

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02014/188911

発行日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)

(43) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014. 11. 27)

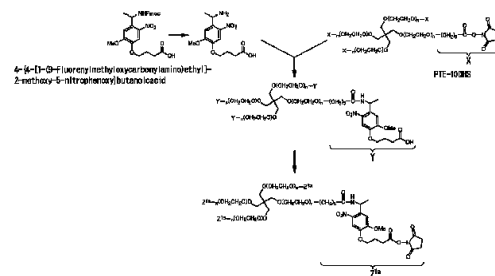
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C08G 65/333 (2006.01)	C O 8 G 65/333	4 B O 2 9
C08G 69/26 (2006.01)	C O 8 G 69/26	4 B O 6 5
C08G 63/12 (2006.01)	C O 8 G 63/12	4 H O 4 5
C08G 81/00 (2006.01)	C O 8 G 81/00	4 J O O 1
C12M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 C	4 J O O 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2015-518193 (P2015-518193)	(71) 出願人	301021533
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/062725		国立研究開発法人産業技術総合研究所
(22) 国際出願日	平成26年5月13日 (2014. 5. 13)		東京都千代田区霞が関 1-3-1
(11) 特許番号	特許第6056111号 (P6056111)	(74) 代理人	100064908
(45) 特許公報発行日	平成29年1月11日 (2017. 1. 11)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	特願2013-108429 (P2013-108429)	(74) 代理人	100134544
(32) 優先日	平成25年5月22日 (2013. 5. 22)		弁理士 森 隆一郎
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100188558
			弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100140774
			弁理士 大浪 一徳
		(72) 発明者	杉浦 慎治
			茨城県つくば市東 1-1-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 光分解性架橋剤、光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体

(57) 【要約】

本発明は、細胞担体として、適切な含水率、適度な水溶性、および複雑かつ微細な三次元構造を構築することが可能な強度を併せ持った光分解性ゲルを製造できる光分解性架橋剤を提供する。本発明の光分解性架橋剤においては、3分岐以上の分岐鎖を有する分岐鎖状のポリエチレングリコールからなる主鎖2、及び前記分岐鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基3を含み、前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基4、及び、一つまたは複数のニトロ基をベンゼン環に有している。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

3 以上の分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖、及び前記分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

【請求項 2】

前記活性エステル基が N - ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である請求項 1 記載の光分解性架橋剤。

【請求項 3】

前記分岐鎖におけるエチレングリコールの平均繰り返し数が 20 から 500 の範囲にある請求項 1 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 4】

前記分岐鎖の数が 4 又は 8 である請求項 1 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 5】

前記ポリエチレングリコール主鎖が、ネオペンチル骨格を有する請求項 1 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の光分解性架橋剤、及び分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシシル基を有する高分子化合物、を反応させて得られ、前記高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシシル基が、前記光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合して架橋されていることを特徴とする光分解性ゲル。

【請求項 7】

前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 8】

前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である、請求項 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 9】

前記高分子化合物が、ゼラチンである、請求項 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

【請求項 11】

前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン樹脂または細胞接着性材料からなる、請求項 10 に記載の細胞培養器具。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の細胞培養器具、及び
該細胞培養器具に光を照射する照射部、
を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する、
細胞配列・分別装置。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

請求項 10 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

【請求項 15】

(I) 請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び
(IV) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 16】

(I) 細胞を内包させた、請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び
(III) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 17】

請求項 6 に記載の光分解性ゲル、及び細胞、
を含む組織体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、材料工学の分野に属し、特に、複雑且つ微細な三次元組織体の製造に用いることができる光分解性架橋剤と、これを用いた、光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、医薬品を開発のコストは *Erroom's Law* という法則に従って指数関数的に増大しているという（非特許文献 1）。臨床試験でドロップアウトする確率の高さが年々増大していることや（非特許文献 2）、動物実験における種差の問題を考えると、培養細胞を用いたインビトロアッセイは今後ますます重要になってくると考えられる。

現在、細胞アッセイはハイスループットシステムの普及により、創薬スクリーニングの幅広い場面で利用されており、近年ではインクジェット方式などの液体ハンドリング技術が利用できるようになり、更なるハイスループット化が進んでいる。また、一度のアッセイでより多くの情報量を取得するハイコンテツ化へと技術のトレンドは移行してきている。

一方、一般的な細胞アッセイで利用されている単層培養においては、細胞周囲の環境が動物体内の環境と大きく異なっているため、培養細胞では本来体内で発現すべき機能の多くを喪失しているという問題があった。

次世代の細胞アッセイ技術では、生体内の三次元構造を模倣した組織体を人工的に再構成し、より機能の高い組織体を利用したより信頼性の高いアッセイを適用することで、より高い *vivo-vitro* 相関が期待されている。

【0003】

細胞培養方法の一つとして、ハイドロゲルを利用した方法が挙げられる。ハイドロゲルは、高い含水率、力学的性質の調整が容易、栄養素の拡散性に優れる等の細胞の担体として優れた特性を有している（非特許文献 3）。

ハイドロゲルは、光分解性の基を分子内に組み込むことで光分解性が付与され、光による加工が可能な光分解性ゲルが開発されている。光分解性ゲルとしては、例えばポリエチレングリコールを主鎖とし、ニトロベンジル基を分子内に有するものがある（特許文献 1 及び非特許文献 4）。このような構成を持った高分子モノマーから形成されるハイドロゲルの物性は、光照射によって時間的・空間的に制御可能であり（非特許文献 5 及び 6）、光分解は生細胞との適合性が高い（非特許文献 4 及び 7）。

10

20

30

40

50

しかし、これまでに報告されている光分解性ゲルは、ラジカル重合を利用してゲル化されるため、酸素の存在下で重合すると酸素の影響を受けて劣化することがある。また、ラジカルが細胞や生理活性物質にダメージを与えてしまう、また、主鎖として使用できる高分子化合物が、ラジカル重合できるモノマーの重合物に限定されるため、その利用が限定されてしまっている等の問題があった。

発明者らは、ラジカル重合を利用せず、高分子化合物と混合するだけで架橋反応が起こり、光分解性ゲルを形成可能な光分解性架橋剤の開発を行ってきた（特許文献2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

【特許文献1】特開2007-108087号公報

【特許文献2】特開2012-80844号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Scannell, J. W. et al., Nat. Rev. Drug Discov. (2012) Vol. 11, pp. 191 - 200.

【非特許文献2】Pammolli, F. et al., Nat. Rev. Drug Discov. (2011) Vol. 10, pp. 428 - 438.

【非特許文献3】Drury, J. L. and Mooney, D. J., Biomaterials (2003) Vol. 24, pp. 4337 - 4351.

20

【非特許文献4】Kloxin, A. M. et al., Science (2009) Vol. 324, pp. 59 - 63.

【非特許文献5】Kloxin, A. M. et al., Adv. Mater. (2010) Vol. 22, pp. 61 - 66.

【非特許文献6】Wong, D. Y. et al., Macromolecules (2010) Vol. 43, pp. 2824 - 2831.

【非特許文献7】Kloxin, A. M. et al., Biomaterial (2010) Vol. 31, pp. 1 - 8.

【非特許文献8】Kikuchi, K., et al., Biotechnol. Bioeng. (2009) Vol. 103, pp. 552.

30

【非特許文献9】Nichol, J. W., et al., Biomaterials (2010) Vol. 31, pp. 536.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従来の、ラジカル重合反応を用いずに重合可能な光分解性のゲルでは、ゲルが溶媒を吸収して膨潤することでゲルが崩れてしまい、意図した構造が構築できないことがある。またゲルの強度が低く、生体構造を再現するような複雑な三次元構造の作製が難しいという問題がある。ゲルの強度を容易に高める方法としては、ゲルを構成する化合物の濃度を上げてよいが、濃度を上げるとゲルの含水率が下がってしまう。または、ゲルの強度を高めるために、価数を一定とした場合、ポリマーを構成する化合物の分子量を下げることでゲルの強度を高めることができるがゲルの水に対する溶解度が低下してしまい、製造時および使用時において扱いにくく、またゲルの状態が不均一になりやすい。

40

【0007】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、細胞担体として適切な含水率、適度な水溶性、および複雑かつ微細な三次元構造を構築することが可能な強度を併せ持った光分解性ゲルを製造できる光分解性架橋剤の提供を課題とする。

また、前記光分解性架橋剤を有する光分解性ゲル、該光分解性ゲルを有する細胞培養器具、該細胞培養器具を使用する細胞配列・分別装置、並びに該細胞培養器具を用いる細胞配列法、及び細胞分別方法、並びに該光分解性ゲルを用いた組織体及び組織体形成方法の

50

提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは鋭意検討し、光分解性架橋剤の分岐数を高めることでゲルの強度を高められ、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は以下の通りである。

[1] 3以上の分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖、及び前記分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

[2] 前記活性エステル基がN-ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である[1]に記載の光分解性架橋剤。

[3] 前記分岐鎖におけるエチレングリコールの平均繰り返し数が20から500の範囲にある[1]又は[2]に記載の光分解性架橋剤。

[4] 前記分岐鎖の数が4又は8である[1]～[3]のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[5] 前記ポリエチレングリコールの主鎖が、ネオペンチル骨格を有する[1]～[4]のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[6] [1]～[5]のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤、及び分子内に合計2以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物、を反応させて得られ、前記高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシル基が、前記光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合して架橋されていることを特徴とする光分解性ゲル。

[7] 前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群より選択される少なくとも1つである、[6]に記載の光分解性ゲル。

[8] 前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である[6]又は[7]に記載の光分解性ゲル。

[9] 前記高分子化合物が、ゼラチンである[6]又は[7]に記載の光分解性ゲル。

[10] [6]～[9]のいずれか一つに記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

[11] 前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン系樹脂または細胞接着性材料からなる、[10]に記載の細胞培養器具。

[12] [10]又は[11]に記載の細胞培養器具、及び該細胞培養器具に光を照射する照射部を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する細胞配列・分別装置。

[13] [10]又は[11]に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

[14] [10]又は[11]に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

[15]

(I) [6]に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；

(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び

(IV) 細胞を培養する工程

を含む、組織体形成方法。

[16]

10

20

30

40

50

(Ⅰ)細胞を内包させた、[6]に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(ⅠⅠ)光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び
(ⅠⅠⅠ)細胞を培養する工程
を含む、組織体形成方法。

[17][6]～[9]のいずれか一つに記載の光分解性ゲル、及び細胞、
を含む組織体。

【発明の効果】

【0009】

本発明の光分解性架橋剤によれば、細胞担体として適切な含水率、適度な水溶性、および複雑かつ微細な三次元構造を構築することが可能な強度とを併せ持った光分解性ゲルの製造が実現され、複雑かつ微細な三次元構造を有する組織体の形成および、より生体環境に近く信頼度の高い細胞アッセイ系が実現される。したがって本発明は、再生医療技術の発展および新規の医薬品開発に資する。

10

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明の光分解性架橋剤の模式図である。

【図2】本発明の光分解性架橋剤の構造の説明図である。

【図3A】本発明の光分解性ゲルの生成反応を示す図である。

【図3B】本発明の一の態様における光分解性ゲルが、光分解性架橋剤とポリエチレングリコール誘導体との反応によって生成される状態を示す図である。

20

【図3C】本発明の別の態様における光分解性ゲルが、光分解性架橋剤とゼラチンとの反応によって生成される状態を示す図である。

【図4A】本発明の光分解性ゲルの分解反応を示す図である。

【図4B】本発明の一の態様における光分解性ゲルが、光の照射により分解される様子を模式的に示す図である。

【図4C】本発明の別の態様における光分解性ゲルが、光の照射により分解される様子を模式的に示す図である。

【図5】本発明の細胞配列・分別装置の一例を示す構成図である。

【図6A】本発明の細胞配列方法の一例を示す模式図である。

【図6B】本発明の細胞配列方法の別の例を示す模式図である。

30

【図7A】本発明の細胞分別方法の一例を示す模式図である。

【図7B】本発明の細胞分別方法の別の例を示す模式図である。

【図8A】本発明の組織体形成方法の第一の例を示す模式図である。

【図8B】本発明の組織体形成方法の第二の例を示す模式図である。

【図8C】本発明の組織体形成方法の第三の例を示す模式図である。

【図8D】本発明の組織体形成方法の第四の例を示す模式図である。

【図9A】本発明の組織体形成方法の第五の例を示す模式図である。

【図9B】本発明の組織体形成方法の第六の例を示す模式図である。

【図9C】本発明の組織体形成方法の第七の例を示す模式図である。

【図10】本発明の光分解性架橋剤の合成の一例を示す説明図である。

40

【図11】光照射によってパターン分解された、本発明のゼラチンベースの光分解性ゲルの写真である。

【図12】光照射によってパターン分解された、本発明のポリエチレングリコールベースの光分解性ゲルの写真である。

【図13A】本発明の光分解性ゲルの、厚さ方向への分解深度の測定結果を示す図である（照射エネルギー：1.5 J / cm²）。

【図13B】本発明の光分解性ゲルの、厚さ方向への分解深度の測定結果を示す図である（照射エネルギー：9.0 J / cm²）。

【図13C】本発明の光分解性ゲルの、光分解後の、ゲル層平均深度の計測結果を示す図である。

50

【図 1 4 A】光分解性ゲル中に包埋された細胞の様子である（光照射前）。

【図 1 4 B】光分解性ゲル中に包埋された細胞の様子である（光照射後；明視野観察）。

【図 1 4 C】光分解性ゲル中に包埋された細胞の様子である（光照射後；蛍光観察）。

【図 1 5】異なる濃度の組成により調製した光分解性ゲル上での H U V E C s 細胞の 1 日間培養の結果を示す図である。

【図 1 6 A】光分解性ゲル上での H U V E C s 細胞の付着状態を位相コントラスト画像により観察した図である（培養期間 1 日）。

【図 1 6 B】光分解性ゲル上での H U V E C s 細胞の付着状態を位相コントラスト画像により観察した図である（培養期間 3 日）。

【図 1 6 C】3 日間の培養後の H U V E C s 細胞の生細胞を示す図である。

10

【図 1 6 D】3 日間の培養後の H U V E C s 細胞の死細胞を示す図である。

【図 1 7 A】ゼラチンと、濃度を変えた架橋剤とから調製した光分解性ゲル上での H U V E C s 細胞についての位相コントラスト画像を示す図である。図中のバーは、400 μ m である（培養期間 1 日）。

【図 1 7 B】ゼラチンと、濃度を変えた架橋剤とから調製した光分解性ゲル上での H U V E C s 細胞についての位相コントラスト画像を示す図である。図中のバーは、400 μ m である（培養期間 3 日）。

【図 1 8 A】光照射とゲルの分解が細胞の生存度に与える影響を示す図である（光照射： $0 \text{ J} / \text{cm}^2$ ）。図中のバーは、200 μ m である。

【図 1 8 B】光照射とゲルの分解が細胞の生存度に与える影響を示す図である（光照射： $1.0 \text{ J} / \text{cm}^2$ ）。図中のバーは、200 μ m である。

20

【図 1 8 C】光照射とゲルの分解が細胞の生存度に与える影響を示す図である（光照射： $2.0 \text{ J} / \text{cm}^2$ ）。図中のバーは、200 μ m である。

【図 1 8 D】光照射とゲルの分解が細胞の生存度に与える影響を示す図である（光照射： $3.0 \text{ J} / \text{cm}^2$ ）。図中のバーは、200 μ m である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

《光分解性架橋剤》

【0012】

本発明の光分解性架橋剤は、3 分岐以上の分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖、及びその末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、

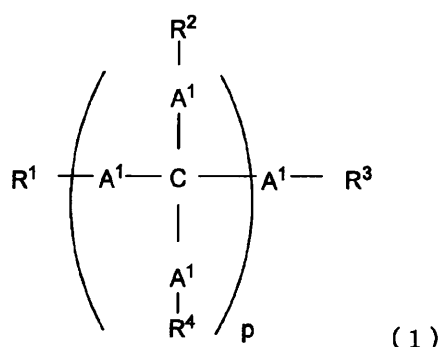
30

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を当該ベンジル基のベンゼン環に有する化合物である。

前記光分解性架橋剤としては、例えば、下記式一般式（1）で表される化合物が挙げられる。

【0013】

【化 1】



40

【0014】

前記一般式（1）中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は、それぞれ独立して水素原子、Z、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n$

50

$H_2O)_n - Z$ 、又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。

Z は、光分解性のベンジル基を表し、前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基をベンゼン環に有する。

複数の A^1 は、連結基を表し、それぞれ独立に単結合、又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し、

該アルキル基中の 1 個又は非隣接の 2 個以上の $-CH_2-$ はそれぞれ独立して $-CH=CH-$ 、 $-C \equiv C-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCO-$ 、又はシクロヘキシレン基によって置換されていてもよい。

p は 1 以上の整数を表し、複数存在する R^2 及び R^4 は同一でも異なってもよい。 $R^1 \sim R^4$ のうち少なくとも 3 つ以上の R が Z を含み、2 つ以上の R が $-O(CH_2CH_2O)_n - Z$ であることとする。

【0015】

本発明の光分解性架橋剤は、3 分岐以上の分岐鎖を有していることから、該分岐鎖の分岐末端に配置された活性エステル基と、該活性エステル基と反応する高分子化合物との間に形成される架橋点（架橋剤 1 分子あたり）が十分に多い。そのため、本発明の光分解性架橋剤は、適度な強度を持った光分解性ゲルを得ることを可能にする。また、本発明の光分解性架橋剤は、光分解性のニトロベンジル基を含む基を有していることから、伝統的なフォトリソグラフィや近年の二光子励起加工法に代表されるような、光による微細加工技術を適応可能である。そのため、本発明の光分解性架橋剤は、光照射によってゲルの微細な加工が可能な光分解性ゲルを得ることを可能にする。したがって、本発明の光分解性架橋剤を用いれば、複雑且つ微細な三次元構造を有するゲルを構築することが可能である。

【0016】

前記一般式 (1) で表される光分解性架橋剤が含むポリエチレングリコール分岐鎖のエチレングリコールの平均繰り返し数 n は、20 から 500 の範囲にあり、30 から 250 の範囲にあることがより好ましく、40 から 125 の範囲にあることがさらに好ましい。

エチレングリコールの繰り返し数を上記範囲に設定することで、ゲルの水に対する溶解度を高めることができ、製造時および使用時において扱いの容易で、状態の均一な光分解性ゲルを得ることができる。

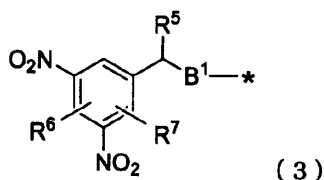
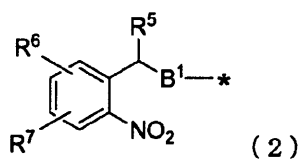
【0017】

前記一般式 (1) において、Z は光分解性のベンジル基である。前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基をベンゼン環に有する。

係るベンジル基としては、下記一般式 (2) 又は (3) で表される基が好ましい。

【0018】

【化 2】



【0019】

前記一般式 (2) ~ (3) 中、 B^1 は、 $-(CH_2)_m - C(=O) - NH -$ で表され

る基を表し、mは、0～5の整数を表し、5が好ましい。

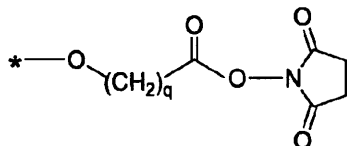
星印は、エチレングリコールの酸素原子との結合位置を表す。

R⁵は、水素もしくは炭素数1～6の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基を表し、炭素数1～6の直鎖状のアルキル基がより好ましく、メチル基が特に好ましい。R⁶は、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基、又は炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルコキシ基を表し、炭素数1～6の直鎖状のアルコキシ基がより好ましく、メトキシ基が特に好ましい。R⁷は、アミノ基又はヒドロキシシル基に対する反応性を有する活性エステル基を表し、N-ヒドロキシコハク酸イミド誘導体が好ましく、下記一般式(4)で表される誘導体がより好ましい。

【0020】

10

【化3】



(4)

【0021】

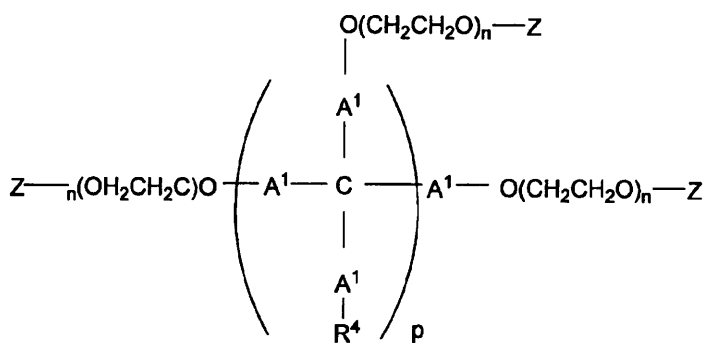
前記一般式(4)中、星印は、ベンゼン環の炭素原子との結合位置を表す。qは1～10の整数を表し、1～6が好ましく、2～5がより好ましく、3が特に好ましい。

20

前記一般式(1)で表される化合物において、該化合物は、具体的には下記一般式(7)及び(8)で表される化合物であることが好ましい。

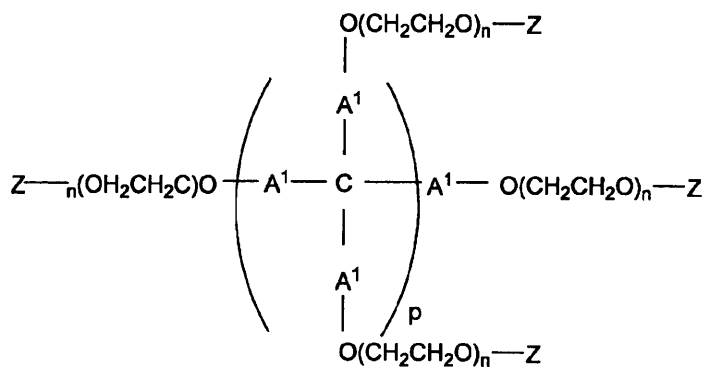
【0022】

【化4】



(7)

30



(8)

40

【0023】

前記一般式(7)及び(8)中、n、Z、A¹、R¹～R⁴、及びpは前記一般式(1)におけるものと同様である。

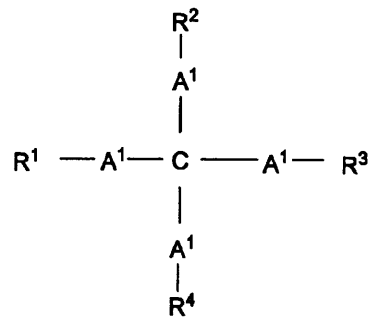
【0024】

50

p が 1 の場合、前記一般式 (1) で表される化合物は、具体的には下記一般式 (9) で表される化合物であることが好ましい。

【 0 0 2 5 】

【 化 5 】



(9)

10

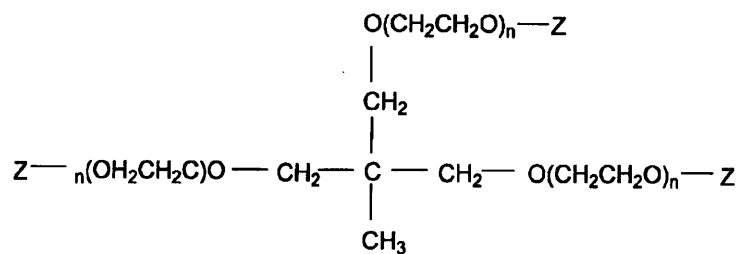
【 0 0 2 6 】

前記一般式 (9) 中、Z、A¹、及び R¹ ~ R⁴ は前記一般式 (1) におけるものと同様である。

前記一般式 (9) で表される化合物は、具体的には下記一般式 (1 0) 又は (1 1) で表される化合物であることが好ましい。

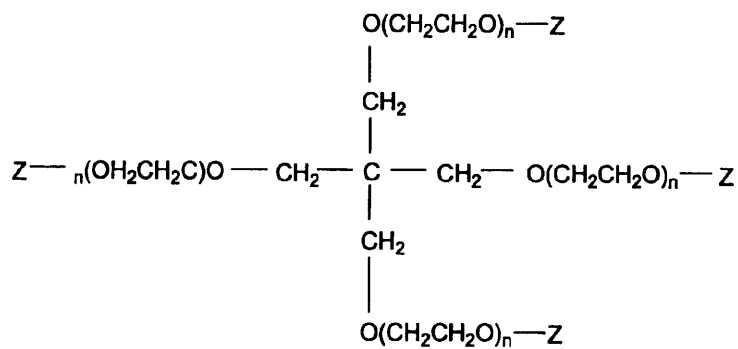
【 0 0 2 7 】

【 化 6 】



(1 0)

20



(1 1)

30

【 0 0 2 8 】

前記一般式 (1 0) ~ (1 1) 中、n、Z は前記一般式 (1) におけるものと同様である。

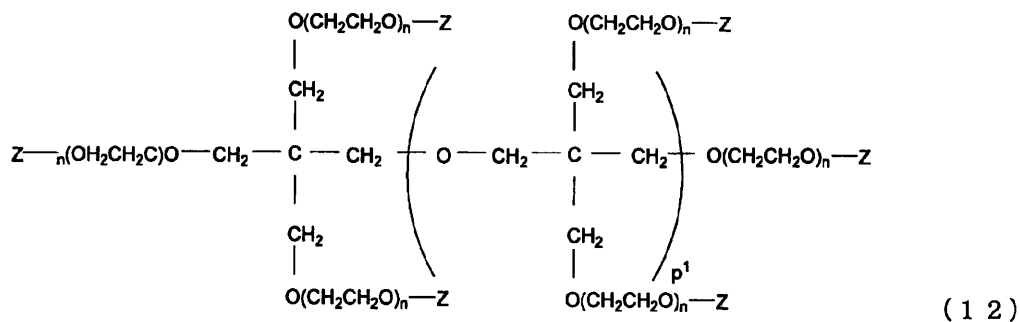
【 0 0 2 9 】

前記一般式 (1) で表される化合物は、具体的には下記一般式 (1 2) で表される化合物であることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

40

【化 7】



10

【0031】

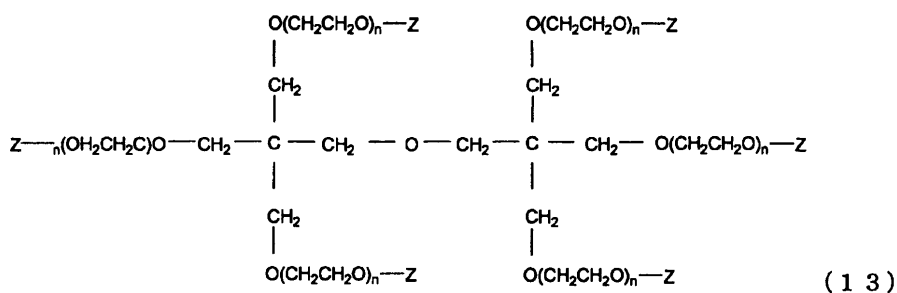
前記一般式(12)中、Z、は前記一般式(1)におけるものと同様である。p¹は1以上の整数を表す。

【0032】

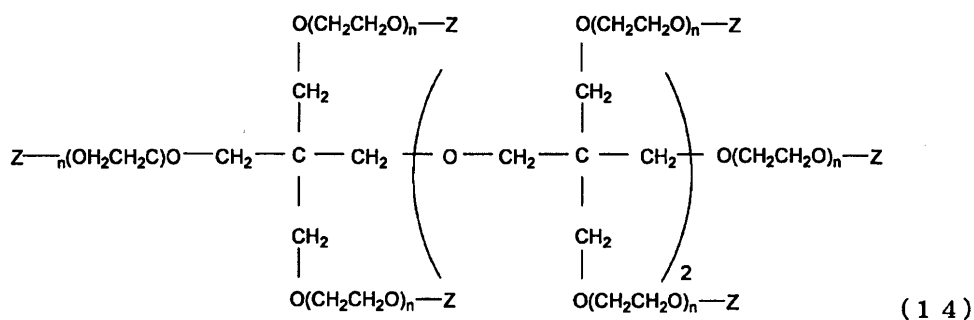
前記一般式(12)で表される化合物は、具体的には下記一般式(13)又は(14)で表される化合物であることが好ましい。

【0033】

【化 8】



20



30

【0034】

前記一般式(13)～(14)中、n、Zは前記一般式(1)におけるものと同様である。

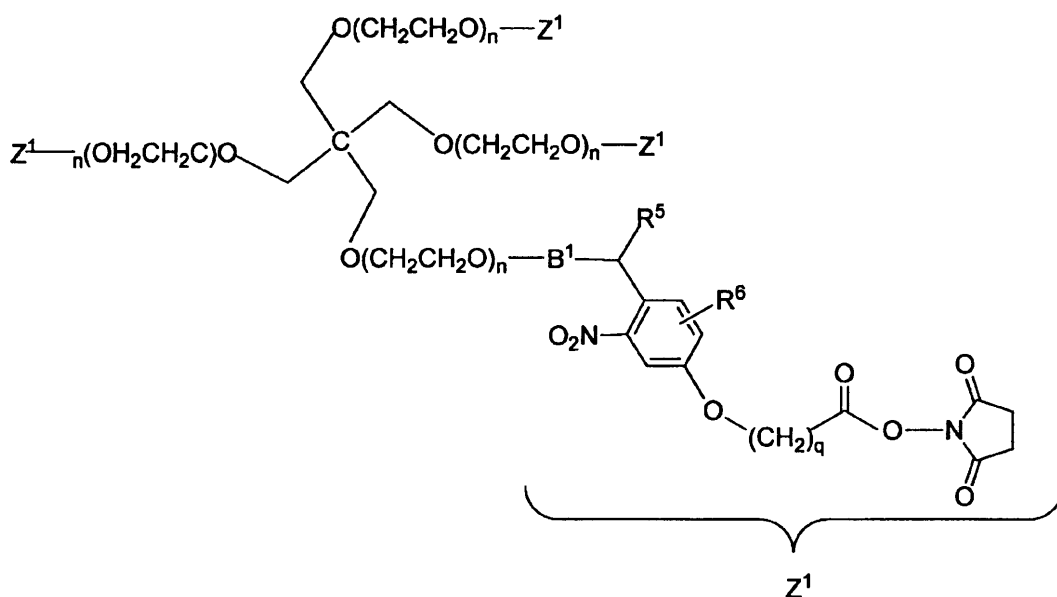
40

4分岐又は8分岐型のポリエチレングリコール(または誘導体)は合成しやすく、また、入手も容易であることから、前記一般式(1)で表される化合物において、ポリエチレングリコールが4分岐又は8分岐(分岐鎖数が4つまたは8つ)であることが好ましい。

即ち、本発明の光分解性架橋剤としては、下記一般式(15)又は(16)で表される化合物がより好ましい。

【0035】

【化 9】

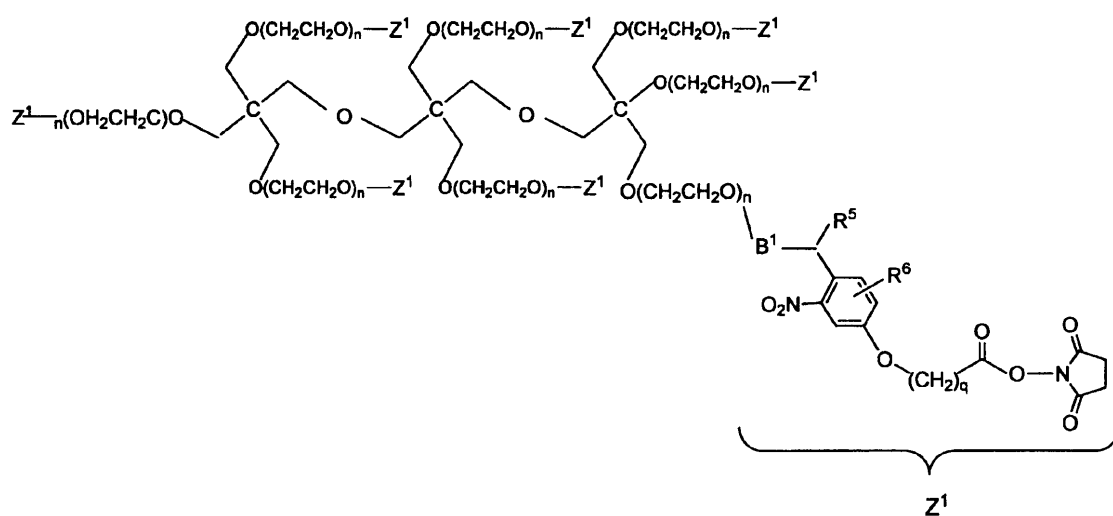


(15)

10

20

30



(16)

【0036】

前記一般式(15)～(16)中、B¹、R⁵～R⁶、及びqは、前記一般式(2)～(4)におけるものと同様である。

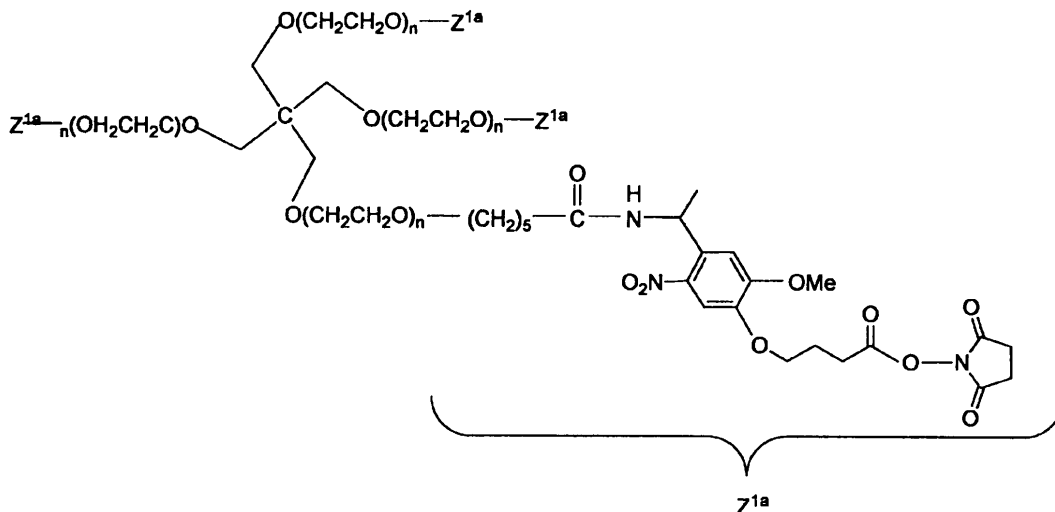
【0037】

前記一般式(15)又は(16)で表される化合物において、具体的には下記式(17)又は(18)で表される化合物であることが更に好ましい。

40

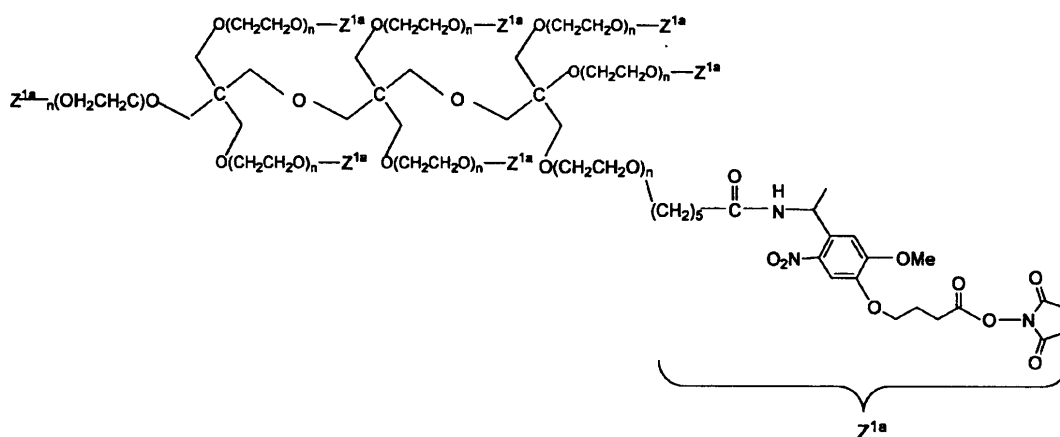
【0038】

【化 10】



10

(17)



20

(18)

30

【0039】

また、前記ポリエチレングリコールが、ネオペンチル骨格を有するものが好ましく、式(17)、式(18)で表される化合物が特に好ましい。

【0040】

図1に、前記式(17)で表される化合物の模式図を示す。図1に示されるように、光分解性架橋剤1は、分岐鎖状のポリエチレングリコール(PEG)からなる主鎖2、及び分岐鎖状の主鎖2の末端側に配置された光分解性のニトロベンジル基を含む基3と、ニトロベンジル基を含む基3の末端側に配置された活性エステル基4とからなり、4分岐のポリエチレングリコールの分岐鎖を有し、ポリエチレングリコールの分岐鎖が中心にネオペンチル骨格を有する。

40

図1および図2に示すように、主鎖2はポリエチレングリコール(PEG)である。ニトロベンジル基を含む基3は、アミド結合部5(NHCO)を介して主鎖2に結合している。

【0041】

《光分解性架橋剤の合成》

前記一般式(1)で表される化合物の製造方法について説明する。

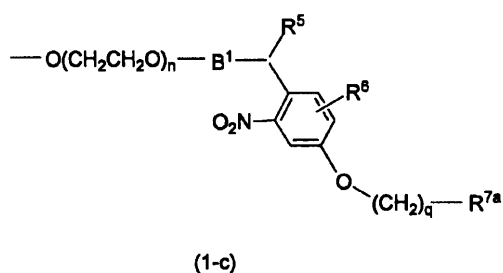
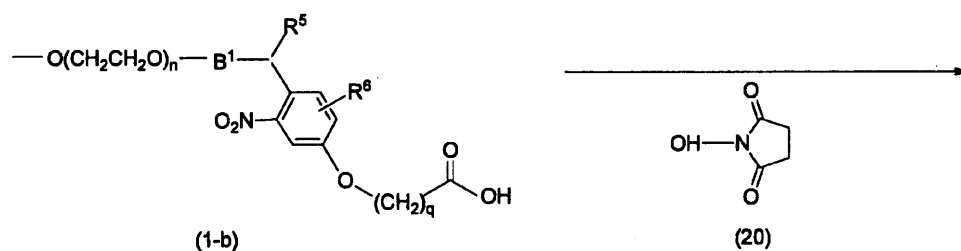
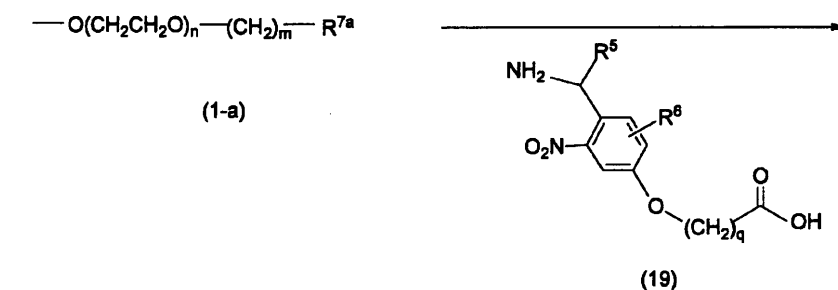
前記一般式(1)で表される化合物は、3分岐以上の分岐鎖を有する、ポリエチレングリコール主鎖、及び前記分岐鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を当該ベンジル基のベンゼン環に有する化合物である。以

50

下に、前記分岐の末端に前記光分解性のベンジル基を配置し、前記ベンジル基に活性エステル基を配置する反応を説明する。

【 0 0 4 2 】

【 化 1 1 】



【 0 0 4 3 】

式中 B^1 、 $R^5 \sim R^6$ 、及び q は、前記一般式 (2) ~ (4) におけるものと同様である。 R^{7a} はアミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基を表す。

【 0 0 4 4 】

一般式 (1-c) で表される基は、一般式 (1-a) で表される基と、一般式 (1-a) で表される化合物に対して 1.0 ~ 2.0 倍モル量の一般式 (19) で表される化合物とを、溶媒中、0 ~ 200 の温度で数 10 分 ~ 24 時間処理し、溶媒を除去後、一般式 (1-b) で表される化合物を析出させ、精製後、一般式 (1-b) で表される化合物に対して、1.0 ~ 2.0 倍モル量の一般式 (20) で表される化合物とを、触媒の存在下、溶媒中、0 ~ 200 の温度で数 10 分 ~ 24 時間処理し、単離することにより得られる。前記触媒としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) が好ましい。

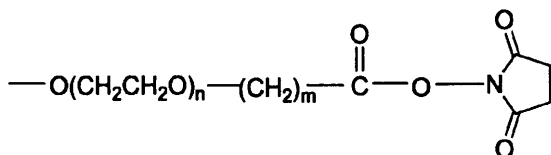
40

【 0 0 4 5 】

上記一般式 (1-a) で表される基は、下記一般式 (21) であることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

【化 1 2】



(21)

【0047】

前記一般式(21)中、 n 及び m は前記一般式(1)～(3)におけるものと同様である。

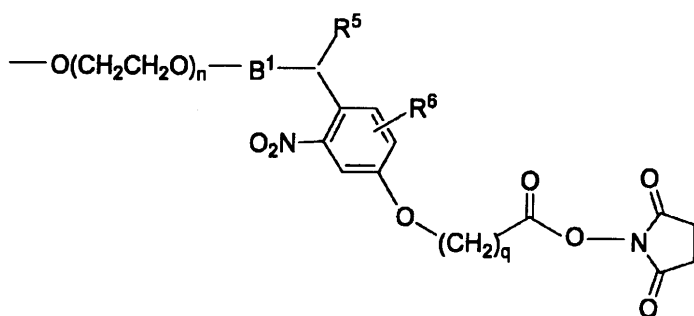
10

【0048】

上記一般式(1-c)で表される基は、下記一般式(22)であることが好ましい。

【0049】

【化 1 3】



(22)

20

【0050】

前記一般式(22)中、 n 、 B^1 、 $R^5 \sim R^6$ 、及び q は、前記一般式(1)～(4)におけるものと同様である。

【0051】

《光分解性ゲル》

本発明の光分解性ゲルは、本発明の光分解性架橋剤、及び分子内に合計2以上のアミノ基またはヒドロキシル基を有する高分子化合物、を反応させて得られ、前記高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシル基が、前記光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合して架橋されていることを特徴とする光分解性ゲルである。

30

高分子化合物は、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群より選択される少なくとも1つであることが好ましい。

【0052】

高分子化合物としては、分岐型のポリエチレングリコールもしくはその誘導体、またはタンパク質としてゼラチンがより好ましい。

【0053】

ポリエチレングリコールは細胞との相互作用が少なく、しかも高分子化合物自体が水に可溶であるために好ましい。なかでも、分岐型のポリエチレングリコールまたはその誘導体を用いると、網目構造が形成されやすく、ゲル化が進行しやすくなるため好ましい。分岐型のポリエチレングリコール(または誘導体)の分岐数は3以上が好ましい。特に、4分岐型のポリエチレングリコール(または誘導体)は入手しやすいため好適である。

40

ポリエチレングリコール(または誘導体)は、末端にアミノ基を有することが望ましい。

ポリエチレングリコール(または誘導体)の分子量は1万から4万の範囲にあることが好ましい。

【0054】

ゼラチンの主成分であるコラーゲンは多細胞生物(動物)の細胞外基質の主成分である

50

ことから、細胞の足場タンパク質として好ましく、また、細胞の増殖、分化を促す場合があるために好ましい。用いられるゼラチンの種類は特に制限されないが、ウシ、又はブタ皮由来原料を酸処理して得られた t y p e A ゼラチンが好ましい。

ゼラチンの強度は特に制限されないが、200～400ブルームが好ましく、250～350ブルームがより好ましい。

【0055】

塩基性多糖類としては、キトサンが好ましい。

【0056】

高分子化合物と光分解性架橋剤とを混合すると、高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシル基は、光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合して架橋される。

前記アミノ基は光分解性架橋剤の活性エステル基とアミド結合を形成し、前記ヒドロキシル基は活性エステル基とエステル結合を形成する。これによって、網目構造が形成され、ゲル化が進行し、光分解性ゲルが生成する。

本発明では、架橋反応を促進させるための添加剤は特に必要ないため、高分子化合物と光分解性ゲルとを混合するだけで架橋反応が起こり、ゲル化が進行する。また、反応時の温度は常温でよい。

また、本発明における架橋反応は溶存酸素の影響を受けないため、薄膜状のゲルの形成が容易である。

【0057】

高分子化合物に対する光分解性架橋剤の添加量（光分解性架橋剤／高分子化合物）はゲル化する範囲で自由に設定することができるが、強度の高いゲルを調製するためには高分子化合物のアミノ基と光分解性架橋剤の活性エステル基のモル比で1：1程度であることが好ましい。高分子化合物と光分解性架橋剤との混合比は、例えば4分岐型のアミノ末端ポリエチレングリコール（またはその誘導体）を高分子化合物として用い、4分岐型の光分解性架橋剤を用いる場合は、モル比（高分子化合物：光分解性架橋剤）で4：1から1：4の範囲が好ましく、モル比で2：1から1：2の範囲がより好ましい。

高分子化合物の使用量は、例えば4分岐型のポリエチレングリコール（または誘導体）の場合、光分解性ゲル中に2．5重量％以上含有されるように設定することが好ましく、ゼラチンの場合、光分解性ゲル中に1．0重量％以上含有されるように設定することが好ましい。

【0058】

図3Aは、光分解性架橋剤1の末端側に配置された活性エステル基4と高分子化合物のアミノ基8とが縮合してアミド結合9を形成し、架橋される反応を示すものである。

【0059】

図3Bは、光分解性架橋剤と高分子化合物6とを反応させることによって、光分解性ゲル10を生成させる反応を模式的に示すものである。

高分子化合物6は、末端にアミノ基8を有する4分岐型のポリエチレングリコール誘導体である。

高分子化合物6と光分解性架橋剤1とを混合すると、高分子化合物6のアミノ基は、光分解性架橋剤1の活性エステル基4と縮合して架橋される。

これによって、高分子化合物6は、光分解性架橋剤1を介して他の高分子化合物6と結合し、網目構造を有する光分解性ゲル10が生成する。

【0060】

図3Cは、光分解性架橋剤と高分子化合物7とを反応させることによって、光分解性ゲル10'を生成させる反応を模式的に示すものである。

高分子化合物7は、分子内にアミノ基8を有するゼラチンである。

高分子化合物7と光分解性架橋剤1とを混合すると、高分子化合物7のアミノ基は、光分解性架橋剤1の活性エステル基4と縮合して架橋される。

これによって、高分子化合物7は、光分解性架橋剤1を介して他の高分子化合物7と結合し、網目構造を有する光分解性ゲル10'が生成する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

本発明の光分解性ゲルは、光の照射により光分解性架橋剤 1 が分解されることによって、分解される。

図 4 A は、光分解性架橋剤のニトロベンジル基の分解を示すものである。ニトロベンジル基を含む基 3 は、例えば波長 330 ~ 380 nm の紫外線などの光の照射により、破線位置で分解可能である。

ニトロベンジル基を含む基 3 は、アミド結合部 5 のアミノ基との間の結合が切断され、ニトロベンジル基 3' となる。なお、ニトロベンジル基の構造によっては、前記光照射によりニトロベンジル基を含む基 3 と活性エステル基 4 との結合が切断されることもある。

図 4 B と図 4 C は、それぞれ光分解性ゲル 10 と 10' が、光の照射により分解される様子を模式的に示すものである。光分解性ゲルが分解されることにより、光分解性ゲルは水に溶解する。

【 0 0 6 2 】

本発明によれば、前記構造を有する光分解性架橋剤を用いるので、高分子化合物と混合するだけで架橋反応が起こり、ゲル化が進行する。

ラジカル重合を利用してゲル化される従来の光応答性ゲルおよび光分解性ゲルの製造工程は、重合の際に酸素が存在すると重合反応を阻害し、ゲル化が進行しない。この現象は特に薄膜状のゲルを調製する際に顕著になる。一方、本発明の光分解性架橋剤では、架橋反応時に酸素の影響を全く受けないため、このような重合反応阻害は起こらない。

ラジカル重合反応を利用する場合も無酸素雰囲気条件で反応を行えば薄膜状のゲルを調製することが可能となるかもしれないが、その場合には無酸素条件下で重合反応を行わせるための設備が必要となり、製造工程が複雑になる。

一方、本発明の光分解性架橋剤を用いると、無酸素雰囲気条件が必要ないため、薄膜状のゲルの製造工程が簡略であり、効率的かつ低コストで光分解性ゲルを調製できる。

また、本発明では、架橋反応にラジカル重合を利用しないため、ラジカルによってダメージを受けやすい物質を混合した状態で光分解性ゲルを調製することが可能となる。従って、光分解性ゲルを広範な用途、例えば細胞や生理活性物質を固定化する用途にも使用できる。また、ラジカル重合に対応できないモノマーの重合物も高分子化合物として使用できることから、高分子化合物の選択範囲が広いという利点もある。

【 0 0 6 3 】

本発明の光分解性ゲルは、適度な強度、及び光分解性を有しているため、伝統的なフォトリソグラフィや近年の二光子励起加工法に代表されるような、光による微細加工技術を適応可能である。また、本発明の光分解性ゲルは、適度な強度を有しつつ細胞担体として適切な含水率を実現できる。したがって、本発明の光分解性ゲルは、複雑且つ微細な三次元構造を有する細胞担体として使用可能であり、非常に有用な材料である。

【 0 0 6 4 】

《細胞培養器具》

本発明の細胞培養器具は、本発明の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されていることを特徴とする細胞培養器具である。

光分解性ゲル層の厚さは、100 nm ~ 100 μm が好ましく、300 nm ~ 30 μm がさらに好ましく、1000 nm ~ 10 μm が特に好ましい。

【 0 0 6 5 】

細胞培養基材の構成材料としては、特に制限されず、プラスチック、ガラス、改質ガラス、金属等を挙げることができる。

プラスチックとして好適なものとしては、スチレン系樹脂（例えばポリスチレン（PS））、アクリル系樹脂（例えばポリメタクリル酸メチル樹脂（PMMA））、ポリビニルピリジン系樹脂（ポリ（4 - ビニルピリジン）、4 - ビニルピリジン - スチレン共重合体等）、シリコーン系樹脂（例えばポリジメチルシロキサン樹脂）、ポリオレフィン系樹脂（例えばポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂）、ポリエステル樹脂（ポリエチレンテレフタレート樹脂（PET））、ポリカーボネート系樹脂、エ

10

20

30

40

50

ポキシ系樹脂等がある。

細胞培養基材は、細胞培養に一般的に用いられる細胞培養ディッシュもしくはマイクロプレートと同様の構造の基材が好ましい。

細胞培養基材は、少なくとも表面が、ポリスチレンまたは細胞接着性材料からなることが好ましい。

【0066】

細胞接着性材料としては、細胞接着性タンパク質又は細胞接着性ペプチドが好ましい。

細胞接着性タンパク質は、ファイブロネクチン、コラーゲン、ゼラチン、ラミニンからなる群から選択された少なくとも1つであることがより好ましく、ゼラチンが特に好ましい。細胞接着性ペプチドは、アルギニン グリシン アスパラギン酸というアミノ酸配列（RGD配列）を有することが好ましい。

10

【0067】

本発明の細胞培養器具は、本発明の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されていることを特徴とする細胞培養器具である。本発明の光分解性ゲルは、複雑且つ微細な三次元構造を構築可能な細胞担体として好適な材料である。本発明の光分解性ゲルのみを用いても細胞培養、及び加工を行うことは可能であるが、本発明の光分解性ゲルを細胞培養基材表面に形成させることで、細胞培養、及びゲルの加工がより容易となる。

【0068】

《細胞配列・分別装置》

図5は、本発明の細胞配列・分別装置の一例であって、細胞培養器具11を保持する保持台12と、細胞培養器具11に光を照射する照射部13を備えている。

20

照射部13は、光源（図示略）と、細胞培養器具11の任意の一部領域にのみ光照射する照射領域調整部14と、パソコンなどの制御部15とを有する。

照射領域調整部14は、所定のパターン16をなす光を細胞培養器具11に照射することができる。パターン16は表示装置17に表示される。

【0069】

照射領域調整部14は、例えばDMD（デジタルマイクロミラーデバイス（Digital Micromirror Device））とを備えている。DMDは複数のマイクロミラーを有し、各マイクロミラーは、制御部15からの信号により独立に角度を設定できるようにされ、光源からの光を反射することによって、前記信号に応じたパターンの光18を細胞培養器具11に照射できるようになっている。

30

照射領域調整部14は、レンズ19、ミラー20、レンズ21を経て、細胞培養器具11の任意の領域に光18を照射できる。細胞培養器具11の任意形状の一部領域にのみ光18を照射することもできるし、全領域に光18を照射することもできる。

光源としては、光分解性架橋剤を分解させ得るものが選択され、例えば紫外線、可視光等の光を照射できるもの（例えば紫外線ランプ、可視光ランプ等）が使用できる。

光の波長域は、例えば200～1000nmを例示できる。特に300～600nm、なかでも350～400nmは好適である。照射エネルギーは、通常は0.01～1000J/cm²、好ましくは0.1～100J/cm²、より好ましくは1～10J/cm²である。

40

なお、光を細胞培養基材の一部領域にのみ照射させるための構成としては、DMDに限らず、液晶シャッターアレイ、光空間変調素子、所定形状のフォトマスク等も採用できる。

【0070】

図5に示す細胞配列・分別装置は、後述のように、光が照射される一部領域に細胞を配列する細胞配列装置としても使用できるし、前記光照射領域にある細胞とそれ以外の領域にある細胞とを分別する分別装置としても使用できる。

【0071】

本発明の光分解性ゲルは、光照射により複雑且つ微細な三次元構造を構築可能でかつ細胞担体として使用可能な材料である。そのため、本発明の細胞配列・分別装置は、光によ

50

る微細な加工技術と細胞培養技術とを組み合わせることで、三次元的で且つ精度の高い細胞配列、細胞培養、及び細胞分別を実現できる。また、細胞配列、細胞培養及び細胞分別を同時に行うことが可能であるため、三次元的な細胞状態を把握しつつ細胞を分別および配列させることが可能である。

【0072】

《細胞配列および分別方法》

次に、本発明の細胞培養器具を使用し、該細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射することにより前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞とそれ（当該一部領域）以外の領域にある細胞とを分別する工程を有することを特徴とする細胞分別方法、及び、前記一部領域に細胞を配列する工程を有することを特徴とする細胞配列方法について説明する。

10

【0073】

本発明において分別対象となる細胞は、特に限定されず、目的に応じて、動物由来の細胞（例えばヒト細胞）、植物由来の細胞、微生物由来の細胞等を使用できる。

具体例としては、例えば、造血幹細胞、骨髓系幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞などの体性幹細胞や胚性幹細胞、人工多能性幹細胞がある。

また、好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球（T細胞、NK細胞、B細胞等）等の白血球や、血小板、赤血球、血管内皮細胞、リンパ系幹細胞、赤芽球、骨髓芽球、単芽球、巨核芽球および巨核球等の血液細胞、内皮系細胞、上皮系細胞、肝実質細胞、膵ラ島細胞等のほか、研究用に樹立された各種株化細胞も本発明の対象となり得る。

20

【0074】

なお、本発明において、細胞が付着する（接着する）とは、例えば、培地や緩衝液等による洗浄等の一定の物理的刺激によってもその位置から移動しなくなることである。例えば、培地や緩衝液等の流れによる所定の剪断応力（例えば $0.1 \sim 10 \text{ N/m}^2$ ）の洗浄操作により移動しない状態を「接着状態」（付着状態）とすることができる。

【0075】

本発明の細胞配列および分別方法は、細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射することにより前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解する方法であり、同時に、光分解性ゲルが加工されることを伴う。光分解性ゲル層の縦横方向（XY軸方向）に着目した場合、光分解性ゲルが選択的に分解されることで、光分解性ゲルが2次元的に加工される。光分解性ゲル層の厚さ方向（Z軸方向）に着目した場合、光分解性ゲルが三次元的に加工される。

30

光を照射した部分に含まれる光分解性ゲル層は、全てのゲルを分解させてもよいし、すべてのゲルを分解させないで、Z軸方向への分解深度を任意に変化させることが可能である。

【0076】

（細胞配列方法）

以下、図6Aを参照しつつ、第1の例の細胞配列方法を詳しく説明する。図6Aは細胞培養器具30の模式図である。

【0077】

細胞培養基材31の表面に光分解性ゲル層32を形成する。細胞培養基材31の表面は細胞接着性が低い材料、例えばガラス、シリコン樹脂等であることが好ましい。光分解性ゲル層は、細胞接着性が高いことが好ましく、光分解性ゲル層に含まれる本発明の光分解性架橋剤と架橋される高分子化合物が、前記細胞接着性タンパク質であることが好ましい。

40

光分解性ゲル層32は、光分解性ゲルと前記細胞接着性材料とを混合した混合材料であってもよい。

【0078】

細胞培養器具30の光分解性ゲル層32の一部である領域A1に、フォトマスク35を通して光を照射し、領域A1の光分解性ゲル層32を分解させる。この領域A1の光分解

50

性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 3 1 表面から除去され、光分解性ゲル層 3 2 は三次元的に加工される。

細胞培養器具 3 0 に細胞 3 4 を播種すると、光分解性ゲル層 3 2 の表面 3 3 及び光照射によって新たに形成された光分解性ゲル層表面 3 3 ' にのみ細胞 3 4 は付着する。

光分解性ゲル層 3 2 の表面 3 3、3 3 ' に付着しなかった細胞 3 4 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 3 0 から除去することができる。これによって、三次元的に加工された光分解性ゲル層 3 2 上に細胞 3 4 を選択的に配列することができる。

【0079】

以下、図 6 B を参照しつつ、第 2 の例の細胞配列方法を詳しく説明する。図 6 B は細胞培養器具 4 0 の模式図である。

細胞培養基材 4 1 の表面に光分解性ゲル層 4 2 を形成する。細胞培養基材 4 1 の表面は細胞接着性が高い材料、例えばポリスチレンであることが好ましい。細胞培養基材 4 1 の表面が細胞接着性材料を含まない場合は、細胞培養基材 4 1 上に、細胞接着性材料からなるコート層を形成させてもよい。

光分解性ゲル層 4 2 は細胞接着性が低いことが好ましく、光分解性ゲル層 4 2 に含まれる本発明の光分解性架橋剤と架橋される高分子化合物は、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、細胞接着性の低いタンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 つであることが好ましく、分岐型のポリエチレングリコール誘導体が特に好ましい。

【0080】

細胞培養器具 4 0 の光分解性ゲル層 4 2 の一部である領域 A 1 に、フォトマスク 3 5 を通して光を照射し、領域 A 1 の光分解性ゲル層 4 2 を分解させる。この領域 A 1 の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 4 1 表面から除去される。

細胞培養器具 4 0 に細胞 3 4 を播種すると、光分解性ゲル層 4 2 が失われた領域 A 1 の細胞培養基材 4 1 の表面にのみ細胞 3 4 は付着する。

細胞培養基材 4 1 表面に付着しなかった細胞 3 4 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 3 0 から除去することができる。これによって、領域 A 1 に細胞 3 4 を選択的に配列することができる。

【0081】

(細胞分別方法)

次に、図 7 A を参照しつつ、第 1 の例の細胞分別方法を詳しく説明する。図 7 A は細胞培養器具 5 0 の模式図である。

【0082】

細胞培養基材 5 1 の表面に光分解性ゲル層 3 2 を形成する。

細胞培養基材 5 1 の材料は特に制限されず、前記の材料を用いることができる。光分解性ゲル層 3 2 は、細胞接着性が高いことが好ましく、光分解性ゲル層 3 2 に含まれる本発明の光分解性架橋剤と架橋される高分子化合物が、前記細胞接着性タンパク質であることが好ましい。

光分解性ゲル層 3 2 は、光分解性ゲルと前記細胞接着性材料とを混合した混合材料であってもよい。

【0083】

光分解性ゲル層 3 2 が細胞接着性材料を含まない場合は、光分解性ゲル層 3 2 上に、光分解性ゲルと細胞接着性タンパクとを含むコート層を形成させてもよい。

【0084】

細胞培養器具 5 0 に細胞 3 4 を播種すると、光分解性ゲル層 3 2 表面に細胞 3 4 が付着する。

【0085】

細胞培養器具 5 0 の光分解性ゲル層 3 2 の一部である領域 A 1 に、フォトマスク 3 5 を通して光を照射し、領域 A 1 の光分解性ゲルを分解させる。この領域 A 1 の光分解性ゲル

10

20

30

40

50

は可溶化し、洗浄により細胞培養基材 5 1 の表面から除去され、光分解性ゲル層 3 2 は三次元的に加工される。また、領域 A 1 の光分解性ゲルに付着した細胞 3 4 も細胞培養基材 5 1 から剥離する。

剥離した細胞 3 4 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 5 0 から選択的に除去することができる。

これによって、領域 A 1 の細胞 3 4 と、それ以外の細胞 3 4 を分別することができる。

【 0 0 8 6 】

以下、図 7 B を参照しつつ、第 2 の例の細胞分別方法を詳しく説明する。図 7 B は細胞培養器具 6 0 の模式図である。

10

【 0 0 8 7 】

細胞培養基材 5 1 の表面に、細胞 3 4 を内包した光分解性ゲル層 6 2 を形成する。

細胞培養基材 5 1 の材料は特に制限されず、前記の材料を用いることができる。光分解性ゲル層 6 2 に含まれる本発明の光分解性架橋剤と架橋される高分子化合物は、分子内に合計 2 以上のアミノ基またはヒドロキシル基を有する高分子化合物であれば特に制限されず、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 つであることが好ましく、分岐型のポリエチレングリコール誘導体又はゼラチンであることがより好ましい。

【 0 0 8 8 】

20

細胞培養器具 6 0 の光分解性ゲル層 6 2 の一部である領域 A 1 に、フォトマスク 3 5 を通して光を照射し、領域 A 1 の光分解性ゲルを分解させる。この領域 A 1 の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 5 1 表面から除去され、光分解性ゲル層 6 2 は三次元的に加工される。また、領域 A 1 の光分解性ゲルに内包された細胞 3 4 も細胞培養基材 5 1 から剥離する。

剥離した細胞 3 4 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 6 0 から選択的に除去することができる。

これによって、領域 A 1 の細胞 3 4 と、それ以外の細胞 3 4 を分別することができる。

【 0 0 8 9 】

上記細胞配列方法および細胞分別方法によれば、細胞培養器具 1 1 の領域 A 1 にのみ光を照射するので、光照射による細胞 3 4 への悪影響を極力抑えることができる。このため、細胞 3 4 の細胞外マトリックスや膜タンパク質が損なわれるのを防止し、器官特異的機能を維持することができる。このため、細胞工学分野、再生医療分野、バイオ関連工業分野、組織工学分野などにおいて有用である。

30

また、領域 A 1 にのみの光照射によって細胞 3 4 の分別を行うため、目的の細胞を精度よく分別することができる。

【 0 0 9 0 】

さらに、本発明の光分解性ゲルは、複雑かつ微細な三次元構造を構築可能な細胞担体として好適な材料であるから、本発明の細胞配列方法および細胞分別方法によれば、三次元的で且つ精度の高い細胞配列、及び細胞分別を実現できる。

40

【 0 0 9 1 】

《組織体形成方法》

本発明における組織体とは、細胞が三次元的に集合した状態を指し、細胞間に本発明の光分解性ゲルを含んでもよい。前記細胞は本発明の光分解性ゲルを用いて任意の期間培養され、増殖させたり、所望の組織を形成したり、所望の状態に分化されることが好ましい。

【 0 0 9 2 】

本発明の組織体形成方法は光分解性ゲルを形成する工程を含む。光分解性ゲルの厚さは、ゲルに内包させた細胞が、Z 軸方向に少なくとも 2 細胞以上が配列可能であって、三次元組織体が形成可能な厚みである 10 μ m 以上であることが好ましい。より具体的には、

50

20 μm ~ 1000 μm が好ましく、50 μm ~ 300 μm がさらに好ましい。

【0093】

本発明の組織体形成方法では、光分解性ゲルを形成した後に、光分解性ゲルへの光照射によって、光分解性ゲルの一部又は全部を分解し、組織体から光分解性ゲルの少なくとも一部を取り除くことができる。

【0094】

なお、以下の組織体形成方法の説明では、本発明の細胞培養器具を用いる場合を説明するが、本発明の組織体形成方法は本発明の光分解性ゲルを用いていればよく、本発明の細胞培養器具を用いずにも実施してもよい。

【0095】

次に、以下の工程：

- (I) 本発明の光分解性ゲルを形成する工程；
 - (II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
 - (III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び
 - (IV) 細胞を培養する工程；
- を含むことを特徴とする組織体形成方法について説明する。

【0096】

上記(I) ~ (IV)の工程の順番は、適宜入れ替えてもよく、また前記工程のうちの任意の工程を2回以上行ってもよい。

【0097】

以下、図8Aを参照しつつ、第1の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図8Aは細胞培養器具30の模式図である。

細胞培養基材31および光分解性ゲル層32は、第1の例の細胞配列法と同様の構成を用いることができる。

【0098】

細胞培養器具30の光分解性ゲル層32の一部である領域A1に、フォトマスク35を通して光を照射し、領域A1の光分解性ゲル層32を分解させる。この領域A1の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材31表面から除去され、光分解性ゲル層32は三次元的に加工され、フォトマスクのパターンに対応した形状をとる。

細胞培養器具30に細胞34を播種すると、光分解性ゲル層32の表面33及び光照射によって新たに形成された光分解性ゲル層表面33'にのみ細胞34は付着する。

光分解性ゲル層32の表面33、33'に付着しなかった細胞34は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具30から除去することができる。これによって、三次元的に加工された光分解性ゲル層32上に細胞34を選択的に配列することができる。

その後、細胞34を培養すると、細胞34は加工された光分解性ゲル層32を足場として増殖でき、細胞培養器具30上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0099】

以下、図8Bを参照しつつ、第2の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図8Bは細胞培養器具40の模式図である。

細胞培養基材41の表面に光分解性ゲル層42を形成する。

細胞培養基材41および光分解性ゲル層42は、第2の例の細胞配列法と同様の構成を用いることができる。

【0100】

細胞は基質への接着依存性の増殖を示さないものが好ましく、例えば腫瘍細胞、血球系細胞、各種幹細胞等が挙げられる。

【0101】

細胞培養器具40の光分解性ゲル層42の一部である領域A1に、フォトマスク35を通して光を照射し、領域A1の光分解性ゲル層42を分解させる。この領域A1の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材41表面から除去され、光分解性ゲル層42

10

20

30

40

50

は三次元的に加工される。

細胞培養器具 40 に細胞 34 を播種すると、光分解性ゲル層 42 が失われた領域 A1 の細胞培養基材 41 表面にのみ細胞 34 は付着する。

細胞培養基材 41 表面に付着しなかった細胞 34 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 30 から除去することができる。これによって、領域 A1 に細胞 34 を選択的に配列することができる。

その後、細胞 34 を培養すると、細胞 34 は加工された光分解性ゲル層 42 に規定された形状で増殖でき、細胞培養器具 40 上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0102】

以下、図 8C を参照しつつ、第 3 の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図 8C は細胞培養器具 50 の模式図である。

10

まず、細胞培養基材 51 の表面に光分解性ゲル層 32 を形成する。

細胞培養基材 51 および光分解性ゲル層 32 は、第 1 の例の細胞分別法と同様の構成を用いることができる。この場合、光分解性ゲル層 32 上に、光分解性ゲルと細胞接着性タンパクとを含むコート層を形成させることは適さない。

【0103】

細胞培養器具 50 に細胞 34 を播種すると光分解性ゲル層 32 表面に細胞 34 が付着する。

細胞培養器具 50 の光分解性ゲル層 32 の一部である領域 A1 に、フォトマスク 35 を通して光を照射し、領域 A1 の光分解性ゲルを分解させる。この領域 A1 の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 51 表面から除去され、光分解性ゲル層 32 は三次元的に加工される。また、領域 A1 の光分解性ゲルに付着した細胞 34 も細胞培養基材 51 表面から剥離する。

20

剥離した細胞 34 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 50 から選択的に除去することができる。

これによって、領域 A1 の細胞 34 と、それ以外の細胞 34 を分別する。

その後、細胞 34 を培養すると、細胞 34 は加工された光分解性ゲル層 32 を足場として増殖でき、細胞培養器具 50 上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0104】

以下、図 8D を参照しつつ、第 4 の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図 8D は細胞培養器具 50 の模式図である。

30

まず、細胞培養基材 51 の表面に光分解性ゲル層 32 を形成する。

細胞培養基材 51 および光分解性ゲル層 32 は、第 1 の例の細胞分別法と同様の構成を用いることができる。この場合、光分解性ゲル層 32 上に、光分解性ゲルと細胞接着性タンパクとを含むコート層を形成させることは適さない。

【0105】

細胞培養器具 50 に細胞 34 を播種すると、光分解性ゲル層 32 表面に細胞 34 が付着する。

その後、細胞 34 を培養し、細胞培養器具 50 上に細胞層を形成することができる。

さらに、細胞培養器具 50 の光分解性ゲル層 32 の一部である領域 A1 に、フォトマスク 35 を通して光を照射し、領域 A1 の光分解性ゲルを分解させる。この領域 A1 の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 51 表面から除去され、光分解性ゲル層 32 は三次元的に加工される。また、領域 A1 の光分解性ゲルに付着した細胞 34 も細胞培養基材 51 表面から剥離する。

40

剥離した細胞 34 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 50 から選択的に除去することができる。

これによって、細胞培養器具 50 上の細胞層から細胞を選択的に除去することができる。

また、細胞 34 を加工後のゲル上でさらに培養させることで、細胞 34 は加工された光分解性ゲル層 32 を足場として増殖でき、細胞培養器具 50 上で、三次元的に組織体を形

50

成することができる。

【0106】

次に、以下の工程：

- (I) 細胞を内包させた前記光分解性ゲルを形成する工程；
 - (II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
 - (III) 細胞を培養する工程；
- を含むことを特徴とする組織体形成方法について説明する。

【0107】

上記(I)～(III)の工程の順番は、適宜入れ替えてもよく、また前記工程のうちの任意の工程を2回以上行ってもよい。

10

【0108】

細胞培養基材51および光分解性ゲル層62は、第2の例の細胞分別法と同様の構成を用いることができる。

【0109】

以下、図9Aを参照しつつ、第5の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図9Aは細胞培養器具60の模式図である。

細胞培養基材51の表面に、細胞34を内包した光分解性ゲル層62を形成する。

【0110】

細胞培養器具60の光分解性ゲル層62の一部である領域A1に、フォトマスク35を通して光を照射し、領域A1の光分解性ゲルを分解させる。この領域A1の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材51表面から除去され、光分解性ゲル層62は三次元的に加工され、また、領域A1の光分解性ゲルに内包された細胞34も細胞培養基材51表面から剥離する。

20

剥離した細胞34は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具60から選択的に除去することができる。

これによって、領域A1の細胞34と、それ以外の細胞34を分別する。

その後、細胞34を培養すると、細胞34は加工された光分解性ゲル層62に規定された形状で増殖でき、細胞培養器具60上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0111】

以下、図9Bを参照しつつ、第6の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図9Bは細胞培養器具60の模式図である。

30

細胞培養基材51の表面に、細胞34が内包された光分解性ゲル層62を形成する。

その後、細胞34を培養し、細胞培養器具60上に三次元的に細胞塊を形成することができる。

細胞培養器具60の光分解性ゲル層62の一部である領域A1に、フォトマスク35を通して光を照射し、領域A1の光分解性ゲルを分解させる。この領域A1の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材51表面から除去され、光分解性ゲル層62は三次元的に加工され、また、領域A1の光分解性ゲルに内包された細胞34も細胞培養基材51表面から剥離する。

40

剥離した細胞34は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具60から選択的に除去することができる。

これによって、領域A1の細胞34と、それ以外の細胞34が分別され、細胞培養器具60上に三次元的に形成された細胞塊から細胞を取り除くことができる。その後、細胞34を培養すると、細胞34は加工された光分解性ゲル層62に規定された形状で増殖でき、細胞培養器具60上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0112】

以下、図9Cを参照しつつ、第7の例の組織体形成方法を詳しく説明する。図9Cは細胞培養器具60の模式図である。

細胞培養基材51の表面に、細胞34が内包された光分解性ゲル層62を形成する。

【0113】

50

細胞培養器具 60 の光分解性ゲル層 62 の一部である領域 A1 に、フォトマスク 35 を通して光を照射し、領域 A1 の光分解性ゲルを分解させる。この領域 A1 の光分解性ゲルは可溶化し、洗浄により細胞培養基材 51 表面から除去され、光分解性ゲル層 62 は三次元的に加工される。また、領域 A1 の光分解性ゲルに内包された細胞 34 も細胞培養基材 51 表面から剥離する。

剥離した細胞 34 は、培地や緩衝液等により洗浄すること等によって細胞培養器具 60 から選択的に除去することができる。

これによって、領域 A1 の細胞 34 と、それ以外の細胞 34 を分別する。

その後、光照射により露出した細胞培養基材 51 上又は光分解性ゲル層 62 上に、細胞 34 とは別の種類の細胞 34' を内包した光分解性ゲル層 72 をさらに形成してもよい。

光分解性ゲル層 62 及び 72 は、例えば領域 A1 とは異なる領域 B1 へ、フォトマスク 35 を通して光照射することにより再度加工することができる。

その後、細胞 34、34' を培養すると、細胞 34、34' は加工された光分解性ゲル層 62、72 に規定された形状で増殖でき、細胞培養器具 60 上で、三次元的に組織体を形成することができる。

【0114】

本発明の光分解性ゲルは、複雑かつ微細な三次元構造を構築可能な細胞担体として好適な材料であるから、本発明の組織体形成方法によれば、複雑かつ微細な三次元構造を有する組織体を形成可能である。また、より生体環境に近く信頼度の高い細胞アッセイ系が実現される。

【実施例】

【0115】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0116】

(実施例 1)

[光分解性架橋剤の合成]

以下は、光分解性架橋剤 (NHS - PD - 4 armPEG) の合成方法である。

N,N - ジメチルスルホキシド (DMSO) 洗浄した 3 - (1 - piperazino) propyl functionalized silica gel (66 g) の DMSO (130 mL) 溶液に 4 - {4 - [1 - (9 - Fluorenylmethyloxycarbonylamino) ethyl] - 2 - methoxy - 5 - nitrophenoxy} butanoic acid (2.7 g) を加え、室温 ~ 還流条件下で数十分 ~ 24 時間攪拌した。濾過後、濾取物を DMSO で洗浄し、減圧下、全量が約 130 mL になるまで DMSO を留去した。得られた残留物に SUNBRIGHT PTE - 100HS (日油株式会社製、9.6 g) のテトラヒドロフラン (THF) 溶液を加え、室温 ~ 還流条件下で数十分 ~ 24 時間攪拌した。反応混合物から減圧下にて THF を留去後、残渣を氷冷したエーテルにゆっくり滴下し、数時間 ~ 3 日間静置後、析出物を濾取した。析出物を少量の THF に溶解させ、氷冷したエーテルにゆっくり滴下し、1 ~ 24 時間静置後、析出物を濾取した (2 回繰り返す)。減圧下、乾燥させた析出物を Sephadex LH - 20 (MeOH) で分離精製し、得られた化合物の THF 溶液に N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を加え、室温 ~ 還流条件下で数十分 ~ 24 時間攪拌した。反応混合物から減圧下にて THF を留去後、ジクロロメタン (CH₂Cl₂) を加えて希釈した。得られた CH₂Cl₂ 溶液を 5% 塩酸水溶液および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後、減圧下溶媒を留去し、少量の THF に溶解させた残渣をエーテルにゆっくり滴下し、1 ~ 24 時間時間静置後、析出物を濾取した (2 回繰り返す)。析出物を減圧下乾燥後、目的化合物の光分解性架橋剤を 9.80 g 得た。

上記の過程と、得られた化合物を図 10 に示す。

10

20

30

40

50

得られた目的化合物についてNMRによる分析を行い、目的の化合物が得られたことを確認した。以下にNMRによる分析結果を示す。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.35 (m, 2H), 1.53 (d, $J = 7.09$ Hz, 3H), 1.60 (m, 4H), 2.18 (br t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 2.28 (tt, $J = 7.33, 5.98$ Hz, 2H), 2.85 (br s, 4H), 2.88 (t, $J = 7.33$ Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.43 (t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 3.47 3.83 (m, $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$), 3.94 (s, 3H), 4.15 (t, $J = 5.98$ Hz, 2H), 5.49 (dq, $J = 7.57, 7.09$ Hz, 1H), 6.39 (br d, $J = 7.57$ Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.56 (s, 1H).

【0117】

(実施例2)

[光分解性ゲルの製造] (ゼラチン溶液)

ゼラチン (Type A、300ブルーム、ブタ皮由来) (Gelatin from Porcine skin gel strength 300, Sigma Aldrich 社) (5w/v%)

溶媒 (リン酸緩衝液 (DPBS): 0.3 mM HEPES = 1:1, pH 7) 上記の分量で、ゼラチンと溶媒を37 で攪拌混合した後、ゼラチン溶液を得た。

(光分解性架橋剤溶液)

光分解性架橋剤 (実施例1で合成) 10 mM (12.1w/v%)

溶媒 (140 mM NaCl、10 mM フタル酸 水溶液) (光分解性ゲル溶液) ゼラチン溶液と光分解性架橋剤を等量で混合し、ゼラチンベースの光分解性ゲル溶液を得た。

【0118】

(実施例3)

[amino-4arm PEG 溶液]

amino-4arm PEG (MW = 10,000) (SUNBRIGHT PTE-100PA、日油株式会社製) 10 mM (12.1w/v%)

溶媒 (リン酸緩衝液 (DPBS): 0.3 M HEPES = 1:1, pH 7) 上記の分量で、PEGと溶媒を混合し、amino-4arm PEG 溶液を得た。

[光分解性架橋剤溶液]

光分解性架橋剤 (実施例1で合成) 10 mM (12.1w/v%)

溶媒 (140 mM NaCl、10 mM フタル酸 水溶液、pH 4) (光分解性ゲル溶液) amino-4arm PEG 溶液と光分解性架橋剤を等量で混合し、ポリエチレングリコールベースの光分解性ゲル溶液を得た。

【0119】

(実施例4)

実施例2のゼラチンベースの光分解性ゲル溶液 (10 ~ 30 μL) をアミノコートされたスライドガラス (MASコートスライドガラス、松浪硝子工業株式会社) に塗布した後に、スライドガラスで覆い、光分解性ゲル層を形成させた。ゲル層の厚みは、スライドガラス (厚さ: 150 μm) またはペットフィルム (厚さ: 25 μm) により調節した。フォトリソグラフィ用マスクは、パターンを300 dpiの解像度でフィルム印刷し、作成した。

上記のマスクを照射装置とスライドガラスの間に配置することで、ゲルを選択的に露光させ、光分解を行った。照射エネルギーは7.2 ~ 9.0 J/cm^2 で、所望のパターンにゲルが分解されるまで光照射を行った。光源は350 ~ 385 nmで、30 mW/ cm^2 のものを使用した。光照射により分解されたゲルは、蒸留水中で洗浄除去を行った。

図11は、光照射によってパターン分解された、本発明のゼラチンベースの光分解性ゲルの写真である。本発明のゼラチンベースの光分解性ゲルは、領域A1への選択的な光照射により、直径20 μm まで高分解能 (XY平面) で分解することが確認された。

【 0 1 2 0 】

(実施例 5)

実施例 3 のポリエチレングリコールベースの光分解性ゲル溶液 (1 0 ~ 3 0 μ L) をアミノコートされたスライドガラス (M A S コートスライドガラス、松浪硝子工業株式会社) に塗布した後に、スライドガラスで覆い、光分解性ゲル層を形成させた。ゲル層の厚みは、スライドガラス (厚さ : 1 5 0 μ m) またはペットフィルム (厚さ : 2 5 μ m) により調節した。

マスクの作製と、ゲルの光分解は実施例 4 と同様に行った。

図 1 2 は、光照射によってパターン分解された、本発明のポリエチレングリコールベースの光分解性ゲルの写真である。本発明のポリエチレングリコールベースの光分解性ゲルは、領域 A 1 への光照射により、直径 2 0 μ m まで高分解能 (X Y 平面) で分解することが確認された。

10

【 0 1 2 1 】

また、光分解性ゲルの Z 軸分解能について検証を行った。図 1 3 A は、1 . 5 J / c m ² の照射エネルギーで領域 A 1 への光照射を行い、光分解を行ったゲルの状態の画像である。図 1 3 B は、9 . 0 J / c m ² の照射エネルギーで領域 A 1 への光照射を行い、光分解を行ったゲルの状態の画像である。光学顕微鏡によるゲル表面の観察結果を図 1 3 A 上部パネル及び図 1 3 B 上部パネルに示す。このパターン分解したゲル表面に蛍光ビーズを局在化させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ゲルの分解形状および分解深度を計測した。共焦点レーザー顕微鏡によって得られた画像データを図 1 3 A の中部、下部パネル、及び図 1 3 B の中部、下部パネル、に示す。図 1 3 A 中部パネルおよび図 1 3 B 中部パネル中の破線 (i)、(i i) および (i i i) 位置における Z 軸平面図を、それぞれ図 1 3 A 下部パネルおよび図 1 3 B 下部パネルの (i)、(i i) および (i i i) に示す。

20

図 1 3 C には、0 . 9 J / c m ²、1 . 5 J / c m ²、3 . 0 J / c m ² および 9 . 0 J / c m ² の照射エネルギーで領域 A 1 への光照射を行い、光分解を行った後の、ゲル層平均深度の計測結果 (n = 4) を表す。本発明のポリエチレングリコールベースの光分解性ゲルは、照射エネルギーが大きいほど、領域 A 1 での Z 軸方向への分解深度が深くなり、9 . 0 J / c m ² の照射エネルギーでは、ゲル内部 2 1 6 μ m まで分解されていた。

これらの結果から、本発明の実施例 4 および実施例 5 の光分解性ゲルは、X Y Z のいずれの軸方向においても、光照射による微細加工が可能であることが確認された。

30

【 0 1 2 2 】

(実施例 6)

[光分解性ゲルへの細胞の包埋]

実施例 3 の a m i n o - 4 a r m P E G 溶液に、細胞 3 4 (マウス線維芽細胞 : N I H - 3 T 3) を加え、実施例 3 と同様に光分解性架橋剤溶液を加え、細胞 3 4 を含んだ光分解性ゲル溶液を得た。その後、スライドガラス上に細胞 3 4 を内包したゲル層 6 2 を形成させ、領域 A 1 への光照射によってパターン分解を行った。ゲル層の形成とゲルのパターン分解は実施例 4 と同様の方法により行った。

細胞 3 4 を内包し、光照射を行ったゲル層 6 2 に、L I V E / D E A D a s s a y k i t (0 . 5 μ L のエチジウムホモダイマー 1、2 . 0 μ L のカルセイン A M を使用 (M o l e c u l a r P r o b e s 製)) を用いて染色し、細胞 3 4 の生死状態を調べた。

40

染色により、生細胞は緑色蛍光を発し、死細胞は赤色蛍光を発する。

染色後の様子を図 1 4 A ~ C に示す。図 1 4 A は光照射前のゲル層 6 2 の蛍光観察画像である。図 1 4 B は光照射後のパターン形成されたゲル層 6 2 の明視野観察の画像であり、図 1 4 C は図 1 4 B の蛍光観察画像である。光照射後のゲルにおいて、包埋された細胞 3 4 のうち、7 0 % 以上の細胞 3 4 が緑色の蛍光を示した。したがって本発明の光分解性ゲル内に細胞 3 4 を包埋し、光照射によってパターン形成を行った後であっても、細胞 3 4 が良好な状態で生存可能なことが明らかである。

以上の結果より、本発明の光分解性架橋剤を用いた本発明の光分解性ゲルは、細胞をゲル内で生存させたまま微細な三次元構造を形成可能であることがわかった。したがって、

50

本発明の光分解性架橋剤を用いた本発明の光分解性ゲルは、複雑且つ微細な三次元組織体の形成に好適な、非常に有用性の高い組織工学材料である。

【0123】

(実施例7)

[光分解性ゲルの調製]

10 mM amino-4 arm PEG (MW = 9617、NOF Corp. 社製)、又は5% (w/w) ゼラチン (Type A、300ブルーム、ブタ皮由来) を、リン酸緩衝液 (PBS, Invitrogen 社製) と 0.3 M HEPES 緩衝液 (和光純薬工業社製) (pH = 7.0) の等量混液を用いて調整することで、ベースポリマー溶液とした。また、合成した NHS-PC-4 arm PEG 架橋剤 (10 mM、12.1% w/v) を、10 mM フタル酸緩衝液 (pH 4.0、和光純薬工業社製) により調整することで、架橋剤溶液とした。さらに調整した架橋剤溶液が、140 mM NaCl (和光純薬工業社製) となるように調製した。なお、ゼラチン溶液は 37℃、その他の溶液は室温にて調整を行った。

ベースポリマー溶液及び架橋剤溶液を調整した後に、等量混合した。アミノコートされたスライドガラス (MASコート、松浪硝子工業株式会社製) 上に、光分解性ゲル溶液と架橋剤の混合溶液を、10 - 30 µL の液量でスライドガラス上に塗布した後に、カバーガラスで覆い、光分解性ゲル層を形成させた。その際、ゲル層の厚みは、ポリエチレンテレフタレート (PET) フィルム (厚さ: 25 µm) 又はカバーガラス (厚さ: 150 µm) で調節した。

【0124】

(実施例8)

[細胞培養]

次に、実施例7で調製した光分解性ゲル上における細胞挙動を評価するために、合成したゲル基剤上へヒト臍静脈内皮細胞 (HUV EC) を播種した。本評価には、amino-4 arm PEG 又はゼラチンをベースポリマーとして調製した光分解性ゲルを用いた。また、HUV EC 細胞の培養には、HuMedia EG-2 培養液 (クラボウ社製) (2% (v/v) ウシ胎仔血清、10 ng/mL のヒト表皮成長因子、1.34 µg/L ヘミコハク酸ヒドロコルチゾン、50 µg/mL ゲンタマイシン、50 ng/mL アンフォテリシン B、5 ng/mL ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、10 µg/mL ヘパリン含有)) を用いて、5% CO₂、37℃ 環境下にて培養した。培養した細胞を 0.1% トリプシン含有 DPBS 溶液へ5分間暴露した後に、細胞回収を行い、最終的な細胞濃度が 1.0×10^7 細胞/mL になるよう細胞懸濁液を HuMedia EG-2 培養液にて調整した。

amino-4 arm PEG 又はゼラチンで調製した光分解性ゲル上に、HUV EC 細胞を播種した。光分解性ゲル上に 35 µL の細胞懸濁液を用いて播種を行い、ゲル表面全体に細胞を広げた後に、培養器内で静置した。培養開始1時間後、光分解性ゲル表面へ接着しなかった細胞と過剰な培養液をピペットにより吸引除去し、35 mm² の培養皿に 3 mL の培養液を加え、再び培養器内へ静置した。

培養開始1日目、又は3日目に、倒立型顕微鏡にて画像観察を行った。さらに培養3日目の細胞生死判定を行うために、LIVE/DEAD assay kit (0.5 µL エチジウムホモダイマー1、2.0 µL カルセインAM (Molecular Probes 製)) による細胞染色を行った。細胞染色液にて10分間染色を行い、培養細胞を DPBS により洗浄した後に、倒立型顕微鏡により明視野画像観察及び蛍光画像観察を行った。

また、光照射時の光毒性と合成したゲル分解物の毒性評価を行うために、上述した手法を用いて、同様に細胞生死判定を行った。2.5% (w/v) ゼラチンベースした光分解性ゲル溶液と、1.0% (w/v) NHS-PC-4 arm PEG 架橋剤溶液により合成した光分解性ゲル上で HUV EC 細胞を3日間培養した後に、パターン光照射 (365 nm、125 mW/cm²、8 - 24 秒) を行い、さらに 37℃ で3時間培養することで、ゲル

分解物へ細胞暴露試験を行った。試料への光照射は、P C 制御型マイクロプロジェクションシステム（D E S M - 0 1、エンジニアリングシステム社製）により行った（非特許文献 8 を参照）。

【 0 1 2 5 】

（結果）

本実施例では、光分解性ゲル上における細胞挙動を評価するために、モデル細胞として H U V E C 細胞による培養評価を行った。その結果、a m i n o - 4 a r m P E G により調製した光分解性ゲル表面上へは、ほとんど H U V E C 細胞が接着しなかった（図 1 5）。これは P E G が細胞非接着性の基材であるためと考えられる（非特許文献 9 を参照）。それに対して、ゼラチンにより調製したゲル表面上へは、すべての H U V E C 細胞が接着することが明らかとなった（図 1 6 A 及び図 1 6 B）。

図 1 6 A 及び図 1 6 B の右パネル及び中央パネルに示されるよう、2.5 % (w/v) ゼラチン溶液と 1.0 % (w/v) 又は 3.0 % (w/v) 架橋剤により調製したゼラチンベースの光分解性ゲル上では、培養開始 3 日目に顕著な細胞増殖が確認され、5.0 % (w/v) 架橋剤濃度を使用したゲルと比較して、細胞増殖に顕著な違いがみられる。本検討結果より、合成した光分解ゲル上における細胞挙動（基材への細胞接着、基材上での細胞伸長、及び基材上での細胞増殖）の相違は、光分解性架橋剤の濃度に起因する可能性が示唆された。

また同様の手法にて、1.25 % (w/v) ゼラチン溶液と 0.5 - 2.5 % (w/v) 架橋剤により調製した光分解性ゲルでの細胞増殖を調べたところ、図 1 7 B に示したように、2.5 % (w/v) ゼラチン溶液を用いた結果と同様の傾向が観察されたため、細胞増殖はゼラチン濃度に依存しないことが明らかとなった。本検討結果より、ゼラチン溶液により合成した光分解性ゲル上における細胞接着は、架橋剤濃度によりのみ依存して変化すると考えられる。すなわち、ゼラチン基材上の未反応アミノ残基が影響を受けずに存在しているので、未反応アミノ酸残基が細胞接着と細胞増殖に重要であると考えられる。

【 0 1 2 6 】

（実施例 9）

[H U V E C 細胞のパターニング]

2.5 % (w/v) ゼラチン溶液と 1.0 % (w/v) 架橋剤により調製した光分解性ゲル上での H U V E C 細胞のパターニングを検証するため、実施例 8 と同様に光分解性ゲル上で培養した H U V E C 細胞に対して、フォトマスクを介した光照射（1.0 ~ 3.0 J / c m²）を行った。さらに、光照射時の光毒性とゲル分解物の細胞毒性を評価するために、L I V E / D E A D a s s a y k i t による細胞生死判定を行った。

（結果）

光照射後のゲルパターン分解により、H U V E C 細胞はゲル孔内へ落下し、中心から周辺へと移動した（図 1 8 C 及び図 1 8 D）。図に示される細胞のパターンは、ゲルの光分解によるものである。したがって、ゲル上における細胞制御をマイクロオーダーで実現できる可能性が示唆された。

さらにゲル上にて伸長した細胞に光照射を施した後に、細胞生死判定を行った結果、光照射領域上の細胞と非照射領域上における細胞で、細胞生死に大きな相違は確認されなかった（図 1 8 B - 図 1 8 D）。すなわち、光照射とゲル分解は、細胞の生存へは影響しないことが明らかとなった。

【 0 1 2 7 】

以上の実施例においては、光分解性ゲルを a m i n o - 4 a r m P E G とゼラチンから調製できること、アミノ部分を有する生体分子をそのまま利用して、光分解性ハイドロゲルを調製できることなどが示された。また、本願で示した光分解性架橋剤は、その他の天然のポリマー（コラーゲン、フィブロネクチン、キトサン等）との反応も可能であると思われる、様々な光分解性ヒドロゲルの調製の可能性を広げた。

【 0 1 2 8 】

以上で説明した各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は一例であり、本

発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。また、本発明は各実施形態によって限定されることはなく、請求項（クレーム）の範囲によってのみ限定される。

【産業上の利用可能性】

【0129】

本発明は、細胞工学分野、再生医療分野、バイオ関連工業分野、組織工学分野などにおいて有用である。

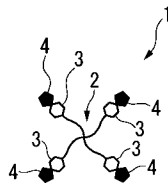
【符号の説明】

【0130】

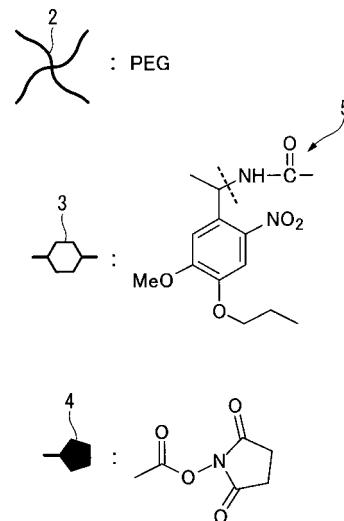
1 ... 光分解性架橋剤、2 ... 主鎖、3 ... ニトロベンジル基を含む基、4 ... 活性エステル基、5 ... アミド結合部、6 ... 高分子化合物、7 ... 高分子化合物、8 ... アミノ基、9 ... 架橋剤と高分子化合物間のアミド結合、10 ... 光分解性ゲル、11・30・40・50・60 ... 細胞培養器具、31・41・51 ... 細胞培養基材、32・42・62・72 ... 光分解性ゲル層、33 ... 光分解性ゲル層の表面、34 ... 細胞、35 ... フォトマスク、A1・B1 ... 光が照射される一部領域。

10

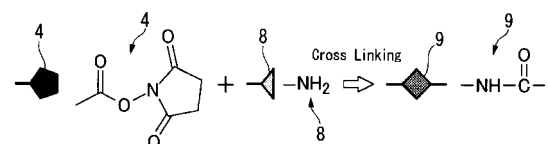
【図1】



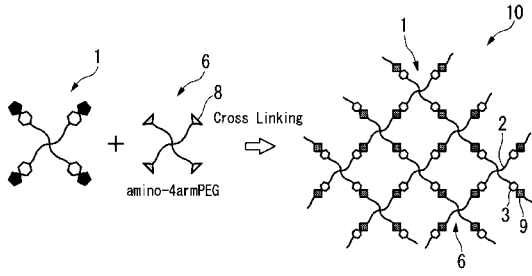
【図2】



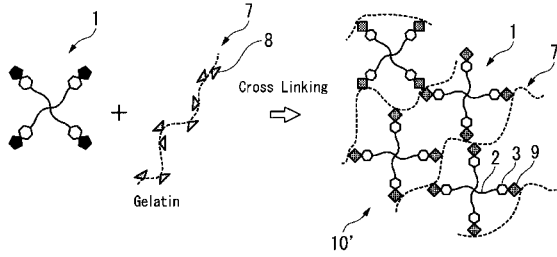
【図3A】



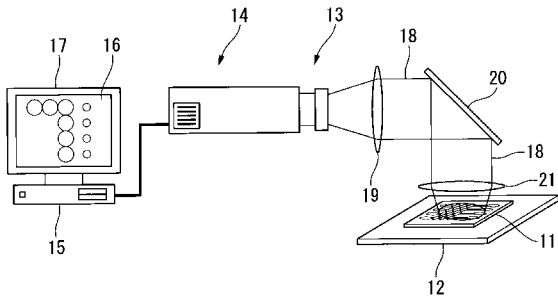
【 図 3 B 】



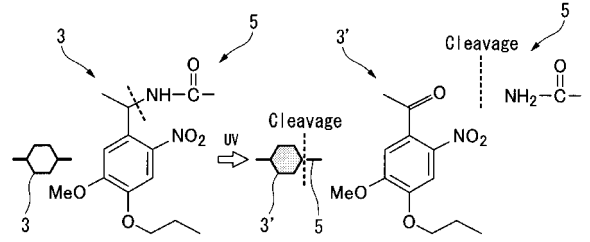
【 図 3 C 】



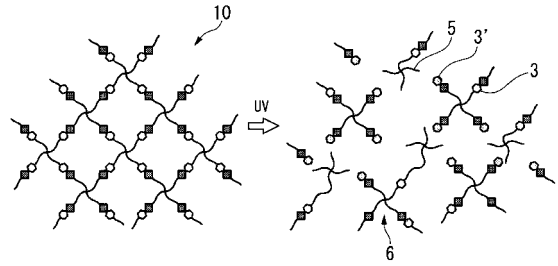
【 図 5 】



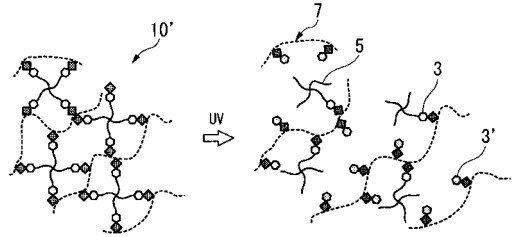
【 図 4 A 】



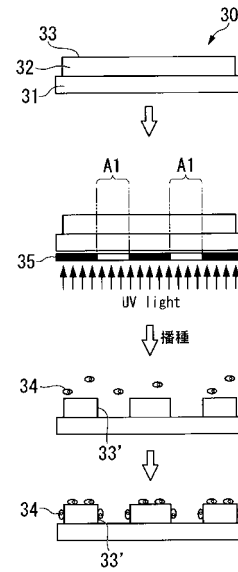
【 図 4 B 】



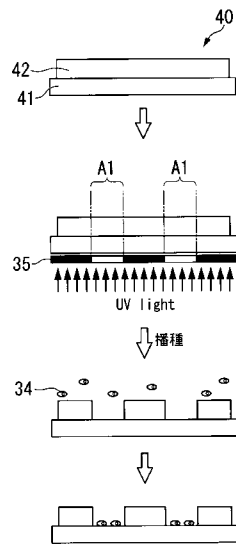
【 図 4 C 】



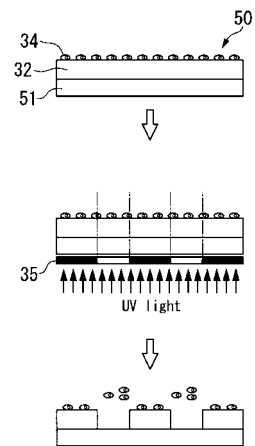
【 図 6 A 】



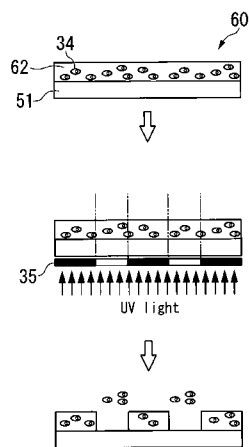
【図 6 B】



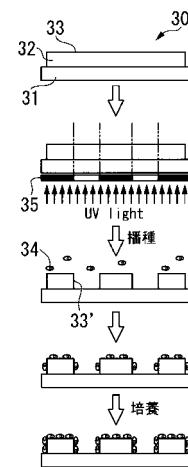
【図 7 A】



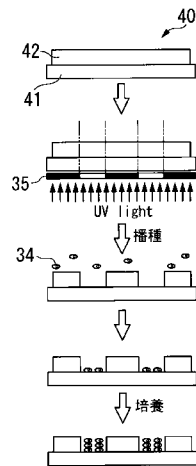
【図 7 B】



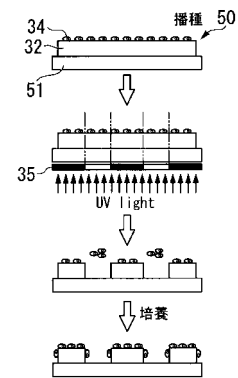
【図 8 A】



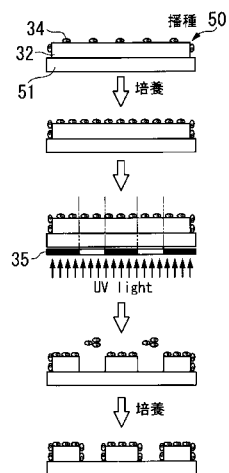
【図 8 B】



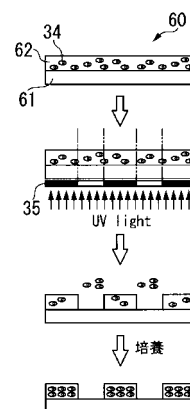
【図 8 C】



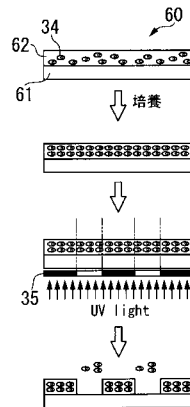
【図 8 D】



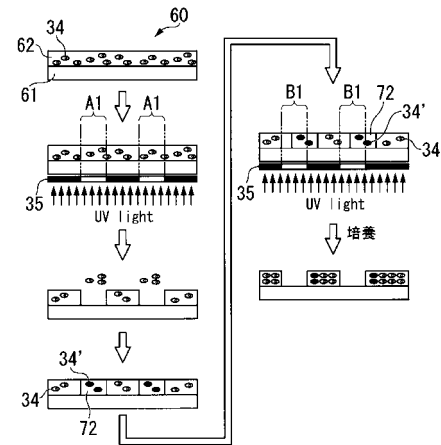
【図 9 A】



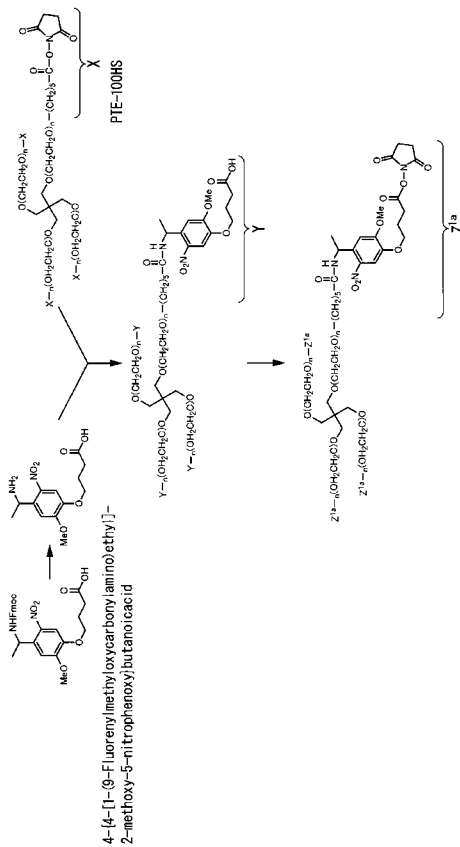
【図 9 B】



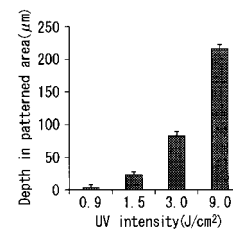
【図 9 C】



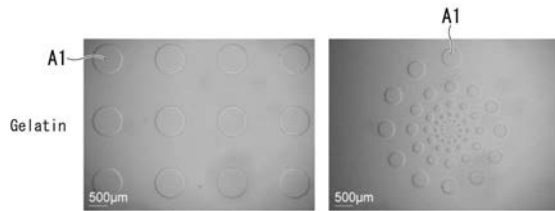
【図 10】



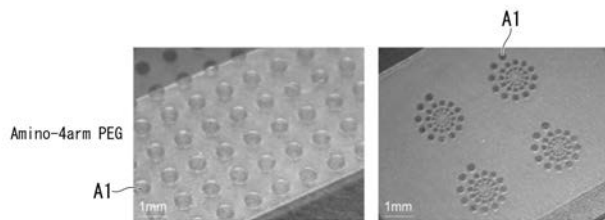
【図 13 C】



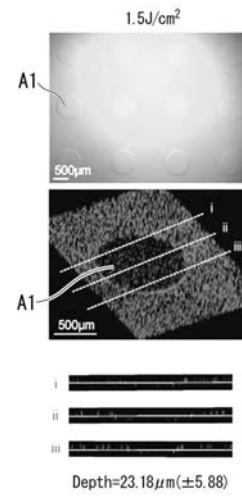
【図 1 1】



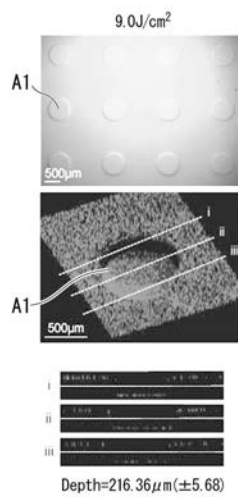
【図 1 2】



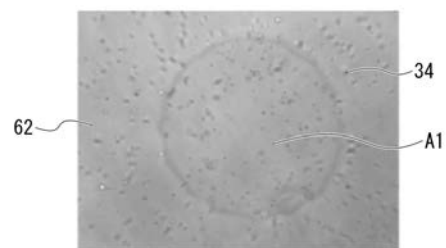
【図 1 3 A】



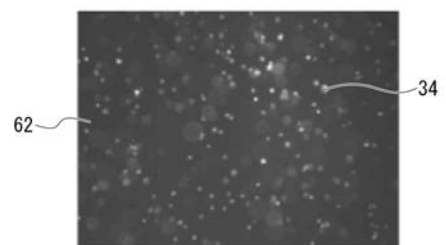
【図 1 3 B】



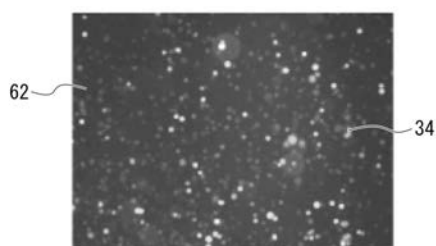
【図 1 4 B】



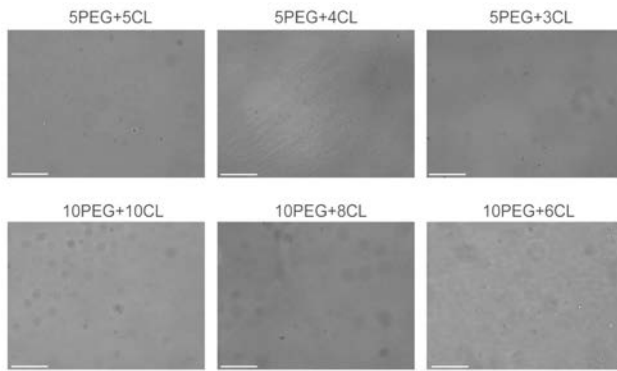
【図 1 4 C】



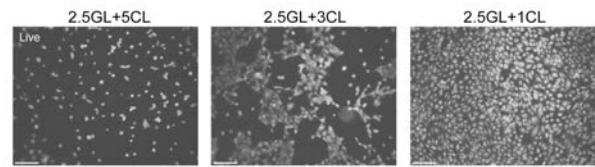
【図 1 4 A】



【図 15】



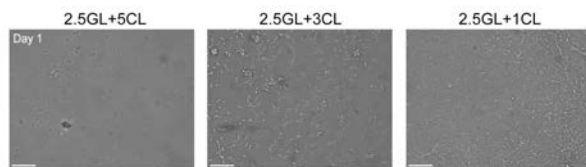
【図 16 C】



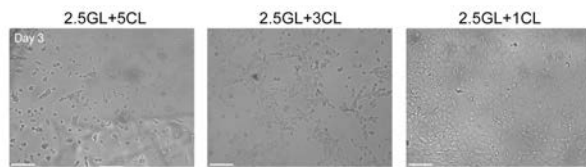
【図 16 D】



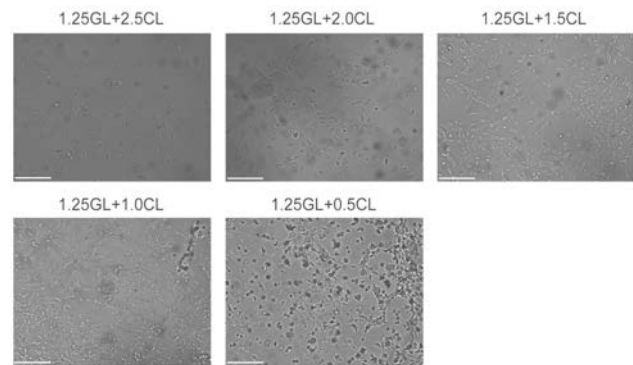
【図 16 A】



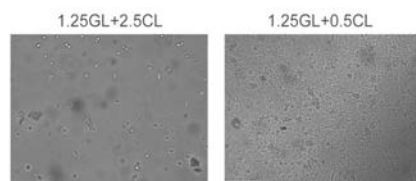
【図 16 B】



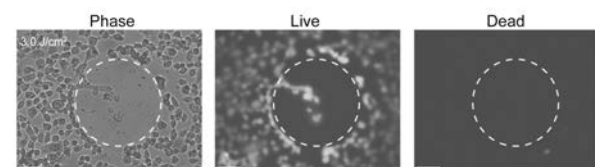
【図 17 A】



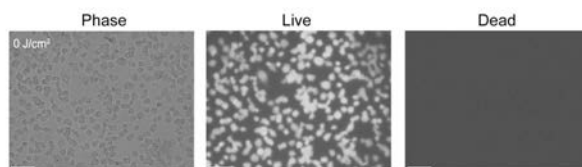
【図 17 B】



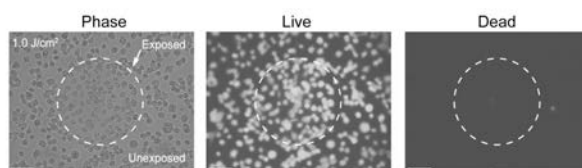
【図 18 D】



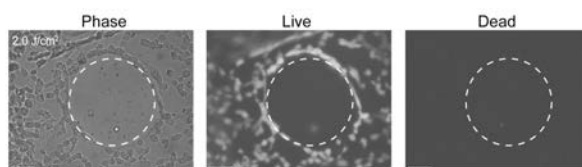
【図 18 A】



【図 18 B】



【図 18 C】



【手続補正書】

【提出日】平成27年11月11日(2015.11.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3 以上の分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖、及び前記分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシ基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

【請求項 2】

前記活性エステル基が N - ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である請求項 1 記載の光分解性架橋剤。

【請求項 3】

前記分岐鎖におけるエチレングリコールの平均繰り返し数が 20 から 500 の範囲にある請求項 1 又は 2 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 4】

前記分岐鎖の数が 4 又は 8 である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 5】

前記ポリエチレングリコール主鎖が、ネオペンチル骨格を有する請求項 1 ～ 4 のいずれか一項 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の光分解性架橋剤、及び分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシ基を有する高分子化合物が、前記高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシ基と前記光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合して アミド結合又はエステル結合を形成していることを特徴とする光分解性ゲル。

【請求項 7】

前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 8】

前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である、請求項 6 又は 7 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 9】

前記高分子化合物が、ゼラチンである、請求項 6 又は 7 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 10】

請求項 6 ～ 9 のいずれか一項 に記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

【請求項 11】

前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン樹脂または細胞接着性材料からなる、請求項 10 に記載の細胞培養器具。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具、及び
該細胞培養器具に光を照射する照射部、
を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する、細胞配列・分別装置。

【請求項 13】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

【請求項 14】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

【請求項 15】

(I) 請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び
(IV) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 16】

(I) 細胞を内包させた、請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び
(III) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 17】

請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の光分解性ゲル、及び細胞、を含む組織体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

発明者らは鋭意検討し、光分解性架橋剤の分岐数を高めることでゲルの強度を高められ、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は以下の通りである。

[1] 3 以上の分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖、及び前記分岐鎖を有するポリエチレングリコール主鎖の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

[2] 前記活性エステル基が N - ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である [1] に記載の光分解性架橋剤。

[3] 前記分岐鎖におけるエチレングリコールの平均繰返し数が 20 から 500 の範囲にある [1] 又は [2] に記載の光分解性架橋剤。

[4] 前記分岐鎖の数が 4 又は 8 である [1] ～ [3] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[5] 前記ポリエチレングリコールの主鎖が、ネオペンチル骨格を有する [1] ～ [4] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[6] [1] ～ [5] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤、及び分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物が、前記高分子化合物のアミノ基またはヒドロキシル基と前記光分解性架橋剤の活性エステル基と縮合してアミド結合又はエ

ステル結合を形成していることを特徴とする光分解性ゲル。

[7] 前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群より選択される少なくとも１つである、[6]に記載の光分解性ゲル。

[8] 前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である [6] 又は [7] に記載の光分解性ゲル。

[9] 前記高分子化合物が、ゼラチンである [6] 又は [7] に記載の光分解性ゲル。

[10] [6] ~ [9] のいずれか一つに記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

[11] 前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン系樹脂または細胞接着性材料からなる、[10] に記載の細胞培養器具。

[12] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具、及び該細胞培養器具に光を照射する照射部を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する細胞配列・分別装置。

[13] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

[14] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

[15]

(I) [6] に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；

(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び

(IV) 細胞を培養する工程

を含む、組織体形成方法。

[16]

(I) 細胞を内包させた、[6] に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び

(III) 細胞を培養する工程

を含む、組織体形成方法。

[17] [6] ~ [9] のいずれか一つに記載の光分解性ゲル、及び細胞、を含む組織体。

【**手続補正書**】

【**提出日**】平成28年3月9日(2016.3.9)

【**手続補正 1**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】全文

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項 1**】

ポリエチレングリコール鎖を含む分岐鎖状の鎖状構造を有し、前記鎖状構造の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、前記末端の数が3以上であり、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシ基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

【**請求項 2**】

前記活性エステル基が N - ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である請求項 1 記載の光

分解性架橋剤。

【請求項 3】

前記ポリエチレングリコール鎖のエチレングリコールの平均繰り返し数が 20 から 500 の範囲にある請求項 1 又は 2 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 4】

前記末端の数が 4 又は 8 である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 5】

前記ポリエチレングリコール鎖が、ネオペンチル骨格を有する請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 6】

分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物の前記アミノ基又は前記ヒドロキシル基と、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の光分解性架橋剤の前記活性エステル基によるアミド結合又はエステル結合を有する光分解性ゲル。

【請求項 7】

前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 8】

前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である、請求項 6 又は 7 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 9】

前記高分子化合物が、ゼラチンである、請求項 6 又は 7 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 10】

請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

【請求項 11】

前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン樹脂または細胞接着性材料からなる、請求項 10 に記載の細胞培養器具。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具、及び
該細胞培養器具に光を照射する照射部、
を備え、
前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する、
細胞配列・分別装置。

【請求項 13】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

【請求項 14】

請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

【請求項 15】

(I) 請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び
(IV) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 16】

(I) 細胞を内包させた、請求項 6 に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び
(I I I) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 17】

請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の光分解性ゲル、及び細胞、
を含む組織体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

発明者らは鋭意検討し、光分解性架橋剤の分岐数を高めることでゲルの強度を高められ、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は以下の通りである。

[1] ポリエチレングリコール鎖を含む分岐鎖状の鎖状構造を有し、前記鎖状構造の末端に配置された光分解性のベンジル基、を含み、前記末端の数が 3 以上であり、

前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基に対する反応性を有する活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を、当該ベンジル基のベンゼン環に有する、光分解性架橋剤。

[2] 前記活性エステル基が N - ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体である [1] に記載の光分解性架橋剤。

[3] 前記ポリエチレングリコール鎖のエチレングリコールの平均繰り返し数が 20 から 500 の範囲にある [1] 又は [2] に記載の光分解性架橋剤。

[4] 前記末端の数が 4 又は 8 である [1] ～ [3] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[5] 前記ポリエチレングリコール鎖が、ネオペンチル骨格を有する [1] ～ [4] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[6] 分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物の前記アミノ基又は前記ヒドロキシル基と、前記 [1] ～ [5] のいずれか 1 つに記載の光分解性架橋剤の前記活性エステル基によるアミド結合又はエステル結合を有する光分解性ゲル。

[7] 前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらのうちいずれかの誘導体からなる群より選択される少なくとも一つである、[6] に記載の光分解性ゲル。

[8] 前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である [6] 又は [7] に記載の光分解性ゲル。

[9] 前記高分子化合物が、ゼラチンである [6] 又は [7] に記載の光分解性ゲル。

[10] [6] ～ [9] のいずれか一つに記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

[11] 前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン系樹脂または細胞接着性材料からなる、[10] に記載の細胞培養器具。

[12] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具、及び該細胞培養器具に光を照射する照射部を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する細胞配列・分別装置。

[13] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

[14] [10] 又は [11] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記

一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

[1 5]

(I) [6] に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；

(I I I) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び

(I V) 細胞を培養する工程

を含む、組織体形成方法。

[1 6]

(I) 細胞を内包させた、[6] に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び

(I I I) 細胞を培養する工程

を含む、組織体形成方法。

[1 7] [6] ~ [9] のいずれか一つに記載の光分解性ゲル、及び細胞、を含む組織体。

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月14日(2016.9.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

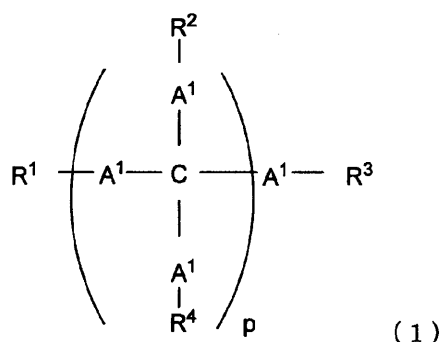
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式 (1) で表される化合物である光分解性架橋剤。

【化 1】



【前記一般式 (1) 中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は、それぞれ独立して水素原子、 Z 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ 、又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し、

Z は、光分解性のベンジル基を含み、前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基と縮合反応可能な活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を前記ベンジル基のベンゼン環に有し、前記活性エステル基が N -ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体であり、

複数の A^1 は、連結基を表し、それぞれ独立に単結合、又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、

該アルキレン基中の 1 個又は非隣接の 2 個以上の $-\text{CH}_2-$ はそれぞれ独立して $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{C})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、又はシクロヘキシル基によって置換されていてもよく、

p は 1 以上の整数を表し、複数存在する R^2 及び R^4 は同一でも異なってもよく、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ のうちの 3 つ以上が Z を含み、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ のうちの 2 つ以上が $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ を含む。

$\text{C H}_2 \text{O})_n - \text{Z}$ である。]

【請求項 2】

前記ポリエチレングリコール鎖の前記 $(\text{C H}_2 \text{C H}_2 \text{O})_n$ で表されるエチレングリコールの平均繰返し数が 20 から 500 の範囲にある請求項 1 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 3】

前記 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ で表される末端の数が 4 又は 8 であり、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は $-\text{O}(\text{C H}_2 \text{C H}_2 \text{O})_n - \text{Z}$ を表す請求項 1 又は 2 に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 4】

ネオペンチル骨格を有する請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の光分解性架橋剤。

【請求項 5】

分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物の前記アミノ基又は前記ヒドロキシル基と、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の光分解性架橋剤の前記活性エステル基によるアミド結合又はエステル結合を有する光分解性ゲル。

【請求項 6】

前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 5 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 7】

前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である、請求項 5 又は 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 8】

前記高分子化合物が、ゼラチンである、請求項 5 又は 6 に記載の光分解性ゲル。

【請求項 9】

請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

【請求項 10】

前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン樹脂または細胞接着性材料からなる、請求項 9 に記載の細胞培養器具。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載の細胞培養器具、及び
該細胞培養器具に光を照射する照射部、
を備え、
前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する、
細胞配列・分別装置。

【請求項 12】

請求項 9 又は 10 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

【請求項 13】

請求項 9 又は 10 に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

【請求項 14】

(I) 請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の光分解性ゲルを形成する工程；
(II) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；
(III) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び
(IV) 細胞を培養する工程；
を含む、組織体形成方法。

【請求項 15】

(I) 細胞を内包させた、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び

(I I I) 細胞を培養する工程；

を含む、組織体形成方法。

【請求項 16】

請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の光分解性ゲル、及び細胞、を含む組織体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

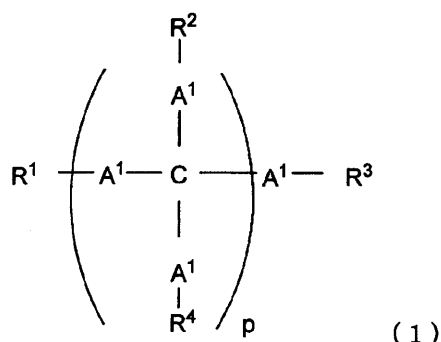
【補正の内容】

【0008】

発明者らは鋭意検討し、光分解性架橋剤の分岐数を高めることでゲルの強度を高められ、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は以下の通りである。

[1] 下記一般式 (1) で表される化合物である光分解性架橋剤。

【化 1】



[前記一般式 (1) 中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は、それぞれ独立して水素原子、 Z 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ 、又は炭素原子数 1 ～ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し

Z は、光分解性のベンジル基を含み、前記ベンジル基は、アミノ基又はヒドロキシル基と縮合反応可能な活性エステル基、及び、一つまたは複数のニトロ基を前記ベンジル基のベンゼン環に有し、前記活性エステル基が N -ヒドロキシコハク酸イミドの誘導体であり

複数の A^1 は、連結基を表し、それぞれ独立に単結合、又は炭素原子数 1 ～ 20 の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、

該アルキレン基中の 1 個又は非隣接の 2 個以上の $-\text{CH}_2-$ はそれぞれ独立して $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}=\text{C}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、又はシクロヘキシレン基によって置換されていてもよく、

p は 1 以上の整数を表し、複数存在する R^2 及び R^4 は同一でも異なってもよく、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ のうちの 3 つ以上が Z を含み、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ のうちの 2 つ以上が $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ である。]

[2] 前記ポリエチレングリコール鎖の前記 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ で表されるエチレングリコールの平均繰り返し数が 20 から 500 の範囲にある前記 [1] に記載の光分解性架橋剤。

[3] 前記 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ で表される末端の数が 4 又は 8 であり、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ を表す前記 [1] 又は [2] に記載の光分解性架橋剤。

[4] ネオペンチル骨格を有する前記 [1] ～ [3] のいずれか一つに記載の光分解性架橋剤。

[5] 分子内に合計 2 以上のアミノ基又はヒドロキシル基を有する高分子化合物の前記アミノ基又は前記ヒドロキシル基と、前記 [1] ~ [4] のいずれか 1 つに記載の光分解性架橋剤の前記活性エステル基によるアミド結合又はエステル結合を有する光分解性ゲル。

[6] 前記高分子化合物が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、塩基性多糖類、タンパク質、およびこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも 1 つである、前記 [5] に記載の光分解性ゲル。

[7] 前記高分子化合物が、分岐型のポリエチレングリコール誘導体である、前記 [5] 又は [6] に記載の光分解性ゲル。

[8] 前記高分子化合物が、ゼラチンである、前記 [5] 又は [6] に記載の光分解性ゲル。

[9] 前記 [5] ~ [8] のいずれか一つに記載の光分解性ゲルからなる層が、細胞培養基材の表面に形成されている細胞培養器具。

[1 0] 前記細胞培養基材の少なくとも表面が、スチレン樹脂または細胞接着性材料からなる、前記 [9] に記載の細胞培養器具。

[1 1] 前記 [9] 又は [1 0] に記載の細胞培養器具、及び
該細胞培養器具に光を照射する照射部、
を備え、

前記照射部は、光源、及び前記光源からの光を該細胞培養器具の表面の任意の一部領域にのみ照射させる照射領域調整部、を有する、
細胞配列・分別装置。

[1 2] 前記 [9] 又は [1 0] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域の細胞、及び当該一部領域以外の領域にある細胞を分別する工程を有する、細胞分別方法。

[1 3] 前記 [9] 又は [1 0] に記載の細胞培養器具の一部領域にのみ光を照射し、前記一部領域の光分解性ゲルを選択的に分解することによって、前記一部領域に細胞を配列する工程を有する、細胞配列方法。

[1 4]

(I) 前記 [5] ~ [8] のいずれか一つに記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの形状を規定する工程；

(I I I) 前記光分解性ゲルに細胞を播種する工程；及び

(I V) 細胞を培養する工程；

を含む、組織体形成方法。

[1 5]

(I) 細胞を内包させた、前記 [5] ~ [8] のいずれか一つに記載の光分解性ゲルを形成する工程；

(I I) 光照射によって前記光分解性ゲルの構造を規定する工程；及び

(I I I) 細胞を培養する工程；

を含む、組織体形成方法。

[1 6] 前記 [5] ~ [8] のいずれか一つに記載の光分解性ゲル、及び細胞、を含む組織体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G65/333(2006.01)i, C08G63/12(2006.01)i, C08G69/26(2006.01)i, C08G81/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)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)

C08G65/00-67/04, C08G63/00-64/42, C08G69/00-69/50, C08G81/00, C12M1/00, C12M3/04, C12N1/00, C12N5/00

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-080844 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 26 April 2012 (26.04.2012), claims; paragraphs [0010] to [0034]; examples (Family: none)	1-17
A	JP 2012-125218 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 05 July 2012 (05.07.2012), claims; paragraphs [0008] to [0062] (Family: none)	1-17
A	JP 2010-059322 A (Kanagawa University), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; paragraphs [0013] to [0018] (Family: none)	1-17

☒ 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
07 August, 2014 (07.08.14)

Date of mailing of the international search report
19 August, 2014 (19.08.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/062725

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 2009-542843 A (E.I. Du Pont de Nemours & Co.), 03 December 2009 (03.12.2009), claims; paragraphs [0012] to [0074] & US 2008/0004421 A1 & US 2011/0269916 A1 & EP 2035482 A2 & WO 2008/005207 A2	1-17
A	JP 2010-508428 A (DSM IP Assets B.V.), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; paragraphs [0019] to [0093] & US 2010/0099786 A1 & EP 2089438 A1 & WO 2008/055666 A1	1-17
A	Xueguang Jiang, Christopher A. Lavender, Jeremiah W. Woodcock, and Bin Zhao, Multiple Micellization and Dissociation Transitions of Thermo- and Light-Sensitive Poly(ethylene oxide)-b-poly(ethoxytri(ethylene glycol) acrylate-co-o-nitrobenzyl acrylate) in Water, Macromolecules, 2008, Volume 41, Issue 7, pp.2632-2643	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 2 7 2 5	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C08G65/333(2006.01)i, C08G63/12(2006.01)i, C08G69/26(2006.01)i, C08G81/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)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（IPC）） Int.Cl. C08G65/00-67/04, C08G63/00-64/42, C08G69/00-69/50, C08G81/00, C12M1/00, C12M3/04, C12N1/00, C12N5/00			
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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） CPlus/REGISTRY(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	
A	JP 2012-080844 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2012.04.26, 特許請求の範囲, 【0010】－【0034】, 実施例（ファミリーなし）	1-17	
A	JP 2012-125218 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2012.07.05, 特許請求の範囲, 【0008】－【0062】（ファミリーなし）	1-17	
A	JP 2010-059322 A（学校法人神奈川大学）2010.03.18, 特許請求の範囲, 【0013】－【0018】（ファミリーなし）	1-17	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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 07.08.2014		国際調査報告の発送日 19.08.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 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） 大木 みのり 電話番号 03-3581-1101 内線 3457	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 2 7 2 5
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
A	JP 2009-542843 A (イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー) 2009.12.03, 特許請求の範囲, 【0012】－【0074】 & US 2008/0004421 A1 & US 2011/0269916 A1 & EP 2035482 A2 & WO 2008/005207 A2	1-17
A	JP 2010-508428 A (ディーエスエム アイピー アセッツ ビー. ブイ.) 2010.03.18, 特許請求の範囲, 【0019】－【0093】 & US 2010/0099786 A1 & EP 2089438 A1 & WO 2008/055666 A1	1-17
A	Xueguang Jiang, Christopher A. Lavender, Jeremiah W. Woodcock, and Bin Zhao, Multiple Micellization and Dissociation Transitions of Thermo- and Light-Sensitive Poly(ethylene oxide)-b-poly(ethoxytri(ethylene glycol)acrylate-co-o-nitrobenzyl acrylate) in Water, Macromolecules, 2008, Volume 41, Issue 7, pp.2632-2643	1-17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)		
C 1 2 M 3/04 (2006.01)	C 1 2 M	3/04	A	4 J 0 2 9		
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	Z	4 J 0 3 1		
C 0 7 K 14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78				

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

(72)発明者 高木 俊之

茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 柳川 史樹

茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 須丸 公雄

茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 金森 敏幸

茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

F ターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC10 DG08 EA20 GB10

4B065 AA90X BC46 BC48 BD50 CA44

4H045 AA10 AA20 AA30 BA57 CA40 EA61 EA65 FA58 FA59

4J001 DB05 DB09 EB74 EC85 ED64 JA17 JB17 JC10

4J005 AA04 AA12 BD02 BD05

4J029 AA03 AB04 AE06 HB02 JE012 JE182

4J031 AA02 AA04 AA15 AA53 AC03 AC07 AD01 AE07 AE19 AF09

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。