

(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
2014 年 12 月 31 日(31.12.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/208778 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) C12M 3/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/067852
- (22) 国際出願日: 2014 年 6 月 27 日(27.06.2014)
- (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 2013-137253 2013 年 6 月 28 日(28.06.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学(TOHOKE UNI-
VERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区
片平二丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 梶 弘和(KAJI, Hirokazu); 〒9808577 宮城
県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学
法人東北大学内 Miyagi (JP). 藤枝 俊宣(FUJIE,
Toshinori); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二
丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi
(JP). 森 好弘(MORI, Yoshihiro); 〒9808577 宮城県
仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法
人東北大学内 Miyagi (JP). 西澤 松彦(NISHIZA-
WA, Matsuhiko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片
平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内

Miyagi (JP). 阿部 俊明(ABE, Toshiaki); 〒9808577
宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立
大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 永井 展裕(NA-
GAI, Nobuhiro); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片
平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内
Miyagi (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕
グリーンヒルズ MORI タワー 3 2 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

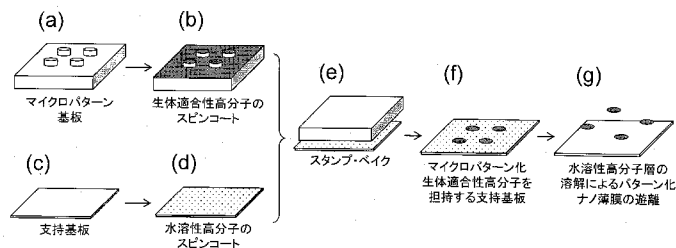
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: CELL-CARRYING PATTERNED NANO-THIN FILM

(54) 発明の名称: 細胞担持パターン化ナノ薄膜

図 1



- (a) Micropattern substrate
(b) Spin coating of biocompatible macromolecules
(c) Support substrate
(d) Spin coating of water-soluble macromolecules
(e) Stamping and baking
(f) Support substrate carrying micropatterned biocompatible macromolecules
(g) Release of patterned nano-thin film due to dissolution of water-soluble macromolecule layer

(57) Abstract: The objective of the present invention is to provide a new means capable of easy, efficient and minimally invasive cell transplantation (delivery) to a narrow space in an organism such as in an eyeball. This cell-carrying patterned nano-thin film is characterised by having, as a substrate, a nano-thin film that has a micropattern and by carrying cells atop the nano-thin film.

(57) 要約: 本発明は、眼球内のような生体内の狭小な空間に、簡便に、かつ効率的に、また低侵襲に細胞移植(送達)することができる新たな手段を提供することを目的とする。マイクロパターンを有するナノ薄膜を基材とし、当該ナノ薄膜上に細胞を担持することを特徴とする、細胞担持パターン化ナノ薄膜。



(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称

細胞担持パターン化ナノ薄膜

技術分野

本発明は、生体内の狭小な空間に、簡便に、かつ効率的に、また低侵襲に細胞移植（送達）することを可能とする細胞送達法に関する。

より詳細には、本発明は、マイクロパターンを有するナノ薄膜を基材とし、当該ナノ薄膜上に細胞を担持することを特徴とする、細胞担持パターン化ナノ薄膜に関する。

背景技術

近年、再生医療の分野で難治性疾患に対する細胞移植療法の開発が広く進められている。例えば、眼科領域における難治性疾患の 1 つに加齢黄斑変性があるが、これは網膜組織中心の黄斑部が障害されることにより発症する失明リスクの極めて高い疾患である。今日までに、治療法として網膜色素上皮（以下、「RPE」と記載する。）細胞の移植が試みられている。例えば、RPE 細胞の懸濁液を網膜下に直接注入することによって細胞移植を行う方法が検討されているが（非特許文献 1）、注入された細胞の生着率が低いことが問題となっている。また、RPE 細胞のみから成るシートを移植する方法も検討されているが、RPE 細胞のシートは脆弱であるため扱いが非常に難しい。近年では、iPS 細胞より誘導した RPE 細胞をシート化し患部に移植する試みも検討されているが、網膜下への RPE 細胞の効率的な送達法は依然として確立されておらず、当該分野においては新たな細胞送達法が切望されている。

一方、生体分解性ポリマーからなるナノメートルオーダーの膜厚を有する薄膜（いわゆる「ナノ薄膜」）が開発され、当該ナノ薄膜に機能性物質を担持させ皮膚や生体組織に貼付して使用する複合体が報告されている（特許文献 1－2）。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 特許第 5028422 号公報

特許文献 2 特開 2010-63411 号公報

非特許文献

非特許文献 1 Cell Transplant, 14, 799-808 (2005)

発明の概要

本発明は、眼球内のような生体内の狭小な空間に、簡便に、かつ効率的に、また低侵襲に細胞移植（送達）することができる新たな手段を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、マイクロパターンを有するナノ薄膜上で細胞を培養して得られる細胞担持パターン化ナノ薄膜が、注射針等の細管で吸引し、放出することが可能であり、かつそのように吸引・放出しても、当該細胞担持パターン化ナノ薄膜は元の形状を維持することが可能であり、また膜表面に接着した細胞を生存したまま、剥離することなく安定的に保持できることを見出した。そしてかかる特徴により、当該細胞担持パターン化ナノ薄膜は注射針等の細管を用いて低侵襲に生体内に導入し細胞移植（送達）できることを見出した。

本発明は、これらの知見に基づくものであり、以下の特徴を有する。

[1] 厚さ 500nm 未満であり、かつ直径又は最も長い対角線の長さが $10\mu\text{m}$ ～ 20mm であるパターン化ナノ薄膜を基材とし、該パターン化ナノ薄膜上に細胞を担持することを特徴とする、細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[2] パターン化ナノ薄膜が、生体適合性高分子からなる、[1] の細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[3] パターン化ナノ薄膜が細胞外基質でコーティングされている、[1] 又は [2] の細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[4] パターン化ナノ薄膜が金属、半導体、セラミック、又は磁性体からなるナノ粒子を含む、[1] ～ [3] のいずれかの細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[5] パターン化ナノ薄膜が機能性物質を含む、[1] ～ [4] のいずれかの細

胞担持パターン化ナノ薄膜。

[6] 細胞が網膜色素上皮細胞である、[1]～[5]のいずれかの細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[7] 細管より組織中に放出され、該組織に細胞を送達するための、[1]～[6]のいずれかの細胞担持パターン化ナノ薄膜。

[8] [1]～[7]のいずれかの細胞担持パターン化ナノ薄膜を細管より生体組織中に放出することを含む、生体組織への細胞移植方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2013-137253 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、パターン化ナノ薄膜の作製方法の簡略図を示す。

図 2 は、パターン化ナノ薄膜の写真図を示す。支持基板上に転写されたポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) と磁性ナノ粒子 (MNPs) から成るナノ薄膜 (a) 及びその顕微鏡写真 (b)。24G (内径 $470\mu\text{m}$) カテーテル内に吸引されたパターン化ナノ薄膜 (直径 1mm) (c)。

図 3 (a)～(d) は、異なるサイズのパターン化ナノ薄膜の顕微鏡写真図を示す。(a) 直径 $1000\mu\text{m}$ 。(b) 直径 $500\mu\text{m}$ 。(c) 直径 $400\mu\text{m}$ 。(d) 直径 $300\mu\text{m}$ 。

図 4 は、パターン化ナノ薄膜の表面プロファイルを示す。(a) MNPs を混合させず PLGA のみから成るパターン化ナノ薄膜。(b) MNPs を混合した PLGA を用いて作製したパターン化ナノ薄膜。挿入図はナノ薄膜の光学イメージであり、破線はスキャン部を示す。

図 5 - 1 は、パターン化ナノ薄膜上で培養した RPE 細胞の形態評価を示す。(a) 培養 1 日後の RPE 細胞の位相差顕微鏡写真。(b) 培養 1 日後の RPE 細胞の蛍光顕微鏡写真 (緑：生細胞、赤：死細胞)。(c) 培養 1 日後の RPE 細胞をカルセイン AM (緑) にて、パターン化ナノ薄膜をローダミン B (赤) にて染色した結果を示す共焦点顕微鏡写真。(d) パターン化ナノ薄膜表面の原子間力顕微鏡 (AFM) 写真。(e) MNPs 混合の有無による、パターン化ナノ薄膜上の細胞増殖活性への影響を

示す特性図。

図5-2は、パターン化ナノ薄膜上で培養した RPE 細胞の形態評価を示す。(f) MNPs を含む PLGA ナノ薄膜上および (g) MNPs を含まない PLGA ナノ薄膜上で 2 日間培養した RPE 細胞の免疫染色写真 (左上: 位相差顕微鏡写真。右上: (赤) ZO-1 タイトジャンクション、(青) 核。左下: (緑) F-アクチン、(青) 核。右下: 重ね合わせ)。

図6は、細胞担持パターン化ナノ薄膜に対するシリンジ操作に伴う力学的ストレス負荷後の細胞生存率評価を示す。(a) RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜 ($400\mu\text{m}$ 径) を 25G (内径 $320\mu\text{m}$) 注射針で吸引・放出した前後の、パターン化ナノ薄膜上の細胞を示す位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真 (緑: 生細胞、赤: 死細胞)。

(b) 異なる直径を有する細胞担持パターン化ナノ薄膜の力学的ストレス負荷前後の細胞生存率 (注射針: S.N., 静脈留置カテーテル: I.C.)。 (c) 細胞を担持したナノ薄膜 (厚さ 170nm) およびマイクロメートル厚の薄膜 ($5.5\mu\text{m}$) における力学的ストレス負荷前後の、各薄膜上の RPE 細胞の位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真 (緑: 生細胞、赤: 死細胞)。 (d) シリンジによる吸引・放出前後の各薄膜上の細胞接着面積。

図7は、(a) 黄斑変性症を患う網膜への、細胞担持パターン化ナノ薄膜の導入方法の簡略図を示す。(b) 摘出したブタ眼球の黄斑部網膜下への RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜の導入結果を示す。黄斑部網膜下に導入されたパターン化ナノ薄膜 (ローダミン B で染色) の顕微鏡写真。

図8は、ラットの眼球網膜下への RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜の導入結果を示す。(a-1) 眼球網膜下に RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜が導入されて一週間後のラットの眼底光干渉断層像 (OCT) を示す写真図である。矢印は導入した RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を示す。(a-2) RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜が導入されていないコントロールラットの眼底 OCT を示す写真図である。(b) 摘出された、RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜が導入されたラット眼球の後眼部を示す写真図である。矢印は導入した RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を示す。

(c) 眼球網膜下に RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜が導入されて一週間後のラットより摘出した眼球より作製された網膜組織切片を、ヘマトキシリン・エオジン

(HB) 染色した結果を示す写真図である。矢印は RPE 細胞担持ナノ薄膜によって導入された細胞を示す。

発明を実施するための形態

1. 細胞担持パターン化ナノ薄膜

本発明における「細胞担持パターン化ナノ薄膜」は、基材であるパターン化ナノ薄膜上に細胞を担持してなることを特徴とする。

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

本発明において利用可能な「生体適合性高分子」としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリブチレンサクシネート、ポリジオキサノン、ポリジメチルシロキサン、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフエン)、タンパク質(コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ファイブロネクチン、エラスチン)、多糖類(キトサン、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、セルロース)、核酸(DNA, RNA) 及びそれらの共重合体等が挙げられる。好ましくは、生体適合性高分子は生体分解性ポリマーであり、特に好ましくはポリ乳酸グリコール酸共重合体(以下、「PLGA」と記載する。)である。

本発明において「パターン化ナノ薄膜」とは、微細な形状及び大きさ(マイクロパターン)を有するナノ薄膜を意味する。ナノ薄膜の形状は特に限定されず、円形、楕円形、多角形(例えば四角形、星形等)とすることができるが、その直径又は最も長い対角線の長さがおよそ $10\mu\text{m}$ ～20mm、好ましくはおよそ $50\mu\text{m}$ ～15mm、より好ましくはおよそ $100\mu\text{m}$ ～10mm、さらに好ましくはおよそ $150\mu\text{m}$ ～5mm、

よりさらに好ましくはおよそ $200\ \mu\text{m}$ ~ 3mm 、とりわけ好ましくはおよそ $300\ \mu\text{m}$ ~ 1mm 程度である。ただし、パターン化ナノ薄膜の厚み並びに直径又は最も長い対角線の長さは上記範囲に限定されず、細胞を担持させたパターン化ナノ薄膜を細管により吸引・放出することが可能であり、かつ当該吸引・放出による力学的ストレスが負荷されたとしても担持された細胞の多く（例えば、当該力学的ストレスが負荷される前の担持細胞数の 50% 以上、60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上またはそれ以上の細胞）がパターン化ナノ薄膜上に接着・生存している限り、適宜変更することができる。

本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜は以下の [1] ~ [5] の工程を含む手法により得ることができる。本発明におけるパターン化ナノ薄膜は公知の手法（特許第 5028422 号公報）に基づいて作製することができ、以下及び図 1 に、マイクロスタンプ法とスピンコーティング法を組み合わせた作製方法の概略を示すが、パターン化ナノ薄膜の作製方法は当該手法に限定されない。

[1] 基板（例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、金属、シリコン、ガラス等）に特定のマイクロパターンが凸状に刻みこまれたマイクロパターン基板（すなわち“スタンプ”）を作製する。マイクロパターン基板は常法に従い、フォトリソグラフィ技術を利用して作製することができる。例えば、基板表面をオクタデシルトリメトキシシラン（ODMS）、オクタデシルジメチルクロロシラン、トリアルコキシヘキサデシルシラン等の長鎖状疎水性分子でコーティングした後、その上にポジ型フォトレジストを塗布する。次に、前記レジストにフォトマスクを透過させて露光（電子照射、紫外線照射、X 線照射等）する。続いて、基体上のレジストを現像し、感光した領域のレジストを除去する。そして、 O_2 プラズマ処理、 CO プラズマ処理又はハロゲンガスを用いた反応性イオンエッチング処理により、レジストで保護されていない領域の長鎖状疎水性分子を除去する。最後にアセトン、テトラヒドロフラン（THF）、ジクロロメタン等を用いてレジストを除去することで、マイクロパターン基板を得ることができる（図 1 中、(a) として示す）。

[2] 得られたマイクロパターン基板の表面（マイクロパターンが刻みこまれたスタンプ面）に生体適合性高分子層を形成する。生体適合性高分子又は生体適合性高分子の構成要素（例えば、生体分解性ポリマーの構成要素であるところの

モノマー等) (以下、「生体適合性高分子等」と記載する。) を適当な溶媒 (例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトン、酢酸エチル等) 中に 1mg/mL~100mg/mL、好ましくは 5mg/mL~40mg/mL の濃度で溶解し、この生体適合性高分子等の溶液をスピンコーティング法にてマイクロパターン基板表面に塗布する。スピンコーターの回転速度、回転時間を調節することにより、マイクロパターン基板表面上に塗布される生体適合性高分子等の厚みを調節することができ、最終生成物であるパターン化ナノ薄膜の厚みを調節することができる。次いで、塗布された生体適合性高分子等を重合及び／又は架橋することによって、マイクロパターン基板表面上に生体適合性高分子からなる層を形成することができる (図 1 中、(b) として示す)。ここで「重合」としては、重縮合、重付加、付加縮合、開環重合、付加重合 (ラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合)、熱による固相重合、光重合、放射線重合、プラズマ重合等を挙げることができる。また「架橋」は、公知の架橋剤 (例えば、アルキルジミデート類、アシルジアジド類、ジイソシアネート類、ビスマレイミド類、トリアジニル類、ジアゾ化合物、グルタルアルデヒド等) を用いて行うことができる。

生体適合性高分子等の溶液には、金属、半導体、セラミック、磁性体等からなるナノ粒子、好ましくは磁性体ナノ粒子を含めることができる。当該ナノ粒子は 1nm~500nm、好ましくは 1nm~50nm 程度の粒子径を有する。当該ナノ粒子を生体適合性高分子等の溶液中含め、生体適合性高分子等と共にマイクロパターン基板表面上に塗布することによって、最終生成物であるパターン化ナノ薄膜の表面に当該ナノ粒子に起因する凹凸を形成することができる。パターン化ナノ薄膜の表面に凹凸を形成することによって、細胞が接着できる表面積を増すことができると共に、細胞の増殖活性を増大させることができる。また、パターン化ナノ薄膜に磁性体ナノ粒子含めた場合には、磁力を用いてパターン化ナノ薄膜を移動／集合させることができ操作性を高めることができる。ナノ粒子は生体適合性高分子等の溶液中に 0.1mg/mL~10mg/mL、好ましくは 1mg/mL~5mg/mL の濃度で含めることができる。

〔3〕 水溶性犠牲層を備える支持基板を作製する。支持基板 (例えば、シリコン、ガラス等) (図 1 中、(c) として示す) の一表面を、ポリビニルアルコール (PVA)

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

〔4〕 マイクロパターン基板上の生体適合性高分子層を、支持基板の水溶性犠牲層上にスタンプ・ベイクする（図1中、(e)として示す）。生体適合性高分子の水溶性犠牲層上へのベイクは熱処理により行うことができる。これにより、生体適合性高分子がマイクロパターンを維持したまま水溶性犠牲層上に転写され、生体適合性高分子を担持する支持基板（生体適合性高分子担持支持基板）を得ることができる（図1中、(f)として示す）。

次いで、得られた生体適合性高分子担持支持基板の生体適合性高分子を備える面を、細胞の接着及び増殖を促進する細胞外基質によりコーティングする。本発明において利用可能な「細胞外基質」としては、例えば、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ポリ-D-リジン（PDL）、ラミニン、ポリ-L-オルニチン／ラミニン（PLO/LM）等が挙げられる。細胞外基質のコーティングは、適当な溶媒中に溶解した（例えば $0.01 \mu\text{g/mL}$ ～ $5 \mu\text{g/mL}$ にて）細胞外基質溶液をスピンコーティング法等により支持基板上に塗布し、その後乾燥させることにより行うことができる。これにより、細胞外基質によりコーティングされた生体適合性高分子担持支持基板を得ることができる。

〔5〕 細胞外基質によりコーティングされた生体適合性高分子担持支持基板に細胞懸濁液を滴下して、およそ1時間～5時間ほどインキュベートして細胞を支持基板上に沈着させる。次いで、当該支持基板を培地中に入れさらに1日～3日間ほど培養する。当該培養の間に、支持基板上の水溶性犠牲層は溶解するため、所定のマイクロパターンを有するパターン化ナノ薄膜が支持基板より遊離する（図1中、(g)として示す）。水溶性犠牲層の溶解に伴い、その上に直接コーティングされた細胞外基質層も溶解するため、細胞はパターン化ナノ薄膜上でのみで増殖する。パターン化ナノ薄膜上で細胞がコンフルエントになるまで培養するこ

とによって、目的の細胞担持パターン化ナノ薄膜を得ることができる。細胞の培養条件及び培地の組成は、用いる細胞に適した一般的なものを使用することができる。

本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜において、パターン化ナノ薄膜中又はその表面には、機能性物質を担持させることができる。「機能性物質」とは、細胞の増殖、分化、生理活性等を制御する機能を有する物質（例えば、タンパク質、ポリペプチド、化合物等）やナノ薄膜の可視化を可能にする物質を意味する。このような機能性物質としては、成長／増殖因子（例えば、線維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮成長因子（EGF）、骨形成タンパク質（BMP）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）等）、眼圧降下剤、神経保護剤、抗生物質、抗がん剤、可視化プローブ（造影剤、ナノ粒子、蛍光色素等）が挙げられる。機能性物質はパターン化ナノ薄膜に対して化学的又は物理的手法を用いて結合させることができる。化学的手法としては、官能基を介した化学的結合が挙げられ、例えば生体適合性高分子等を予め適当な官能基（例えばアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、アルデヒド基等）で修飾しておき、得られたパターン化ナノ薄膜に対して当該導入した官能基を介して機能性物質を結合させることができる。物理的手法としては、パターン化ナノ薄膜と機能性物質との間の静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合、分子間力などによる結合が挙げられる。機能性物質のパターン化ナノ薄膜への結合は、上記細胞担持パターン化ナノ薄膜の製造工程において、細胞外基質によるコーティングの前、又は当該コーティングの後、又は当該コーティングと同時に行うことができる。

2. 細胞

本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜において、パターン化ナノ薄膜に担持させ得る細胞としては、細胞移植療法にて患者に移植され得る細胞（ただし、体液中に浮遊する細胞は除く）が挙げられ、例えば網膜色素上皮（RPE）細胞、視細胞、肝細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎細胞、膵島細胞、神経細胞等が挙げられる。これらの細胞は、本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜が導入される患者より単離されたものであっても良いし、あるいは、ES 細胞、幹細胞又は iPS 細胞から誘導されたものであっても良い。

3. 細胞担持パターン化ナノ薄膜を用いた細胞送達

本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜は優れた柔軟性と自己支持性を有し、その直径又は最も長い対角線の長さよりも小さな内径を有する細管で吸引することができ、また当該細管より放出することができる。また、本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜は細胞を安定に保持することができ、細管による吸引及び放出といった力学的ストレスが負荷されても、細胞の多く（例えば、当該力学的ストレスが負荷される前の担持細胞数の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上またはそれ以上の細胞）をパターン化ナノ薄膜上に保持することができる。

「細管」としては例えば、注射針やカテーテル等が挙げられる。「細管」のサイズ（ゲージ）や長さは、細胞担持パターン化ナノ薄膜の大きさや、細胞担持パターン化ナノ薄膜を導入する部位等の要因に応じて適宜選択することができる。

本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜の生体内への導入は、生理食塩水と共に細胞担持パターン化ナノ薄膜を注射針又はカテーテル先端より吸引し、注射シリンジ又はカテーテル内に保持し、注射針又はカテーテル先端を疾患部位又はその近傍に挿入し、細胞担持パターン化ナノ薄膜を注射針又はカテーテル先端より放出して留置することにより行うことができる。細胞担持パターン化ナノ薄膜の生体内への導入により、前記疾患部位又はその近傍に担持する細胞を送達することができる。生体内には一又はそれ以上の細胞担持パターン化ナノ薄膜を導入することができる。例えば、本発明によれば、黄斑変性症の治療を目的とする、黄斑部網膜への網膜色素上皮（RPE）細胞移植において、患者及び眼組織に大きな負担をかけることなく細胞移植（送達）を行うことができる。図7(a)に黄斑変性症を患う網膜への、本発明の細胞担持パターン化ナノ薄膜を用いた細胞送達の概略を示す。例えば、18～25ゲージの微細な注射針又はカテーテルを強膜より眼球内部に挿入し、疾患部位又はその近傍の網膜側より網膜下まで刺し入れ少量の生理食塩水を注入し、細胞担持パターン化ナノ薄膜を導入するスペースを確保する。次いで、当該スペースに注射針又はカテーテルよりRPE細胞担持パターン化ナノ薄膜を放出し、注入した生理食塩水を吸引・除去することによって、細胞担持パターン化ナノ薄膜を網膜下に留置することができる。導入されたRPE細胞は疾患部

(例えば、黄斑変性部位)にて増殖又は疾患部における細胞と置換され、疾患を完治又はその症状を軽減することができる。また、導入されたパターン化ナノ薄膜は生体内で分解吸収され得る。

次に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[実施例 1] パターン化ナノ薄膜の作製

パターン化ナノ薄膜の作製方法の概略を図 1 に示す。パターン化ナノ薄膜はスピニングとマイクロスタンプ法を組み合わせで作製した。まず、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロパターン基板 (図 1(a)) の表面に、磁性ナノ粒子 (MNPs : 粒径 10nm) (2.5mg/mL) を混合させた、又は混合させない、ポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) 溶液 (5mg/mL) をスピニングした (4000rpm, 40s)。次いで、このマイクロパターン基板 (図 1(b)) を、水溶性犠牲層であるポリビニルアルコール (PVA) をコートしておいたガラス製の支持基板 (22mm x 22mm) (図 1(d)) に押し付けベイクし (120℃にて 5 分間)、PLGA 層をマイクロパターン基板から支持基板側に転写した (図 1(f))。細胞培養に利用するパターン化ナノ薄膜の製造においては、支持基板にさらに I 型コラーゲン溶液 (0.5mg/mL) をスピニングした。その後、水溶性犠牲層である PVA を水性溶媒中で溶解させることで、支持基板より遊離した、自己支持性を有するパターン化ナノ薄膜を得た (図 1(g))。

得られたパターン化ナノ薄膜を図 2 に示す。図 2(a) は支持基板上に転写された PLGA と MNPs から成るパターン化ナノ薄膜を示し、図 2(b) はその拡大図である。また、支持基板より遊離したパターン化ナノ薄膜は優れた柔軟性と自己支持性を有し、ナノ薄膜自体の直径より小さい内径のカテーテル (24G (内径 470 μ m) カテーテル) で吸引することができた (写真図のパターン化ナノ薄膜はローダミンにより着色されている) (図 2(c))。

パターン化ナノ薄膜は、作製に用いるマイクロパターン基板のパターン形状を変えることで、様々な形状/サイズのパターン化ナノ薄膜を作製することができた (図 3(a) - (d))。

得られたパターン化ナノ薄膜の表面形状を触針式表面形状測定器 (DekTak) にて

測定したところ、MNPs の混合の有無にかかわらず、パターン化ナノ薄膜の平均膜厚はおおよそ 170nm であった (図 4(a)－(b))。

〔実施例 2〕 パターン化ナノ薄膜上での網膜色素上皮 (RPE) 細胞の培養

上記実施例 1 において、PLGA 層がマイクロパターン基板から転写され I 型コーゲン溶液をスピコートした支持基板に、RPE 細胞の懸濁液 (1.5×10^6 細胞/mL) を 0.4mL ずつ滴下し、37℃にて 1 時間程度インキュベートし細胞を支持基板上に沈着させた。次いで、細胞が沈着した支持基板を培地 (DMEM, 4%(v/v)FBS, 1%ペニシリンストレプトマイシン) 中に入れ、常法に従い培養した。

得られた培養物について、生死判定キット (Cellstain-Double Staining Kit, 同仁化学研究所) を用いて、生細胞及び死細胞を染色した。

結果を図 5-1 (a)－(b)に示す。培地中で水溶性犠牲層である PVA が溶解されるため、RPE 細胞はパターン化ナノ薄膜上にのみ接着して増殖・成長していることが確認された。パターン化ナノ薄膜上にて死細胞は検出されなかった。

また、得られた培養物について、RPE 細胞をカルセイン AM で、パターン化ナノ薄膜をローダミン B で染色した。

結果を図 5-1 (c)に示す。写真図より明らかなとおり、RPE 細胞がパターン化ナノ薄膜上でモノレイヤー組織を形成し存在していることが確認できた。

また、MNPs を混合した PLGA を用いて作製したパターン化ナノ薄膜 (以下、「MNPs(+)パターン化ナノ薄膜」と記載する。) 及び MNPs を混合させず PLGA のみから成るパターン化ナノ薄膜 (以下、「MNPs(-)パターン化ナノ薄膜」と記載する。) について、その表面構造を原子間力顕微鏡 (AFM) にて観察した。

結果を図 5-1 (d)に示す。MNPs(+)パターン化ナノ薄膜 (左) (自乗平均面粗さ (RMS) : 2.86nm) の方が、MNPs(-)パターン化ナノ薄膜 (右) (RMS: 0.489nm) と比べて表面が粗い構造を有することが確認できた。

次いで、MNPs 混合の有無による、パターン化ナノ薄膜上の細胞増殖活性への影響を調べた。MNPs(+)パターン化ナノ薄膜、又は MNPs(-)パターン化ナノ薄膜上にて培養した RPE 細胞について、セルカウンティングキット (Cell Counting Kit-8 (CCK-8) : 同仁化学研究所) を用いて、経時的にパターン化ナノ薄膜上の細胞数を計測し、各パターン化ナノ薄膜の細胞増殖活性への影響を評価した。

結果を図 5-1 (e) に示す。MNP(+)パターン化ナノ薄膜上の細胞の方が、MNP(-)パターン化ナノ薄膜上の細胞に比べ培養 1 日後の増殖活性が高いことが確認できた。

さらに、MNP(+)パターン化ナノ薄膜上又は MNP(-)パターン化ナノ薄膜上にそれぞれ 2 日間培養した細胞について、抗 ZO-1 抗体及び抗 F-Actin 抗体を一次抗体として用いて免疫染色を行った。

結果を図 5-2 (f) -(g) に示す。MNP(+)パターン化ナノ薄膜上の細胞 (図 5-2 (f)) の方が、MNP(-)パターン化ナノ薄膜上の細胞 (図 5-2 (g)) に比べ、ZO-1 (タイトジャンクション) 及び F-Actin の形成が促進されており、また、細胞の形態は網膜色素上皮に特徴的なヘキサゴナルな形態を示しているのが確認できた。

[実施例 3] RPE 細胞担持ナノ薄膜の注射針による吸引・放出試験

上記実施例 2 に記載の手法にしたがって、MNP(+)パターン化ナノ薄膜上で RPE 細胞を培養して得られた培養物 (以下、「RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜」と呼ぶ。) について、25G (内径 320 μ m) 注射針での吸引・放出に伴う力学的ストレスによる、組織形態の変化及び細胞の生存について評価した。具体的には、RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜 (300 μ m、400 μ m、500 μ m、1000 μ m の直径を有する) を 25G (内径 320 μ m) 注射針で 1 回ずつ吸引・放出し、当該力学的ストレス負荷前後のパターン化ナノ薄膜上の RPE 細胞について、組織形態の変化を位相差顕微鏡にて、また細胞の生存を生死判定キット (Cellstain-Double Staining Kit, 同仁化学研究所) を用いて確認した。

結果を図 6 に示す。図 6(a) の写真図より明らかなとおり、RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜に対して力学的ストレスを負荷したとしても、パターン化ナノ薄膜上の RPE 細胞において、組織形態及び細胞の生存に大きな変化は生じないことが確認できた。

図 6(b) は、パターン化ナノ薄膜のサイズによる、上記力学的ストレス負荷前後の細胞生存率への影響を示す。結果より明らかなとおり、パターン化ナノ薄膜の直径やシリンジ針の種類 (注射針: S.N., 静脈留置カテーテル: I.C.) による影響はみられず、いずれの場合においても力学的ストレス負荷後に 80%以上の細胞生

存率が得られた。

また、ナノ薄膜（厚さ 170nm）を用いて作製された RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜、及び厚さのみ異なるマイクロ厚薄膜（厚さ 5.5 μm ）を用いて作製された RPE 細胞担持パターン化マイクロ厚薄膜に対して、上記力学的ストレスを負荷し、各薄膜上の組織形態の変化及び細胞の生存について上記と同様に調べた。

力学的ストレス負荷前後における、各薄膜の各顕微鏡における観察結果を図 6(c)に、各薄膜に対する細胞接着面積の変化を図 6(d)に示す。なお、図 6(d)において細胞接着面積の値は力学的ストレス負荷前における細胞接着面積を 100%とする相対値にて示す。

ナノ薄膜を用いて作製された RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜では、8 割以上の細胞が薄膜表面に接着維持され、かつほとんどの細胞が生存しており、パターン化ナノ薄膜上に形成されたモノレイヤー構造を安定に維持していることが確認できた。一方、マイクロ厚薄膜を用いて作製された RPE 細胞担持パターン化マイクロ厚薄膜では、力学的ストレスの負荷により大部分の細胞が膜から剥離してしまった。パターン化マイクロ厚薄膜は、パターン化ナノ薄膜に比べて柔軟性に乏しく、そのため力学的ストレスによる細胞への負荷が大きくなり大部分の細胞が膜から剥離してしまったと考えられる。

[実施例 4] ブタ眼球網膜下への細胞担持ナノ薄膜の導入

ブタ眼球網膜下への RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜の導入試験を行った。25G（内径 320 μm ）注射針を、摘出したブタ眼球の強膜より眼球内に挿入し、黄斑部の網膜側より網膜下まで刺し入れ少量の生理食塩水を注入し、RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を導入するための空間を形成した。次いで、上記実施例 2 に記載の手法にしたがって作製した RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を 25G 注射針を用いてシリンジ内に吸引し、それを前記と同様に挿入した注射針より網膜下に形成した前記空間内に放出した。最後に、注入した生理食塩水を吸引・除去することによって RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を網膜下に留置した。

図 7(b)に、ブタ眼球黄斑部網膜下に導入した RPE 細胞担持ナノ薄膜の顕微鏡写真を示す。注入された RPE 細胞担持ナノ薄膜は網膜下で伸展し、元の円形状を維持していることが確認できた。

〔実施例 5〕 ラット眼球網膜下への細胞担持ナノ薄膜の導入

Sprague-Dawley (SD) ラットの眼球網膜下への RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜の導入試験を行った。30G (内径 $140\mu\text{m}$) 注射針を、麻酔したラットの眼球の強膜より眼球内に挿入し、黄斑部の網膜側より網膜下まで刺し入れ少量の生理食塩水を注入し、RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を導入するための空間を形成した。次いで、上記実施例 2 に記載の手法にしたがって作製した RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を 30G 注射針を用いてシリンジ内に吸引し、それを前記と同様に挿入した注射針より網膜下に形成した前記空間内に放出した。最後に、注入した生理食塩水を吸引・除去することによって RPE 細胞担持パターン化ナノ薄膜を網膜下に留置した。コントロールのラットには、生理食塩水のみを注入、吸引・除去する操作を同様に行った。

処置後のラットは通常の方法に従い、飼育した。

処置後、1 週間後の各ラットの眼底光干渉断層像 (OCT) を調べたところ、注入された RPE 細胞担持ナノ薄膜が、網膜下で伸展し、シート状の構造で保持されていることが確認できた (図 8 (a-1))。次いで、ラットの眼球を摘出し、後眼部を観察したところ、導入したナノ薄膜が確認できた (図 8 (b))。さらに、摘出し眼球の網膜組織の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HB) 染色したところ、RPE 細胞担持ナノ薄膜によって導入された細胞が確認できた。

これらの結果より、細胞担持パターン化ナノ薄膜を用いて生体の組織中に、低侵襲に細胞移植 (送達) できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、注射針等の細管を用いて吸引・放出することが可能な、細胞を担持する生体適合性高分子からなるナノ薄膜を提供することができる。かかる特徴を有する細胞担持ナノ薄膜は、生体内の狭小な空間にも注射針等の細管を用いて低侵襲に導入し細胞移植 (送達) することができ、患者や組織の負担を低減することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として

本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 厚さ 500nm 未満であり、かつ直径又は最も長い対角線の長さが $10\mu\text{m}$ ～ 20mm であるパターン化ナノ薄膜を基材とし、該パターン化ナノ薄膜上に細胞を担持することを特徴とする、細胞担持パターン化ナノ薄膜。
2. パターン化ナノ薄膜が、生体適合性高分子からなる、請求項 1 に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
3. パターン化ナノ薄膜が細胞外基質でコーティングされている、請求項 1 又は 2 に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
4. パターン化ナノ薄膜が金属、半導体、セラミック、又は磁性体からなるナノ粒子を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
5. パターン化ナノ薄膜が機能性物質を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
6. 細胞が網膜色素上皮細胞である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
7. 細管より組織中に放出され、該組織に細胞を送達するための、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜。
8. 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の細胞担持パターン化ナノ薄膜を細管より生体組織中に放出することを含む、生体組織への細胞移植方法。

図 1

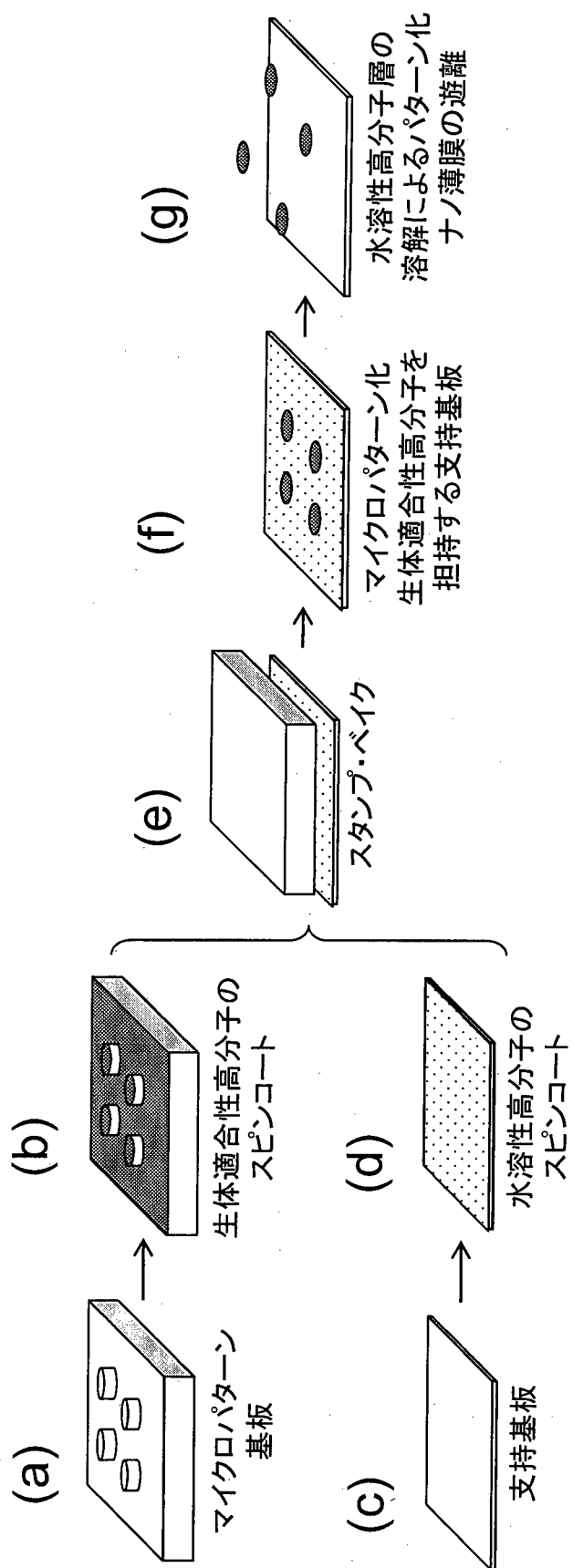


図 2

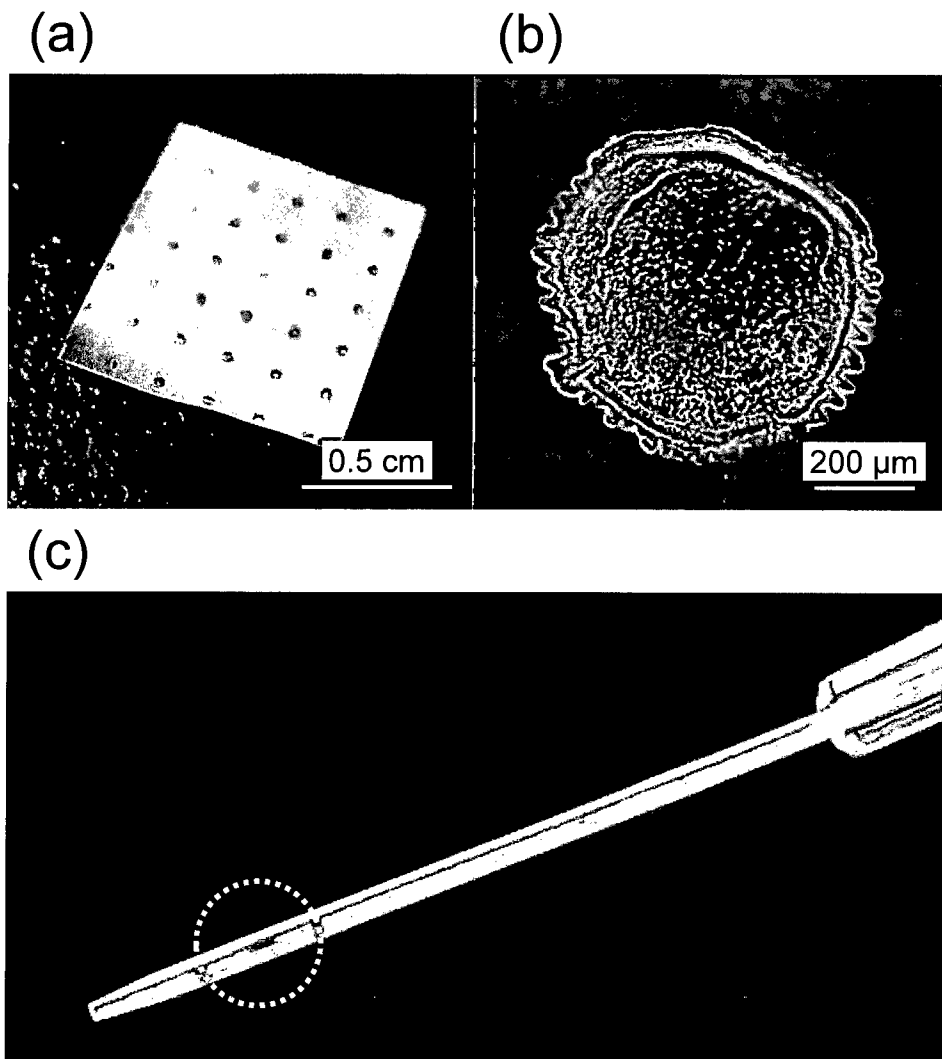


図 3

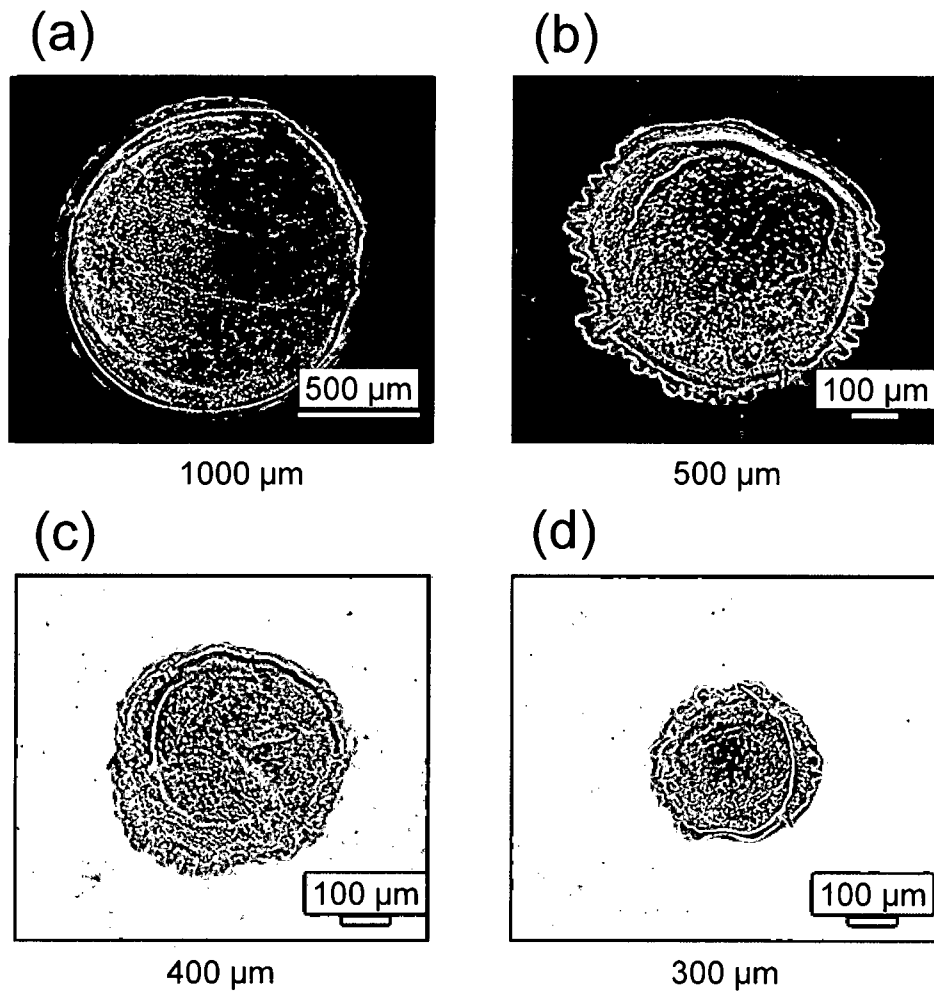
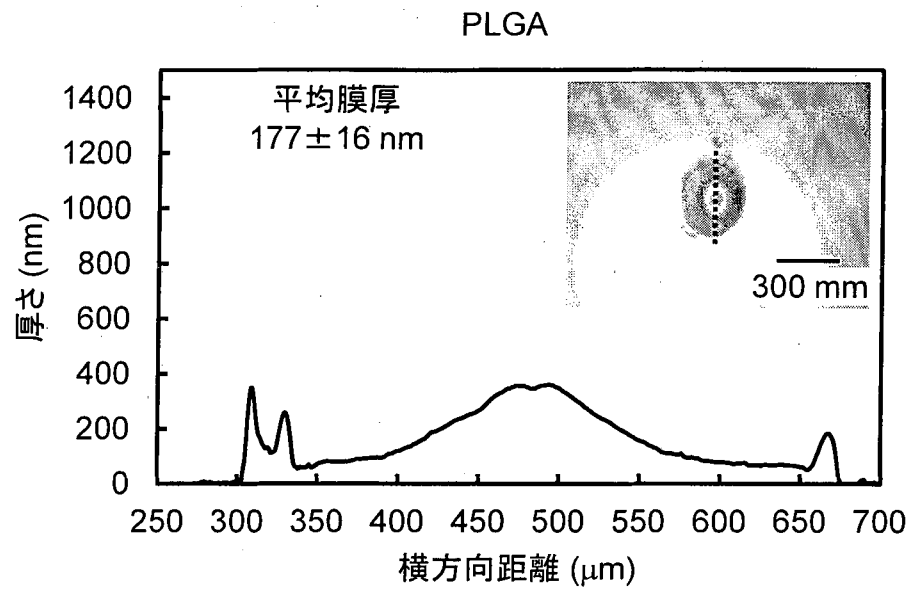


図 4

(a)



(b)

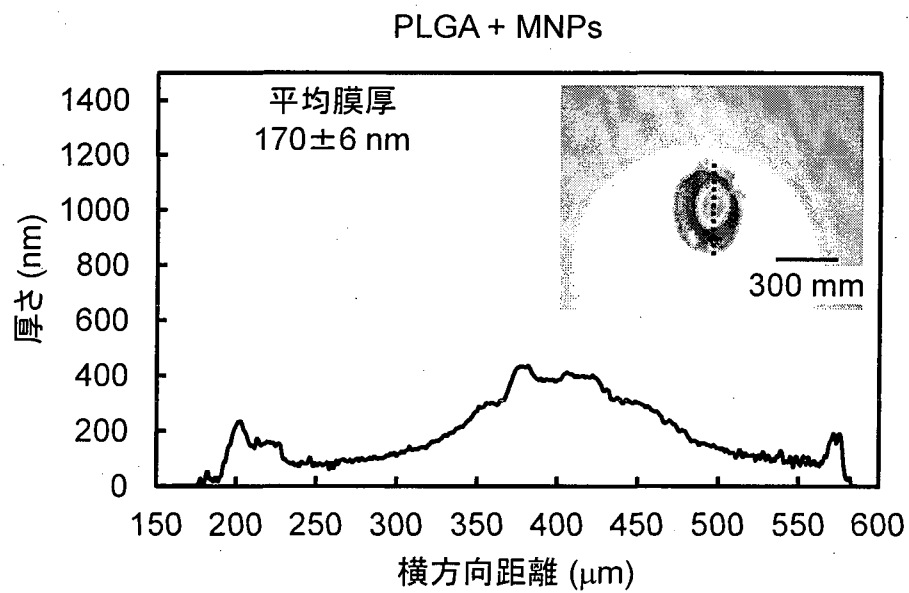


図 5-1

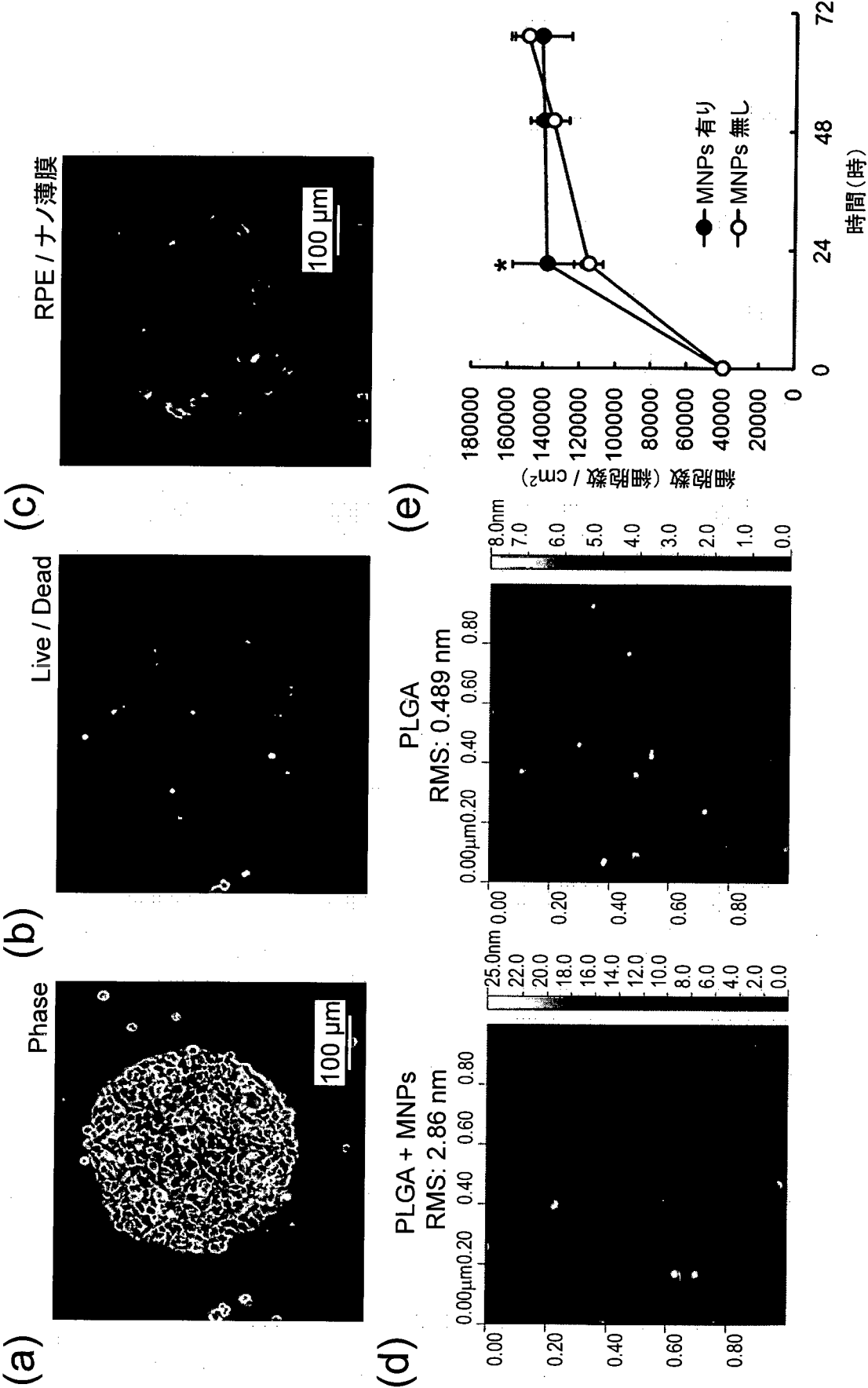


図 5-2

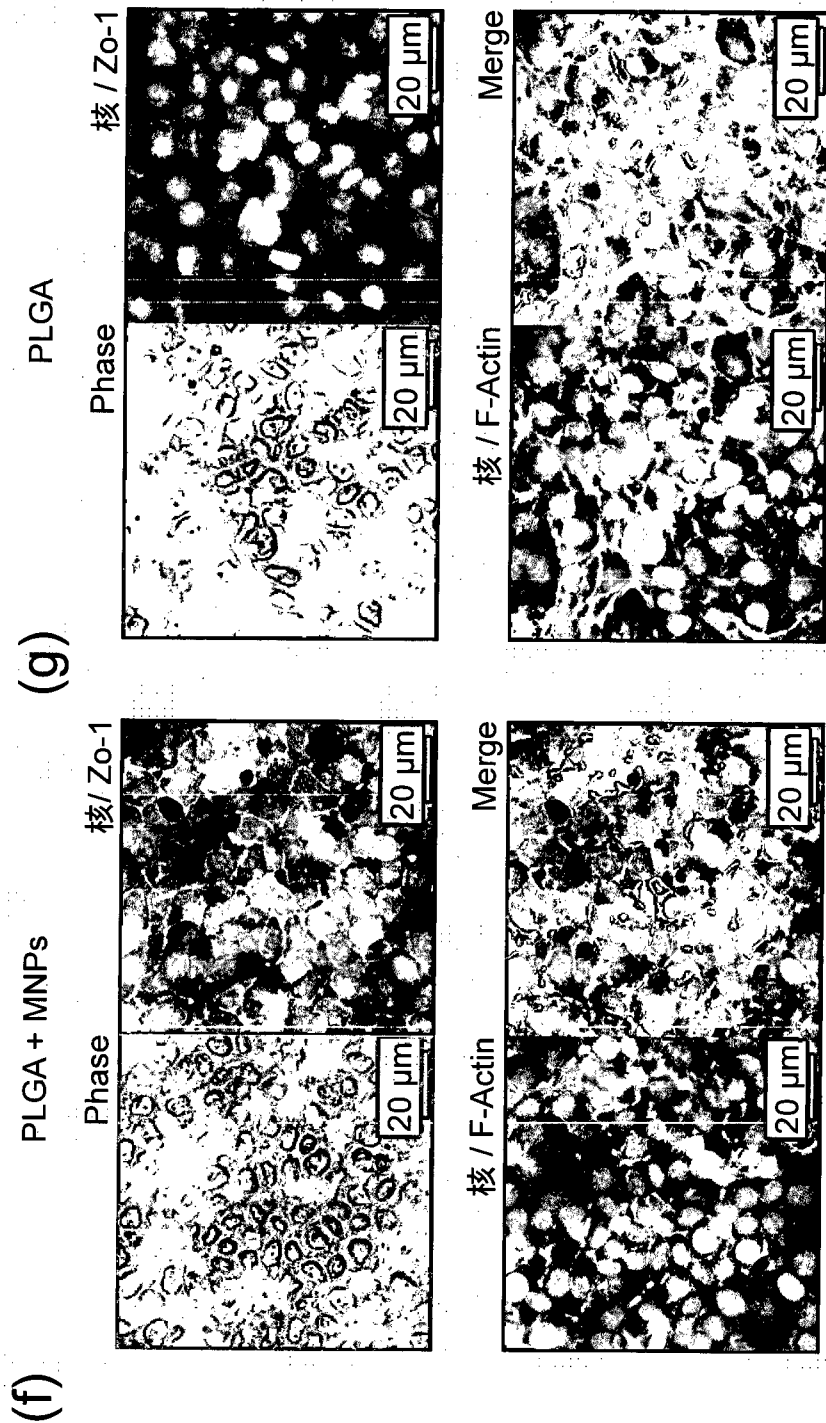


図 6

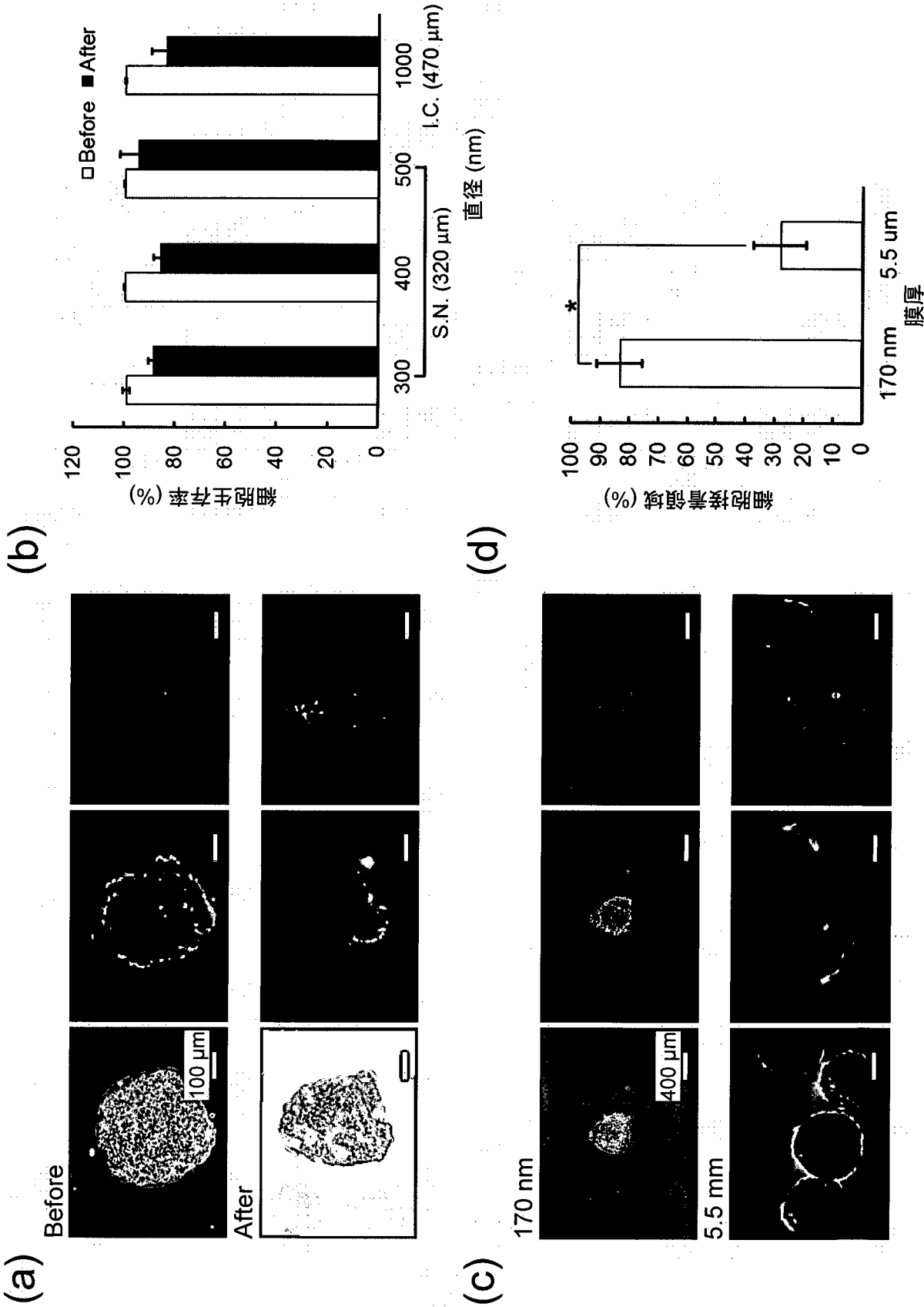
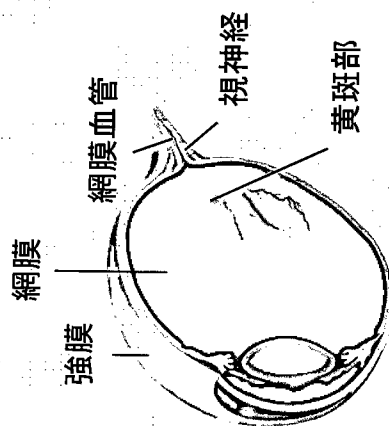


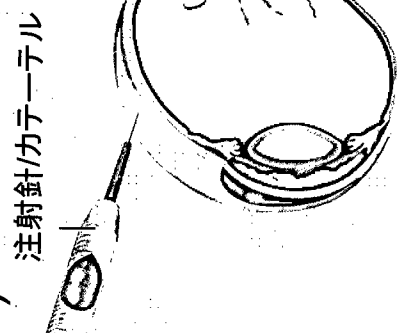
図 7

(a)

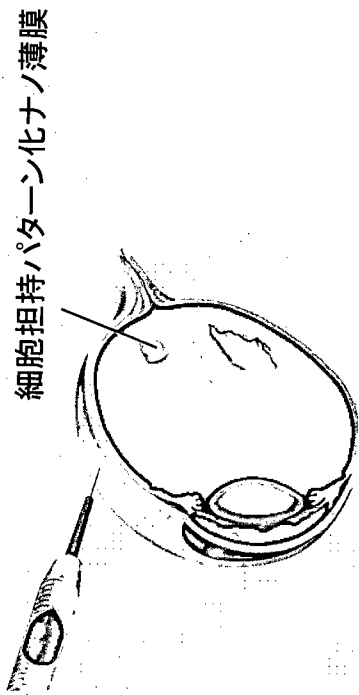
i)



ii)



iii)



(b)

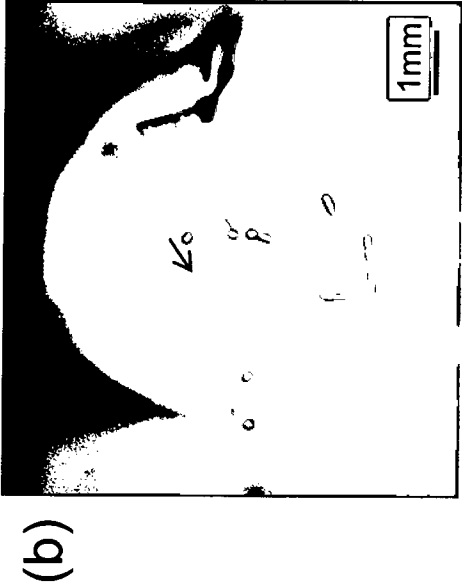
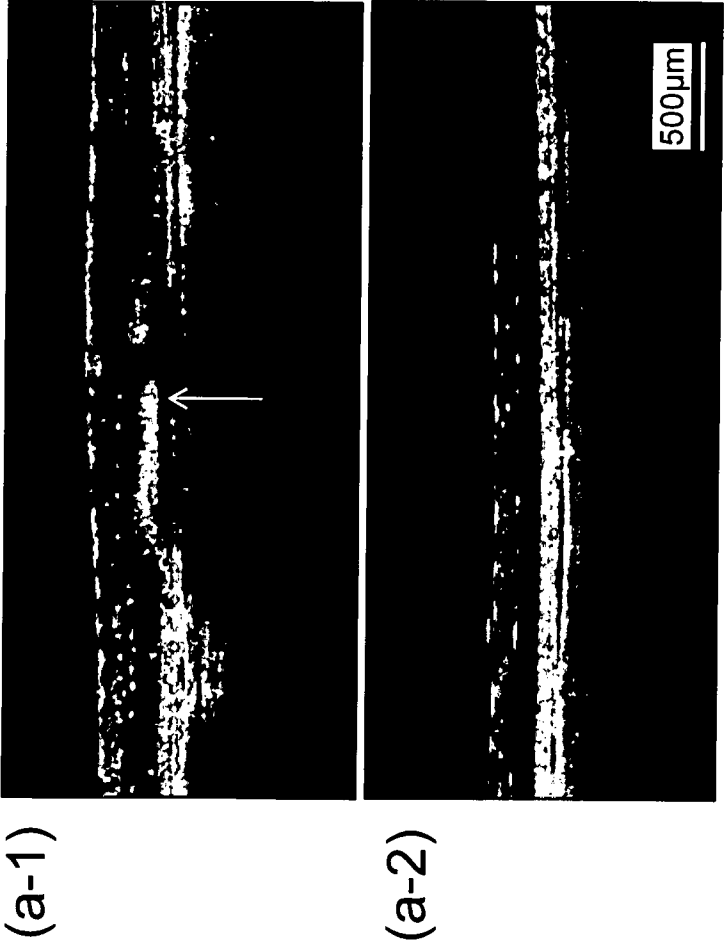


視神経

網膜血管

細胞担持パターン化ナノ薄膜

図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12M3/04
(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L15/00-33/18, A61P1/00-43/00, C12M3/04, C12N5/07

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yoshihiro MORI et al., "Jiko Shijisei Kobunshi Cho Hakumaku ni yoru Saibo Delivery Ryoho no Kaihatsu", The Electrochemical Society of Japan Soritsu 80 Shunen Kinen Taikai Koen Yoshishu, 29 March 2013 (29.03.2013), page 462	1-8
X	Yoshihiro MORI et al., "Jiko Shijisei Nano Hakumaku ni yoru Saibo Delivery Ryoho no Kaihatsu", Society for Chemistry and Micro-Nano Systems Dai 27 Kai Kenkyukai, 23 May 2013 (23.05.2013), page 64	1-8
X Y	Toshinori FUJIE et al., "Development of polymeric nanosheets for the biomedical application", Hyomen, 01 July 2010 (01.07.2010), vol.48, no.7, pages 211 to 219	1-5, 7, 8 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 September, 2014 (26.09.14)

Date of mailing of the international search report
07 October, 2014 (07.10.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Toshinori Fujie, et al., A nano-fibrous assembly of collagen-hyaluronic acid for controlling cell-adhesive properties, Soft Matter, 2010.10.07, Volume 6 Number 19, Pages 4672-4676	1-3, 5
X	JP 2007-006987 A (National University Corporation Hokkaido University), 18 January 2007 (18.01.2007), claims; paragraphs [0053] to [0055], [0062] to [0063] (Family: none)	1-3, 5
X	WO 2006/093207 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 08 September 2006 (08.09.2006), claims; paragraphs [0077] to [0078], [0092], [0105] (Family: none)	1-3, 5
Y	WO 2007/032224 A1 (ArBlast Co., Ltd.), 22 March 2007 (22.03.2007), claims (Family: none)	6
A	Leonardo Ricotti, et al., Adhesion and proliferation of skeletal muscle cells on single layer poly(lactic acid) ultra-thin films, Biomed Microdevices, 2010.10, Volume 12 Issue 5, Pages 809-819	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12M3/04(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61L15/00-33/18, A61P1/00-43/00, C12M3/04, C12N5/07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

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

CAplus/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	森好弘、他、自己支持性高分子超薄膜による細胞デリバリー療法の開発、電気化学会創立 80 周年記念大会 講演要旨集、2013.03.29, 462 頁	1-8
X	森好弘、他、自己支持性ナノ薄膜による細胞デリバリー療法の開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会、2013.05.23, 64 頁	1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 7 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

常見 優

4 C

3 3 4 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	藤枝俊宣、他、医療応用に向けた高分子超薄膜の新展開、表面、 2010.07.01, 第48巻 第7号, 211頁～219頁	1-5, 7, 8 6
X	Toshinori Fujie, et al., A nano-fibrous assembly of collagen-hyaluronic acid for controlling cell-adhesive properties, Soft Matter, 2010.10.07, Volume 6 Number 19, Pages 4672-4676	1-3, 5
X	JP 2007-006987 A (国立大学法人 北海道大学) 2007.01.18, 特許請求の範囲、【0053】～【0055】、【0062】～【0063】 (ファミリーなし)	1-3, 5
X	WO 2006/093207 A1 (国立大学法人 北海道大学) 2006.09.08, 特許請求の範囲、【0077】～【0078】、【0092】、【0105】 (ファミリーなし)	1-3, 5
Y	WO 2007/032224 A1 (アルブラスト株式会社) 2007.03.22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	6
A	Leonardo Ricotti, et al., Adhesion and proliferation of skeletal muscle cells on single layer poly(lactic acid) ultra-thin films, Biomed Microdevices, 2010.10, Volume 12 Issue 5, Pages 809-819	1-8