

(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  
2020年10月8日(08.10.2020)



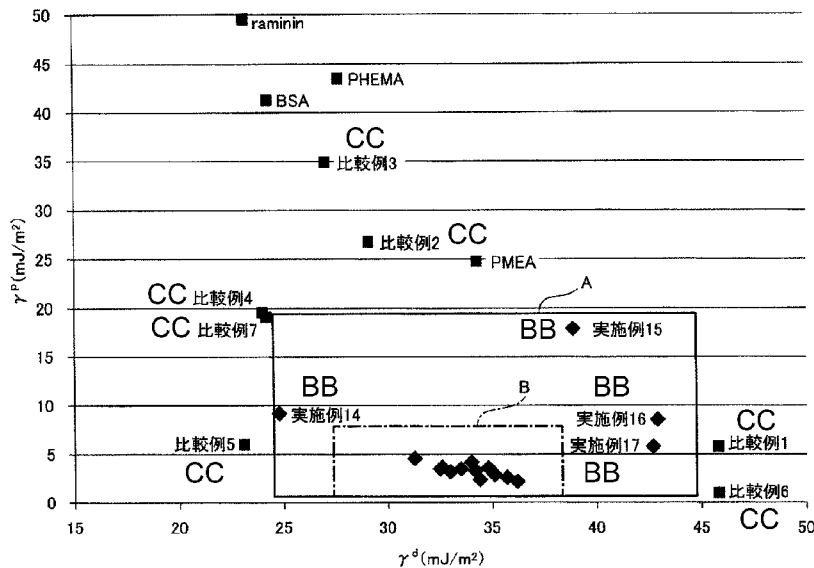
(10) 国際公開番号  
**WO 2020/203769 A1**

- (51) 国際特許分類:  
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/014013
- (22) 国際出願日: 2020年3月27日(27.03.2020)
- (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 2019-068406 2019年3月29日(29.03.2019) JP
- (71) 出願人: 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号 Osaka (JP).

- (72) 発明者: 羽根田 聡 (HANEDA, Satoshi); 〒6180021 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 真鍋 百里子 (MANABE, Yuriko); 〒6180021 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 石井 亮馬 (ISHII, Ryoma); 〒6180021 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 井口 博貴 (IGUCHI, Hiroki); 〒6180021 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 山内 博史 (YAMAUCHI, Hiroshi); 〒6180021 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 大村 貴宏 (OOMURA, Takahiro); 〒3490198 埼玉県蓮田市黒浜3-5-3 積水化学工業株式会社内 Saitama (JP).

(54) Title: CELL CULTURE SCAFFOLD MATERIAL, CELL CULTURE VESSEL, CELL CULTURE FIBER AND METHOD FOR CULTURING CELL

(54) 発明の名称: 細胞培養用足場材料、細胞培養用容器、細胞培養用繊維及び細胞の培養方法



BB Example  
CC Comparative example

(57) Abstract: Provided is a cell culture scaffold material having moderate hydrophilicity and strength, having high fixability after seeding of cells, and enabling cell proliferation with high efficiency. In a cell culture scaffold material according to the present invention, the dispersion component  $\gamma^d$  of the surface free energy is 24.5 mJ/m<sup>2</sup> or more and less than 45.0 mJ/m<sup>2</sup>, and the dipole component  $\gamma^p$  of the surface free energy is 1.0 mJ/m<sup>2</sup> or more and less than 20.0 mJ/m<sup>2</sup>.

(57) 要約: 適度な親水性と強度とを備え、細胞の播種後の定着性が高く、高効率に細胞増殖が可能な細胞培養用足場材料を提供する。本発明に係る細胞培養用足場材料は、表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ が24.5 mJ/m<sup>2</sup>以上45.0 mJ/m<sup>2</sup>未満であり、表面自由エネルギーの双極子成分 $\gamma^p$ が1.0 mJ/m<sup>2</sup>以上20.0 mJ/m<sup>2</sup>未満である。

[続葉有]



WO 2020/203769 A1

(74) 代理人: 特許業務法人 宮▲崎▼・目次特許事務所 (MIYAZAKI & METSUGI); 〒5400028 大阪府大阪市中央区常盤町1丁目3番8号 中央大通F Nビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

細胞培養用足場材料、細胞培養用容器、細胞培養用繊維及び細胞の培養方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、細胞を培養するために用いられる細胞培養用足場材料に関する。また、本発明は、上記細胞培養用足場材料を用いた細胞培養用容器、細胞培養用繊維及び細胞の培養方法に関する。

### 背景技術

[0002] 学術分野、創薬分野及び再生医療分野等の研究開発において、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ及びサル等の動物細胞が用いられている。動物細胞を培養するために用いられる足場材料として、ラミニン及びビトロネクチン等の接着タンパク質、並びにマウス肉腫由来のマトリゲル等の天然高分子材料が用いられている。

[0003] また、下記の特許文献1～3に示すように合成樹脂を用いた足場材料も知られている。

[0004] 下記の特許文献1には、ポリビニルアセタール化合物からなる成形物又は該ポリビニルアセタール化合物と水溶性多糖類とからなる成形物からなり、該ポリビニルアセタール化合物のアセタール化度が20～60モル%である細胞培養用担体が開示されている。

[0005] 下記の特許文献2には、未分化細胞を未分化の状態で培養するための足場材料であって、ハイドロゲルからなる足場材料が開示されている。

[0006] また、下記の特許文献3には、多能性幹細胞の未分化性を維持するための細胞培養方法であって、ポリロタキサンプロック共重合体で被覆された表面を有する培養器上で該多能性幹細胞を培養する工程を含む方法が開示されている。

### 先行技術文献

## 特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2006-314285号公報  
特許文献2：特開2010-158180号公報  
特許文献3：特開2017-23008号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 足場材料として天然高分子材料を用いることで、播種後の細胞の定着性を高めることができる。しかしながら、天然高分子材料は、高価であったり、天然由来物質であるためロット間のばらつきが大きかったり、動物由来の成分による安全上の懸念があったりする。
- [0009] 一方、特許文献1～3に記載のような合成樹脂を用いた足場材料は、天然高分子材料を用いた足場材料と比べて、安価であり、ロット間のばらつきが小さく、かつ安全性に優れる。しかしながら、特許文献1～3に記載の合成樹脂を用いた足場材料は、親水性が非常に高いため、該足場材料が液体培地によって膨潤し、該足場材料が剥がれるなどして強度に劣ることがある。また、特許文献1～3に記載の合成樹脂を用いた足場材料では、細胞の播種後の定着性が低く、細胞が十分に増殖しないことがある。
- [0010] 従来、適度な親水性と強度とを備え、細胞の播種後の定着率が高く、高効率に細胞増殖が可能な細胞培養用足場材料を作製することは困難であった。
- [0011] 本発明の目的は、適度な親水性と強度とを備え、細胞の播種後の定着性が高く、高効率に細胞増殖が可能な細胞培養用足場材料を提供することである。また、本発明は、上記細胞培養用足場材料を用いた細胞培養用容器、細胞培養用繊維及び細胞の培養方法を提供することも目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0012] 本発明の広い局面によれば、表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ が24.5 mJ/m<sup>2</sup>以上45.0 mJ/m<sup>2</sup>未満であり、表面自由エネルギーの双極子成分 $\gamma^p$ が1.0 mJ/m<sup>2</sup>以上20.0 mJ/m<sup>2</sup>未満である、細胞培養用足

場材料が提供される。

- [0013] 本発明に係る細胞培養用足場材料のある特定の局面では、前記細胞培養用足場材料は、合成樹脂を含む。
- [0014] 本発明に係る細胞培養用足場材料の他の特定の局面では、前記合成樹脂がポリビニルアセタール骨格及びポリ（メタ）アクリル酸エステル骨格の内の少なくとも一方の骨格を有する。
- [0015] 本発明に係る細胞培養用足場材料のさらに他の特定の局面では、前記合成樹脂がポリビニルアセタール樹脂である。
- [0016] 本発明の広い局面によれば、合成樹脂を含む細胞培養用足場材料であって、前記合成樹脂がポリビニルアセタール樹脂を含み、前記ポリビニルアセタール樹脂のアセタール化度が60モル%よりも高い、細胞培養用足場材料が提供される。
- [0017] 本発明に係る細胞培養用足場材料のある特定の局面では、前記ポリビニルアセタール樹脂が、アミン構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位からなる群から選択される少なくとも一種の構成単位を有する。
- [0018] 本発明に係る細胞培養用足場材料の他の特定の局面では、前記ポリビニルアセタール樹脂において、前記アミン構造を有する構成単位、前記イミン構造を有する構成単位、及び前記アミド構造を有する構成単位の合計の含有量が、0.1モル%以上30モル%以下である。
- [0019] 本発明に係る細胞培養用足場材料のさらに他の特定の局面では、前記細胞が、体細胞、幹細胞、前駆細胞又は分化細胞である。
- [0020] 本発明の広い局面によれば、細胞の培養領域の少なくとも一部に上述した細胞培養用足場材料を備える、細胞培養用容器が提供される。
- [0021] 本発明の広い局面によれば、上述した細胞培養用足場材料を含む、細胞培養用繊維が提供される。
- [0022] 本発明の広い局面によれば、上述した細胞培養用足場材料を用いる、細胞の培養方法が提供される。

[0023] 本発明に係る細胞の培養方法のある特定の局面では、前記細胞培養用足場材料上に細胞塊を播種する工程を備える。

### 発明の効果

[0024] 本発明によれば、適度な親水性と強度とを備え、細胞の播種後の定着性が高く、高効率に細胞増殖が可能な細胞培養用足場材料及び上記細胞培養用足場材料を用いた細胞培養用容器、細胞培養用繊維及び細胞の培養方法が提供される。

### 図面の簡単な説明

[0025] [図1]図1は主な合成樹脂の表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ と双極子成分 $\gamma^p$ との関係を示す図である。

[図2]図2は図1の一部拡大図である。

[図3]図3は図1の一部拡大図である。

### 発明を実施するための形態

[0026] 以下に、実施形態を挙げて本発明の説明を行うが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0027] [細胞培養用足場材料1]

本発明に係る細胞培養用足場材料の第一の態様は、該細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ が $24.5 \text{ mJ/m}^2$ 以上 $45.0 \text{ mJ/m}^2$ 未満であり、表面自由エネルギーの双極子成分 $\gamma^p$ が $1.0 \text{ mJ/m}^2$ 以上 $20.0 \text{ mJ/m}^2$ 未満である。

[0028] 本発明者らは、細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーを制御することで、上述の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0029] 上記表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ 及び双極子成分 $\gamma^p$ は、K a e l b l e - U y の理論式を用いて算出される。K a e l b l e - U y の理論式は、下記式(1)で示されるように、トータル表面自由エネルギー $\gamma$ が、分散成分 $\gamma^d$ と双極子成分 $\gamma^p$ との和になるとの仮定に基づく理論式である。

[0030]

[数1]

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (1)$$

[0031] また、K a e l b l e - U y の理論式では、液体の表面自由エネルギーを  $\gamma_l$  ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) とし、固体の表面自由エネルギーを  $\gamma_s$  ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) とし、接触角を  $\theta$  ( $^\circ$ ) とすると、下記式 (2) が成立する。

[0032] [数2]

$$\gamma_l (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_l^p} \quad (2)$$

[0033] したがって、液体の表面自由エネルギー  $\gamma_l$  が既知である液体を2種類用いて、細胞培養用足場材料を用いて形成された樹脂膜に対する接触角  $\theta$  を測定し、 $\gamma_s^d$  及び  $\gamma_s^p$  の連立方程式を解くことにより、細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーの分散成分  $\gamma^d$  及び双極子成分  $\gamma^p$  を求めることができる。

[0034] なお、本発明においては、上記表面自由エネルギー  $\gamma_l$  が既知である2種類の上記液体として、純水及びジヨードメタンが用いられる。

[0035] 上記接触角  $\theta$  は、接触角計 (例えば、協和界面化学社製「DMo-701」) を用いて、以下のようにして測定される。

[0036] 細胞培養用足場材料を用いて形成された樹脂膜の表面に純水又はジヨードメタンを  $1 \mu\text{L}$  滴下する。滴下してから30秒後の純水と、該樹脂膜とのなす角度を、純水に対する接触角  $\theta$  とする。また、同様に、滴下してから30秒後のジヨードメタンと、該樹脂膜とのなす角度を、ジヨードメタンに対する接触角  $\theta$  とする。

[0037] 上記表面自由エネルギーの分散成分  $\gamma^d$ 、及び双極子成分  $\gamma^p$  を好適に調整できる観点から、上記細胞培養用足場材料は、合成樹脂を含むことが好ましい。上記表面自由エネルギーの分散成分  $\gamma^d$ 、及び双極子成分  $\gamma^p$  をより一層好適に調整できる観点から、上記合成樹脂は、ポリビニルアセタール骨格及びポリ (メタ) アクリル酸エステル骨格の内の少なくとも一方の骨格を有することが好ましい。

- [0038] 図1は主な合成樹脂の表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ と双極子成分 $\gamma^p$ との関係を示す図である。図2及び図3はそれぞれ図1の一部拡大図である。なお、図1～3において、後述の実施例及び比較例で用いた合成樹脂の結果も示している。
- [0039] 本発明の効果を発揮する観点から、上記細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ は、 $24.5 \text{ mJ/m}^2$ 以上 $45.0 \text{ mJ/m}^2$ 未満であり、双極子成分 $\gamma^p$ は、 $1.0 \text{ mJ/m}^2$ 以上 $20.0 \text{ mJ/m}^2$ 未満である。
- [0040] 本発明の効果をより一層効果的に発揮させる観点からは、上記細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーの分散成分 $\gamma^d$ は、 $28.0 \text{ mJ/m}^2$ 以上であることが好ましく、 $32.8 \text{ mJ/m}^2$ 以上であることがより好ましく、 $38.0 \text{ mJ/m}^2$ 以下であることが好ましく、 $36.0 \text{ mJ/m}^2$ 以下であることがより好ましい。
- [0041] 本発明の効果をより一層効果的に発揮させる観点からは、上記細胞培養用足場材料の表面自由エネルギーの双極子成分 $\gamma^p$ は、 $2.5 \text{ mJ/m}^2$ 以上であることが好ましく、 $10.0 \text{ mJ/m}^2$ 以下であることが好ましく、 $5.0 \text{ mJ/m}^2$ 以下であることがより好ましい。
- [0042] 上記分散成分 $\gamma^d$ 及び上記双極子成分 $\gamma^p$ は、例えば、以下で述べる合成樹脂の骨格を適宜変更することにより制御することができる。
- [0043] 上記分散成分 $\gamma^d$ は、例えば、合成樹脂における非極性官能基の含有量を増やしたり、環状構造を有する官能基を導入したりすることにより大きくすることができ、合成樹脂におけるブチル基の含有量を減らすこと等により小さくすることができる。
- [0044] 上記双極子成分 $\gamma^p$ は、例えば、合成樹脂における極性官能基の含有量を増やしたり、エーテル構造を含む官能基を導入したりすることにより大きくすることができ、非極性官能基であるブチル基の含有量を増やすことにより小さくすることができる。
- [0045] (合成樹脂)



合成樹脂は、重合性モノマー（以下、単に「モノマー」ともいう）を重合（重縮合も含む）させて得られるポリマー（以下、単に「ポリマー」ともいう）を主成分とするものをいう。上記ポリマーは、1種だけのモノマーを重合させたホモポリマーであってもよく、2種以上のモノマーを重合させたコポリマーであってもよい。

[0046] 上記ポリマーとしては、例えば、飽和又は不飽和炭化水素、芳香族炭化水素、飽和又は不飽和脂肪酸、芳香族カルボン酸、飽和又は不飽和ケトン、芳香族ケトン、飽和又は不飽和アルコール、芳香族アルコール、飽和又は不飽和アミン、芳香族アミン、飽和又は不飽和チオール、芳香族チオール、有機ケイ素化合物等の1種以上の重合性モノマーからなるポリマーが挙げられる。

[0047] 具体的な上記ポリマーとしては、例えば、ポリオレフィン、ポリエーテル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール樹脂、ポリエステル、ポリ（メタ）アクリル酸エステル、エポキシ樹脂、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリカーボネート、セルロース、ポリペプチド等が挙げられる。

[0048] 細胞の定着性をより一層高める観点からは、上記合成樹脂は、ポリビニルアセタール骨格及びポリ（メタ）アクリル酸エステル骨格の内の少なくとも一方の骨格を有することが好ましく、ポリビニルアセタール樹脂であることが好ましい。

[0049] 細胞の定着性をより一層高める観点から、上記ポリマーは、ポリ（メタ）アクリル酸エステル又はポリビニルアセタール樹脂であることが好ましく、ポリビニルアセタール樹脂であることがより好ましい。

[0050] 上記ポリマーは、一種類のみを用いてもよく、二種類以上を組み合わせる用いてもよい。二種類以上のポリマーを組み合わせる場合は、二種類以上のポリマーを混合して用いてもよく、二種類以上のポリマーの骨格を化学結合させたポリマーとして用いてもよい。合成樹脂として、二種類以上のポリマーを組み合わせる場合には、ポリ（メタ）アクリル酸エステルと、ポリビニ

ルアセタールとを組み合わせることが好ましい。

[0051] 本明細書において、「(メタ)アクリル酸類」とは、(メタ)アクリル酸エステル及び(メタ)アクリル酸からなる群より選択される少なくとも1種をいう。またポリ(メタ)アクリル酸類は、そのモノマーである(メタ)アクリル酸エステル又は(メタ)アクリル酸を重合することによって得られる重合体であるが、(メタ)アクリル酸エステル又は(メタ)アクリル酸以外のモノマーを共重合したものも含む。

[0052] 上記(メタ)アクリル酸エステルとしては特に限定されないが、(メタ)アクリル酸アルキルエステル、(メタ)アクリル酸環状アルキルエステル、(メタ)アクリル酸アリールエステル、(メタ)アクリルアミド類、(メタ)アクリル酸ポリエチレングリコール類、(メタ)アクリル酸ホスホリルコリン等が挙げられる。

[0053] 上記(メタ)アクリル酸アルキルエステルとしては、例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、*n*-プロピル(メタ)アクリレート、イソプロピル(メタ)アクリレート、*n*-ブチル(メタ)アクリレート、イソブチル(メタ)アクリレート、*t*-ブチル(メタ)アクリレート、*n*-オクチル(メタ)アクリレート、イソオクチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ノニル(メタ)アクリレート、イソノニル(メタ)アクリレート、デシル(メタ)アクリレート、イソデシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート、イソテトラデシル(メタ)アクリレート等が挙げられる。

[0054] なお、これらの(メタ)アクリル酸アルキルエステルは、特に制限はないが、炭素原子数1~3のアルコキシ基、テトラヒドロフルフリル基等の種々の置換基で置換されていてもよい。このような(メタ)アクリル酸アルキルエステルの例としては、メトキシエチルアクリレート、テトラヒドロフルフリルアクリレート等が挙げられる。

[0055] 上記(メタ)アクリル酸環状アルキルエステルとしては、例えば、シクロ

ヘキシル（メタ）アクリレート、イソボルニル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0056] 上記（メタ）アクリル酸アリアルエステルとしては、例えば、フェニル（メタ）アクリレート、ベンジル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0057] 上記アクリルアミド類としては、例えば、（メタ）アクリルアミド、N-イソプロピル（メタ）アクリルアミド、N-tert-ブチル（メタ）アクリルアミド、N, N'-ジメチル（メタ）アクリルアミド、（3-（メタ）アクリルアミドプロピル）トリメチルアンモニウムクロリド、4-（メタ）アクリロイルモルホリン、3-（メタ）アクリロイル-2-オキサゾリジノン、N-[3-（ジメチルアミノ）プロピル]（メタ）アクリルアミド、N-（2-ヒドロキシエチル）（メタ）アクリルアミド、N-メチロール（メタ）アクリルアミド、6-（メタ）アクリルアミドヘキサン酸等が挙げられる。

[0058] 上記（メタ）アクリル酸ポリエチレングリコール類としては、例えば、メトキシーポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシーポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、ヒドロキシーポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、メトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、ヒドロキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート、メトキシートリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシートリエチレングリコール（メタ）アクリレート、ヒドロキシートリエチレングリコール（メタ）アクリレート等が挙げられる。

[0059] 上記（メタ）アクリル酸ホスホリルコリンとしては、例えば、2-（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられる。

[0060] 上記（メタ）アクリル酸エステル以外のモノマーとしては、特に限定はなく、（メタ）アクリル酸、エチレン、ビニルエステル等が挙げられる。

[0061] 上記（メタ）アクリル酸エステルは単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

- [0062] なお、本明細書において、「(メタ)アクリル」とは、「アクリル」又は「メタクリル」を意味し、「(メタ)アクリレート」とは、「アクリレート」又は「メタクリレート」を意味する。
- [0063] なお、細胞の定着性を一層効果的に発揮させる観点からは、本発明に係る細胞培養用足場材料の第一の態様は、以下で述べる第二の態様を組み合わせたものであることが好ましい。
- [0064] [細胞培養用足場材料2]  
本発明に係る細胞培養用足場材料の第二の態様は、合成樹脂を含み、該合成樹脂がポリビニルアセタール樹脂を含み、該ポリビニルアセタール樹脂のアセタール化度が60モル%よりも高い。
- [0065] 本発明者らは、アセタール化度が60モル%よりも高いポリビニルアセタール樹脂を含む合成樹脂を用いることで、上述の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0066] なお、本発明に係る細胞培養用足場材料は、アセタール化度が60モル%よりも高いポリビニルアセタール樹脂のみからなる態様が含まれる。
- [0067] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、適度な親水性と強度とを備えるため、細胞の播種後の定着性が向上する。特にフィーダー細胞や接着タンパク質を含まない無血清培地培養において、細胞播種後の初期定着率が向上する。
- [0068] 従来、細胞培養用足場材料として合成樹脂を用いる場合に、合成樹脂のアセタール化度を60モル%よりも高く設定することは報告されていなかった。アセタール化度の増加に伴う水酸基の割合の低下により細胞培養用足場材料の親水性が低下することで、細胞の播種後の定着性の低下及び細胞培養に必要な多糖類等の透過性の低下が懸念されていたからである。ところが、本発明者は、親水性よりも強度が重要であることを知見し、アセタール化度を60モル%よりも高く設定して細胞培養用足場材料の強度を向上することで、細胞の播種後の定着性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0069] 以下、ポリビニルアセタール樹脂について詳細に説明する。

[0070] (ポリビニルアセタール樹脂)

ポリビニルアセタール樹脂は、ポリビニルアルコールをアルデヒドによりアセタール化することにより合成することができる。ポリビニルアセタール樹脂は、側鎖にアセチル基と水酸基とアセタール基とを有する。

[0071] ポリビニルアルコールのアセタール化に用いられるアルデヒドとしては、特に限定されない。上記アルデヒドとしては、例えば、炭素数が1～10のアルデヒド等が挙げられる。上記アルデヒドは、鎖状脂肪族基、環状脂肪族基又は芳香族基を有していてもよい。上記アルデヒドは、鎖状アルデヒドであってもよく、環状アルデヒドであってもよい。

[0072] 上記アルデヒドとしては、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナール、ノナナール、デカナール、アクロレイン、ベンズアルデヒド、シンナムアルデヒド、ペリルアルデヒド、ホルミルピリジン、ホルミルイミダゾール、ホルミルピロール、ホルミルピペリジン、ホルミルトリアゾール、ホルミルテトラゾール、ホルミルインドール、ホルミルイソインドール、ホルミルプリン、ホルミルベンゾイミダゾール、ホルミルベンゾトリアゾール、ホルミルキノリン、ホルミルイソキノリン、ホルミルキノキサリン、ホルミルシンノリン、ホルミルプテリジン、ホルミルフラン、ホルミルオキサラン、ホルミルオキサソラン、ホルミルチオフェン、ホルミルチオラン、ホルミルチアン、ホルミルアデニン、ホルミルグアニン、ホルミルシトシン、ホルミルチミン、及びホルミルウラシル等が挙げられる。上記アルデヒドは、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。

[0073] 上記アルデヒドは、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、又はペンタナールであることが好ましく、ブチルアルデヒドであることがより好ましい。したがって、ポリビニルアセタール樹脂は、ポリビニルブチラール樹脂であることがより好ましい。

[0074] 上記ポリビニルアセタール樹脂の平均重合度は、好ましくは100以上、より好ましくは200以上、更に好ましくは500以上、特に好ましくは1

500以上、好ましくは6000以下、より好ましくは3000以下、更に好ましくは2500以下である。上記平均重合度が上記下限以上であると、液体培地で膨潤しても細胞培養用足場材料の強度を好適に保つことができ、細胞増殖性が向上する。上記平均重合度が上記上限以下であると、取り扱い性を高めることができ、細胞培養用足場材料の成形性を高めることができる。

[0075] 上記ポリビニルアセタール樹脂のアセタール化度（ポリビニルブチラール樹脂の場合にはブチラール化度）は、好ましくは60モル%以上、より好ましくは65モル%以上、好ましくは90モル%以下、より好ましくは85モル%以下である。上記アセタール化度が上記下限以上であると、細胞の定着性に優れ、高効率に細胞増殖を行うことができる。上記アセタール化度が上記上限以下であると、溶剤への溶解性を良好にすることができる。

[0076] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、アセチル化度（アセチル基量）は、好ましくは0.0001モル%以上、好ましくは5モル%以下である。

[0077] 上記ポリビニルアセタール樹脂のアセタール度及びアセチル化度は、<sup>1</sup>H-NMR（核磁気共鳴スペクトル）により測定することができる。

[0078] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、ビニル化合物が共重合されていてもよい。上記ポリビニルアセタール樹脂は、ビニル化合物との共重合体であってもよい。本発明では、ビニル基と共重合体したポリビニルアセタール樹脂も、ポリビニルアセタール樹脂とみなす。上記ビニル化合物は、ビニル基（H<sub>2</sub>C=C H-）を有する化合物である。上記ビニル化合物は、ビニル基を有する構成単位を有する重合体であってもよい。

[0079] 上記共重合体は、ポリビニルアセタール樹脂とビニル化合物とのブロック共重合体であってもよく、ポリビニルアセタール樹脂にビニル化合物がグラフトしたグラフト共重合体であってもよい。上記共重合体は、グラフト共重合体であることが好ましい。

[0080] 上記共重合体は、例えば、以下の（1）～（3）の方法により合成することができる。（1）ビニル化合物が共重合されたポリビニルアルコールを用

いてポリビニルアセタール樹脂を合成する方法。(2) ポリビニルアルコールと、ビニル化合物が共重合されたポリビニルアルコールとを用いてポリビニルアセタール樹脂を合成する方法。(3) グラフト共重合させる前のポリビニルアセタール樹脂にビニル化合物をグラフト共重合させる方法。

[0081] 上記ビニル化合物としては、エチレン、アリルアミン、ビニルピロリドン、無水マレイン酸、マレイミド、イタコン酸、(メタ)アクリル酸、ビニルアミン、(メタ)アクリル酸エステル等が挙げられる。上記ビニル化合物は、1種のみが用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。なお、上記(メタ)アクリル酸エステルとしては、例えば、上述した(メタ)アクリル酸エステルが挙げられる。

[0082] 上記グラフト共重合体は「ポリビニルアセタールからなるユニット」と「ビニル化合物からなるユニット」とを有するグラフト共重合体(以下、単に「グラフト共重合体」ともいう)を含有する。

[0083] 本発明において、「ポリビニルアセタールからなるユニット」及び「ビニル化合物からなるユニット」とは、グラフト共重合体中に存在している「ポリビニルアセタール」、「ビニル化合物」からなるユニットのことをいう。

[0084] また、ポリビニルアセタールからなるユニット及びビニル化合物からなるユニットを有するグラフト共重合体は、主鎖を構成する「ポリビニルアセタールからなるユニット」又は「ビニル化合物からなるユニット」に、該主鎖とは異なる側鎖を構成する「ポリビニルアセタールからなるユニット」又は「ビニル化合物からなるユニット」が結合した分岐状の共重合体のことをいう。

[0085] 上記グラフト共重合体の分子量としては特に制限は無いが、数平均分子量( $M_n$ )が10000~600000で、重量平均分子量( $M_w$ )が20000~1200000で、これらの比( $M_w/M_n$ )が2.0~40であることが好ましい。 $M_n$ 、 $M_w$ 、 $M_w/M_n$ がこのような範囲であると、上記細胞足場材料の強度が好適に保たれる。

[0086] 上記グラフト共重合体におけるアセタール化度は、例えば上記グラフト共

重合体のキシレンにおける可溶分を重水素化ジメチルスルホキシドに溶解し、 $^1\text{H-NMR}$ により測定することができる。

[0087] 本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点からは、上記ポリビニルアセタール樹脂は、ブレンステッド塩基性基又はブレンステッド酸性基を有することが好ましく、ブレンステッド塩基性基を有することがより好ましい。すなわち、ポリビニルアセタール樹脂の一部がブレンステッド塩基性基又はブレンステッド酸性基により変性されていることが好ましく、ポリビニルアセタール樹脂の一部がブレンステッド塩基性基で変性されていることがより好ましい。この場合、フィーダー細胞や接着タンパク質を含まない無血清培地培養において、細胞播種後の初期定着率が向上し、細胞の培養がし易くなる。

[0088] なお、本明細書において、ポリビニルアセタール樹脂の一部にブレンステッド塩基性基又はブレンステッド酸性基を有するポリビニルアセタール樹脂を変性ポリビニルアセタール樹脂ということがある。

[0089] 上記ブレンステッド塩基性基は、水素イオン $\text{H}^+$ を他の物質から受け取ることができる官能基の総称である。上記ブレンステッド塩基性基としては、例えば、アミン構造を有する置換基、イミン構造を有する置換基、アミド構造を有する置換基、イミド構造を有する置換基等のアミン系塩基性基が挙げられる。

[0090] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、アミン構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位、アミド構造を有する構成単位、及びイミド構造を有する構成単位からなる群から選択される少なくとも一種の構成単位を有することが好ましい。上記ポリビニルアセタール樹脂は、アミン構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位からなる群から選択される少なくとも一種の構成単位を有することがより好ましい。

[0091] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記アミン構造を有する構成単位、上記イミン構造を有する構成単位、上記アミド構造を有する構成単位、

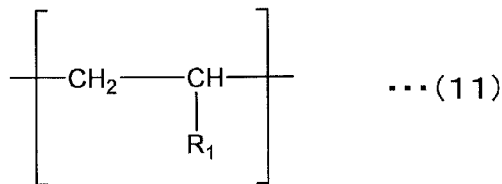


及び上記イミド構造を有する構成単位の合計の含有量は、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは1モル%以上、好ましくは30モル%以下、より好ましくは10モル%以下である。上記合計の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、播種直後の細胞接着性をより一層高めることができる。

[0092] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記アミン構造を有する構成単位、上記イミン構造を有する構成単位、及び上記アミド構造を有する構成単位の合計の含有量は、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは1モル%以上、好ましくは30モル%以下、より好ましくは10モル%以下である。上記合計の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、播種直後の細胞接着性をより一層高めることができる。

[0093] 本発明において、上記イミン構造とは、C=N結合を有する構造をいう。上記ポリビニルアセタール樹脂は、イミン構造を側鎖に有することが好ましい。また、上記イミン構造は、ポリビニルアセタール樹脂の主鎖を構成する炭素原子に直接結合していてもよく、アルキレン基等の連結基を介して主鎖に結合していてもよい。なお、上記イミン構造を側鎖に有するとは、ポリビニルアセタール樹脂のグラフト鎖において、上記イミン構造を有することも含まれる。上記イミン構造を有する構成単位としては、例えば、下記式(11)又は下記式(12)に示す構成単位等が挙げられる。

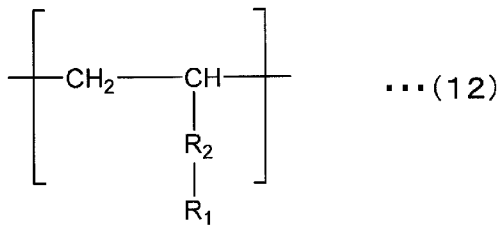
[0094] [化1]



[0095] 上記式(11)中、R<sub>1</sub>はイミン構造を有する基を表す。

[0096]

[化2]

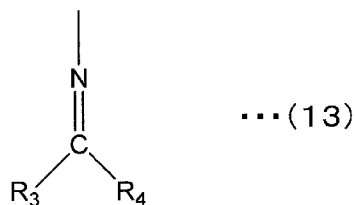


[0097] 上記式(12)中、 $R_1$ はイミン構造を有する基を表し、 $R_2$ はアルキレン基を表す。上記アルキレン基の炭素数は、好ましくは1以上、好ましくは12以下、より好ましくは5以下である。上記アルキレン基の炭素数が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞培養用足場材料の強度を高めることができる。

[0098] 上記アルキレン基としては、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、オクタメチレン基、デカメチレン基等の直鎖状アルキレン基、メチルメチレン基、メチルエチレン基、1-メチルペンチレン基、1,4-ジメチルブチレン基等の分岐状アルキレン基、シクロプロピレン基、シクロブチレン基、シクロヘキシレン基等の環状アルキレン基等が挙げられる。上記アルキレン基は、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基等の直鎖状アルキル基であることが好ましく、メチレン基又はエチレン基であることがより好ましい。

[0099] 上記式(11)中の $R_1$ 及び上記式(12)中の $R_1$ としては、下記式(13)に示す基が挙げられる。

[0100] [化3]



[0101] 上記式(13)中、 $R_3$ は水素原子又は炭素数1~18の炭化水素基を表し、 $R_4$ は炭素数1~18の炭化水素基を表す。

- [0102] 上記炭化水素基としては、飽和炭化水素基、不飽和炭化水素基、及び芳香族系炭化水素基等が挙げられる。なお、上記炭化水素基は、飽和炭化水素基、不飽和炭化水素基、芳香族系炭化水素基のいずれか一種のみからなるものであってもよく、これらが2種以上用いられたものであってもよい。
- [0103] 上記飽和炭化水素基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*so-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、オクタデシル基等が挙げられる。上記飽和炭化水素基は、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、又は*n*-ブチル基であることが好ましい。
- [0104] 上記芳香族系炭化水素基としては、フェニル基、トルイル基、キシリル基、*t*-ブチルフェニル基、及びベンジル基等が挙げられる。
- [0105] 上記イミン構造を有する構成単位は、上記式(11)で表される構造を有し、かつ上記式(13)中、 $R_3$ が水素原子、メチル基、又はエチル基であり、 $R_4$ がメチル基、エチル基又はプロピル基である構成単位であることが好ましい。
- [0106] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記イミン構造を有する構成単位の含有量は、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは1.0モル%以上、好ましくは20.0モル%以下、より好ましくは15.0モル%以下である。上記含有量が上記下限以上であると、経時粘度安定性を良好にすることができる。上記含有量が上記上限以下であると、アセタール化を十分に進行させることができる。
- [0107] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記アセタール化度に対する、イミン構造を有する構成単位の含有量の比（イミン構造を有する構成単位の含有量／アセタール化度）は、好ましくは0.001以上、好ましくは0.5以下である。上記比（イミン構造を有する構成単位の含有量／アセタール化度）が上記下限以上及び上記上限以下であると、高い強度及び優れた接着

性を両立して、接着後の耐久性を向上させることができる。

[0108] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、イミノ基 (=NH) を有する構成単位 (イミノ構造を有する構成単位) を有することが好ましい。

[0109] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、上記イミノ基を側鎖に有することが好ましい。また、上記イミノ基は、ポリビニルアセタール樹脂の主鎖を構成する炭素原子に直接結合していてもよく、アルキレン基等の連結基を介して主鎖に結合していてもよい。

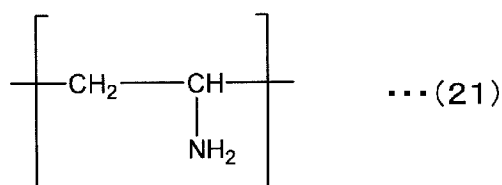
[0110] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、アミン構造を有する構成単位又はアミド構造を有する構成単位を有することが好ましい。

[0111] 上記ポリビニルアセタール樹脂は、上記アミン構造又はアミド構造を側鎖に有することが好ましい。また、上記アミン構造又はアミド構造は、ポリビニルアセタール樹脂の主鎖を構成する炭素原子に直接結合していてもよく、アルキレン基等の連結基を介して主鎖に結合していてもよい。更に、上記アミン構造におけるアミン基は、第一級アミン基でもよく、第二級アミン基でもよく、第三級アミン基でもよく、第四級アミン基でもよい。これらのなかでも、細胞の定着性を高める観点から、第一級アミン基が好ましい。

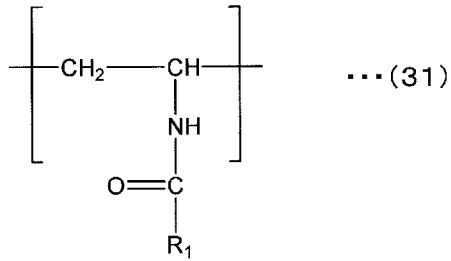
[0112] なお、上記アミン構造又はアミド構造を側鎖に有するとは、ポリビニルアセタール樹脂のグラフト鎖において、上記アミン構造又はアミド構造を有することも含まれる。

[0113] 特に、上記アミン構造は、 $-NH_2$ であることが好ましい。なお、本発明において、アミド構造とは、 $-C(=O)-NH-$ を有する構造をいう。なかでも、上記アミン構造を有する構成単位は、下記式(21)に示す構造であることが好ましい。また、上記アミド構造を有する構成単位は、下記式(31)に示す構造であることが好ましい。

[0114] [化4]



[0115] [化5]



[0116] 上記式(31)中、 $R_1$ は水素原子又は炭素数1~10の炭化水素基を表す。上記炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、及びシクロアルケニル基等が挙げられる。

[0117] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記アミン構造又はアミド構造を有する構成単位の含有量は、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは0.5モル%以上、好ましくは20モル%以下、より好ましくは10モル%以下である。上記含有量が上記下限以上であると、付加特性を高めることができる。上記含有量が上記上限以下であると、溶解性が上がりすぎることがなく、沈殿法による変性ポリビニルアセタール樹脂粉末の取り出しが容易となる。

[0118] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、上記アミン構造又はアミド構造を有する構成単位と、イミン構造を有する構成単位との合計の含有量は、好ましくは0.1モル%以上、より好ましくは0.5モル%以上、好ましくは20モル%以下、より好ましくは10モル%以下である。

[0119] 上記ポリビニルアセタール樹脂において、アミン構造又はアミド構造を有する構成単位の含有量に対する、イミン構造を有する構成単位の含有量の比(イミン構造を有する構成単位/アミン構造又はアミド構造を有する構成単位)は、0.5/99.5~99.5/0.5であることが好ましい。上記比が0.5/99.5以上であると、経時粘度安定性を十分なものとすることができ、上記比が99.5/0.5以下であると、細胞の定着性向上の観点より架橋性能を十分に発揮することができる。上記比(イミン構造を有する構成単位/アミン構造又はアミド構造を有する構成単位)は、5/95以

上であることがより好ましく、90/10以下であることがより好ましい。

- [0120] なお、上記イミン構造を有する構成単位の含有量、上記イミド構造を有する構成単位の含有量、上記アミン構造を有する構成単位の含有量、アミド構造を有する構成単位の含有量は、 $^1\text{H-NMR}$ （核磁気共鳴スペクトル）により測定することができる。
- [0121] 上記ブレンステッド酸性基は、水素イオン $\text{H}^+$ を他の物質に渡すことができる官能基の総称である。
- [0122] ブレンステッド酸性基としては、カルボキシル基、スルホン酸基、マレイン酸基、スルフィン酸基、スルフェン酸基、リン酸基、ホスホン酸基、及びこれらの塩等が挙げられる。ブレンステッド酸性基は、カルボキシル基であることが好ましい。
- [0123] 上記ポリビニルアセタール樹脂を上記ブレンステッド酸性基により変性する方法としては特に限定されないが、上記ポリビニルアルコールと、上記イタコン酸又は（メタ）アクリル酸とを共重合する方法、及び上記ポリビニルアルコールの側鎖にブレンステッド酸性基を導入する方法等が挙げられる。
- [0124] 上記ポリビニルアセタール樹脂を作製する方法としては、例えば、上記イミン構造を有する単量体と、酢酸ビニルとを共重合させることによって得られたポリ酢酸ビニルをケン化し得られたポリビニルアルコールを、従来公知の方法によりアセタール化する方法が挙げられる。また、アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を有するポリビニルアルコールを、従来公知の方法によりアセタール化することでイミン構造を導入する方法を用いてもよい。アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を有するポリビニルアルコールを後変性して得られたイミン構造を有する変性ポリビニルアルコールを、従来公知の方法によりアセタール化する方法を用いてもよい。更に、未変性のポリビニルアセタール樹脂を後変性させることでイミン構造を導入してもよい。すなわち、上記変性ポリビニルアセタール樹脂は、アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を有するポリビニルアルコールのアセタール化物であってもよい。これらのなかでは、アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を

有するポリビニルアルコールをアセタール化してなることでイミン構造を有する変性ポリビニルアセタール樹脂を得る方法が好ましい。特に、このような方法を用いる場合、アセタール化に使用するアルデヒド、酸触媒の量を過剰に添加することでイミン構造を得ることができる。

- [0125] 上記アルデヒドを過剰に添加する方法では、アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を有するポリビニルアルコール100重量部に対して、アルデヒドを70~150重量部添加することが好ましい。特に、アルデヒドとしては、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、*n*-ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、*n*-バレルアルデヒド、フェニルアルデヒドが好ましい。
- [0126] 上記酸触媒を過剰に添加する方法では、酸触媒を全体の0.5重量%以上添加することが好ましい。また、アミノ基又はアミド構造を有する構成単位を有するポリビニルアルコール100重量部に対して、酸触媒を5.0~70.0重量部添加することが好ましい。特に、酸触媒としては、塩酸、硝酸、硫酸、パラトルエンスルホン酸が好ましい。なお、このような方法を用いる場合において、アミノ基、アミド構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位を確認する方法としては、例えば、<sup>1</sup>H-NMRで確認する方法等が挙げられる。
- [0127] 上記アセタール化は、公知の方法を用いることができ、水溶媒中、水と水との相溶性のある有機溶媒との混合溶媒中、あるいは有機溶媒中で行うことが好ましい。上記水との相溶性のある有機溶媒としては、例えば、アルコール系有機溶剤を用いることができる。上記有機溶媒としては、例えば、アルコール系有機溶剤、芳香族有機溶剤、脂肪族エステル系溶剤、ケトン系溶剤、低級パラフィン系溶剤、エーテル系溶剤、アミド系溶剤、アミン系溶剤等が挙げられる。
- [0128] 上記アルコール系有機溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、*tert*-ブタノール等が挙げられる。

- [0129] 上記芳香族有機溶剤としては、例えば、キシレン、トルエン、エチルベンゼン、安息香酸メチル等が挙げられる。
- [0130] 上記脂肪族エステル系溶剤としては、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、酪酸メチル、酪酸エチル、アセト酢酸メチル、アセト酢酸エチル等が挙げられる。
- [0131] 上記ケトン系溶剤としては、例えば、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン、メチルシクロヘキサノン、ベンゾフェノン、アセトフェノン等が挙げられる。
- [0132] 上記低級パラフィン系溶剤としては、ヘキサン、ペンタン、オクタン、シクロヘキサン、デカン等が挙げられる。
- [0133] 上記エーテル系溶剤としては、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、プロピレングリコールジエチルエーテル等が挙げられる。
- [0134] 上記アミド系溶剤としては、N，N-ジメチルホルムアミド、N，N-ジメチルテセトアミド、N-メチルピロリドン、アセトアニリド等が挙げられる。
- [0135] 上記アミン系溶剤としては、アンモニア、トリメチルアミン、トリエチルアミン、n-ブチルアミン、ジn-ブチルアミン、トリn-ブチルアミン、アニリン、N-メチルアニリン、N，N-ジメチルアニリン、ピリジン等が挙げられる。
- [0136] これらの有機溶媒は、単体で用いることもできるし、2種以上の溶媒を混合で用いることもできる。これらのなかでも、樹脂に対する溶解性及び精製時の簡易性の観点から、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、テトラヒドロフランが特に好ましい。
- [0137] 上記アセタール化は、酸触媒の存在下において行うことが好ましい。上記酸触媒は特に限定されず、硫酸、塩酸、硝酸、リン酸等の鉱酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸等のカルボン酸や、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸等のスルホン酸が挙げられ



る。これらの酸触媒は、単独で用いられてもよく、2種以上の化合物を併用してもよい。なかでも、塩酸、硝酸、硫酸が好ましく、塩酸が特に好ましい。

[0138] (細胞培養用足場材料の他の詳細)

本発明に係る細胞培養用足場材料は、細胞を培養するために用いられる。本発明に係る細胞培養用足場材料は、細胞を培養する際の該細胞の足場として用いられる。本発明に係る細胞培養用足場材料では、細胞塊が播種されることが特に好ましい。ただし、本発明に係る細胞培養用足場材料では、細胞塊が播種されなくてもよい。

[0139] 上記細胞としては、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ及びサル等の動物細胞が挙げられる。また、上記細胞としては、体細胞、幹細胞、前駆細胞及び分化細胞 (Differentiated cells) 等が挙げられる。上記体細胞は、癌細胞であってもよい。

[0140] 上記分化細胞としては、神経細胞、心筋細胞、網膜細胞及び肝細胞等が挙げられる。

[0141] 上記幹細胞としては、多能性幹細胞、組織幹細胞及び組織前駆細胞等が挙げられる。

[0142] 上記組織幹細胞及び上記組織前駆細胞は、自己複製能を有し、外胚葉系組織、内胚葉系組織、中胚葉系組織及び生殖系組織のいずれかに属し、それが属している臓器の構成細胞種への限られた分化能を示す細胞をいう。

[0143] 組織幹細胞および組織前駆細胞としては、例えば、神経幹細胞、神経堤幹細胞、網膜幹細胞、角膜幹細胞、ケラチノサイト表皮幹細胞、メラノサイト幹細胞、乳腺幹細胞、肝幹細胞、腸幹細胞、気道幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、血管内皮前駆細胞、血管周皮細胞、骨格筋幹細胞、脂肪幹細胞、腎前駆細胞及び精子幹細胞等が挙げられる。

[0144] 上記細胞は、体細胞、幹細胞、前駆細胞又は分化細胞であることが好ましい。上記体細胞は、癌細胞、神経細胞、心筋細胞、網膜細胞、又は肝細胞であることが好ましい。

## [0145] [細胞の培養方法]

本発明に係る細胞培養用足場材料を用いて、様々な細胞を培養することができる。該細胞としては、上述した細胞が挙げられる。本発明に係る細胞培養用足場材料は、培養培地の水分によって膨潤し難く、適度な親水性と強度とを維持できるので、細胞の播種後の定着率を向上させることができる。

[0146] 上記細胞の培養方法では、上記細胞培養用足場材料上に細胞塊を播種する工程を備えることが好ましい。上記細胞塊は、コンフルエントになった培養容器に細胞剥離剤を添加し、ピペッティングにより均一に破砕処理することで得ることができる。細胞剥離剤としては、特に限定されないが、エチレンジアミン／リン酸緩衝溶液が好ましい。細胞塊の大きさは50  $\mu\text{m}$ ～200  $\mu\text{m}$ であることが好ましい。

[0147] 細胞培養用足場材料は、細胞の培養において、平面培養（二次元培養方法）に用いることの他に、生体内により近い状態、例えば多孔質膜やハイドロゲルなどの基材上での細胞の培養（三次元培養方法）に用いることができる。細胞培養用足場材料をバイオリクター等に用いることにより、効率良く細胞を増殖させることができるからである。

[0148] 細胞培養用足場材料は、適度な親水性と強度を備えることから、二次元培養方法に用いられることが好ましい。

[0149] 平面培養（二次元培養方法）用容器としては、形状や大きさは特に限定されないが、1つまたは複数のウェル（穴）を備える細胞培養用テストプレートや、細胞培養用フラスコ等が挙げられる。上記マイクロプレートのウェルの数は限定されないが、例えば、2、4、6、12、24、48、96、384等が挙げられる。上記ウェルの形状は特に限定されないが、真円、楕円、三角形、正方形、長方形、五角形等が挙げられる。上記ウェル底面の形状は特に限定されないが、平底、丸底、凹凸等が挙げられる。

[0150] 1つまたは複数のウェル（穴）を備える細胞培養用テストプレートや、細胞培養用フラスコの材質は特に限定されないが、高分子樹脂や金属、無機材料が挙げられる。上記高分子樹脂としては、ポリスチレン、ポリエチレン、

ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリイソブレン、シクロオレフィンポリマー、ポリイミド、ポリアミド、ポリアミドイミド、（メタ）アクリル樹脂、エポキシ樹脂、シリコン等が挙げられる。金属としては、ステンレス、銅、鉄、ニッケル、アルミ、チタン、金、銀、白金等が挙げられる。無機材料としては、酸化ケイ素（ガラス）、酸化アルミ、酸化チタン、酸化ジルコニウム、酸化鉄、窒化ケイ素等が挙げられる。

[0151] 上述の他にも、細胞培養用足場材料は、細胞を培地中で自由に浮遊させて成長させる浮遊培養方法に用いることができる。

[0152] [その他の実施の形態]

本発明は、上述の細胞培養用足場材料の他にも、その他の実施の形態として、細胞培養用足場材料を用いた発明が提供される。

[0153] 例えば、本発明では、上述した細胞培養用足場材料と、多糖類とを含有する細胞培養用担体（媒体）が提供される。多糖類としては、特に制限なく様々な多糖類を用いることができる。なかでも水溶性多糖類が好ましい。

[0154] また、本発明では、細胞の培養領域の少なくとも一部に上述した細胞培養用足場材料を備える細胞培養用容器が提供される。上記細胞培養用容器では、上記細胞培養用足場材料が、膜状であることが好ましく、樹脂膜であることが好ましい。上記細胞培養用容器では、容器本体と、容器本体の表面上に上記細胞培養用足場材料（樹脂膜）が配置されている。容器としては、細胞の培養領域の少なくとも一部に樹脂膜を備えるものであれば、特に制限はなく、様々な容器を用いることができる。容器としては、平面培養用容器や、バイオリアクター等を用いることができる。

[0155] また、本発明では、上述した細胞培養用足場材料を含む細胞培養用繊維が提供される。この場合、細胞培養用足場材料は、繊維上に塗布されていることが好ましい。また細胞培養用足場材料は、繊維中に含漬されたり、練り込まれたりしている形態であってもよい。細胞培養用繊維は、フラスコなどの平面構造には接着しにくい、線維（f i b r i l）状構造などの立体構造には接着しやすい細胞の三次元培養方法に適している。

- [0156] 上記細胞培養用足場材料は架橋されていてもよい。架橋されることで水膨潤性を抑制し、好適に強度を上げることができるからである。架橋剤を用いることによって、架橋された細胞培養用足場材料を得ることができる。
- [0157] 架橋剤としては特に限定されないが、ポリアルコールやポリカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸、金属石鹼、多糖類等が挙げられる。
- [0158] ポリアルコールとしては特に限定されないが、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタンジオール、ペンタンジオール、ヘキサジオール、ヘプタンジオール、オクタンジオール、ノナンジオール、デカンジオール、ドデカンジオール、ウンデカンジオール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ポリエチレングリコール、カテコール、ピロガロール、ジボロン酸、メチレンジボロン酸、エチレンジボロン酸、プロピレンジボロン酸、フェニレンジボロン酸、ビフェニルジボロン酸、ビスフェノール誘導体等が挙げられる。
- [0159] ポリカルボン酸としては特に限定されないが、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、フタル酸、ポリ（メタ）アクリル酸等が挙げられる。
- [0160] ヒドロキシカルボン酸としては特に限定されないが、グリコール酸、乳酸、タルトロン酸、グリセリン酸、ヒドロキシ酪酸、リンゴ酸、酒石酸、シトマル酸、クエン酸、イソクエン酸、ロイシン酸、メバロン酸、パントイン酸、リシノール酸、リシネライジン酸、セレブロン酸、キナ酸、シキミ酸、ヒドロキシ安息香酸、サリチル酸、クレオソート酸、バニリン酸、シリング酸、ピロカテク酸、レソルシル酸、プロトカテク酸、ゲンチジン酸、オルセリン酸、没食子酸、マンデル酸、ベンジル酸、アトロラクチン酸、メリロト酸、フロレト酸、クマル酸、ウンベル酸、コーヒー酸、フェルラ酸、シナピン酸、ヒドロキシステアリン酸等が挙げられる。
- [0161] 金属石鹼としては特に限定されないが、ステアリン酸、ラウリン酸、リシノール酸、オクチル酸などの脂肪酸と、リチウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、バリウム、亜鉛、アルミニウムなどの金属の塩が挙げられ

る。

[0162] 多糖類としては特に限定されないが、ペクチン、グアーガム、キサントガム、タマリンドガム、カラギーナン、プロピレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、セルロース、キチン、アガロース、カラギーナン、ヘパリン、ヒアルロン酸、キシログルカン、グルコマンナン酸等が挙げられる。

### 実施例

[0163] 以下に、実施例及び比較例を挙げて本発明を説明するが本発明は以下の実施例に限定解釈されることはない。なお、得られた合成樹脂、変性ポリビニルアセタール樹脂における構成単位は、該樹脂をDMSO-d6（ジメチルスルホキサイド）に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR（核磁気共鳴スペクトル）を用いて測定した。なお、上記構成単位は、例えば、アミン構造を有する構成単位の含有量（モル%）、イミン構造を有する構成単位の含有量（モル%）、アミド構造を有する構成単位の含有量（モル%）、アセタール化度（モル%）、アセチル基量（モル%）、水酸基量（モル%）、（メタ）アクリル酸エステル基量（モル%）である。

[0164] [実施例1]

（ポリビニルブチラール樹脂の調製）

攪拌装置を備えた反応機に、イオン交換水2700mLと、平均重合度250、鹼化度99モル%のポリビニルアルコール300gとを投入し、攪拌しながら加熱溶解し、溶液を得た。次に、この溶液に触媒として35重量%塩酸を、塩酸濃度が0.2重量%となるように添加し、温度を15℃に調整した後、攪拌しながらn-ブチルアルデヒド（n-BA）22gを添加した。その後、n-ブチルアルデヒド（n-BA）148gを添加したところ、白色粒子状のポリビニルブチラール樹脂が析出した。析出してから15分後に、35重量%塩酸を、塩酸濃度が1.8重量%になるように添加し、50℃に加熱し、50℃で2時間熟成させた。次いで、溶液を冷却し、中和した後、ポリビニルブチラール樹脂を水洗し、乾燥させることにより、ポリビニ

ルブチラル樹脂を得た。

[0165] 得られたポリビニルブチラル樹脂は、平均重合度 250、水酸基量 28 モル%、アセチル基量 1 モル%、アセタール化度 71 モル%であった。

[0166] (細胞培養用容器の調製)

得られたポリビニルブチラル樹脂 1 g をブタノール 19 g に溶解させることで、ポリビニルブチラル樹脂溶液を得た。得られたポリビニルブチラル樹脂溶液 150  $\mu$ L を  $\phi$  22 mm のカバーガラス (松浪社製、22 丸 No. 1 をエアダスターで除塵して使用) 上に吐出し、スピンコーターを用いて 2000 rpm、20 秒回転させて平滑な樹脂膜を得た。得られた上記樹脂膜をカバーガラスごと  $\phi$  22 mm のポリスチレンディッシュに配置することにより細胞培養用容器を得た。

[0167] (表面自由エネルギー)

上記樹脂膜の表面自由エネルギーを、接触角計 (協和界面化学社製、DMo-701) を用いて測定した。上記樹脂膜上に純水 1  $\mu$ L を滴下し、30 秒後の液滴像を撮影することで純水の接触角を得た。また、上記樹脂膜上にジヨードメタン 1  $\mu$ L を滴下し、30 秒後の液滴像を撮影することでジヨードメタンの接触角を得た。得られた接触角から、Kaelble-Uy の理論式を用いて表面自由エネルギーの分散成分  $\gamma^d$  及び双極子成分  $\gamma^p$  を算出した。

[0168] 得られた細胞培養用容器を用いて、以下の条件で試験を行った。

[0169] (細胞培養試験の方法)

得られた細胞培養用容器にリン酸緩衝生理食塩水 1 mL を加えて 37°C のインキュベーター内で 1 時間静置した。ディッシュ内のリン酸緩衝生理食塩水を除いた後、キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞 (フェニックスバイオ社製、PXB-cells) を  $3 \times 10^4$  cells 播種した。次いで、培地 RM-101 (東洋合成社製) 1 mL を添加し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーター内で培養を行った。

[0170] (評価)

## (1) 初期接着性 (播種後の定着性)

細胞培養試験において、細胞の播種から24時間後にトリプシンを用いて細胞を剥離した。オートセルカウンター (NanoEntech社製、オートセルカウンターEVE) を用いて、細胞数を測定した。

## [0171] &lt;初期接着性の評価基準&gt;

○○○：細胞数が $2.5 \times 10^4$  cells以上

○○：細胞数が $1.5 \times 10^4$  cells以上 $2.5 \times 10^4$  cells未満

○：細胞数が $1.0 \times 10^4$  cells以上 $1.5 \times 10^4$  cells未満

×：細胞数が $1.0 \times 10^4$  cells未満

## [0172] (2) 細胞増殖性

細胞培養試験において、細胞の播種から3日後にトリプシンを用いて細胞を剥離した。オートセルカウンター (NanoEntech社製、オートセルカウンターEVE) を用いて、細胞数を測定した。

## [0173] &lt;細胞増殖性の評価基準&gt;

○○○：細胞数が $2.0 \times 10^5$  cells以上

○○：細胞数が $1.0 \times 10^5$  cells以上 $2.0 \times 10^5$  cells未満

○：細胞数が $5.0 \times 10^4$  cells以上 $1.0 \times 10^5$  cells未満

×：細胞数が $5.0 \times 10^4$  cells未満

## [0174] [実施例2]

平均重合度850、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例1と同様にして試験を行った。

## [0175] [実施例3]

平均重合度1700、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例1と同様にして試験を行った。

## [0176] [実施例4]

平均重合度2400、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを使用し

たこと、および、*n*-ブチルアルデヒド (*n*-BA) の代わりに、アセトアルデヒドを使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして試験を行った。

[0177] [実施例 5]

平均重合度 850、鹼化度 98 モル%、エチレン変性度 4 モル% のポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして試験を行った。

[0178] [実施例 6]

平均重合度 250、鹼化度 99 モル%、上記式 (21) に示すアミノ基を有する構成単位を 2 モル% 含有するポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして試験を行った。

[0179] [実施例 7]

平均重合度 1600、鹼化度 99 モル%、上記式 (21) に示すアミノ基を有する構成単位を 2 モル% 含有するポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして試験を行った。

[0180] [実施例 8]

実施例 1 で得られた重合度約 250 のポリビニルアセタール 100 重量部、および、*N*-ビニルピロリドン 1 重量部を 500 重量部のテトラヒドロフランに溶解させてグラフト共重合体樹脂溶液を得た。得られた樹脂溶液に Irgacure 184 (BASF 社製) 0.05 重量部を溶解させ、PET フィルム上に塗布した。塗布物を 25℃ にてアイグラフィックス社製、UV コンベア装置「ECS301G1」を用い、365 nm の波長の光を積算光量 2000 mJ/cm<sup>2</sup> で照射することで複合樹脂溶液を得た。得られた複合樹脂溶液を 80℃、3 時間真空乾燥させることで複合樹脂を得た。得られた複合樹脂について、カラムとして Waters 社製「2690 Separations Model」を用いて、GPC 法によってポリスチレン換算による重量平均分子量を測定したところ、約 4 万であった。得られた複合樹脂を 3 重量% ブタノール溶液に調整し、実施例 1 と同様にして試験を行った。



## [0181] [実施例 9]

ポリビニルアセタール 100 重量部に対して N-ビニルピロリドン 10 重量部を添加したこと以外は、実施例 8 と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約 6 万であった。

## [0182] [実施例 10]

ポリビニルアセタール 100 重量部に対して N-ビニルピロリドン 30 重量部を添加したこと以外は、実施例 8 と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約 5 万であった。

## [0183] [実施例 11]

ポリビニルアセタール 100 重量部に対してテトラヒドロフルフリルアクリレート 5 重量部を添加したこと以外は、実施例 8 と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約 6 万であった。

## [0184] [実施例 12]

ポリビニルアセタール 100 重量部に対してメトキシエチルアクリレート 5 重量部を添加したこと以外は、実施例 8 と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約 7 万であった。

## [0185] [実施例 13]

ポリビニルアセタール 100 重量部に対してブチルメタクリレート 5 重量部を添加したこと以外は、実施例 8 と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約 6 万。

## [0186] [実施例 14]

N-イソプロピルアクリルアミド 75 重量部、および、ブチルメタクリレート 25 重量部をテトラヒドロフラン 300 重量部に溶解させてアクリルモノマー溶液を得た。得られたアクリルモノマー溶液に Irgacure 184 (BASF 社製) 2 重量部を溶解させ、PET フィルム上に塗布した。塗布物を 25℃ にてアイグラフィックス社製、UV コンベア装置「ECS 301G1」を用い、365nm の波長の光を積算光量 2000mJ/cm<sup>2</sup> で照射することでアクリル樹脂溶液を得た。得られたアクリル樹脂溶液を 80℃

、3時間真空乾燥させることでアクリル樹脂を得た。得られたアクリル樹脂を3重量%ブタノール溶液に調整し、実施例1と同様にして試験を行った。得られたアクリル樹脂の重量平均分子量は約10万であった。

[0187] [実施例15]

N-イソプロピルアクリルアミド75重量部、および、ブチルメタクリレート25重量部に代えて、メトキシエチルアクリレート90重量部、および、ブチルメタクリレート10重量部を使用したこと以外は実施例14と同様にして、アクリル樹脂を得た。得られたアクリル樹脂を3重量%ブタノール溶液に調整し、実施例1と同様にして試験を行った。得られたアクリル樹脂の重量平均分子量は約8万であった。

[0188] [実施例16]

N-イソプロピルアクリルアミド75重量部、および、ブチルメタクリレート25重量部に代えて、メトキシエチルアクリレート75重量部、および、ブチルメタクリレート25重量部を使用したこと以外は実施例14と同様にして、アクリル樹脂を得た。得られたアクリル樹脂を3重量%ブタノール溶液に調整し、実施例1と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約9万であった。

[0189] [実施例17]

N-イソプロピルアクリルアミド75重量部、および、ブチルメタクリレート25重量部に代えて、ブチルメタクリレート2重量部、および、エチルアクリレート98重量部を使用したこと以外は実施例14と同様にして、アクリル樹脂を得た。得られたアクリル樹脂を3重量%ブタノール溶液に調整し、実施例1と同様にして試験を行った。得られたアクリル樹脂の重量平均分子量は約8万であった。

[0190] [比較例1]

足場材料を用いず、ポリスチレンディッシュのみで実施例1と同様にて試験を行った。

[0191] [比較例2]

2回目のn-ブチルアルデヒド（n-BA）の添加量を148gから89gに変更したこと以外は、実施例1と同様にして試験を行った。

[0192] [比較例3]

合成樹脂として平均重合度1000、鹼化度98モル%のポリビニルアルコールを使用したこと以外は、実施例1と同様にして試験を行った。

[0193] [比較例4]

N-イソプロピルアクリルアミド100重量部、酢酸エチル75重量部、アゾビスイソブチロニトリル0.5重量部を混合し、窒素雰囲気下、65℃で8時間重合を行うことでポリアクリルアミド樹脂を得た。得られた樹脂について、カラムとしてWaters社製「2690 Separations Model」を用いて、GPC法によってポリスチレン換算による重量平均分子量を測定したところ、約9万（重合度約800）であった。その他の操作は実施例1と同様にして試験を行った。

[0194] [比較例5]

N-イソプロピルアクリルアミド100重量部に代えてエチルアクリレート100重量部を使用したこと以外は比較例4と同様にして試験を行った。

[0195] [比較例6]

N-イソプロピルアクリルアミド100重量部に代えてブチルメタクリレート100重量部を使用したこと以外は比較例4と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約9万であった。

[0196] [比較例7]

ポリビニルアセタール30重量部に対してN-ビニルピロリドン70重量部を添加したこと以外は、実施例8と同様にして試験を行った。得られた樹脂の重量平均分子量は約9万であった。

[0197] 得られた結果をまとめて表1～4に示す。

[0198]

[表1]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5
アセタール化度(モル%)	71	68	65	66	64
アセチル基量(モル%)	1	1	1	1	2
水酸基量(モル%)	28	31	34	33	30
アミン構造を有する構成単位の含有量(1)(モル%)	-	-	-	-	-
イミン構造を有する構成単位の含有量(2)(モル%)	-	-	-	-	-
アミド構造を有する構成単位の含有量(3)(モル%)	-	-	-	-	-
アミン構造を有する構成単位、イミン基を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位を合計した含有量((1)+(2)+(3))(モル%)	-	-	-	-	-
平均重合度	250	850	1700	2400	850
$\gamma^d$ ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )	32.5	32.6	33.5	31.3	34.2
$\gamma^p$ ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )	3.5	3.7	3.5	4.6	3.3
合成樹脂					
ポリビニルアセター ル樹脂					
培養評価					
初期接着性	○	○	○	○	○
細胞増殖性	○	○	○	○	○

[0199]

[表2]

	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	
合成樹脂	アセタール化度(モル%)	77	76	70	65	54
	アセチル基量(モル%)	1	1	1	1	1
	水酸基量(モル%)	20	21	28	25	21
	アミン構造を有する構成単位の含有量(1)(モル%)	0.3	0.3	-	-	-
	イミン構造を有する構成単位の含有量(2)(モル%)	1.7	1.7	-	-	-
	アミド構造を有する構成単位の含有量(3)(モル%)	-	-	1	9	24
	アミン構造を有する構成単位、イミン基を有する構成単 位、及びアミド構造を有する構成単位を合計した含有量 ((1)+(2)+(3))(モル%)	2.0	2.0	1	9	24
	平均重合度	250	1600	250	250	250
	$\gamma^d$ ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )	34.2	34.8	33.0	35.7	36.2
	$\gamma^p$ ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )	3.3	3.6	3.2	2.6	2.2
培養評価	初期接着性	〇〇	〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇
	細胞増殖性	〇〇	〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇

[0200]

[表3]

	実施例 11	実施例 12	実施例 13	実施例 14	実施例 15	実施例 16	実施例 17
合成樹脂	アセトール化度(モル%)	68	68	68	-	-	-
	アセチル基量(モル%)	1	1	1	-	-	-
	水酸基量(モル%)	27	27	27	-	-	-
	アミン構造を有する構成単位の含有量(1)(モル%)	-	-	-	-	-	-
	イミン構造を有する構成単位の含有量(2)(モル%)	-	-	-	-	-	-
	アミド構造を有する構成単位の含有量(3)(モル%)	-	-	-	-	-	-
	テトラヒドロフルフリルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	4	-	-	-	-	-
	メトキシエチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	4	-	-	-	-
	ブチルメタクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	4	-	-	-
	アミン構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位を合計した含有量((1)+(2)+(3))(モル%)	-	-	-	-	-	-
平均重合度	250	250	250	-	-	-	
アミド構造を有する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	79	-	-	
ブチルメタクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	21	9	23	
メトキシエチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	91	77	
エチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	-	
平均重合度	-	-	-	-	-	-	
$\gamma^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	35.1	34	34.4	24.8	38.9	42.9	
$\gamma^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	2.9	4.2	2.4	9.2	17.9	8.6	
初期接着性	○	○	○	○	○	○	
細胞増殖性	○	○	○	○	○	○	
培養評価	○	○	○	○	○	○	

[0201]

[表4]

	比較例 1	比較例 2	比較例 3	比較例 4	比較例 5	比較例 6	比較例 7
合成樹脂	アセトール化度(モル%)	-	40	0	-	-	21
	アセチル基量(モル%)	-	3	2	-	-	0
	水酸基量(モル%)	-	57	98	-	-	8
	アミン構造を有する構成単位の含有量(1)(モル%)	-	-	-	-	-	-
	イミン構造を有する構成単位の含有量(2)(モル%)	-	-	-	-	-	-
	アミド構造を有する構成単位の含有量(3)(モル%)	-	-	-	-	-	71
	テトラヒドロフルフリルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	-
	メトキシエチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	-
	ブチルメタクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	-
	アミン構造を有する構成単位、イミン基を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位を合計した含有量((1)+(2)+(3))(モル%)	-	-	-	-	-	71
平均重合度	-	250	1000	-	-	-	250
アミド構造を有する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	100	-	-	-
ブチルメタクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	100	-
メトキシエチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	-	-	-
エチルアクリレートに由来する構成単位の含有量(モル%)	-	-	-	-	100	-	-
平均重合度	-	-	-	800	600	550	250
$\gamma^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	45.8	28.9	26.7	24.0	23.1	45.7	24.3
$\gamma^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	5.8	26.8	34.9	19.6	6.0	1.0	26.8
初期接着性	×	×	×	×	×	×	×
細胞増殖性	×	×	×	×	×	×	×
培養評価							

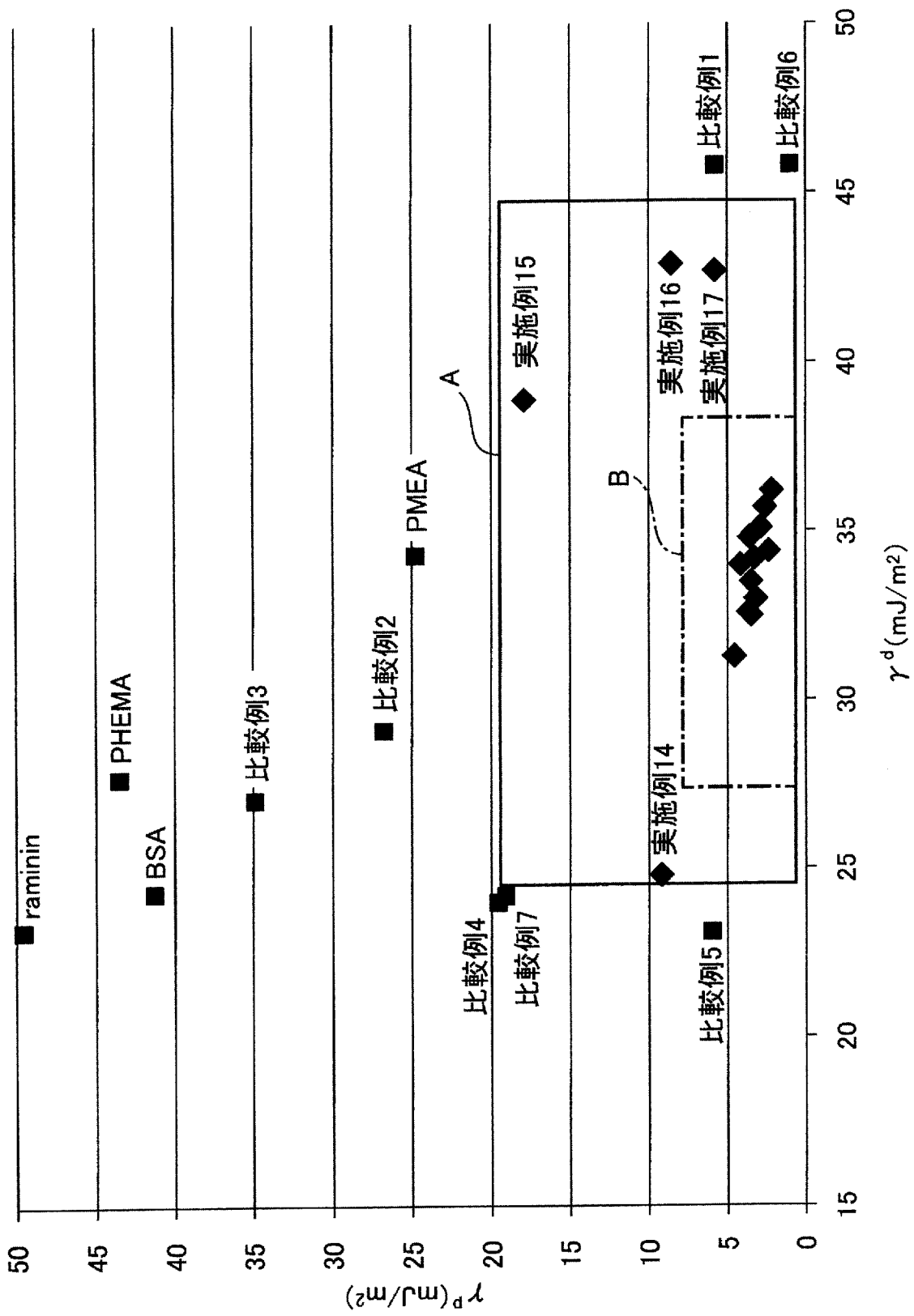
## 請求の範囲

- [請求項1] 表面自由エネルギーの分散成分  $\gamma^d$  が  $28.0 \text{ mJ/m}^2$  以上  $38.0 \text{ mJ/m}^2$  以下であり、  
表面自由エネルギーの双極子成分  $\gamma^p$  が  $1.0 \text{ mJ/m}^2$  以上  $10.0 \text{ mJ/m}^2$  以下であり、  
合成樹脂を含み、  
前記合成樹脂がポリビニルアセタール骨格及びポリ（メタ）アクリル酸エステル骨格の少なくとも一方の骨格を有し、  
前駆細胞又は分化細胞の培養に用いられる、細胞培養用足場材料。
- [請求項2] 前記合成樹脂がポリビニルアセタール樹脂である、請求項1に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項3] 合成樹脂を含む細胞培養用足場材料であって、  
前記合成樹脂がポリビニルアセタール樹脂を含み、  
前記ポリビニルアセタール樹脂のアセタール化度が60モル%よりも高く、  
前記ポリビニルアセタール樹脂がポリビニルブチラール樹脂であり、  
前駆細胞又は分化細胞の培養に用いられる、細胞培養用足場材料。
- [請求項4] 前記ポリビニルアセタール樹脂が、アミン構造を有する構成単位、イミン構造を有する構成単位、及びアミド構造を有する構成単位からなる群から選択される少なくとも一種の構成単位を有する、請求項2又は3に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項5] 前記ポリビニルアセタール樹脂において、前記アミン構造を有する構成単位、前記イミン構造を有する構成単位、及び前記アミド構造を有する構成単位の合計の含有量が、0.1モル%以上30モル%以下である、請求項4に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項6] 細胞の培養領域の少なくとも一部に請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞培養用足場材料を備える、細胞培養用容器。

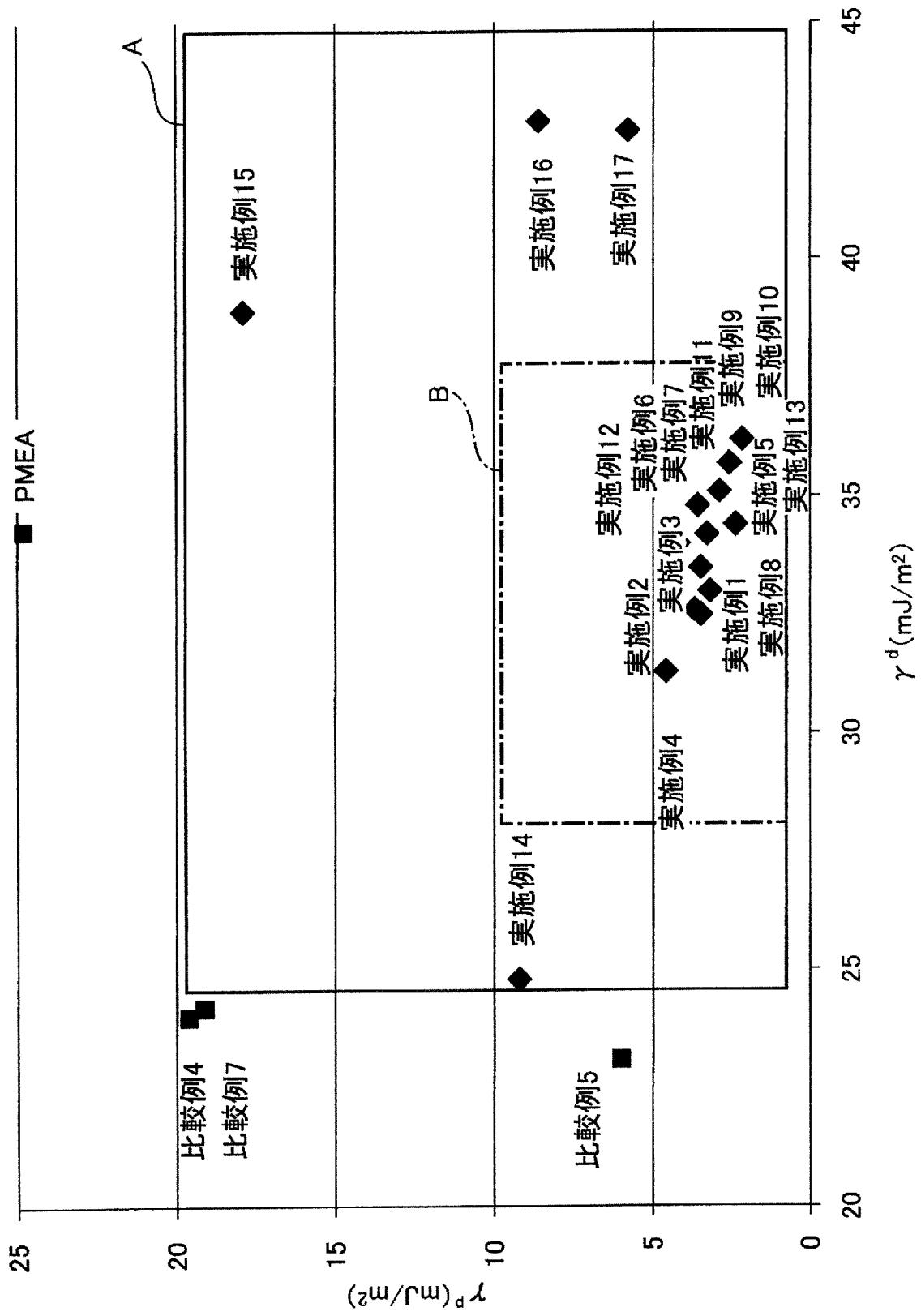


- [請求項7] 請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞培養用足場材料を含む、細胞培養用繊維。
- [請求項8] 請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞培養用足場材料を用いる、細胞の培養方法。
- [請求項9] 前記細胞培養用足場材料上に細胞塊を播種する工程を備える、請求項8に記載の細胞の培養方法。

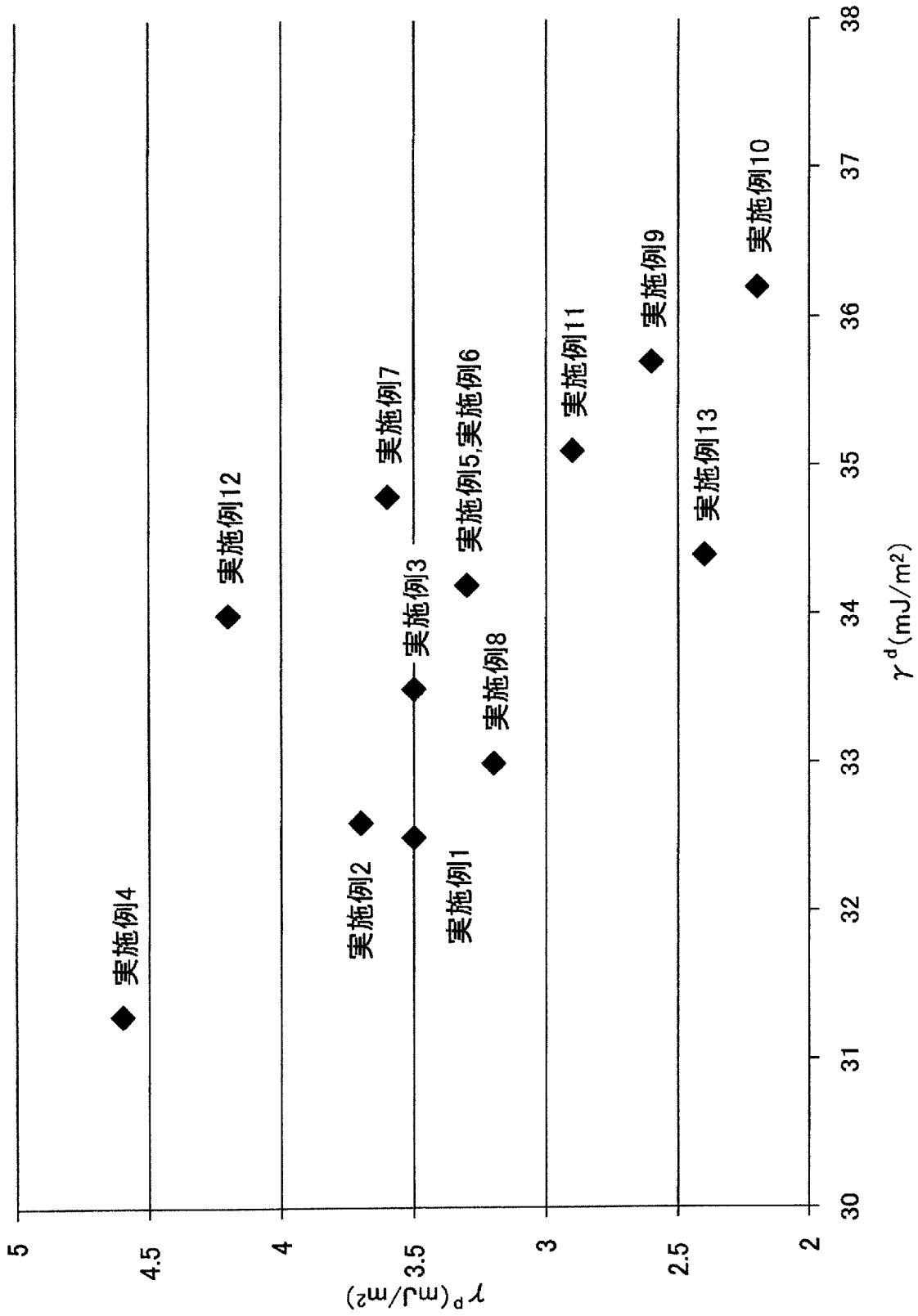
[図1]



[図2]



[図3]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/014013

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int.Cl. C12M1/00(2006.01) i. C12M3/00(2006.01) i. C12N5/00(2006.01) i. C12N5/07(2010.01) i		
FI: C12M3/00A. C12M1/00A. C12N5/00. C12N5/07		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. C12M1/00. C12M3/00. C12N5/00. C12N5/07		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 4537790 A (INSTITUT PASTEUR) 27.08.1985 (1985-08-27), claims	1-3, 6-9 3-9
X Y	JP 02-227070 A (ASAHI OPTICAL CO., LTD.) 10.09.1990 (1990-09-10), claims, example 3, page 3, upper left column, lines 11-18	1-3, 7 3-9
Y	JP 05-076364 A (KANEGAFUCHI CHEM IND CO., LTD.) 30.03.1993 (1993-03-30), paragraph [0015]	3-9
Y	JP 2000-328356 A (NITIVY CO., LTD.) 28.11.2000 (2000-11-28), claims, examples	4-9
Y	JP 10-158322 A (HYMO CORPORATION) 16.06.1998 (1998-06-16), claims, examples	4-9
Y	JP 10-287711 A (UNITIKA CHEM CO., LTD.) 27.10.1998 (1998-10-27), claims, examples	4-9
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 08.06.2020	Date of mailing of the international search report 16.06.2020	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/014013

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-237158 A (AION KK) 09.10.2008 (2008-10-09), entire text	1-9
A	JP 2004-129572 A (BIO ENERGY KK) 30.04.2004 (2004-04-30), entire text	1-9
P, X	WO 2019/131978 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 04.07.2019 (2019-07-04), entire text	1-9
P, X	WO 2019/131981 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 04.07.2019 (2019-07-04), entire text	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2020/014013

US 4537790 A	27.08.1985	BE 869459 A
JP 02-227070 A	10.09.1990	US 5085781 A claims, example 3, pillar 4 line 68 to pillar 5, line 13
JP 05-076364 A	30.03.1993	(Family: none)
JP 2000-328356 A	28.11.2000	(Family: none)
JP 10-158322 A	16.06.1998	(Family: none)
JP 10-287711 A	27.10.1998	(Family: none)
JP 2008-237158 A	09.10.2008	(Family: none)
JP 2004-129572 A	30.04.2004	(Family: none)
WO 2019/131978 A1	04.07.2019	TW 201930587 A
WO 2019/131981 A1	04.07.2019	TW 201930587 A

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i FI: C12M3/00 A; C12M1/00 A; C12N5/00; C12N5/07		
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（IPC）） C12M1/00; C12M3/00; C12N5/00; 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (STN)		
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	US 4537790 A (INSTITUT PASTEUR) 27.08.1985 (1985 - 08 - 27) Claims	1-3, 6-9
Y		3-9
X	JP 02-227070 A (旭光学工業株式会社) 10.09.1990 (1990 - 09 - 10) 特許請求の範囲、実施例 3, 第 3 頁左上欄第 1 1 - 1 8 行	1-3, 7
Y		3-9
Y	JP 05-076364 A (鐘淵化学工業株式会社) 30.03.1993 (1993 - 03 - 30) 段落 [0015]	3-9
Y	JP 2000-328356 A (株式会社ニチピ) 28.11.2000 (2000 - 11 - 28) 特許請求の範囲、実施例	4-9
Y	JP 10-158322 A (ハイモ株式会社) 16.06.1998 (1998 - 06 - 16) 特許請求の範囲、実施例	4-9
Y	JP 10-287711 A (ユニチカケミカル株式会社) 27.10.1998 (1998 - 10 - 27) 特許請求の範囲、実施例	4-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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 08.06.2020	国際調査報告の発送日 16.06.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	権限のある職員（特許庁審査官） 小倉 梢 4N 4504 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	



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
A	JP 2008-237158 A (アイオン株式会社) 09.10.2008 (2008 - 10 - 09) 全文	1-9
A	JP 2004-129572 A (バイオ・エナジー株式会社) 30.04.2004 (2004 - 04 - 30) 全文	1-9
P, X	WO 2019/131978 A1 (積水化学工業株式会社) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 全文	1-9
P, X	WO 2019/131981 A1 (積水化学工業株式会社) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 全文	1-9

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2020/014013

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 4537790 A	27.08.1985	BE 869459 A	
JP 02-227070 A	10.09.1990	US 5085781 A Claims, Example 3, 第4柱 第68行-第5柱第13行	
JP 05-076364 A	30.03.1993	(ファミリーなし)	
JP 2000-328356 A	28.11.2000	(ファミリーなし)	
JP 10-158322 A	16.06.1998	(ファミリーなし)	
JP 10-287711 A	27.10.1998	(ファミリーなし)	
JP 2008-237158 A	09.10.2008	(ファミリーなし)	
JP 2004-129572 A	30.04.2004	(ファミリーなし)	
WO 2019/131978 A1	04.07.2019	TW 201930587 A	
WO 2019/131981 A1	04.07.2019	TW 201930587 A	