

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第6206612号
(P6206612)

(45) 発行日 平成29年10月4日(2017.10.4)

(24) 登録日 平成29年9月15日(2017.9.15)

(51) Int.Cl. F1
C12M 3/00 (2006.01) C12M 3/00 Z

請求項の数 5 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2017-42382(P2017-42382)	(73) 特許権者	000222118
(22) 出願日	平成29年3月7日(2017.3.7)		東洋インキSCホールディングス株式会社
審査請求日	平成29年3月7日(2017.3.7)		東京都中央区京橋二丁目2番1号
早期審査対象出願		(72) 発明者	伊藤 越美
			東京都中央区京橋二丁目2番1号 東洋インキSCホールディングス株式会社内
		(72) 発明者	倉内 啓輔
			東京都中央区京橋二丁目2番1号 東洋インキSCホールディングス株式会社内
		(72) 発明者	荻原 直人
			東京都中央区京橋二丁目2番1号 東洋インキSCホールディングス株式会社内
		(72) 発明者	草間 大輔
			東京都中央区京橋二丁目2番1号 トーヨーカラー株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養用袋状容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基材層および表面層を少なくとも二層以上含み、表面層が、細胞培養液と接する袋状容器内面に配置されている内容物として細胞培養液を封入するための細胞培養用袋状容器であって、下記(1)～(4)の条件の全てを満たす細胞培養用袋状容器。

(1) 前記表面層は、撥水剤および熱可塑性樹脂を撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1：5～1：1000の質量比の範囲で含む撥水性材料からなる。

(2) 前記撥水剤が、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である。

(3) 前記撥水性材料用の熱可塑性樹脂が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン - 酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種である。

(4) 前記基材層が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン - 酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む層である。

【請求項2】

撥水剤が、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の細胞培養用袋状容器。

【請求項3】

少なくとも基材層および表面層を含む二層以上の層からなり、表面層が細胞培養液と接する袋状容器内面に配置されている内容物として細胞培養液を封入するための細胞培養用袋状容器の製造方法であって、下記(11)～(15)の条件の全てを満たす製造方法。

(11) 撥水剤および熱可塑性樹脂を撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1 : 5 ~ 1 : 1000 の質量比の範囲で溶融混練し撥水性材料を用意する。

(12) 前記撥水性材料と基材層用の熱可塑性樹脂とを成形し、前記撥水性材料からなる表面層と基材層とを少なくとも含む袋状容器を形成する。

(13) 前記撥水剤が、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である。

10

(14) 前記撥水性材料用の熱可塑性樹脂が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン-酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種である。

(15) 前記基材層用の熱可塑性樹脂が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン-酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種である。

【請求項4】

撥水剤が、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項3記載の細胞培養用袋状容器の製造方法。

【請求項5】

20

撥水性材料と基材層用の熱可塑性樹脂との成形が、インフレーション成形、Tダイフィルムによる成形、およびブロー成形からなる群より選ばれる少なくとも1種の成形方法である、請求項3または4記載の細胞培養用袋状容器の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養用袋状容器及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

再生医学を行う手法として、臓器組織培養、細胞培養の利用、自己組織誘導の研究などがある。将来的には遺伝子操作をした豚などの体内で人間の臓器を養殖するという手法も考えられている。自己組織誘導については、細胞と、分化あるいは誘導因子(シグナル分子)と、足場の3つを巧みに組み合わせることによって、組織再生が可能になるとみられており、従来の材料による機能の回復(工学技術にもとづく人工臓器)には困難が多く限界があること、臓器移植医療が移植適合性などの困難を抱えていることから、再生医学には大きな期待が寄せられている。このような再生医療研究等に使用される細胞培養用容器として、ガラス製や合成樹脂製のフラスコ又はシャーレが使用されていることが知られているが、大量生産には不向きであることや輸送や廃棄の容易さから、袋状容器(バック)の開発が進められている。そのようなものとしては、例えば、ポリ(エチレンブチレン)ポリスチレンブロック共重合体等からなるポリマーアロイから形成された細胞培養用バックが報告されている(特許文献1)。

30

【0003】

細胞培養用容器には優れた細胞増殖能が求められることから、例えば、特許文献2には、フッ素ガスによって容器表面の一部がフッ素置換されたポリエチレン製容器が開示されている。しかし、特許文献2に記載された技術では、毒性の高いフッ素ガスを使用しなければならないことや、短期間での細胞接着の抑制効果は認められるものの、フッ素ガス処理後のポリマーシート表面が経時で徐々に親水性に変化してしまい、長期間での抑制効果に劣るという問題があった。

また、特許文献3には、支持体上に含フッ素ポリマー等を含む表面層を有する細胞培養器材が開示されている。しかし、特許文献3に記載された技術は、専ら含フッ素ポリマー

40

50

等を含む溶液をキャスト法等によってウェルプレート上に表面層を形成しているものであり、表面層を形成する際の残留有機溶剤が細胞の生存に悪影響を及ぼす懸念があるだけでなく、袋状容器として必要な酸素ガス透過性、冷蔵保存性、透明性、ヒートシール性といった細胞培養袋状容器に必要な特性が不十分であるという問題があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平3-65177号公報

【特許文献2】特開2005-218444号公報

【特許文献3】国際公開公報WO2016/121994号

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明が解決しようとする課題は、長期間の細胞培養でも、抗体タンパクの吸着性が抑制でき、細胞の増殖を阻害しない細胞接着性の低い表面性状を有し、冷蔵保存性、透明性、ヒートシール性、遮光性に優れた細胞培養用袋状容器を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の実施態様は、内容物として細胞培養液を封入するための細胞培養用袋状容器であって、袋状容器内面の細胞培養液と接する表面が、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなる撥水性材料からなり、撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比が、撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1 : 5 ~ 1 : 1000 の範囲内である細胞培養用袋状容器である。（ただし、熱可塑性樹脂は撥水剤を除く。）

20

【0007】

また、本発明の実施態様は、撥水剤が、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である上記細胞培養用袋状容器である。

【0008】

また、本発明の実施態様は、撥水剤が、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体およびシリコンオイルからなる群より選ばれる少なくとも1種である上記細胞培養用袋状容器である。

30

【0009】

また、本発明の実施態様は、熱可塑性樹脂が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン-酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種である上記細胞培養用袋状容器である。

【0010】

また、本発明の実施態様は、細胞培養用袋状容器が、少なくとも基材層および表面層を含む二層以上の積層からなり、表面層が、袋状容器内面に配置されており、表面層を構成する材料が、撥水性材料である上記細胞培養用袋状容器である。

40

【0011】

また、本発明の実施態様は、基材層が、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィンおよびエチレン-酢酸ビニル共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む層である上記細胞培養用袋状容器である。

【0012】

また、本発明の実施態様は、上記細胞培養用袋状容器の製造方法であって、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなる撥水性材料を溶融混練して成形する細胞培養用袋状容器の製造方法である。

【0013】

50

また、本発明の実施態様は、内容物として細胞培養液を封入する細胞培養用袋状容器を形成するため撥水性材料であって、袋状容器内面の細胞培養液と接する表面が、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなる撥水性材料からなり、撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比が、撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1 : 5 ~ 1 : 1000 の範囲内である撥水性材料である。(ただし、熱可塑性樹脂は撥水剤を除く。)

【発明の効果】

【0014】

本発明により、長期間の細胞培養でも、抗体タンパクの吸着性が抑制でき、細胞の増殖を阻害しない細胞接着性の低い表面性状を有し、冷蔵保存性、透明性、ヒートシール性、遮光性に優れた細胞培養用袋状容器を提供することができるようになった。

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明について説明する。尚、本明細書では、「細胞培養用袋状容器」を単に「袋」と略記することがある。また、「(メタ)アクリル」とは、アクリルおよび/またはメタクリルを意味する。本発明は、内容物として細胞培養液を封入するための細胞培養用袋状容器であって、袋状容器内面の細胞培養液と接する表面が、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなる撥水性材料からなり、撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比が、撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1 : 5 ~ 1 : 1000 の範囲内であることを特徴とする。

【0016】

(撥水剤)

撥水剤は、本発明の課題を解決できるものであれば、特に制限はないが、表面層の撥水性を発現し易いフッ素樹脂および/またはシリコン樹脂が好ましく、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリクロロトリフルオロエチレン(PCTFE)、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、ポリフッ化ビニル(PVF)、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体、シリコンオイルがより好ましく、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体、シリコンオイルが更に好ましい。

20

【0017】

フッ素含有アクリル共重合体とは、フッ素含有単量体とアクリル単量体との共重合体を指し、含フッ素セグメントとアクリルセグメントとを有するブロック共重合体であることが好ましい。ここで、含フッ素セグメントとは、含フッ素単量体を含むセグメント(部分構造)である。含フッ素単量体としては、パーフルオロアルキル基を有する単量体であることが好ましく、炭素数4~8のパーフルオロアルキル基を有する単量体であることがより好ましい。一方、アクリルセグメントとは、アクリル系単量体を含むセグメント(部分構造)である。ここでアクリル系単量体とは、アクリル単量体およびメタクリル単量体を包含することを意味する。そのようなアクリル系単量体としては、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸t-ブチル、(メタ)アクリル酸ドデシル、(メタ)アクリル酸ヘキサデシル、(メタ)アクリル酸オクタデシル、(メタ)アクリル酸2-エチルヘキシル等の(メタ)アクリル酸アルキルエステル、(メタ)アクリル酸シクロヘキシル等の(メタ)アクリル酸シクロアルキルエステル、(メタ)アクリル酸ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸ヒドロキシブチル等の(メタ)アクリル酸ヒドロキシアルキルエステル、(メタ)アクリル酸グリシジル、(メタ)アクリル酸ベンジル、(メタ)アクリルアミド等が挙げられる。フッ素含有アクリル共重合体の具体例としては、日油社製モディパーFシリーズ(F606、F206、F246、F906、F3636、F226等)等が挙げられる。

30

40

【0018】

ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体とは、ポリオルガノシロキサン基含有単量体とアクリル単量体との共重合体を指し、含ポリオルガノシロキサン基セグメントとアクリルセグメントとを有するブロック共重合体であることが好ましい。ここで、含ポリオルガノシロキサン基セグメントとは、含ポリオルガノシロキサン基単量体を含

50

むセグメント（部分構造）である。含ポリオルガノシロキサン基単量体としては、含ポリメチルシロキサン基単量体またはそのメチル基が一部水素原子で置換された変性体であることが好ましい。一方、アクリルセグメントとは、上記フッ素含有アクリル共重合体におけるアクリルセグメントと同義である。フッ素含有アクリル共重合体の具体例としては、日油社製モディパーFSシリーズ（FS700、FS710、FS720、FS730、FS770等）等が挙げられる。

【0019】

シリコンオイルとは、25℃で液体であるポリオルガノシロキサンを指す。ここで、ポリオルガノシロキサンとしては、ジメチルポリシロキサン、メチルヒドロジェンポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン、アルキル変性シリコーン、アミノ変性シリコーン、エポキシ変性シリコーン、カルボキシル変性シリコーン、メルカプト変性シリコーン、クロロアルキル変性シリコーン、アルキル高級アルコール変性シリコーン、アルコール変性シリコーン、ポリエーテル変性シリコーン等が挙げられる。シリコンオイルの具体例としては、信越化学工業社製シリコンオイルであるKF-99（メチルヒドロジェンシリコーンオイル）、KF-96（ジメチルシリコーンオイル）等が挙げられる。

10

【0020】

ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリクロロトリフルオロエチレン（PCTFE）、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリフッ化ビニル（PVF）の具体例としては、ダイキン工業社製のルブロンシリーズ（PTFE）、ダイキン工業社製のネオフロンPCTFEシリーズ（PCTFE）、ダイキン工業社製のネオフロンPVDFシリーズ（PVDF）、デュポン社製のTedlar（登録商標）PVF（PVF）等が挙げられる。

20

撥水剤は、数平均分子量が2000以上1000000以下であることが好ましい。

また、撥水剤は、単独で用いても良いし、2種以上を組み合わせ用いても良い。

【0021】

（熱可塑性樹脂）

熱可塑性樹脂は、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレンテレフレート、ポリオレフィン等の熱可塑性樹脂が挙げられるが、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィン、エチレン-酢酸ビニル共重合体が好ましい。ポリオレフィンの具体例としては、低密度ポリエチレン（LDPE）、高密度ポリエチレン（HDPE）等のポリエチレン、ポリプロピレン（PP）、ポリ（4-メチルペンテン）等が挙げられる。ポリオレフィンの中でも、高圧重合法で製造される直鎖状低密度ポリエチレンが好ましく、具体例としては、東ソ社製のポリエチレンのニポロンZグレード：TZ250B；日本ポリエチレン社製のUF420、UF421等が挙げられる。また、エチレン-酢酸ビニル共重合体としては、エチレン-酢酸ビニル共重合体およびエチレン-酢酸ビニル共重合体のケン化物が挙げられる。熱可塑性樹脂は、数平均分子量が2000以上1000000以下であることが好ましい。また、熱可塑性樹脂は、単独で用いても良いし、2種以上を組み合わせ用いても良い。

30

【0022】

（撥水性材料）

本明細書でいう撥水性材料とは、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなり、撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比が、撥水剤：熱可塑性樹脂＝1：5～1：1000の範囲内であるものを指す。このような配合比率をとることによって、本発明が解決しようとする課題を解決できるものである。撥水性材料中の撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比は、撥水剤：熱可塑性樹脂＝1：5～1：100が好ましく、1：10～1：100が好ましい。撥水性材料の製造は、特に限定されるものではない。例えば、撥水剤と熱可塑性樹脂とを混合し、ヘンシェルミキサーやタンブラー、ディスパー等で混合しニーダー、ロールミル、スーパーミキサー、ヘンシェルミキサー、シュギミキサー、パーティカルグラニュレーター、ハイスピードミキサー、ファーマトリックス、ボールミル、スチールミル、サンドミル、振動ミル、アトライター、バンバリーミキサーのような回分式混練機、二軸押出機、単軸押出機で混合や熔融混練し、ペレット状、粉体状、顆粒状あるいはビーズ状等の形状の

40

50

撥水性材料を得ることができる。これらはしばしば、マスターバッチまたはコンパウンドと呼ばれる。本発明では、二軸押出機による熔融混練して製造することが好ましい。

【0023】

(表面層)

本発明の細胞培養用袋状容器中で細胞培養液と接する表面層は、上記撥水剤と熱可塑性樹脂とを含有する撥水性材料からなる層である。また、表面層の厚みは、特に制限はないが、概ね20～200 μm が好ましく、シート状であることが好ましい。表面層は、後述する基材層と同時に成形して作成しても良いし、別途作製した基材層と貼り合わせても良い。成形方法としては、カレンダー成形、インフレーション成形、Tダイフィルムによる成形、ブロー成形、ラミネート等が挙げられる。

10

【0024】

(基材層)

基材層は、細胞培養用袋状容器を作成できるものであれば特に制限はなく、上述した表面層で使用される熱可塑性樹脂と同じものを使用することができる。特に、ポリオレフィン、ポリシクロオレフィン、エチレン-酢酸ビニル共重合体は、酸素透過性が優れているため、好ましく使用することができる。また、基材層の厚みは、特に制限はないが、概ね20～200 μm が好ましく、シート状であることが好ましい。基材層は、上述した表面層と同時に成形して作成しても良いし、別途作製した表面層と貼り合わせても良い。成形方法としては、表面層と同じ成形方法が挙げられる。

20

【0025】

(細胞培養用袋状容器)

本発明の細胞培養用袋状容器は、上記シートを袋状にした容器であり、細胞液を導入、導出するポートをそれぞれ設けることが、取り扱いの上で好ましい。容器を構成するシートは、表面層のみからなる単層であってもよいし、基材層および表面層を含む二層以上を含む積層シートであってもよいが、酸素ガス透過性や強度面から、二層以上を含む積層シートであることが好ましい。シートの厚みは、10～500 μm が好ましいが、各層の厚みは、特に制限されるものではなく、用途に応じて適宜変更することができる。シートを袋状にして容器を作成する場合、ヒートシール法によりシートを熱融着して容器を作成することが好ましい。

30

【0026】

(細胞培養)

(細胞)

上記製造方法によって得られた細胞培養用袋状容器を用いた細胞培養は、常法に従って実施できる。培養できる細胞は、臍帯血細胞、造血幹細胞、リンパ球細胞、ハイブリドーマなどの浮遊細胞、肝細胞などの臓器を形成する足場非依存性細胞等が挙げられる。

(培地)

用いることができる培地としては、当業者に良く知られた基礎培地を用いることができ、イーグルMEM培地、DMEM培地、RPMI1640、HamF10培地、HamF12培地等が挙げられる。

40

【実施例】

【0027】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を何ら制限するものではない。なお、実施例における、「部」および「%」は、それぞれ「質量部」および「質量%」を意味する。表1に実施例等で使用した材料を示す。

【0028】

[実施例1]

撥水剤A1部と熱可塑性樹脂A1000部とをスーパーミキサー(カワタ社製)に投入し、25にて3分間攪拌して混合物を得た。次いで、この混合物を二軸押出し機(日本プラコン社製)に投入し、160で熔融混練して押し出し、ペレタイザーでカットすることで、コンパウンド状の撥水性材料を得た。次に、表面層となる材料として上記コンパ

50

ウンド状の撥水性材料、基材層となる材料として熱可塑性樹脂Bを用い、160 で水冷式共押出インフレーション成形機により、表面層と基材層とを有する筒状の積層シートを製造した。その際、表面層の厚さが50 μm、基材層の厚さが50 μmとなるような条件で成形した。この積層シートを10 cm角に切断した。次いで、細胞懸濁液の流入ポートおよび流出ポートを設けた配置にして表面層が袋状容器の内側となるように2枚の積層シートを重ね合わせ、積層シートの縁部をヒートシール法により密着させて細胞培養袋状容器を作成した。

【0029】

[実施例2～63、比較例1～3]

表面層および基材層を構成する撥水剤および熱可塑性樹脂の種類と配合、ならびに表面層および基材層の厚みが表2に示すように成形条件を変更した以外は、実施例1と同様にして、細胞培養袋状容器をそれぞれ作成した。尚、実施例4、9、13、18、22、27、31、36、40、45、49、54、58、63および比較例1は、コンパウンド状の撥水性材料のみ使用して作製した基材層を有さない単層シートの細胞培養袋状容器であるが、表2中では、便宜上、表面層として記載していることを断っておく。

【0030】

(評価)

上記で得られた細胞培養用袋状容器を、以下に示す評価方法に従い評価を行った。評価結果を表2～4に示す。

評価項目1．<水との接触角>

上記シートの表面層における水との接触角を、JISK 6788 (ISO 8296)の方法に基づいて測定した。

評価項目2．<有機溶剤残存量測定>

上記シート10 cm角を測定用試料に用いて、ガスクロマトグラフGC-8A (島津製作所社製、FID検出器使用、キャリアーガス：窒素、カラム充填物質 (ジーエルサイエンス社製)：PEG-HT (5%) - UNIPORT HP (60/80メッシュ)、カラムサイズ：直径3 mm x 3 m、試料投入温度 (インジェクション温度)：150、カラム温度：60、内部標準物質：n-ブタノール)を用いて有機溶剤の残存量を求め、以下の基準で評価した。

：有機溶剤の残存量が1 ppm以下である。良好。

x：有機溶剤の残存量が1 ppm以上である。不良。

【0031】

評価項目3．<酸素ガス透過性>

上記シートについて、JISK 7126-2 (差圧法)に準じて23 での酸素透過度 (cc/m²・24 hr・atm)を測定した。酸素透過度が大きいものほど良好であり、以下の基準で評価した。

評価基準：

：酸素透過度が20 cc/m²・24 hr・atm以上である。極めて良好。

：酸素透過度が10 cc/m²・24 hr・atm以上、20 cc/m²・24 hr・atm未満である。良好。

：酸素透過度が1 cc/m²・24 hr・atm以上、10 cc/m²・24 hr・atm未満である。使用可能。

x：酸素透過度が1 cc/m²・24 hr・atm未満である。不良。

【0032】

評価項目4．<透明性>

上記シートについて、紫外分光光度計を用いて、450 nmにおける光透過率を測定した。光透過率が高いほど透明性が良好であり、以下の基準で評価した。

：光透過率が95%以上である。極めて良好。

：光透過率が90%以上、95%未満である。良好。

：光透過率が85%以上、90%未満である。使用可能。

10

20

30

40

50

×：光透過率が85%以下。不良。

【0033】

評価項目5．＜抗体タンパク吸着性＞

（試験条件）

プレート：96ウェルプレート

酵素、抗体：HPR-IgG(HORSE RADISH PEROXIDASE IMMUNOGLOBULIN)

染色液：TMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)

反応停止液：Stop Solution タカラバイオ社製 WASH and Stop Solution For ELISA With Solution for ELISA without Sulfuric Acid使用

測定機器：MITHRAS 2 LD943-M2Mマイクロプレートリーダー

（手順）

1．細胞培養用袋試料を11mm角にカットし、PBSで10000倍希釈したHPR-IgG溶液1mlずつに浸漬させた。

2．室温で1時間インキュベートした。

3．PBS-T(0.1% Tween 20)を用いて各ウェルを4回洗浄した。

4．TMBZ溶液を各ウェルに1mlずつ分注し、室温で10分間インキュベートする。

5．Stop Solutionを各ウェルに1mlずつ分注後、450nm(副波長650nm)の吸光度Aを測定した。吸光度Aが小さいほど良好であり、以下の基準で評価した。

評価基準：

：吸光度A 0.2。極めて良好。

：0.2 < A 0.6。良好。

：0.6 < A 0.8。使用可能。

×：0.8 < A。不良。

【0034】

評価項目6．＜細胞増殖倍率＞

ヒト白血病細胞株のMOLT-4細胞を懸濁した10%牛胎児血清を含んだRPMI 1640培地(MOLT-4細胞株の播種濃度： 1.0×10^5 cells/ml)5mlをそれぞれ加え、37 / 5%二酸化炭素 / 99%RH(相対湿度)で14日間培養を行い、袋状容器から培養液の一部をサンプリングし、ヘモサイトメーターにより袋内の細胞濃度、細胞増殖倍率(評価結果を表3に示す)を算出した。細胞増殖倍率が大きいほど良好であり、以下の基準で評価した。

評価基準：

：細胞増殖倍率 > 30倍。極めて良好。

：26倍 細胞増殖倍率 30倍。良好。

：21倍 < 細胞増殖倍率 26倍。使用可能。

×：細胞増殖倍率 21倍。不良。

【0035】

評価項目7．＜冷蔵庫保存性＞

上記細胞培養袋状容器を5の冷蔵庫に移し、一年間保管した。下記に示す基準で細胞培養袋状容器の表面層の状態を視覚により判定した。ひび割れの大きさが小さく、ひび割れの数が少ないものほど良好であり、以下の基準で評価した。

評価基準：

：ひび割れない。極めて良好。

：長さ1mm未満の小さなひび割れが4箇所以下認められる。良好。

：長さ1mm未満の小さなひび割れが5箇所以上10箇所以下認められる。使用可能。

×：長さ1mm未満の小さなひび割れが11箇所以上認められる。または長さ1mm以上の大きなひび割れが認められる。不良。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

評価項目 8 . < ヒートシール強度 >

上記シートの表面層同士を接触させた状態で、140、0.4MPa、および1秒間の条件下でヒートシールを行い、試験片を作製した。この試験片を用いて「インストロン3345」（インストロン社製）にて、300mm/分の条件下にて、JIS K6854-2に基づいて180°剥離試験を行った。得られた剥離力をヒートシール強度とした。ヒートシール強度が大きいものほど良好であり、以下の基準で評価した。

評価基準：

- ：ヒートシール強度 > 70 N / 25 mm。極めて良好。
- ：40 N / 25 mm ヒートシール強度 70 N / 25 mm。良好。
- ：25 N / 25 mm < ヒートシール強度 40 N / 25 mm。使用可能。
- ×：ヒートシール強度 25 N / 25 mm。不良。

10

評価項目 9 . < 遮光性 >

D65標準光源の照射下で上記の細胞増殖倍率と同じ方法及び基準で評価を行った。

【 0 0 3 7 】

表2～4より明らかな通り、実施例の袋は、いずれも、表面層の水接触角が大きく（撥水性が高く）、有機溶剤含有量がない袋であり、酸素ガス透過性、透明性、抗体タンパク吸着性、細胞増殖倍率、冷蔵庫保存性、ヒートシール性、遮光性に優れていることが明らかとなった。特に、撥水剤として、フッ素含有アクリル共重合体、ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体、シリコンオイルを使用した例では、これらの評価結果が極めて優れていることが明らかとなった。

20

【 0 0 3 8 】

これに対して、比較例1に用いた細胞培養用袋は、表面層に撥水剤を有していないため、抗体タンパク吸着性と細胞増殖倍率、遮光性が著しく悪化した。また、比較例2の袋は、十分な疎水性表面を形成することができなかつたため、抗体タンパク吸着性、細胞生存率、遮光性が著しく悪化した。理由として、袋内部表面の疎水性が不十分であったことが原因ではないかと思われる。比較例3の袋は、透明性、抗体タンパク吸着性、細胞増殖倍率、ヒートシール性、遮光性が不要であった。

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

表 1

略号	材料	内容
撥水剤A	モディパー(登録商標)F606(日油社製)	フッ素系共重合セグメントとアクリル系共重合セグメントを有するフッ素含有アクリルブロック共重合体
撥水剤B	ルブロンL-5(ダイキン工業社製)	ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)微粒子
撥水剤C	ネオフロンPCTFE M-300P(ダイキン工業社製)	ポリクロロトリフルオロエチレン(PCTFE)
撥水剤D	ネオフロンPVDF VP-825(ダイキン工業社製)	ポリフッ化ビニリデン(PVDF)
撥水剤E	Tedlar(登録商標)PVF(デュポン社製)	ポリフッ化ビニル(PVF)
撥水剤F	KF-96(信越化学工業社製)	シリコンオイル(ジメチルポリシロキサン)
撥水剤G	KF-99(信越化学工業社製)	シリコンオイル(側鎖の一部が水素変性されているジメチルポリシロキサン)
撥水剤H	モディパー(登録商標)FS700(日油社製)	ポリオルガノシロキサン基含有アクリル共重合体
熱可塑性樹脂A	ニポロン(登録商標)-Z TZ250B(東ソー社製)	ポリオレフィン(1-ヘキセナーエチレン共重合体)
熱可塑性樹脂B	メルセン(登録商標)H-6960(東ソー社製)	エチレン-酢酸ビニル共重合体のケン化物
熱可塑性樹脂C	ゼオネックス(登録商標)480(日本ゼオン社製)	ポリシクロオレフィン
熱可塑性樹脂D	ノバテックLL UF420(日本ポリエチレン社製)	直鎖状低密度ポリエチレン

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

【表 2】

例	表面層			基材層			細胞培養用袋状容器									
	撥水性材料			熱可塑性樹脂種類	厚み (μm)	熱可塑性樹脂種類	厚み (μm)	表面層の 水接触角 (°)	有機溶剤 残存量	酸素ガス 透過性	透明性	抗体タンパク 吸着性	細胞増殖 倍率	冷蔵庫 保存性	ヒート シール性	遮光性
	撥水剤 種類	部	厚み (μm)													
1	A	1	A	1000	50	B	50	98	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
2	A	1	B	100	50	A	50	96	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
3	A	1	C	100	50	C	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
4	A	1	A	1000	100	-	-	98	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
5	A	1	A	10	50	B	50	101	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
6	A	1	D	10	50	B	50	101	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
7	A	1	B	5	50	B	50	105	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
8	A	1	C	5	50	B	50	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
9	A	1	C	5	100	-	-	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
10	B	1	A	1000	50	B	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
11	B	1	B	100	50	A	50	93	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
12	B	1	C	100	50	C	50	93	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
13	B	1	A	1000	100	-	-	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
14	B	1	A	10	50	B	50	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
15	B	1	D	10	50	B	50	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
16	B	1	B	5	50	B	50	98	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
17	B	1	C	5	50	B	50	99	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
18	B	1	C	5	100	-	-	99	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
19	C	1	A	1000	50	B	50	93	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
20	C	1	B	100	50	A	50	94	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
21	C	1	C	100	50	C	50	94	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
22	C	1	A	1000	100	-	-	93	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
23	C	1	A	10	50	B	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
24	C	1	D	10	50	B	50	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
25	C	1	B	5	50	B	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
26	C	1	C	5	50	B	50	94	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
27	C	1	C	5	100	-	-	94	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
28	D	1	A	1000	50	B	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
29	D	1	B	100	50	A	50	94	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
30	D	1	C	100	50	C	50	95	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
31	D	1	A	1000	100	-	-	95	○	△	◎	◎	◎	◎	◎	◎
32	D	1	A	10	50	B	50	99	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
33	D	1	D	10	50	B	50	101	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
34	D	1	B	5	50	B	50	98	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
35	D	1	C	5	50	B	50	97	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
36	D	1	C	5	100	-	-	97	○	△	◎	◎	◎	◎	◎	◎

表2

実施例

【 0 0 4 1 】

10

20

30

40

【表 2】

例	表面層				基材層			細胞培養用袋状容器								
	撥水性材料		厚み (μm)	熱可塑性 樹脂 種類	厚み (μm)	熱可塑性 樹脂 種類	厚み (μm)	表面層の 水接触角 ($^\circ$)	有機溶剤 残存量	酸素ガス 透過性	透明性	抗体タンパク 吸着性	細胞増殖 倍率	冷蔵庫 保存性	ヒート シール性	遮光性
	撥水剤 種類	種類														
	37	E	1	A	1000	50	B	50	100	95	○	○	○	○	○	○
	38	E	1	B	100	50	A	50	100	94	○	○	○	○	○	○
	39	E	1	C	100	50	C	50	100	95	○	○	○	○	○	○
	40	E	1	A	1000	100	-	-	100	95	○	△	○	○	○	○
	41	E	1	A	10	50	B	50	100	99	○	○	○	○	○	○
	42	E	1	D	10	50	B	50	100	101	○	○	○	○	○	○
	43	E	1	B	5	50	B	50	100	98	○	○	○	○	○	○
	44	E	1	C	5	50	B	50	100	97	○	○	○	○	○	○
	45	E	1	C	5	100	-	-	100	97	○	△	○	○	○	○
	46	F	1	A	1000	50	B	50	100	98	○	○	○	○	○	○
	47	F	1	B	100	50	A	50	100	97	○	○	○	○	○	○
	48	F	1	C	100	50	C	50	100	95	○	○	○	○	○	○
	49	G	1	A	1000	100	-	-	100	98	○	○	○	○	○	○
	50	G	1	A	50	50	B	50	100	101	○	○	○	○	○	○
	51	G	1	D	50	50	B	50	100	103	○	○	○	○	○	○
	52	G	1	B	75	50	B	50	100	99	○	○	○	○	○	○
	53	G	1	C	75	50	B	50	100	100	○	○	○	○	○	○
	54	G	1	C	75	100	-	-	100	100	○	○	○	○	○	○
	55	H	1	A	1000	50	B	50	100	99	○	○	○	○	○	○
	56	H	1	B	100	50	A	50	100	96	○	○	○	○	○	○
	57	H	1	C	100	50	C	50	100	97	○	○	○	○	○	○
	58	H	1	A	1000	100	-	-	100	99	○	○	○	○	○	○
	59	H	1	A	10	50	B	50	100	101	○	○	○	○	○	○
	60	H	1	D	10	50	B	50	100	103	○	○	○	○	○	○
	61	H	1	B	5	50	B	50	100	101	○	○	○	○	○	○
	62	H	1	C	5	50	B	50	100	101	○	○	○	○	○	○
	63	H	1	C	5	100	-	-	100	101	○	○	○	○	○	○
	1	-	-	A	-	100	-	-	100	85	○	△	○	○	△	x
	2	A	1	B	2000	50	B	50	100	86	○	△	○	○	△	x
	3	A	1	B	2	50	B	50	100	91	○	x	○	○	△	x
	比較例															

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

【表3】

表3

例	細胞培養前 (cells × 10 ⁵ /ml)	14日培養後 (cells × 10 ⁵ /ml)	細胞増殖倍率	細胞増殖倍率
1	1.0	32.0	32	◎
2	1.0	31.0	31	◎
3	1.0	31.2	31.2	◎
4	1.0	31.3	31.3	◎
5	1.0	31.1	31.1	◎
6	1.0	31.5	31.5	◎
7	1.0	31.1	31.1	◎
8	1.0	31.1	31.1	◎
9	1.0	31.0	31.2	◎
10	1.0	31.1	31	◎
11	1.0	31.0	31	◎
12	1.0	31.0	31	◎
13	1.0	31.0	31	◎
14	1.0	31.0	31	◎
15	1.0	31.0	31	◎
16	1.0	31.0	31	◎
17	1.0	31.0	31	◎
18	1.0	31.0	31	◎
19	1.0	27.1	26.1	○
20	1.0	28.7	26.7	○
21	1.0	26.9	26.9	○
22	1.0	26.7	26.7	○
23	1.0	27.0	27.0	○
24	1.0	26.3	26.3	○
25	1.0	26.5	26.5	○
26	1.0	26.2	26.2	○
27	1.0	26.7	26.7	○
28	1.0	30.8	30.8	◎
29	1.0	31.1	31.1	◎
30	1.0	31.0	31.0	◎
31	1.0	30.3	30.3	◎
32	1.0	30.1	30.1	◎
33	1.0	30.5	30.5	◎
34	1.0	31.0	31.0	◎
35	1.0	31.0	31.0	◎
36	1.0	31.1	31.1	◎
37	1.0	27.0	27.0	○
38	1.0	29.7	29.7	○
39	1.0	27.8	27.8	○
40	1.0	26.9	26.9	○
41	1.0	28.0	28.0	○
42	1.0	27.3	27.3	○
43	1.0	26.5	26.5	○
44	1.0	26.1	26.1	○
45	1.0	27.7	27.7	○
46	1.0	32.0	32.0	◎
47	1.0	33.1	33.1	◎
48	1.0	33.1	33.1	◎
49	1.0	35.1	35.1	◎
50	1.0	32.1	32.1	◎
51	1.0	34.1	34.1	◎
52	1.0	33.0	33.0	◎
53	1.0	32.0	32.0	◎
54	1.0	31.6	31.6	◎
55	1.0	32.2	32.2	◎
56	1.0	33.1	33.1	◎
57	1.0	33.3	33.3	◎
58	1.0	35.4	35.4	◎
59	1.0	32.5	32.5	◎
60	1.0	34.0	34.0	◎
61	1.0	33.1	33.1	◎
62	1.0	32.1	32.1	◎
63	1.0	31.5	31.5	◎
比較例 1	1.0	15.0	15	×
比較例 2	1.0	20.0	20	×
比較例 3	1.0	18.0	18	×

10

20

30

40

【0043】

【表4】

表4

例	細胞培養前 (cells × 10 ⁵ /ml)	14日培養後 (cells × 10 ⁵ /ml)	細胞増殖倍率	遮光性
1	1.0	32.0	32	◎
2	1.0	31.0	31	◎
3	1.0	31.2	31.2	◎
4	1.0	31.3	31.3	◎
5	1.0	31.1	31.1	◎
6	1.0	31.5	31.5	◎
7	1.0	31.1	31.1	◎
8	1.0	31.1	31.1	◎
9	1.0	31.0	31.2	◎
10	1.0	27.0	27.0	○
11	1.0	27.0	27.0	○
12	1.0	27.0	27.0	○
13	1.0	27.0	27.0	○
14	1.0	27.0	27.0	○
15	1.0	27.0	27.0	○
16	1.0	27.0	27.0	○
17	1.0	27.0	27.0	○
18	1.0	27.0	27.0	○
19	1.0	26.1	26.1	○
20	1.0	26.7	26.7	○
21	1.0	26.9	26.9	○
22	1.0	26.7	26.7	○
23	1.0	27.0	27.0	○
24	1.0	26.3	26.3	○
25	1.0	26.5	26.5	○
26	1.0	26.2	26.2	○
27	1.0	26.7	26.7	○
28	1.0	30.8	30.8	◎
29	1.0	31.1	31.1	◎
30	1.0	31.0	31.0	◎
31	1.0	30.3	30.3	◎
32	1.0	30.1	30.1	◎
33	1.0	30.5	30.5	◎
34	1.0	31.0	31.0	◎
35	1.0	31.0	31.0	◎
36	1.0	31.1	31.1	◎
37	1.0	27.0	27.0	○
38	1.0	29.7	29.7	○
39	1.0	27.8	27.8	○
40	1.0	26.9	26.9	○
41	1.0	28.0	28.0	○
42	1.0	27.3	27.3	○
43	1.0	26.5	26.5	○
44	1.0	26.1	26.1	○
45	1.0	27.7	27.7	○
46	1.0	32.0	32.0	◎
47	1.0	33.1	33.1	◎
48	1.0	33.1	33.1	◎
49	1.0	35.1	35.1	◎
50	1.0	32.1	32.1	◎
51	1.0	34.1	34.1	◎
52	1.0	33.0	33.0	◎
53	1.0	32.0	32.0	◎
54	1.0	31.6	31.6	◎
55	1.0	32.2	32.2	◎
56	1.0	33.1	33.1	◎
57	1.0	33.3	33.3	◎
58	1.0	35.4	35.4	◎
59	1.0	32.5	32.5	◎
60	1.0	34.0	34.0	◎
61	1.0	33.1	33.1	◎
62	1.0	32.1	32.1	◎
63	1.0	31.5	31.5	◎
比較例 1	1.0	15.0	15	×
比較例 2	1.0	20.0	20	×
比較例 3	1.0	18.0	18	×

10

20

30

40

【要約】

【課題】

長期間の細胞培養でも、抗体タンパクの吸着性が抑制でき、細胞の増殖を阻害しない細胞接着性の低い表面性状を有し、冷蔵保存性、透明性、ヒートシール性、遮光性に優れた細胞培養用袋状容器を提供すること。

【解決手段】

内容物として細胞培養液を封入するための細胞培養用袋状容器であって、袋状容器内面の細胞培養液と接する表面が、撥水剤および熱可塑性樹脂を含んでなる撥水性材料からなり、撥水剤と熱可塑性樹脂との質量比が、撥水剤：熱可塑性樹脂 = 1 : 5 ~ 1 : 1000 の範囲内である細胞培養用袋状容器。

50

【選択図】なし

フロントページの続き

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 国際公開第2016/121994(WO,A1)
特開2003-079360(JP,A)
特開平07-289235(JP,A)
特開昭63-198972(JP,A)
国際公開第2015/163043(WO,A1)
特開平11-028083(JP,A)
特開平03-065177(JP,A)
特開2005-218444(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)