201809041

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201809041 A

(43)公開日： 中華民國 107 (2018) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：106117676 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 05 月 26 日

(51)Int. Cl.： *C08F230/02 (2006.01)* *C08F220/10 (2006.01)*
C09D133/14 (2006.01) *C09D143/02 (2006.01)*
C12M3/00 (2006.01) *B65D23/02 (2006.01)*

(30)優先權：2016/05/27 日本 2016-106041

(71)申請人：日商日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (JP)
日本

(72)發明人：広井佳臣 HIROI, YOSHIOMI (JP) ；安部菜月 ABE, NATSUKI (JP) ；西野泰斗 NISHINO, TAITO (JP)

(74)代理人：林志剛

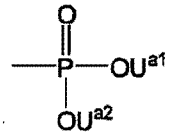
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：1 共 62 頁

(54)名稱

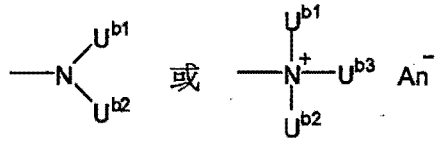
細胞培養容器

(57)摘要

本發明係提供細胞培養容器、其製造方法及使用其之細胞團塊的製造方法，其特徵為具有含有下述式(a)所示基的重複單位、含有下述式(b)所示基之重複單位與含有下述式(c)所示基之重複單位的共聚物塗布於表面者(式中，U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2} 及 U^{b3}、R^c 以及 An^-如說明書及申請專利範圍所記載)。



(a)



(b)



(c)

201809041

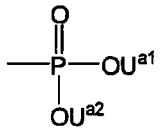
【發明摘要】

【中文發明名稱】

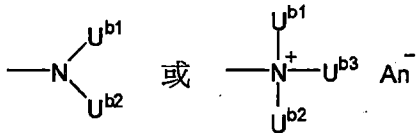
細胞培養容器

【中文】

本發明係提供細胞培養容器、其製造方法及使用其之細胞團塊的製造方法，其特徵為具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布於表面者（式中，U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}、R^c以及An^-如說明書及申請專利範圍所記載）。

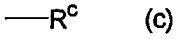


(a)



或

(b)



(c)

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞培養容器

【技術領域】

[0001] 本發明係關於細胞培養容器、其製造方法及使用其之細胞團塊（亦稱為球體）的製造方法。特別為本發明係關於以具有細胞的附著抑制能之共聚物塗布於表面者為特徵的細胞培養容器及其製造方法。

【先前技術】

[0002] 近年來，正發展將扮演在動物或植物體內相異角色的種種器官、組織及細胞於活體外使其增殖或維持的技術。欲使這些器官、組織在活體外增殖或維持，各稱為器官培養、組織培養，欲使由器官、組織所分離的細胞在活體外增殖、分化或維持者稱為細胞培養。細胞培養為將經分離的細胞在培養基中以活體外方式增殖、分化或維持之技術，於詳細解析活體內之各種器官、組織、細胞之功能及結構上為不可欠缺者。又，藉由該技術所培養的細胞及／或組織可利用於，藉由化學物質、醫藥品等藥效及毒性評估或酵素、細胞增殖因子、抗體等有用物質的大量生產、疾病或缺陷所失去的器官、組織、細胞的補充再生醫療、植物之品種改良、基因重組作物之作成等種種領域上。

[0003] 來自動物的細胞由該性狀可大略分為懸浮細胞與貼壁細胞之2類。懸浮細胞為於生育·增殖上無需立足點的細胞，貼壁細胞為於生育·增殖上需要立足點的細胞，但構成活體之大部分細胞皆為後者貼壁細胞。作為貼壁細胞之培養方法，已知有單層培養、分散培養、嵌入式培養、微小載體培養及細胞團塊（球體）培養等。

[0004] 特別為近年來，隨著再生醫療領域之發展，作為在更接近活體內的環境下的培養方法中，球體培養受到注目，適合該培養之培養基組成物或培養基添加劑已有種種被報告（例如參照專利文獻1及2）。又，在球體培養中，由培養容器（基材）之刺激為左右培養結果的重要要因，期待將細胞（特別為細胞團塊）無自培養容器的刺激下，且在三次元環境或完全懸浮狀態下進行培養（例如參考專利文獻3）。

[0005] 本發明者們，注意到作為具有種種活體物質之附著抑制能的塗布材料而受到期待的具有磷酸酯基之聚合物，進行重複檢討。其結果，將含有特定陰離子性基與陽離子性基的共聚物塗布於表面的至少一部分之細胞培養容器為，抑制細胞對容器表面（內部表面）之附著的同時，塗布於容器表面上強固地固著，作為塗布對培養液的溶離或放射線耐性經改善的細胞培養容器為有用者已有報告（例如參照專利文獻4）。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0006]

[專利文獻1] 國際公開第2014/017513號公報

[專利文獻2] 國際公開第2013/144372號公報

[專利文獻3] 日本特開2008-61609號公報

[專利文獻4] 國際公開第2014/0196652號公報

【發明內容】

[發明所解決的問題]

[0007] 本發明係以提供細胞培養容器、其製造方法及使用其之細胞團塊的製造方法為目的。特別為本發明係以提供以具有細胞的附著抑制能之共聚物塗布於表面者為特徵的細胞培養容器、其製造方法及使用其之細胞團塊的製造方法為目的。

[0008] 過去，欲使細胞（特別細胞團塊）在三次元環境或完全懸浮狀態下進行培養，有著細胞對容器表面的附著及附著於細胞培養容器之塗布對培養液的溶離之問題。又，亦有著藉由細胞培養之生產·分泌的蛋白質/含於培養基的蛋白質對容器表面的附著之問題。對於藉由親水性化合物的塗布而附著的細胞培養容器，雖可改善對容器表面的細胞附著，但附著於細胞培養容器的塗布對於培養液的溶離或蛋白質對於容器表面的附著等問題依然存在。

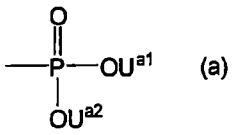
[解決課題的手段]

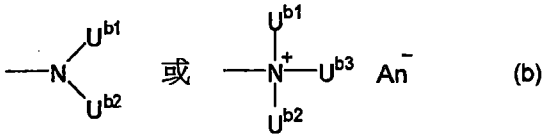
[0009] 本發明者們接著注意到具有磷酸酯基的聚合物而進行詳細檢討。其結果，發現將以同時含有特定陰離子性基與陽離子性基，及特定疏水性基之共聚物對表面的至少一部分進行塗布的細胞培養容器，可同時抑制細胞及蛋白質對於容器表面的附著，且因塗布可強固地固著於容器表面，故可作為改善塗布對於培養液的溶離之細胞培養容器為有用，完成本發明。

即，本發明如以下所示：

[0010] 1.一種細胞培養容器，其特徵為將具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布於表面者；

【化1】


(a)


(b)


(c)

〔式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

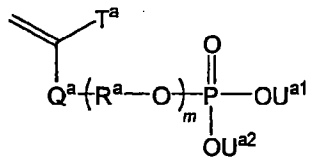
R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15

的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

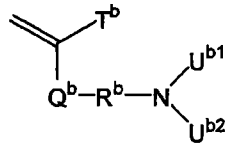
An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

[0011] 2.如上述1所記載的細胞培養容器，其中含有上述式（a）、（b）及（c）所示基的重複單位各係由下述式（A）、（B）及（C）所示單體所衍生者；

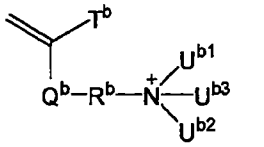
【化2】



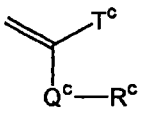
(A)



或



(B)



(C)

〔式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

Q^a及Q^b各獨立表示單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c表示單鍵、醚鍵或酯鍵；

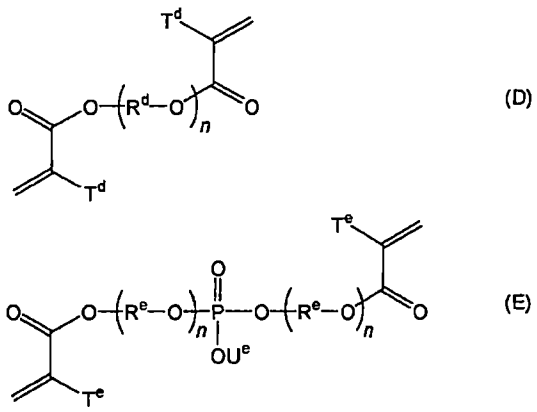
R^a及R^b各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支烷基所取代，R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳

原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子；m表示0至6的整數〕。

[0012] 3.上述2所記載的細胞培養容器，其中m表示1，R^a及R^b各獨立表示伸乙基或伸丙基。

[0013] 4.如上述1至3中任一所記載的細胞培養容器，其中上述共聚物為進一步具有含有由下述式（D）或（E）所示單體所衍生的交聯結構；

【化3】



(D)

(E)

（式中，

T^d、T^e及U^e各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

R^d及R^e各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支烷基所取代；n表示1至6的整數）。

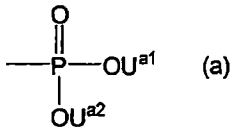
[0014] 5.如上述4所記載的細胞培養容器，其中T^d及

T^e各獨立表示氫原子或甲基，U^e表示氫原子，R^d及R^e各獨立表示伸乙基或伸丙基。

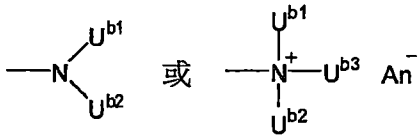
[0015] 6.如上述1至5中任一所記載的細胞培養容器，其中具有蛋白質之附著抑制能。

[0016] 7.一種細胞培養容器之製造方法，其特徵為含有將具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物，塗布於容器的表面之至少一部分的步驟；

【化4】



(a)



(b)



(c)

〔式中，

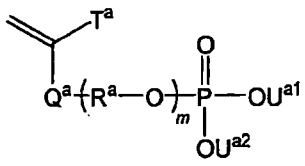
U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

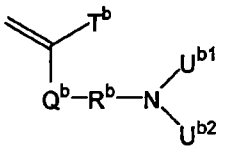
An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

[0017] 8.如上述7所記載的製造方法，其中含有上述式（a）、（b）及（c）所示基之重複單位各係由下述式（A）、（B）及（C）所示單體所衍生的重複單位；

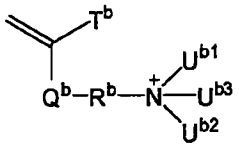
【化5】



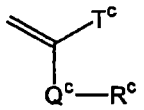
(A)



或



(B)



(C)

〔式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

Q^a及Q^b各獨立表示單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c表示單鍵、醚鍵或酯鍵；

R^a及R^b各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支烷基所取代，R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取

代）；An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子；m表示0至6的整數〕。

[0018] 9.如上述7或8所記載的製造方法，其中塗布步驟為使用含有共聚物的塗漆而實施。

[0019] 10.上述9所記載的製造方法，其中含有共聚物的塗漆為預先調整其pH。

[0020] 11.如上述7至10中任一所記載的製造方法，其中進一步含有將經塗布的細胞培養容器於乾燥步驟前及／或後進行洗淨之步驟。

[0021] 12.如上述11所記載的製造方法，其中乾燥步驟後之洗淨可使用選自由含有水及電解質之水溶液所成群的至少1種溶劑而實施。

[0022] 13.一種細胞團塊的製造方法，其特徵為使用如上述1至6中任一所記載的細胞培養容器或藉由如上述7至12中任一所記載的製造方法所製造的細胞培養容器。

[發明之效果]

[0023] 本發明之細胞培養容器為藉由以含有式（a）所示陰離子、式（b）所示陽離子與式（c）所示疏水性基的共聚物對表面的至少一部分進行塗布，可抑制對容器表面之細胞或蛋白質的附著。被認為藉由該陽離子及陰離子之靜電的平衡，容器表面保持在電氣中性，可防止細胞或蛋白質之附著。另一方面，藉由塗布中之該陽離子及陰離

子形成離子結合（離子複合），可固著任意選自玻璃、纖維、無機粒子或樹脂（合成樹脂及天然樹脂）等容器之基材種類，且經固著後成為對水系溶劑（水、磷酸緩衝液（PBS）、醇等）的耐久性優良之塗布。

[0024] 又，藉由於共聚物導入式（c）所示疏水性基，可提高蛋白質之附著抑制能，且與塑質等樹脂的密著性亦良好，成為對於固著後的水系溶劑之耐久性更為優良的塗布。

即，藉由本發明，提供一種除可抑制細胞對於容器表面的附著以外，亦可同時抑制蛋白質對於容器表面的附著，對溶劑的耐久性亦優良的細胞培養容器。

【圖式簡單說明】

[0025]

[圖1] 表示培養4天後，將對於實施例1、比較例1、陰性對照、陽性對照之培養皿的細胞之附著藉由倒立型顯微鏡進行觀察之結果。

【實施方式】

[實施發明之形態]

[0026]

1.用語之說明

對於本發明所使用的用語，若無其他說明以外，其為以下定義。

[0027] 對於本發明，「鹵素原子」表示氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。

[0028] 對於本發明，「烷基」表示直鏈或者分支之飽和脂肪族烴的1價基。作為「碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」，例如可舉出甲基、乙基、n-丙基、異丙基、n-丁基、異丁基、s-丁基、t-丁基、n-戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基或1-乙基丙基。作為「碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基」，除可舉出上述碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基之例子以外，亦可舉出己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四基、十五烷基、十六烷基、十七烷基或十八烷基、或者這些的異構物。

[0029] 對於本發明，「可由鹵素原子所取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」表示上述碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基，或者以1以上的上述鹵素原子所取代的上述碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基。「碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」的例子如上述所示。另一方面，「由1個以上的鹵素原子所取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」表示上述碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基的1個以上之任意氫原子可由鹵素原子所取代，作為例子，可舉出氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、溴甲基、碘甲基、2,2,2-三氟乙基、2,2,2-三氯乙基、全氟乙基、全氟丁基或全氟戊基等。

[0030] 對於本發明，「酯鍵」表示-C(=O)-O-或者-O-C(=O)-，「醯胺鍵」表示-NHC(=O)-或者-C(=O)NH-，「醚鍵」表示-O-。

[0031] 對於本發明，「可由鹵素原子所取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基」表示碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基，或者可由1個以上的鹵素原子所取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基。其中所謂「伸烷基」表示對應上述烷基之2價有機基。作為「碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基」之例子，可舉出伸甲基、伸乙基、伸丙基、三伸甲基、四伸甲基、1-甲基伸丙基、2-甲基伸丙基、二甲基伸乙基、乙基伸乙基、五伸甲基、1-甲基-四伸甲基、2-甲基-四伸甲基、1,1-二甲基-三伸甲基、1,2-二甲基-三伸甲基、2,2-二甲基-三伸甲基、1-乙基-三伸甲基、六伸甲基、八伸甲基及十伸甲基等，彼等之中，以伸乙基、伸丙基、八伸甲基及十伸甲基為佳，例如以伸乙基、伸丙基、三伸甲基、四伸甲基等碳原子數1至5的直鏈或者分支伸烷基為較佳，特佳為伸乙基或伸丙基。「以1個以上的鹵素原子所取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基」表示上述伸烷基的1個以上之任意氫原子由鹵素原子所取代的意思，特別以伸乙基或伸丙基的氫原子之一部分或全部由鹵素原子所取代者為佳。

[0032] 對於本發明，所謂「碳原子數3至10的脂環式烴基」表示碳原子數3至10的單環式或者多環式之飽和或者部分不飽和的脂肪族烴之1價基。其中亦以碳原子數3至

10之單環式或者二環式的飽和脂肪族烴之1價基為佳，例如可舉出環丙基、環丁基或環己基等碳原子數3至10的環烷基或者聯環〔3.2.1〕辛基、冰片基（Bornyl）、異冰片基等碳原子數4至10的聯環烷基。

[0033] 對於本發明，所謂「碳原子數6至10的芳基」表示碳原子數6至10的單環式或者多環式之芳香族烴的1價基，例如可舉出苯基、萘基或蒽基等。所謂「碳原子數6至10的芳基」表示可由1個以上的上述「可由鹵素原子所取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」所取代。

[0034] 對於本發明，所謂「碳原子數7至15的芳烷基」表示基-R-R'（其中，R表示上述「碳原子數1至5的伸烷基」，R'表示上述「碳原子數6至10的芳基」），例如可舉出苯甲基、苯乙基或α-甲基苯甲基等。「碳原子數7至15的芳烷基」的芳基部分可由1個以上之上述「可由鹵素原子所取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」所取代。

[0035] 對於本發明，所謂「碳原子數7至15的芳基氧基烷基」表示基-R-O-R'（其中，R表示上述「碳原子數1至5的伸烷基」，R'表示上述「碳原子數6至10的芳基」），例如可舉出苯氧基甲基、苯氧基乙基或苯氧基丙基等。「碳原子數7至15的芳基氧基烷基」的芳基部分表示可由1個以上的上述「可由鹵素原子所取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基」所取代。

[0036] 對於本發明，所謂「鹵化物離子」表示氟化

物離子、氯化物離子、溴化物離子或碘化物離子。

對於本發明，所謂「無機酸離子」表示碳酸離子、硫酸離子、磷酸離子、磷酸氫離子、磷酸二氫離子、硝酸離子、過氯酸離子或硼酸離子。

作為上述An^-的較佳者為鹵化物離子、硫酸離子、磷酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子，特佳為鹵化物離子。

[0037] 對於本發明，所謂（甲基）丙烯酸酯化合物表示丙烯酸酯化合物與甲基丙烯酸酯化合物的雙方。例如（甲基）丙烯酸表示丙烯酸與甲基丙烯酸。

[0038] 所謂具有細胞的附著抑制能者，例如表示藉由以實施例所記載的方法所進行的細胞數測定試藥，與未經塗布做比較時的相對吸光度（WST O.D.450nm）（%）（實施例之吸光度（WST O.D.450nm）/比較例之吸光度（WST O.D.450nm）×100）為50%以下，較佳為30%以下，更佳為20%以下。

[0039] 所謂具有蛋白質的附著抑制能者，例如表示藉由以實施例所記載的方法所進行的QCM-D測定，與無塗布膜相比較時的相對每單位面積的質量（%）（實施例的每單位面積之質量（ng/cm^2）/比較例的每單位面積之質量（ng/cm^2）×100）為50%以下，較佳為30%以下，更佳為20%以下。

[0040] 對於本發明，作為蛋白質可舉出纖維蛋白原、牛血清白蛋白（BSA）、人類白蛋白、各種球蛋白、

β-脂蛋白、各種抗體（IgG、IgA、IgM）、過氧化物酶、各種補體、各種血凝素、纖維連接蛋白、溶菌酶、血管性血友病因子（vWF）、血清γ-球蛋白、胃蛋白酶、卵白白蛋白、胰島素、組蛋白、核糖核酸酶、膠原、細胞色素c等，特別對於在血清所含的蛋白質（白蛋白及球蛋白）具有特高附著抑制能。

[0041]

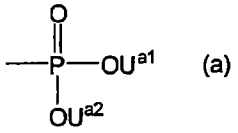
2.本發明之說明

≪細胞培養容器≫

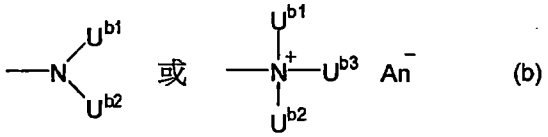
本發明之第一態樣為具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布在表面的至少一部分為特徵之細胞培養容器；

[0042]

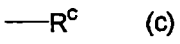
【化6】



(a)



(b)



(c)

[0043]

〔式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

[0044]

<細胞>

所謂本發明中之細胞表示，構成動物或植物的最基本單位，作為該要素，其為於細胞膜內部具有細胞質與各種細胞小器官者。此時，內包DNA的核可含於或未含於細胞內部。例如於本發明中之來自動物的細胞中，含有精子或卵子等生殖細胞、構成活體之體細胞、幹細胞（多能性幹細胞等）、前驅細胞、自活體經分離的癌細胞、獲得自活體經分離的不死化能（Immortality）後並在體外可安定地維持的細胞（細胞株）、自活體經分離的經人工基因改變而成的細胞、自活體經分離的經人工核交換的細胞等。作為構成活體的體細胞之例子，並未限定於以下者，可含有成纖維細胞、骨髓細胞、B淋巴球、T淋巴球、嗜中性粒細胞、紅血球、血小板、巨噬細胞、單核細胞、骨細胞、骨髓細胞、外膜細胞、樹突狀細胞、角質形成細胞、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、內皮細胞、血管內皮細胞、肝實質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神經系細

胞、神經膠質細胞、神經元、少突膠質細胞、小膠質細胞、星狀膠細胞、心臟細胞、食道細胞、肌肉細胞（例如平滑肌細胞或骨架筋細胞）、胰臟β細胞、黑素細胞、造血前驅細胞（例如來自臍帶血的CD34陽性細胞）及單核細胞等。該體細胞為例如含有由皮膚、腎臟、脾臟、腎上腺、肝臟、肺、卵巢、胰臟、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前列腺、睪丸、胸腺、肌肉、結締組織、骨、軟骨、血管組織、血液（含臍帶血）、骨髓、心臟、眼、腦或神經組織等任意組織所採集的細胞。所謂幹細胞為兼具複製自己自身的能力與分化為其他複數系統的細胞之能力的細胞，作為該例子，並未限定於以下者，含有胚胎幹細胞（ES細胞）、胚胎腫瘤細胞、胚胎生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、神經幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、胰腺幹細胞、肌肉幹細胞、生殖幹細胞、腸道幹細胞、腫瘤幹細胞、毛囊幹細胞等。作為多能性幹細胞，前述幹細胞中舉出ES細胞、胚胎生殖幹細胞、iPS細胞。所謂前驅細胞為在自前述幹細胞分化為特定體細胞或生殖細胞之途中段階的細胞。所謂癌細胞為自體細胞所衍生的獲得無限增殖能之細胞。所謂細胞株為藉由在活體外的人工操作而獲得無限增殖能之細胞。

作為癌細胞株的例子，並未限定於以下者，但作為人類乳癌細胞株，可舉出HBC-4、BSY-1、BSY-2、MCF-7、MCF-7/ADR RES、HS578T、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-N、BT-549、T47D，作為人類子宮頸癌細胞

株，可舉出HeLa，作為人類肺癌細胞株，可舉出A549、EKVX、HOP-62、HOP-92、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H322M、NCI-H460、NCI-H522、DMS273、DMS114，作為人類大腸癌細胞株，可舉出Caco-2、COLO-205、HCC-2998、HCT-15、HCT-116、HT-29、KM-12、SW-620、WiDr，作為人類前列腺癌細胞株，可舉出DU-145、PC-3、LNCaP，作為人類中樞神經系癌細胞株，可舉出U251、SF-295、SF-539、SF-268、SNB-75、SNB-78、SNB-19，作為人類卵巢癌細胞株，可舉出OVCAR-3、OVCAR-4、OVCAR-5、OVCAR-8、SK-OV-3、IGROV-1，作為人類腎癌細胞株，可舉出RXF-631L、ACHN、UO-31、SN-12C、A498、CAKI-1、RXF-393L、786-0、TK-10，作為人類胃癌細胞株，可舉出MKN45、MKN28、St-4、MKN-1、MKN-7、MKN-74，作為皮膚癌細胞株，可舉出LOX-IMVI、LOX、MALME-3M、SK-MEL-2、SK-MEL-5、SK-MEL-28、UACC-62、UACC-257、M14，作為白血病細胞株，可舉出CCRF-CRM、K562、MOLT-4、HL-60TB、RPMI8226、SR、UT7/TPO、Jurkat等。作為細胞株的例子，並未限定在以下所示者，但含有HEK293（人類胚胎腎細胞）、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、AE-1、3D9、Ns0/1、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five（註冊商標）、Vero等。作為肝細胞株的例子，並未限定於以下者，但可舉出HepG2、Hep3B、HepaRG（註冊商標）、JHH7、HLF、HLE、PLC/PRF/5、WRL68、

HB611、SK-HEP-1、HuH-4、HuH-7等。

[0045] 對於在本發明中之來自植物的細胞，含有自植物體的各組織所分離的細胞，亦含有自該細胞將細胞壁以人工方式除去的原始質量體。

[0046]

<容器>

構成本發明之細胞培養容器的經共聚物塗布的容器若為在該技術領域中可使用的任意形態之容器類即可，例如可舉出於細胞培養中一般使用的盤子、燒瓶、塑膠袋、鐵氟龍（註冊商標）袋子、盤子、培養皿、組織培養用盤子、多功能皿、微平板、微孔板、多片式盤、多片孔板、室載玻片、細胞培養燒瓶、攪拌子燒瓶、試管、碟子、培養袋、輥子瓶等。較佳可舉出6～1536孔的多片孔板及盤子。

[0047] 作為容器之原料，典型可使用玻璃或樹脂。由加工容易性或經濟性等觀點來看，使用樹脂者為佳。樹脂可為天然樹脂或合成樹脂中任一者，作為天然樹脂，例如可舉出纖維素、三乙酸纖維素（CTA）、將葡聚醣硫酸固定化之纖維素等，作為合成樹脂，例如可舉出聚丙烯腈（PAN）、聚酯系聚合物合金（PEPA）、聚苯乙烯（PS）、聚碸（PSF）、聚乙烯對苯二甲酸乙二醇酯（PET）、聚甲基甲基丙烯酸酯（PMMA）、聚乙烯醇（PVA）、聚胺基甲酸酯（PU）、亞乙基乙烯基醇（EVAL）、聚乙烯（PE）、聚酯、聚丙烯（PP）、聚氟

化亞乙烯基（PVDF）、聚迷碸（PES）、聚碳酸酯（PC）、聚氯乙烯（PVC）、聚四氟伸乙基（PTFE）、超高分子量聚乙烯（UHPE）、聚二甲基矽氧烷（PDMS）、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯樹脂（ABS）、鐵氟龍（註冊商標）、環烯烴聚合物（COP）（例如、ZEONOR（註冊商標）、ZEONEX（註冊商標）（Zeon Japan（股）製））或各種離子交換樹脂或等。在本發明之細胞培養容器的製造中，將共聚物塗布使其存在於該容器表面的至少一部分時，因無須以高溫處理，亦可適用於耐熱性低之樹脂等。

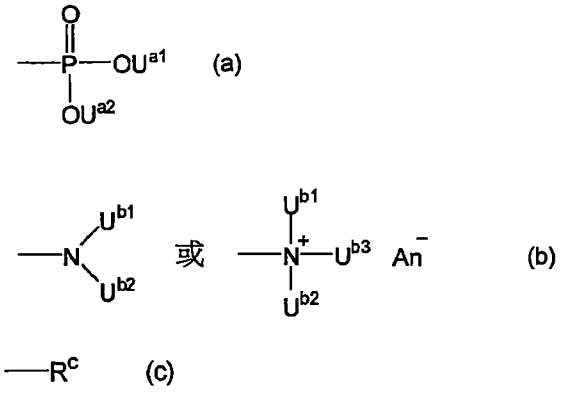
[0048]

<共聚物>

本發明之細胞培養容器為，容器表面的至少一部分藉由特定共聚物進行塗布者為特徵。有關本發明的共聚物為具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物：

[0049]

【化7】



[0050] 〔式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

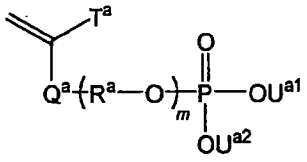
[0051] 有關本發明之共聚物若為具有含有上述式（a）所示基的重複單位、含有上述式（b）所示基的重複單位與含有上述式（c）所示基的重複單位之共聚物即可，並無特別限制。且，對於本發明，含有上述式（c）所示基的重複單位與含有上述式（a）所示基的重複單位及含有上述式（b）所示基的重複單位相異。該共聚物以將含有上述式（a）所示基的單體、含有上述式（b）所示

基的單體與含有上述式（c）所示基的單體進行自由基聚合所得者為佳，但亦可使用經聚縮合、聚加成反應所得者。作為共聚物的例子，可舉出烯烴經反應的乙烯基聚合聚合物、聚醯胺、聚酯、聚碳酸酯、聚胺基甲酸酯等，但此等中亦以使烯烴經反應的乙烯基聚合聚合物或（甲基）丙烯酸酯化合物進行聚合的（甲基）丙烯酸聚合物為特佳。

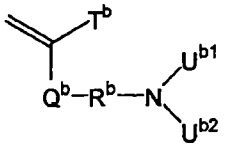
[0052] 較佳為含有上述式（a）、（b）及（c）所示基的單體，各為下述式（A）、（B）及（C）：

[0053]

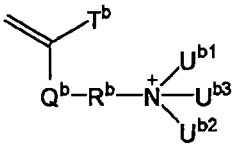
【化8】



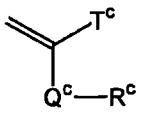
(A)



或



(B)



(C)

[0054] 〔式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

Q^a及Q^b各獨立表示單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c表示單鍵、醚鍵或酯鍵；

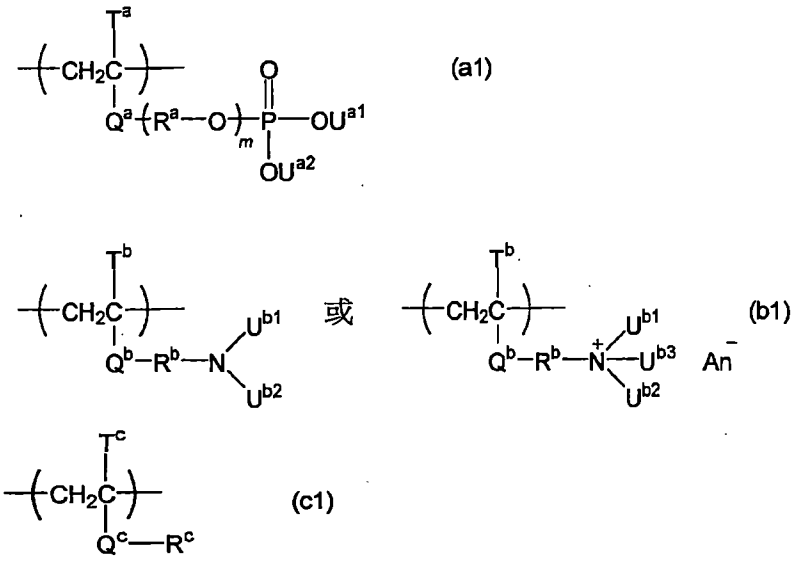
R^a及R^b各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數

1至10的直鏈或者分支烷基所取代，R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子；

m表示0至6的整數〕所示單體。因此，由式（A）、（B）及（C）所示單體所衍生的重複單位各為下述式（a1）、（b1）及（c1）：

[0055]

【化9】



[0056]（式中，T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}、Q^a、Q^b及Q^c、R^a、R^b及R^c、An^-以及m與上述同義）所示。

[0057] T^a、T^b及T^c各獨立表示氫原子、甲基或乙基為佳，較佳為各獨立表示氫原子或甲基。

[0058] U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子、甲基、乙基或t-丁基為佳。U^{a1}及U^{a2}較佳為氫原子。U^{b1}、U^{b2}（及U^{b3}）更佳為甲基或乙基，特佳為甲基。

[0059] Q^a及Q^b各獨立表示酯鍵（-C(=O)-O-或者-O-C(=O)-）或醯胺鍵(-NHC(=O)-或者-C(=O)NH-)為佳，較佳為各獨立表示-C(=O)-O-或-C(=O)NH-，特佳為-C(=O)-O-。Q^C以醚鍵或酯鍵(-C(=O)-O-或者-O-C(=O)-)為佳，較佳為-O-或-C(=O)-O-，特佳為-C(=O)-O-。

[0060] R^a及R^b各獨立表示可由鹵素原子所取代的碳原子數1至3的直鏈或分支伸烷基為佳，較佳為各獨立表示伸乙基或者伸丙基，或者表示由1個氯原子所取代的伸乙基或者伸丙基，特佳為伸乙基或者伸丙基。R^c表示碳原子數4至8的直鏈或者分支烷基或碳原子數3至8的脂環式烴基為佳，較佳為碳原子數4至6的直鏈或者分支烷基或碳原子數3至6的脂環式烴基，特佳為丁基或環己基。

[0061] 作為上述An^-以鹵化物離子、硫酸離子、磷酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子為佳，特佳為鹵化物離子。

[0062] 對於式（A）及（B），m表示0至3的整數為佳，較佳為1或2的整數，特佳為1。

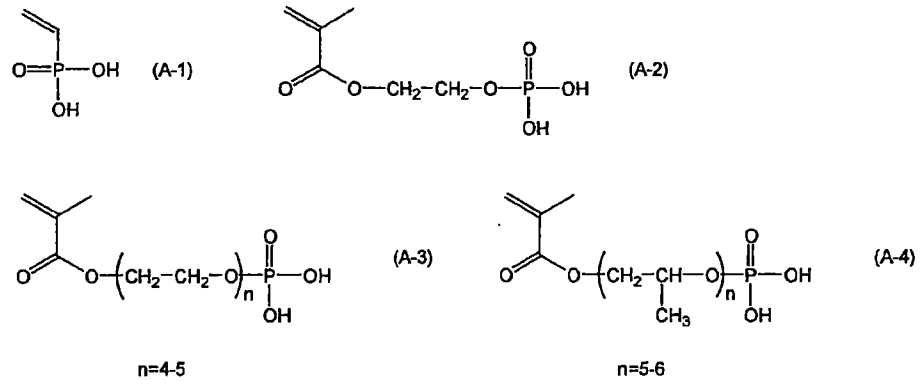
[0063] 作為上述式（A）的具體例子，可舉出乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基（甲基）丙烯酸酯、3-氯-2-酸性磷醯氧丙基（甲基）丙烯酸酯、酸性磷醯氧丙基（甲基）丙烯酸酯、酸性磷醯氧甲基（甲基）丙烯酸酯、酸性磷醯氧

聚氧乙二醇單（甲基）丙烯酸酯、酸性磷醯氧聚氧丙二醇單（甲基）丙烯酸酯等，但其中亦以乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（=磷酸2-（甲基丙烯醯氧）乙基）為佳。

[0064] 乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（=磷酸2-（甲基丙烯醯氧）乙基）、酸性磷醯氧聚氧乙二醇單甲基丙烯酸酯及酸性磷醯氧聚氧丙二醇單甲基丙烯酸酯的結構式各為下述式（A-1）～式（A-4）所示。

[0065]

【化10】



[0066] 這些化合物在合成時，如後述一般式（D）或（E）所示，有時含有具有2個官能基之（甲基）丙烯酸酯化合物。

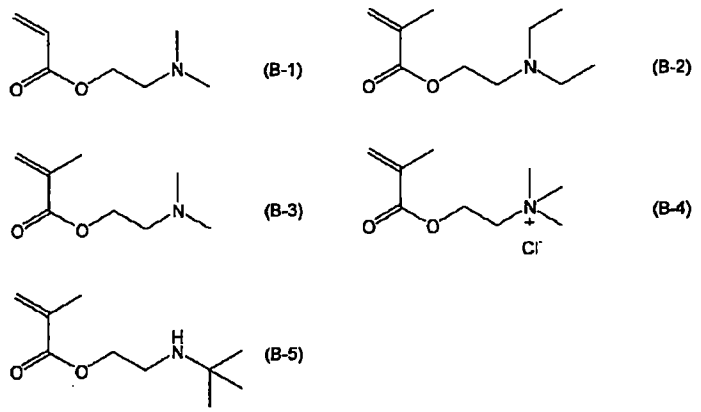
[0067] 作為上述式（B）之具體例子，可舉出二甲基胺基乙基（甲基）丙烯酸酯、二乙基胺基乙基（甲基）丙烯酸酯、二甲基胺基丙基（甲基）丙烯酸酯、2-（t-丁基胺基）乙基（甲基）丙烯酸酯、甲基丙烯醯膽鹼氯化物等，但其中亦以使用二甲基胺基乙基（甲基）丙烯酸酯、

甲基丙烯醯膽鹼氯化物或2-（t-丁基胺基）乙基（甲基）丙烯酸酯為佳。

[0068] 二甲基胺基乙基丙烯酸酯（=丙烯酸2-（二甲基胺基）乙基）、二乙基胺基乙基甲基丙烯酸酯（=甲基丙烯酸2-（二乙基胺基）乙基）、二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯（=甲基丙烯酸2-（二甲基胺基）乙基）、甲基丙烯醯膽鹼氯化物及2-（t-丁基胺基）乙基甲基丙烯酸酯（=甲基丙烯酸2-（t-丁基胺基）乙基）的結構式各為下述式（B-1）～式（B-5）所示。

[0069]

【化11】



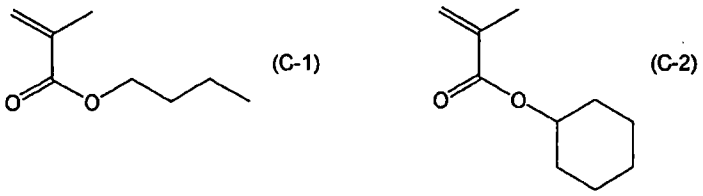
[0070] 作為上述式（C）之具體例子，可舉出丁基（甲基）丙烯酸酯、2-乙基己基（甲基）丙烯酸酯、月桂基（甲基）丙烯酸酯、硬脂基（甲基）丙烯酸酯等（甲基）丙烯酸的直鏈或者分支烷基酯類；環己基（甲基）丙烯酸酯、異冰片基（甲基）丙烯酸酯等（甲基）丙烯酸的環狀烷基酯類；苯甲基（甲基）丙烯酸酯、苯乙基（甲基）丙烯酸酯等（甲基）丙烯酸的芳烷基酯類；苯乙烯、

甲基苯乙烯、氯甲基苯乙烯等苯乙烯系單體；甲基乙烯基醚、丁基乙烯基醚等乙烯基醚系單體；乙酸乙烯基、丙酸乙烯基等乙烯基酯系單體。其中亦以使用丁基（甲基）丙烯酸酯或環己基（甲基）丙烯酸酯為佳。

[0071] 丁基甲基丙烯酸酯（=甲基丙烯酸丁基）及環己基甲基丙烯酸酯（=甲基丙烯酸環己基）的結構式各為下述式（C-1）及式（C-2）所示。

[0072]

【化１２】



[0073] 有關本發明的共聚物中所含的含有式（a）所示基之重複單位（或式（a1）所示重複單位）的比例為3莫耳%至80莫耳%，較佳為3.5莫耳%至50莫耳%，更佳為4莫耳%至40莫耳%。且，有關本發明之共聚物可含有包含2種以上的式（a）所示基之重複單位（或式（a1）所示重複單位）。

[0074] 有關本發明之共聚物中所含的含有式（b）所示基之重複單位（或式（b1）所示重複單位）的比例為3莫耳%至80莫耳%，較佳為5莫耳%至70莫耳%，更佳為8莫耳%至65莫耳%。且，有關本發明的共聚物可包含含有2種以上的式（b）所示基之重複單位（或式（b1）所示重複單位）。

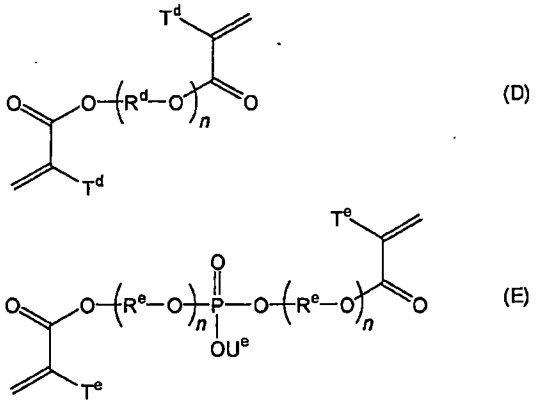
[0075] 有關本發明的共聚物中所含的含有式（c）所示基之重複單位（或式（c1）所示重複單位）的比例亦可為對於全共聚物扣除上述式（a）及式（b）的全殘留部分，亦可為扣除上述式（a）及式（b）與下述所敘述的第4成分的合計比例的殘留部分，但例如為1莫耳%至90莫耳%，以3莫耳%至88莫耳%為佳，較佳為5莫耳%至87莫耳%。且，有關本發明的共聚物可包含含有2種以上式（c）所示基之重複單位（或式（c1）所示重複單位）。

[0076] 有關本發明的共聚物中之上述式（a1）、式（b1）及式（c1）所表示的重複單位之比例組合中，以式（a1）：3莫耳%至80莫耳%、式（b1）：3莫耳%至80莫耳%、式（c1）：1莫耳%至90莫耳%為佳，較佳為式（a1）：3.5莫耳%至50莫耳%、式（b1）：5莫耳%至70莫耳%、式（c1）：3莫耳%至88莫耳%，更佳為式（a1）：4莫耳%至40莫耳%、式（b1）：8莫耳%至65莫耳%、式（c1）：5莫耳%至87莫耳%。

[0077] 另外有關本發明的共聚物可共聚合任意第4成分。例如將作為第4成分的具有2個以上官能基之（甲基）丙烯酸酯化合物進行共聚合，或聚合物的一部分進行部分性3次元交聯。作為如此第4成分，例如可舉出下述式（D）或（E）：

[0078]

【化１３】



(D)

(E)

[0079] 〔式中，T^d、T^e及U^e各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基，R^d及R^e各獨立表示可由鹵素原子所取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支伸烷基；n表示1至6的整數〕所示2官能性單體。即有關本發明的共聚物較佳為含有自如2官能性單體所衍生的交聯結構者。

[0080] 對於式（D）及（E），T^d及T^e各獨立表示氫原子、甲基或乙基為佳，較佳為各獨立表示氫原子或甲基。

[0081] 對於式（E），U^e以氫原子、甲基或乙基為佳，較佳為氫原子。

[0082] 對於式（D），R^d以可由鹵素原子所取代的碳原子數1至3的直鏈或者分支伸烷基為佳，較佳為各獨立表示伸乙基或者伸丙基，或者由1個氯原子所取代的伸乙基或者伸丙基，特佳為伸乙基或者伸丙基。又，對於式（D），n以1至5的整數為佳，特佳為1。

[0083] 對於式（E），R^e以可由鹵素原子所取代之碳

原子數1至3的直鏈或者分支伸烷基為佳，較佳為各獨立表示伸乙基或者伸丙基，或者由1個氯原子所取代的伸乙基或者伸丙基，特佳為伸乙基或者伸丙基。又，對於式（E），n以1至5的整數為佳，特佳為1。

[0084] 式（D）所示2官能性單體較佳可舉出乙二醇二（甲基）丙烯酸酯、三乙二醇二（甲基）丙烯酸酯、丙二醇二（甲基）丙烯酸酯或來自上述式（A-3）的2官能性單體等。

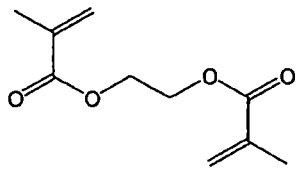
式（E）所示2官能性單體較佳為可舉出磷酸雙（甲基丙烯醯氧甲基）、磷酸雙〔（2-甲基丙烯醯氧）乙基〕、磷酸雙〔3-（甲基丙烯醯氧）丙基〕或來自上述式（A-3）的2官能性單體。

[0085] 任意第4成分可為3官能性單體。作為如此第4成分的3官能性單體，例如可舉出三丙烯酸次膦基參（氧基-2,1-乙烷二基）。

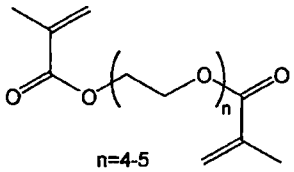
[0086] 這些第4成分之中，亦以乙二醇二甲基丙烯酸酯、來自上述式（A-3）及（A-4）的2官能性單體中，具有乙二醇及丙二醇的重複單位之二甲基丙烯酸酯、磷酸雙〔2-（甲基丙烯醯氧）乙基〕以來自及上述式（A-3）及（A-4）的2官能性單體中，藉著磷酸酯基具有乙二醇及丙二醇之重複單位的二甲基丙烯酸酯為佳，該結構式各如下述式（D-1）～（D-3）及式（E-1）～（E-3）所示。

[0087]

【化１４】

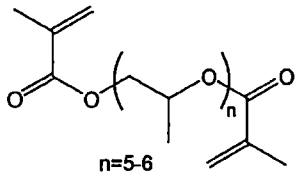


(D-1)



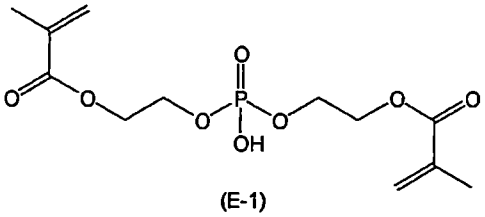
n=4-5

(D-2)

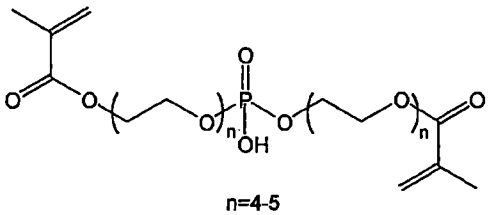


n=5-6

(D-3)

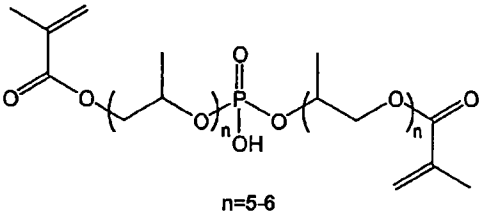


(E-1)



n=4-5

(E-2)



n=5-6

(E-3)

[0088] 於共聚物中，亦可含有這些第4成分之1種或2種以上。

上述共聚物中之第4成分，例如由上述式（D）或（E）所示2官能性單體所衍生的交聯結構之比例為0莫耳%至50莫耳%。

[0089] 式（A）所示化合物對於形成上述共聚物的單體全體之比例為3莫耳%至80莫耳%，較佳為3.5莫耳%至50莫耳%，更佳為4莫耳%至40莫耳%。又，式（A）所示化合物可為2種以上。

式（B）所示化合物對於形成上述共聚物的單體全體之比例為3莫耳%至80莫耳%，較佳為5莫耳%至70莫耳%，更佳為8莫耳%至65莫耳%。又，式（B）所示化合物可為2種以上。

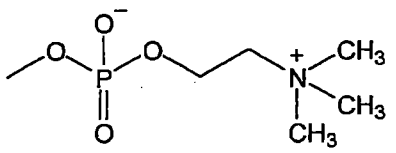
式（C）所示化合物對於形成上述共聚物的單體全體之比例可為減去上述式（A）及（B）的比例之殘留全部分，亦可為減去上述式（A）及（B）與上述第4成分的合計比例之殘留部分，例如為1莫耳%至90莫耳%，較佳為3莫耳%至88莫耳%，更佳為5莫耳%至87莫耳%。又，式（C）所示化合物可為2種以上。

[0090] 有關本發明之共聚物，作為進一步任意第5成分，可共聚合乙烯性不飽和單體或多糖類或者此衍生物。作為乙烯性不飽和單體的例子，可舉出選自由（甲基）丙烯酸及其酯；乙酸乙烯酯；乙烯基吡咯啶酮；亞乙基；乙烯基醇；以及這些親水性的官能性衍生物所成群的1種或2種以上乙烯性不飽和單體。作為多糖類或其衍生物的例子，可舉出羥基烷基纖維素（例如羥基乙基纖維素或羥基丙基纖維素）等纖維素系高分子、澱粉、葡聚醣、可得然膠（Curdrun）。

[0091] 所謂親水性官能性衍生物表示具有親水性官能基或結構的乙烯性不飽和單體。作為親水性官能性基或結構之例子，可舉出甜菜鹼結構；醯胺結構；烷二醇殘基；胺基；以及亞磺醯基等。

[0092] 甜菜鹼結構表示具有第4級銨型陽離子結構與酸性陰離子結構的兩性中心之化合物的一價或二價基，例如可舉出磷酸膽鹼基：

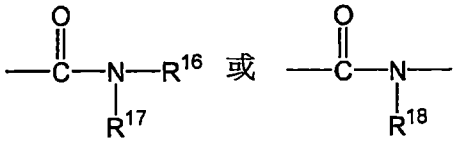
【化１５】



。作為具有如此結構的乙烯性不飽和單體之例子，可舉出2-甲基丙烯醯氧乙基磷酸膽鹼（MPC）等。

[0093] 醯胺結構表示下述式：

【化１６】



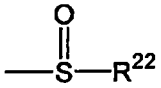
〔其中，R^{16}、R^{17}及R^{18}彼此表示氫原子或有機基（例如甲基、羥基甲基或羥基乙基等）〕所示基。作為具有如此結構之乙烯性不飽和單體的例子，可舉出（甲基）丙烯醯胺、N-（羥基甲基）（甲基）丙烯醯胺等。且具有如此結構的單體或聚合物，例如揭示於日本特開2010-169604號公報等。

[0094] 烷二醇殘基表示烷二醇（HO-Alk-OH；其中Alk為碳原子數1至10的伸烷基）之單側端末或兩端末的羥基與其他化合物進行縮合反應後所殘留的伸烷基氧基（-Alk-O-），亦包含伸烷基氧基單位為重複的聚（伸烷基氧基）基。作為具有如此結構的乙烯性不飽和單體之例子，可舉出2-羥基乙基（甲基）丙烯酸酯、甲氧基聚乙二醇（甲基）丙烯酸酯等。且，具有如此結構的單體或聚合物例如揭示於日本特開2008-533489號公報等。

[0095] 胺基表示式：$-NH_2$、$-NHR^{19}$或$-NR^{20}R^{21}$〔其中，R^{19}、R^{20}及R^{21}彼此獨立為有機基（例如碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基等）〕所示基。對於本發明中之胺基中包含經4級化或氯化的胺基。作為具有如此結構的乙烯性不飽和單體之例子，可舉出二甲基胺基乙基（甲基）丙烯酸酯、2-（t-丁基胺基）乙基（甲基）丙烯酸酯、甲基丙烯醯基氯化膽鹼等。

[0096] 亞磺醯基表示下述式：

【化17】



〔其中，R^{22}為有機基（例如為碳原子數1至10的有機基，較佳為具有1個以上的羥基之碳原子數1至10的烷基等）〕所示基。作為具有如此結構的聚合物，可舉出於日本特開2014-48278號公報等揭示的共聚物。

[0097]

<共聚物之製造方法>

有關本發明之共聚物為可藉由一般丙烯酸聚合物或甲基丙烯酸聚合物等合成方法的自由基聚合、陰離子聚合、陽離子聚合等方法進行合成。該形態可為溶液聚合、懸浮聚合、乳化聚合、塊狀聚合等種種方法。

[0098] 作為反應用溶劑，雖可為水、磷酸緩衝液或乙醇等醇或組合此等混合溶劑，以含有水或乙醇為佳。且以含有水或乙醇10質量%以上100質量%以下者為佳。較佳

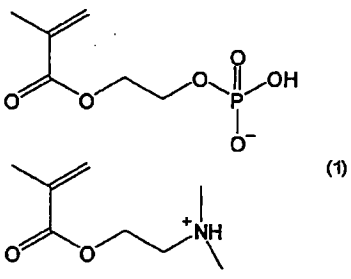
為含有水或乙醇50質量%以上100質量%以下者。更佳為含有水或乙醇80質量%以上100質量%以下者。特佳為含有水或乙醇90質量%以上100質量%以下者。以水與乙醇的合計為100質量%為佳。

[0099] 作為反應濃度，例如如將含有上述式（a）所示基的單體、含有上述式（b）所示基的單體與含有上述式（c）所示基的單體之反應溶劑中濃度設定在0.01質量%至4質量%者為佳。濃度若超過4質量%時，例如藉由式（a）所示磷酸基所具有的強締合性，共聚物在反應溶劑中會有凝膠化之情況產生。若濃度未達0.01質量時，因所得之塗漆的濃度過低，故欲得到充分膜厚之塗布膜的塗布膜形成用組成物之作成變的困難。濃度以0.01質量%至3質量%，例如以3質量%或2質量%為佳。

[0100] 對於有關本發明之共聚物的合成，將含有上述式（a）所示基的單體與含有上述式（b）所示基的單體，例如作為式（1）所記載的鹽後，亦可製造出與含有上述式（c）所示基的單體進行聚合的共聚物。

[0101]

【化18】



(1)

[0102] 因含有磷酸基的單體為容易締合之單體，故

滴入反應系統中時，可少量地滴入於反應溶劑中使其快速分散。且反應溶劑欲提高單體及聚合物的溶解性時可加溫（例如40℃至100℃）。

[0103] 欲有效率地進行聚合反應，使用聚合起始劑為佳。作為聚合起始劑的例子，可使用2,2'-偶氮雙（異丁腈）、2,2'-偶氮雙（2-甲基丁腈）、2,2'-偶氮雙（2,4-二甲基戊腈）（和光純藥工業（股）製；VA-065、10小時半衰期溫度；51℃）、4,4'-偶氮雙（4-氰基吉草酸）、2,2'-偶氮雙（4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈）、1,1'-偶氮雙（環己烷-1-甲腈）、1-〔（1-氰基-1-甲基乙基）偶氮〕甲醯胺、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕、2,2'-偶氮雙（2-甲基丙酸脒）二鹽酸鹽、2,2'-偶氮雙〔2-甲基-N-（2-羥基乙基）丙醯胺〕（和光純藥工業（股）製：VA-086、10小時半衰期溫度；86℃）、過氧化苯甲醯基（BPO）、2,2'-偶氮雙〔N-（2-羧基乙基）-2-甲基丙酸脒〕n-水合物（和光純藥工業（股）製：VA-057、10小時半衰期溫度；57℃）、4,4'-偶氮雙（4-氰基戊烷酸）（和光純藥工業（股）製：V-501）、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕二鹽酸鹽（和光純藥工業（股）製：VA-044、10小時半衰期溫度；44℃）、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕二硫酸鹽二水合物（和光純藥工業（股）製：VA-046B、10小時半衰期溫度；46℃）、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕（和光純藥工業（股）製：VA-061、10小時半衰期溫度；61℃）、2,2'-

偶氮雙（2-脒丙烷）二鹽酸鹽（和光純藥工業（股）製：V-50、10小時半衰期溫度；56℃）、過氧二硫酸或t-丁基過氧化氫等，其中若考慮到離子平衡、對水的溶解性，以使用2,2'-偶氮雙〔2-甲基-N-（2-羥基乙基）丙醯胺〕、2,2'-偶氮雙〔N-（2-羧基乙基）-2-甲基丙酸脒〕n-水合物、4,4'-偶氮雙（4-氰基戊烷酸）、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕二鹽酸鹽、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕二硫酸鹽二水合物、2,2'-偶氮雙〔2-（2-咪唑啉-2-基）丙烷〕、2,2'-偶氮雙（2-脒丙烷）二鹽酸鹽或過氧二硫酸中任一者為佳。

[0104] 作為聚合起始劑的添加量，對於使用於聚合的單體合計重量而言為0.05質量%～10質量%。

[0105] 反應條件為將反應容器在油浴等於50℃至200℃進行加熱1小時至48小時的攪拌，較佳為於80℃至150℃進行加熱5小時至30小時的攪拌後，進行聚合反應進而得到有關本發明的共聚物。反應環境以氮環境為佳。作為反應程序，可將全反應物質放入室溫的反應溶劑後，於上述溫度進行加熱並使其聚合，或亦可於預先加溫的溶劑中，將反應物質的混合物之全部或一部分徐徐地滴入。

[0106] 例如，作為後者之反應程序，將含有上述式（A）、（B）及（C）所示化合物、溶劑及聚合起始劑的混合物，滴入於保持在比該聚合起始劑之10小時半衰期溫度更高之溫度的溶劑中，使其進行反應（聚合）。藉由採用該反應程序與溫度條件，可將上述式（A）、式（B）

或式（C）所示化合物的反應溶劑中之濃度，例如設定在0.01質量%至10質量%。此時，濃度即使若超過4質量%，於反應前，滴入相及反應相皆成為透明均勻溶液，可抑制反應後共聚物在反應溶劑中之凝膠化。

[0107] 有關本發明的共聚物之分子量若為數千至數百萬程度即可，較佳為5,000至5,000,000。更佳為10,000至2,000,000。又，亦可為無規共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物中任一種，欲製造該共聚物時的共聚合反應本身並無特別限定，可使用藉由利用自由基聚合或離子聚合或光聚合、乳化聚合之聚合等在公知溶液中進行合成的方法。依據這些目的的用途，可單獨使用本發明之共聚物中任一種，亦可混合複數共聚物，且改變其比率後使用。

[0108] 如此所製造的種種共聚物可為2次元聚合物亦可為3次元聚合物，於含有水的溶液中成分散狀態。換言之，在含有這些聚合物之塗漆中，會產生不均勻凝膠化或白濁沈澱者為不佳，以成為透明塗漆、分散膠體狀塗漆或溶膠者為佳。

[0109] 本發明之細胞培養容器係以將上述共聚物塗布於容器表面的至少一部分為特徵，以塗布在可與細胞及培養液接觸的容器內部表面者為佳，以塗布在容器表面全體者為較佳。對於細胞培養容器之上述共聚物的塗布可藉由公知手段，具體為藉由後述項目≪細胞培養容器之製造方法≫及實施例所敘述的手段而形成。本發明之細胞培養容器的塗布厚度可配合容器形狀或目的而做適宜選擇，以

10～1000Å為佳，以10～500Å為較佳，以10～300Å為特佳。本發明之細胞培養容器藉由如此塗布，可具有對於細胞或蛋白質優良的附著抑制能。

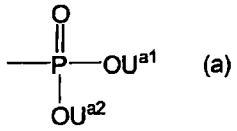
[0110]

≪細胞培養容器之製造方法≫

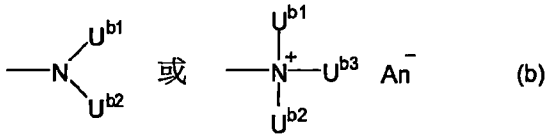
本發明之第二態樣為含有將具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布於容器表面的至少一部分之步驟的細胞培養容器的製造方法。

[0111]

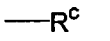
【化19】



(a)



(b)



(c)

[0112]（式中，U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}、R^c以及An^-與上述同義）。

[0113]

<塗布步驟>

在本發明之細胞培養容器的製造方法之塗布步驟中，將共聚物塗布於容器表面的至少一部分。例如容器為圓底多片孔板時，僅塗布孔凹陷部分，但亦可塗布培養皿全

體。其中，容器及共聚物各如前述項目<容器>及<共聚物>所述者。

[0114] 塗布步驟並無特別限定，可將容器與共聚物接觸，藉由斯業者所公知的任一塗布手段（例如塗佈、浸漬等）實施即可。例如將含有共聚物的塗漆塗布於容器，或者亦可將容器浸漬於含有共聚物的塗漆而實施。較佳為藉由於含有共聚物之塗漆將容器浸漬而實施。

[0115] 含有共聚物之塗漆為將在前述項目<共聚物的製造方法>所得之共聚物於適切溶劑以所望濃度進行溶解而調製，或者亦可將含有藉由該製造方法所得的共聚物之反應溶液，直接或稀釋至所望固體成分濃度後作為塗漆使用。作為含於塗漆之溶劑，可舉出水、磷酸緩衝液（PBS）、醇。作為醇為碳數2至6的醇，例如可舉出乙醇、丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、異丁醇、t-丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、1-庚醇、2-庚醇、2,2-二甲基-1-丙醇（=新戊基醇）、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-丁醇（=t-戊基醇）、3-甲基-1-丁醇、3-甲基-3-戊醇、環戊醇、1-己醇、2-己醇、3-己醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇、2-乙基-1-丁醇、2-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-1-戊醇、3-甲基-2-戊醇、3-甲基-3-戊醇、4-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、4-甲基-3-戊醇及環己醇，可單獨使用或使用組合這些的混合溶劑，但以選自水、PBS及乙醇者為佳。欲進行共聚物之溶解，必須含有水。

[0116] 作為塗漆中之共聚物的濃度為0.01至4質量%，較佳為0.01至3質量%，更佳為0.01至2質量%，最佳為0.01至1質量%。共聚物之濃度若未達0.01質量%時，無法形成充分膜厚之塗布，若超過4質量%時，塗漆之保存安定性會變差，可能會引起溶解物之析出或凝膠化。

[0117] 且於塗漆中，除上述共聚物與溶劑以外，不損害視必要所得之塗布的性能之範圍下，亦可添加其他物質。作為其他物質，可舉出防腐劑、界面活性劑、提高與基材（容器）之密著性的底漆（Primer）、防霉劑及糖類等。

[0118] 欲調節塗漆中之共聚物的離子平衡，含有共聚物之塗漆可預先調整pH。pH調整，例如可於含有聚物之塗漆中添加pH調整劑，可將塗漆的pH調至3.5～8.5，較佳為調至4.0～8.0而實施。所使用的pH調整劑之種類及其量可配合塗漆中之共聚物的濃度或共聚物之陰離子與陽離子的存在比等做適宜選擇。作為pH調整劑的例子，可舉出氨、二乙醇胺、吡啶、N-甲基-D-葡糖胺、參（羥基甲基）胺基甲烷等有機胺；氫氧化鉀、氫氧化鈉等鹼金屬氫氧化物；氯化鉀、氯化鈉等鹼金屬鹵化物；硫酸、磷酸、鹽酸、碳酸等無機酸或該鹼金屬鹽；科林等4級銨陽離子；或者彼等混合物（例如磷酸緩衝生理食鹽水等緩衝液）。彼等中，亦以氨、二乙醇胺、N-甲基-D-葡糖胺、參（羥基甲基）胺基甲烷、氫氧化鈉及科林（Choline）為佳，特佳為氨、二乙醇胺、氫氧化鈉及科林。

[0119] 將含有如此共聚物的塗漆接觸於容器，於該表面的至少一部分形成塗布。塗布為形成在容器表面全體者為佳。

[0120] 且，於塗布步驟之前，可將容器表面以公知的UV/臭氧處理進行洗淨。該洗淨步驟可使用市售UV/臭氧清潔劑等而實施。

[0121]

<乾燥·洗淨·滅菌步驟>

塗布步驟後，較佳為將經塗布的容器在-200℃至200℃的溫度下使其乾燥。藉由乾燥，與取出上述塗布膜形成用組成物中之溶劑的同時，有關本發明之共聚物的式（a）及式（b）彼此形成離子鍵而完全固著於基體。本發明之細胞培養容器的塗布膜厚以10～1000Å為佳，以10～500Å為較佳，以10～300Å為特佳。本發明者們發現在本發明之細胞培養容器的製造方法中，無須在高溫下處理，可藉由在低溫之處理，具有所望特性的塗布形成在容器表面，且即使為數十至數百Å程度的薄膜厚，不僅具有優良耐久性，亦具有對於細胞或蛋白質之優良附著抑制能。

[0122] 乾燥例如可在室溫（10℃至35℃，例如25℃）下實施，但欲更迅速地可形成塗布膜，例如可在40℃至50℃下實施。又，亦可在藉由冷凍乾燥法的極低溫～低溫（-200℃至-30℃前後）下實施。冷凍乾燥亦稱為真空冷凍乾燥，通常為將經乾燥者以冷媒冷卻後，在真空狀態下使溶劑昇華而除去的方法。使用在冷凍乾燥的一般冷

媒，可舉出乾冰與甲醇之混合媒體（-78℃）、液體氮（-196℃）等。更佳的乾燥溫度為10℃至180℃，特佳乾燥溫度為25℃至150℃。

[0123] 且，於乾燥步驟之前及／或後，可將經塗布的容器表面，以乙醇等碳原子數1至5的醇及／或水進行洗淨。該洗淨步驟為在0℃至60℃下，較佳為25℃（室溫）至40℃的溫度下，實施30分鐘至48小時，較佳為1至24小時。

[0124] 且經乾燥步驟後，欲除去殘存於該塗布之雜質、未反應單體等，且進一步欲調節膜中之共聚物的離子平衡，可使用選自含有水及電解質的水溶液所成群的至少1種溶劑，以流水洗淨或超音波洗淨等進行洗淨。其中，含有水或電解質的水溶液，例如可在40℃至95℃之範圍下加溫者。含有電解質之水溶液以PBS及生理食鹽水（僅含有氯化鈉者、達爾伯克氏磷酸緩衝生理食鹽水、Tris緩衝生理食鹽水、HEPES緩衝生理食鹽水及巴比妥緩衝生理食鹽水為佳，PBS為特佳。

[0125] 即使以醇、水、及PBS等洗淨，形成於容器之表面的塗布，無溶離下可強固地固著於基材（即容器）。所形成的塗布具有含細胞或蛋白質的種種活體物質之附著抑制能。因此，本發明之細胞培養容器除可抑制細胞或蛋白質之附著，對於溶劑之耐久性亦為優良。

[0126] 視必要，欲將經塗布的容器進行滅菌，可施予放射線、電子線、環氧乙烷、高壓高溫釜等公知滅菌處

理。

[0127]

≪細胞團塊之製造方法≫

本發明之第三態樣為，使用藉由本發明之細胞培養容器及本發明之製造方法所得之細胞培養容器（以下將兩者合併為「本發明之細胞培養容器」）者為特徵之細胞團塊的製造方法。使用本發明之細胞培養容器時，可抑制細胞團塊對於容器表面之附著，且可抑制塗布對於培養液之溶離，故無自容器的刺激之狀態下可培養細胞團塊。細胞團塊較佳為使用含有具有在本發明之細胞培養容器中使細胞或組織懸浮的效果之多糖類（特別為脫醯化結冷膠）為特徵之培養基進行培養者。如此培養基的具體組成或培養方法，例如於國際公開第2014/017513號公報所揭示。

[實施例]

[0128] 以下雖舉出有關本發明之培養容器及其製造方法的合成例、實施例及試驗例，但此等僅為進一步詳細說明本發明所示者，本發明並未限定於此等。

[0129]

<原料組成之測定方法>

具有含有磷的化合物之原料的各含有磷的化合物之濃度（質量%）測定為藉由^{31}P-NMR進行。使用下述標準物質算出於原料中所含的各含有磷的化合物之絕對濃度（絕對質量%）。

[0130]

（測定條件）

·模式：反柵極去偶合模式（定量模式）

·裝置：varian 400 MHz

·溶劑：CD_3OD（重甲醇）（30重量%）

·轉動數：0 Hz

·數據點：64000

·倒裝角：90°

·等待時間：70 s

·積分次數：16回，n=4，

·標準物質：三甲基磷酸+D_2O（調製75%TMP溶液）

[0131]

<合成例1>

於酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（製品名；Phosmer M、Uni Chemical（股）製之乾固法100℃·1小時中之不揮發部分：91.8%、酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（44.2質量%）、磷酸雙〔2-（甲基丙烯醯氧）乙基〕（28.6質量%）、其他物質（27.2質量%）之混合物）7.00g中加入純水16.05g並充分溶解。其次，將乙醇48.16g、甲基丙烯酸2-（二乙基胺基）乙基9.41g（東京化成工業（股）製）、甲基丙烯酸丁基1.34g（東京化成工業（股）製）、2,2'-偶氮雙（N-（2-羧基乙基）-2-甲基丙酸脒）n-水合物（VA-057、和光純藥工業（股）製）0.09g保持在20℃以下，依序加入於Phosmer M之水溶液。將放有充分攪拌為

均勻的上述全部之混合液導入滴定漏斗。另一方面，另外將純水96.31g添加於附有冷卻管之3口燒瓶中並使成為氮氣流，一邊攪拌一邊升溫至迴流溫度。維持該狀態下，將導入上述混合液的滴定漏斗設置於3口燒瓶中，經2小時將混合液滴入於純水與乙醇之沸騰液內。滴入後在24小時維持上述環境之狀態下加熱攪拌後得到固體成分約10質量%之含有共聚物的塗漆178.35g。

[0132]

<比較合成例1>

將酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（製品名；Phosmer M、Uni Chemical（股）製之乾固法100℃經1小時中之不揮發部分：91.8%，酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯（44.2質量%）、磷酸雙〔2-（甲基丙烯醯氧）乙基〕（28.6質量%）、其他物質（27.2質量%）之混合物）28.00g維持在60℃下進行攪拌，滴入甲基丙烯酸2-（二甲基胺基）乙酯21.37g。於此加入純水133.96g，再將乙醇44.65g、（東京化成工業（股）製）、2,2'-偶氮雙（N-（2-羧基乙基）-2-甲基丙酸脒）n-水合物（VA-057、和光純藥工業（股）製）0.25g在保持20℃以下依序加入。將放有充分攪拌均勻的上述全部之混合液導入於滴定漏斗。另一方面，另外將純水267.93g放入附有冷卻管的3口燒瓶，將此吹入氮氣，一邊攪拌一邊升溫至迴流溫度。維持該狀態下，將導入上述混合液的滴定漏斗設置於3口燒瓶，經2小時將混合液滴入於純水與乙醇之沸騰液內。滴入後，在維持24小時

的上述環境之狀態下藉由加熱攪拌，得到固體成分約9.70質量%的含有共聚物之塗漆496.16g。所得之透明液體的GFC中之重量平均分子量約280,000。

[0133]

<調製例1>

（矽晶圓之準備）

直接使用半導體評估用之市售矽晶圓。

[0134]

（QCM傳感器（PS）之作成）

將經Au蒸鍍的水晶振動子（Q-Sense,QSX304），使用UV/臭氧洗淨裝置（UV253E、Phil Zhen股份有限公司製）進行10分鐘洗淨後，於溶解2-胺基乙烷硫醇（東京化成工業（股）製）0.0772g於乙醇1000ml的溶液中浸漬24小時。以乙醇洗淨傳感器表面後自然乾燥，將溶解聚苯乙烯（PS）（Aldrich公司製）1.00g於甲苯99.00g的塗漆藉由旋轉塗佈機以3500rpm/30sec於膜傳感器側進行旋塗，經120℃/1min乾燥後做成QCM傳感器（PS）。

[0135]

（塗布之調製）

於在上述合成例1所得之含有共聚物的塗漆5.00g中，加入純水31.5g、乙醇1.35g、1mol/L氫氧化鈉水溶液（1N）（關東化學（股）公司製）0.24g後充分攪拌，調製出塗布膜形成組成物。pH為7.3。於所得之塗布膜形成組成物中，將上述矽晶圓傾斜，於烤箱中在45℃乾燥24小

時。其後將附著於塗布膜上的未硬化膜形成用組成物以PBS與純水進行充分洗淨，得到形成塗布膜之矽晶圓。使用上述矽晶圓以光學式干涉膜厚計確認塗布膜之膜厚為90Å。

又，將上述塗布膜形成用組成物以3500rpm/30se對QCM傳感器（PS）進行旋塗，作為乾燥步驟在45℃的烤箱進行24小時燒烤。其後，作為洗淨步驟對於過剩未硬化之塗布膜形成用組成物以PBS與超純水進行各2次的洗淨，得到經表面處理之QCM傳感器（PS）。

[0136]

<調製例2>

直接使用上述QCM傳感器（PS）。

[0137]

<調製例3>

在上述比較合成例1所得之含有共聚物之塗漆45.00g，加入純水265.92g、乙醇125.58g、1mol/L氫氧化鈉水溶液（1N）（關東化學（股）公司製）8.18g並充分攪拌，調製出塗布膜形成用組成物。藉由與實施例之同樣方法，得到形成塗布膜之矽晶圓或經表面處理的QCM傳感器（PS）。使用上述矽晶圓以光學式干涉膜厚計確認塗布膜之膜厚為44Å。

[0138]

<試驗例1：蛋白質附著抑制效果>

將在調製例1～3所得之經表面處理的QCM傳感器

（PS）附於散逸型水晶振動子微平衡QCM-D（E4、Q-Sense），流入PBS至確認頻率數之變化在1小時下成為1Hz以下的安定底線為止。其次，將經安定的底線之頻率數作為0Hz流入約10分鐘之PBS。繼續於41010-Basal Medium Eagle（BME），no Glutamine（Thermo Fisher Scientific股份有限公司製）添加15wt%之牛血清（FBS）、L-Glutamine、作為抗生物質之青黴素與鏈黴素，流入溶液約30分鐘，其後讀取再次流入PBS約20分鐘後的11次泛音之吸著誘起頻率數的位移（Δf）。使用用於分析之Q-Tools（Q-Sense），針對吸著誘起頻率數的位移（Δf），將在Sauerbrey式所說明的吸著誘起頻率數之位移（Δf）以每單位面積的質量（ng/cm^2）換算，作為活體物質的附著量表示於下述表1。有關將本發明之合成例1的共聚物作為塗布使用的調製例1與將未塗布的調製例2及比較合成例1之共聚物作為塗布使用的調製例3做比較，顯示低於一位數的各種蛋白質吸著量。

[0139]

[表1]

	塗布	蛋白質附著量(ng/cm^2)
調製例1	合成例1之共聚物	16
調製例2	無塗布(ps表面)	566
調製例3	比較合成例1之共聚物	297

[0140]

<實施例1>

依序實施以下各處理步驟，調製出本發明中之細胞培養容器。

處理1：將在合成例1所調製之共聚物含有塗漆使用網孔尺寸為0.22μm之濾器進行過濾後，添加至96孔細胞培養培養皿（BDBioscience公司製、#351172）之孔成為200μL（固體成分1質量%）/孔，在室溫進行1小時靜置後，除去過剩塗漆。

[0141] 處理2：使用烤箱（Advantech東洋股份有限公司製之乾燥機FC-612）在50℃進行1晚乾燥。其後將滅菌水添加於每1孔為200μL後，經除去後進行洗淨。同樣地進一步進行第2次洗淨，得到經塗布的細胞培養容器。

[0142]

<比較例1>

將在實施例1所使用的在合成例1所調製的含有共聚物之塗漆，取代為在比較合成例1所調製的含有共聚物的塗漆以外，與實施例1同樣下，得到經塗布之細胞培養容器。

[0143]

<試驗例2：細胞附著抑制效果>

（塗布培養皿之調製）

使用在實施例1及比較例1所得之經塗布的細胞培養容器。作為陽性對照之試樣，使用市售的細胞低接著培養皿（康寧公司製之#3474）。作為陰性對照，使用未施予塗

布之96孔細胞培養培養皿（BDBioscience公司製之#351172）。

[0144]

（細胞之調製）

細胞為使用老鼠胚成纖維細胞C3H10T1/2（DSPharma Biomedical公司製）。使用於細胞之培養的培養基為使用含有10%FBS（HyClone公司製）與L-谷氨醯胺-青黴素-鏈黴素安定化溶液（Sigma-Aldrich公司製）的BME培養基（Thermo Fisher Scientific公司製）。細胞在37℃/CO_2恆溫培養器內保持5%二氧化碳濃度之狀態下，使用直徑10cm的盤子（培養基10mL）進行2天以上靜置培養。繼續將本細胞以PBS5ml洗淨後，添加胰蛋白酶-EDTA溶液（Invitrogen公司製）1mL，剝離細胞，於上述培養基10mL中各懸浮。將本懸浮液經離心分離（湯米股份有限公司精工製之型號LC-200、1000rpm/3分、室溫）後，除去澄清液，調製出添加上述培養基的細胞懸浮液。

[0145]

（細胞附著實驗）

對於上述經調製的培養皿，將各細胞懸浮液添加各100μL成為2×10^3cells/wel。其後在保持5%二氧化碳濃度之狀態下，在37℃靜置4天於CO_2恆溫培養器內。

[0146]

（細胞附著之觀察）

培養4天後將細胞對於實施例1之培養皿、比較例1之

培養皿、陽性對照及陰性對照的培養皿之附著以倒立型顯微鏡（Olympus公司製、CKX31）的觀察（倍率：4倍）為基準下比較。在實施例1之培養皿、比較例1之培養皿及陽性對照之培養皿中，幾乎未見到細胞附著。各培養皿的結果（培養4天後）如圖1所示。又，將Cell Counting Kit-8溶液（同仁化學研究所製）添加於每1孔至10μL，在37℃靜置2小時於CO_2恆溫培養器。其後，以吸光度計（MolecularDevices公司製之SpectraMax）測定450nm之吸光度。各測定值為減去僅添加各培養基的孔之測定值所得之值。其結果如表2所示。

[0147]

[表2]
吸光度測定

	吸光度
實施例1	0.061
比較例1	0.053
陽性對照	0.034
陰性對照	0.511

[0148] 如上述，除陰性對照以外在所有培養皿中未見到細胞的附著。此時，未附著的細胞形成細胞團塊（橢球體）。

[產業上可利用性]

[0149] 本發明之細胞培養容器為以含有特定基之共

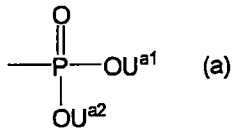
聚物塗布於表面的至少一部分。該塗布可抑制細胞或蛋白質對容器表面的附著，同時亦可使塗布強固地固著於容器表面，故改善塗布對培養液之溶離的抑制。因此，本發明之細胞培養容器為在無由容器的刺激之狀態下可培養細胞團塊的層面上來看為有利。

【發明申請專利範圍】

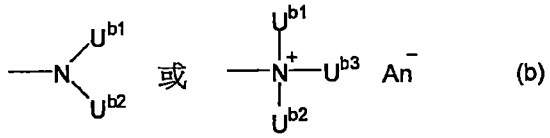
【第1項】

一種細胞培養容器，其特徵為將具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布於表面者；

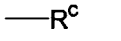
【化1】



(a)



(b)



(c)

〔式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

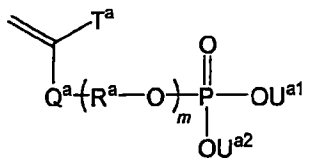
R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

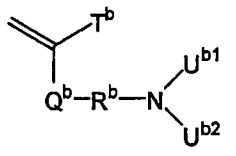
【第2項】

如請求項1之細胞培養容器，其中含有上述式（a）、（b）及（c）所示基的重複單位係由各下述式（A）、（B）及（C）所示單體所衍生的重複單位；

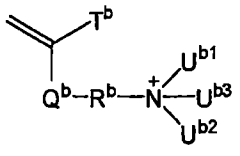
【化2】



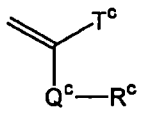
(A)



或



(B)



(C)

〔式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

Q^a及Q^b各獨立表示單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c表示單鍵、醚鍵或酯鍵；

R^a及R^b各獨立表示可由鹵素原子所取代的碳原子數1至10的直鏈或分支伸烷基，R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子；

m表示0至6的整數〕。

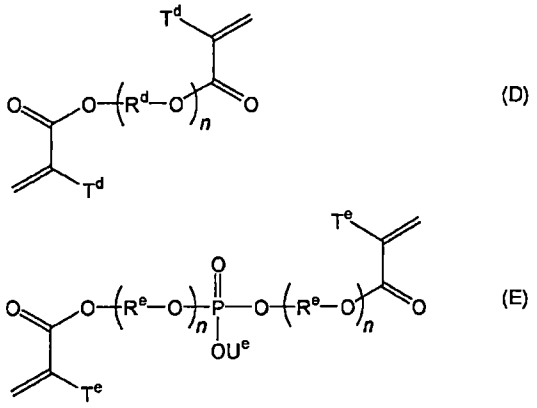
【第3項】

如請求項2之細胞培養容器，其中m為1，R^a及R^b各獨立表示伸乙基或伸丙基。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之細胞培養容器，其中上述共聚物進一步具有由下述式（D）或（E）所示單體所衍生的交聯結構；

【化3】



(D)

(E)

〔式中，

T^d、T^e及U^e各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基，

R^d及R^e各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支烷基所取代；

n表示1至6的整數〕。

【第5項】

如請求項4之細胞培養容器，其特徵為T^d及T^e各獨立表示氫原子或甲基，U^e表示氫原子，R^d及R^e各獨立表示伸

乙基或伸丙基。

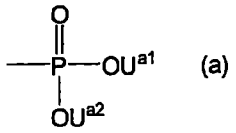
【第6項】

請求項1至5中任一項之細胞培養容器，其中含有蛋白質之附著抑制能。

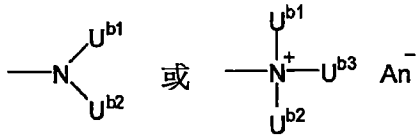
【第7項】

一種細胞培養容器之製造方法，其特徵含有將具有含有下述式（a）所示基的重複單位、含有下述式（b）所示基之重複單位與含有下述式（c）所示基之重複單位的共聚物塗布於容器表面的至少一部分之步驟；

【化4】



(a)



(b)

(c)

〔式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

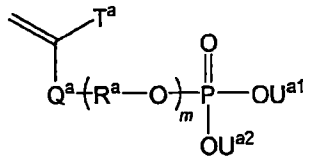
R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；

An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子〕。

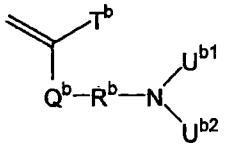
【第8項】

如請求項7之製造方法，其中含有上述式（a）、（b）及（c）所示基的重複單位各係由下述式（A）、（B）及（C）所示單體所衍生的重複單位；

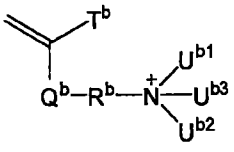
【化5】



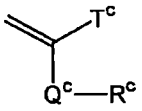
(A)



或



(B)



(C)

〔式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及U^{b3}各獨立表示氫原子或碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基；

Q^a及Q^b各獨立表示單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c表示單鍵、醚鍵或酯鍵；

R^a及R^b各獨立表示可由可以鹵素原子進行取代的碳原子數1至10的直鏈或者分支烷基所取代，R^c表示碳原子數1至18的直鏈或者分支烷基、碳原子數3至10的脂環式烴基、碳原子數6至10的芳基、碳原子數7至15的芳烷基或碳原子數7至15的芳基氧基烷基（其中，前述芳基部分可由可以鹵

素原子進行取代的碳原子數1至5的直鏈或者分支烷基所取代）；An^-表示選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸酯離子所成群的陰離子；m表示0至6的整數〕。

【第9項】

如請求項7或8之製造方法，其中塗布步驟為使用含有共聚物之塗漆而實施。

【第10項】

如請求項9之製造方法，其中含有共聚物之塗漆為預先進行pH調整者。

【第11項】

如請求項7至10中任一項之製造方法，其中進一步含有將經塗布的細胞培養容器於乾燥步驟前及／或後進行洗淨的步驟。

【第12項】

如請求項11之製造方法，其中乾燥步驟後之洗淨為使用選自由含有水及電解質的水溶液所成群的至少1種溶劑而實施。

【第13項】

一種細胞團塊之製造方法，其特徵為使用如請求項1至6中任一項之細胞培養容器或藉由如請求項7至12中任一項之製造方法所製造的細胞培養容器。

【發明圖式】

圖 1

➢ C3H10T1/2 細胞：培養第4天

