

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年10月26日(26.10.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/183712 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/07 (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/016010

(22) 国際出願日: 2017年4月21日(21.04.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-086455 2016年4月22日(22.04.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 梶 弘和(KAJI Hirokazu); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 鈴木 仁 (SUZUKI Jin); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 永井 展裕(NAGAI Nobuhiro); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 阿部 俊明(ABE Toshiaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ M O R I タワー3 2階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD OF MANUFACTURING CELL-NANOSCALE THIN FILM COMPOSITE

(54) 発明の名称: 細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法

(57) Abstract: Provided is a novel method of manufacturing a cell-nanoscale thin film composite in which the cell-nanoscale thin film composite can be peeled from a substrate at a controlled timing. The method of manufacturing a cell-nanoscale thin film composite includes culturing cells on a cell culture substrate comprising a nanoscale thin film provided to an electrode substrate with a self-assembled monolayer therebetween, and applying an electrical potential to the electrode substrate at a desired timing so that the self-assembled monolayer undergoes reductive desorption from the electrode substrate, thereby releasing the cell-nanoscale thin film composite.

(57) 要約: 細胞・ナノ薄膜複合体を、基板よりタイミングを制御して剥離することが可能な細胞・ナノ薄膜複合体の新たな製造方法を提供する。ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材において細胞を培養し、所望のタイミングで電極基板に電位を印加して、自己組織化単分子膜を電極基板より還元脱離させ、細胞・ナノ薄膜複合体を遊離させることを含む、細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法。

WO 2017/183712 A1

明 細 書

発明の名称：細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞・ナノ薄膜複合体を基板よりタイミングを制御して剥離する手段、及びそれを用いた細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、再生医療の分野で難治性疾患に対する細胞移植療法の開発が広く進められている。例えば、iPS細胞より必要な細胞を誘導して細胞シートを作製し、それを患部に移植することで様々な臓器や組織を治療することが試みられている。これまでに細胞シートを用いた角膜、食道、心臓、歯周、軟骨等の各疾患に対する臨床研究、治験が行われており、またそれら以外にも肺や耳、肝臓、膵臓疾患等に対する適応拡大が検討されている。

[0003] 細胞シートの作製・使用に際しては、作製した細胞シートを基板から無傷な状態で剥がすことが要求される。現在、細胞シートの回収方法として温度応答性の細胞培養皿を用いた研究（非特許文献1）や自己組織化単分子膜（SAM）と呼ばれるものを用いて電気化学的に基板から剥離させる手法（非特許文献2、特許文献1－2）などの研究が進められている。

[0004] 高分子ナノ薄膜（以下、「ナノ薄膜」と記載する）は高分子物理学の分野で研究されているソフトナノ材料での比較的新しい分類である（非特許文献3）。ナノ薄膜は厚さが数十～数百nmの薄膜であり、高い柔軟性を有する。また薄くて柔軟であることから凹凸表面にも追従し、大きな分子間力によってあらゆる表面へ接着することが可能である。本発明者らはこれまでに、生体適合性がよく生分解性を有するポリ乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）でナノ薄膜を作製し、その上で細胞を培養することで柔軟性、展開性、接着性、生体適合性に優れた細胞・ナノ薄膜複合体が得られることを見出し、報告している（特許文献3）。この細胞・ナノ薄膜複合体は細胞シートの脆くて壊れやすいという欠点を克服し、効果的な細胞送達を可能にした（

非特許文献4)。

[0005] 一方、この細胞・ナノ薄膜複合体を作製するにはナノ薄膜上での細胞の長期培養が必要とされる。足場特性のある細胞を培養する場合、培養期間はナノ薄膜が基板に接着していることが必要であるが、細胞・ナノ薄膜複合体を利用する場面（治療・手術の現場）においては任意のタイミングで基板から剥離することが求められる。したがって、細胞・ナノ薄膜複合体の基板からの剥離を制御することができる技術が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2008-295382号公報

特許文献2：WO2012/033181号公報

特許文献3：WO2014/208778号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：坂井秀昭ら、“日本発・世界初の「細胞シート工学」技術による再生医療”，特許庁技術懇話会誌，271号

非特許文献2：Inaba R. ら、Biomaterials, 30, 21, 3573-9, 2009.

非特許文献3：J. A. Forrest ら、Advances in Colloid and Interface Science, 94, 1-3, 167-195, 2001

非特許文献4：T. Fujie ら、Adv Mater, 26, 1699-1705, 2014.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、細胞・ナノ薄膜複合体を基板より剥離するタイミングを制御することが可能な新たな手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、細胞・ナノ薄膜複合体を、自己組織化単分子膜（SAM）を介して基板となる電極基板に配設することにより、SAMを電気化学的に電極基板より剥離することにより、細胞・ナノ薄膜複合体を基板より遊離させ、回収できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法であって

ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材において、該ナノ薄膜上にて細胞を培養する工程、

該電極基板に、該自己組織化単分子膜が該電極基板より還元脱離する電位を印加して、該自己組織化単分子膜を該電極基板より剥離する工程、ならびに

該自己組織化単分子膜の剥離に伴い、該電極基板より遊離した細胞・ナノ薄膜複合体を回収する工程、を含む、上記方法。

[2] ナノ薄膜が、生体適合性高分子からなる、[1]の方法。

[3] 生体適合性高分子が、ポリ乳酸グリコール酸共重合体である、[2]の方法。

[4] 自己組織化単分子膜がアルカンチオール又はその誘導体、あるいはシステインからなる、[1]～[3]のいずれかの方法。

[5] 電極基板が多孔質体である、[1]～[4]のいずれかの方法。

[6] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、[5]の方法。

[7] ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材。

[8] 電極基板が多孔質体である、[7]に記載の細胞培養基材。

[9] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、[8]の細胞培養基材。

[10] ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材、ならびに該電極基板へ電位を印加するために用いられる力

ウンター電極及び電源を含む、細胞培養装置。

[11] 電極基板が多孔質体である、[10]の細胞培養装置。

[12] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、[11]の細胞培養装置。

[13] 自己組織化単分子膜、ナノ薄膜、及び細胞が、この順で積層されてなる、細胞・ナノ薄膜複合体。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、細胞・ナノ薄膜複合体を、任意のタイミングで基板より遊離させ、回収することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、ナノ薄膜の作製方法の簡略図を示す。

[図2]図2は、SAMを備える電極基板の作製方法の簡略図を示す。

[図3]図3は、各SAMを備える電極基板に電位を印加して得られたサイクリックボルタモグラムを示す。(A)1回目の掃引、(B)2回目の掃引。

[図4]図4は、SAMを備える電極基板上にナノ薄膜が配設されてなる細胞培養基材の写真図を示す。スケールバー：5.0mm。

[図5]図5は、電位を印加することにより電極基板からナノ薄膜が剥離する様子を示す写真図である。(a)電位を印加する前；(b)剥離する瞬間；(c)剥離した後。

[図6]図6は、電位を印加することにより電極基板から細胞・ナノ薄膜複合体が剥離する様子を示す写真図である。(a)電位を印加する前；(b)剥離する瞬間；(c)剥離した後。

[図7]図7は、細胞・ナノ薄膜複合体を電極基板から脱着させる前後の細胞生存率を示すグラフである。

[図8]図8は、金ポラス電極の写真(a)とSEM画像(b)である。

[図9]図9は、ナノ薄膜がポラス電極から脱着する様子を示す写真である。

[図10]図10は、ナノ薄膜が電極基板から脱着するのに要した時間を示すグラフである。

[図11]図11は、シリンジ針による細胞・ナノ薄膜複合体の網膜下への移植の方法を示す図である。

[図12]図12は、細胞・ナノ薄膜複合体を送達した後の網膜の光干渉断層計(OCT)画像である。

[図13]図13は、摘出した眼球に確認された、後眼部の円形のナノ薄膜の写真である。

[図14]図14は、摘出した眼球の網膜の凍結切片画像を示す。

[図15]図15は、網膜切片のヘマトキシン・エオシン染色画像である。

発明を実施するための形態

[0013] 1. 細胞培養基材

本発明における「細胞培養基材」は、ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して基板となる電極基板に配設されてなる構造を有し、細胞はナノ薄膜上に接着することができ、細胞培養において足場となる材料として利用することができる。

[0014] 本発明において「ナノ薄膜」とは、500nm未満、好ましくはおよそ400nm以下、より好ましくはおよそ300nm以下、さらに好ましくはおよそ200nm以下の厚みを有する生体適合性高分子からなるシートを意味する。「ナノ薄膜」の厚みの下限は特に限定されないが、およそ20nm以上、好ましくはおよそ40nm以上、より好ましくはおよそ60nm以上、さらに好ましくはおよそ80nm以上、よりさらに好ましくはおよそ100nm以上とすることができる。例えば、本発明において「ナノ薄膜」は、およそ20nm～300nm、好ましくはおよそ100nm～200nm程度の厚みを有する生体適合性高分子からなるシートとすることができる。

[0015] 本発明において利用可能な「生体適合性高分子」としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリブチレンサクシネート、ポリジオキサノン、ポリジメチルシロキサン、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフエン)、タンパク質(コラーゲン、ゼラチン、ラミニン

、ファイブロネクチン、エラスチン)、多糖類(キトサン、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、セルロース)、核酸(DNA, RNA)及びそれらの共重合体等が挙げられる。好ましくは、生体適合性高分子は生体分解性ポリマーであり、特に好ましくはポリ乳酸グリコール酸共重合体(以下、「PLGA」と記載する。)である。

[0016] 本発明においてナノ薄膜の形状は特に限定されず、円形、楕円形、多角形(例えば、長方形、正方形、五角形、六角形等)又はそれらの組合せ等、任意の形状とすることができる。例えば、ナノ薄膜の直径又は最も長い対角線の長さを、およそ $10\mu\text{m}$ ~ 20mm 、好ましくはおよそ $50\mu\text{m}$ ~ 15mm 、より好ましくはおよそ $100\mu\text{m}$ ~ 10mm 、さらに好ましくはおよそ $150\mu\text{m}$ ~ 5mm 、よりさらに好ましくはおよそ $200\mu\text{m}$ ~ 3mm 、とりわけ好ましくはおよそ $300\mu\text{m}$ ~ 1mm 程度とすることができる(これらに限定はされない)。ナノ薄膜がこのような形状(サイズ)を有することによって、最終生成物である細胞・ナノ薄膜複合体を細管により吸引・放出することができ、当該複合体の生体への移植操作等を容易にすることができる。

[0017] ナノ薄膜の細胞を担持する側の表面は、細胞の接着及び増殖を促進する細胞外基質によりコーティングすることができる。本発明において利用可能な「細胞外基質」としては、例えば、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ファイブロネクチン、ポリ-D-リジン(PDL)、ラミニン、ポリ-L-オルニチン/ラミニン(PLO/LM)等が挙げられる。

[0018] ナノ薄膜中又はその表面には、機能性物質を含めることができる。「機能性物質」とは、細胞の増殖、分化、生理活性等を制御する機能を有する物質(例えば、タンパク質、ポリペプチド、化合物等)やナノ薄膜の可視化を可能にする物質を意味する。このような機能性物質としては、成長/増殖因子(例えば、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮成長因子(EGF)、骨形成タンパク質(BMP)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)等)、眼圧降下剤、神経保護剤、抗生物質、抗がん剤、可視化プ

ローブ（造影剤、ナノ粒子、蛍光色素等）が挙げられる。

[0019] また、ナノ薄膜中又はその表面には、金属、半導体、セラミック、磁性体等からなるナノ粒子、好ましくは磁性体ナノ粒子を含めることができる。当該ナノ粒子は1 nm～500 nm、好ましくは1 nm～50 nm程度の粒子径を有する。ナノ薄膜が当該ナノ粒子を有することによって、ナノ薄膜の表面に当該ナノ粒子に起因する凹凸を形成することができる。ナノ薄膜の表面に凹凸を形成することによって、細胞が接着できる表面積を増すことができると共に、細胞の増殖活性を増大させることができる。また、ナノ薄膜に磁性体ナノ粒子含めた場合には、磁力を用いてナノ薄膜を移動／集合させることができ、最終生成物である細胞・ナノ薄膜複合体の操作性を高めることができる。

[0020] 本発明において利用可能な「電極基板」としては、自己組織化単分子膜がチオレートを紹介して結合することができ、かつ作用電極として機能する導電性を有するものであればよく、例えば、金、銀、白金、銅等の貴金属や、シリコン、炭化ケイ素、セレン化亜鉛等の半導体、酸化スズ、酸化亜鉛、酸化インジウムなどの金属酸化物より選択される一又は複数の材料（電極材料）を利用することができる。電極基板は電極材料からなるものであってもよいし、他の材料（支持基板）の表面の一部又は全体が電極材料で覆われてなるものであってもよい。他の材料は特に限定されず、合成樹脂、金属、無機材料（ガラス、シリコン、セラミック等）を利用することができ、導電性を有するものであっても、導電性を有さないものであってもよい。

[0021] 電極基板の形状や大きさは、上記ナノ薄膜を支持できる限り特に限定されず、任意の形状とすることができ、上記ナノ薄膜と同じ形状及び／又は大きさであってもよいし、上記ナノ薄膜の形状及び／又は大きさは異なってもよい。

[0022] また、電極基板は、多孔質体やメッシュ等、培養培地が透過可能な形状とすることができる。電極基板が多孔質体やメッシュ等の形状を有することによって、電極基板に電位を印加した際に、自己組織化単分子膜との間に、培

養培地が辺縁部からだけでなく、電極基板を透過して侵入することができ、電極表面への電解質溶液の迅速な供給が可能となり、電極基板からの自己組織化単分子膜の剥離を容易にすることができる。また、例えば、多孔質体としてポーラス膜（ポーラス電極基板）を用いることができ、ポーラス膜として金をコートしたポーラス薄膜が例示される。ポーラス膜のポアサイズは、数百nm～数 μm 、好ましくは約1 μm である。

[0023] 本発明において「自己組織化単分子膜」とは、電極基板及び／又はナノ薄膜と結合する複数の疎水性化合物が、分子間相互作用により、高密度に集積し形成される高配向なナノレベルの単分子膜である。このような自己組織化単分子膜は一般的に「SAM」（Self-Assembled Monolayerの略語）と呼ばれることがあり、本明細書においても、自己組織化単分子膜のことを単に「SAM」と呼ぶ場合がある。また、本明細書において、SAMを形成するために用いられる化合物を、SAM化合物と呼ぶ場合がある。

[0024] SAM化合物としては、末端にチオール基（ $-\text{SH}$ 基）を有する、あるいはスルフィド（ $-\text{S}-$ ）又はジスルフィド（ $-\text{S}-\text{S}-$ ）構造を有し、これらを介して電極基板と結合可能な直鎖状疎水性分子が挙げられる。好ましくは、SAM化合物として炭素数4～20個、例えば炭素数4～15個程度のアルカンチオールや、システインを利用することができる。特に好ましくは、システインである。SAMがシステインからなる場合、当該SAMは比較的低い還元電位の印加によって電極基板の表面より剥離することができる。

[0025] SAM化合物は、ナノ薄膜と結合することが可能な官能基で修飾された誘導体とすることができる。用いる官能基は、用いるナノ薄膜に応じて適宜選択することが可能であり、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、アルデヒド基等を用いることができる。例えば、ナノ薄膜がPLGAからなる場合、SAM化合物は当該ナノ薄膜と結合可能なようにカルボキシル基で修飾することができる。

[0026] 上記SAM化合物からなるSAMは、電極基板とナノ薄膜の双方に結合す

ることができ、これによりナノ薄膜はSAMと結合し、当該SAMを介して、当該SAMと結合する電極基板に吸着し、配設される。

[0027] 本発明の細胞培養基材は以下の工程を含む手法により得ることができる。
なお、以下、便宜上、ナノ薄膜を作製する工程を〔１〕とし、電極基板を作製する工程を〔２〕として記載するが、これら工程の順序は特に限定されず、電極基板を作製する工程をナノ薄膜を作製する工程の前に行ってもよいし、あるいは両工程を同時に行ってもよい。

[0028] 〔１〕ナノ薄膜を作製する工程

本発明におけるナノ薄膜は公知の手法（WO 2014／208778号公報）に基づいて作製することができ、以下及び図１に、マイクロスタンプ法とスピンコーティング法を組み合わせた作製方法の概略を示すが、ナノ薄膜の作製方法は当該手法に限定されない。

[0029] （i）例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、金属、シリコン、ガラス等を用いて所定のパターンが凸状に刻みこまれた基板（以下、「スタンプ」と記載する）を作製する。スタンプは常法に従い、フォトリソグラフィ技術を利用して作製することができる。例えば、基板表面をオクタデシルトリメトキシシラン（ODMS）、オクタデシルジメチルクロロシラン、トリアルコキシヘキサデシルシラン等の長鎖状疎水性分子でコーティングした後、その上にポジ型フォトレジストを塗布する。次に、前記レジストにフォトマスクを透過させて露光（電子照射、紫外線照射、X線照射等）する。続いて、基体上のレジストを現像し、感光した領域のレジストを除去する。そして、O₂プラズマ処理、COプラズマ処理又はハロゲンガスを用いた反応性イオンエッチング処理により、レジストで保護されていない領域の長鎖状疎水性分子を除去する。最後にアセトン、テトラヒドロフラン（THF）、ジクロロメタン等を用いてレジストを除去することで、スタンプを得ることができる（図１中、（a）として示す）。

[0030] （ii）得られたスタンプの表面（パターンが刻みこまれたスタンプ面）に生体適合性高分子層を形成する。生体適合性高分子又は生体適合性高分子

の構成要素（例えば、生体分解性ポリマーの構成要素であるところのモノマー等）（以下、「生体適合性高分子等」と記載する。）を適当な溶媒（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトン、酢酸エチル等）中に $1\text{ mg/mL} \sim 100\text{ mg/mL}$ 、好ましくは $5\text{ mg/mL} \sim 40\text{ mg/mL}$ の濃度で溶解し、この生体適合性高分子等の溶液をスピコーティング法にてスタンプ表面に塗布する。スピコーターの回転速度、回転時間を調節することにより、スタンプ表面上に塗布される生体適合性高分子等の厚みを調節することができ、得られるナノ薄膜の厚みを調節することができる。

[0031] 次いで、塗布された生体適合性高分子等を重合及び／又は架橋することによって、スタンプ表面上に生体適合性高分子からなる層を形成することができる（図1中、（b）として示す）。ここで「重合」としては、重縮合、重付加、付加縮合、開環重合、付加重合（ラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合）、熱による固相重合、光重合、放射線重合、プラズマ重合等を挙げることができる。また「架橋」は、公知の架橋剤（例えば、アルキルジミデート類、アシルジアジド類、ジイソシアネート類、ビスマレイミド類、トリアジニル類、ジアゾ化合物、グルタルアルデヒド等）を用いて行うことができる。

[0032] （i i i）水溶性犠牲層を備える支持基板を作製する。支持基板（例えば、シリコン、ガラス等）（図1中、（c）として示す）の一表面を、ポリビニルアルコール（PVA）若しくはその誘導体、ポリイソプロピルアクリルアミド若しくはその誘導体、ポリエーテル若しくはその誘導体、多糖類、高分子電解質又はその塩等の水溶性高分子を用いてコーティングする。コーティングはキャスト法、スピコーティング法等により水溶性高分子を支持基板上に塗布し、乾燥させることにより行うことができる。これにより、水性溶媒に可溶な水溶性犠牲層を備える支持基板を得ることができる（図1中、（d）として示す）。

[0033] （i v）スタンプ表面上の生体適合性高分子層を、支持基板の水溶性犠牲層上にスタンプ・ベイクする（図1中、（e）として示す）。生体適合性高

分子の水溶性犠牲層上へのベイクは熱処理により行うことができる。これにより、生体適合性高分子がパターンを維持したまま水溶性犠牲層上に転写され、生体適合性高分子を担持する支持基板（生体適合性高分子担持支持基板）を得ることができる（図1中、（f）として示す）。

[0034] （v）生体適合性高分子担持支持基板を水に浸し、水溶性犠牲層を溶解させることによって、支持基板より生体適合性高分子を遊離させ、所定のパターンを有するナノ薄膜を得ることができる（図1中、（g）として示す）。

[0035] [2] SAMを備える電極基板を作製する工程

以下及び図2に、スパッタリング法を用いた電極基板の作製方法の概略を示すが、電極基板の作製方法は、当該手法に限定はされない。

[0036] （i）支持基板（合成樹脂、金属、無機材料（ガラス、シリコン、セラミック等））の上に、所定のパターンが切り抜かれたステンシルマスクをのせ、スパッタリングにより電極材料を基板上に付着させ、薄膜を形成させる（図2中、（a）、（b）として示す）。スパッタリングは公知の手法（2極スパッタリング法、マグネトロンスパッタリング法、DCスパッタリング法、RF（高周波）スパッタリング法等）を用いて行うことができる。スパッタリングの時間を調節することによって、支持基板上に付着する電極材料の厚みを調節することができる。電極材料の支持基板に対する付着性を高めるために、電極材料を付着させる前に、チタンやニッケル等別の金属で支持基板を予めコーティングしてもよい。

[0037] （i i）SAM化合物を適当な溶媒（例えば、水、アルコール（エタノール等）、アセトン、酢酸エチル等）中に0.1～10mM、好ましくは1～2mMの濃度で溶解し、このSAM化合物の溶液に、上記電極材料を付着させた支持基板を浸し（図2中、（c）として示す）、SAM化合物をチオレートを通じて電極材料に結合させ、電極材料表面にSAMを形成させる。

[0038] （i i i）ステンシルマスクを除去することによって、所定のパターンを有し、SAMをその表面に備える電極基板を得ることができる（図2中、（d）として示す）。

[0039] [3] 細胞培養基材を得る工程

水中にて、[1] で得られたナノ薄膜を[2] で得られた電極基板上に（より詳細には、電極材料を付着させた領域上に）展開して載せ、水中より取り出し乾燥させ、ナノ薄膜とSAMとを吸着させる。これにより、ナノ薄膜がSAMを介して基板となる電極基板に吸着し、配設されてなる構造を有する細胞培養基材を得ることができる。

[0040] あるいは、上記「[2] SAMを備える電極基板を作製する工程」において、SAMを備える電極基板上にてナノ薄膜を形成してもよい。すなわち、上記「[2] SAMを備える電極基板を作製する工程」の工程(i i)においてSAMを形成させた後、その表面に上記「[1] ナノ薄膜を作製する工程」の工程(i i)と同様の手法にて生体適合性高分子等の溶液を塗布する。次いで、塗布された生体適合性高分子等を重合及び／又は架橋することによって、SAM表面上に生体適合性高分子からなるナノ薄膜を形成する。最後に、ステンシルマスクを除去することによって、所定のパターンを有し、ナノ薄膜がSAMを介して基板となる電極基板に吸着・配設されてなる構造を有する細胞培養基材を得ることができる。

[0041] 細胞培養基材のナノ薄膜の表面は、細胞の接着及び増殖を促進する細胞外基質によりコーティングすることができる。細胞外基質のコーティングは、適当な溶媒中に溶解した（例えば $0.01 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ にて）細胞外基質溶液をスピンドーティング法等によりナノ薄膜上に塗布し、その後乾燥させることにより行うことができる。

[0042] 2. 細胞・ナノ薄膜複合体

本発明において、「細胞・ナノ薄膜複合体」とは、ナノ薄膜上に細胞を担持してなる構造を有する複合体である。より詳細には、本発明にける「細胞・ナノ薄膜複合体」とは、自己組織化単分子膜、ナノ薄膜、及び細胞が、この順で積層されてなる構造を有する複合体である。

[0043] 本発明において、ナノ薄膜に担持させ得る細胞としては、細胞移植療法にて患者に移植され得る細胞（ただし、体液中に浮遊する細胞は除く）が挙げ

られ、例えば網膜色素上皮（R P E）細胞、視細胞、肝細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎細胞、膵島細胞、表皮細胞、神経細胞等が挙げられる。これらの細胞は、本発明の細胞・ナノ薄膜複合体が導入・移植される患者より単離されたものであっても良いし、あるいは、E S細胞、幹細胞又はi P S細胞から誘導されたものであっても良い。

[0044] 本発明の細胞・ナノ薄膜複合体は、上記細胞培養基材を用いて細胞を培養した後、電極基板より、細胞を担持するナノ薄膜が結合するS A Mを剥離することによって得ることができる。

[0045] 電極基板からのS A Mの剥離は、電極基板にS A Mが還元脱離する電位を印加することによって行うことができる。

[0046] 電極基板に印加する電位は、S A Mが還元脱離する一方、細胞に悪影響を生じない電位であればよく、用いられるS A Mに応じて適宜決定することができる。電極基板に印加する電位は、サイクリックボルタンメトリー（C y c l i c V o l t a m m e t r y : C V）の測定により決定することができる。すなわち、所定の開始電位から所定の折り返し電位まで所定の掃引速度にて、S A Mを備える電極基板に電位を印加する。次いで、当該所定の折り返し電位より折り返して、当該初期電位まで再び当該所定の掃引速度で電位を印加する。この間に電極基板に流れる電流を測定し、印加した電位との関係に基づいてサイクリックボルタモグラムを得る。得られたサイクリックボルタモグラムにおいて、負電流のピーク、すなわち、S A Mの還元脱離に起因するピークを生じる電位を決定する。S A Mを剥離するために電極基板に印加する電位は、このS A Mの還元脱離に起因するピークを生じる電位又はこれよりも負の電位とすることができる。

[0047] 電極基板に印加する電位は、用いられるS A Mによって異なるものの、例えば、 $-0.1\text{ V} \sim -2.0\text{ V}$ （v s A g / A g C l）の範囲より選択される値とすることができる。例えば、S A Mがシステインからなる場合、 -0.7 V もしくはそれ以上、 -0.8 V もしくはそれ以上、 -0.9 V もしくはそれ以上、 -1.0 V もしくはそれ以上、 -1.1 V もしくはそれ以上

、 -1.2 V もしくはそれ以上、 -1.3 V もしくはそれ以上、 -1.4 V もしくはそれ以上、 -1.5 V もしくはそれ以上、 -1.6 V もしくはそれ以上、 -1.7 V もしくはそれ以上、 -1.8 V もしくはそれ以上、 -1.9 V もしくはそれ以上の電位を印加することができる。

[0048] 電極基板へ電位を印加する時間は、SAMが電極基板より剥離するのに十分な時間であって、細胞に悪影響を生じない時間であればよく、特に限定はされないが、例えば、 $5\sim 100$ 秒、好ましくは $30\sim 60$ 秒より適宜選択することができ、連続的に、又は断続的に行うことができる。

[0049] 電極基板への電位の印加は常法にしたがって行うことができる。すなわち、カウンター電極及び細胞培養終了後の細胞を担持する細胞培養基材を、培地中、又は適当な緩衝液（例えば、PBS）中に浸し、適当な電源にカウンター電極及び細胞培養基材の電極基板を接続することによって行うことができる。

[0050] 電極基板への電位の印加により、SAMが電極基板より剥離され、それによって電極基板より遊離した細胞・ナノ薄膜複合体を得ることができる。電極基板からのSAMの剥離、及び細胞・ナノ薄膜複合体の遊離を促すために、ピペッティングや振盪の操作を加えても良い。

[0051] 3. 細胞・ナノ薄膜複合体を用いた細胞送達

本発明の細胞・ナノ薄膜複合体は優れた柔軟性と自己支持性を有し、その直径又は最も長い対角線の長さよりも小さな内径を有する細管で吸引することができ、また当該細管より放出することができる。

[0052] 「細管」としては例えば、ガラス針、注射針（シリンジ針）、カテーテル等が挙げられる。「細管」のサイズ（ゲージ）や長さは、細胞・ナノ薄膜複合体の大きさや、細胞・ナノ薄膜複合体を導入する部位等の要因に応じて適宜選択することができる。

[0053] 本発明の細胞・ナノ薄膜複合体の生体内への導入は、生理食塩水と共に細胞・ナノ薄膜複合体を注射針又はカテーテル先端より吸引し、注射シリンジ又はカテーテル内に保持し、注射針又はカテーテル先端を疾患部位又はその

近傍に挿入し、細胞・ナノ薄膜複合体を注射針又はカテーテル先端より放出して留置することにより行うことができる。細胞・ナノ薄膜複合体の生体内への導入により、前記疾患部位又はその近傍に担持する細胞を送達することができる。生体内には一又はそれ以上の細胞・ナノ薄膜複合体を導入することができる。また、導入されたパターン化ナノ薄膜は生体内で分解吸収され得る。

[0054] 例えば、網膜色素上皮（RPE）細胞の細胞・ナノ薄膜複合体を網膜に導入することにより、加齢黄斑変性等の網膜病変を治療することができる。ナノ薄膜を用いるアプローチは、ナノ薄膜の高い柔軟性から細胞シートを網膜病変部等の複雑な表面にも安定に配置することが可能である。さらに、このアプローチでは、回収した細胞・ナノ薄膜複合体をシリンジ針にて低侵襲に網膜下に移植できるため、合併症発生の防止効果も期待できる。

[0055] 4. 細胞培養装置

本発明において細胞培養装置は、上記細胞・ナノ薄膜複合体の製造に用いられる、細胞培養基材、ならびに電極基板へ電位を印加するために用いられるカウンター電極及び適当な電源を含むことができる。

実施例

[0056] 以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

1. 試薬

本実施例において、以下の試薬を用いた。

- ・ 10-カルボキシデカンチオール（同仁化学研究所）
- ・ 7-カルボキシヘプタンチオール（同仁化学研究所）
- ・ L-システイン（和光純薬）
- ・ ポリ乳酸グリコール酸共重合体（75：25，PLGA，Polysciences，Inc.）
- ・ ポリビニルアルコール（分子量13，000－23，000，PVA，SIGMA-ALDRICH）

- ・ポリジメチルシロキサン（PDMS，東レダウコーニング）

その他全ての試薬は市販されているものを使用した。

[0057] 2. 細胞培養基材の作製

2-1. SAM化合物溶液の調製

本実施例においては、3種類のSAM化合物を用いて実験を行った。各SAM化合物溶液は以下の条件で調製した。

- ・10-カルボキシデカンチオールをエタノールに溶かし、1 mMに調製した。
- ・7-カルボキシヘプタンチオールをエタノールに溶かし、1 mMに調製した。
- ・L-システインを蒸留水に溶かし、1 mMに調製した。

[0058] 2-2. 電極基板の作製

電極基板は図2に示す手法に準じて作製した。

[0059] すなわち、シリコーンゴムシート（厚さ200 μm ）をカッティングプロッター（Craft ROBO Pro, GRAPHTEC）を用いて目的の形状にカットし、ガラス基板に貼り付けた状態でチタンを60秒間スパッタリングした。次いで、金を60秒間スパッタリングした後、「2-1. SAM化合物溶液の調製」で作製したいずれかのSAM化合物溶液に室温で30分間浸して、金の表面にSAMを形成させた。最後に、シリコーンゴムシートを剥がすことによって、表面にSAMを備える金がパターンニングされた電極基板を得た。

[0060] 2-3. SAMの電気化学的評価

上記「2-2. 電極基板の作製」で作製した、10-カルボキシデカンチオール、7-カルボキシヘプタンチオール、又はL-システインからなる各SAMを備える金がパターンニングされた電極基板について、ALS電気化学アナライザー（ALS Electrochemical Analyzer Model 760C, CH Instruments）を用いてサイクリックボルタンメトリー（CV）を測定した。

[0061] 測定には三電極式を使用し、上記電極基板、参照電極（A g / A g C l 電極）、カウンター電極（A g 電極）をそれぞれA L S 電気化学アナライザーに接続し、30分間窒素バブリングしたK O H 水溶液（0.5 M）に各電極を浸してC V の測定を以下の条件にて行った。

- ・走査速度：0.1 V s⁻¹
- ・セグメント：2
- ・サンプリング間隔：0.001 V
- ・感度：1 e - 4 A V⁻¹

[0062] 各S A Mを備える電極基板のサイクリックボルタモグラムを、図3に示す。1回目の掃引（A）では、各S A Mを備える電極基板のグラフについてそれぞれピークが確認された。一方、2回目の掃引（B）では全ての電極基板のグラフについてピークが認められなかった。この結果は、1回目の掃引において各電極基板よりS A Mが剥離したことを示す。

[0063] また、以下の表1に電極基板から剥離したS A M化合物の分子数をサイクリックボルタモグラムのピーク値から算出した結果を示す。剥離したS A M化合物の分子数はサイクリックボルタモグラムの負のピークにおける総電荷量と、S A M化合物1分子につき1電子が反応することに基づいて算出した。元々電極基板と結合していた分子数の理論値と比較したところ、3種類のS A M全てで50～70%の分子が剥離したことが示された。

[0064] [表1]

SAM	密度 (nmol/cm ²)	面積 (cm ²)	元々の 分子数	剥がれた 分子数	剥がれた 割合(%)
10-カルボキシデカンチオール	0.58	0.196	6.8E+13	3.3E+13	48.8
7-カルボキシヘプタンチオール	0.45		5.3E+13	3.8E+13	71.3
L-システイン	0.38		4.5E+13	3.2E+13	71.9

[0065] この結果より還元電位を印加することで、電極基板上の大部分のS A Mを剥離できることが確認された。

[0066] 上記C Vの結果より、L-システインからなるS A Mが最も低い電位で、電極基板より剥離することが確認された。この結果より、3種類のS A Mの

中でL-システインからなるSAMが、電位を印加したときに最も脱離しやすいことが示された。以後の実験は、SAMの形成にL-システインを用いて実施した。

[0067] 2-4. 細胞培養基材の作製

PLGAからなるナノ薄膜は図1に示す手法に準じて作製した。

[0068] (1) PVAを蒸留水に100mg/mLにて溶かし、PVAを調製した。ガラス基板にPVA溶液を4000rpmにて40秒間スピコートし、120℃のホットプレートで90秒間加温した。

[0069] (2) PLGAをCH₂Cl₂に20mg/mLにて溶かし、PLGA溶液を調製した。PDMSで目的の形状のスタンプを作製し、これにPLGA溶液を4000rpmにて40秒間スピコートした。

[0070] (3) (2)で得られたPLGAをコートしたスタンプを、(1)で得られたPVAをコートしたガラス基板に押し付けて90秒間加温した。

[0071] (4) スタンプを基板から剥がしてガラス基板を水に浸しPVAを溶解させて、目的の形状を有するナノ薄膜を遊離させた。

[0072] (5) 遊離したナノ薄膜を水中で、上記「2-2. 電極基板の作製」で作製した表面にL-システインからなるSAMを備える電極基板上にピンセットを用いて載せ、水中より取り出し乾燥・吸着させ、ナノ薄膜がSAMを介して電極基板上に配設されてなる細胞培養基材を得た(図4)。

[0073] 2-5. ナノ薄膜の剥離試験

上記「2-4. 細胞培養基材の作製」で作製した細胞培養基材、及び-1.5Vの乾電池に接続したカウンター電極(Pt電極)をPBS中に浸し、当該乾電池で電極基板に電位を30~50秒間印加した。

[0074] その結果、ナノ薄膜の黒く見える部分の面積が増大した(図5)。これはSAMが電極基板より剥離し、電極基板との間にPBSが入り込んだことを示す。この状態でピペットを用いてナノ薄膜に軽く水流を当てると、ナノ薄膜は電極基板より容易に遊離した。

[0075] 一方、電位を印加しない状態で水流を当ててもナノ薄膜は電極基板から剥

がれなかった。

[0076] これらの結果より、SAMの還元脱離を用いることでナノ薄膜を電極基板から遊離させることができることが確認され、そのタイミングは電位印加の操作によって調節できることが示された。

[0077] 3. 細胞・ナノ薄膜複合体の剥離試験

本試験においては、細胞・ナノ薄膜複合体を基板より剥離する手段（SAM、PVA、温度応答性高分子）について比較検討した。

（1）SAMを用いた剥離試験

本実験においては、上記「2-4. 細胞培養基材の作製」にて作製した細胞培養基材を利用した。細胞培養に際して、細胞培養基材はナノ薄膜上にI型コラーゲン（5 mg/mL）をスピコート（4000 rpm, 40秒）して細胞の接着性を高めた後に利用した。

[0078] ラット由来の網膜色素上皮細胞（RPE-J細胞）を 3×10^6 細胞/mL程度に調製して前記細胞培養基材のナノ薄膜上に細胞の懸濁液を400 μ L滴下した。細胞がナノ薄膜に沈着するまで1時間程度インキュベータ（朝日ライフサイエンス、ミニCO₂インキュベータ4020型）内で静置した後、培地を抜き、PBS（-）を静かに加えて洗浄した。PBS（-）を抜き、培地（500 mLのDMEM（Dulbecco's modified Eagle's Medium, High glucose, 和光純薬））に5 mLの抗生物質&抗真菌剤（Antibiotic-Antimycotic, Gibco）及び20 mLの非働化牛胎児血清（FBS, BioWest）を添加したものを加えて、33℃の条件下インキュベータ内で培養した。

[0079] 2日間培養した後、電極基板に「2-5. ナノ薄膜の剥離試験」に記載した手法と同様に、-1.5 Vの乾電池で電位を30～50秒間印加した。

[0080] ピペットを用いて細胞培養基材に軽く水流を当てると、電極基板から細胞・ナノ薄膜複合体が容易に遊離した（図6：電位の印加後、ナノ薄膜の黒く見える部分の面積が増大した（c））。また、Calcein-AM及びP

Iを用いた細胞の生死判定により、得られた細胞・ナノ薄膜複合体における細胞の生存も確認された。細胞・ナノ薄膜複合体を電極基板から脱着させる前後で組織形態に変化は無く、細胞生存率もともにほぼ100%であった（図7）。この結果より、SAMの還元脱離を利用した脱着操作がナノ薄膜上の細胞に与える影響はほとんど無いことがわかった。

[0081] （2）犠牲層のPVAを用いた剥離試験

培養中の細胞・ナノ薄膜複合体の基板としてPVA層を用いて実験を行った。培養液中にて、PVA層が徐々に溶解することによって、細胞・ナノ薄膜複合体を基板より遊離させることを試みた。

[0082] ナノ薄膜上でRPE-J細胞がコンフルエントになるまでに約2日かかるため、約50時間程度で完全にPVA層が溶解するようにPVA量を調製して基板を作製した。すなわち、上記「2-4. 細胞培養基材の作製」に記載する手法と同様に、PVAを蒸留水に10mg/mL, 15mg/mL, 20mg/mL, 30mg/mL, 50mg/mL, 又は100mg/mLにて溶かしてPVA溶液を調製し、これを用いてPVAをコートしたガラス基板を作製した。これにPLGAをコートしたスタンプを押し付けて90秒加温し、スタンプを基板から剥がし、I型コラーゲンをコーティングして、ナノ薄膜・PVA細胞培養基材を作製した。この上に細胞を播種し培養した。

[0083] 結果、100mg/mLのPVA溶液を用いて調製されたナノ薄膜・PVA細胞培養基材においては培養開始から約1時間後に、20mg/mL, 30mg/mL, 50mg/mLのPVA溶液を用いて調製された場合には約2時間後に、15mg/mLのPVA溶液を用いて調製された場合には約24時間後に、10mg/mLのPVA溶液を用いて調製された場合には約36時間後に、それぞれナノ薄膜が完全に遊離して基板を失い、細胞がコンフルエントになるまでの間（約2日間）、基板にナノ薄膜を接着させておくことはできなかった。

[0084] ナノ薄膜の大きさ、用いるPVA溶液の濃度、培養期間等の要因によって、PVAの溶解速度やナノ薄膜の遊離のタイミングは変化し得るため、基板

としてPVA層を利用する本手法によって、所望のタイミングでナノ薄膜を基板より遊離させることは困難であるといえる。

[0085] (3) 温度応答性高分子を用いた剥離試験

培養中の細胞・ナノ薄膜複合体の基板として、温度応答性高分子を用いて実験を行った。培養温度を変化させることによって、温度応答性高分子の接着特性を変化させ、細胞・ナノ薄膜複合体を基板より遊離させることを試みた。

[0086] 上記「2-4. 細胞培養基材の作製」において、工程(4)で得られたナノ薄膜を、温度応答性高分子であるポリイソプロピルアクリルアミドが培養表面に固定された市販の培養皿Up Cell (Wako)に載せ、I型コラーゲンをコーティングした後、この上で細胞を培養し、細胞・ナノ薄膜複合体を作製した。なお、Up Cellは32℃を境にして、それより高温環境では疎水性となり接着表面を作り、それより低温環境では親水性となり遊離表面を作る。

[0087] 2日間の培養後、温度を20℃に下げた環境下で数十分静置したが、Up Cellから細胞・ナノ薄膜複合体を遊離させることはできなかった。また、ピペッティングにより水流を当てたが、Up Cellから剥がれたものは細胞のみで細胞・ナノ薄膜複合体は遊離しなかった。これは細胞の培養環境が33℃で、Up Cellの境界の温度である32℃に近く適切な温度変化を生じさせることができなかったこと、また、PLGAからなるナノ薄膜とUp Cellとの間で強い分子間力働いたこと等が要因として考えられる。

[0088] 以上の結果より、SAMの還元脱離を利用することで細胞・ナノ薄膜複合体を基板より任意のタイミングで、容易に遊離させることが可能であることが示された。すなわち、他の手法と比べて、SAMを利用する本発明の手法が、細胞・ナノ薄膜複合体を得る上で顕著な有用性を有することが明らかとなった。

[0089] 4. 電極基板としてのポラス電極基板(ポラス膜)の利用

SAMの還元脱離反応を促進するためには、電極表面への電解質溶液の迅速な供給が必要である。そこで、電極基板としてポーラス膜の利用を検討した。図8は、金をコートしたポーラス薄膜（ポアサイズ1 μm ）の写真（図8a）とSEM画像（図8b）である。この電極表面にL-システインのSAMを形成させた後、電極上にナノ薄膜を吸着させた。SAMの還元脱離反応を進行させると、1分程度で電極基板からナノ薄膜が脱着することが確認された（図9）。図9A、B及びCは、それぞれ、0秒後、50秒後及び60秒後の状態を示す。図10に電極基板からナノ薄膜が脱着するのに要した時間を示す。ナノ薄膜の直径が10、20mmのいずれの場合も、脱着に要する時間はポーラス電極の方がノンポーラス電極に比べて明らかに短かった。

[0090] これは、ポーラス電極では、電解質溶液が電極表面のエッジからのみならず、ポアを通して裏側からも電極表面に供給されるため、速やかに還元脱離反応が進行したためだと考えられる。

[0091] 5. 細胞・ナノ薄膜複合体のラット眼球網膜下への送達 電極基板から脱着させた細胞・ナノ薄膜複合体のラット眼球網膜下への送達を検討した。ナノ薄膜上でRPE細胞（網膜色素上皮細胞：Retinal Pigment Epithelium）がモノレイヤー組織を形成した後、SAMの還元脱離により、モノレイヤー組織を細胞・ナノ薄膜複合体として電極基板から脱着させた。続いて、ガラスキャピラリーニードル中に細胞・ナノ薄膜複合体を吸引し、その後、ニードルを射出する方法を示す図である。挿入して細胞・ナノ薄膜複合体を射出した（図11）。図12に網膜下に細胞・ナノ薄膜複合体を送達した後の光干渉断層計（OCT）画像を示す。網膜下にシート様構造の影が観察された一方で、コントロールの網膜ではそのような影は確認されなかった。また、眼球を摘出すると、後眼部に円形のナノ薄膜が確認された（図13）。図14は摘出眼球の凍結切片画像であり、ナノ薄膜が網膜下に送達され展開していることが確認できる。さらに、別のサンプルで行ったヘマトキシリン・エオシン染色画像による組織学的検査からナノ薄膜による網膜下への細胞の局所送達を示唆された（図15）。

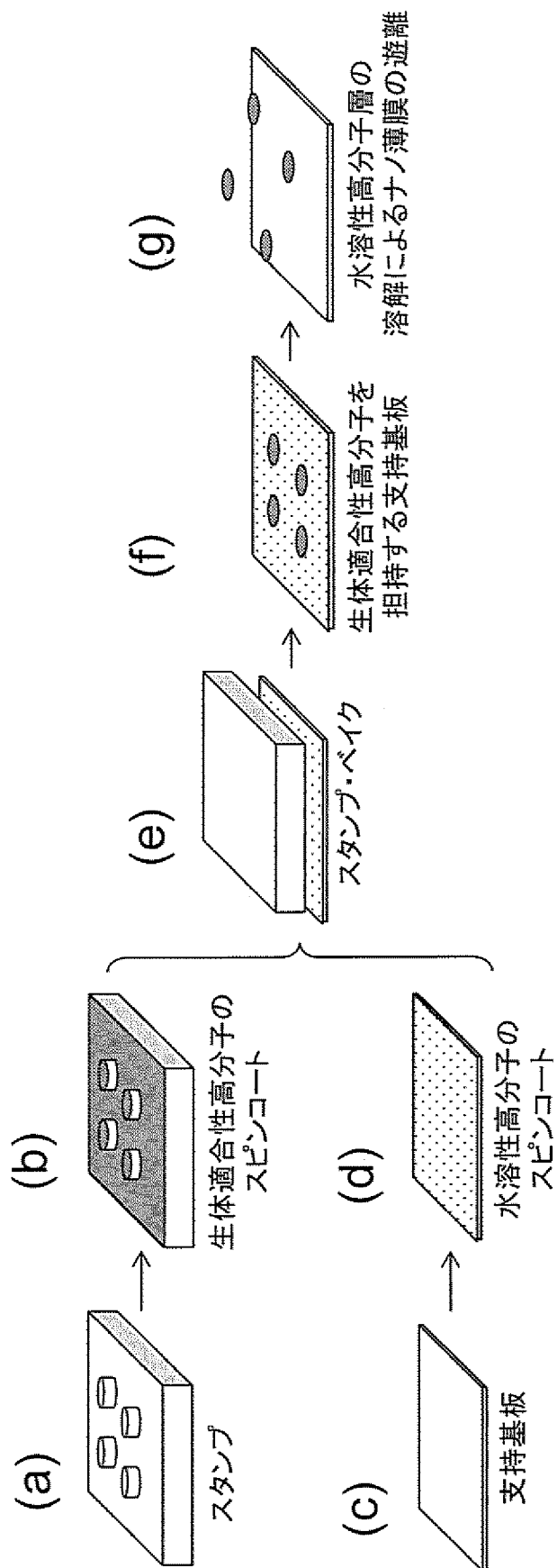
請求の範囲

- [請求項1] 細胞・ナノ薄膜複合体の製造方法であって
ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材において、該ナノ薄膜上にて細胞を培養する工程、
該電極基板に、該自己組織化単分子膜が該電極基板より還元脱離する電位を印加して、該自己組織化単分子膜を該電極基板より剥離する工程、ならびに
該自己組織化単分子膜の剥離に伴い、該電極基板より遊離した細胞・ナノ薄膜複合体を回収する工程、を含む、上記方法。
- [請求項2] ナノ薄膜が、生体適合性高分子からなる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 生体適合性高分子が、ポリ乳酸グリコール酸共重合体である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 自己組織化単分子膜がアルカンチオール又はその誘導体、あるいはシステインからなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 電極基板が多孔質体である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、請求項5記載の方法。
- [請求項7] ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材。
- [請求項8] 電極基板が多孔質体である、請求項7に記載の細胞培養基材。
- [請求項9] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、請求項8記載の細胞培養基材。
- [請求項10] ナノ薄膜が自己組織化単分子膜を介して電極基板に配設されてなる細胞培養基材、ならびに該電極基板へ電位を印加するために用いられるカウンター電極及び電源を含む、細胞培養装置。
- [請求項11] 電極基板が多孔質体である、請求項10に記載の細胞培養装置。
- [請求項12] 電極基板である多孔質体がポラス膜である、請求項11記載の細

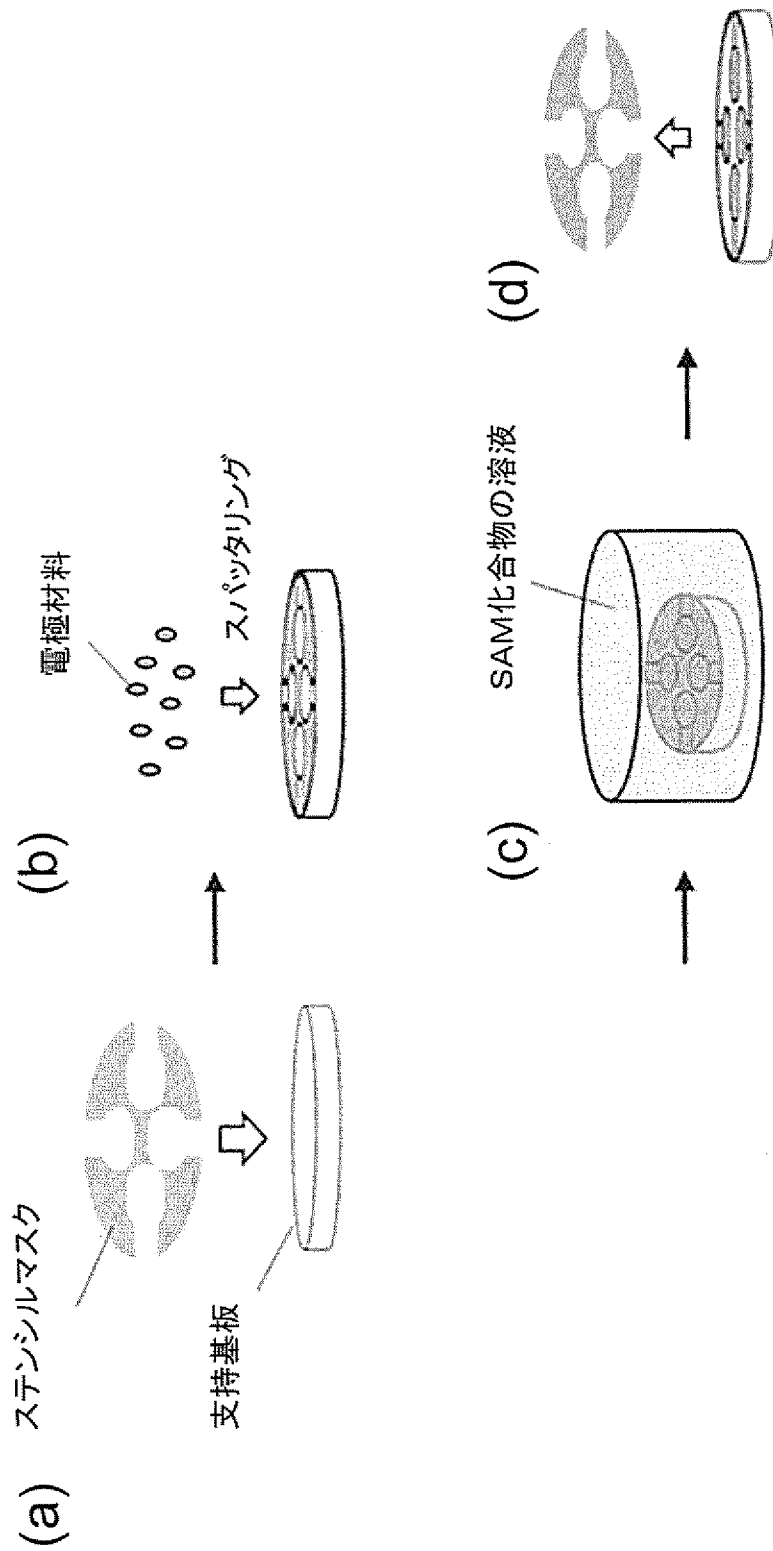
胞培養装置。

[請求項13] 自己組織化単分子膜、ナノ薄膜、及び細胞が、この順で積層されてなる、細胞・ナノ薄膜複合体。

[図1]

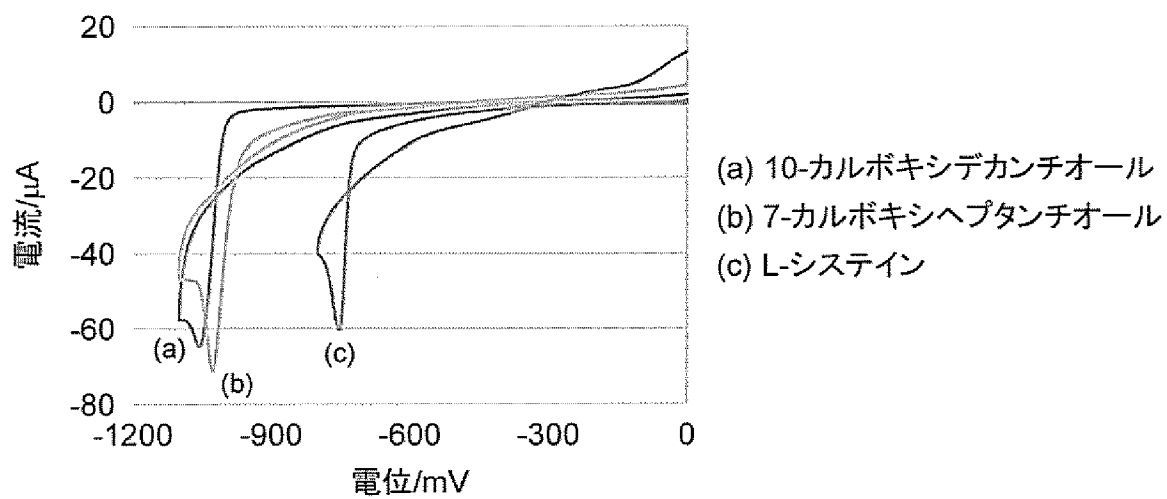


[図2]

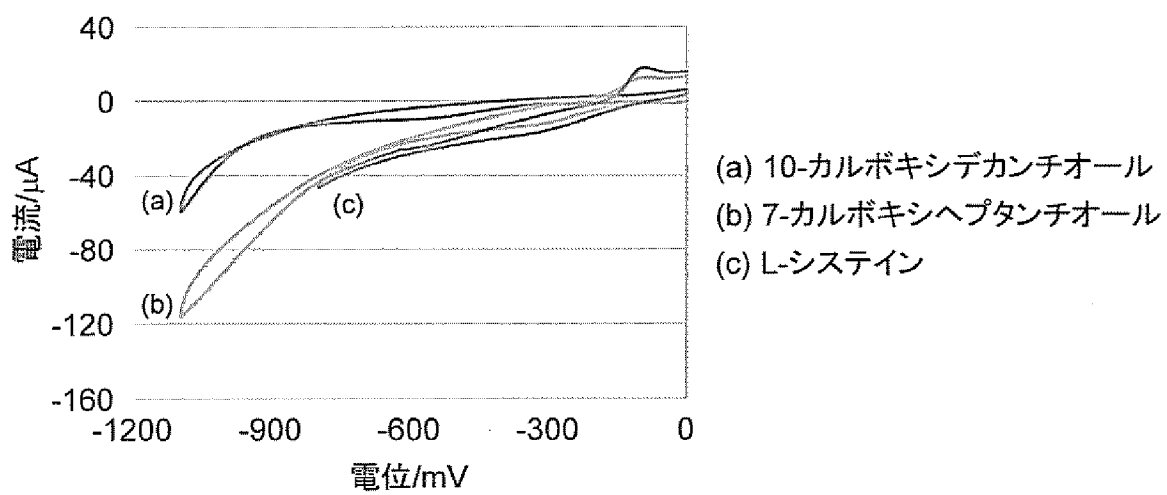


[図3]

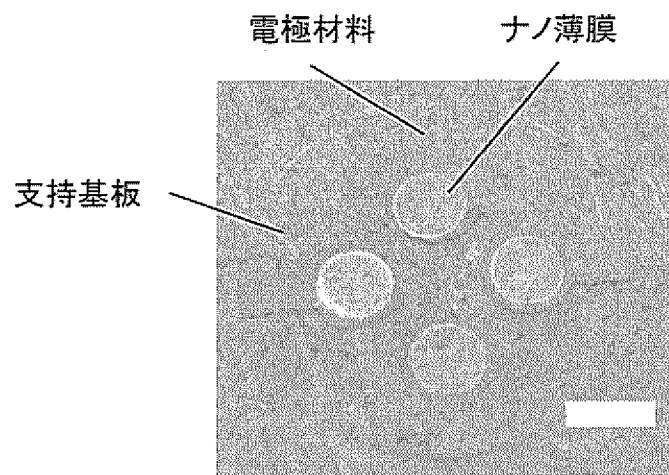
(A)



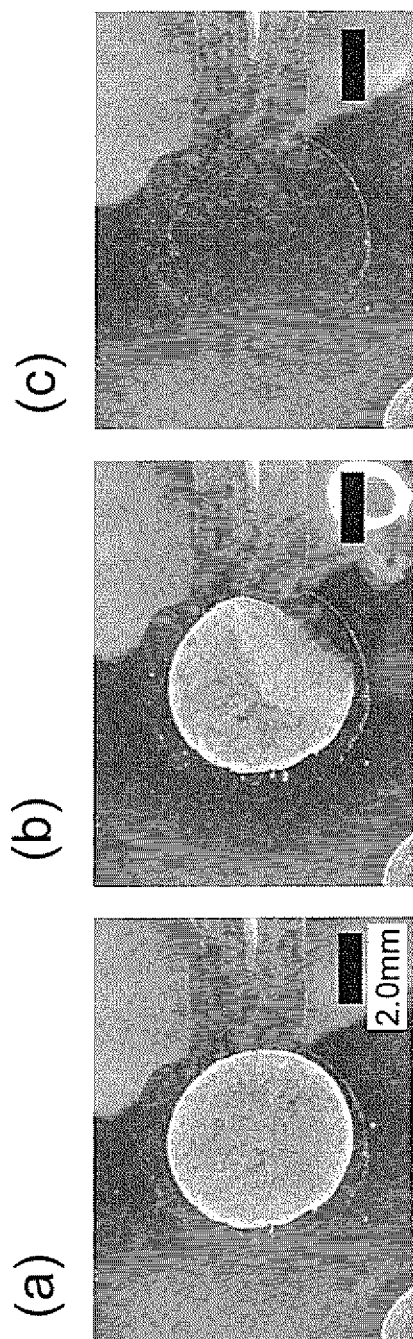
(B)



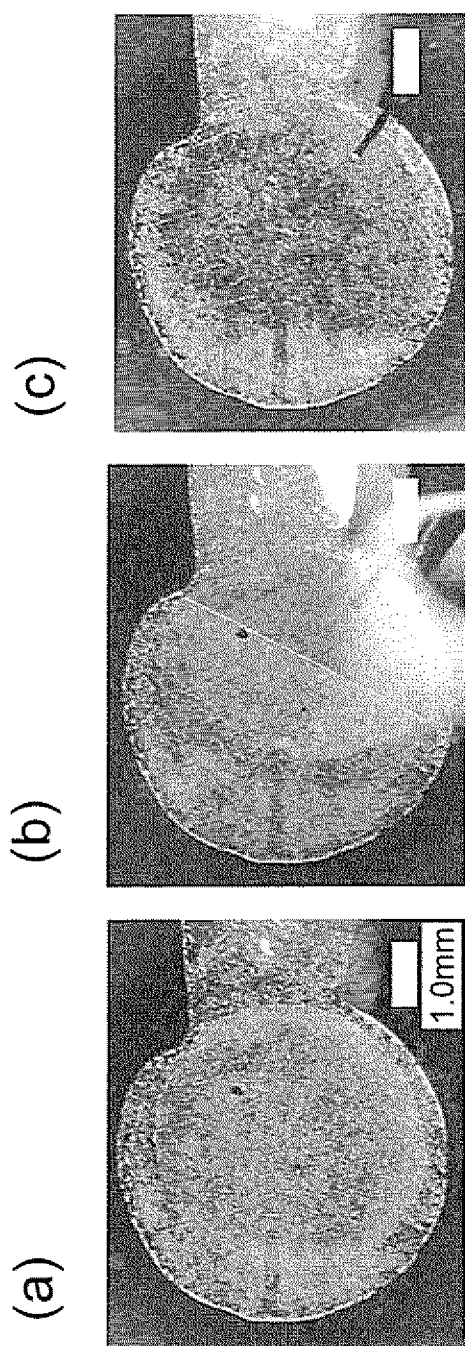
[図4]



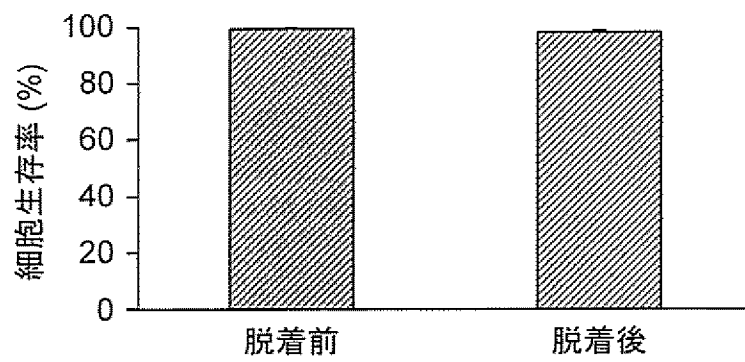
[図5]



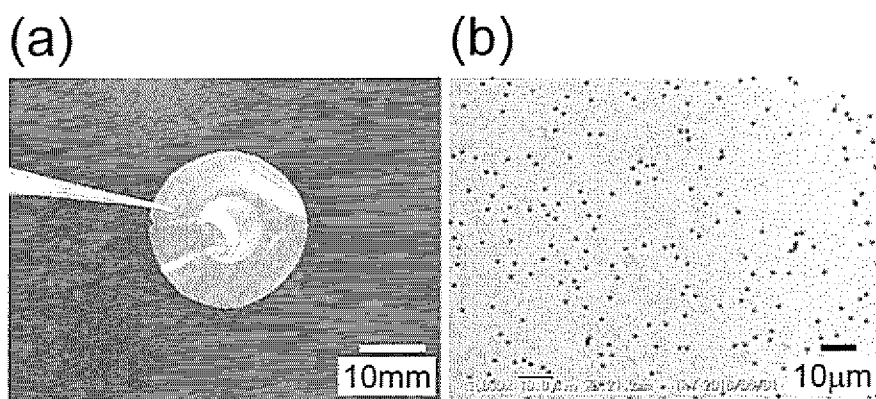
[図6]



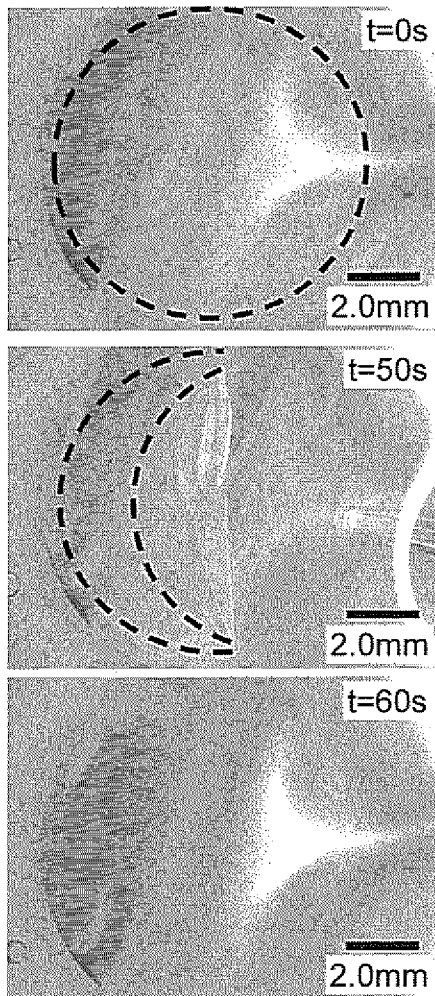
[図7]



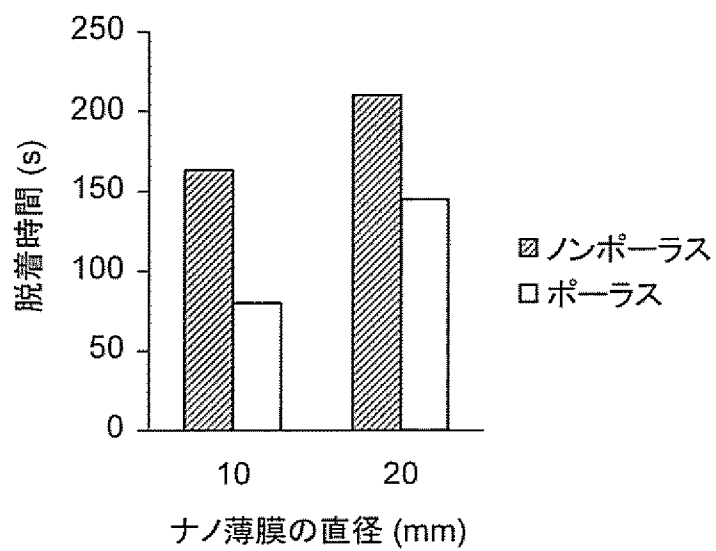
[図8]



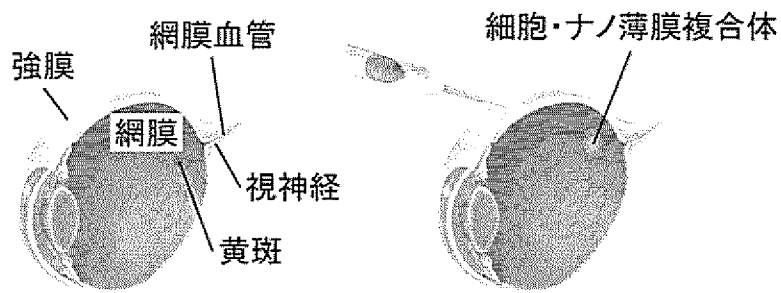
[図9]



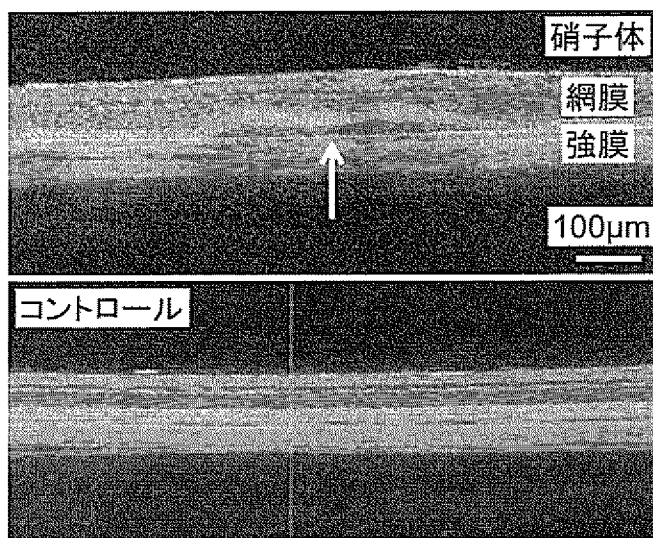
[図10]



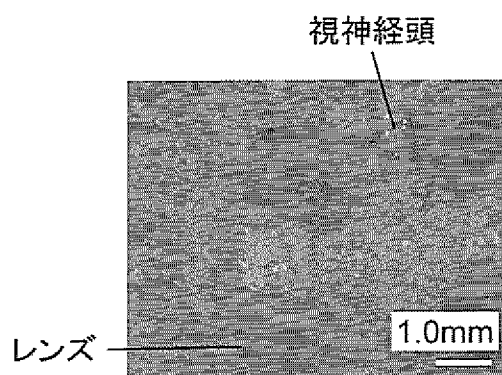
[図11]



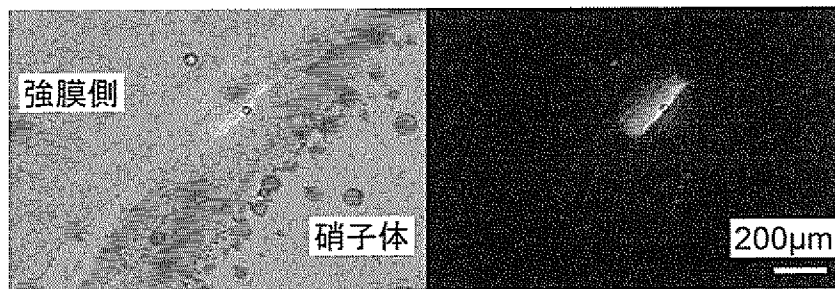
[図12]



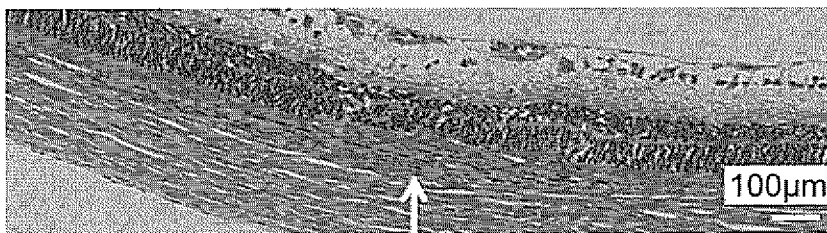
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/016010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07(2010.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/07, A61L27/00, C12M3/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN), Japio-GPG/FX, AGRICOLA(STN), BIOTECHNO(STN), CABA(STN),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/208778 A1 (Tohoku University), 31 December 2014 (31.12.2014), claims; page 10 & JP 14-208778 A1	1-13
Y	JP 2015-217663 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 07 December 2015 (07.12.2015), claims; paragraphs [0003], [0035], [0036]; fig. 2(B) (Family: none)	1-13
A	JP 2008-136684 A (Tohoku University), 19 June 2008 (19.06.2008), (Family: none)	1-13

☐ 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
12 July 2017 (12.07.17)

Date of mailing of the international search report
25 July 2017 (25.07.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/016010

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

SCISEARCH (STN) , TOXCENTER (STN)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/07, A61L27/00, 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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), Japio-GPG/FX, AGRICOLA (STN), BIOTECHNO (STN), CABA (STN), SCISEARCH (STN), TOXCENTER (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 請求項の番号
Y	WO 2014/208778 A1 (国立大学法人東北大学) 2014. 12. 31, 請求の範囲、p. 10 & JP 14-208778 A1	1-13
Y	JP 2015-217663 A (凸版印刷株式会社) 2015. 12. 07, 【特許請求の範囲】、【0003】、【0035】、【0036】、【図2】 (B) (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2008-136684 A (国立大学法人東北大学) 2008. 06. 19, (ファミリーなし)	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- | | |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「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 |
| 「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 | 「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 |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

12. 07. 2017

国際調査報告の発送日

25. 07. 2017

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)

太田 雄三

4 B

3959

電話番号 03-3581-1101 内線 3448