説明

- [0027] [図1]本発明の細胞培養用パターンニング基板の一例を示す概略断面図である。
[図2]本発明の細胞培養用パターンニング基板の細胞接着部および細胞接着阻害部を形成する方法の一例を示す工程図である。
[図3]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の一例を示す概略断面図である。
[図4]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の他の例を示す概略断面図である。
[図5]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の他の例を示す概略断面図である。
[図6]本発明の細胞培養用パターンニング基板の細胞接着部および細胞接着阻害部を形成する方法の一例を示す説明図である。
[図7]発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法の一例を示す工程図である。

符号の説明

- [0028] 1 … 基材
2 … 凸部
3 … 細胞培養領域
4 … 光触媒含有細胞接着層
6 … エネルギー
7 … 細胞接着阻害部
8 … 細胞接着層
9 … 細胞接着部

11… 基体

12… 光触媒含有層

13… 光触媒含有層側基板

発明を実施するための最良の形態

[0029] 本発明は、基材上に細胞を高精細なパターン状に接着し、培養させるために用いられる細胞培養用パターンニング基板、およびその製造方法に関するものである。以下、それぞれについてわけて説明する。

[0030] A. 細胞培養用パターンニング基板

まず、本発明の細胞培養用パターンニング基板について説明する。本発明の細胞培養用パターンニング基板は、凸部を有する基材と、上記基材表面に形成された細胞を培養する領域である細胞培養領域とを有し、上記細胞培養領域が、凸部を有する基材の上記凸部によって区画されていることを特徴とするものである。

[0031] 本発明の細胞培養用パターンニング基板は、例えば図1に示すように、基材1が有する凸部2によって、細胞を培養する領域である細胞培養領域3が区画されているものである。

[0032] 本発明によれば、隣接する細胞培養領域間に上記凸部が形成されていることから、この凸部の高さや幅等によって、隣接する細胞培養領域に付着された細胞どうしが付着することを防ぐことができる。これにより、目的とするパターン状に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。以下、本発明の細胞培養用パターンニング基板の各構成について説明する。

[0033] (基材)

まず、本発明に用いられる凸部を有する基材について説明する。本発明に用いられる、凸部を有する基材としては、凸部によって、隣接する細胞培養領域に付着した細胞どうしが結合しないようにすることが可能なものであれば特に限定されるものではなく、例えば例えば金属、ガラス、シリコン等の無機材料、およびプラスチックで代表される有機材料等を用いることができる。

[0034] また、基材の可撓性や透明性等は細胞培養用パターンニング基板の種類や用途等によって適宜選択される。

- [0035] また、凸部を形成する方法としては、一般的に基材を形成する方法等を用いることができる。例えば凸部を有する形状に材料を成型して形成する方法や、平坦な部材上に凸部の形状を有する部材を貼りあわせる方法、平坦な部材上に凸部を印刷する方法、平坦な部材にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により凸部を設ける方法、平坦な部材を削り凸部を設ける方法、平坦な部材にコーティング層を設け、そのコーティング層をエッチングすることにより凸部を設ける方法、凹凸形状を有する型を用いて熱プレスにより樹脂を成型する方法、硬化性樹脂を型に流し込み、硬化させて形成する方法等が挙げられる。
- [0036] 上記平坦な部材上に凸部の形状を有する部材を貼り合わせる方法を用いる場合には、平坦な部材と貼り合わせられる部材とを、それぞれ異なる材料からなるものを用いてもよく、また同一の部材のものを用いてもよい。例えば、上記平坦な部材を細胞接着性を有するものとし、凸部として貼り合わせられる部材を細胞と接着性を有しない材料を用いることにより、凸部が形成されていない領域を細胞と接着性を有する細胞培養領域、凸部が形成された領域を細胞と接着性を有しない細胞接着阻害領域とすること等も可能である。また、例えば平坦な部材に凸部を印刷する方法を用いる場合等においても、平坦な部材の材料と同様の材料からなるものを用いて凸部が印刷されたもの等であってもよく、細胞接着性を有する平坦な部材上に、細胞と接着性を有しない材料を用いて印刷されたもの等であってもよい。
- [0037] また、上記凸部の形状については、隣接する細胞培養領域に付着した細胞が結合することを阻害することが可能であれば特に限定されるものではなく、例えば断面形状が矩形状であってもよく、円状や半円状等であってもよく、またさらに三角形状等であってもよい。
- [0038] ここで、上記凸部の高さは、培養する細胞の大きさ等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.1\ \mu\text{m}$ ～ $1000\ \mu\text{m}$ 、中でも $1\ \mu\text{m}$ ～ $500\ \mu\text{m}$ 、特に $10\ \mu\text{m}$ ～ $200\ \mu\text{m}$ 程度とされることが好ましい。また、凸部の幅としては、通常 $10\ \mu\text{m}$ ～ $1000\ \mu\text{m}$ 、中でも $50\ \mu\text{m}$ ～ $800\ \mu\text{m}$ 、特に $100\ \mu\text{m}$ ～ $500\ \mu\text{m}$ 程度とされることが好ましい。ここで、上記幅とは、形成された凸部の底部の幅をいうこととする。このような幅や高さを有する凸部とすることにより、隣接する細胞培養領域上に付着した細胞が結合するこ

とを防止することができるからである。なお、上記凸部の幅は、隣接する凸部間の幅、すなわち細胞培養領域の幅より広いものであってもよく、また狭いものであってもよい。

[0039] (細胞培養領域)

次に、本発明の細胞培養用パターンニング基板における細胞培養領域について説明する。本発明における細胞培養領域は、細胞を培養するために用いられる領域であり、上記凸部により区画されている領域であって、その細胞培養領域の形状は、細胞の種類や目的等に合わせて適宜選択される。ここで、上記凸部により区画されているとは、細胞培養領域の周囲全面に上記凸部が形成されているものであってもよく、また細胞培養領域の周囲の一部のみに凸部が形成されて、細胞培養領域が区画されているもの等であってもよい。

[0040] 本発明において上記細胞培養領域は、細胞と良好な接着性を有するように形成されているものであれば特に限定されるものではなく、例えば生物化学的特性により細胞と接着性を有するものであってもよく、また物理化学的特性により細胞と接着性を有するもの等であってもよい。また、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着するものであればよい。

[0041] このような細胞培養領域は、例えば細胞と接着性を有する細胞接着材料を用いて基材上に細胞接着層を形成したもの等であってもよく、また上述したように基材として細胞と接着性を有するものを用いて細胞培養領域としてもよい。

[0042] 例えば、細胞と接着性を有し、基材としても用いられる材料としては、シリコーン樹脂、スチレン樹脂、アクリル樹脂、メタクリル樹脂、ポリエステル、ポリエチレン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、石英ガラス、ソーダガラス、アパタイト類、アルミナ類等が挙げられる。また、上記細胞接着層に用いられる細胞接着材料としては、一般的な細胞培養基板等に用いられる細胞接着材料を用いることができ、例えば物理化学的特性により細胞と接着する材料としては、例えば親水化ポリスチレン、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)や、ポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリエトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。また、生物化学的に細胞と接着性を有する細

胞接着材料としては、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD(アルギニン－グリシン－アスパラギン酸)配列含有ペプチド、YIGSR(チロシン－イソロイシン－グリシン－セリン－アルギニン)配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン等が挙げられる。

[0043] (細胞培養用パターンニング基板)

本発明の細胞培養用パターンニング基板は、上述した基材上に上記細胞培養領域を有するものであれば、特に限定されるものではないが、本発明においては、特に、上記凸部が形成されている領域が細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する細胞接着阻害部であり、細胞を培養する細胞培養領域が細胞と接着性を有する細胞接着部であることが好ましい。これにより、上記凸部の高さや幅だけでなく、凸部の細胞接着阻害性によっても、隣接する細胞培養領域の細胞どうしが付着することを防ぐことができ、より目的とするパターン状に細胞を培養することが可能となるからである。なお、上記凸部が形成されている領域が細胞接着阻害性を有するとは、上記凸部自体が細胞と接着阻害性を有する場合だけでなく、凸部上に細胞接着阻害性を有する層等が形成されて細胞接着阻害性を有する場合も含むものとする。

[0044] このような細胞接着部と細胞接着阻害部とを有する細胞培養用パターンニング基板の形成方法としては、例えば上述したように、細胞と接着阻害性を有する材料からなる基材上に、細胞と接着性を有する細胞接着層等を形成することにより、凸部は細胞接着阻害性を有し、細胞接着領域は細胞接着性を有するように形成されたもの等としてもよく、また細胞接着性を有する基材の凸部に、細胞と接着阻害性を有する細胞接着阻害層等を形成することにより形成されたもの等としてもよく、またさらに、凸部を有する基材の細胞培養領域に細胞接着層を形成し、凸部上に細胞接着阻害層をそれぞれ形成したもの等であってもよい。

[0045] ここで、本発明においては、特に、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞との接着性が変化する層を用いて、上記細胞接着部および上記細胞接着阻害部が形成されたものであることが好ましい。これにより、細胞接着部および細胞接着阻害部のパターンニングを容易に行うことが可能となるからである。

[0046] このようなエネルギー照射に伴う光触媒の作用により上記細胞接着部および上記

細胞接着阻害部とが形成されたものについて、以下説明する。このような態様としては、以下の6つの態様が挙げられる。それぞれの態様ごとに詳しく説明する。

[0047] (1) 第1の態様

まず、第1の態様としては、凸部を有する基材上に、少なくとも光触媒および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されている場合である。

[0048] 本態様によれば、光触媒含有細胞接着層が光触媒と、上記細胞接着材料とを含有することから、凸部が形成されている領域上の光触媒含有細胞接着層にエネルギーを照射することによって、光触媒の作用により細胞接着材料を分解または変性させて、細胞が接着しない細胞接着阻害部とすることができる。一方、エネルギーが照射されていない領域は、細胞接着材料が残存していることから、細胞との接着性が良好な細胞接着部とすることができる。したがって、特別な装置や複雑な工程等を必要とせず、パターン状にエネルギーを照射することにより、細胞接着部である細胞培養領域の中に、細胞との接着性を有しない細胞接着阻害部を容易に形成することが可能となる。

[0049] また、本態様によれば、上記細胞培養用パターンニング基板上の細胞培養領域に細胞を付着させて細胞培養基板とした際、上記凸部が形成されている細胞接着阻害部にのみエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した細胞を光触媒の作用により除去等することができる。これにより、高精細なパターン状に培養された細胞を維持できる、という利点も有する。

[0050] 以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層、および基材について説明し、さらに細胞接着阻害部の形成方法について説明する。

[0051] a. 光触媒含有細胞接着層

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層は、光触媒と、上記細胞接着材料とを少なくとも含有するものであり、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により上記細胞接着材料が

分解または変性されて細胞との接着性が低いものとなる層である。

[0052] このような光触媒含有細胞接着層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着層形成用塗工液を上記凸部を有する基材上に塗布すること等により、行うことができる。この光触媒含有細胞接着層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピンコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

[0053] この際、上記光触媒含有細胞接着層の膜厚としては、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m}\sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層に用いられる各材料について説明する。

[0054] (i) 細胞接着材料

まず、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される細胞接着材料について説明する。本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される細胞接着材料は、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。ここで、細胞と接着性を有するとは、細胞と良好に接着することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着することをいう。

[0055] 本態様に用いられる細胞接着材料は、このような細胞との接着性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞との接着性を有しなくなるものや、細胞との接着を阻害する細胞接着阻害性を有するものに変化するもの等が用いられる。

[0056] ここで、上記のような細胞と接着性を有する材料には、物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料と、生物化学的特性により細胞と接着性を有する材料との2種類がある。

[0057] 物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料の、細胞との接着性を決定する物理化学的な因子としては、表面自由エネルギーや、静電相互作用等が挙げられる

。例えば細胞との接着性が材料の表面自由エネルギーにより決定される場合には、材料が所定の範囲内の表面自由エネルギーを有すると細胞と材料との接着性が良好となり、その範囲を外れると細胞と材料との接着性が低下することとなる。このような表面自由エネルギーによる細胞の接着性の変化としては、例えば資料CMC出版バイオマテリアルの最先端 筏 義人(監修)p. 109下部に示されるような実験結果が知られている。このような因子により細胞との接着性を有する材料としては、例えば親水化ポリスチレン、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の表面の官能基が置換等されたり、分解されること等によって、表面自由エネルギーが変化し、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

[0058] また、静電相互作用等により細胞と材料との接着性が決定される場合、例えば材料が有する正電荷の量等によって細胞との接着性が決定されることとなる。このような静電相互作用により細胞との接着性を有する材料としては、例えばポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリエトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記材料が分解または変性されることによって、例えば表面に存在する正電荷量を変化させることができ、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

[0059] また、生物学的特性により細胞と接着性を有する材料としては、特定の細胞と接着性が良好なもの、または多くの細胞と接着性が良好なもの等が挙げられ、具体的には、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列含有ペプチド、YIGSR(チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン)配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の構造の一部を破壊したり、主鎖を破壊すること等によって、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとするこ

きる。

[0060] このような細胞接着材料は、上記材料の種類等によって異なるものであるが、光触媒含有細胞接着層中に通常0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%含有されることが好ましい。これにより、細胞接着材料を含有する領域を細胞との接着性が良好な領域とすることができるからである。

[0061] (ii) 光触媒

次に、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される光触媒について説明する。本態様に用いられる光触媒は、上述した細胞接着材料を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性させることが可能なものであれば、特に限定されるものではない。

[0062] ここで、後述するような酸化チタンに代表される光触媒の作用機構は、必ずしも明確なものではないが、光の照射によって生成したキャリアが、近傍の化合物との直接反応、あるいは、酸素、水の存在下で生じた活性酸素種によって、有機物の化学構造に変化を及ぼすものと考えられている。本態様においては、このキャリアが上述した細胞接着材料に作用を及ぼすものであると思われる。

[0063] 本態様に用いられる光触媒として、具体的には、光半導体として知られる例えば二酸化チタン(TiO_2)、酸化亜鉛(ZnO)、酸化スズ(SnO_2)、チタン酸ストロンチウム(SrTiO_3)、酸化タングステン(WO_3)、酸化ビスマス(Bi_2O_3)、および酸化鉄(Fe_2O_3)を挙げることができ、これらから選択して1種または2種以上を混合して用いることができる。

[0064] 本態様においては、特に二酸化チタンが、バンドギャップエネルギーが高く、化学的に安定で毒性もなく、入手も容易であることから好適に使用される。二酸化チタンには、アナターゼ型とルチル型があり本態様ではいずれも使用することができるが、アナターゼ型の二酸化チタンが好ましい。アナターゼ型二酸化チタンは励起波長が380nm以下にある。

[0065] このようなアナターゼ型二酸化チタンとしては、例えば、塩酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(石原産業(株)製STS-02(平均粒径7nm)、石原産業(株)製ST-K01)、硝酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(日産化学(株)製TA-15(平均

粒径12nm))等を挙げることができる。

[0066] 光触媒の粒径は小さいほど光触媒反応が効果的に起こるので好ましく、平均粒径が50nm以下が好ましく、20nm以下の光触媒を使用するのが特に好ましい。

[0067] 本態様の光触媒含有細胞接着層における光触媒の含有量は、5～95重量%、好ましくは10～60重量%、さらに好ましくは20～40重量%の範囲で設定することができる。

これにより、光触媒含有細胞接着層のエネルギー照射された領域の細胞接着材料を分解または変性することが可能となるからである。

[0068] ここで、本態様に用いられる光触媒は、例えば高い親水性を有すること等によって、細胞との接着性が低いものであることが好ましい。これにより、上述した細胞接着材料が分解等されて光触媒が露出した領域を、細胞との接着性が低い領域として用いることが可能となるからである。

[0069] (iii) その他

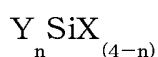
本態様においては、光触媒含有細胞接着層中に、上記細胞接着材料や光触媒だけでなく、必要に応じて例えば、強度や耐性等を向上させるバインダ等を含有するものであってもよい。本態様においては、特にバインダとして、少なくともエネルギー照射された後に、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する材料が用いられることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着阻害部の細胞との接着性を低いものとすることができるからである。このような材料としては、例えばエネルギー照射される前から上記細胞接着阻害性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなるものであってもよい。

[0070] 本態様においては、特にエネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなる材料をバインダとして用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の領域においては、上記細胞接着材料の細胞との接着性を阻害することがなく、エネルギー照射された領域のみを、細胞との接着性が低いものとすることができるからである。

[0071] このようなバインダとして用いられる材料としては、例えば主骨格が上記の光触媒の

光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような有機置換基を有するものが好ましく、例えば、(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)撥水性や撥油性に優れた反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

[0072] 上記の(1)の場合、一般式：

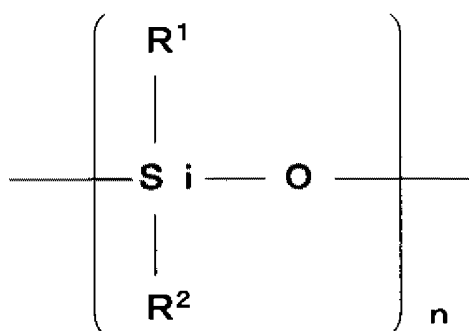


(ここで、Yはアルキル基、フルオロアルキル基、ビニル基、アミノ基、フェニル基もしくはエポキシ基、またはこれらを含む有機基であり、Xはアルコキシル基、アセチル基またはハロゲンを示す。nは0～3までの整数である。)

で示される珪素化合物の1種または2種以上の加水分解縮合物もしくは共加水分解縮合物であるオルガノポリシロキサンであることが好ましい。なお、ここでYで示される有機基の炭素数は1～20の範囲内であることが好ましく、また、Xで示されるアルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基であることが好ましい。

[0073] また、上記の(2)の反応性シリコーンとしては、下記一般式で表される骨格をもつ化合物を挙げることができる。

[0074] [化1]



[0075] ただし、nは2以上の整数であり、 R^1 、 R^2 はそれぞれ炭素数1～20の置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アリールあるいはシアノアルキル基であり、モル比で全体の40%以下がビニル、フェニル、ハロゲン化フェニルである。また、 R^1 、 R^2 がメチル基のものが表面エネルギーが最も小さくなるので好ましく、モル比でメチル基が60%以上であることが好ましい。また、鎖末端もしくは側鎖には、分子鎖中に少なくとも1個

以上の水酸基等の反応性基を有する。上記のような材料を用いることによって、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、エネルギー照射された領域の表面を高い親水性を有するものとすることができる。これにより、細胞との接着が阻害され、エネルギー照射された領域には細胞が接着しないものとすることができるからである。

[0076] また、上記のオルガノポリシロキサンとともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物をバインダに混合してもよい。

[0077] 上記材料を細胞接着阻害材料として用いる場合、エネルギーが照射される前の水との接触角が 15° ～ 120° 、中でも 20° ～ 100° の範囲内となるものであることが好ましい。これにより、上記細胞接着材料の細胞との接着性を阻害することのないものとすることができるからである。

[0078] また、この細胞接着阻害材料にエネルギーが照射された場合には、水との接触角が 10° 以下となるものであることが好ましい。上記範囲とすることにより、高い親水性を有するものとすることができ、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。

[0079] なお、ここでいう水との接触角は、水、もしくは同等の接触角を有する液体との接触角を接触角測定器(協和界面科学(株)製CA-Z型)を用いて測定(マイクロシリンジから液滴を滴下して30秒後)し、その結果から、もしくはその結果をグラフにして得たものである。

[0080] また、本態様においては、エネルギーが照射された領域の濡れ性の変化を起こさせること等により、細胞との接着性が低下する、もしくはそのような変化を補助する分解物質等を含有するものであってもよい。

[0081] このような分解物質としては、例えばエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解等されて、親水性となること等により、細胞との接着性が低下する界面活性剤等を挙げることができる。具体的には、日光ケミカルズ(株)製NIKKOL BL、BC、BO、BBの各シリーズ等の炭化水素系、デュボン社製ZONYL FSN、FSO、旭硝子(株)製サーフロンS-141、145、大日本インキ化学工業(株)製メガファックF-141、144、ネオス(株)製フタージェントF-200、F251、ダイキン工業(株)製ユニダインD S-401、402、スリーエム(株)製フロラードFC-170、176等のシリコーン系の非イ

オン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

[0082] また、界面活性剤の他にも、ポリビニルアルコール、不飽和ポリエステル、アクリル樹脂、ポリエチレン、ジアリルフタレート、エチレンプロピレンジエンモノマー、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、ポリウレタン、メラミン樹脂、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、ポリイミド、スチレンブタジエンゴム、クロロプレンゴム、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ナイロン、ポリエステル、ポリブタジエン、ポリベンズイミダゾール、ポリアクリルニトリル、エピクロルヒドリン、ポリサルファイド、ポリイソプレン等のオリゴマー、ポリマー等を挙げることができる。

[0083] 本態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着層中に5重量%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。

[0084] b. 基材

次に、本態様に用いられる基材について説明する。本態様に用いられる基材としては、上述した凸部を有するものであれば、特に限定されるものではない。このような基材としては、例えば金属、ガラス、シリコン等の無機材料、およびプラスチックで代表される有機材料等を用いることができる。

[0085] また、基材の可撓性等は細胞培養用パターンニング基板の種類や用途等によって適宜選択される。また、上記基材の透明性は、細胞培養用パターンニング基板の種類や、上記細胞接着材料を分解または変性させるために照射されるエネルギーの照射方向等によって、適宜選択され、例えば基材が遮光部等を有しており、上記エネルギーの照射が、基材側から行われる場合等には、基材が透明性を有するものとされる。

[0086] また、上述したような凸部を形成する方法としては、上記凸部が形成可能な方法であれば特に限定されるものではなく、一般的に基材を形成する方法等を用いることができ、上述した方法と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0087] ここで、本態様においては、上記基材が照射されるエネルギーに対して透過性を有する場合、細胞培養領域にエネルギーが照射されないよう、上記基材と光触媒含有細胞接着層との間、かつ細胞培養領域に相当する位置に遮光部が形成されていて

もよい。これにより、凸部が形成されている領域に、エネルギーを照射して細胞接着阻害部を形成する際に、フォトマスク等を用いることなく、基材裏面側から全面にエネルギーを照射することにより、凸部上に形成された上記光触媒含有細胞接着層中の細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。

[0088] 本態様に用いることが可能な遮光部としては、細胞接着阻害部を形成する際に、細胞培養用パターンニング基板に照射されるエネルギーを遮断することが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えばスパッタリング法、真空蒸着法等により厚み1000～2000Å程度のクロム等の金属薄膜を形成し、この薄膜をパターンニングすることにより形成されてもよい。このパターンニングの方法としては、スパッタ等の通常のパターンニング方法を用いることができる。

[0089] また、樹脂バインダ中にカーボン微粒子、金属酸化物、無機顔料、有機顔料等の遮光性粒子を含有させた層をパターン状に形成する方法であってもよい。用いられる樹脂バインダとしては、ポリイミド樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ゼラチン、カゼイン、セルロース等の樹脂を1種または2種以上混合したものや、感光性樹脂、さらにはO/Wエマルジョン型の樹脂組成物、例えば、反応性シリコーンをエマルジョン化したもの等を用いることができる。このような樹脂製遮光部の厚みとしては、0.5～10μmの範囲内で設定することができる。このような樹脂製遮光部のパターンニングの方法は、フォトリソ法、印刷法等一般的に用いられている方法を用いることができる。

[0090] c. 細胞接着阻害部の形成方法

次に、本態様における細胞接着阻害部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図2に示すように、凸部を有する基材1上に形成された上記光触媒含有細胞接着層4に、例えばフォトマスク5等を用いて、細胞接着阻害部を形成するパターン状、すなわち凸部が形成されている領域にエネルギー6を照射することにより(図2(a))、エネルギー照射された領域の光触媒含有細胞接着層4中の細胞接着性材料が分解または変性されて、細胞と接着性を有しない細胞接着阻害部7を形成することができる(図2(b))。この際、細胞接着阻害部には、光触媒、および細胞接着材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。

- [0091] ここで、本態様でいうエネルギー照射(露光)とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。
- [0092] 通常このようなエネルギー照射に用いる光の波長は、400nm以下の範囲、好ましくは380nm以下の範囲から設定される。これは、上述したように光触媒として用いられる好ましい光触媒が二酸化チタンであり、この二酸化チタンにより光触媒作用を活性化させるエネルギーとして、上述した波長の光が好ましいからである。
- [0093] このようなエネルギー照射に用いることができる光源としては、水銀ランプ、メタルハライドランプ、キセノンランプ、エキシマランプ、その他種々の光源を挙げることができる。
- [0094] 上述したような光源を用い、フォトマスクを介したパターン照射により行う方法の他、エキシマ、YAG等のレーザを用いてパターン状に描画照射する方法を用いることも可能である。また、上述したように、基材が細胞接着部と同じパターン状に遮光部を有する場合には、基材側からエネルギーを全面に照射することにより、行うことができる。この場合、フォトマスク等が必要なく、位置あわせ等の工程が必要ない、という利点を有する。
- [0095] また、エネルギー照射に際してのエネルギーの照射量は、光触媒の作用によって細胞接着材料が分解または変性されるのに必要な照射量とする。
- [0096] この際、光触媒が含有される層を加熱しながらエネルギー照射することにより、感度を上昇させることが可能となり、効率的に細胞接着材料を分解または変性させることができる点で好ましい。具体的には30℃～80℃の範囲内で加熱することが好ましい。
- [0097] 本態様におけるフォトマスクを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有細胞接着層側のいずれの方向からエネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有細胞接着層側からエネルギー照射を行う必要がある。
- [0098] (2)第2の態様
- 次に、第2の態様としては、上述した凸部を有する基材上に、少なくとも光触媒およ

び、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0099] 本態様においては、上記光触媒含有細胞接着阻害層が、光触媒と、上記細胞接着阻害材料を含有することから、光触媒含有細胞接着阻害層の凸部以外の領域に、エネルギー照射することによって、層中に含有される光触媒の作用により、細胞接着阻害材料を分解または変性させることができ、エネルギーが照射された領域を細胞との接着性を有する細胞接着部、すなわち細胞培養領域とすることができるのである。またこの際、エネルギーが照射されていない凸部が形成されている領域については、細胞接着阻害材料が残存しており、細胞接着阻害性を有するものとすることができるのである。

[0100] 以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層、および基材について説明し、さらに細胞接着部の形成方法について説明する。

[0101] a. 光触媒含有細胞接着阻害層

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層は、光触媒および上記細胞接着阻害材料を含有する層であり、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、細胞接着阻害材料が分解または変性されて細胞との接着性を有するものとなる層である。

[0102] このような光触媒含有細胞接着阻害層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液を上記凸部を有する基材上に塗布すること等により行うことができる。この光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピンコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

[0103] この際、上記光触媒含有細胞接着阻害層の膜厚としては、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$

程度、中でも0.1 μm ～0.3 μm 程度とすることができる。

[0104] 以下、上記光触媒含有細胞接着阻害層に用いられる材料について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒については、上述した第1の態様で用いられる光触媒と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0105] (i)細胞接着阻害材料

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層に含有される細胞接着阻害材料について説明する。

[0106] 本態様に用いられる細胞接着阻害材料は、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。

[0107] ここで、上記細胞接着阻害性を有するとは、細胞が細胞接着阻害材料と接着することを阻害する性質を有することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞との接着を阻害する性質を有することをいう。

[0108] 本態様に用いられる細胞接着阻害材料は、このような細胞接着阻害性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞接着阻害性を有しなくなるものや、細胞との接着性が良好となるものが用いられる。

[0109] このような細胞接着阻害材料としては、例えば水和能の高い材料を用いることができる。水和能の高い材料は、周りに水分子が集まった水和層が形成され、通常、このような水和能の高い物質は水分子との接着性の方が細胞との接着性より高いことから、細胞は上記水和能の高い材料と接着することができず、細胞との接着性が低いものとなるのである。ここで、上記水和能とは、水分子と水和する性質をいい、水和能が高いとは、水分子と水和しやすいことをいうこととする。

[0110] 上記水和能が高く細胞接着阻害材料として用いられる材料としては、例えばポリエチレングリコールや、ベタイン構造等を有する両性イオン材料、リン脂質含有材料等が挙げられる。このような材料を上記細胞接着阻害材料として用いた場合、後述するエネルギー照射工程においてエネルギーが照射された際、光触媒の作用によって、上記細胞接着阻害材料が分解または変質等され、表面の水和層が離れることにより、上記細胞接着阻害性を有しないものとすることができるのである。

- [0111] また、本態様においては、上記細胞接着阻害材料として、光触媒の作用により分解されるような、撥水性または撥油性の有機置換基を有する界面活性剤も用いることができる。このような界面活性剤としては、例えば、日光ケミカルズ(株)製NIKKOL B L、BC、BO、BBの各シリーズ等の炭化水素系、デュポン社製ZONYL FSN、FS O、旭硝子(株)製サーフロンS-141、145、大日本インキ化学工業(株)製メガファックF-141、144、ネオス(株)製フタージェントF-200、F251、ダイキン工業(株)製ユニダインDS-401、402、スリーエム(株)製フロラードFC-170、176等のフッ素系あるいはシリコン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。
- [0112] このような材料を細胞接着阻害材料として用いて光触媒含有細胞接着阻害層を形成した際に、表面に上記細胞接着阻害材料が偏在することとなる。これにより、表面の撥水性や撥油性を高いものとすることができ、細胞との相互作用が小さく、細胞との接着性が低いものとするのできる。また、この層にエネルギー照射工程において、エネルギーが照射された場合には、光触媒の作用によって、容易に分解されて上記光触媒が露出し、上記細胞接着阻害性を有しないものとするのできる。である。
- [0113] 本態様においては、上記細胞接着阻害材料として、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞との接着性が良好となるものが用いられることが特に好ましく、このような細胞接着阻害材料としては、例えば撥油性や撥水性を有する材料が挙げられる。
- [0114] 細胞接着阻害材料として、上記撥水性または撥油性を有する材料を用いた場合には、細胞接着阻害材料の撥水性または撥油性によって、細胞と細胞接着阻害材料との間における、例えば疎水性相互作用等の相互作用が小さく、細胞との接着性を低いものとするのできる。
- [0115] このような撥水性または撥油性を有する材料としては、例えば骨格が光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するもの等を挙げることができ。

- [0116] 骨格が光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するものとしては、例えば、上述した第1の態様にバインダ等として用いられる(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。
- [0117] このような物質は、第1の態様においてバインダとして用いられる場合には、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等をエネルギー照射に伴う光触媒の作用により、高い割合で分解または変性させて、超親水性とすることにより、細胞接着阻害性を有する材料として用いられるが、本態様においては、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により完全には分解または変性等されない程度、エネルギーを照射することによって、エネルギーが照射された領域を細胞との接着性を有するものとすることができる。また、上記のオルガノポリシロキサン等とともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物を別途混合してもよい。
- [0118] 上記撥水性や撥油性を有する材料を細胞接着阻害材料として用いる場合、通常、水との接触角が 80° 以上、中でも 100° ～ 130° 範囲内である材料を細胞接着阻害材料として用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の光触媒含有細胞接着阻害層を、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。なお、上記角度の上限は、平坦な基材上での細胞接着阻害材料の水との接触角の上限であり、例えば凹凸を有するような基材上での上記細胞接着阻害材料の水との接触角を測定した場合には、例えば、資料ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・アプライド・フィジックス、パート2、32巻、L614～L615、1993年 Ogawaら、に示されるように上限が 160° 程度となる場合もある。
- [0119] また、この細胞接着阻害材料にエネルギーを照射し、細胞との接着性を有するものとする場合には、水との接触角が 10° ～ 40° 、中でも 15° ～ 30° の範囲内とするようにエネルギーが照射されることが好ましい。これにより、エネルギー照射された後の光触媒含有細胞接着阻害層の細胞との接着性を高いものとすることができるから

である。なお、ここでいう水との接触角は、上述した方法により得られるものである。

[0120] このような細胞接着阻害材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、細胞接着阻害材料を含有する領域を細胞との接着性が低い領域とすることができからである。

[0121] なお、上記細胞接着阻害材料は、界面活性を有することが好ましい。例えば、上記細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液等を塗布した後、乾燥させる際等に、塗膜表面に偏在する割合が高まり、結果として良好な細胞接着阻害性を得られるからである。

[0122] (ii)その他

また、本態様の光触媒含有細胞接着阻害層には、例えば層を形成する際の塗工性や、層を形成した際の強度や耐性等、必要とされる特性に合わせてバインダ等が含有されていてもよい。また、上記細胞接着阻害材料が上記バインダとしての機能を果たすものであってもよい。

[0123] このようなバインダとしては、例えば主骨格が上記光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものを用いることができる。具体的には、有機置換基を有しない、もしくは接着性に影響を与えない程度の有機置換基を有するポリシロキサン等を挙げることができ、これらはテトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン等を加水分解、重縮合することにより得ることができる。

[0124] 本態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着阻害層中に5重量%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層の形成を容易としたり、光触媒含有細胞接着阻害層に強度を付与する等、特性を発揮することが可能となるからである。

[0125] また、本態様においては特に、上記光触媒含有細胞接着阻害層中に、少なくともエネルギー照射された後に、細胞と接着性を有する細胞接着材料が含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギーが照射された領域である細胞接着部、すなわち細胞培養領域の細胞との接着性をより良好なものと

することができるからである。このような細胞接着材料としては、上記バインダとして用いられるものであってもよく、また、バインダと別に使用されるものであってもよい。また例えば、エネルギー照射される前から細胞と良好な接着性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞と良好な接着性を有するものとなるものであってもよい。ここで、上記細胞と接着性を有するとは、細胞と良好に接着することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着することをいう。

[0126] 本態様においては、少なくともエネルギー照射された後に、上記細胞接着材料が細胞と良好な接着性を有するものであれば、細胞との接着が、例えば疎水性相互作用や、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力等の物理的相互作用により良好なものとされるものであってもよく、生物学的特性により、良好なものとされるものであってもよい。

[0127] 本態様においては、このような細胞接着材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギー照射された領域である細胞接着部の細胞との接着性をより良好なものとすることができるからである。また、エネルギー照射される前から細胞と良好な接着性を有する材料を細胞接着材料として用いる場合には、エネルギー照射されない領域、すなわち細胞接着阻害部となる領域における上記細胞接着阻害材料の細胞接着阻害性を阻害しない程度含有されることが好ましい。

[0128] b. 基材

次に、本態様に用いられる基材について説明する。本態様に用いられる基材は、上述した凸部を有するものであれば、特に限定されるものではなく、上記第1の態様で説明したような基材とすることができる。

[0129] ここで、本態様においては、上記基材が照射されるエネルギーに対して透過性を有する場合、基材上の凸部が形成されている領域に、遮光部が形成されていてもよい。これにより、細胞培養領域上の上記光触媒含有細胞接着阻害層にエネルギーを照射して、細胞接着部とする際に、フォトマスク等を用いる必要がなく、基材裏面側から

全面にエネルギーを照射することにより、容易に細胞接着部を形成することができるからである。なお、本態様においては、上記基材が有する凸部の他に、遮光部を別途形成してもよいが、上記基材が有する凸部として、この遮光部を形成してもよい。これにより、製造効率よく細胞培養用パターンニング基板を形成することができるからである。

ここで、本態様に用いられる基材の種類や、上記遮光部の形成方法、種類等については、第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0130] c. 細胞接着部の形成方法

次に、細胞接着部の形成方法について説明する。本態様においては、細胞培養領域上の光触媒含有細胞接着阻害層に、例えばフォトマスク等を用いてエネルギーを照射する。これにより、エネルギー照射された領域の細胞接着阻害部を分解または変性することができ、細胞との接着性を有する細胞接着部(細胞培養領域)とすることができるからである。この際、細胞接着部には、光触媒や、細胞接着阻害材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。一方、エネルギーが照射されていない領域である凸部が形成されている領域においては、細胞接着阻害材料が残存し、細胞との接着性を有しない細胞接着阻害部とすることができる。

[0131] ここで、本態様でいうエネルギー照射(露光)とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

[0132] なお、このようなエネルギー照射の方法等については、上述した第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0133] (3) 第3の態様

次に、第3の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されているものである。

[0134] 本態様においては、上記細胞接着層が、光触媒含有層上に形成されていることから、凸部が形成された領域にエネルギーを照射することによって、細胞接着層中の細胞接着材料が、隣接する光触媒含有層中の光触媒の作用により分解または変性されて、その領域の細胞との接着性が低下した細胞接着阻害部を形成することが可能となるのである。この際、細胞接着阻害部には、例えば上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着材料が少量含有されている、または細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは細胞接着層が完全に分解除去されて光触媒含有層が露出すること等となる。また、上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

[0135] また、本態様によれば、上記細胞培養用パターンニング基板上の細胞培養領域に細胞を付着させて細胞培養基板とした際、上記凸部が形成されている細胞接着阻害部にのみエネルギー照射することにより、上記光触媒含有層の作用により、上記細胞接着阻害部に付着した細胞を除去等することができる。これにより、高精細なパターン状に培養された細胞を維持できる、という利点も有する。

[0136] 以下、本態様の各構成について説明する。なお、本態様に用いられる基材、および本態様における細胞接着阻害部の形成方法については、上述した第1の態様と同様であるので、ここでの説明は省略する。

[0137] a. 細胞接着層

まず、本態様に用いられる細胞接着層について説明する。本態様に用いられる細胞接着層は、少なくとも細胞との接着性を有する細胞接着材料を有する層であり、一般的に細胞との接着性を有する層として用いられる層を用いることができる。

[0138] 具体的な細胞接着材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着層に用いられる細胞接着材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本態様の細胞接着層にも、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着層で説明した細胞接着阻害性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着阻害部の細胞との接着性を低いものとすることが可能となるからである。

- [0139] また、このような細胞接着層の形成は、上記細胞接着材料を含有する細胞接着層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により塗布すること等により行うことができ、第1の態様の光触媒含有細胞接着層の形成方法と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。なお、たんぱく質等の比較的高価な細胞接着材料を用いる場合等には、細胞接着層の形成に吸着法が適用される場合もある。
- [0140] なお、このような細胞接着層の膜厚は、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.001\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.01\mu\text{m}\sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。
- [0141] b. 光触媒含有層
- 次に、本態様に用いられる光触媒含有層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層は、少なくとも光触媒を含有する層であれば、特に限定されるものではなく、光触媒のみからなる層であってもよく、またバインダ等、他の成分を含有する層等であってもよい。
- [0142] 本態様で使用する光触媒としては、第1の態様における光触媒含有細胞接着層に用いられるものと同様とすることができ、本態様においても特に酸化チタンが用いられることが好ましい。
- [0143] ここで、光触媒のみからなる光触媒含有層を用いた場合には、上記細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性に対する効率が向上し、処理時間の短縮化等のコスト面で有利である。一方、光触媒とバインダとからなる光触媒含有層を用いた場合には、光触媒含有層の形成が容易であるという利点を有する。
- [0144] 光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、CVD法、真空蒸着法等の真空製膜法を用いる方法を挙げることができる。真空製膜法により光触媒含有層を形成することにより、均一な膜でかつ光触媒のみを含有する光触媒含有層とすることが可能であり、これにより細胞接着材料を均一に分解または変性させることが可能であり、かつ光触媒のみからなることから、バインダを用いる場合と比較して効率的に細胞接着材料を分解または変性させることが可能となる。
- [0145] また、光触媒のみからなる光触媒含有層の形成方法の他の例としては、例えば光触媒が二酸化チタンの場合は、基材上に無定形チタニアを形成し、次いで焼成によ

り結晶性チタニアに相変化させる方法等が挙げられる。ここで用いられる無定形チタニアとしては、例えば四塩化チタン、硫酸チタン等のチタンの無機塩の加水分解、脱水縮合、テトラエトキシチタン、テトライソプロポキシチタン、テトラ n -プロポキシチタン、テトラブトキシチタン、テトラメトキシチタン等の有機チタン化合物を酸存在下において加水分解、脱水縮合によって得ることができる。次いで、400℃～500℃における焼成によってアナターゼ型チタニアに変性し、600℃～700℃の焼成によってルチル型チタニアに変性することができる。

[0146] また、バインダを用いる場合は、バインダの主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものが好ましく、例えばこのようなバインダとしては、上述した細胞接着層の項で用いられるオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

[0147] このようにオルガノポリシロキサンをバインダとして用いた場合は、上記光触媒含有層は、光触媒とバインダであるオルガノポリシロキサンを必要に応じて他の添加剤とともに溶剤中に分散して塗布液を調製し、この塗布液を基材上に塗布することにより形成することができる。使用する溶剤としては、エタノール、イソプロパノール等のアルコール系の有機溶剤が好ましい。塗布はスピンコート、スプレーコート、ディップコート、ロールコート、ビードコート等の公知の塗布方法により行うことができる。バインダとして紫外線硬化型の成分を含有している場合、紫外線を照射して硬化処理を行うことにより光触媒含有層を形成することができる。

[0148] また、バインダとして無定形シリカ前駆体を用いることができる。この無定形シリカ前駆体は、一般式 SiX_4 で表され、Xはハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

[0149] 具体的には、テトラエトキシシラン、テトライソプロポキシシラン、テトラ n -プロポキシシラン、テトラブトキシシラン、テトラメトキシシラン等が挙げられる。また、この場合には、無定形シリカの前駆体と光触媒の粒子とを非水性溶媒中に均一に分散させ、透明基材上に空気中の水分により加水分解させてシラノールを形成させた後、常温で脱水縮重合することにより光触媒含有層を形成できる。シラノールの脱水縮重合を1

00℃以上で行えば、シラノールの重合度が増し、膜表面の強度を向上できる。また、これらの結着剤は、単独あるいは2種以上を混合して用いることができる。

[0150] 光触媒含有層中の光触媒の含有量は、5～60重量%、好ましくは20～40重量%の範囲で設定することができる。また、光触媒含有層の厚みは、0.05～10 μm の範囲内が好ましい。

[0151] また、光触媒含有層には上記の光触媒、バインダの他に、上述した細胞接着層に用いられる界面活性剤等を含むさせることもできる。

[0152] ここで、本態様においては上記光触媒含有層は、その表面は細胞との接着性が、例えば表面が親水性であること等によって細胞との接着性が低いことが好ましい。これにより、上記細胞接着層が分解等されて光触媒含有層が露出した場合に、その領域を細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

[0153] また、本態様においては、上述したように上記光触媒含有層上に遮光部が形成されていてもよい。これにより、上記細胞接着層の全面にエネルギーを照射した場合に、遮光部が形成された領域上の光触媒は励起されず、遮光部が形成された領域以外の細胞接着層中に含有される細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。またこの場合、遮光部が形成されている領域の光触媒は励起されないことから、エネルギーが照射される方向が特に限定されない、という利点を有する。

[0154] このような遮光部としては、第1の態様で説明したものと同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0155] (4)第4の態様

次に、第4の態様としては、上記基材上に、少なくとも光触媒を含む光触媒含有層および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含む細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0156] 本態様においては、上記細胞接着阻害層が光触媒含有層上に形成されていることから、凸部が形成されている領域以外の領域に形成されている細胞接着阻害層にエネルギー照射をすることにより、光触媒含有層中に含有される光触媒が励起され、細

胞接着阻害層中の細胞接着阻害材料を分解または変性することができ、細胞接着部(細胞培養領域)を形成することができるのである。またこの際、エネルギーが照射されず、細胞接着阻害材料が残存する凸部が形成された領域を細胞接着阻害部とすることができる。

[0157] ここで、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着阻害部に含有される細胞接着阻害材料の量と比較して、細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部中にはその細胞接着阻害材料が少量含有されている、または細胞接着阻害材料の分解物等が含有されていることや、細胞接着阻害材料が完全に分解されて光触媒含有層が露出すること等となる。また、上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていることとなる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射された後に、細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞接着部のみに、高精細に細胞を接着させることが可能となるからである。

[0158] 以下、本態様に用いられる細胞接着阻害層について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒含有層については、上述した第3の態様で説明したものと同様のものを用いることができ、また本態様に用いられる基材、および細胞接着部の形成方法については、上記の第2の態様と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。

[0159] a. 細胞接着阻害層

本態様に用いられる細胞接着阻害層は、上記光触媒含有層上に形成されるものであり、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有するものであれば特に限定されるものではない。

[0160] 本態様においては、このような層が形成可能であれば、その形成方法等は特に限

定されるものではなく、例えば、上記細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により上記光触媒含有層上に塗布することにより、形成することができる。また、このような細胞接着阻害層の膜厚は、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m}\sim 0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

[0161] ここで、本態様において形成される細胞接着阻害層に用いられる具体的な細胞接着阻害材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着阻害層に用いられる細胞接着阻害材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本態様の細胞接着阻害層にも、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着阻害層で説明した細胞接着性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着部(細胞培養領域)の細胞との接着性を高いものとすることができるからである。

[0162] (5)第5の態様

また、第5の態様としては、少なくとも細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、上記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着材料が分解または変性されているものである。

[0163] 本態様においては、細胞接着層と、上記光触媒含有層とを対向させて配置し、細胞接着阻害部を形成するパターン状、すなわち上記凸部の形成された領域にエネルギーを照射することにより、光触媒含有層中の光触媒の作用により、細胞接着層中の細胞接着材料が分解または変性されて、細胞接着阻害部を形成することが可能となるのである。

[0164] また、本態様によれば、上記細胞培養用パターンニング基板上の細胞培養領域に細胞を付着させて細胞培養基板とした際、上記凸部が形成されている細胞接着阻害部に、上記光触媒含有層側基板を用いてエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した細胞を光触媒の作用により除去等することができ、高精細なパターン状に培養された細胞を維持できる、という利点も有する。

[0165] 以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板と、その光触媒含有層側基板を用

いて細胞接着阻害部を形成する方法について説明する。なお、本態様に用いられる細胞接着層については、上述した第3の態様で用いられるものと同様であるので、ここでの説明は省略する。

[0166] a. 光触媒含有層側基板

まず、本態様に用いられる光触媒を含有する光触媒含有層を有する光触媒含有層側基板について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層側基板としては、通常、光触媒を含有する光触媒含有層を有するものであり、通常、基体と、その基体上に光触媒含有層が形成されているものである。この光触媒含有層側基板は、例えばパターン状に形成された光触媒含有層側遮光部やプライマー層等を有していてもよい。以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板の各構成について説明する。

[0167] (i) 光触媒含有層

まず、光触媒含有層側基板に用いられる光触媒含有層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層は、光触媒含有層中の光触媒が、近接する細胞接着層中の細胞接着材料を分解または変性させるような構成であれば、特に限定されるものではなく、光触媒とバインダとから構成されているものであってもよく、光触媒単体で製膜されたものであってもよい。また、その表面の特性は特に親液性であっても撥液性であってもよい。

[0168] 本態様において用いられる光触媒含有層は、基体上に全面に形成されたものであってもよいが、例えば図3に示すように、基体11上に光触媒含有層12がパターン上に形成されたものであってもよい。

[0169] このように光触媒含有層をパターン状に形成することにより、細胞接着阻害部を形成するためにエネルギーを照射する際に、フォトマスク等を用いるパターン照射をする必要がなく、全面に照射することにより、細胞接着層に含有される細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部を形成することができる。

[0170] この光触媒含有層のパターニング方法は、特に限定されるものではないが、例えばフォトリソグラフィ法等により行うことが可能である。

[0171] また、実際に光触媒含有層に面する細胞接着層上の部分のみの、細胞接着材料が分解または変性されるものであるので、エネルギーの照射方向は上記光触媒含有

層と細胞接着層とが面する部分にエネルギーが照射されるものであれば、いかなる方向から照射されてもよく、さらには、照射されるエネルギーも特に平行光等の平行なものに限定されないという利点を有するものとなる。

[0172] ここで、本態様で用いられる光触媒含有層については、上述した第3の態様で説明した光触媒含有層と同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0173] (ii) 基体

次に、光触媒含有層側基板に用いられる基体について説明する。通常、光触媒含有層側基板は、少なくとも基体とこの基体上に形成された光触媒含有層とを有するものである。この際、用いられる基体を構成する材料は、後述するエネルギーの照射方向や、得られるパターン形成体が透明性を必要とするか等により適宜選択される。

[0174] また本態様に用いられる基体は、可撓性を有するもの、例えば樹脂製フィルム等であつてもよいし、可撓性を有しないもの、例えばガラス基板等であつてもよい。これは、エネルギー照射方法により適宜選択されるものである。

[0175] なお、基体表面と光触媒含有層との密着性を向上させるために、基体上にアンカー層を形成するようにしてもよい。このようなアンカー層としては、例えば、シラン系、チタン系のカップリング剤等を挙げることができる。

[0176] (iii) 光触媒含有層側遮光部

本態様に用いられる光触媒含有層側基板には、パターン状に形成された光触媒含有層側遮光部が形成されたものを用いても良い。このように光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板を用いることにより、エネルギー照射に際して、フォトマスクを用いたり、レーザ光による描画照射を行う必要がない。したがって、光触媒含有層側基板とフォトマスクとの位置合わせが不要であることから、簡便な工程とすることが可能であり、また描画照射に必要な高価な装置も不必要であることから、コスト的に有利となるという利点を有する。

[0177] このような光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板は、光触媒含有層側遮光部の形成位置により、下記の二つの態様とすることができる。

[0178] 一つが、例えば図4に示すように、基体11上に光触媒含有層側遮光部14を形成し

、この光触媒含有層側遮光部14上に光触媒含有層12を形成して、光触媒含有層側基板とする態様である。もう一つは、例えば図5に示すように、基体11上に光触媒含有層12を形成し、その上に光触媒含有層側遮光部14を形成して光触媒含有層側基板とする態様である。

- [0179] いずれの態様においても、フォトマスクを用いる場合と比較すると、光触媒含有層側遮光部が、上記光触媒含有層と細胞接着層との配置部分の近傍に配置されることになるので、基体内等におけるエネルギーの散乱の影響を少なくすることができることから、エネルギーのパターン照射を極めて正確に行うことが可能となる。
- [0180] ここで、本態様においては、図5に示すような光触媒含有層12上に光触媒含有層側遮光部14を形成する態様である場合には、光触媒含有層と細胞接着層とを所定の位置に配置する際に、この光触媒含有層側遮光部の膜厚をこの間隙の幅と一致させておくことにより、上記光触媒含有層側遮光部を上記間隙を一定のものとするためのスペーサとしても用いることができるという利点を有する。
- [0181] すなわち、所定の間隙において上記光触媒含有層と細胞接着層とを対向させた状態で配置する際に、上記光触媒含有層側遮光部と細胞接着層とを密着させた状態で配置することにより、上記所定の間隙を正確とすることが可能となり、そしてこの状態でエネルギーを照射することにより、細胞接着層と遮光部とが接触している部分の細胞接着層は、細胞接着材料が分解または変性されないことから、細胞接着阻害部を精度良く形成することが可能となるのである。
- [0182] このような光触媒含有層側遮光部の形成方法は、特に限定されるものではなく、光触媒含有層側遮光部の形成面の特性や、必要とするエネルギーに対する遮蔽性等に応じて適宜選択されて用いられ、第1の態様で説明した基材上に設けられる遮光部と同様のものとすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。
- [0183] なお、上記説明においては、光触媒含有層側遮光部の形成位置として、基体と光触媒含有層との間、および光触媒含有層表面の二つの場合について説明したが、その他、基体の光触媒含有層が形成されていない側の表面に光触媒含有層側遮光部を形成する態様も採ることが可能である。この態様においては、例えばフォトマスクをこの表面に着脱可能な程度に密着させる場合等が考えられ、細胞接着阻害部の

パターンを小ロットで変更するような場合に好適に用いることができる。

[0184] (iv) プライマー層

次に、本態様の光触媒含有層側基板に用いられるプライマー層について説明する。本態様において、上述したように基体上に光触媒含有層側遮光部をパターン状に形成して、その上に光触媒含有層を形成して光触媒含有層側基板とする場合においては、上記光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層との間にプライマー層を形成してもよい。

[0185] このプライマー層の作用・機能は必ずしも明確なものではないが、光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層との間にプライマー層を形成することにより、プライマー層は光触媒の作用による細胞接着材料の分解または変性を阻害する要因となる光触媒含有層側遮光部および光触媒含有層側遮光部間に存在する開口部からの不純物、特に、光触媒含有層側遮光部をパターンニングする際に生じる残渣や、金属、金属イオン等の不純物の拡散を防止する機能を示すものと考えられる。したがって、プライマー層を形成することにより、高感度で細胞接着材料の分解または変性の処理が進行し、その結果、高精細に形成された細胞接着阻害部を得ることが可能となるのである。

[0186] なお、本態様においてプライマー層は、光触媒含有層側遮光部のみならず光触媒含有層側遮光部間に形成された開口部に存在する不純物が光触媒の作用に影響することを防止するものであるので、プライマー層は開口部を含めた光触媒含有層側遮光部全面にわたって形成されていることが好ましい。

[0187] 本態様におけるプライマー層は、光触媒含有層側基板の光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層とが接触しないようにプライマー層が形成された構造であれば特に限定されるものではない。

[0188] このプライマー層を構成する材料としては、特に限定されるものではないが、光触媒の作用により分解されにくい無機材料が好ましい。具体的には無定形シリカを挙げることができる。このような無定形シリカを用いる場合には、この無定形シリカの前駆体は、一般式 SiX_4 で示され、Xはハロゲン、メキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物であり、それらの加水分解物であるシラノール、または平均

分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

また、プライマー層の膜厚は、 $0.001\mu\text{m}$ から $1\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましく、特に $0.001\mu\text{m}$ から $0.1\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。

[0189] b. 細胞接着阻害部の形成方法

次に、本態様における細胞接着阻害部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図6に示すように、基材1上に形成された細胞接着層8と、光触媒含有層側基板13の光触媒含有層12とを、所定の間隙をおいて配置し、例えばフォトマスク5等を用いて、上記凸部が形成されている領域に、エネルギー6を所定の方向から照射する(図6(a))。これにより、エネルギー照射された領域の細胞接着材料が分解または変性されて、細胞と接着性を有しない細胞接着阻害部7が細胞接着部9中に形成されるのである(図6(b))。この際、細胞接着阻害部は、例えば上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその細胞接着材料が少量含有されている、または細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは細胞接着層が完全に分解除去されて基材が露出すること等となる。また、上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着阻害部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

[0190] 上記の配置とは、実質的に光触媒の作用が細胞接着層表面に及ぶような状態で配置された状態をいうこととし、実際に物理的に接触している状態の他、所定の間隔を隔てて上記光触媒含有層と細胞接着層とが配置された状態とする。この間隙は、 $200\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

[0191] 本態様において上記間隙は、パターン精度が極めて良好であり、光触媒の感度も高く、したがって細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性の効率が良好である点を考慮すると特に $0.2\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の範囲内、好ましくは $1\mu\text{m}$ ～ $5\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。このような間隙の範囲は、特に間隙を高い精度で制御することが可能である小面積の細胞接着層に対して特に有効である。

[0192] 一方、例えば $300\text{mm}\times 300\text{mm}$ 以上といった大面積の細胞接着層に対して処理を行う場合は、接触することなく、かつ上述したような微細な間隙を光触媒含有層側

基板と細胞接着層との間に形成することは極めて困難である。したがって、細胞接着層が比較的大面積である場合は、上記間隙は、 $10\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲内、特に $50\sim 75\ \mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。間隙をこのような範囲内とすることにより、パターンがぼやける等のパターン精度の低下の問題や、光触媒の感度が悪化して細胞接着材料を分解または変性させる効率が悪化する等の問題が生じることなく、さらに細胞接着材料の分解または変性にムラが発生しないといった効果を有するからである。

[0193] このように比較的大面積の細胞接着層をエネルギー照射する際には、エネルギー照射装置内の光触媒含有層側基板と細胞接着層との位置決め装置における間隙の設定を、 $10\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲内、特に $25\ \mu\text{m}\sim 75\ \mu\text{m}$ の範囲内に設定することが好ましい。設定値をこのような範囲内とすることにより、パターン精度の大幅な低下や光触媒の感度の大幅な悪化を招くことなく、かつ光触媒含有層側基板と細胞接着層とが接触することなく配置することが可能となるからである。

[0194] このように光触媒含有層と細胞接着層表面とを所定の間隔で離して配置することにより、酸素と水および光触媒作用により生じた活性酸素種が脱着しやすくなる。すなわち、上記範囲より光触媒含有層と細胞接着層との間隔を狭くした場合は、上記活性酸素種の脱着がしにくくなり、結果的に細胞接着材料を分解または変性させる速度を遅くしてしまう可能性があることから好ましくない。また、上記範囲より間隔を離して配置した場合は、生じた活性酸素種が細胞接着層に届き難くなり、この場合も細胞接着材料の分解または変性の速度を遅くしてしまう可能性があることから好ましくない。

[0195] このような極めて狭い間隙を均一に形成して光触媒含有層と細胞接着層とを配置する方法としては、例えばスペーサを用いる方法を挙げることができる。そして、このようにスペーサを用いることにより、均一な間隙を形成することができると共に、このスペーサが接触する部分は、光触媒の作用が細胞接着層表面に及ばないことから、このスペーサを上述した細胞接着部と同様のパターンを有するものとすることにより、スペーサの形成されていない部分のみの細胞接着材料を分解または変性させることができ、高精細に細胞接着阻害部を形成することができるのである。また、このようなス

ペーサを用いることにより、光触媒の作用により生じた活性酸素種が拡散することなく、高濃度で細胞接着層表面に到達することから、効率よく高精細な細胞接着阻害部を形成することができる。

[0196] 本態様においては、このような光触媒含有層側基板の配置状態は、少なくともエネルギー照射の間だけ維持されればよい。

[0197] ここで、本態様でいうエネルギー照射(露光)とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

[0198] ここで、本態様において照射されるエネルギーの種類等については、上述した第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0199] なお、本態様におけるフォトマスクを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有層側基板のいずれの方向からエネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有層側基板側からエネルギー照射を行う必要がある。

[0200] (6)第6の態様

またさらに、第6の態様としては、上記基材上に、少なくとも細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害層を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が形成されており、上記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているものである。

[0201] 本態様においては、上記細胞接着阻害層中に、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料が含有されていることから、細胞接着阻害層と光触媒含有層とを対向させて配置し、細胞接着培養領域のパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒含有層中の光触媒の作用により、細胞接着阻害層中の細胞接着阻害材料が分解または変性されて、細胞との接着性を有する細胞培養領域(細胞接着部)を形成することができるのである。この際、エネルギーが照射されていない領域については、細胞接着阻害材料が残存することから、細胞との接着性を有しないものとすることができ、細胞接着阻害部として用いることができ

るのである。

[0202] ここで、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着阻害部に含有される細胞接着阻害材料の量と比較して、細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部中にはその細胞接着阻害材料が少量含有されている、または細胞接着阻害材料の分解物等が含有されている、または細胞接着阻害材料が完全に分解されて基材が露出すること等となる。また、上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていること等となる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射された後に、細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞培養領域のみに、高精細に細胞を接着させることが可能となるからである。

[0203] なお、本態様に用いられる細胞接着阻害層は、上記第4の態様で説明した細胞接着阻害層と同様であり、光触媒含有層側基板およびその配置やエネルギーの照射方法等については、上記第5の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0204] (その他)

上述した細胞培養用パターンニング基板は、血管細胞の培養に用いられるものであってもよい。この場合、上記細胞培養領域上で、血管を組織する血管細胞をパターン状に培養した後、血管細胞の血管化を促す成長因子を追加すること等によって、血管を形成することができる。このような血管を組織する血管細胞とは、例えば各生物、特にヒトや動物より得られた血管内皮細胞、ペリサイト、平滑筋細胞、血管内皮前駆細胞、平滑筋前駆細胞を意味し、特に血管内皮細胞等を用いることができる。また、血管内皮細胞とペリサイトとの共培養や血管内皮細胞と平滑筋細胞との共培養等の複数の種類の細胞の共培養とすることもできる。

[0205] また、通常、上記細胞培養領域上で目的とするパターン状に形成した後、培地に

bFGFやVEGF等の血管細胞の血管化を促す成長因子を追加すること等により、血管とすることができる。このような成長因子から受ける刺激によって、血管細胞は増殖を停止して分化し血管化すると考えられる。血管培養領域上にコンフルエントに接着させた血管細胞を血管化する際の培地としては上記のような成長因子を含む液体培地の他、上記のような成長因子を含むゲル状の培地やゲル状の培地と液体培地を組み合わせた上記のような成長因子入り培地を用いることができる。ゲル状の培地としては、コラーゲン、フィブリンゲル、マトリゲル(商品名)、合成ペプチドハイドロゲルなどを用いることができる。

[0206] なお、上記血管を形成する際には、細胞培養領域のラインパターンと同じ方向に一軸方向のずり応力を加えることが効果的である。これにより血管細胞の接着形態が長細い紡錘型になり、それぞれの血管細胞が互いに上記一軸方向に配向したように見える状態で接着することが可能となるからである。血管を形成するには、血管細胞接着の際に、血管細胞の接着形態が長細い形で互いに同じ方向を向いているような状態でコンフルエントに接着することが重要である。ここで、上記一軸方向のずり応力を加える方法としては、培養皿をシェーカーや振とう機に置いて培養する方法や培養液を一方向に流しながら培養する方法などが挙げられる。特に幅が5000 μm を超える血管を作るには、一軸方向のずり応力は不可欠である。

[0207] ここで、本発明の細胞培養用パターンニング基板上で、複数の血管を形成する場合、上記細胞培養領域は、実質的に平行なライン状に複数本形成されることとなる。なお、ここでいう平行とは、完全に平行な場合だけでなく、実質的な平行、すなわちある領域において2本のラインが交差していなければよく、例えば交差しないジグザグ状のライン等、ラインが交わらずに存在する状態も含まれるものとする。また、上記実質的に平行には、例えば網状構造のような交差や分岐している構造のうちの交差や分岐していない部分についても含まれることとする。

[0208] また、上記各血管を形成する細胞培養領域の形状は、ライン状に形成されるものであれば特に限定されるものではなく、目的とする血管の形状に合わせて適宜選択されるが、通常、上記細胞培養領域のラインの幅は、10 μm ～5000 μm 、中でも20 μm ～100 μm 、特に40 μm ～60 μm 程度とされる。ライン幅が10 μm 未満である

場合には、血管細胞が接着しにくくなることから好ましくない。一方、ライン幅が5000 μm を超える場合には、ほとんど全ての血管細胞が拵がった形態で細胞培養領域に接着することとなることから、培養された血管細胞を、血管の形状にすることが困難となり、好ましくない。

[0209] なお本発明においては、良好な血管を作るために、特に上記細胞培養領域内に細胞接着補助部を有することが好ましい。上記細胞接着補助部とは、上記細胞培養領域に微細なパターン状に形成された、血管細胞と接着性を有しない領域をいうこととする。上記細胞接着補助部は、上記細胞培養領域上に血管細胞を接着させた際、細胞培養領域内での血管細胞どうしの結合を阻害しない程度、すなわち上記細胞接着補助部上でも血管細胞どうしが結合し得る程度、微細なパターン状に形成される。

[0210] 一般的に細胞培養領域に血管細胞を付着させて血管細胞を培養し、組織を形成する場合、血管細胞は細胞培養領域の外側から内側にかけて徐々に配列する。また組織の形成の際には、個々の血管細胞が形態変化をして配列することが必要であり、この血管細胞の形態変化についても、細胞培養領域の端部から中央部にかけて徐々に行われるものである。そのため、細胞培養領域の幅が太い場合には、細胞培養領域の中央部での血管細胞の配列性が悪く、組織が形成されない場合や、細胞培養領域の中央部に血管細胞が接着しない場合等がある。また、細胞培養領域の中央部における血管細胞の形態変化性が悪い場合がある。そこで、上記細胞接着補助部を形成することにより、細胞接着補助部の端部からも血管細胞を配列させたり、形態変化をさせることが可能となるため、欠けや形態変化不良等を生じさせることなく、血管細胞を培養することができるのである。また、上記細胞接着補助部は、細胞接着補助部を挟んで隣り合う血管細胞どうしの接着を阻害しないように形成されることから、最終的に培養される血管細胞の幅としては、上記細胞培養領域の幅と同様の幅とすることができるのである。

[0211] 上記細胞接着補助部は、上記細胞培養領域内でライン状に形成されることが好ましい。また、ラインの形状は特に限定されるものではなく、例えば直線状、曲線状、点線状、破線状、網目状等とすることができる。上記細胞接着補助部のライン幅は、0.

5 μm ～10 μm 、中でも1 μm ～5 μm の範囲内とすることが好ましい。上記範囲より幅が広い場合は、細胞接着補助部を挟んで隣接する血管細胞どうしが細胞接着補助部上で相互作用することが困難となるので好ましくないからである。また上記範囲より幅が狭い場合は、本発明におけるパターン形成技術を用いて形成することが難しいからである。

[0212] また、上記細胞接着補助部は、例えばジグザグ状等、面内で凹凸パターンを有するように形成されていてもよい。ここで面内とは基材表面またはこれに準じる面をいうこととする。この際、上記凹凸パターンの凹部端から凸部端までの距離の平均値は、前記細胞培養領域に血管細胞を接着させた際に、血管細胞が細胞培養領域のライン方向と同様の方向に整列する距離であればよいが、特に0.5 μm ～30 μm の範囲内であることが好ましい。なお、上記凹凸を有するパターンの凹部端から凸部端までの距離の平均の測定は、細胞接着補助部の端部の長さ200 μm の範囲における各凹凸の最底部から最頂部までの距離を測定し、その平均を算出した値とする。上記細胞接着補助部の形成方法としては、上述した細胞接着阻害部の形成方法と同様とすることができる。

[0213] B. 細胞培養用パターンニング基板の製造方法

次に、本発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法について説明する。本発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法には、二つの実施態様がある。以下、それぞれの実施態様ごとに説明する。

[0214] 1. 第1実施態様

まず、本発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法の第1実施態様について説明する。本発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法の第1実施態様は、凸部を有する基材および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、前記細胞接着層と前記光触媒含有層とが対向するように配置した後、前記凸部を有する領域に所定の方向からエネルギー照射し、前記細胞接着層中に含有される細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、エネルギー

ーが未照射であり、細胞との接着性を有する細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とするものである。

[0215] 本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の製造方法におけるエネルギー照射工程は、例えば図7に示すように、凸部を有する基材1と、その基材1上に形成された細胞接着層8とを有するパターンニング用基板を準備する(図7(a))。次に、光触媒含有層12および基体11を有する光触媒含有層側基板13を準備し、上記パターンニング用基板の細胞接着層8と光触媒含有層12とを対向させて、例えばフォトマスク5を用いて、凸部が形成されている領域に対して、所定の方向からエネルギー6を照射することにより(図7(b))、エネルギー照射されて細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部7と、エネルギーが未照射であり、細胞と接着性を有する細胞接着部9とのパターンを形成する(図7(c))工程である。

[0216] 本実施態様によれば、製造された細胞培養用パターンニング基板の凸部が形成されている領域上は細胞接着阻害性を有しており、凸部が形成されていない領域、すなわち細胞培養領域においては、細胞と接着性を有するものとすることができる。これにより、細胞培養用パターンニング基板の細胞培養領域上に細胞を付着させた際、隣接する細胞培養領域が凸部によって区画されることとなり、上記凸部の高さや幅だけでなく、上記凸部が形成されている領域の細胞接着阻害性によっても、隣接する細胞培養領域に付着した細胞どうしが結合することを防止することができ、高精細なパターン状に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。

[0217] なお、本実施態様のエネルギー照射工程に用いられるパターンニング基板における凸部を有する基材および細胞接着層、光触媒含有層側基板、光触媒含有層側基板と細胞接着層との配置、照射されるエネルギー等については、上述した「A. 細胞培養用パターンニング基板」の第5の態様で説明したものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0218] また、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の製造方法は、上記エネルギー照射工程以外に、適宜必要な工程を有していてもよい。また、本実施態様によれば、上記細胞培養用パターンニング基板上の細胞培養領域に細胞を付着させて細胞培養

基板とした際、上記凸部が形成されている細胞接着阻害部に、上記光触媒含有層側基板を用いてエネルギー照射することにより、上記細胞接着阻害部に付着した細胞を除去等することができ、高精細なパターン状に培養された細胞を維持できる、という利点も有する。

[0219] 2. 第2実施態様

次に、本発明の細胞培養用パターンニング基板の製造方法の第2実施態様について説明する。本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の製造方法は、凸部を有する基材および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着阻害層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、上記細胞接着層と上記光触媒含有層とが対向するように配置した後、上記凸部を有する領域以外に所定の方向からエネルギー照射し、上記細胞接着阻害層中に含有される細胞接着阻害材料が分解または変性されて、細胞との接着性を有する細胞接着部と、エネルギーが未照射であり、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する細胞接着阻害部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とするものである。

[0220] 本実施態様によれば、製造された細胞培養用パターンニング基板の凸部が形成されている領域上は細胞接着阻害材料が残存しているため細胞接着阻害性を有しており、凸部が形成されていないエネルギーが照射された領域、すなわち細胞培養領域においては、細胞接着阻害材料が分解または変性されているため、細胞と接着性を有するものとすることができる。これにより、細胞培養用パターンニング基板の細胞培養領域上に細胞を付着させた際、隣接する細胞培養領域が凸部によって区画されることとなり、上記凸部の高さや幅だけでなく、上記凸部が形成されている領域の細胞接着阻害性によっても、隣接する細胞培養領域に付着した細胞どうしが結合することを防止することができ、高精細なパターン状に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができるのである。

[0221] ここで、本態様のエネルギー照射工程に用いられる光触媒含有層側基板や、光触媒含有層側基板と細胞接着層との配置、照射されるエネルギー等については、上述

した「A. 細胞培養用パターンニング基板」の第5の態様で説明したものと同様とすることができ、パターンニング用基板に用いられる基材や細胞接着阻害層については、上述した「A. 細胞培養用パターンニング基板」の第4の態様で説明したものと同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の製造方法は、上記エネルギー照射工程以外に、適宜必要な工程を有していてもよい。

- [0222] なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

実施例

- [0223] 以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

- [0224] [実施例1]

(凸部を有する基材の作製)

スライドガラス上にスクリーン印刷法により、幅 $300\mu\text{m}$ 、高さ $25\mu\text{m}$ の樹脂製のライン状凸部を、凸部のピッチが $500\mu\text{m}$ となるように、形成した。

- [0225] (光触媒含有細胞接着阻害層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコーン)0.4g、細胞接着阻害材料としてフルオロアルキルシランTSL8223(GE東芝シリコーン)0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、 100°C で加温した。

この溶液をスピンコーティング法により上記凸部付きスライドガラスに塗布し、その基板を 150°C の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された光触媒含有細胞接着阻害層を基板上に形成した。

上記コーティング層形成後の隣接する凸部間に挟まれた領域と凸部との平均高低差は $24.6\mu\text{m}$ であった。

- [0226] (光触媒含有細胞接着阻害層のパターンニング)

幅300 μm 、ピッチ500 μm のライン状遮光部が形成されたマスクを、上記光触媒含有細胞接着阻害層を形成したガラス上に、凸部と遮光部とが相対するように配置し、露光機から紫外線を5.5 Jcm^{-2} 照射した。これにより、露光部は細胞接着阻害材料が部分的に分解除去され、細胞接着性を有する領域に変化した。

[0227] (細胞の播種、組織化)

各種組織に由来する細胞の培養実験手順については、例えば“組織培養の技術 第三版 基礎編”、日本組織培養学会編、朝倉書店等にその詳細が述べられている。本出願においては、ラット肝実質細胞を用いて基板を評価した。

ラットより摘出した肝臓をシャーレに移してメスで5mm大に細分し、20mlのDMEM培地を加えてピペットで軽く懸濁した後、細胞濾過器で濾過した。得られた粗分散細胞浮遊液を500～600rpmで90秒間遠心処理し、上清を吸引して除去した。残留した細胞に新たにDMEM培地を加えて再び遠心処理した。この操作を3回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得た。得られた肝実質細胞に、DMEM培地20mlを加えて懸濁し、肝実質細胞懸濁液を調製した。

次にWaymouth MB752/1培地(L-グルタミン含有、 NaHCO_3 非含有)(ギブコ社製)14.12gに蒸留水900mlを添加した。これに NaHCO_3 2.24g、アンホテリシンB液(ICN)10ml、およびペニシリンストレプトマイシン液(ギブコ社製)10ml加えて攪拌した。これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌したものをWaymouth MB752/1培地液とした。

先に作製した肝実質細胞懸濁液を、同じく作製したWaymouth MB752/1培地液に懸濁した上で、細胞接着部と細胞接着阻害部とを有する、上述した細胞培養用パターンニング基板上に播種した。この基板を37°C、5% CO_2 付与したインキュベータ内に24時間静置し、基板全面に肝実質細胞を接着させた。この基板をPBSで2回洗浄することにより、非接着細胞や死細胞を除去した後、新しい培地液と交換した。

培地液を交換しながら48時間まで細胞の培養を続け光学顕微鏡で細胞を観察したところ、細胞が細胞培養パターンニング基板の、凸部により挟まれた細胞接着部、すなわち細胞培養領域に沿いながら接着していることを確認した。また、上記細胞接着領域間(凸部上)で細胞同士の接着がないことを確認した。

[0228] [実施例2]

(凸部を有する基材の作製)

透明ポリスチレンプレート上に、実施例1と同様の方法により、幅 $200\mu\text{m}$ 、高さ $30\mu\text{m}$ の樹脂製でライン状の凸部を、ピッチ $400\mu\text{m}$ で形成した。

[0229] (光触媒含有細胞接着層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン)0.4g、細胞接着材料としてアミノプロピルトリエトキシシラン0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、 100°C で加温した。

この溶液をスピンコーティング法により上記凸部付きポリスチレンプレート上に塗布し、その基板を 150°C の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された光触媒含有細胞接着層を基板上に形成した。

上記コーティング層形成後の隣接する凸部間に挟まれた領域と凸部との平均高低差は $29.5\mu\text{m}$ であった。

[0230] (光触媒含有細胞接着層のパターニング)

幅 $200\mu\text{m}$ 、ピッチ $400\mu\text{m}$ のライン状遮光部が形成されたマスクを、上記光触媒含有細胞接着層が形成されたポリスチレンプレート上に、凸部で挟まれた領域と遮光部とが相対するように配置し、露光機から紫外線を 12Jcm^{-2} 照射した。これにより、露光部の細胞接着材料がほぼ完全に分解除去され、細胞接着阻害性を有する非常に親水性の高い領域に変化した。

[0231] (細胞の播種、組織化)

実施例1と同様に、細胞を播種した。この際、実施例1と同様に、細胞が細胞培養用パターニング基板上の、凸部により挟まれた細胞接着部、すなわち細胞培養領域に沿いながら接着していることを確認した。また、上記細胞接着領域間(凸部上)で細胞同士の接着がないことを確認した。

[0232] [実施例3]

(凸部を有する基材の作製)

実施例1で用いた基材と同様の基材を用いた。

[0233] (光触媒含有層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコーン)0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、100℃で加温した。

この溶液をスピンコーティング法により上記凸部付きスライドガラスに塗布し、その基板を150℃の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された光触媒含有層を基板上に形成した。

上記光触媒含有層形成後の、隣接する凸部間に挟まれた領域と凸部との平均高低差は24.7 μm であった。

[0234] (細胞接着層の形成)

フィブロネクチンF-4759(シグマ)0.2mgと、純水200mlとを混合し、この水溶液を上記スライドガラスの光触媒含有層に対し、基板面積1 cm^2 当たり、300 μl の比率で滴下し、これを4℃下で24時間静置した。さらに、基板をPBSにて2回洗浄し、凸部を有する基板上に光触媒含有層と細胞接着層とを有するスライドガラスとした。

[0235] (細胞接着層のパターニング)

幅200 μm 、ピッチ500 μm のライン状遮光部が形成されたマスクを、上記スライドガラス上の凸部で挟まれた領域と、遮光部とが相対するように配置し、露光機から紫外線を12 Jcm^{-2} 照射した。これにより、露光された凸部表面は、細胞接着材料であるフィブロネクチンがほぼ完全に分解除去され、細胞接着阻害性を有する非常に高い親水性を有する領域に変化した。

[0236] (細胞の播種、組織化)

実施例1と同様に、細胞接着実験を実施した。この際、実施例1と同様に、細胞が細胞培養用パターニング基板上の、凸部により挟まれた細胞接着部、すなわち細胞培養領域に沿いながら接着していることを確認した。また、上記細胞接着領域間(凸部上)で細胞同士の接着がないことを確認した。

[0237] [実施例4]

(凸部を有する基材の作製)

実施例1で用いた基材と同様の基材を用いた。

[0238] (細胞接着層の形成)

フィブロネクチンF-4759(シグマ)0.2mg、純水200mlとを混合し、この水溶液を上記スライドガラスに対し、基板面積 1cm^2 当たり、 $300\mu\text{l}$ の比率で滴下し、これを 4°C 下で24時間静置した。さらに、基板をPBSにて2回洗浄し、凸部を有する基板上に細胞接着層とを有するスライドガラスとした。

[0239] <光触媒含有層側基板の作製>

(光触媒含有層形成用塗工液の作製)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン)0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、 100°C で加温した。

[0240] (光触媒含有層の形成)

一般的なクロムマスクを作製する手順により、石英ガラス上に、遮光部 $200\mu\text{m}$ 、開口部 $300\mu\text{m}$ (ピッチ $500\mu\text{m}$)のストライプ状の光触媒含有層側遮光部を設けたフォトマスクを作製した。このフォトマスク表面に、上記光触媒含有層形成用塗工液を、スピンコーティング法により塗布し、その基板を 150°C で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された膜厚 $0.2\mu\text{m}$ の光触媒含有層をフォトマスク上に形成し、光触媒含有層側基板とした。

[0241] (細胞接着層のパターニング)

上記光触媒含有層側基板を、上記スライドガラス上の凸部で挟まれた領域と、遮光部とが相対するように配置し、露光機から紫外線を 12Jcm^{-2} 照射した。これにより、露光された凸部表面は、細胞接着材料であるフィブロネクチンがほぼ完全に分解除去され、細胞接着阻害性を有する非常に高い親水性を有する領域に変化した。

[0242] (細胞の播種、組織化)

実施例1と同様に、細胞接着実験を実施した。この際、実施例1と同様に、細胞が細胞培養用パターニング基板上の、凸部により挟まれた細胞接着部、すなわち細胞

培養領域に沿いながら接着していることを確認した。また、上記細胞接着領域間(凸部上)で細胞同士の接着がないことを確認した。

[0243] [実施例5]

(凸部を有する基材の作製)

スライドガラス上にスクリーン印刷法により、幅 $300\mu\text{m}$ 、高さ $25\mu\text{m}$ の樹脂製のライン状凸部を、凸部のピッチが $700\mu\text{m}$ となるように形成した。

[0244] (細胞接着阻害層の形成)

シランカップリング剤XC98-B2472(GE東芝シリコン)をイソプロピルアルコールで10倍希釈し、ここに1, 3-ブタンジオールを濃度が10%となるように添加して攪拌し、細胞接着阻害層を形成するためのコーティング剤を調製した。上記ライン状凸部が形成されたスライドガラスを120秒間UV洗浄し、直後に、前記コーティング剤をスピンのコーティング法により塗布し、 150°C で15分間乾燥させて細胞接着阻害層を形成した。

[0245] (光触媒含有層側基板の作製)

幅 $300\mu\text{m}$ のライン状遮光部と、幅 $400\mu\text{m}$ のライン状開口部が交互に形成されたフォトマスクを作製した。この際、幅 $400\mu\text{m}$ の前記ライン状開口部内には、細胞接着補助部に対応する部分として、開口部のライン方向に沿ってピッチ $40\mu\text{m}$ で幅 $5\mu\text{m}$ のライン状遮光部が形成された。このフォトマスクに、実施例4と同様に光触媒含有層を形成し、透明な光触媒含有層側基板とした。

[0246] (細胞接着阻害層のパターニング)

前記の細胞接着補助部に対応するパターンを有する光触媒含有層側基板の光触媒含有層と、前記細胞接着阻害層とを対向させて配置した。この際、上記ライン状遮光部が前記基材のライン状凸部上となるように位置あわせを行った。続いて光触媒含有層側基板側から紫外線を $6\text{J}/\text{cm}^2$ 照射した。これにより、基材上に形成された細胞接着阻害層のうち、隣接する凸部に挟まれた領域の細胞接着阻害材料がパターン状に除去され、細胞接着補助部を有する細胞接着部が形成された。

[0247] (細胞の播種、組織化)

培養液(5%ウシ胎児血清含有MEM培地)を含む培養ディッシュに上記細胞接着

部が形成された細胞培養用パターンニング基板を配置し、 6×10^5 個/mlの濃度となるようシ血管内皮細胞を播種した。培養ディッシュをシーソーシェーカーの上に配置し24時間培養したところ、内皮細胞は細胞接着補助部を有する細胞接着部に接着した。この間、シェーカーはゆっくりとシーソーのように動作し、細胞培養用パターンニング基板のラインパターンと同一方向に培地の流れが生じるよう調整された。顕微鏡観察により、接着した血管内皮細胞は、ライン方向に沿って配向した形状であることが確認された。

請求の範囲

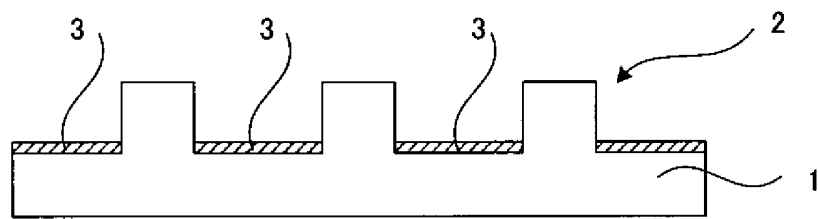
- [1] 凸部を有する基材と、前記基材表面に形成された細胞を培養する領域である細胞培養領域とを有し、前記細胞培養領域が、凸部を有する基材の前記凸部によって区画されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板。
- [2] 前記凸部を有する領域は、細胞と接着阻害性を有する細胞接着阻害部であり、前記細胞培養領域は、細胞と接着性を有する細胞接着部であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [3] 前記基材上に、少なくとも光触媒および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層が形成されており、前記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [4] 前記基材上に、少なくとも光触媒および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層が形成されており、前記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着阻害材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [5] 前記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、前記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [6] 前記基材上に、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が形成されており、前記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着阻害材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記

載の細胞培養用パターンニング基板。

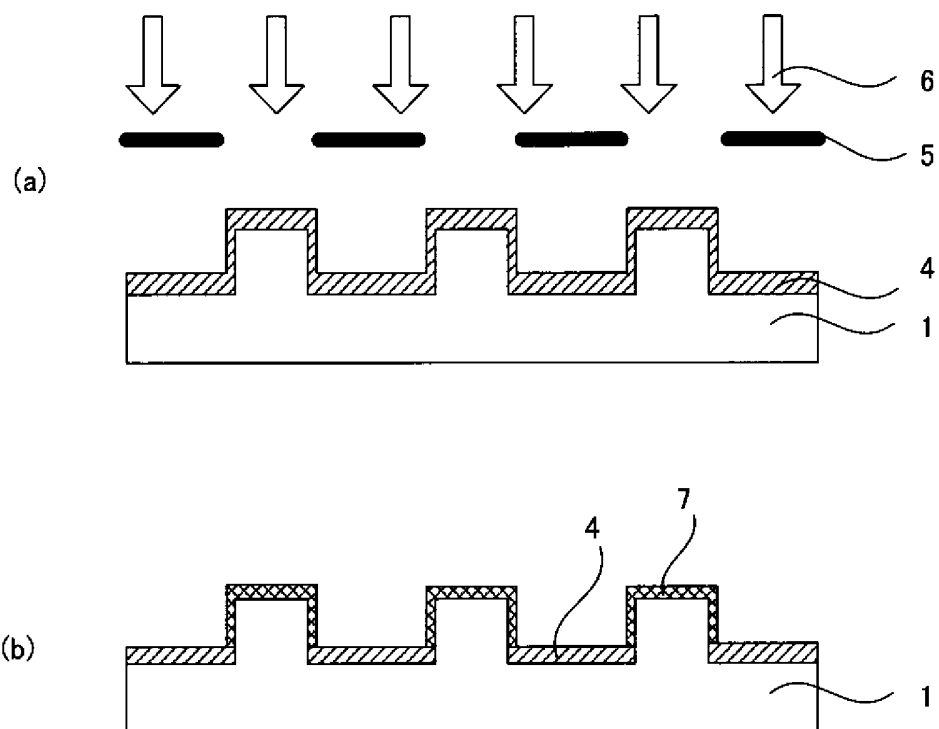
- [7] 前記基材上に、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層が形成されており、前記細胞接着阻害部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [8] 前記基材上に、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が形成されており、前記細胞接着部は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、前記細胞接着阻害材料が分解または変性されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [9] 凸部を有する基材および、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する細胞接着層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、前記細胞接着層と前記光触媒含有層とが対向するように配置した後、前記凸部を有する領域に所定方向からエネルギー照射し、前記細胞接着層中に含有される細胞接着材料が分解または変性された細胞接着阻害部と、エネルギーが未照射であり、細胞との接着性を有する細胞接着部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とする細胞培養用パターンニング基板の製造方法。
- [10] 凸部を有する基材および、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層を有するパターンニング用基板と、光触媒を含有する光触媒含有層および基体を有する光触媒含有層側基板とを、前記細胞接着層と前記光触媒含有層とが対向するように配置した後、前記凸部を有する領域以外に所定方向からエネルギー照射し、前記細胞接着阻害層中に含有される細胞接着阻害材料が分解または変性されて、細胞との接着性を有する細胞接着部と、エネルギーが未照射であり、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する細胞接着阻

害部とからなるパターンを形成するエネルギー照射工程を有することを特徴とする細胞培養用パターンニング基板の製造方法。

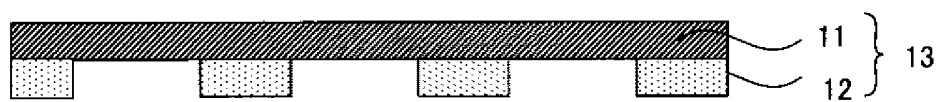
[図1]



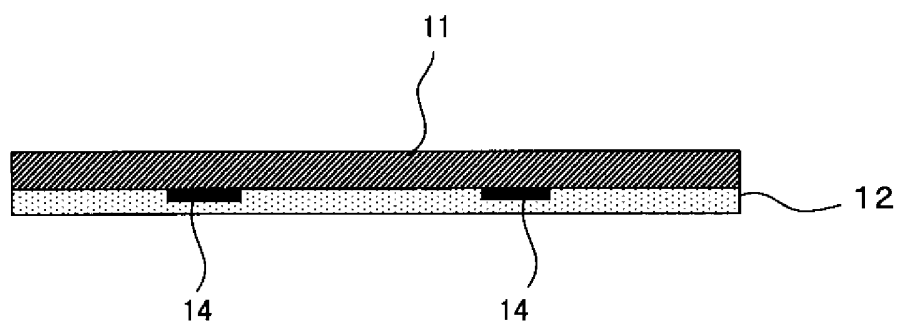
[図2]



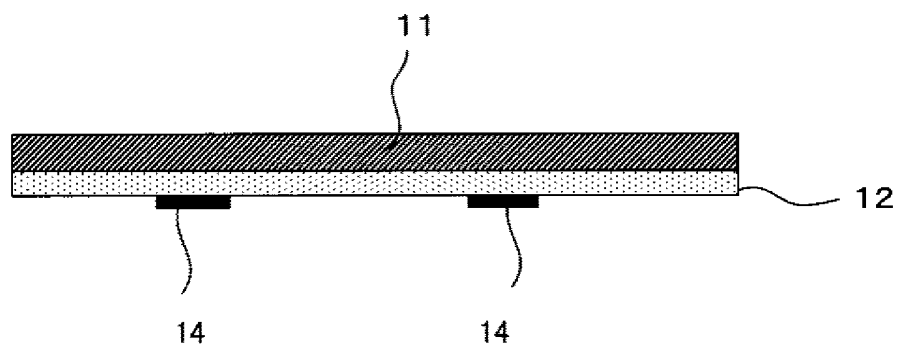
[図3]



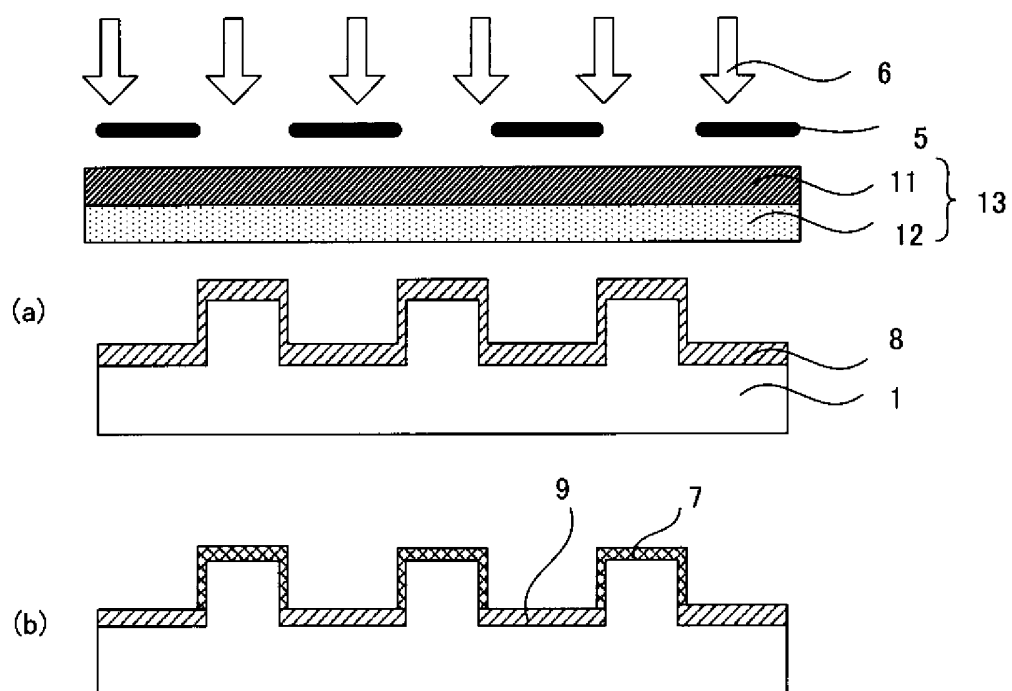
[図4]



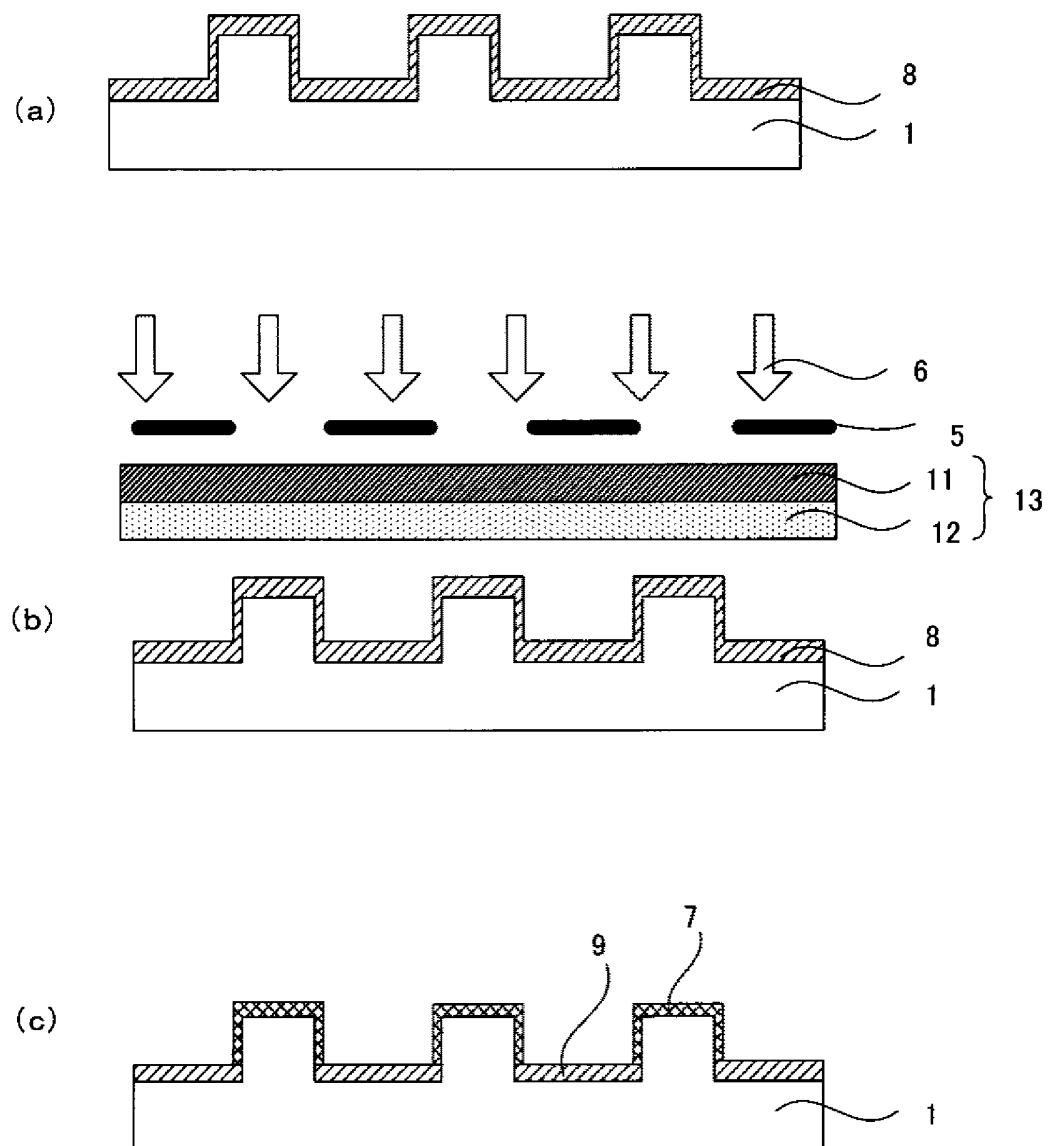
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12M3/00

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)

Int. Cl.⁷ C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN)

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> Y	JP 2004-57019 A (Toshiba Ceramics Co., Ltd.), 26 February, 2004 (26.02.04), Full text (Family: none)	<u>1, 2</u> 3-9
<u>X</u> Y	JP 07-75547 A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), 20 March, 1995 (20.03.95), Full text (Family: none)	<u>1, 2</u> 3-9
<u>X</u> Y	JP 03-7576 A (Kaneka Corp.), 14 January, 1991 (14.01.91), Full text & DE 69013764 C	<u>1, 2</u> 3-9



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

19 July, 2005 (19.07.05)

Date of mailing of the international search report

02 August, 2005 (02.08.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007775

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-51 A (Ekodebaisu Kabushiki Kaisha), 08 January, 2004 (08.01.04), Full text (Family: none)	3, 7
Y	Nicolau, D.V. et al. "Control of the neuronal cell attachment by functionality manipulation of diazo-naphtho-quinone/novolak photoresist surface", Biosensors & Bioelectronics, (1996), Vol.11, No.12, pages 1237 to 1252	3-8
Y	JP 2003-9859 A (Nippon Sheet Glass Co., Ltd.), 14 January, 2003 (14.01.03), Full text (Family: none)	3-8
Y	JP 2003-295428 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 15 October, 2003 (15.10.03), Full text & EP 1246011 A2 & US 2003/0008217 A1	7-10
Y	JP 2003-228172 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 15 August, 2003 (15.08.03), Full text & EP 1246011 A2 & US 2003/0008217 A1	7, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007775

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to all of claims 1 to 10 is "patterning substrate for cell culture, comprising a base material, the base material having protrudent portions, and cell culture regions (cell culture portions) adapted to culture cells, wherein the cell culture regions are partitioned by the protrudent portions". However, search has revealed that "cell culture substrate comprising a base surface with adherence to cells and, provided thereon through coating with a synthetic resin, etc., cell-nonadherent portions, wherein the cell-adherent portions and the cell-nonadherent portions are patterned in crossed or other form" is not novel as it is disclosed in the reference (JP (continued to extra sheet))

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007775

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

2004-57019A, (Toshiba Ceramics Co., Ltd.), 26 February, 2004 (26.02.04)).
Consequently, the above common matter falls within the category of prior art and hence cannot be regarded as being a special technical feature.

Therefore, the claimed inventions are to be grouped into two general inventive concepts, namely, the one directed to "patterning substrate for cell culture, comprising a base material, the base material having protrudent portions, and cell culture regions (cell culture portions) adapted to culture cells, wherein the cell culture regions are partitioned by the protrudent portions" and the other directed to "patterning substrate for cell culture wherein a photocatalyst is contained in a cell-adherent layer or cell-nonadherent layer".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12M3/00

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.⁷ C12M3/00

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

CAplus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X ----- Y	JP 2004-57019 A, (東芝セラミックス株式会社), 2004.02.26, 全文 (ファミリーなし)	1,2 ----- 3-9
X ----- Y	JP 07-75547 A, (株式会社バイオマテリアル研究所), 1995.03.20, 全文 (ファミリーなし)	1,2 ----- 3-9

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ 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

19.07.2005

国際調査報告の発送日

02.8.2005

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)

伏見 邦彦

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3334

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 請求の範囲の番号
X ----- Y	JP 03-7576 A, (鐘淵化学工業株式会社), 1991.01.14, 全文 & DE 69013764 C	1,2 ----- 3-9
Y	JP 2004-51 A, (エコデバイス株式会社), 2004.01.08, 全文 (ファミリーなし)	3,7
Y	Nicolau,D.V. et al., "Control of the neuronal cell attachment by functionality manipulation of diazo-naphtho-quinone/novolak photoresist surface", Biosensors & Bioelectronics, (1996), Vol.11, No.12, pp.1237-1252	3-8
Y	JP 2003-9859 A, (日本板硝子株式会社), 2003.01.14, 全文 (ファミリーなし)	3-8
Y	JP 2003-295428 A, (大日本印刷株式会社), 2003.10.15, 全文 & EP 1246011 A2 & US 2003/0008217 A1	7-10
Y	JP 2003-228172 A, (大日本印刷株式会社), 2003.08.15, 全文 & EP 1246011 A2 & US 2003/0008217 A1	7,9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10全てに共通の事項は、「凸部を有する基材と、細胞を培養する領域である細胞培養領域(細胞培養部)とを有し、前記細胞培養領域が、前記凸部によって区画されている細胞培養用パターンニング基板」であるが、調査の結果、「細胞付着性を有する基体表面に、合成樹脂等をコーティングして細胞非付着性部分を形成した細胞培養基材であって、細胞付着性部分と細胞非付着性部分を、交差状等にパターン形成した細胞培養基材」は、文献(JP 2004-57019 A, (東芝セラミックス株式会社), 2004.02.26)に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。結果として、上記共通の事項は、先行技術の域をでないから、特別な技術的特徴とすることはできない。

それ故、請求の範囲に係る発明は、「凸部を有する基材と、細胞を培養する領域である細胞培養領域(細胞培養部)とを有し、前記細胞培養領域が、前記凸部によって区画されている細胞培養用パターンニング基板」の一般的発明概念と、「細胞接着層または細胞非接着層に光触媒を含有する、細胞培養用パターンニング基板」の一般的発明概念の、2つに分類される。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。