

(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
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/253070 A1

(51) 国際特許分類:
D06M 15/285 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C08F 293/00 (2006.01) D06M 15/263 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) D06M 101/32 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/020258

(22) 国際出願日: 2024年6月3日(03.06.2024)

(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 2023-093313 2023年6月6日(06.06.2023) JP
特願 2023-143854 2023年9月5日(05.09.2023) JP

(71) 出願人: 東ソ一株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町4 5 6 0 番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 金 榮鎮 (KIM Young-Jin); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3 番地1 東ソ一株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 今富 伸哉 (IMATOMI Shinya); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3 番地1 東ソ一株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 最上 聡文 (MOGAMI Toshifumi); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3 番地1 東ソ一株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP). 伊藤 博之 (ITO Hiroyuki); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川2 7 4 3 番地1 東ソ一株式会社東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1 番1 号 丸の内 M Y P L A Z A

(明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: TEMPERATURE-RESPONSIVE NONWOVEN FABRIC

(54) 発明の名称: 温度応答性不織布

(57) Abstract: The present invention relates to a nonwoven fabric in which a block copolymer including (A), (B), and (C) blocks is coated onto a surface of the nonwoven fabric, which comprises a plastic having a true density of 1.0-1.5 g/cm³ and a water absorption rate of less than 0.3%. (A) A polymer block having an HLB value (Griffin's method) in the range of 7-20, inclusive. (B) A polymer block having an HLB value (Griffin's method) in the range of at least 0 and less than 7. (C) A temperature-responsive polymer block having a lower critical solution temperature (LCST) in water in the range of 0-50 °C.

(57) 要約: 本発明は、真密度が1.0~1.5 g/cm³で吸水率が0.3%未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布に関する。(A) HLB値(グリフィン法)が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。(B) HLB値(グリフィン法)が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。(C) 水に対する下限臨界溶解温度(LCST)が0°C~50°Cの範囲にある温度応答性重合体ブロック。

WO 2024/253070 A1

明 細 書

発明の名称： 温度応答性不織布

技術分野

[0001] 本発明は、温度応答性不織布に関する。

背景技術

[0002] バイオテクノロジーは医療や食品をはじめ幅広く活用されている。バイオテクノロジーの中でも細胞を原料とした開発が加速しており、医療分野では細胞医薬品が難治疾患の治療を目指しており、食品分野では培養肉が省資源省スペースで生産効率の高い食用肉の生産を目指している。これら技術の実用化には原料細胞の生産コスト低減が不可欠である。

[0003] 一般的に多くの動物細胞は足場依存性があり、細胞を増殖する際は足場となる培養基材が必要である。培養基材としてプラズマ処理を施したポリスチレン製のディッシュがあり、細胞を回収する際はトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて処理するが、処理が煩雑な課題があった。これに対し特許文献1では、温度応答性ポリマーを基材表面に被覆した培養基材が記載されている。温度応答性ポリマーの相転移を利用し、タンパク質分解酵素を用いずに冷却することで細胞の回収を可能にしており煩雑操作を解消した。

[0004] また一般的な細胞培養用ディッシュは、ディッシュ底面でしか培養できず単位培地当たりの細胞生産性が低い課題があった。これに対し特許文献2では、温度応答性ポリマーを含んだ不織布が記載されている。温度応答性ポリマーを含んだ不織布は表面積が広いいため単位培地量当たりの細胞生産性を高めることができる。さらに細胞回収時は冷却することで繊維の集合構造である不織布が繊維構造まで崩壊し、不織布表面の細胞だけでなく不織布内部の細胞も回収できる。

[0005] しかしながら、特許文献2記載の温度応答性ポリマーを含んだ不織布を用いた細胞回収方法では、細胞懸濁液中に不織布成分である繊維が含まれてしまうため、繊維を除去する工程が必要となり操作が煩雑な課題が残存した。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許5846584号公報

特許文献2：特開2008-029226号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本特許の目的は、単位培地当たりの細胞生産性が高く、且つ、繊維状の夾雑物を含まない細胞懸濁液を回収可能な培養基材を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、以上の点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布は、単位培地当たりの細胞生産性が高く、且つ、繊維状の夾雑物を含まない細胞懸濁液を回収できることを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は以下の態様を含包する。

<1>真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布。

(A) HLB値(グリフィン法)が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

(B) HLB値(グリフィン法)が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

<2>前記吸水率が 0.2% 以下であることを特徴とする<1>記載の不織布。<3>プラスチックがポリエチレンテレフタレートであることを特徴とする<1>又は<2>記載の不織布。

<4>ブロック共重合体の被覆量が $1.0 \sim 100.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であることを特徴とする<1>~<3>記載の不織布。

<5>不織布を構成する繊維の太さが $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ であることを特徴とする<1>~<4>記載の不織布。

<6>ブロック共重合体のブロック (C) の割合が $30 \sim 90 \text{mol}\%$ であることを特徴とする<1>~<5>記載の不織布。

<7>ブロック共重合体の数平均分子量が $1000 \sim 1000000$ であることを特徴とする<1>~<6>記載の不織布。

<8><1>~<7>記載の不織布の製造方法。

<9>真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{g}/\text{cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記 (A)、(B)、(C) のブロックを含むブロック共重合体を被覆する工程を含むことを特徴とする、<1>~<7>記載の不織布の製造方法。

(A) HLB値 (グリフィン法) が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

(B) HLB値 (グリフィン法) が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

<10>前記吸水率が 0.2% 以下であることを特徴とする<9>記載の製造方法。

<11><1>~<7>記載の不織布を用いた細胞培養方法。

<12><1>~<7>記載の不織布を含む培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする細胞培養方法。

<13>キレート剤を含む冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を含むことを特徴とする<11>又は<12>記載の細胞培養方法。

発明の効果

[0009] 真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布は、単位培地当たりの細胞生産性が高く、且つ、繊維状の夾雑物を含まない細胞懸濁液を回収できる。

(A) HLB値(グリフィン法)が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

(B) HLB値(グリフィン法)が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明するが、本発明を以下の内容に限定する趣旨ではない。本発明は、その趣旨の範囲内で適宜変更して実施できる。

[0011] 本発明は真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布である。

[0012] 本発明において不織布とは繊維を熱または機械的または化学的な作用によって接着または絡み合わせる事で布にしたものである。

[0013] 本発明において不織布とは、繊維を布状にし、繊維を結合させたものであり、不織布を形成させるシーティング方法に特に限定はないが、一般的に空气中で形成させる乾式法、水中で形成させる湿式法、スパンボンド法等が挙げられ、また、繊維間の結合を形成させるボンディング方法に特に限定はないが、一般的に熱による結合、化学的結合、機械的結合等が挙げられ、本発明の範囲にあれば加工のしやすさに応じ適宜選択できる。

[0014] 本発明において不織布を構成する繊維の真密度は、不織布を構成する繊維間にある隙間部分(孔隙部分)を除いた体積から算出される密度であり、水中で沈降するために $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ であり、攪拌下で分散しやすい

ように、好ましくは $1.0 \sim 1.3 \text{ g/cm}^3$ であり、さらに好ましくは $1.0 \sim 1.2 \text{ g/cm}^3$ である。不織布を構成する繊維の吸水率は、水中で分解せずに強度を保つために 0.3% 未満であり、好ましくは 0.2% 以下であり、さらに好ましくは 0.15% 以下であり、特に好ましくは 0.1% 以下である。吸水率の評価方法はISO 62:1999, Plastics - Determination of water absorptionを翻訳した、JIS K 7209:2000, 「プラスチック-吸水率の求め方」を参照する。不織布を構成する繊維の材質は特に限定はないが、本発明の真密度と吸水率の範囲にある材質の一例として、ポリアミドイミド、ポリオキシメチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ塩化ビニル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリフェニレンスルファイド、ポリスチレン、ポリプロピレン等が挙げられるが、加工のしやすさから好ましくはポリエチレンテレフタレートである。また本発明の真密度と吸水率の範囲にあれば材質は共重合体からなっても良く、多層構造糸であっても良い。また、本発明の真密度と吸水率の範囲にあれば不織布に有機物及び／又は無機物及び／又は金属を添加しても良い。

[0015] 不織布を構成する繊維の太さは特に限定はないが、細胞が吸着するために、好ましくは $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $10 \sim 300 \mu\text{m}$ であるが、使用細胞種や特性を考慮し適宜選択することが好ましい。

[0016] 不織布を構成する繊維の構造は特に限定はなく、断面構造の一例として、円形であり、表面積を高めるために花形や扁平多葉型にしても良いし、細胞培養用培地を不織布全体に行き届かせるために中空糸構造であっても良く、使用細胞種や特性を考慮し適宜選択することが好ましい。

[0017] 不織布の厚みは特に限定はないが、一例として、 $0.01 \sim 5 \text{ mm}$ であり、好ましくは $0.1 \sim 3 \text{ mm}$ であるが、使用細胞種や特性を考慮し適宜選択することが好ましい。

[0018] 不織布の目開きは特に限定はなく、一例として $1 \mu\text{m} \sim 1000 \mu\text{m}$ である。

[0019] 本発明の不織布に被覆するブロック共重合体は下記（A）、（B）、（C）のブロックを含む。

（A）HLB値（グリフィン法）が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

（B）HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

[0020] HLB値（Hydrophile-Lipophile Balance : HLB）とは、W. C. Griffin, Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1, 311 (1949). に記載の、水と油への親和性の程度を表す値であり、0から20までの値を取り、0に近いほど疎水性が高く、20に近いほど親水性が高くなる。計算式によりHLB値を算出方法として、アトラス法、グリフィン法、デイビス法、川上法があるが、本明細書においては、グリフィン法により算出した値を使用し、本発明のブロック共重合体を構成する各ブロックの繰り返し単位中の親水部の式量と繰り返し単位の総式量を元に、下記の計算式により算出した。

HLB値 = $20 \times (\text{繰り返し単位中の親水部の式量}) \div (\text{繰り返し単位の総式量})$

[0021] 前述の、各ブロックの繰り返し単位中の親水部の定義として、スルホン部（ $-\text{SO}_3-$ ）、ホスホノ基部（ $-\text{PO}_3-$ ）、カルボキシル基部（ $-\text{COOH}$ ）、エステル部（ $-\text{COO}-$ ）、アミド部（ $-\text{CONH}-$ ）、イミド部（ $-\text{CON}-$ ）、アルデヒド基部（ $-\text{CHO}$ ）、カルボニル基部（ $-\text{CO}-$ ）、ヒドロキシル基部（ $-\text{OH}$ ）、アミノ基部（ $-\text{NH}_2$ ）、アセチル基部（ $-\text{COCH}_3$ ）、エチレンアミン部（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ）、エチレンオキシ部（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ）、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、アンモニウムイオン、ハロゲン化物イオン、酢酸イオンを例示することができる

。

[0022] 繰り返し単位中の親水部の算出では、親水部を構成する原子が、他の親水部を構成する原子として重複してはならない。繰り返し単位中のHLB値の算出例を以下に記載した。例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（分子量：295.27）の場合、親水部は、エステル部が1部、ホスホノ基が1部およびエチレンアミン部が1部であり、親水部の分子量は181.04であるから、HLB値は12.3である。2-ジメチルアミノエチルメタクリレート（分子量：157.11）の場合、親水部は、エステル部が1部およびエチレンアミン部が1部であり、親水部の分子量は86.07であるから、HLB値は11.0である。メチルメタクリレート（分子量：100.12）の場合、親水部は、エステル部が1部であり、親水部の分子量は44.01であるから、HLB値は8.8である。n-ブチルメタクリレート（分子量：142.20）の場合、親水部は、エステル部が1部であり、親水部の分子量は44.01であるから、HLB値は6.2である。

[0023] 下限臨界溶解温度（LCST；Lower Critical Solution Temperature）とは、この温度よりも低い温度では高分子が水に溶解して透明の溶液になるが、この温度よりも高い温度では不溶化して白濁するか沈殿が生じ、相分離する温度である。ブロック（C）に含まれる繰り返し単位とその水に対するLCSTは、例えば、N-イソプロピルアクリルアミド（LCST=32℃）、N-n-プロピルメタクリルアミド（LCST=22℃）、N-テトラヒドロフルフルルアクリルアミド（LCST=28℃）、N-エトキシエチルアクリルアミド（LCST=35℃）、N,N-ジエチルアクリルアミド（LCST=32℃）、N-イソプロピルメタクリルアミド（LCST=44℃）、N-n-プロピルメタクリルアミド（LCST=28℃）、N-テトラヒドロフルフルルメタクリルアミド（LCST=35℃）、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド（LCST=23℃）、またはN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド（

LCST = 20°C) などが例示できる。本発明におけるブロック (C) は、前記繰り返し単位を1種類のみ用いてもよく、2種類以上を組み合わせ用いてもよい。また温度応答性を有するのであれば、前記温度応答性繰り返し単位の他に、異なる繰り返し単位を含んでも良い。

[0024] (A)、(B)、(C) のブロックを含むブロック共重合体の一例として、(A) 2-メトキシエチルアクリレート (HLB値 = 13.5) の繰り返し単位、(B) n-ブチルアクリレート (HLB値 = 6.9) の繰り返し単位、(C) N-イソプロピルアクリルアミド (LCST = 32°C) の繰り返し単位からなるブロック共重合体が挙げられる。

[0025] ブロック共重合体の数平均分子量は特に限定はないが、一例として10000~1000000であり、好ましくは5000~500000、さらに好ましくは10000~200000である。

[0026] ブロック共重合体の組成比は特に限定はないが、不織布上の培養細胞を冷却で回収するために、ブロック (C) の割合は好ましくは30~90mol%であり、さらに好ましくは50~80mol%である。

[0027] 本発明の不織布に被覆するブロック共重合体の被覆量 (本発明の不織布へのブロック共重合体の固定量ともいう。) は特に限定はないが、不織布上の培養細胞を冷却で回収するために、好ましくは1.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、さらに好ましくは2.0~10.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

[0028] 本発明の不織布の製造方法は特に限定はなく、一例として含浸法や浸漬法が挙げられ、不織布にポリマー溶液を浸漬ないし吹付を行い、乾燥して溶媒を除去することで得られる。本発明の不織布には (A)、(B)、(C) のブロックを含むブロック共重合体以外のポリマーが被覆されても良く、一例として正電荷や負電荷を有するポリマーも被覆すると細胞が接着しやすくなる。

[0029] 本発明の不織布の製造方法は、例えば、真密度が1.0~1.5 g/cm^3 で吸水率が0.3%未満のプラスチックからなる不織布表面に下記 (A)、(B)、(C) のブロックを含むブロック共重合体を被覆する工程を含むこ

とを特徴とする方法であってもよい。

(A) HLB値（グリフィン法）が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。

(B) HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

[0030] 本発明の不織布は細胞培養、特に接着細胞の培養に使用できる。接着性細胞とはマイクロキャリア等の細胞培養基材の表面に付着しながら増殖する細胞である。培養する接着細胞の由来は特に限定はないが、一例としてヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、ヌードマウス、マウス、モルモット、ブタ、ヒツジ、チャイニーズハムスター、ウシ等の哺乳類やニワトリ、アヒル等の鳥類等が挙げられる。また、培養する細胞（接着細胞）の種類に特に限定はなく、一例として間葉系幹細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞、アフリカミドリザルの腎臓上皮由来のVERO細胞、イヌ腎臓由来のMDCK細胞、マウス結合組織由来のL929細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞のHEK293細胞、ウシ腎臓由来のMDBK細胞、ネコ腎臓由来のCRFK細胞、モルモット腎臓由来のCPK細胞、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞、更に生体内の各組織、臓器を構成する上皮細胞や内皮細胞、収縮性を示す骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経系を構成するニューロン細胞、グリア細胞、繊維芽細胞、生体の代謝に関与する肝実質細胞、肝非実質細胞や脂肪細胞、分化能を有する細胞として、種々の組織に存在する幹細胞、さらにはそれらから分化誘導した細胞が挙げられる。これら以外でも、血液、リンパ液、髄液、喀痰、尿又は便に含まれる細胞や、体内あるいは環境中に存在する微生物、ウイルス、原虫等を例示できる。使用する培地の種類は特に限定はなく、血清培地であっても無血清培地であっても良く、細胞の種類に応じて適宜選択できる。

[0031] 本発明の培養で使用される基礎培地の種類は特に限定はなく、例えば、M

EM、 α MEM、DMEM、EMEM、GMEM、DMEM/Ham' s F-12、Ham' s F-12、Ham' s F-10、Medium199、RPMI1640などを用いることができる。また、血清培地であっても無血清培地であっても良いが、使用血清は特に限定はなく、例えば、牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS)、児牛血清、成牛血清、ウマ血清、ヒツジ血清、ヤギ血清、ブタ血清、ニワトリ血清、ウサギ血清、ヒト血清が使用できる。また、完成培地は抗生物質を含有してもしなくても良く、細胞の種類に応じて適宜選択できる。

[0032] 本発明の不織布を用いた細胞培養方法は特に限定はなく、静置条件で培養しても良いし、振とう条件で培養しても良いし、攪拌条件で培養しても良く、前記方法を組み合わせた方法による間欠的な振とう条件及び／又は間欠的な攪拌条件でも良い。振とう条件で培養する場合、振とう速度に特に限定はなく、振とう方向にも特に限定はない。攪拌条件で培養する場合は攪拌速度に特に限定はなく、一例として1~1000rpmである。培養時の培養温度は特に限定はないが、温度応答性ポリマーが疎水化し細胞が接着しやすい環境の提供ができるLCST以上で行うことが好ましい。培養後はLCST未達の温度に冷却することで不織布上の細胞を回収できる。冷却方法は特に限定はなく、冷却器を使用して直接冷却しても良いし、培地を冷却液で交換しても良い。冷却液は培地を使うことができ、培地は成長因子や血清等を含む完成培地であっても、成長因子や血清等を含まない基礎培地であっても良い。冷却液がリン酸緩衝液であってもタンパク質分解酵素を含む細胞剥離液であっても良いが、タンパク質分解酵素を含む細胞剥離液を選択することで細胞の回収数が高くなりやすい。タンパク質分解酵素は一例としてトリプシンであり、動物由来成分を含まないリコンビナントトリプシンであっても良い。また、リン酸緩衝液または細胞剥離液にEDTA、EGTAなどのキレート剤を導入すると細胞がさらに不織布からシングルセルとして剥離しやすくなる。ここでシングルセルとは、細胞同士が繋がっている状態から脱し、1細胞ごとに分離していることを意味している。冷却液がリン酸緩衝液である

場合、リン酸緩衝液中のキレート剤の濃度は特に限定はなく、 $1\ \mu\text{M}\sim 1\ \text{mM}$ である。細胞を回収する際は、冷却液に流動があると不織布の冷却を促進できるため好ましく、一例として攪拌やピペティングで流動を得ることができる。

[0033] 本発明の不織布を用いた細胞培養方法は、例えば、本発明の不織布を含む培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする方法であってもよい。本発明の不織布を用いた細胞培養方法は、キレート剤を導入した冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を更に含んでもよい。

[0034] 本発明の不織布の培養性能は、冷却したタンパク質分解酵素を含む細胞剥離液及び／又はタンパク質分解酵素を含まない冷却剥離液及び／又はキレート剤を含む細胞剥離液を用いて回収できた細胞数と回収した細胞懸濁液中の不織布断片混入の有無で評価する。タンパク質分解酵素は特に限定はないが、一例としてTrypLE Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific製)が挙げられる。タンパク質分解酵素を含まない冷却剥離液は特に限定はないが、一例としてカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))が挙げられる。キレート剤を含む細胞剥離液は特に限定はないが、一例として $1\ \text{mM}$ のEDTAを含むPBS(-)が挙げられる。細胞数の計測方法は特に限定はないが、血球計算板などを用いて評価できる。

実施例

[0035] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例により何ら制限されるものではない。なお、断りのない限り、試薬は市販品を用いた。

[0036] <ブロック共重合体の組成解析>

核磁気共鳴測定装置(日本電子製、商品名JNM-ECZ400S/L1)を用いたプロトン核磁気共鳴分光($1\ \text{H-NMR}$)スペクトル分析より求めた。

[0037] <ブロック共重合体の分子量、分子量分布の解析>

重量平均分子量 (Mw)、数平均分子量 (Mn) 及び分子量分布 (Mw/Mn) は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC) によって測定した。GPC装置は東ソー (株) 製 HLC-8320GPCを用い、カラムは東ソー (株) 製 TSK gel SuperAWM-Hを2本用い、カラム温度を40℃に設定し、溶離液は10mMトリフルオロ酢酸ナトリウムを含む2, 2, 2-トリフルオロエタノールを用いて測定した。測定試料は1.0mg/mLで調製して測定した。分子量の検量線は、分子量既知のポリメタクリル酸メチル (Sigma-Aldrich社製) を用いた。

[0038] <温度応答性ポリマーMBIの合成>

100mL 2口フラスコに2-メトキシエチルアクリレート (MEA) 0.650g (5mmol) を加え、さらにシアノメチルドデシルカルボナートを31.8mg (100 μ mol) とアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン10mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で24時間加熱攪拌した。

[0039] 1回目の加熱攪拌後、上記にn-ブチルアクリレート (BA) 3.845g (30mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン5mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で48時間加熱攪拌した。

[0040] 2回目の加熱攪拌後、上記にN-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm, LCST=32℃) 7.355g (65mmol) を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル1.6mg (10 μ mol) と1, 4-ジオキサン35mLを加え、アルゴンガス置換後、62℃で48時間加熱攪拌した。

[0041] 3回目の加熱攪拌後、反応液を水で再沈精製し、減圧乾燥することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をクロロホルムに溶解し、分液ロートを用いクロロホルム相を回収した。回収したクロロホルム相をエバポレーターで濃縮し、ヘキサンで再沈精製した。沈殿物をろ過で回収し、減圧乾燥することで、ポリマーMBIを5.805g得た。得られたブロック共重合体MBI

の組成比はMEA/BA/IPAAm=5/26/69 (mol%)であり、数平均分子量Mnは8.5万、分子量分布Mw/Mnは1.78であった。

[0042] <負電荷を有するポリマーCStS>

100mL 2口フラスコにp-カルボキシスチレン(CSt) 1.156g (8mmol)とスチレン(St) 1.271g (12mmol)を加え、さらにアゾビスイソブチロニトリル3.3mg (20μmol)とtert-ブチルアルコール20mLを加え、アルゴンガス置換後、64℃で24時間加熱攪拌した。反応液をn-ヘプタンで再沈精製し、減圧乾燥することで、ポリマーCStSを0.92g得た。ポリマーCStSの組成比はCSt/St=33/67 (mol%)、数平均分子量Mnは10.6万、分子量分布Mw/Mnは1.84であった。

[0043] <細胞数と細胞生存率の計測>

細胞懸濁液中から10μLを細胞数測定用スライド(Thermo Fisher Scientific製、商品名Countess Cell Counting Chamber Slid)に添加し自動セルカウンター(Thermo Fisher Scientific製、商品名Countess II)を用いて、細胞数を測定した。

[0044] 実施例1

50mLのビーカーに1.00wt%のポリマーMBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.03wt%のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えた。ビーカー内の溶液にポリエチレンテレフタレートの不織布であるBioNOCELL(CESCO BIOENGINEERING製、比表面積2400cm²/g、吸水率0.1%)を5g浸漬させ、5分間静置した後に不織布を溶液から取り出し、室温で2時間乾燥した。さらに50℃で減圧乾燥することで温度応答性不織布1を得た。1gの温度応答性不織布1のブロック共重合体コート膜を2, 2, 2-トリフルオロエタノールで抽出し、GPCのピーク強度からブロック共

重合体の被覆量（固定量）を評価したところ、 $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

[0045] 100mmの無処理ディッシュ（Corning製）に0.1gの温度応答性不織布1と10mLの間葉系幹細胞増殖培地2（PromoCell製）を加えた。さらにロンザ製のヒト骨髄由来間葉系幹細胞（継代数2）を $5 \times 10^5 \text{ cells}$ 加えて 37°C の5vol% CO_2 雰囲気インキュベーター内で6日間培養した。

[0046] 培養後、ディッシュを室温の安全キャビネットに移し、培地を抜取り、 37°C のカルシウムとマグネシウムが不含のリン酸緩衝生理食塩水（PBS（-））を10mL加えて1分間静置し、PBS（-）を抜取った。さらに新たに 4°C のTrypLE Express Enzyme（Thermo Fisher Scientific製）を5mL加え、30分間静置した。5mLの間葉系幹細胞増殖培地2を加え、1mLのピペットで30回ピペッティングを行った後、細胞懸濁液を目開き $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナーをセットした15mLのチューブに通し、さらにセルストレーナー上に2mLのPBS（-）を加え、細胞懸濁液をチューブに回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測した。細胞数は $38.0 \times 10^5 \text{ cells}$ で、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0047] 実施例2

50mLのビーカーに4.00wt%のポリマーMBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10gと0.12wt%のポリマーCStSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10g加えたこと以外は実施例1と同じ方法で温度応答性不織布2を得た。温度応答性不織布2のブロック共重合体の被覆量（固定量）を評価したところ $35.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

[0048] 温度応答性不織布2を用いたこと以外は実施例1と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養した。

[0049] 温度応答性不織布2を用いたこと以外は実施例1と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は $38.8 \times 10^5 \text{ cells}$ で、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0050] 実施例 3

50 mL のビーカーに 0.50 wt % のポリマー MB I の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g と 0.015 wt % のポリマー CS t S の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g 加えたこと以外は実施例 1 と同じ方法で温度応答性不織布 3 を得た。温度応答性不織布 3 のブロック共重合体の被覆量（固定量）を評価したところ $1.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

[0051] 温度応答性不織布 3 を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養した。

[0052] 温度応答性不織布 3 を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は $33.3 \times 10^5 \text{ cells}$ で、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0053] 比較例 1

100 mm の無処理ディッシュ（Corning 製）に 0.1 g の未処理の BioNOCELL（非温度応答性不織布 A と規定）を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養した。

[0054] 非温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、繊維状の夾雑物は認められなかったが、細胞数は $10.2 \times 10^5 \text{ cells}$ と、実施例 1 ~ 3 と比較して 3 分の 1 程度の細胞回収数にとどまった。

[0055] 比較例 2

ナイロン製の不織布（比表面積 $3500 \text{ cm}^2/\text{g}$ 、吸水率 1.1%）を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法で温度応答性不織布 A を得た。温度応答性不織布 A のブロック共重合体の被覆量（固定量）を評価したところ $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

[0056] 温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養した。

[0057] 温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 32.8

× 10⁵ cells だったが、繊維状の夾雑物が認められた。

[0058] 比較例 3

ナイロン製の不織布（比表面積 3500 cm²/g、吸水率 1.1%）（非温度応答性不織布 B と規定）を用いたこと以外は比較例 1 と同じ方法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を培養した。

[0059] 非温度応答性不織布 B を用いたこと以外は実施例 1 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 10.0 × 10⁵ cells と、実施例 1 ~ 3 と比較して 3 分の 1 程度の細胞回収数にとどまり、さらに繊維状の夾雑物が認められた。

[0060] [表1]

	不織布		ブロック共重合体 固定量	回収細胞数	回収細胞中の 夾雑物
	素材	吸水率			
	-	%	μg/cm ²	10 ⁵ 個	-
実施例 1	ポリエチレンテレフタレート	0.1	5.0	38.0	なし
実施例 2	ポリエチレンテレフタレート	0.1	35.0	38.8	なし
実施例 3	ポリエチレンテレフタレート	0.1	1.7	33.3	なし
比較例 1	ポリエチレンテレフタレート	0.1	0.0	10.2	なし
比較例 2	ナイロン	1.1	0.0	32.8	あり(繊維状)
比較例 3	ナイロン	1.1	6.0	10.0	あり(繊維状)

[0061] 実施例 4

50 mL のビーカーに 6.00 wt% のポリマー MBI の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g と 0.09 wt% のポリマー CStS の 1-メトキシ-2-プロパノール溶液を 10 g 加えたこと以外は実施例 1 と同じ方法で温度応答性不織布 4 を得た。温度応答性不織布 4 のブロック共重合体の被覆量（固定量）を評価したところ 41.6 μg/cm² であった。

[0062] 超低接着表面 24 ウェルプレート（Corning 社製、製品番号：3473）に、2 枚の温度応答性不織布 4 と 2 mL の 10% のウシ胎児血清（FBS、バイオウエスト社製）と 1% の抗生物質-抗真菌剤溶液（和光純薬社製）を含有する DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製）を加えた。さらに、VERO 細胞（

ATCC製、製品番号：CCL-81)を 0.25×10^5 cells/枚の播種濃度で加えて 37°C の $5\text{ vol}\% \text{CO}_2$ 雰囲気の内キュベーター内で6日間培養した。

[0063] 培養後、24ウェルプレート室温の安全キャビネットに移し、培地を抜き取り、 37°C のPBS(-)を2 mL加えて1分間静置洗浄し、PBS(-)を抜取った。さらに、 4°C のPBS(-)を2 mL加え、10分間静置した。その後、1 mLのピペットで20回ピペッティングし冷却処理を行った。冷却処理後得られた細胞懸濁液を目開き $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナー(ASONE社製、製品番号：VCS-70)をセットした50 mLのチューブに通し、セルストレーナー上に2 mLの新たな 4°C のPBS(-)を加え洗浄し、細胞懸濁液をチューブに回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 2.81×10^5 cells/枚で、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0064] 実施例5

50 mLのビーカーに $8.00 \text{ wt}\%$ のポリマーMBIの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10 gと $0.16 \text{ wt}\%$ のポリマーCstSの1-メトキシ-2-プロパノール溶液を10 g加えたこと以外は実施例1と同じ方法で温度応答性不織布5を得た。温度応答性不織布5のブロック共重合体の被覆量(固定量)を評価したところ $52.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

[0065] 温度応答性不織布5を用いたこと以外は実施例4と同じ方法でVERO細胞を培養した。

[0066] 温度応答性不織布5を用いたこと以外は実施例4と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 2.48×10^5 cells/枚、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0067] 比較例4

非温度応答性不織布Aを用いたこと以外は実施例4と同じ方法でVERO細胞を培養した。

[0068] 非温度応答性不織布Aを用いたこと以外は実施例4と同じ方法で細胞懸濁

液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、繊維状の夾雑物は認められなかったが、細胞数は 1.22×10^5 cells/枚と、実施例4～5と比較して2分の1程度の細胞回収数にとどまった。

[0069] 実施例6

超低接着表面24ウェルプレート（Corning社製、製品番号：3473）に、2枚の温度応答性不織布4と2mLの10%のウシ胎児血清（FBS、バイオウエスト社製）と1%の抗生物質－抗真菌剤溶液（和光純薬社製）を含有するDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium、和光純薬社製）を加えた。さらに、BHK-21細胞（ATCC製、製品番号：CCL-10）を 0.25×10^5 cells/枚の播種濃度で加えて37℃の5vol%CO₂雰囲気の内キュベーター内で6日間培養した。

[0070] 培養後、24ウェルプレートを室温の安全キャビネットに移し、培地を採取し、37℃のPBS（－）を2mL加えて1分間静置洗浄し、PBS（－）を採取した。さらに、4℃のPBS（－）を2mL加え、10分間静置した。その後、1mLのピペットで20回ピペッティングし冷却処理を行った。冷却処理後得られた細胞懸濁液を目開き70μmのセルストレーナー（ASONE社製、製品番号：VCS-70）をセットした50mLのチューブに通し、セルストレーナー上に2mLの新たな4℃のPBS（－）を加え洗浄し、細胞懸濁液をチューブに回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 2.80×10^5 cells/枚で、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0071] 実施例7

温度応答性不織布5を用いたこと以外は実施例6と同じ方法でBHK-21細胞を培養した。

[0072] 温度応答性不織布5を用いたこと以外は実施例6と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は 4.22×10^5 cells/枚、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0073] 比較例 5

非温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 6 と同じ方法で BHK-21 細胞を培養した。

[0074] 非温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 6 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、繊維状の夾雑物は認められなかったが、細胞数は $1.41 \times 10^5 \text{ cells/枚}$ と、実施例 6~7 と比較して 3 分の 1 程度の細胞回収数にとどまった。

[0075] 実施例 8

温度応答性不織布 4 を用いたこと以外は実施例 6 と同じ方法で BHK-21 細胞を培養した。

[0076] 培養後、24 ウェルプレートを室温の安全キャビネットに移し、培地を抜き取り、 37°C の PBS (-) を 2 mL 加えて 1 分間洗浄し、PBS (-) を抜取った。さらに、 4°C の 1 mM の EDTA を含む PBS (-) を 2 mL 加え、10 分間静置した。その後、1 mL のピペットで 20 回ピペティングし冷却処理を行った。冷却処理後得られた細胞懸濁液を目開き $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナー (ASONE 社製、製品番号: VCS-70) をセットした 50 mL のチューブに通し、セルストレーナー上に 2 mL の新たな 4°C の PBS (-) を加え洗浄し、細胞懸濁液をチューブに回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は $3.09 \times 10^5 \text{ cells/枚}$ と、実施例 6 と比較し細胞回収数が増加された。また、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0077] 実施例 9

温度応答性不織布 5 を用いたこと以外は実施例 6 と同じ方法で BHK-21 細胞を培養した。

[0078] 温度応答性不織布 5 を用いたこと以外は実施例 8 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、細胞数は $4.46 \times 10^5 \text{ cells/枚}$ と、実施例 7 と比較し細胞回収数が増加された。また、繊維状の夾雑物は認められなかった。

[0079] 比較例 6

非温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 6 と同じ方法で BHK-21 細胞を培養した。

[0080] 非温度応答性不織布 A を用いたこと以外は実施例 8 と同じ方法で細胞懸濁液を回収し、遠心分離で濃縮して細胞数を計測したところ、繊維状の夾雑物は認められなかったが、細胞数は 1.66×10^5 cells/枚と、実施例 8~9 と比較して 3 分の 1 程度の細胞回収数にとどまった。

[0081]

[表2]

	不織布		ブロック共重合体 固定量	細胞種	冷却液	回収細胞数	回収細胞中の 夾雑物
	素材	吸水率					
	-	%	μg/cm ²	-	4°C	10 ⁵ 個/枚	-
実施例 4	ポリエチレンテレフタレート	0.1	41.6	VERO	PBS(-)	2.81	なし
実施例 5	ポリエチレンテレフタレート	0.1	52.5	VERO	PBS(-)	2.48	なし
比較例 4	ポリエチレンテレフタレート	0.1	0.0	VERO	PBS(-)	1.22	なし
実施例 6	ポリエチレンテレフタレート	0.1	41.6	BHK-21	PBS(-)	2.80	なし
実施例 7	ポリエチレンテレフタレート	0.1	52.5	BHK-21	PBS(-)	4.22	なし
比較例 5	ポリエチレンテレフタレート	0.1	0.0	BHK-21	PBS(-)	1.41	なし
実施例 8	ポリエチレンテレフタレート	0.1	41.6	BHK-21	PBS(-)+1mM EDTA	3.09	なし
実施例 9	ポリエチレンテレフタレート	0.1	52.5	BHK-21	PBS(-)+1mM EDTA	4.46	なし
比較例 6	ポリエチレンテレフタレート	0.1	0.0	BHK-21	PBS(-)+1mM EDTA	1.66	なし

請求の範囲

- [請求項1] 真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体が被覆されている不織布。
- (A) HLB値(グリフィン法)が7以上20以下の範囲にある重合体ブロック。
- (B) HLB値(グリフィン法)が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。
- (C) 水に対する下限臨界溶解温度(LCST)が $0^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ の範囲にある温度応答性重合体ブロック。
- [請求項2] 前記吸水率が 0.2% 以下であることを特徴とする請求項1に記載の不織布。
- [請求項3] プラスチックがポリエチレンテレフタレートであることを特徴とする請求項1に記載の不織布。
- [請求項4] ブロック共重合体の被覆量が $1.0 \sim 100.0 \mu\text{g/cm}^2$ であることを特徴とする請求項3に記載の不織布。
- [請求項5] 不織布を構成する繊維の太さが $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項4に記載の不織布。
- [請求項6] ブロック共重合体のブロック(C)の割合が $30 \sim 90 \text{ mol}\%$ であることを特徴とする請求項5に記載の不織布。
- [請求項7] ブロック共重合体の数平均分子量が $1000 \sim 1000000$ であることを特徴とする請求項6に記載の不織布。
- [請求項8] 請求項1～7に記載の不織布の製造方法。
- [請求項9] 真密度が $1.0 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ で吸水率が 0.3% 未満のプラスチックからなる不織布表面に下記(A)、(B)、(C)のブロックを含むブロック共重合体を被覆する工程を含むことを特徴とする、請求項1～7に記載の不織布の製造方法。
- (A) HLB値(グリフィン法)が7以上20以下の範囲にある重合

体ブロック。

(B) HLB値（グリフィン法）が0以上7未満の範囲にある重合体ブロック。

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

[請求項10] 前記吸水率が0.2%以下であることを特徴とする請求項9に記載の製造方法。

[請求項11] 請求項1～7に記載の不織布を用いた細胞培養方法。

[請求項12] 請求項1～7に記載の不織布を含む培地で、細胞を培養する工程を含むことを特徴とする細胞培養方法。

[請求項13] キレート剤を含む冷却液を用いて、細胞をマイクロキャリアから剥離する冷却細胞剥離工程を含むことを特徴とする請求項11に記載の細胞培養方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>D06M 15/285</i> (2006.01)i; <i>C08F 293/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>D06M 15/263</i> (2006.01)i; <i>D06M 101/32</i> (2006.01)n FI: D06M15/285; C08F293/00; C12M3/00 A; C12N5/071; D06M15/263; D06M101:32		
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) D06M15/285; C08F293/00; C12M3/00; C12N5/071; D06M15/263; D06M101/32		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-174919 A (TOSOH CORP.) 15 November 2018 (2018-11-15) claims, paragraphs [0110]-[0111], examples	1-13
Y	JP 11-56353 A (NIPPON BIO SERAPII KK) 02 March 1999 (1999-03-02) claims, paragraph [0009], examples	1-13
Y	JP 2022-73687 A (TOSOH CORP.) 17 May 2022 (2022-05-17) claim 3	13
A	JP 2020-110140 A (TOSOH CORP.) 27 July 2020 (2020-07-27) entire text	1-13
A	WO 2004/058936 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 July 2004 (2004-07-15) entire text	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 23 July 2024		Date of mailing of the international search report 06 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/020258

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-174919 A	15 November 2018	(Family: none)	
JP 11-56353 A	02 March 1999	(Family: none)	
JP 2022-73687 A	17 May 2022	(Family: none)	
JP 2020-110140 A	27 July 2020	(Family: none)	
WO 2004/058936 A1	15 July 2004	US 2006/0254963 A1 EP 1580260 A1 AU 2003289394 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>D06M 15/285(2006.01)i; C08F 293/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; D06M 15/263(2006.01)i; D06M 101/32(2006.01)n FI: D06M15/285; C08F293/00; C12M3/00 A; C12N5/071; D06M15/263; D06M101:32</p>																																		
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） D06M15/285; C08F293/00; C12M3/00; C12N5/071; D06M15/263; D06M101/32</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table> <p>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）</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年																								
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																																	
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年																																	
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年																																	
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年																																	
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2018-174919 A（東ソー株式会社）15.11.2018（2018-11-15） 特許請求の範囲、[0110]-[0111]、実施例</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 11-56353 A（日本バイオセラピー株式会社）02.03.1999（1999-03-02） 特許請求の範囲、[0009]、実施例</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2022-73687 A（東ソー株式会社）17.05.2022（2022-05-17） 請求項3</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2020-110140 A（東ソー株式会社）27.07.2020（2020-07-27） 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2004/058936 A1（独立行政法人産業技術総合研究所）15.07.2004（2004-07-15） 全文</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			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	JP 2018-174919 A（東ソー株式会社）15.11.2018（2018-11-15） 特許請求の範囲、[0110]-[0111]、実施例	1-13	Y	JP 11-56353 A（日本バイオセラピー株式会社）02.03.1999（1999-03-02） 特許請求の範囲、[0009]、実施例	1-13	Y	JP 2022-73687 A（東ソー株式会社）17.05.2022（2022-05-17） 請求項3	13	A	JP 2020-110140 A（東ソー株式会社）27.07.2020（2020-07-27） 全文	1-13	A	WO 2004/058936 A1（独立行政法人産業技術総合研究所）15.07.2004（2004-07-15） 全文	1-13	* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの	“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	“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献	“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	“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	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
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	JP 2018-174919 A（東ソー株式会社）15.11.2018（2018-11-15） 特許請求の範囲、[0110]-[0111]、実施例	1-13																																
Y	JP 11-56353 A（日本バイオセラピー株式会社）02.03.1999（1999-03-02） 特許請求の範囲、[0009]、実施例	1-13																																
Y	JP 2022-73687 A（東ソー株式会社）17.05.2022（2022-05-17） 請求項3	13																																
A	JP 2020-110140 A（東ソー株式会社）27.07.2020（2020-07-27） 全文	1-13																																
A	WO 2004/058936 A1（独立行政法人産業技術総合研究所）15.07.2004（2004-07-15） 全文	1-13																																
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																																	
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの	“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																																	
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献	“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																																	
“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	“&” 同一パテントファミリー文献																																	
“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																																		
<p>国際調査を完了した日</p> <p>23.07.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.08.2024</p>																																	
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>川口 裕美子 4S 9829</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3474</p>																																	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/020258

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-174919 A	15.11.2018	(ファミリーなし)	
JP 11-56353 A	02.03.1999	(ファミリーなし)	
JP 2022-73687 A	17.05.2022	(ファミリーなし)	
JP 2020-110140 A	27.07.2020	(ファミリーなし)	
WO 2004/058936 A1	15.07.2004	US 2006/0254963 A1 EP 1580260 A1 AU 2003289394 A	