

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-24350  
(P2019-24350A)

(43) 公開日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 M 3/00 (2006.01)	C 12 M 3/00	A 4 B 0 2 9
C 12 M 1/00 (2006.01)	C 12 M 1/00	C
C 12 M 1/14 (2006.01)	C 12 M 1/14	
C 12 M 1/22 (2006.01)	C 12 M 1/22	

審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2017-144848 (P2017-144848)	(71) 出願人	000002897 大日本印刷株式会社 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
(22) 出願日	平成29年7月26日 (2017.7.26)	(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
		(72) 発明者	照沼 淳子 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内
		(72) 発明者	長谷 政彦 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内
		(72) 発明者	長井 太郎 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内
		F ターム (参考)	4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 DF01 GA01 GB01 GB02 GB05 GB09

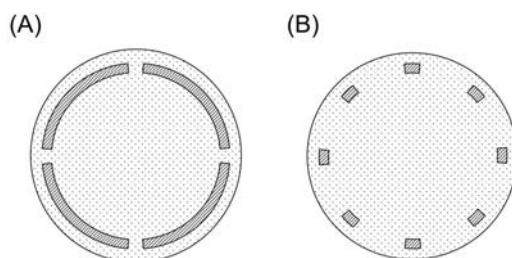
(54) 【発明の名称】細胞培養容器、細胞シートの製造方法、及び細胞培養容器の製造方法

## (57) 【要約】

【課題】本開示は、刺激応答性ポリマーに刺激を与えた後でも細胞シートを安定的に保持することができ、かつ細胞シートを容易に回収できる細胞培養容器を提供することを目的とする。

【解決手段】本実施形態は、刺激により細胞接着度合いが変化する刺激応答性領域と、前記刺激応答性領域を取り囲むように隣接して配置された細胞接着性を有する少なくとも1つの細胞接着性領域と、を含むシート形成領域を有する細胞培養容器であって、前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域が隣接している境界部分である少なくとも1つの接着境界が存在し、前記刺激応答性領域は、前記接着境界のそれぞれに接する連続した領域である、細胞培養容器である。

【選択図】図11



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

刺激により細胞接着度合いが変化する刺激応答性領域と、  
前記刺激応答性領域を取り囲むように前記刺激応答性領域に隣接して配置された細胞接着性を有する少なくとも1つの細胞接着性領域と、  
を含むシート形成領域を有する細胞培養容器であって、  
前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域が隣接している境界部分である少なくとも1つの接着境界が存在し、  
前記刺激応答性領域は、前記接着境界のそれぞれに接する連続した領域である、細胞培養容器。

10

**【請求項 2】**

前記接着境界は、前記刺激応答性領域の外周付近に配置されている、請求項1に記載の細胞培養容器。

**【請求項 3】**

前記接着境界が複数存在する、請求項1又は2に記載の細胞培養容器。

**【請求項 4】**

前記接着境界が少なくとも4つ存在する、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

**【請求項 5】**

前記刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれとを結ぶ2つの直線により形成される角度であって該角度が最大となるように前記2つの点が選択された角度を角度とした場合、前記接着境界の全てに対応する角度の総和が90°以上である、請求項3又は4に記載の細胞培養容器。

20

**【請求項 6】**

前記角度の総和が180°以上である、請求項5に記載の細胞培養容器。

**【請求項 7】**

前記刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれとを結ぶ2つの直線及び前記一つの接着境界で囲われる領域であって該領域の面積が最大となるように前記2つの点が選択された領域の面積を面積Tとした場合、前記接着境界の全てに対応する面積Tの総和が、前記刺激応答性領域の面積に対して、0.2倍以上である、請求項3～6のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

30

**【請求項 8】**

前記接着境界の総合長さが、前記刺激応答性領域の外周の長さに対して0.2倍以上である、請求項3～7のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

**【請求項 9】**

前記シート形成領域は、前記接着境界の総数の前記刺激応答性領域の重心から伸びる直線で、分割後のそれぞれの面積が等しくなるように前記刺激応答性領域を前記接着境界の総数の領域に分割した場合、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに、少なくとも1つの接着境界が接している配置形状を有する、請求項3～8のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

40

**【請求項 10】**

前記シート形成領域は、前記分割後の刺激応答性領域のそれぞれに、1つの接着境界のみが接している配置形状を有する、請求項9に記載の細胞培養容器。

**【請求項 11】**

一つの接着境界のうちの1つの点と該一つの接着境界に隣り合う接着境界のうちの1つの点とを結ぶ直線であって該直線が最短となるように前記1つの点のそれが選択された直線を直線Lとした場合、全ての接着境界に対応する直線Lと全ての接着境界とで囲まれる領域の面積が、シート形成領域の面積に対して0.6倍以上である、請求項3～10のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

**【請求項 12】**

50

前記接着境界が1つのみ存在し、該接着境界の長さが、前記刺激応答性領域の外周の長さに対して0.7倍以上である、請求項1又は2に記載の細胞培養容器。

【請求項13】

前記細胞接着性領域が刺激応答性領域の全外周に接して配置されている、請求項12に記載の細胞培養容器。

【請求項14】

シート形成領域の面積に対する刺激応答性領域の面積の比が、0.6以上である、請求項1～13のいずれか1項に記載の細胞培養容器。

【請求項15】

細胞非接着性を有する細胞非接着性領域が、前記シート形成領域の外側に配置されている、請求項1～14のいずれか1項に記載の細胞培養容器。 10

【請求項16】

前記刺激応答性領域が、刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層から構成され、

前記刺激応答性層が、基材上に形成されている、請求項1～15のいずれか1項に記載の細胞培養容器。 11

【請求項17】

前記刺激応答性ポリマーが、下限臨界溶液温度を有する温度応答性ポリマーを含む、請求項16に記載の細胞培養容器。 12

【請求項18】

前記基材が細胞接着性を有し、前記細胞接着性領域が前記基材の表面から構成されている、請求項16又は17に記載の細胞培養容器。 13

【請求項19】

前記基材が、ガラス又はプラスチックを含む、請求項18に記載の細胞培養容器。 14

【請求項20】

請求項1～19のいずれか1項に記載の細胞培養容器で細胞を培養して細胞シートを形成する工程を含む、細胞シートの製造方法。 15

【請求項21】

請求項18又は19に記載の細胞培養容器を製造する方法であって、

前記細胞接着性を有する基材の上に前記刺激応答性層を形成する工程と、

前記刺激応答性層を部分的に除去して、前記基材を露出する工程と、 16

を含む、細胞培養容器の製造方法。 17

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、細胞培養容器、細胞シートの製造方法、及び細胞培養容器の製造方法に関する。 18

【背景技術】

【0002】

再生医療技術の一つとして、細胞を移植する手法がある。移植のための細胞の形態としては、細胞をシート状に培養して得られる細胞シートが挙げられる。細胞シートは、細胞間結合で細胞同士が連結されたシート状の細胞集合体である。また、細胞シートはシャーレなどの基材上で細胞を培養することにより形成することができる。 40

【0003】

細胞シートを形成する方法として、光や温度などの刺激によって細胞に対する接着度合いが変化する刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層を利用した方法が知られている。刺激応答性ポリマーとしては、例えば、温度応答性ポリマーが挙げられる。この温度応答性ポリマーは、温度を低くすると、そのコンフォメーションが変化する性質を有する。温度応答性ポリマーを利用した細胞シートの形成方法では、細胞をその表面上で培養する培養層として温度応答性ポリマーを含む層が基材上に形成されている容器が用いられる。この温度応答性ポリマーを含む層上で、細胞を細胞培養温度（例えば37）で接着させながら 50

ら培養することにより、細胞シートを形成することができる。そして、細胞を培養して細胞シートを形成した後、温度応答性ポリマーを含む層の温度を下げるに、温度応答性ポリマーのコンフォメーションが変化し、細胞シートがその表面に接着できなくなる。その結果、温度応答性ポリマーを含む層から細胞シートを剥離して回収することができる。

#### 【0004】

刺激応答性ポリマーを利用して細胞シートを形成する方法を開示する文献として、例えば、以下の特許文献が挙げられる。

#### 【0005】

特許文献1では、水に対する上限若しくは下限臨界溶液温度が0～80であるポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上にて、皮膚細胞を上限臨界溶液温度以下又は下限臨界溶液温度以上で培養し、その後上限臨界溶液温度以上又は下限臨界溶液温度以下にすることにより培養皮膚細胞が剥離されることを特徴とする皮膚細胞培養法が開示されている。10

#### 【0006】

特許文献2では、細胞非接着性に変化することが可能である内底面を有する培養容器に、細胞を含有する培養液を加える細胞添加工程と、培養容器に加えられた細胞に内底面方向への遠心力を作用させながら、細胞間接着が形成される条件下で細胞培養を行い、細胞間を接着させて組織を形成する細胞培養工程と、細胞培養工程において得られた組織を前記内底面から剥離し回収する剥離工程とを含む、組織の作製方法が開示されている。

#### 【0007】

特許文献3では、鉄架橋アルギン酸ゲルを含む細胞培養用基質の上で細胞を培養する工程、及び鉄架橋アルギン酸ゲルを含む細胞培養用基質を鉄に特異的に結合するキレート剤を用いて溶解し、培養した細胞を細胞シートとして得る工程、を含む細胞シートの製造方法が開示されている。20

#### 【0008】

また、刺激応答性領域、細胞接着性領域及び細胞非接着性領域の配置を特定した細胞培養用基材が特許文献4及び5に開示されている。

#### 【0009】

特許文献4では、刺激により細胞の接着度合いが変化する刺激応答性領域と、細胞接着性を有する細胞接着性領域と、細胞非接着性を有する細胞非接着性領域と、を有し、前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域の境界部分である接着境界を有し、前記刺激応答性領域の外周の少なくとも一部に、前記刺激応答性領域及び前記細胞非接着性領域の境界部分である非接着境界を有することを特徴とする細胞培養用基材が開示されている。30

#### 【0010】

特許文献5では、刺激により細胞接着性が変化する刺激応答性領域と、細胞易接着性を有する細胞接着性領域と、細胞非接着性を有する細胞非接着性領域と、を有し、前記刺激応答性領域は少なくとも2箇所において前記細胞接着性領域と隣り合い、前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域の境界部分である少なくとも2つの分離された接着境界を有し、前記刺激応答性領域が、前記接着境界間を結ぶように配置され、前記細胞非接着性領域が、前記刺激応答性領域の周囲に配置されていることを特徴とする細胞培養容器が開示されている。40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0011】

【特許文献1】特開平05-192138号公報

【特許文献2】特開2014-23540号公報

【特許文献3】特開2012-65632号公報

【特許文献4】特開2012-105608号公報

【特許文献5】特開2012-105609号公報

#### 【発明の概要】

10

20

30

40

50

**【発明が解決しようとする課題】****【0012】**

特許文献1～3では、各種刺激応答性ポリマーを利用して細胞シートを形成している。しかしながら、これらの方法では、刺激応答性ポリマーに所定の刺激を与えると、完全に細胞シートが培養面から剥離してしまう。細胞シートは脆弱であるため、一旦培養面から剥がれると、破れが生じ易くなり、また、張力のために収縮して形状が変形し易くなる。そのため、細胞シートは、基材から剥離した後、直ぐに別の支持体で保持する必要がある。しかし、この操作が煩雑であり、場合にはこの操作によって細胞シートの破れや変形が生じてしまう場合もある。そのため、刺激応答性ポリマーに刺激を与えた後でも細胞シートを培養面上に安定的に保持することができ、かつ刺激付与後に細胞シートを容易に回収できる細胞培養容器の開発が求められている。

10

**【0013】**

特許文献4及び5では、刺激付与後の細胞シートの形状安定性及び細胞シートの回収容易性の観点からは検討されておらず、上記要求に十分に答えるものではない。

**【0014】**

そこで、本開示は、刺激付与後でも細胞シートを培養面上に安定的に保持することができ、かつ細胞シートを容易に回収できる細胞培養容器を提供することを目的とする。

20

**【課題を解決するための手段】****【0015】**

そこで、本発明の一態様を、以下に示す。

**【0016】**

(1) 刺激により細胞接着度合いが変化する刺激応答性領域と、

前記刺激応答性領域を取り囲むように前記刺激応答性領域に隣接して配置された細胞接着性を有する少なくとも1つの細胞接着性領域と、

を含むシート形成領域を有する細胞培養容器であって、

前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域が隣接している境界部分である少なくとも1つの接着境界が存在し、

前記刺激応答性領域は、前記接着境界のそれぞれに接する連続した領域である、細胞培養容器。

(2) 前記接着境界は、前記刺激応答性領域の外周付近に配置されている、(1)に記載の細胞培養容器。

(3) 前記接着境界が複数存在する、(1)又は(2)に記載の細胞培養容器。

(4) 前記接着境界が少なくとも4つ存在する、(1)～(3)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(5) 前記刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれぞれとを結ぶ2つの直線により形成される角度であって該角度が最大となるように前記2つの点が選択された角度を角度とした場合、前記接着境界の全てに対応する角度の総和が90°以上である、(3)又は(4)に記載の細胞培養容器。

(6) 前記角度の総和が180°以上である、(5)に記載の細胞培養容器。

(7) 前記刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれぞれとを結ぶ2つの直線及び前記一つの接着境界で囲われる領域であって該領域の面積が最大となるように前記2つの点が選択された領域の面積を面積Tとした場合、前記接着境界の全てに対応する面積Tの総和が、前記刺激応答性領域の面積に対して、0.2倍以上である、(3)～(6)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

40

(8) 前記接着境界の総合長さが、前記刺激応答性領域の外周の長さに対して0.2倍以上である、(3)～(7)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(9) 前記シート形成領域は、前記接着境界の総数の前記刺激応答性領域の重心から伸びる直線で、分割後のそれぞれの面積が等しくなるように前記刺激応答性領域を前記接着境界の総数の領域に分割した場合、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに、少なくとも1つの接着境界が接している配置形状を有する、(3)～(8)のいずれか1つに記載の細胞

50

培養容器。

(10) 前記シート形成領域は、前記分割後の刺激応答性領域のそれぞれに、1つの接着境界のみが接している配置形状を有する、(9)に記載の細胞培養容器。

(11) 一つの接着境界のうちの1つの点と該一つの接着境界に隣り合う接着境界のうちの1つの点とを結ぶ直線であって該直線が最短となるように前記1つの点のそれぞれが選択された直線を直線Lとした場合、全ての接着境界に対応する直線Lと全ての接着境界とで囲まれる領域の面積が、シート形成領域の面積に対して0.6倍以上である、(3)～(10)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(12) 前記接着境界が1つのみ存在し、該接着境界の長さが、前記刺激応答性領域の外周の長さに対して0.7倍以上である、(1)又は(2)に記載の細胞培養容器。 10

(13) 前記細胞接着性領域が刺激応答性領域の全外周に接して配置されている、(12)に記載の細胞培養容器。

(14) シート形成領域の面積に対する刺激応答性領域の面積の比が、0.6以上である、(1)～(13)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(15) 細胞非接着性を有する細胞非接着性領域が、前記シート形成領域の外側に配置されている、(1)～(14)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(16) 前記刺激応答性領域が、刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層から構成され、前記刺激応答性層が、基材上に形成されている、(1)～(15)のいずれか1つに記載の細胞培養容器。

(17) 前記刺激応答性ポリマーが、下限臨界溶液温度を有する温度応答性ポリマーを含む、(16)に記載の細胞培養容器。 20

(18) 前記基材が細胞接着性を有し、前記細胞接着性領域が前記基材の表面から構成されている、(16)又は(17)に記載の細胞培養容器。

(19) 前記基材が、ガラス又はプラスチックを含む、(18)に記載の細胞培養容器。

(20) (1)～(19)のいずれか1つに記載の細胞培養容器で細胞を培養して細胞シートを形成する工程を含む、細胞シートの製造方法。

(21) (18)又は(19)に記載の細胞培養容器を製造する方法であって、前記細胞接着性を有する基材の上に前記刺激応答性層を形成する工程と、前記刺激応答性層を部分的に除去して、前記基材を露出する工程と、

を含む、細胞培養容器の製造方法。 30

#### 【発明の効果】

#### 【0017】

本開示によれば、刺激付与後でも細胞シートを培養面上に安定的に保持することができ、かつ細胞シートを容易に回収できる細胞培養容器を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0018】

【図1】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図2】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図3】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図4】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図5】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図6】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図7】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。 40

10

20

30

40

50

【図 8】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 9】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 10】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 11】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 12】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 13】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 14】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 15】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 16】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 17】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 18】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 19】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 20】本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図である。

【図 21】本実施形態の細胞培養容器の構成例を説明するための概略図である。

【図 22】本実施形態の細胞培養容器の構成例を説明するための概略図である。

【図 23】本実施形態の細胞培養容器の構成例を説明するための概略図である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0019】

以下、本発明の実施形態について説明する。

##### 【0020】

本実施形態は、刺激により細胞接着度合いが変化する刺激応答性領域と、前記刺激応答性領域を取り囲むように隣接して配置された細胞接着性を有する少なくとも1つの細胞接着性領域と、を含むシート形成領域を有する細胞培養容器であって、前記刺激応答性領域及び前記細胞接着性領域が隣接している境界部分である少なくとも1つの接着境界が存在し、前記刺激応答性領域は、前記接着境界のそれぞれに接する連続した領域である、細胞培養容器である。

##### 【0021】

本実施形態によれば、刺激応答性領域に刺激を与えた後でも細胞シートを安定的に保持することができ、かつ細胞シートを容易に回収できる細胞培養容器を提供することができる。本実施形態に係る細胞培養容器において、刺激応答性領域に所定の刺激を与えると、刺激応答性領域は細胞非接着性となり、細胞シートが刺激応答性領域から剥がれてくる。この際、細胞シートはシート形成領域から完全に剥がれずに、細胞シートの一部が細胞接着性領域に付着している。これにより、細胞シートを安定的に培養面上に保持することができる。また、細胞シートは部分的に培養面に付着しているため、ピンセットによる剥離作業やピペッティングなどの水流で容易に培養面から剥がして回収することができる。

##### 【0022】

刺激応答性領域は、刺激により細胞接着度合いが変化する領域であり、細胞培養時は細

10

20

30

40

50

胞接着性とさせ、細胞シートの剥離操作時には刺激を付与することにより細胞非接着性とすることができる領域である。刺激応答性領域は、接着境界のそれぞれに連続するように形成される。

【0023】

細胞接着性領域は、細胞接着性を有する領域である。なお、細胞接着性領域は、上記刺激によりその細胞接着性又は細胞非接着性が実質的に変わらない。細胞接着性領域は、刺激応答性領域を取り囲むように刺激応答性領域に隣接して配置されている。

【0024】

接着境界は、刺激応答性領域及び細胞接着性領域が隣接している境界部分である。接着境界は、刺激応答性領域の外周付近に配置されることが好ましい。接着境界は少なくとも1つ存在すればよい。また、本実施形態において、接着境界が少なくとも2つ、すなわち複数存在することが好ましく、少なくとも3つ存在することがより好ましく、少なくとも4つ存在することがさらに好ましい。接着境界が複数存在する場合、複数の接着境界はそれぞれ離れて存在する。

10

【0025】

なお、本明細書において、外周とは、連続する一つの領域におけるその外側の領域との境を規定する外側の外縁のことを言う。また、本明細書において、内周とは、連続する一つの領域におけるその内側の領域、つまりその領域中に囲まれる領域との境を規定する内側の外縁のことを言う。

20

【0026】

シート形成領域は、細胞培養により細胞シートが形成される領域であり、刺激応答性領域及び細胞接着性領域を含む。シート形成領域の外側には、シート非形成部が配置され得る。該シート非形成部は、シート形成領域に形成される細胞シートと繋がる細胞シートが形成されない部分であれば特に制限されるものではない。例えば、シート非形成部としては、細胞非接着性を有する細胞非接着性領域が配置されていてもよい。すなわち、シート形成領域の外周に接するように細胞非接着性領域が配置されていてもよい。また、シート非形成部としては、培養液を保持する培養空間を形成する側壁が配置されていてもよい。すなわち、シート形成領域の外周は、培養空間を形成する側壁と接していてもよい。また、シート非形成部として、例えば段差の存在などにより、シート形成領域の外側に培養空間が存在しており、シート形成領域に形成される細胞シートと繋がる細胞シート自体が形成されない構成を採用することもできる。

30

【0027】

シート形成領域は、細胞培養容器の培養面に少なくとも1つ形成されることができ、培養面に複数のシート形成領域が形成されていてもよい。培養面上に複数のシート形成領域が配置される場合は、各シート形成領域の間には細胞非接着性領域が配置されていることが好ましい。

【0028】

以下、本実施形態の細胞培養容器について、図を参照して説明する。

40

【0029】

なお、以下に記載する「重心」、「角度」又は「面積」は、画像解析ソフトを用いて求めることができる。画像解析ソフトとしては、これらを求めることが可能であるものであれば特に制限されないが、例えば、「ImageJ」などが挙げられる。

【0030】

本発明の一実施形態は、刺激応答性領域を取り囲む細胞接着性領域を有し、刺激応答性領域及び細胞接着性領域が隣接する境界部分である接着境界が1つのみ存在する形態である。この接着境界が1つのみ存在する形態の構成例を図1に示す。図1において、細胞接着性領域が刺激応答性領域の全外周に接して配置されており、接着境界は1つのみ存在している。本実施形態は、細胞接着性領域が刺激応答性領域の全外周に接して配置されているものに限定されるものではなく、例えば、刺激応答性領域の外周の一部分において、細胞接着性領域が接して配置されていなくてもよい。

50

## 【0031】

図1において、符号1は刺激応答性領域を示し、符号2は細胞接着性領域を示す。細胞接着性領域2は、刺激応答性領域1を取り囲むように隣接して配置され、刺激応答性領域1の全外周が細胞接着性領域2に接している。また、符号3は、刺激応答性領域1及び細胞接着性領域2が隣接している境界部分である接着境界を示す。図1において、接着境界は1つ存在している。

## 【0032】

図2において、接着境界は1つ存在しており、刺激応答性領域の外周の一部において、細胞接着性領域が接して配置されていない。この形態の場合、細胞接着性領域が刺激応答性領域の全外周の70%以上に接して配置されていることが好ましい。すなわち、接着境界の長さが、刺激応答性領域の外周の長さに対して0.7倍以上であることが好ましい。また、接着境界の長さが0.8倍以上であることがより好ましく、0.9倍以上であることがさらに好ましい。刺激応答性領域の外周の一部において細胞接着性領域が接していない部分を設けることにより、ピペッティングで起こした水流が細胞シート下へ入り込むため剥離作業が容易になる。

10

## 【0033】

細胞培養により細胞シートが形成されるシート形成領域は、刺激応答性領域1及び細胞接着性領域2を含んで構成される。シート形成領域の形状は、特に制限されるものではなく、例えば、図1(A)はシート形成領域の形状が円形である例を示し、図1(B)はシート形成領域の形状が四角形である例を示している。

20

## 【0034】

図3に示すように、シート形成領域の外側には、細胞非接着性を有する細胞非接着性領域がシート形成領域に隣接するように配置されていてもよい。すなわち、シート形成領域の外周に接するように細胞非接着性領域が配置されていてもよい。また、シート形成領域の外周は、培養液を保持する培養空間を形成する側壁と接していてもよい。また、シート形成領域の外側には、段差などが存在して、培養空間が存在していてもよい。

## 【0035】

また、図4に示すように、細胞接着性領域2に取り囲まれている刺激応答性領域1に加えて、第二の刺激応答性領域(外側刺激応答性領域とも称す)11を細胞接着性領域2の外側に隣接させて配置してもよい。この外側刺激応答性領域11は、例えば、細胞接着性領域2の外周に部分的に接するように配置してもよく、細胞接着性領域2の全外周に接するように配置してもよい。この外側刺激応答性領域11を設けておくことにより、刺激を付与した際に、細胞シートの端部に捲れ上がる部分ができるため、細胞シートを容易に剥離することができる。外側刺激応答性領域11の面積は、シート形成領域の面積に対して0.1%以上30%以下であることが好ましい。また、図5に示すように、刺激応答性領域1を取り囲むように隣接して配置された細胞接着性領域2に加えて、第二の細胞接着性領域(外側細胞接着性領域とも称す)12を、外側刺激応答性領域11の外側に隣接させて配置してもよい。この外側細胞接着性領域12は、例えば、外側刺激応答性領域11の外周に部分的に接するように配置してもよく、外側刺激応答性領域11の全外周に接するように配置してもよい。この外側細胞接着性領域12を設けておくことにより、刺激を付与した際に、細胞シートの端部を強く培養面上に付着させることができる。外側細胞接着性領域12の面積は、シート形成領域の面積に対して10%以下であることが好ましい。外側刺激応答性領域11及び外側細胞接着性領域12は細胞接着性領域2の外側に繰り返し設けられていてもよい。

30

## 【0036】

また、刺激応答性領域1及び細胞接着性領域2の形状は、特に制限されるものではなく、本実施形態では、細胞接着性領域2が刺激応答性領域1の外周に接して配置されればよい。図1(A)では刺激応答性領域1の形状が円形である例が示され、図1(B)では刺激応答性領域1の形状が四角形である例が示されているが、例えば、図6に示すような非定形であり得る。

40

50

**【 0 0 3 7 】**

また、刺激応答性領域 1 を取り囲むように隣接して配置された細胞接着性領域 2 以外にも、刺激応答性領域内に、さらなる細胞接着性領域が配置されていてもよい。さらなる細胞接着性領域を設けることにより、必要に応じて細胞シートの接着性を向上することができる。また、刺激応答性領域内に、細胞非接着性領域が配置されていてもよい。この際、これらの細胞接着性領域及び細胞非接着性領域は、本発明の効果を妨げない範囲で配置され得る。

**【 0 0 3 8 】**

本発明の一実施形態は、刺激応答性領域を取り囲む細胞接着性領域を有し、刺激応答性領域及び細胞接着性領域が隣接する境界部分である接着境界が少なくとも 2 つ存在する形態である。また、接着境界が少なくとも 3 つ存在することが好ましく、少なくとも 4 つ存在することがより好ましい。接着境界が複数存在することにより、刺激付与後の細胞シートの安定性及びシート形成領域との接着力とのバランスを取り易くなる。この接着境界が少なくとも 2 つ存在する実施形態のシート形成領域の構成例を図 7 ~ 1 0 に示す。

10

**【 0 0 3 9 】**

図 7 は、本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図であり、接着境界が 2 つ存在する形態を示す。図 7 において、符号 1 は刺激応答性領域を示し、符号 2 a、2 b は細胞接着性領域を示す。細胞接着性領域 2 a、2 b は、刺激応答性領域 1 を取り囲むように隣接して配置されている。図 7 の形態では、刺激応答性領域 1 の外周が部分的に細胞接着性領域に接している。また、符号 3 a、3 b は、刺激応答性領域 1 及び細胞接着性領域 2 a、2 b が隣接している境界部分である接着境界を示す。図 7 の形態では、接着境界は 2 つ存在しており、2 つの個別の細胞接着性領域に、それぞれ 1 つの接着境界が形成されている。

20

**【 0 0 4 0 】**

図 8 は、本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図であり、接着境界が 3 つ存在する形態を示す。図 8 において、符号 1 は刺激応答性領域を示し、符号 2 a、2 b、2 c は細胞接着性領域を示す。細胞接着性領域 2 a、2 b、2 c は、刺激応答性領域 1 を取り囲むように隣接して配置されている。図 8 の形態では、刺激応答性領域 1 の外周が部分的に細胞接着性領域に接している。また、符号 3 a、3 b、3 c は、刺激応答性領域 1 及び細胞接着性領域 2 a、2 b、2 c が隣接している境界部分である接着境界を示す。図 8 の形態では、接着境界は 3 つ存在しており、3 つの個別の細胞接着性領域に、それぞれ 1 つの接着境界が形成されている。

30

**【 0 0 4 1 】**

図 9 は、本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図であり、接着境界が 4 つ存在する形態を示す。図 9 において、符号 1 は刺激応答性領域を示し、符号 2 a、2 b、2 c、2 d は細胞接着性領域を示す。細胞接着性領域 2 a、2 b、2 c、2 d は、刺激応答性領域 1 を取り囲むように隣接して配置されている。図 9 の形態では、刺激応答性領域 1 の外周が部分的に細胞接着性領域に接している。また、符号 3 a、3 b、3 c、3 d は、刺激応答性領域 1 及び細胞接着性領域 2 a、2 b、2 c、2 d が隣接している境界部分である接着境界を示す。図 9 の形態では、接着境界は 4 つ存在しており、4 つの個別の細胞接着性領域に、それぞれ 1 つの接着境界が形成されている。

40

**【 0 0 4 2 】**

図 1 0 は、本実施形態の細胞培養容器が有するシート形成領域の構成例を説明するための概略平面図であり、接着境界が 8 つ存在する形態を示す。図 1 0 において、符号 1 は刺激応答性領域を示し、符号 2 a、2 b、2 c、2 d、2 e、2 f、2 g、2 h は細胞接着性領域を示す。細胞接着性領域 2 a、2 b、2 c、2 d、2 e、2 f、2 g、2 h は、刺激応答性領域 1 を取り囲むように隣接して配置されている。図 1 0 の形態では、刺激応答性領域 1 の外周が部分的に細胞接着性領域に接している。また、符号 3 a、3 b、3 c、3 d、3 e、3 f、3 g、3 h は、刺激応答性領域 1 及び細胞接着性領域 2 a、2 b、2

50

c、2d、2e、2f、2g、2hが隣接している境界部分である接着境界を示す。図10の形態では、接着境界は8つ存在しており、8つの個別の細胞接着性領域に、それぞれ1つの接着境界が形成されている。

#### 【0043】

複数の細胞接着性領域は、刺激応答性領域を取り囲むように隣接して配置されている。また、複数の細胞接着性領域は、刺激応答性領域の外周付近に配置されている。細胞接着性領域が刺激応答性領域の外周付近に配置されることにより、刺激付与後に細胞シートをより安定的に培養面上に保持することができる。

#### 【0044】

図7～10に示す形態では、複数の細胞接着性領域2は、刺激応答性領域1の外周の一部に接して配置されている。換言すると、複数の細胞接着性領域2は、刺激応答性領域1の外側に刺激応答性領域1に隣接するように配置されている。なお、本実施形態は、このような細胞接着性領域が刺激応答性領域の外周の一部に接して配置されている形態に限定されるものではなく、図11に示すように、少なくとも1つの細胞接着性領域は、刺激応答性領域の内側であってかつ刺激応答性領域の外周付近に配置されていてもよい。また、図7～10には、隣接する細胞接着性領域の間の間隔がそれぞれ等しい形態が記載されているが、本実施形態は特にこのような形態に限定されるものではなく、隣接する細胞接着性領域の間の間隔が異なっていてもよい。

10

#### 【0045】

本実施形態において、刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれぞれとを結ぶ2つの直線により形成される角度であって該角度が最大となるように前記2つの点が選択された角度を角度とした場合、接着境界の全てに対応する角度の総和が90°以上であることが好ましい。この形態について、図12及び13を用いて説明する。図12は、図9及び図10に記載のシート形成領域について、角度を示した図である。また、図13は、角度の概念を説明するための図である。接着境界から選択される2つの点は、角度が最大となるように選択される。図13(A)に示すように、細胞接着性領域が刺激応答性領域の重心から遠くなるにつれて広がっている場合は、通常、上記2つの点は接着境界の端部になり得る。一方、図13(B)に示すように、細胞接着性領域が刺激応答性領域の重心から遠くなるにつれて狭くなっている場合は、上記2つの点は接着境界の端部以外の箇所となり得る。本実施形態では、接着境界の全てに対応する角度の総和が90°以上であることが好ましく、120°以上であることがより好ましく、150°以上であることがさらに好ましく、180°以上であることが特に好ましい。角度

の総和が大きくなる程、接着境界の長さが長くなり、刺激付与後でも細胞シートを培養面により安定的に保持することができる。また、接着境界の全てに対応する角度の総和が270°以下であることが好ましく、240°以下であることがより好ましく、210°以下であることがさらに好ましい。角度の総和が小さくなる程、接着境界の長さが短くなり、刺激付与後に細胞シートを培養面から剥離し易くすることができる。なお、角度が最大となる2つの点が複数組以上ある場合は、後述の面積Tが最大となるような2つの点を優先して選択する。

20

30

#### 【0046】

なお、刺激応答性領域の重心は、刺激応答性領域の一次モーメントの和が0となる位置であり、単純な図形であれば計算で求めることができる。また、複雑な図形であっても、画像解析ソフトを使うことにより容易に算出可能である。

40

#### 【0047】

なお、接着境界を観察する方法は、特に制限されるものではないが、例えば、以下の方法によることができる。例えば、i) 細胞シートに染色成分を加えることで細胞接着性領域を着色して観察する方法や、ii) 細胞が接着した後刺激を与え、刺激応答性領域に接着した細胞のみを剥離させて、刺激によって剥離した細胞を取り除いた後、細胞が接着している領域を観察する方法が挙げられる。

#### 【0048】

50

なお、角度<sub>1</sub>は、例えば、上述の方法で特定した2つの点にマーカーで印をつけ、重心から印まで直線を引き、角度<sub>1</sub>を可視化し、その後、画像解析ソフトを用いて測定することができる。

#### 【0049】

本実施形態において、刺激応答性領域の重心と一つの接着境界のうちの2つの点のそれとを結ぶ2つの直線及び一つの接着境界で囲われる領域であって該領域の面積が最大となるように前記2つの点が選択された領域の面積を面積Tとした場合、接着境界の全てに対応する面積Tの総和が、刺激応答性領域の面積に対して、0.2倍以上であることが好ましい。この形態について、図14を用いて説明する。図14は、図9及び図10に記載のシート形成領域について、面積Tを示した図である。接着境界から選択される2つの点は、面積Tが最大となるように選択される。本実施形態では、接着境界の全てに対応する面積Tの総和が、刺激応答性領域の面積に対して、0.2倍以上であることが好ましく、0.3倍以上であることがより好ましく、0.4倍以上であることがさらに好ましく、0.5倍以上であることが特に好ましい。面積Tの総和が大きくなる程、刺激付与後でも細胞シートを培養面上により安定的に保持することができる。また、接着境界の全てに対応する面積Tの総和が、刺激応答性領域の面積に対して、0.9倍以下であることが好ましく、0.8倍以下であることがより好ましく、0.7倍以下であることがさらに好ましい。面積Tの総和が小さくなる程、刺激付与後に細胞シートを細胞接着性領域から培養面から剥離し易くすることができる。本実施形態において、刺激応答性領域内に含まれかつ刺激応答性領域の外周付近に配置される細胞接着性領域が存在する場合、上記2つの点の間には、刺激応答性領域の重心に対して内側に位置する接着境界と、刺激応答性領域の重心に対して外側に位置する接着境界が形成される。図15において、刺激応答性領域の重心に対して内側に位置する接着境界3'及び刺激応答性領域の重心に対して外側に位置する接着境界3''を太線で示す。このような場合、面積Tを構成する上記領域の形成には、刺激応答性領域の重心に対して内側に位置する接着境界3'が用いられる。

10

20

30

40

#### 【0050】

なお、面積Tも、例えば、画像解析ソフト等を用いて測定することができる。

#### 【0051】

本実施形態において、接着境界の総合長さが、刺激応答性領域の外周の長さに対して0.2倍以上であることが好ましい。この形態について、図16を用いて説明する。図16は、図9に記載のシート形成領域について、刺激応答性領域の外周及び接着境界を示したものである。図16において、接着境界3a、3b、3c、3dは太線で示され、刺激応答性領域の外周のうち接着境界以外の部分は矢印で示されている。図16において、刺激応答性領域の外周の長さは、太線で示された接着境界の総合長さと、矢印で示された、刺激応答性領域の外周のうち接着境界以外の部分の総合長さとの和である。図16において、接着境界の総合長さは、複数の接着境界3a、3b、3c、3dの長さの和である。本実施形態では、接着境界の総合長さが、刺激応答性領域の外周の長さに対して0.2倍以上であることが好ましく、0.3倍以上であることがより好ましく、0.4倍以上であることがさらに好ましい。接着境界の総合長さが大きくなる程、刺激付与後でも細胞シートを培養面上により安定的に保持することができる。また、接着境界の総合長さが、刺激応答性領域の外周の長さに対して0.9倍以下であることが好ましく、0.8倍以下であることがより好ましく、0.7倍以下であることがさらに好ましい。接着境界の総合長さが小さくなる程、刺激付与後に細胞シートを培養面から剥離し易くすることができる。

#### 【0052】

なお、接着境界の総合長さも、たとえば、画像解析ソフトを用いて測定することができる。同様に、刺激応答性領域の外周の長さも、画像解析ソフトを用いて測定することができる。

#### 【0053】

本実施形態において、シート形成領域は、接着境界の総数の刺激応答性領域の重心から伸びる直線で、分割後のそれぞれの面積が等しくなるように刺激応答性領域を接着境界の

50

総数の領域に分割した場合、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに、少なくとも1つの接着境界が接している配置形状を有することが好ましい。図17に、図9及び図10に記載のシート形成領域について、分割後のそれぞれの面積が等しくなるように刺激応答性領域を接着境界の総数の領域に分割した状態を示す。なお、接着境界の総数の刺激応答性領域の重心から伸びる直線で、分割後のそれぞれの面積が等しくなるように刺激応答性領域を接着境界の総数の領域に分割する方法・形態は、複数（又は無数）存在し得るが、本実施形態では、いずれかの均等分割形態において、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに少なくとも1つの接着境界が接している配置形状が得られればよい。また、いずれの均等分割形態においても、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに少なくとも1つの接着境界が接している配置形状を有することが好ましい。また、図17に示すように、いずれかの均等分割形態において、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに1つの接着境界のみが接している配置形状を有することが好ましい。図17（A）及び（B）では、分割後の刺激応答性領域のそれぞれに1つの接着境界が接している。

#### 【0054】

本実施形態において、一つの接着境界のうちの1つの点と該一つの接着境界に隣り合う接着境界のうちの1つの点とを結ぶ直線であって該直線が最短となるように前記1つの点のそれぞれが選択された直線を直線Lとした場合、全ての接着境界に対応する直線Lと全ての接着境界とで囲まれる領域の面積（以下、面積Sと称す）が、シート形成領域の面積に対して0.6倍以上であることが好ましい。この形態について、図18を用いて説明する。図18は、図10に記載のシート形成領域について、直線Lの概念を示したものである。図18において、例えば一つの細胞接着性領域2aに一つの接着境界3aが存在する。この接着境界に隣り合う接着境界とは、刺激応答性領域の外周に沿った方向で隣りに配置されている接着境界のことであり、外周に沿った方向は一方の方向とその方向とは反対の方向との両方向が考えられる。図18（A）では、接着境界3aに隣り合う接着境界とは、接着境界3b及び接着境界3dのことであり、図18（B）では、接着境界3aに隣り合う接着境界とは、接着境界3b及び接着境界3hのことである。図18（A）において、接着境界3aと接着境界3bを結ぶ最短の直線は符号L1で示される直線であり、接着境界3aと接着境界3dを結ぶ最短の直線は符号L4で示される直線である。図18（B）において、接着境界3aと接着境界3bを結ぶ最短の直線は符号L1で示される直線であり、接着境界3aと接着境界3hを結ぶ最短の直線は符号L8で示される直線である。全ての接着境界に対応する直線Lは、符号L1～L8で示される直線である。図18において、全ての接着境界に対応する直線Lと全ての接着境界とで囲まれる領域とは、直線L1～L8及び接着境界3a～3hで囲まれる領域のことである。本実施形態では、この全ての接着境界に対応する直線Lと全ての接着境界とで囲まれる領域の面積Sが、シート形成領域の面積に対して、0.6倍以上であることが好ましく、0.7倍以上であることがより好ましく、0.8倍以上であることがさらに好ましく、0.9倍以上であることが特に好ましい。シート形成領域の面積に対する面積Sが大きくなる程、刺激付与後でも細胞シートを培養面上により安定的に保持することができる。面積Sの上限値は、特に制限されるものではないが、例えば、1倍以下である。また、面積Sは、刺激応答性領域の面積に対して、0.8倍以上であることが好ましく、0.9倍以上であることがより好ましい。本実施形態において、刺激応答性領域内に含まれかつ刺激応答性領域の外周付近に配置される細胞接着性領域が存在する場合、隣り合う2つの直線Lの間には、刺激応答性層領域（又はシート形成領域）の重心に対して内側に位置する接着境界と、刺激応答性層領域（又はシート形成領域）の重心に対して外側に位置する接着境界が形成される。図19において、刺激応答性層領域（又はシート形成領域）の重心に対して内側に位置する接着境界3'及び刺激応答性層領域（又はシート形成領域）の重心に対して外側に位置する接着境界3''を太線で示す。このような場合、上記領域の形成には、刺激応答性層領域（又はシート形成領域）の重心に対して内側に位置する接着境界3'が用いられる。また、本実施形態において、隣り合う2つの接着境界の間に最短となる直線が複数存在する場合は、面積Sが最も小さくなる直線が上記領域の形成に選択される。

## 【0055】

面積Sも、例えば、画像解析ソフトを用いて測定することができる。

## 【0056】

本実施形態において、細胞非接着性領域がシート形成領域の外側に配置されてもよい。すなわち、細胞非接着性領域がシート形成領域の外周に接して配置されてもよい。具体的には、細胞非接着性領域が、細胞接着性領域及び／又は刺激応答性領域の外周に接して配置されてもよい。また、例えば図20(A)に示すように、本実施形態では、細胞非接着性領域は、細胞接着性領域及び刺激応答性領域の外周に接して配置され得る。図20(A)において、細胞接着性領域の外周のうち接着境界以外の部分及び刺激応答性領域の外周のうち接着境界以外の部分に接して細胞非接着性領域4が配置されている。また、例えば図20(B)に示すように、細胞非接着性領域は、刺激応答性領域の外周に接して配置され得る。また、細胞非接着性領域は、細胞接着性領域の外周に接して配置され得る。また、シート形成領域の外側には、培養液を保持する培養空間を形成する側壁が配置されてもよい。すなわち、シート形成領域の外周は、培養液を保持する培養空間を形成する側壁と接していくてもよい。また、シート形成領域の外側には、段差などが存在して、培養空間が存在していてもよい。

10

## 【0057】

本実施形態において、刺激応答性領域は、例えば、刺激応答性を有する表面を有する刺激応答性層により形成することができ、細胞接着性領域は、細胞接着性を有する表面を有する細胞接着性層により形成することができ、細胞非接着性領域は、細胞非接着性を有する細胞非接着性層により形成されることがある。

20

## 【0058】

本実施形態において、シート形成領域の外側には、シート非形成部が配置され得る。

図21に、シート形成領域が培養液を保持する培養空間を形成する側壁と接している形態について、細胞培養容器の構成例を説明するための図を示す。図21(A)は、図9に示すシート形成領域を有する細胞培養容器の上面概略図である。刺激応答性領域は刺激応答性層101から形成され、細胞接着性領域は細胞接着性層102から形成されている。図21(B)～(E)は、図21(A)のAA'線による垂直断面における細胞培養容器の構成例を示す概略断面図である。なお、図21(A)において、図21(B)～(E)にて示されている基材105は省略されている。図21(B)において、基材105の上に、刺激応答性層101及び細胞接着性層102がそれぞれ配置されている。刺激応答性層101及び細胞接着性層102は同一平面上に配置されている。図21(C)において、基材105の上に細胞接着性層102が配置されており、該細胞接着性層102の上に刺激応答性層101が配置されている。刺激応答性層101の周囲に露出する細胞接着性層102の表面が細胞接着性領域を形成している。図21(D)において、細胞接着性表面を有する基材105の上に刺激応答性層101が配置されており、刺激応答性層101の周囲に露出する細胞接着性を有する基材105の表面が細胞接着性領域を形成している。図21(C)及び(D)において、刺激応答性領域及び細胞接着性領域の高さは、それらの間に連続する細胞シートが形成される程度の高さである。図21(E)において、基材105の上に刺激応答性層101が配置されており、該刺激応答性層101の上に細胞接着性層102が配置されている。細胞接着性層102は刺激応答性層101の外周端部に沿って配置されている。

30

また、図22に、シート形成領域の外側に細胞非接着性領域が形成されている形態について、細胞培養容器の構成例を説明するための図を示す。図22(A)は、図20(A)に示すシート形成領域と該シート形成領域の外側に配置された細胞非接着性領域を有する細胞培養容器の上面概略図である。刺激応答性領域は刺激応答性層101から形成され、細胞接着性領域は細胞接着性層102から形成され、細胞非接着性領域は細胞非接着性層104から形成されている。図22(B)～(D)は、図22(A)のBB'線による垂直断面における細胞培養容器の構成例を示す概略断面図である。なお、図22(A)において、図22(B)～(D)にて示されている基材105は省略されている。図22(B)

40

50

)において、基材 105 の上に、刺激応答性層 101、細胞接着性層 102 及び細胞非接着性領域 104 がそれぞれ配置されている。刺激応答性層 101、細胞接着性層 102 及び細胞非接着性領域 104 は同一平面上に配置されている。図 22 (C)において、細胞非接着性表面を有する基材 105 の上に細胞接着性層 102 が配置されており、該細胞接着性層 102 の上に刺激応答性層 101 が配置されている。細胞接着性層 102 の周囲に露出する細胞非接着性を有する基材 105 の表面が細胞非接着性領域を形成しており、刺激応答性層 101 の周囲に露出する細胞接着性層 102 の表面が細胞接着性領域を形成している。図 22 (D)において、細胞非接着性表面を有する基材 105 の上に刺激応答性層 101 が配置されており、該刺激応答性層 101 の上に細胞接着性層 102 が配置されている。細胞接着性層 102 は刺激応答性層 101 の外周端部に沿って配置されている。細胞接着性層 102 の周囲に露出する細胞非接着性を有する基材 105 の表面が細胞非接着性領域を形成している。本実施形態において、さらに、必要に応じて、露出表面を有さない他の層や、他の領域となる露出表面を有する他の層が配置されていてもよい。

また、図 23 に、シート形成領域の外側に培養空間が存在している形態について、細胞培養容器の構成例を説明するための図を示す。図 23 (A) は、図 9 に示すシート形成領域を有する細胞培養容器の上面概略図である。図 23 (B) は、図 23 (A) の AA' 線による垂直断面における細胞培養容器の構成例を示す概略断面図である。図 23 (B)において、基材 105' の上に刺激応答性層 101 及び細胞接着性層 102 がそれぞれ配置されており、該基板 105' が細胞容器の底面上に配置されている。細胞接着性層 102 の外側は培養空間が存在している。

#### 【0059】

##### [ 刺激応答性領域 ]

刺激応答性領域は、刺激により細胞接着度合いが変化する領域であり、細胞培養時は細胞接着性とさせ、細胞シートの剥離操作時には刺激を付与することにより細胞非接着性とすることができます。刺激応答性領域は、例えば、刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層により形成することができる。刺激応答性領域は、刺激応答性層の表面である。刺激応答性領域に細胞を播種すると、細胞接着性を発現している際には細胞が刺激応答性領域に接着するが、細胞非接着性を発現している際には細胞が刺激応答性領域に接着することを阻害されるため、刺激応答性領域に接着していた細胞シートを剥離することができる。刺激の種類としては、特に制限されるものではないが、例えば、温度、pH、イオン、光、電位又は磁場などが挙げられる。

#### 【0060】

刺激応答性ポリマーは、所定の刺激によって細胞に対する接着度合いが変化する材料である。刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層は、所定の刺激によって細胞の接着度合いを変化させることにより、細胞接着性から細胞非接着性へとその性質を変化させることができ可能な表面を有する。刺激応答性ポリマーとしては、例えば、温度応答性ポリマー、pH 応答性ポリマー、イオン応答性ポリマー、光応答性ポリマーなどを挙げることができる。なかでも温度応答性ポリマーが、刺激の付与が容易である観点から好ましく用いられる。

#### 【0061】

温度応答性ポリマーとしては、例えば、細胞を培養する温度では細胞接着性を示し、形成した細胞シートを剥離する時の温度では細胞非接着性を示すものを用いることができる。例えば、温度応答性ポリマーは、下限臨界溶液温度未満の温度では周囲の水に対する親和性が向上し、ポリマーが水を取り込んで膨潤して表面に細胞を接着し難くする性質（細胞非接着性）を示し、下限臨界溶液温度以上の温度ではポリマーから水が脱離することでポリマーが収縮して表面に細胞を接着しやすくする性質（細胞接着性）を示すものが好ましく用いられる。下限臨界溶液温度 (T) が 0 以上 80 以下、好ましくは 0 以上 50 以下、より好ましくは 37 以下である温度応答性ポリマーを用いることが好ましい。

#### 【0062】

好適な温度応答性ポリマーとしては、例えば、アクリル系ポリマー又はメタクリル系ポ

10

20

30

40

50

リマーが挙げられ、より具体的にはポリ-N-イソプロピルアクリラミド(  $T = 32$  )、ポリ-N-n-プロピルアクリラミド(  $T = 21$  )、ポリ-N-n-プロピルメタクリラミド(  $T = 32$  )、ポリ-N-エトキシエチルアクリラミド(  $T = \text{約} 35$  )、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルアクリラミド(  $T = \text{約} 28$  )、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルメタクリラミド(  $T = \text{約} 35$  )、ポリ-N,N-ジエチルアクリラミド(  $T = 32$  )などが挙げられる。また、これらのポリマーを形成するためのモノマーが2種以上組み合わされて重合された共重合体であってもよい。

## 【0063】

これらのポリマーを形成するためのモノマーとしては、放射線照射によって重合し得るモノマーを用いることができる。モノマーとしては、例えば、(メタ)アクリラミド化合物、N-(若しくはN,N-ジ)アルキル置換(メタ)アクリラミド誘導体、環状基を有する(メタ)アクリラミド誘導体、ビニルエーテル誘導体などが挙げられる。モノマーは、1種を単独で使用してもよく、又は2種以上を組み合わせて使用してよい。モノマーを一種類単独で使用した場合、基材上に形成されるポリマーはホモポリマーとなり、モノマーを複数種組み合わせて使用した場合、基材上に形成されるポリマーはヘテロポリマーとなる。どちらの形態も本発明に包含される。

10

## 【0064】

また、増殖細胞の種類によって、 $T$ を調節する必要がある場合には、上記以外の他のモノマーを更に加えて共重合してよい。

20

## 【0065】

pH応答性ポリマー又はイオン応答性ポリマーは形成しようとする細胞シートに適したものを選択することができる。

## 【0066】

細胞接着性とは細胞が接着し易い性質をいう。細胞接着性は、表面の化学的性質や物理的性質などによって細胞の接着や伸展が起こりやすいか否かで決定される。刺激応答性層の細胞接着性を判断する指標として、実際に細胞培養した際の細胞接着伸展率を用いることができる。細胞接着性の表面は、細胞接着伸展率が60%以上の表面であることが好ましく、細胞接着伸展率が80%以上の表面であることがより好ましい。細胞接着伸展率が高いと、効率的に細胞を培養することができる。細胞接着伸展率は、播種密度が4000 cells/cm<sup>2</sup>以上30000 cells/cm<sup>2</sup>未満の範囲内で培養しようとする対象細胞を測定対象表面に播種し、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベーター内に保管し、14.5時間培養した時点で接着伸展している細胞の割合( { ( 接着している細胞数 ) / ( 播種した細胞数 ) } × 100 (%) )と定義することができる。細胞の播種は、10% FBS入りDME培地に懸濁させて測定対象物上に播種し、その後、細胞ができるだけ均一に分布するよう、細胞が播種された測定対象物をゆっくりと振とうすることにより行う。さらに、細胞接着伸展率の測定は、測定直前に培地交換を行って接着していない細胞を除去した後に行う。細胞接着伸展率の測定では、細胞の存在密度が特異的になりやすい箇所(例えば、存在密度が高くなりやすい所定領域の中央、存在密度が低くなりやすい所定領域の周縁)を除いた箇所を測定箇所とする。

30

## 【0067】

一方、細胞非接着性とは、細胞が接着し難い性質をいう。細胞非接着性は、表面の化学的性質や物理的性質などによって細胞の接着や伸展が起こりにくいか否かで決定される。細胞非接着性領域の上記細胞接着伸展率は、60%未満であることが好ましく、40%未満であることがより好ましく、5%以下であることが更に好ましく、2%以下であることが特に好ましい。

40

## 【0068】

刺激応答性ポリマーは、1種を単独で用いてもよく、複数種を混合して用いてよい。

## 【0069】

刺激応答性層は、上記刺激応答性ポリマーを主成分として含む。刺激応答性層における刺激応答性ポリマーの含有量は、刺激応答性層の総固形分中、50質量%以上であること

50

が好ましく、70質量%以上であることがより好ましく、90質量%以上であることがさらに好ましく、95質量%以上であることが特に好ましく、100質量%であることがより特に好ましい。刺激応答性層は、上記刺激応答性ポリマーの他に、添加剤などを含んでもよい。添加剤としては、例えば、他の高分子、可塑剤などが挙げられる。

#### 【0070】

刺激応答性層の厚さは、特に制限されるものではなく、適宜選択することができる。刺激応答性層の厚さは、例えば1nm以上であり、好ましくは5nm以上であり、より好ましくは10nm以上である。また、刺激応答性層の厚さは、例えば200nm以下であり、好ましくは100nm以下である。

#### 【0071】

刺激応答性層は、基材の上に形成されることが好ましい。

#### 【0072】

基材表面に刺激応答性層を形成する方法としては、特に制限されるものではないが、例えば、浸漬法、スプレー法、スピンドルコート法等により基材表面にポリマー液を配置した後、溶媒を除去（乾燥）する方法が挙げられる。ポリマー液は、均一性の観点から、バーコータを用いて塗布することが好ましい。また、刺激応答性層を形成する方法としては、ポリマーを形成するためのモノマーを基材表面に塗布し、電子線照射、紫外線照射、プラズマ照射又は重合開始剤反応などによってモノマーを重合させることも好ましい。また必要に応じて、刺激応答性層を形成する前の基材表面の前処理として、コロナ処理、プラズマ処理、オゾン処理、シランカップリング剤処理などの化学処理を行ってもよい。この処理により、基材表面に刺激応答性層をより安定的に固定化することができる。

#### 【0073】

基材の材料は、特に制限されるものではなく、例えば、ガラス又はプラスチックを用いることができる。プラスチックとしては、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、環状ポリオレフィン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シリコーン樹脂、又はアクリル樹脂が挙げられる。アクリル樹脂としては、汎用性の観点から、ポリメチルメタクリレート（PMMA）が好ましい。

#### 【0074】

基材は、細胞培養容器の外壁を構成する材料として用いられてもよい。細胞培養容器の形状は、特に制限されるものではなく、所望の細胞シートの形状を考慮して適宜選択することができる。細胞培養容器の形状は、例えば、シャーレ、フラスコ、ビーカー、ウェルプレートなどの形状であり得る。基材は、例えば、細胞培養容器の外壁の側壁及び底壁を構成していてもよい。また、細胞培養容器は、適切な大きさの蓋を有することができる。細胞培養容器は、該蓋で閉じられた際に、液密になることが好ましい。

#### 【0075】

刺激応答性領域の形状としては、接着境界のそれぞれに接する連続した形状であれば、特に制限されるものではない。例えば、図1などに示すような略円形のものや略四角形などの略多角形のものが挙げられ、非線対称又は非点対称などの非対称形状のものも含まれる（例えば図6）。また、シート形成領域の面積に対する刺激応答性領域の面積の比は、例えば、0.6以上であり、より好ましくは0.8以上であり、さらに好ましくは0.9以上である。

#### 【0076】

刺激応答性領域の形状が略多角形である場合、細胞接着性領域は、多角形状の頂点付近に配置されていることが好ましい。刺激応答性領域の多角形の頂点付近に細胞接着性領域が存在することにより、刺激付与後でも細胞シートを培養面上により安定的に保持することができる。

#### 【0077】

接着境界とは、刺激応答性領域及び細胞接着性領域の境界である。接着境界は、刺激応答性領域及び細胞接着性領域上に細胞同士が結合している連続した細胞シートを形成でき、刺激応答性領域に刺激を与えた後に刺激応答性領域及び細胞接着性領域上で連続した細

10

20

30

40

50

胞シートを維持できるものであれば特に制限されるものではない。すなわち、接着境界は、刺激応答性領域と細胞接着性領域とが平面視上接している箇所を示すものだけではなく、刺激応答性領域及び細胞接着性領域の間に、刺激応答性領域及び細胞接着性領域上で培養される細胞同士が接着することができる幅で配置された細胞非接着性領域などの他の領域が存在するものであっても良い。

#### 【0078】

接着境界としては、平面視上、刺激応答性領域の外周に位置するものに限られず、図1 1に例示するように、平面視上、刺激応答性領域の内側に位置するものも挙げられる。細胞接着性領域は、刺激応答性領域と隣接して配置されるが、隣接するとは、上述のように、刺激応答性領域の内側に配置される概念を含む。

10

#### 【0079】

接着境界の数は、少なくとも1つであれば特に制限されるものではなく、用途に応じて適宜設定することができる。本実施形態において、接着境界の数は、少なくとも2つであることが好ましく、少なくとも3つであることが好ましく、少なくとも4つであることが好ましい。複数の接着境界は、それぞれ離れて存在する。

#### 【0080】

一つの連続する細胞接着性領域に1つの接着境界が形成されてもよく、一つの連続する細胞接着性領域に複数の接着境界が形成されてもよい。本実施形態において、接着境界は、一つの連続する細胞接着性領域に1つの接着境界を形成するものであることが好ましい。

20

#### 【0081】

刺激応答性領域及び／又は細胞接着性領域は、細胞非接着性領域により囲まれていることが好ましい。すなわち、細胞非接着性領域が、刺激応答性領域及び／又は細胞接着性領域の外側に配置されていることが好ましい。また、細胞非接着性領域は、刺激応答性領域及び細胞接着性領域の両方の周囲に配置されていることが好ましい。

#### 【0082】

また、細胞非接着性領域が刺激応答性領域の周囲に配置されていることは、刺激応答性領域の外周に非接着境界を有することを意味する。非接着境界においては、刺激を付与した際、該非接着境界に沿って細胞シートが培地中に浮遊することが好ましい。このような非接着境界は、通常、平面視上、上記細胞非接着性領域と接しているが、例えば、刺激応答性領域及び細胞非接着性領域の間に、刺激応答性領域に刺激を与えた際に、非接着境界に沿って細胞シートを培地中に浮遊させることができる程度の幅で形成された細胞接着性領域などの他の領域が存在する箇所も含むものである。刺激応答性領域の細胞非接着性領域との位置関係としては、刺激応答性領域の外周の一部が細胞非接着性領域に接していることが好ましい。刺激応答性領域が細胞非接着性領域に接して配置されていれば、その非接着境界からピッティングなどで水流を与え易くなり、細胞シートを剥がし易い。

30

#### 【0083】

##### [細胞接着性領域]

細胞接着性領域は、細胞接着性を有する表面であり、細胞接着性領域は、細胞接着性を有する表面を有する層（細胞接着性層）から形成され得る。

40

#### 【0084】

細胞接着性領域は、1つの領域から形成されてもよく、また、2つの別々の領域から形成されてもよい。

#### 【0085】

本実施形態における細胞接着性領域の数、形状、配置としては、図1～6に示すように細胞接着性領域が一つの連続した領域で構成されていてもよく、図7～11に示すように、複数の分かれた領域から構成されていてもよい。

#### 【0086】

細胞接着性領域の形状としては、刺激応答性領域に刺激を与えた後に細胞シートを安定的に保持できるものであれば特に制限されるものではない。また、細胞接着性領域の1つ

50

当たりの面積としても、刺激応答性領域に刺激を与えた後に細胞シートを安定的に保持できるものであれば特に制限されるものではない。また、シート形成領域の面積に対する細胞接着性領域の総面積の比は、例えば、0.4以下であり、好ましくは0.2以下であり、より好ましくは0.1以下である。また、シート形成領域の面積に対する細胞接着性領域の総面積の比は、好ましくは0.01以上であり、より好ましくは0.05以上である。

#### 【0087】

本実施形態において、細胞接着性領域の任意の点を通るように刺激応答性領域の重心から線を引いた時の細胞接着性領域の最大幅を接着領域幅Hとした場合、接着領域幅Hは、シート形成領域の最大径に対して、例えば10%以下であり、好ましくは5%以下である。また、接着領域幅Hは、シート形成領域の最大径に対して、好ましくは0.05%である。なお、シート形成領域の最大径とは、シート形成領域全体を含むことができる最小の円における直径を指す。

10

#### 【0088】

細胞接着性領域の種類としては、1種類のみであっても良く、異なる細胞接着材料を含む細胞接着性領域を含むものであっても良い。

#### 【0089】

細胞接着性領域は、細胞非接着性領域と接しても良く、接していなくてもよい。細胞接着性領域は、細胞非接着性領域と接していることが好ましい。

20

#### 【0090】

細胞接着性領域の刺激応答性領域に対する高さは、細胞シートを形成可能であれば特に制限されるものではない。例えば、細胞接着性領域は、刺激応答性領域に対して、高くてもよく、同じであってもよく、又は低くてもよい。また、細胞接着性領域の細胞非接着性領域に対する高さについても同様であり、特に制限されるものではない。

#### 【0091】

細胞接着性領域の細胞接着性の程度としては、所望の細胞接着性を示すものであれば特に制限されるものではなく、刺激応答性領域が細胞接着性を発現している場合の細胞接着性と同様とすることができます。

#### 【0092】

細胞接着性層は、例えば、細胞接着材料を含む層により形成することができる。細胞接着性層は、例えば生物化学的特性により細胞接着性を有してもよく、また、物理化学的特性により細胞接着性を有してもよい。細胞接着材料としては、例えば、一般的な細胞培養基板等に用いられる細胞接着材料を用いることができる。例えば、物理化学的特性により細胞と接着する材料としては、例えば、親水化ポリスチレン、ポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン等の塩基性化合物及びそれらを含む縮合物等が挙げられる。また、生物化学的に細胞と接着性を有する材料としては、フィブリン、フィプロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列含有ペプチド、YIGSR(チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン)配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン、及びこれらの混合物、例えばマトリゲル等が挙げられる。

30

#### 【0093】

また、細胞接着性層としては、例えば、各種ガラス、プラズマ処理を施したポリスチレン、ポリプロピレン等も用いることができる。

40

#### 【0094】

基材の表面が細胞接着性を有する場合、細胞接着性層として基材を利用することができます。すなわち、細胞接着性を有する基材表面を細胞接着性領域として用いることができる。例えば、細胞接着性を有する基材の上に刺激応答性ポリマーを含む刺激応答性層を形成した後、所定の部分の刺激応答性層を除去して基材表面を露出させることにより、刺激応答性領域を容易に形成することができる。また、刺激応答性層を部分的に除去する方法以外の方法としても、例えば、フォトリソグラフィーなどの技術を使って最初から基材表面

50

上に部分的にだけ刺激応答性層を形成する方法も用いることができる。なお、基材の細胞接着性は、例えば、基材上に対象細胞を播種し、対象細胞が基材に接着して増殖するか否かを調べることで判断することができる。

#### 【0095】

基材は、細胞接着性の観点から、親水性処理面を有するプラスチックを含んで構成されることが好ましい。プラスチックとしては、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、環状ポリオレフィン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミド、シリコーン、又はアクリルなどが挙げられる。親水性処理は、プラスチックの表面を親水性に改質できる処理であれば特に制限されるものではない。そのような表面処理としては、例えば、コロナ放電処理、プラズマ処理、UVオゾン処理、電子線照射処理、又はレーザー処理などが挙げられる。親水性処理面を有する基材は、市販されているものを用いてもよく、例えば、Nunc<sup>TM</sup>細胞培養ディッシュ（商品名、Thermo Fisher Scientific社製）、Falconセルカルチャーディッシュ（Corning社製）、細胞培養用シャーレ（住友ベークライト社製）、又は組織培養用ディッシュ（旭硝子社製）として市販されている。また、親水性処理面を有する基材は、例えば、親水性処理が施されていない未処理のプラスチック製の基材に親水性処理を施すことにより用意することもできる。未処理の基材としては、例えば、Nunc<sup>TM</sup>ペトリディッシュ（商品名、Thermo Fisher Scientific社製）、Falconペトリディッシュ（Corning社製）、浮遊培養用シャーレ（住友ベークライト社製）、又は無処理ディッシュ（旭硝子社製）を用いることができる。親水性処理により、プラスチック表面に存在する親水性官能基（例えばヒドロキシ基やカルボニル基）が増えるものと考えられる。プラスチック製の基材の表面が親水性処理されることにより、細胞の接着性を向上させることができる。基材の表面が親水性処理されていることにより、培養液中に含まれるタンパク質などの細胞間マトリックスの材料となる栄養素が接着面に集まり易くなり、結果として、未処理の基材を用いる場合に比べて細胞の接着性が向上するものと考えられる。10

#### 【0096】

細胞接着性層には、添加剤やバインダー樹脂なども添加してもよい。

#### 【0097】

細胞接着性層の形成方法としては、刺激応答性層の形成方法と同様の方法を用いることができる。30

#### 【0098】

##### [細胞非接着性領域]

細胞非接着性領域は、細胞非接着性を有する表面であり、細胞非接着性を有する表面を有する層（細胞非接着性層）から形成され得る。

#### 【0099】

細胞非接着性領域の細胞接着性の程度としては、所望の細胞非接着性を示すものであれば特に制限されるものではなく、刺激応答性領域が細胞非接着性を発現している場合の細胞接着性と同様とすることができます。

#### 【0100】

細胞非接着性層は、例えば、細胞非接着材料を含む層により形成することができる。このような細胞非接着材料としては、細胞と非接着性を有するものであれば良く、例えば、水和能の高い材料を用いることができる。水和能が高く細胞非接着材料として用いられる材料としては、例えば、ポリエチレングリコールや、ベタイン構造等を有する両性イオン材料、リン脂質含有材料等が挙げられる。40

#### 【0101】

また、細胞非接着材料としては、撥水性又は撥油性を有する材料又は超親水性を有する材料も用いることができる。撥水性又は撥油性を有する材料としては、例えば、撥水性又は撥油性の有機置換基を有するものを用いることができ、具体的にはゾルゲル反応等によりクロロ又はアルコキシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノ

10

20

30

40

50

ポリシロキサン、反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等や撥水性又は撥油性の有機置換基を有する界面活性剤も用いることができる。さらに、超親水性を有する材料としては、エネルギー照射に伴う光触媒の作用等によって、上記オルガノポリシロキサン等の有機置換基を分解したもの等が挙げられる。

【0102】

細胞非接着性層は、添加剤やバインダー樹脂などを含んでもよい。

【0103】

細胞非接着性層の形成方法としては、刺激応答性層の形成方法と同様の方法を用いることができる。

【0104】

[細胞シートの製造方法]

本発明の一形態は、上述の本実施形態に細胞培養容器で細胞を培養して細胞シートを形成する工程を含む、細胞シートの製造方法に関する。

【0105】

上述の本実施形態に係る細胞培養容器を用いて細胞を培養して細胞シートを形成した後、刺激を与えることにより、細胞シートが細胞接着性領域に付着した形態で浮かび上がる。細胞シートは、細胞接着性領域に付着しているため、その形状が安定している。また、細胞シートは、その浮かび上がった部位から容易に細胞接着性領域から剥離することができるため、容易に使用用途に適用することができる。

【0106】

細胞シートを剥離する方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。例えば、細胞接着性領域に細胞シートが付着している部位にピペッティングなどのシェアストレスを与えることで細胞シートを剥がすことができる。また、細胞シートが付着している部位にピンセットやピペットチップなどで切り込みを入れて細胞接着性領域に付着している細胞を細胞シートから切り離すことにより、細胞シートを剥がすことができる。また、切り込みを入れる場合には、先端が細い部材を用いることが好ましいが、基材を傷付けることで不純物が発生しないように、基材より柔らかいか或いは先端が丸い部材で細胞シートに切り込みをいれることが望ましい。また、粘着シールを剥がす様にピンセットやピペットチップなどで直接細胞シートに物理的な力を加えて基材から剥離してもよく、この場合も基材より柔らかいか先端が丸い部材を用いて剥離するのが望ましい。

【0107】

細胞シートの形成において、細胞を刺激応答性領域及び細胞接着性領域を含む培養面に播種した後、培養により細胞を増殖させ、コンフルエントに到達させることが好ましい。本明細書において、「コンフルエント」とは、細胞が培養面を覆った状態を言う。

【0108】

本実施形態において、刺激応答性層及び細胞接着性領域の表面が、細胞が培養される表面である培養面となることが好ましい。つまり、細胞は刺激応答性層及び細胞接着性領域の表面に接着することが好ましい。

【0109】

細胞の培養時間は、特に制限されるものではなく、細胞シートが形成されるまで培養することができる。細胞シートを形成するためには、播種された細胞が隣接する細胞間に細胞外マトリックスを形成することが必要となる。

【0110】

対象細胞は、特に制限されるものではなく、細胞シートを形成可能な細胞であれば特に制限なく用いることができる。対象細胞は、例えば、接着性細胞である。接着性細胞としては、例えば、肝臓の実質細胞である肝細胞、クッパー細胞、血管内皮細胞や角膜内皮細胞などの内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、碎骨細胞、歯根膜由来細胞、表皮角化細胞などの表皮細胞、気管上皮細胞、消化管上皮細胞、子宮頸部上皮細胞、角膜上皮細胞などの上皮細胞、乳腺細胞、ペリサイト、平滑筋細胞や心筋細胞などの筋細胞、筋芽細胞、腎細胞、膵ランゲルハンス島細胞、末梢神経細胞や視神経細胞などの神経細胞、軟骨細胞、又

10

20

30

40

50

は骨細胞などが挙げられる。これらの細胞は、組織や器官から直接採取した初代細胞でもよく、或いは、それらを何代か継代させたものでもよい。さらにこれらの細胞は、未分化細胞である胚性幹細胞、多分化能を有する間葉系幹細胞などの多能性幹細胞、単分化能を有する血管内皮前駆細胞などの单能性幹細胞、分化が終了した細胞の何れであってもよい。また、細胞は單一種を培養してもよいし、二種以上の細胞を共培養してもよい。

#### 【0111】

培養液は、特に制限されるものではなく、例えば、当該技術分野で一般的に用いられる細胞培養用培地を用いることができる。培地としては、例えば、用いる細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DME培地、MEM培地、IMDM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地及びRPMI1640培地などの基礎培地を用いることができる。基礎培地は、例えば、朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の技術第三版」581頁に記載されている。さらに、基礎培地に血清（ウシ胎児血清など）、各種増殖因子、抗生物質、アミノ酸などを加えてよい。また、Gibco無血清培地（インビトロジェン社）などの市販の無血清培地も用いることができる。最終的に得られる細胞シートの臨床応用を考えると、動物由来成分を含まない培地を使用することが好ましい。

10

#### 【0112】

なお、本実施形態は、上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本実施形態の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本実施形態の技術的範囲に包含される。また、好ましい例、範囲、数値、材料、条件などの本実施形態について説明した内容はいずれも組み合わせて本実施形態の一つとして理解することができ、本実施形態は、それらのいずれの組み合わせも包含するものである。

20

#### 【実施例】

#### 【0113】

以下、実施例を用いて本実施形態を説明する。本実施例では、図9に記載のシート形成領域を有する細胞培養容器を作製した例を示す。

30

#### 【0114】

##### (実施例1)

直径2cmの円形ポリスチレン基材の全面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)をコーティングし、温度刺激により細胞接着性と細胞非接着性とに変化できる表面を有する刺激応答性層を形成した。次に、外周から内側方向に1mmまでの範囲をオゾン処理により刺激応答性層を分解除去し、細胞接着性を有する基材を露出させ、細胞接着性領域を形成した。この際、細胞接着性領域は、図9に示すような4つの領域を有する形状とした。また、隣接する細胞接着性領域の間の4箇所の隙間(図18(A)に示す直線L1～L4に相当)はそれぞれ1mmとした。このようにして刺激応答性領域及び細胞接着性領域が形成された基板を容器底面に配置し、細胞培養容器E1を作製した。

#### 【0115】

##### (比較例1)

比較例として、刺激応答性層の部分的な除去を行わなかったこと以外は、実施例1と同じにして、細胞培養容器C1を作製した。

40

#### 【0116】

##### (評価)

作製した細胞培養容器C1の前記基材上に、マウス筋芽細胞を $1 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、37℃で1日間培養して細胞シートを形成した。次に、細胞培養容器の温度を20℃に下げて刺激応答性層に温度刺激を与えたところ、15分後に細胞シートが基材から完全に剥離した。

#### 【0117】

一方で、細胞培養容器E1についても同様に評価したところ、温度刺激を与えてから1時間後も細胞シートは基材から完全に剥離せず、細胞シートの収縮は確認されずに細胞接

50

着性領域に付着していた。また、軽くピペッティングすることで簡便に細胞シートを基材から回収することができた。

#### 【0118】

##### (実施例2)

直径2cmの円形ポリスチレン基材の全面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)をコーティングし、温度刺激により細胞接着性と細胞非接着性とに変化できる表面を有する刺激応答性層を形成した。次に、外周から内側方向に0.5mmまでの範囲にコラーゲンをピペットで塗布しゲル化させた後に乾燥することで、細胞接着性領域を形成した。

この際、細胞接着性領域は、図10に示すような8つの領域を有する形状とし、8箇所の隙間(図18(B)のL1~L8に相当)はそれぞれ6mmとし、細胞培養容器E2を作製した。10

また、同様に、細胞接着性領域は、図9に示すような4つの領域を有する形状とし、4箇所の隙間(図18(A)に示す直線L1~L4に相当)はそれぞれ14mmとし、細胞培養容器E3を作製した。

さらに、同様に、細胞接着性領域は、図1(A)に示すように、1つの領域で隙間がないように構成されるように形成して、細胞培養容器E4を作製した。なお、シート形成領域に対する細胞接着領域の面積の比は約0.2となる。20

#### 【0119】

##### (比較例2)

比較例として、上述のコラーゲンを含む細胞接着性層を形成しなかったこと以外は、実施例2と同様にして、細胞培養容器C2を作製した。20

#### 【0120】

##### (評価)

作製した細胞培養容器C2の前記基材上に、マウス筋芽細胞を $1 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、37℃で1日間培養して細胞シートを形成した。次に、細胞培養容器の温度を20℃に下げて刺激応答性層に温度刺激を与えたところ、15分後に細胞シートが基材から完全に剥離した。

#### 【0121】

一方で、細胞培養容器E2、E3、E4についても同様に評価したところ、温度刺激を与えてから1時間後も細胞シートは基材から完全に剥離せず、細胞接着性領域に付着していた。また、E4の細胞シートはまったく細胞シートの収縮は確認されず、E4、E3、E2の順に細胞シートの収縮をより効果的に抑制していた。そして、ピペットやピンセットで接着部位を剥離することで簡便に細胞シートを基材から回収することができた。この時、E2、E3、E4の順に基材から細胞シートをより容易に回収することができた。30

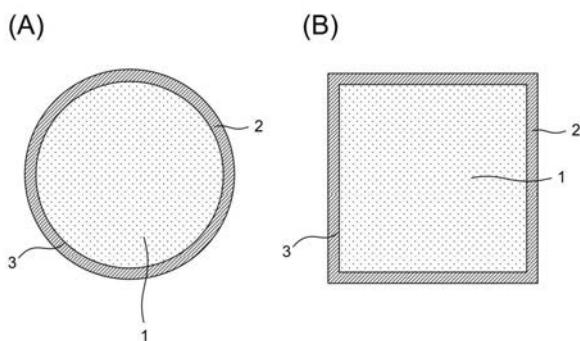
#### 【符号の説明】

#### 【0122】

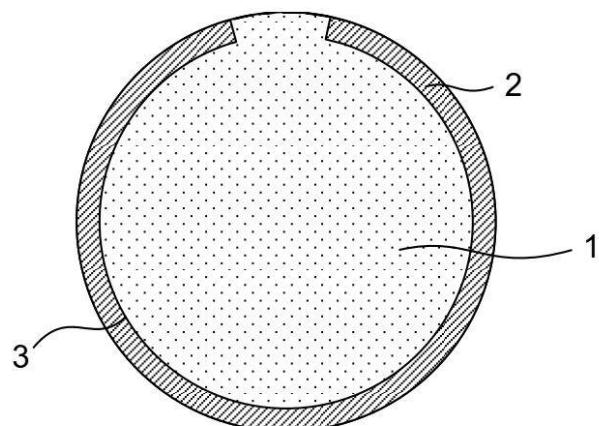
- 1 刺激応答性領域
- 2 細胞接着性領域
- 3 接着境界
- 4 細胞非接着性領域
- 11 外側刺激応答性領域
- 12 外側細胞接着性領域
- 101 刺激応答性層
- 102 細胞接着性層
- 104 細胞非接着性層
- 105、105' 基材

40

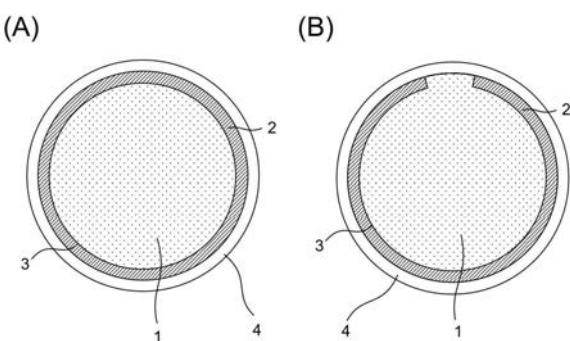
【図1】



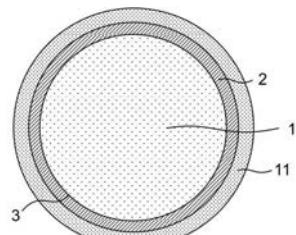
【図2】



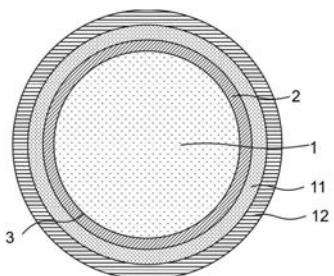
【図3】



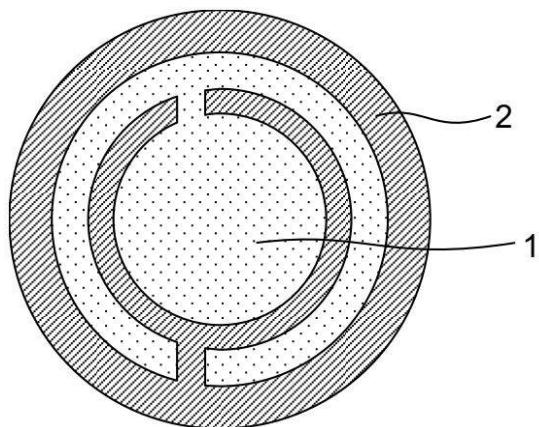
【図4】



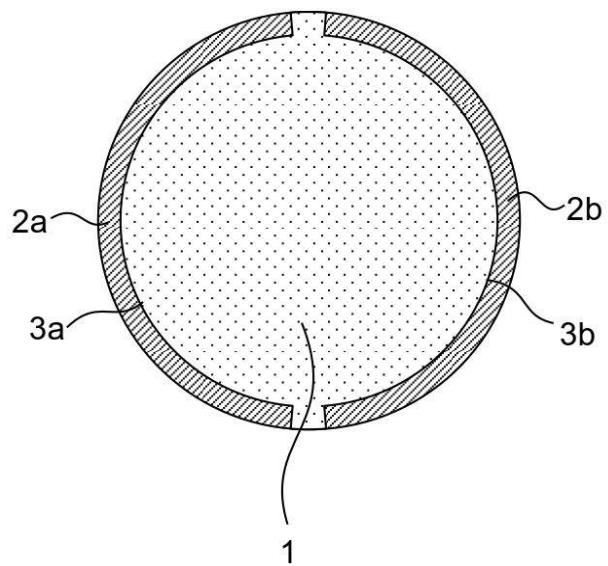
【図5】



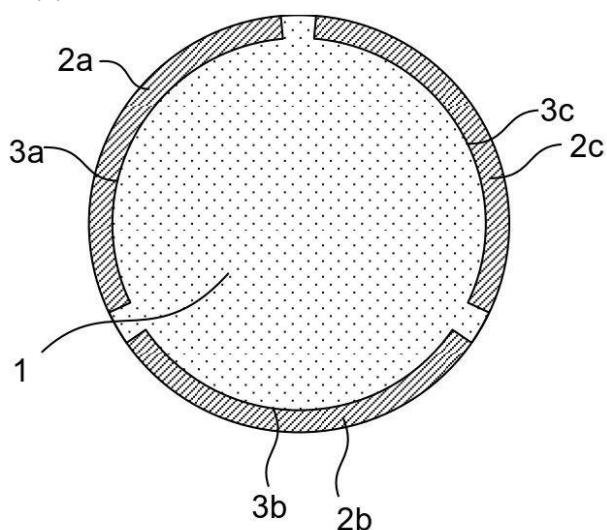
【図6】



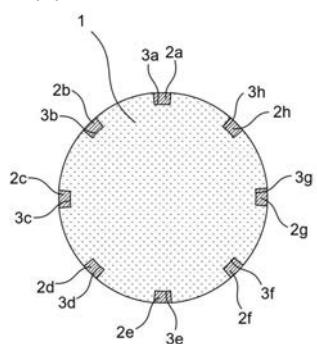
【図7】



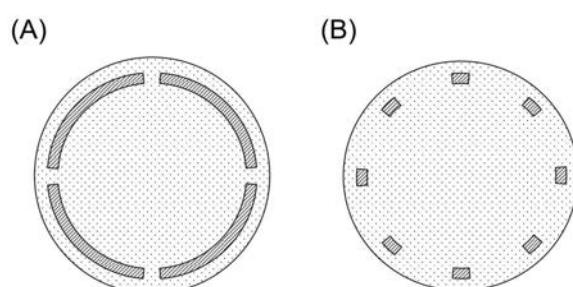
【図8】



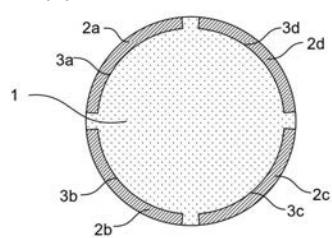
【図10】



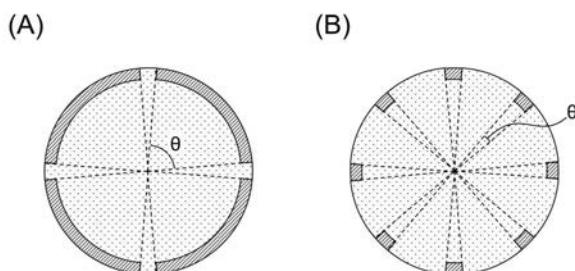
【図11】



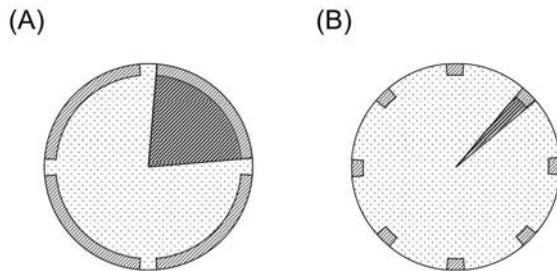
【図9】



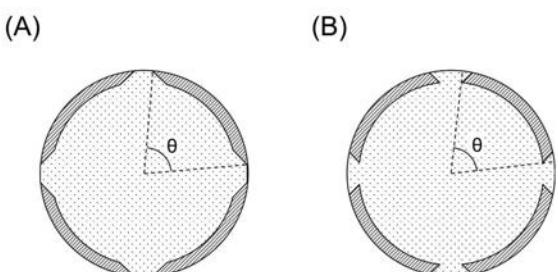
【図12】



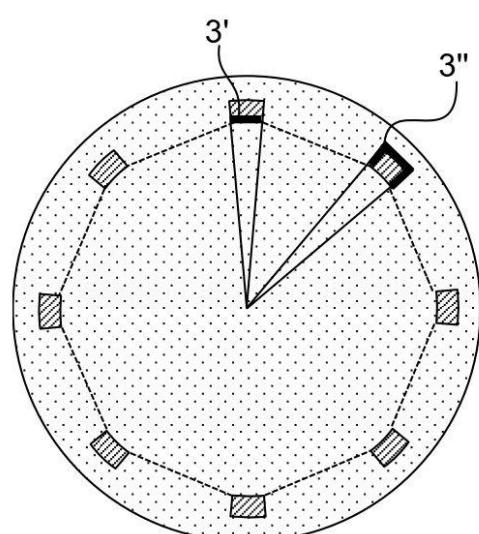
【図14】



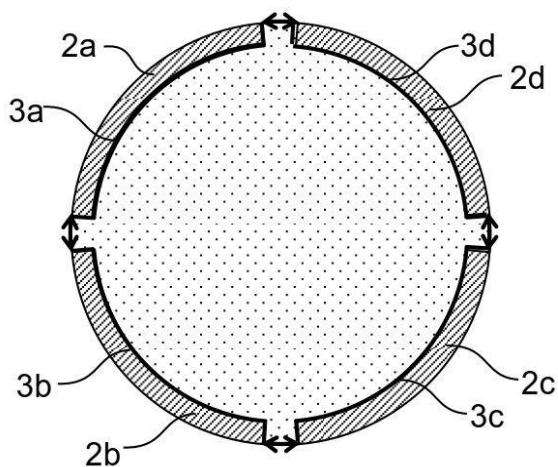
【図13】



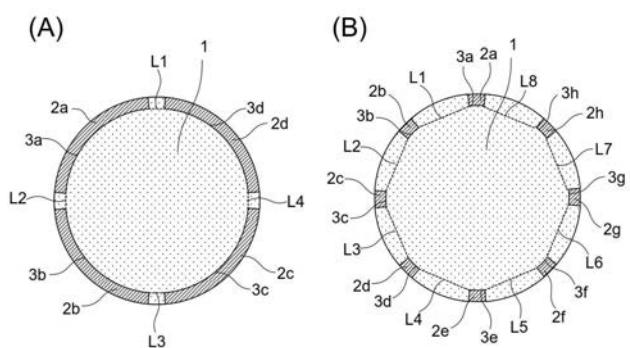
【図15】



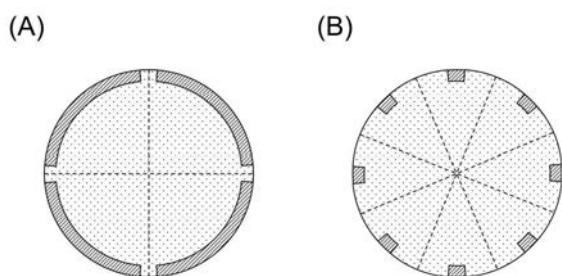
【図16】



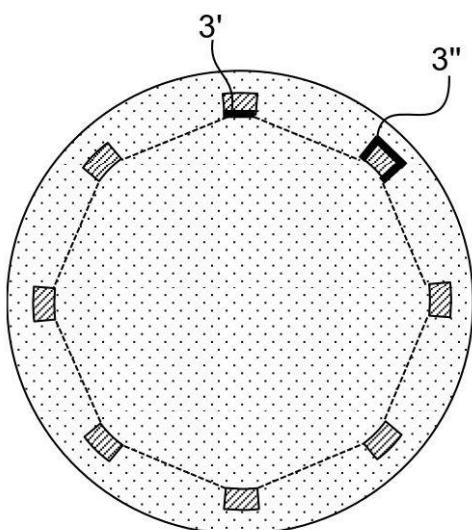
【図18】



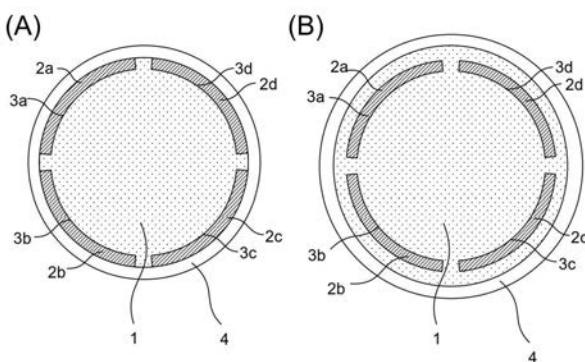
【図17】



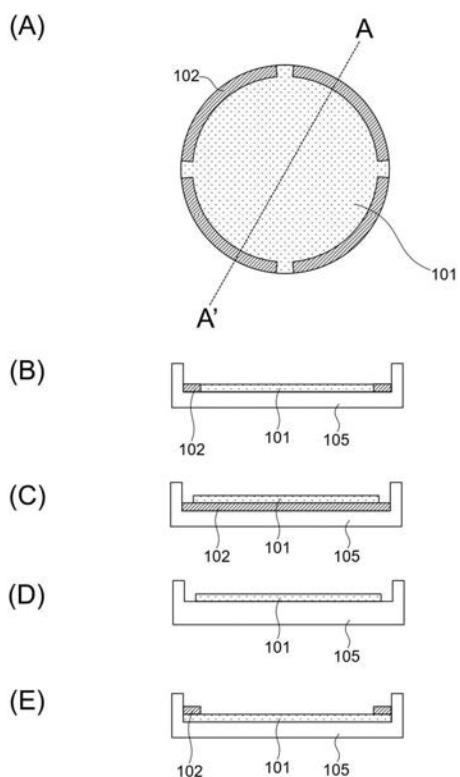
【図19】



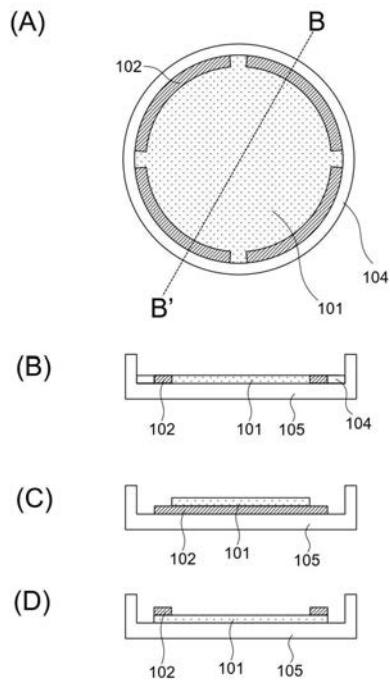
【図20】



【図21】



【図22】



【図23】

