

明 細 書

発明の名称：細胞培養用足場材料及び細胞培養用容器

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。天然高分子材料を足場材料として用いることで、ラミニンやビトロネクチン等が有する細胞接着性のアミノ酸配列（A r g – G l y – A s p 等）を有するドメインと、細胞表面のインテグリンとが結合し、細胞が足場材料に良好に接着し、かつ細胞が良好に増殖する。

[0003] また、下記の特許文献 1 には、繰り返し構造と R G D 配列等の細胞接着配列とを含むタンパク質が開示されている。このタンパク質は、上記繰り返し構造として、特定の A l a リッチ部位と特定の A l a 非リッチ部位とが連結した構造を有する。また、特許文献 1 には、このタンパク質を含む材料を細胞足場材料として用いることができることが記載されている。

[0004] また、下記の特許文献 2 ～ 5 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。

[0005] 下記の特許文献 2 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。

[0006] また、下記の特許文献 3 には、第 1 の繊維ポリマー足場材を含み、該第 1

の繊維ポリマー足場材の繊維が整列されている、組成物（足場材料）が開示されている。この繊維ポリマーの材料として、脂肪族ポリエステル等が用いられている。

[0007] また、下記の特許文献4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。

[0008] さらに、下記の特許文献5には、表面を有する基板と、上記基板の上記表面に設けられた親水性共重合体層と、上記親水性共重合体層の表面にそれぞれに結合される複数のペプチド鎖とを具備する細胞培養用製品が開示されている。上記親水性共重合体層は、複数のポリビニルアルコール単位、複数のポリビニルアルコール誘導体単位及び複数のカルボン酸基含有単位によって共重合された層である。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2018-064542号公報

特許文献2：特開2006-314285号公報

特許文献3：WO2007/090102A1

特許文献4：特開2017-023008号公報

特許文献5：特開2015-070832号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 足場材料として天然高分子材料を用いることで、播種後の細胞が良好に増殖し、また、仮足が良好に伸展する。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。また、足場材料として、特許文献1に記載のようなRGD配列等の細胞接着配列を有するポリペ

プチドを用いた場合にも、細胞接着配列以外のアミノ酸配列によって、細胞の接着性や細胞の増殖性にばらつきが生じることがある。

[0011] 一方、特許文献2～5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2～4に記載のような従来の合成樹脂を用いた足場材料では、細胞の増殖性が低いという問題がある。また、従来の合成樹脂を用いた足場材料では、仮足が十分に伸展しない。また、特許文献5に記載の足場材料では、細胞の増殖性をある程度高めることができるものの、親水性が高いため、液体培地により足場材料が浸漬したり、膨潤したりして、細胞の増殖性が低下することがある。

[0012] 本発明の目的は、仮足の伸展性に優れ、かつ細胞の増殖性に優れる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

[0013] 本発明の広い局面によれば、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含み、水酸基価が、 1100 mg KOH/g 以下である、細胞培養用足場材料が提供される。

[0014] 本発明の広い局面によれば、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含み、前記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価が、 1100 mg KOH/g 以下である、細胞培養用足場材料が提供される。

[0015] 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、前記ペプチド部が、細胞接着性のアミノ酸配列を有する。

[0016] 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、前記細胞接着性のアミノ酸配列が、RGD配列、YIGSR配列、又はPDSGR配列を少なくとも有する。

[0017] 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、前記細胞接着性のアミノ酸配列が、下記式(1)で表されるRGD配列を少なくとも

有する。

[0018] $\text{Arg-Gly-Asp-X} \cdots$ 式 (1)

[0019] 前記式 (1) 中、Xは、Gly、Ala、Val、Ser、Thr、Phe、Met、Pro、又はAsnを表す。

[0020] 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、前記ペプチド部が、3個以上10個以下のアミノ酸により構成される。

[0021] 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、前記ポリビニルアルコール誘導体部と前記ペプチド部とが、リンカー部を介して結合している。

[0022] 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、前記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体部が、ポリビニルアセタール樹脂部と、前記ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂である。

[0023] 本発明の広い局面によれば、容器本体と、上述した細胞培養用足場材料とを備え、前記容器本体の表面上に、前記細胞培養用足場材料が配置されている、細胞培養用容器が提供される。

発明の効果

[0024] 本発明によれば、仮足の伸展性に優れ、かつ細胞の増殖性に優れる、細胞培養用足場材料及び細胞培養用容器を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1] 図1は、本発明の一実施形態に係る細胞培養用容器を模式的に示す断面図である。

[図2] 図2(a)及び(b)は、海島構造の有無の様子を表す画像である。

[図3] 図3(a)、(b)及び(c)は、SFと細胞の平面形状との関係を示す図である。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明の詳細を説明する。

[0027] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含む。本

発明に係る細胞培養用足場材料では、該細胞培養用足場材料の水酸基価が 1100 mg KOH/g 以下であるか、又は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価が 1100 mg KOH/g 以下である。

[0028] 本発明に係る細胞培養用足場材料では、上記の構成が備えられているので、仮足の伸展性に優れ、かつ細胞の増殖性に優れる。また、本発明に係る細胞培養用足場材料は、細胞の接着性に優れる。

[0029] 本発明に係る細胞培養用足場材料では、マトリゲル等の天然高分子材料を用いた場合と同様に、播種後の細胞に糸状仮足様の仮足の伸展が観察される。この仮足の伸展は、従来の合成樹脂材料を用いた足場材料では、ほとんど観察されない。

[0030] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、細胞の播種密度が小さい場合であっても、細胞が細胞培養用足場材料に良好に接着し、かつ細胞が良好に増殖する。

[0031] また、本発明に係る細胞培養用足場材料では、疎水性を低くすることができるので、液体培地により細胞培養用足場材料が浸漬したり、膨潤したりすることを効果的に抑えることができる。そのため、細胞の増殖性を高めることができる。

[0032] また、本発明に係る細胞培養用足場材料は、従来の天然高分子を用いた細胞足場材料と比べて、安価であり、ロット間のばらつきが小さく、安全性に優れる。本発明に係る細胞足場材料を用いることで、細胞の品質管理の負荷を低減することができる。

[0033] (細胞培養用足場材料)

本発明に係る細胞培養用足場材料は、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含む。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、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。

[0034] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有する。上記ペプチド含有ポリビニルアルコー

ル誘導体では、上記ポリビニルアルコール誘導体部と上記ペプチド部とが、リンカー部を介して結合していることが好ましい。したがって、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部と、リンカー部とを有することが好ましい。

[0035] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、後述するように、例えば、ポリビニルアルコール誘導体と、リンカーと、ペプチドとを反応させて得ることができる。

[0036] <ポリビニルアルコール誘導体部>

上記ポリビニルアルコール誘導体部は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記ポリビニルアルコール誘導体に由来する構造部分である。上記ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアルコールによって誘導される化合物である。上記ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアセタール樹脂であることが好ましく、上記ポリビニルアルコール誘導体部は、ポリビニルアセタール樹脂部であることが好ましい。すなわち、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、ポリビニルアセタール樹脂部と、上記ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂であることが好ましい。上記ポリビニルアルコール誘導体及び上記ポリビニルアセタール樹脂は、それぞれ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。

[0037] 上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール樹脂部は、側鎖にアセタール基と、水酸基と、アセチル基とを有することが好ましい。ただし、上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール樹脂部は、例えば、アセチル基を有しなくてもよい。例えば、ポリビニルアルコール誘導体部及びポリビニルアセタール樹脂のアセチル基の全てが、上記リンカーと結合することによって、上記ポリビニルアルコール誘導体部及び上記ポリビニルアセタール樹脂部がアセチル基を有していなくてもよい。

[0038] 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って合成することができる。

[0039] ポリビニルアルコールのアセタール化に用いられる上記アルデヒドは、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く、有していなくてもよい。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。

[0040] 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、ホルミルオキサン、ホルミルチオフエン、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。

[0041] 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、上記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く、上記ポリビニルアセタール樹脂部は、ポリビニルブチラール樹脂部であることがより好ましく、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、ペプチド含有ポリビニルブチラール樹脂であることがより好ましい。

[0042] なお、上記アルデヒドの配合量は、目的とするアセタール基量にあわせて適宜設定することができる。アセタール化反応の効率を高め、かつ未反応の

アルデヒドを容易に除去する観点からは、ポリビニルアルコール100モル%に対して、上記アルデヒドの添加量は、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95モル%以下、より好ましくは90モル%以下である。

[0043] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び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1500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、液体培地による膨潤を効果的に抑えることができるため、細胞培養用足場材料の強度を良好に維持することができる。そのため、細胞増殖性を高めることができる。また、上記平均重合度が上記上限以下であると、取扱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。なお、上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂の平均重合度は、通常、原料となるポリビニルアルコールの平均重合度と同じであり、ポリビニルアルコールの平均重合度によって求めることができる。

[0044] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂の数平均分子量 (M_n) は、好ましくは10000以上、好ましくは60000以下である。上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂の重量平均分子量 (M_w) は、好ましくは2000以上、好ましくは120000以下である。また、上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂において、数平均分子量 (M_n) に対する重量平均分子量 (M_w) の比 (M_w/M_n) は、好ましくは2.0以上、好ましくは40以下である。上記 M_n 、上記 M_w 、上記 M_w/M_n 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。

- [0045] なお、上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂の数平均分子量（ M_n ）及び重量平均分子量（ M_w ）は、例えば、溶媒としてテトラヒドロフラン（THF）を用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）分析により、ポリスチレン換算値として求めることができる。
- [0046] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び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40モル%以上、より好ましくは50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、細胞の定着性をより高めることができ、細胞が効率よく増殖する。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。
- [0047] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂の水酸基の含有率（水酸基量）は、好ましくは15モル%以上、より好ましくは20モル%以上、好ましくは45モル%以下、より好ましくは30モル%以下、更に好ましくは25モル%以下である。
- [0048] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂のアセチル化度（アセチル基量）は、好ましくは1モル%以上、より好ましくは2モル%以上、好ましくは5モル%以下、より好ましくは4モル%以下である。上記アセチル化度が上記下限以上及び上記上限以下であると、ポリビニルアセタール樹脂とリンカーとの反応効率を高めることができる。
- [0049] 上記ポリビニルアルコール誘導体部、上記ポリビニルアセタール樹脂部及び上記ポリビニルアセタール樹脂のアセタール化度、アセチル化度及び水酸基量は、 $^1\text{H-NMR}$ （核磁気共鳴スペクトル）により測定することができる。
- [0050] <ペプチド部>

上記ペプチド部は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記ペプチドに由来する構造部分である。上記ペプチド部は、アミノ酸配列を有する。上記ペプチド部を構成するペプチドは、オリゴペプチドであってもよく、ポリペプチドであってもよい。上記ペプチドは、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。

[0051] 上記ペプチド部は、3個以上のアミノ酸により構成されることが好ましく、4個以上のアミノ酸により構成されることがより好ましく、5個以上のアミノ酸により構成されることが更に好ましく、10個以下のアミノ酸により構成されることが好ましく、6個以下のアミノ酸により構成されることがより好ましい。上記ペプチド部を構成するアミノ酸の個数が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞の接着性及び増殖性をより一層高めることができ、また、仮足の伸展性をより一層良好にすることができる。

[0052] 上記ペプチド部は、細胞接着性のアミノ酸配列を有することが好ましい。なお、細胞接着性のアミノ酸配列とは、ファージディスプレイ法、セファロースビーズ法、又はプレートコート法によって細胞接着活性が確認されているアミノ酸配列をいう。上記ファージディスプレイ法としては、例えば、「The Journal of Cell Biology, Volume 130, Number 5, September 1995 1189-1196」に記載の方法を用いることができる。上記セファロースビーズ法としては、例えば「蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45 No. 15 (2000) 2477」に記載の方法を用いることができる。上記プレートコート法としては、例えば「蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45 No. 15 (2000) 2477」に記載の方法を用いることができる。

[0053] 上記細胞接着性のアミノ酸配列としては、例えば、RGD配列(A r g - G l y - A s p)、YIGSR配列(T y r - I l e - G l y - S e r - A r g)、PDSGR配列(P r o - A s p - S e r - G l y - A r g)、HAV配列(H i s - A l a - V a l)、ADT配列(A l a - A s p - T h r)、QAV配列(G l n - A l a - V a l)、LDV配列(L e u - A s p - V a l)、IDS配列(I l e - A s p - S e r)、REDV配列(A

rg-Glu-Asp-Val)、IDAPS配列(Ile-Asp-Ala-Pro-Ser)、KQAGDV配列(Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val)、及びTDE配列(Thr-Asp-Glu)等が挙げられる。また、上記細胞接着性のアミノ酸配列としては、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」、及び「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されている配列等も挙げられる。上記ペプチド部は、上記細胞接着性のアミノ酸配列を1種のみ有していてもよく、2種以上を有してもよい。

[0054] 上記細胞接着性のアミノ酸配列は、上述した細胞接着性のアミノ酸配列の内の少なくともいずれかを有することが好ましく、RGD配列、YIGSR配列、又はPDSGR配列を少なくとも有することがより好ましく、下記式(1)で表されるRGD配列を少なくとも有することが更に好ましい。この場合には、細胞の接着性及び増殖性をより一層高めることができ、仮足の伸展性をより一層良好にすることができる。

[0055] Arg-Gly-Asp-X . . . 式(1)

[0056] 上記式(1)中、Xは、Gly、Ala、Val、Ser、Thr、Phe、Met、Pro、又はAsnを表す。

[0057] 上記ペプチド部が上記細胞接着性のアミノ酸配列を有する場合に、該細胞接着性のアミノ酸配列のN末端におけるアミノ酸又はC末端におけるアミノ酸と、リンカーとが結合していてもよく、該細胞接着性のアミノ酸配列とは異なる部分のアミノ酸配列を構成するアミノ酸と、リンカーとが結合していてもよい。

[0058] 上記ペプチド部は、直鎖状であってもよく、環状ペプチド骨格を有していてもよい。上記環状ペプチド骨格とは、複数個のアミノ酸より構成された環状骨格である。本発明の効果を一層効果的に発揮させる観点からは、上記環状ペプチド骨格は、4個以上のアミノ酸により構成されることが好ましく、5個以上のアミノ酸により構成されることがより好ましく、10個以下のアミノ酸により構成されることが好ましい。

- [0059] 上記ペプチド部が上記細胞接着性のアミノ酸配列を有しかつ上記環状ペプチド骨格を有する場合、上記細胞接着性のアミノ酸配列とは異なる部分のアミノ酸配列を構成するアミノ酸と、リンカー部とが結合していることがより好ましい。この場合には、細胞の接着性及び増殖性をより一層高めることができ、仮足の伸展性をより一層良好にすることができる。
- [0060] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体100重量%中、上記ペプチド部の含有率は、好ましくは0.01重量%以上、より好ましくは0.1重量%以上、更に好ましくは1重量%以上、特に好ましくは5重量%以上である。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体100重量%中、上記ペプチド部の含有率は、好ましくは30重量%以下、より好ましくは25重量%以下、更に好ましくは20重量%以下、特に好ましくは15重量%以下である。上記ペプチド部の含有率が上記下限以上であると、細胞の接着性及び増殖性を更により一層高めることができ、仮足の伸展性を更により一層良好にすることができる。
- [0061] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記ペプチド部の含有率は、好ましくは0.01モル%以上、より好ましくは0.1モル%以上、より一層好ましくは1モル%以上、更に好ましくは5モル%以上、特に好ましくは10モル%以上である。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記ペプチド部の含有率は、好ましくは60モル%以下、より好ましくは50モル%以下、更に好ましくは35モル%以下、特に好ましくは25モル%以下である。上記ペプチド部の含有率が上記下限以上であると、細胞の接着性及び増殖性を更により一層高めることができ、仮足の伸展性を更により一層良好にすることができる。上記ペプチド部の含有率が上記上限以下であると、製造コストを抑えることができる。なお、上記ペプチド部の含有率（モル%）は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を構成する各構造単位の物質量の総和に対する上記ペプチド部の物質量である。
- [0062] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記アセタール

基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率に対する、上記ペプチド部の含有率のモル比（上記ペプチド部の含有率／上記アセタール基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率）は、好ましくは0.0001以上、より好ましくは0.001以上である。上記モル比（上記ペプチド部の含有率／上記アセタール基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率）が上記下限以上であると、細胞の接着性及び増殖性を更により一層高めることができ、仮足の伸展性を更により一層良好にすることができる。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記アセタール基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率に対する、上記ペプチド部の含有率のモル比（上記ペプチド部の含有率／上記アセタール基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率）の上限は特に限定されない。製造コスト等の観点からは、上記モル比（上記ペプチド部の含有率／上記アセタール基と上記水酸基と上記アセチル基との合計の含有率）は、好ましくは0.2以下である。

[0063] 上記ペプチド部の含有率は、FTIR又はLC-MSにより測定することができる。

[0064] <リンカー部>

上記リンカー部は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体において、上記リンカーに由来する構造部分である。上記リンカー部は、上記ポリビニルアルコール誘導体部と上記ペプチド部との間に位置する。上記ポリビニルアルコール誘導体部と上記ペプチド部とが、上記リンカー部を介して結合している。上記リンカー部は、リンカー（架橋剤）によって形成される。上記リンカーは、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。

[0065] 上記リンカーは、上記ペプチドのカルボキシル基又はアミノ基と縮合可能な官能基を有する化合物であることが好ましい。上記ペプチドのカルボキシル基又はアミノ基と縮合可能な官能基としては、カルボキシル基、チオール基及びアミノ基等が挙げられる。ペプチドと良好に反応させる観点からは、

上記リンカーは、カルボキシル基を有する化合物であることが好ましい。

[0066] 上記カルボキシル基を有するリンカーとしては、(メタ)アクリル酸及びカルボキシル基含有アクリルアミド等が挙げられる。上記カルボキシル基を有するリンカーとして重合性不飽和基を有するカルボン酸(カルボン酸モノマー)を用いることにより、リンカーの導入時にグラフト重合により該カルボン酸モノマーを重合させることができるため、ペプチドと反応させることができるカルボキシル基の個数を増やすことができる。

[0067] ポリビニルアルコール誘導体とペプチドとを良好に結合させる観点からは、上記リンカーは、(メタ)アクリル酸であることが好ましく、アクリル酸であることがより好ましい。

[0068] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、例えば、以下のようにして合成することができる。

[0069] (1) ポリビニルアルコール誘導体(例えばポリビニルアセタール樹脂)と、リンカーとを反応させて、ポリビニルアセタール樹脂とリンカーとが結合した反応物を得る。(2) 得られた反応物と、ペプチドとを反応させて、ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体(ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂)を得る。

[0070] 上記(1)において、上記ポリビニルアセタール樹脂と上記リンカーとが結合した反応物を得る方法としては、ポリビニルアルコールと重合性不飽和基を有するカルボン酸との共重合体をアセタール化する方法、及びポリビニルアセタール樹脂とリンカー(例えばカルボン酸モノマー)とを紫外線照射下でグラフト共重合する方法等が挙げられる。上記反応物を得る方法は、上記グラフト共重合する方法であることが好ましい。この場合には、グラフト重合により該カルボン酸モノマーを重合させることができるため、ペプチドと反応させることができるカルボキシル基の個数を増やすことができる。

[0071] 上記(2)において、得られた反応物におけるリンカー由来のカルボキシル基と、ペプチドのアミノ基とを脱水縮合させて、ポリビニルアセタール樹脂部と、ペプチド部と、リンカー部とを有するペプチド含有ポリビニルアル

コール誘導体（ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂）を得ることができる。

[0072] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体は、リンカー由来のカルボキシル基が残存していてもよく、残存していなくてもよい。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の上記カルボキシル基の含有率は、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2モル%以下、より好ましくは1.5モル%以下である。上記カルボキシル基の含有率が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞の接着性及び増殖性を更により一層高めることができ、仮足の伸展性を更により一層良好にすることができる。なお、上記カルボキシル基の含有率（モル%）は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を構成する各構造単位の物質量の総和に対する上記カルボキシル基の物質量である。

[0073] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、以下の構成（A）又は構成（B）を備える。

[0074] 構成（A）：上記細胞培養用足場材料の水酸基価が1100mg KOH/g以下である。

構成（B）：上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価が1100mg KOH/g以下である。

[0075] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、上記構成（A）又は上記構成（B）を備えるので、上記構成（A）及び上記構成（B）の双方を備えない細胞培養用足場材料と比べて、疎水性を高めることができる。そのため、液体培地により細胞培養用足場材料が浸漬したり、膨潤したりすることを効果的に抑えることができ、細胞の増殖性を高めることができる。特に、細胞を長期培養した場合でも細胞の増殖性能を高く維持することができる。

[0076] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、上記構成（A）及び上記構成（B）の内の上記構成（A）のみを備えていてもよく、上記構成（B）のみを備えていてもよい。本発明に係る細胞培養用足場材料は、上記構成（A）と上記構成（B）とを備えていてもよい。

- [0077] 上記細胞培養用足場材料の水酸基価は、好ましくは 1100 mg KOH/g 以下、より好ましくは 950 mg KOH/g 以下、更に好ましくは 800 mg KOH/g 以下である。上記細胞培養用足場材料の水酸基価が上記上限以下であると、該細胞培養用足場材料の疎水性を高めることができるので、液体培地により細胞培養用足場材料が浸漬したり、膨潤したりすることをより一層効果的に抑えることができる。そのため、細胞の増殖性をより一層高めることができる。上記細胞培養用足場材料の水酸基価の下限は特に限定されない。上記細胞培養用足場材料の水酸基価は、例えば、 50 mg KOH/g 以上であってもよく、 100 mg KOH/g 以上であってもよい。
- [0078] 上記細胞培養用足場材料の酸価は、好ましくは 1 mg KOH/g 以上、より好ましくは 15 mg KOH/g 以上、更に好ましくは 50 mg KOH/g 以上、好ましくは 1400 mg KOH/g 以下、より好ましくは 800 mg KOH/g 以下、更に好ましくは 600 mg KOH/g 以下である。上記細胞培養用足場材料の酸価が上記下限以上であると、ペプチド部が十分に導入されることによって、細胞の接着性を高めやすくなる。上記細胞培養用足場材料の酸価が上記上限以下であると、細胞の増殖性を高めやすくなる。
- [0079] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価は、好ましくは 1100 mg KOH/g 以下、より好ましくは 950 mg KOH/g 以下、更に好ましくは 800 mg KOH/g 以下である。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価が上記上限以下であると、該細胞培養用足場材料の疎水性を高めることができるので、液体培地により細胞培養用足場材料が浸漬したり、膨潤したりすることをより一層効果的に抑えることができる。そのため、細胞の増殖性をより一層高めることができる。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価の下限は、特に限定されない。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価は、例えば、 50 mg KOH/g 以上であってもよく、 100 mg KOH/g 以上であってもよい。
- [0080] 上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の酸価は、好ましくは 1 m

g KOH/g 以上、より好ましくは 15 mg KOH/g 以上、更に好ましくは 50 mg KOH/g 以上、好ましくは 1400 mg KOH/g 以下、より好ましくは 800 mg KOH/g 以下、更に好ましくは 600 mg KOH/g 以下である。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の酸価が上記下限以上であると、ペプチド部が十分に導入されることによって、細胞の接着性を高めやすくなる。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の酸価が上記上限以下であると、細胞の増殖性を高めやすくなる。

[0081] 上記細胞培養用足場材料及び上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価及び酸価は、JIS K0070の中和滴定法を参考にして測定することができる。具体的には、以下のようにして測定することができる。

[0082] <酸価の測定>

以下の器具及び試薬を用意する。

器具：ビュレット

溶媒：エタノール 50 ml とジエチルエーテル 50 ml との混合液

滴定液：0.1 mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液

試料：細胞培養用足場材料又はペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体

[0083] 以下の手順に従って酸価を測定する。

(1) 300 mL の三角フラスコに、試料 5 g と溶媒 100 mL とを加えて、試料を溶媒に溶解させる。溶解後、JIS K8001に従って調整したフェノールフタレイン溶液を数滴添加する。

(2) 25 ml ビュレットに滴定液を充填して滴定を行い、フェノールフタレイン溶液のうすい紅色呈色が30秒間続いたときを終点とする。

(3) 同様にして空試験も行う。

(4) 下記式 (X) により酸価を算出する。

[0084] 酸価 (mg KOH/g) = $V \times f \times 5.611 / S$. . . (X)

S : 試料の質量 (g)

V : 本試験での滴定液量 (mL)

f : 滴定液のファクター

[0085] <水酸基価の測定>

以下の器具及び試薬を用意する。

器具：ビュレット

アセチル化試薬：無水酢酸 25 g にピリジンを加えて全量を 100 mL にした液

滴定液：0.5 mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液

試料：細胞培養用足場材料又はペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体

[0086] 以下の手順に従って水酸基価を測定する。

(1) 100 mL の三角フラスコに、試料とアセチル化試薬 5 mL とを加え、105℃の油浴中で1時間反応させる。

(2) 放冷後、水 1 mL を添加し、105℃の油浴中で10分間反応させる。

(3) 放冷後、エタノール 5 mL で壁面を洗い流して希釈する。希釈後、フェノールフタレイン溶液を数滴添加する。

(4) 25 mL ビュレットに滴定液を充填して滴定を行い、フェノールフタレイン溶液のうすい紅色呈色が30秒間続いたときを終点とする。

(5) 同様にして空試験も行う。

(6) 下記式 (Y) により水酸基価を算出する。

$$[0087] \quad \text{水酸基価 (mg KOH/g)} = [(V_0 - V_1) \times f \times 28.05 / S] + A \quad \dots (Y)$$

S : 試料の質量 (g)

V_0 : 空試験での滴定液量 (mL)

V_1 : 本試験での滴定液量 (mL)

f : 滴定液のファクター

A : 酸価

[0088] 細胞の接着性及び増殖性をより一層高める観点から、上記細胞培養用足場材料は、相分離構造を有することが好ましい。上記相分離構造は、第1の相

と第2の相とを少なくとも有する。

- [0089] 上記相分離構造としては、例えば、海島構造、シリンダー構造、ジャイロイド構造、及びラメラ構造等のマイクロ相分離構造が挙げられる。海島構造では、例えば、第1の相を海部とし、第2の相を島部とすることができる。シリンダー構造、ジャイロイド構造、又はラメラ構造では、例えば、表面積が最も大きい相を第1の相とし、表面積が2番目に大きい相を第2の相とすることができる。上記細胞培養用足場材料が連続相と不連続相とを有することで、細胞との親和性を高め、細胞の接着性及び増殖性をより一層高めることができる。
- [0090] 上記相分離構造は、海島構造であることが好ましい。上記細胞培養用足場材料は、海島構造を有することが好ましい。この場合には、細胞の接着性及び増殖性をより一層高めることができる。
- [0091] 上記細胞培養用足場材料が海島構造を有する場合に、細胞培養用足場材料の表面全体に対する、島部（第2の相）の表面積分率は、好ましくは0.01以上、より好ましくは0.1以上、更に好ましくは0.2以上であり、好ましくは0.95以下、より好ましくは0.9以下、更に好ましくは0.8以下である。上記表面積分率が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞の接着性をより一層高めることができる。
- [0092] 上記細胞培養用足場材料が海島構造を有する場合に、島部がペプチド部を含むことが好ましい。すなわち、上記細胞培養用足場材料は、海部と島部とを有し、島部がペプチド部を含むことが好ましい。この場合、細胞の接着ドメインが島部に集積することで、細胞の接着性を更に一層高めることができる。
- [0093] 相分離構造の有無は、例えば、原子間力顕微鏡（AFM）、透過型電子顕微鏡（TEM）、走査電子顕微鏡（SEM）等により確認することができる。また、上記表面積分率は、顕微鏡観察画像から例えばImageJなどの画像解析ソフトを用いて求めることができる。
- [0094] 上記相分離構造は、例えば、ペプチド部の含有率を高くし、ペプチド含有

ポリビニルアルコール誘導体の分子間又は分子内に相分離構造を形成することによって形成させることができる。

[0095] 本発明の効果を効果的に発揮させる観点及び生産性を高める観点からは、上記細胞培養用足場材料 100 重量%中、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の含有量は、好ましくは 90 重量%以上、より好ましくは 95 重量%以上、更に好ましくは 97.5 重量%以上、特に好ましくは 99 重量%以上、最も好ましくは 100 重量%（全量）である。したがって、上記細胞培養用足場材料は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体であることが最も好ましい。上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の含有量が上記下限以上であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0096] 上記細胞培養用足場材料は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体以外のポリマーを含んでいてもよい。該ポリマーとしては、ポリビニルアセタール樹脂、ポリオレフィン樹脂、ポリエーテル樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、ポリエステル、エポキシ樹脂、ポリアミド樹脂、ポリイミド樹脂、ポリウレタン樹脂、ポリカーボネート樹脂、セルロース、及びポリペプチド等が挙げられる。上記ポリマーは、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。

[0097] 本発明の効果を効果的に発揮させる観点からは、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体以外のポリマーの含有量は少ないほどよい。上記細胞培養用足場材料 100 重量%中、該ポリマーの含有量は、好ましくは 10 重量%以下、より好ましくは 5 重量%以下、更に好ましくは 2.5 重量%以下、特に好ましくは 1 重量%以下、最も好ましくは 0 重量%（未含有）である。したがって、細胞培養用足場材料は、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体以外のポリマーを含まないことが最も好ましい。

[0098] 本発明に係る細胞培養用足場材料は、動物由来の原料を実質的に含まないことが好ましい。動物由来の原料を実質的に含まないことにより、ロット間のばらつきが少なく、コスト、安全性に優れる細胞培養用足場材料を提供す

ることができる。なお、「動物由来の原料を実質的に含まない」とは、細胞培養用足場材料中における動物由来の原料が、3重量%以下であることを意味する。本発明に係る細胞培養用足場材料は、細胞培養用足場材料中における動物由来の原料が、1重量%以下であることが好ましく、0重量%であることがより好ましい。すなわち、上記細胞培養用足場材料は、細胞培養用足場材料中に動物由来の原料を含まないことがより好ましい。

[0099] なお、細胞培養用足場材料は、後述の容器本体の表面上で作製してもよい。例えば、ポリビニルアルコール誘導体部とリンカーとを有する合成樹脂を、容器本体の表面上にコーティングして樹脂膜を形成し、該樹脂膜の表面において該合成樹脂とペプチドとを反応させて、上記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を得てもよい。

[0100] (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。

[0101] 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、体細胞等が挙げられ、例えば、幹細胞、前駆細胞及び成熟細胞等が挙げられる。上記体細胞は、癌細胞であってもよい。

[0102] 上記成熟細胞としては、神経細胞、心筋細胞、網膜細胞及び肝細胞等が挙げられる。

[0103] 上記幹細胞としては、間葉系幹細胞(MSC)、iPS細胞、ES細胞、Muse細胞、胚性がん細胞、胚性生殖幹細胞、及びmGS細胞等が挙げられる。

[0104] 上記細胞培養用足場材料の形状は特に限定されない。上記細胞培養用足場材料は、膜状であってもよく、粒子状であってもよく、繊維状であってもよく、多孔体状であってもよい。膜状には、フィルム状、シート状が含まれる。

- [0105] 上記細胞培養用足場材料は、細胞の二次元培養（平面培養）、三次元培養又は浮遊培養に用いられることが好ましく、二次元培養（平面培養）に用いられることがより好ましい。
- [0106] また、上記細胞培養用足場材料は、該細胞培養用足場材料と、多糖類とを含む細胞培養用担体（媒体）として用いることもできる。上記多糖類は、特に限定されず、従来公知の多糖類を用いることができる。上記多糖類は、水溶性多糖類であることが好ましい。
- [0107] また、上記細胞培養用足場材料は、繊維本体と、該繊維本体の表面上に配置された細胞培養用足場材料とを備える細胞培養用繊維として用いることもできる。この場合、細胞培養用足場材料は、繊維本体の表面に塗布されていることが好ましく、塗布物であることが好ましい。この細胞培養用繊維では、繊維本体中に細胞培養用足場材料が存在していてもよい。例えば、繊維本体を液状の細胞培養用足場材料に含浸したり、練り込んだりすることにより細胞培養用足場材料を繊維本体中に存在させることができる。幹細胞は、一般に、平面構造には接着しにくく、線維状構造などの立体構造には接着しやすい性質を有するため、細胞培養用繊維は、幹細胞の三次元培養に好適に用いられる。幹細胞のなかでも、脂肪幹細胞の三次元培養により好適に用いられる。
- [0108] 上記細胞培養用足場材料における合成樹脂は、架橋されていてもよい。架橋された合成樹脂を含む細胞培養用足場材料は、水膨潤性が効果的に抑制され、強度を高めることができる。架橋剤を用いることにより、合成樹脂を架橋させることができる。
- [0109] 架橋剤としては、ポリアルコール、ポリカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸、金属石鹼及び多糖類等が挙げられる。
- [0110] （細胞培養用容器）
- 本発明に係る細胞培養用容器は、容器本体と、上述した細胞培養用足場材料とを備え、上記容器本体の表面上に、該細胞培養用足場材料が配置されている。上記細胞培養用容器は、細胞の培養領域の少なくとも一部に上記細胞

培養用足場材料を備える。

[0111] 図 1 は、本発明の一実施形態に係る細胞培養用容器を模式的に示す断面図である。

[0112] 細胞培養用容器 1 は、容器本体 2 と、細胞培養用足場材料 3 とを備える。容器本体 2 の表面 2 a 上に細胞培養用足場材料 3 が配置されている。容器本体 2 の底面上に細胞培養用足場材料 3 が配置されている。細胞培養用容器 1 に液体培地を添加し、また、細胞塊等の細胞を細胞培養用足場材料 3 の表面に播種することで、細胞を平面培養することができる。

[0113] なお、容器本体は、第 1 の容器本体と、該第 1 の容器本体の底面上にカバーガラス等の第 2 の容器本体とを備えていてもよい。第 1 の容器本体と第 2 の容器本体とは分離可能であってもよい。この場合、第 2 の容器本体の表面上に、該細胞培養用足場材料が配置されていてもよい。

[0114] 上記容器本体として、従来公知の容器本体（容器）を用いることができる。上記容器本体の形状および大きさは特に限定されない。

[0115] 上記容器本体としては、1 個又は複数個のウェル（穴）を備える細胞培養用プレート、及び細胞培養用フラスコ等が挙げられる。上記プレートのウェル数は特に限定されない。該ウェル数としては、特に限定されないが、例えば、2、4、6、12、24、48、96、384 等が挙げられる。上記ウェルの形状としては、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としては、特に限定されないが、平底、丸底、凹凸等が挙げられる。

[0116] 上記容器本体の材質は特に限定されないが、樹脂、金属及び無機材料が挙げられる。上記樹脂としては、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、ポリイソプレン、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、シリコーン等が挙げられる。上記金属としては、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。上記無機材料としては、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。

[0117] 以下に実施例及び比較例を掲げて本発明を更に詳しく説明する。本発明はこれら実施例のみに限定されない。

[0118] なお、得られた合成樹脂における構造単位の含有率は、合成樹脂をDMSO-d₆（ジメチルスルホキサイド）に溶解した後、¹H-NMR（核磁気共鳴スペクトル）により測定した。また、ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体におけるペプチドの含有率は、FT-IR又はLC-MSにより測定した。得られた合成樹脂のアセタール化度（ブチラール化度）、水酸基量、アセチル化度、カルボキシル基の含有率、及びペプチド部の含有率を表1、2に示した。

[0119] （実施例1）

ポリビニルアセタール樹脂（PVB1）の作製：

攪拌装置を備えた反応機に、イオン交換水2700mL、平均重合度1700、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを300重量部投入し、攪拌しながら加熱溶解し、溶液を得た。得られた溶液に、触媒として、塩酸濃度が0.2重量%となるように35重量%塩酸を添加した。次いで、温度を15℃に調整し、攪拌しながらn-ブチルアルデヒド22重量部を添加した。次いで、n-ブチルアルデヒド148重量部を添加し、白色粒子状のポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂）を析出させた。析出してから15分後に、塩酸濃度が1.8重量%になるように35重量%塩酸を添加した後、50℃に加熱し、50℃で2時間保持した。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、乾燥させて、ポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂（PVB1）、平均重合度1700、アセタール化度（ブチラール化度）70モル%、水酸基量27モル%、アセチル化度3モル%）を得た。

[0120] リンカーの導入：

得られたポリビニルアセタール樹脂99重量部と、アクリル酸（リンカー）1重量部とをTHF300重量部に溶解し、光ラジカル重合開始剤の存在

下で、紫外線照射下で20分間反応させ、ポリビニルアセタール樹脂とアクリル酸とをグラフト共重合させることにより、リンカーを導入した。リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂1重量部をブタノール19重量部に溶解させた。得られた溶液150 μ Lを、エアダスターで除塵した ϕ 22mmのカバーガラス（松浪社製「22丸No. 1」）の表面上に吐出し、スピナーを用いて2000rpm、20秒回転させた後、60℃で60分間加熱して、表面が平滑な樹脂膜を得た。

[0121] ペプチド部の形成：

Arg-Gly-Asp-Serのアミノ酸配列を有する直鎖状のペプチド（アミノ酸残基数4個、表ではRGDSと記載）を用意した。このペプチド1重量部と、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（縮合剤）1重量部とを、カルシウム及びマグネシウムの双方を含まないリン酸緩衝生理食塩水に該ペプチドの終濃度が1mMとなるよう添加し、ペプチド含有液を作製した。このペプチド含有液1重量部を、スピナーコートした樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）に添加し、反応させて、リンカーのカルボキシル基と、ペプチドのArgのアミノ基とを脱水縮合した。このようにして、ポリビニルアセタール樹脂部と、リンカー部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0122] 得られたペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂は、アセタール化度（ブチラール化度）69.3モル%、水酸基量26.7モル%、アセチル化度3.0モル%、カルボキシル基の含有率0.9モル%、ペプチド部の含有率0.1モル%であった。

[0123] 細胞培養用容器の作製：

得られたペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂とカバーガラスとの積層体を、 ϕ 22mm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。

[0124] （実施例2）

実施例 1 と同様にして、樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を得た。

[0125] ペプチド部の形成：

A r g - G l y - A s p - P h e - L y s のアミノ酸配列を有する環状のペプチド（アミノ酸残基数 5 個、A r g と L y s とが結合することにより環状ペプチド骨格を形成、P h e は D 体、表では c - R G D f K と記載）を用意した。このペプチド 1 重量部と、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（縮合剤）1 重量部とを、カルシウム及びマグネシウムの双方を含まないリン酸緩衝生理食塩水に該ペプチドの終濃度が 1 m M となるように添加し、ペプチド含有液を作製した。このペプチド含有液 1 重量部を、スピンコートした樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）に添加し、反応させて、リンカーのカルボキシル基と、ペプチドの L y s のアミノ基とを脱水縮合した。このようにして、ポリビニルアセタール樹脂部と、リンカー部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0126] 細胞培養用容器の作製：

実施例 1 と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0127] （実施例 3）

実施例 1 と同様にして、樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を得た。

[0128] ペプチド部の形成：

G l y - A r g - G l y - A s p - S e r のアミノ酸配列を有する直鎖状のペプチド（アミノ酸残基数 5 個、表では G R G D S と記載）を用意した。ペプチドの添加量を 1 0 重量部にしたこと以外は、実施例 1 と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0129] 細胞培養用容器の作製：

実施例 1 と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0130] （実施例 4）

リンカーの導入において、70重量部のPVB1と30重量部のアクリル酸（リンカー）とを用いたこと、ペプチド部の形成において、ペプチドの添加量を30重量部に変更したこと以外は、実施例3と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂及び細胞培養用容器を作製した。

[0131] （実施例5）

リンカーの導入において、50重量部のPVB1と50重量部のアクリル酸（リンカー）とを用いたこと、ペプチド部の形成において、ペプチドの添加量を40重量部に変更したこと以外は、実施例3と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂及び細胞培養用容器を作製した。

[0132] （実施例6）

リンカーの導入において、30重量部のPVB1と70重量部のアクリル酸（リンカー）とを用いたこと、ペプチド部の形成において、ペプチドの添加量を70重量部に変更したこと以外は、実施例3と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂及び細胞培養用容器を作製した。

[0133] （実施例7）

ポリビニルアセタール樹脂（PVB2）の作製：

攪拌装置を備えた反応機に、イオン交換水2700mL、平均重合度1700、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを300重量部投入し、攪拌しながら加熱溶解し、溶液を得た。得られた溶液に、触媒として、塩酸濃度が0.2重量%となるように35重量%塩酸を添加した。次いで、温度を15℃に調整し、攪拌しながらn-ブチルアルデヒド22重量部を添加した。次いで、n-ブチルアルデヒド143重量部を添加し、白色粒子状のポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂）を析出させた。析出してから15分後に、塩酸濃度が1.8重量%になるように35重量%塩酸を添加した後、50℃に加熱し、50℃で2時間保持した。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、乾燥させて、ポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂（PVB2）、平均重合度1700、アセタール化度（ブチラール化度）69モル%、水酸基量28

モル%、アセチル化度 3 モル%) を得た。

[0134] リンカーの導入：

得られたポリビニルアセタール樹脂 70 重量部と、アクリル酸（リンカー）30 重量部とを THF 300 重量部に溶解し、光ラジカル重合開始剤の存在下で、紫外線照射下で 20 分間反応させ、ポリビニルアセタール樹脂とアクリル酸とをグラフト共重合させることにより、リンカーを導入した。リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂 1 重量部をブタノール 19 重量部に溶解させた。得られた溶液 150 μ L を、エアダスターで除塵した ϕ 22 mm のカバーガラス（松浪社製「22 丸 No. 1」）の表面上に吐出し、スピンコーターを用いて 2000 rpm、20 秒回転させた後、60℃で 60 分間加熱して、表面が平滑な樹脂膜を得た。

[0135] ペプチド部の形成：

得られた樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を用いたこと以外は、実施例 4 と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0136] 細胞培養用容器の作製：

実施例 1 と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0137] （実施例 8）

ポリビニルアセタール樹脂（PVB3）の作製：

攪拌装置を備えた反応機に、イオン交換水 2700 mL、平均重合度 1700、鹼化度 99 モル%のポリビニルアルコールを 300 重量部投入し、攪拌しながら加熱溶解し、溶液を得た。得られた溶液に、触媒として、塩酸濃度が 0.2 重量%となるように 35 重量%塩酸を添加した。次いで、温度を 15℃に調整し、攪拌しながら *n*-ブチルアルデヒド 22 重量部を添加した。次いで、*n*-ブチルアルデヒド 138 重量部を添加し、白色粒子状のポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂）を析出させた。析出してから 15 分後に、塩酸濃度が 1.8 重量%になるように 35 重量%塩酸を添加した後、50℃に加熱し、50℃で 2 時間保持した。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、乾燥させて、ポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂（PVB3）、平均重合度1700、アセタール化度（ブチラール化度）67モル%、水酸基量30モル%、アセチル化度3モル%）を得た。

[0138] リンカーの導入：

得られたポリビニルアセタール樹脂を用いたこと以外は実施例7と同様にして、リンカーを導入した。

[0139] ペプチド部の形成：

得られた樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を用いたこと以外は、実施例4と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0140] 細胞培養用容器の作製：

実施例1と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0141] （実施例9）

ポリビニルアセタール樹脂（PVB4）の作製：

攪拌装置を備えた反応機に、イオン交換水2700mL、平均重合度1700、鹼化度99モル%のポリビニルアルコールを300重量部投入し、攪拌しながら加熱溶解し、溶液を得た。得られた溶液に、触媒として、塩酸濃度が0.2重量%となるように35重量%塩酸を添加した。次いで、温度を15℃に調整し、攪拌しながらn-ブチルアルデヒド22重量部を添加した。次いで、n-ブチルアルデヒド100重量部を添加し、白色粒子状のポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂）を析出させた。析出してから15分後に、塩酸濃度が1.8重量%になるように35重量%塩酸を添加した後、50℃に加熱し、50℃で2時間保持した。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、乾燥させて、ポリビニルアセタール樹脂（ポリビニルブチラール樹脂（PVB4）、平均重合度1700、アセタール化度（ブチラール化度）50モル%、水酸基量47モル%、アセチル化度3モル%）を得た。

[0142] リンカーの導入：

得られたポリビニルアセタール樹脂を用いたこと以外は実施例7と同様にして、リンカーを導入した。

[0143] ペプチド部の形成：

得られた樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を用いたこと以外は、実施例4と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0144] 細胞培養用容器の作製：

実施例1と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0145] （実施例10）

実施例4と同様にして、樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を得た。

[0146] ペプチド部の形成：

G l y - A r g - G l y - A s p - S e r - P r o のアミノ酸配列を有する直鎖状のペプチド（アミノ酸残基数6個、表ではGRGDS Pと記載）を用意した。このペプチドを用いたこと以外は実施例4と同様にして、ポリビニルアセタール樹脂部と、リンカー部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂を作製した。

[0147] 細胞培養用容器の作製：

実施例1と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0148] （比較例1）

平均重合度1700、鹼化度90モル%のポリビニルアルコール99重量部と、アクリル酸（リンカー）1重量部とをエタノール300重量部に溶解し、光ラジカル重合開始剤の存在下で、紫外線照射下で20分間反応させ、ポリビニルアルコールとアクリル酸とをグラフト共重合させることにより、リンカーを導入した。G l y - A r g - G l y - A s p - S e r のアミノ酸配列を有する直鎖状のペプチド（アミノ酸残基数5個、表ではGRGDSと記載）を用いたこと、リンカーのカルボキシル基と、ペプチドのG l y のア

ミノ基とを脱水縮合したこと以外は、実施例1と同様にして、ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体及び細胞培養用容器を作製した。

[0149] (比較例2)

実施例1と同様にして、樹脂膜（リンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂）を得た。比較例2では、ペプチド部を形成しなかった。また、実施例1と同様にして、細胞培養用容器を得た。

[0150] (参考例A)

天然物由来の足場材の作製：

リン酸バッファー（PBS）中に $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したVitronectin（コーニング社製）溶液を $\phi 35\text{mm}$ ディッシュに 1ml 添加した。そこに $\phi 22\text{mm}$ のカバーガラス（松浪社製「22丸No. 1」）を浸漬させ、 37°C で1時間養生することでVitronectinが表面に平滑に吸着した天然物由来の足場材（表中ではVTNと記載）を得た。

[0151] 細胞培養用容器の作製：

実施例1と同様にして、細胞培養用容器を得た。なお、Vitronectinは乾燥すると変性し、接着性能が大きく低下してしまうため、細胞培養用容器の作製後すぐにPBS溶液で浸漬した。

[0152] (評価)

(1) 水酸基価及び酸価の測定

JIS K0070に記載の中和滴定法で、上述した方法により、細胞培養用足場材料の水酸基価及び酸価を測定した。

[0153] (2) 海島構造の有無

得られたペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂の樹脂膜（実施例1～10及び比較例1）、及びリンカーを導入したポリビニルアセタール樹脂の樹脂膜（比較例2）をPBS溶液に30分間浸漬した。浸漬後の樹脂膜を原子間力顕微鏡（AFM、Bruker社製「Dimension XR」）により観察した。QNMモードでピークセットポイントを 2nN に設定する測定条件とし、 $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$ の範囲を観察した。得られた高さマッピング画

像と弾性率マッピング画像とを比較して海島構造の有無を判断した。なお、表では、海島構造が観察される場合に「A」と記載し、海島構造が観察されない場合に「B」と記載した。

[0154] 図2(a)は、海島構造が観察されると判定される画像の例であり、図2(b)は、海島構造が観察されないと判定される画像の例である。具体的には、図2(a)は、実施例7で得られた細胞培養用足場材料の画像であり、図2(b)は、実施例1で得られた細胞培養用足場材料の画像である。

[0155] (3) 細胞培養評価

(3-1) iPS細胞の播種及び培養

以下の液体培地及びROCK(Rho結合キナーゼ)特異的阻害剤を用意した。

[0156] TeSR-E8培地(STEM CELL社製)

ROCK-Inhibitor(Y27632)

[0157] 得られた細胞培養用容器にリン酸緩衝生理食塩水1mLを加えて37℃のインキュベーター内で1時間静置後、細胞培養用容器からリン酸緩衝生理食塩水を除去した。

[0158] φ35mmディッシュにコンフルエント状態になったh-iPS細胞253G1に0.5mMエチレンジアミン四酢酸/リン酸緩衝溶液1mLを加え、室温で2分間静置した。エチレンジアミン四酢酸/リン酸緩衝溶液を除去した後、液体培地1mLでピペッティングすることにより50μm~200μmの大きさに砕かれた細胞塊を得た。得られた細胞塊(細胞数 1.0×10^5 cells)を上記の細胞培養用容器にクランプ播種した。

[0159] 1mLの液体培地と、終濃度が10μMとなるようにROCK特異的阻害剤とを細胞培養用容器に添加して、37℃及びCO₂濃度5%のインキュベーター内で培養を行った。24時間毎に液体培地を1mL除去し、新たな液体培地を1mL加えることで培地交換を行った。

[0160] (3-2) MSCの播種及び培養

以下の液体培地及び添加剤を用意した。液体培地であるMesenCul

t-ACF Plus Mediumに終濃度が1Xとなるように、MesenCult-ACF Plus 500X Supplement及びL-Glutamine 200mmol/L (100X)を加えた。

[0161] MesenCult-ACF Plus Medium (Stemcell technologies社製)

MesenCult-ACF Plus 500X Supplement (Stemcell technologies社製)

L-Glutamine 200mmol/L (100X) (富士フイルム和光純薬社製)

[0162] 以下の間葉系幹細胞 (MSC) を用意した。MSCを含む骨髓間質細胞をMSC用培地で馴化し、MSCの陽性マーカー (CD73、CD90、CD105) が95%以上、MSCの陰性マーカー (CD14、CD34、CD45) が5%未満の純度である細胞をMSCとして使用した。

[0163] Human Bone Marrow Stromal Cells Derived in ACF Medium (Stemcell technologies社製)

[0164] 得られた細胞培養用容器にリン酸緩衝生理食塩水1mLを加えて37℃のインキュベーター内で1時間静置後、細胞培養用容器からリン酸緩衝生理食塩水を除去した。

[0165] φ35mmディッシュにコンフルエント状態になったMSCを配置し、ACF Enzymatic Dissociation Solution (Stemcell technologies社製) 2mLを加え、37℃及びCO₂濃度5%のインキュベーター内で3分間静置した。さらに、ACF Enzyme Inhibition Solution (Stemcell technologies社製) 2mLを加えた。300rpmで8分間遠心後、上清を除去して、液体培地で懸濁し細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液 (細胞数 8.0×10^4 cells) を上記の細胞培養用容器に播種した。

[0166] 播種時は1.5 mLの液体培地を細胞培養用容器に添加した。また、37℃及びCO₂濃度5%のインキュベーター内で培養を行った。

[0167] (3-3) 仮足の伸展性

細胞播種から24時間経過後の細胞を位相差顕微鏡（オリンパス社製「IX73」、10×20倍）を用いて観察した。観察において、細胞培養用容器内の最も平均的な接着形態を示す視野の画像を取得した。得られた画像から、シェイプファクター（SF）を求めることにより、仮足の伸展性を評価した。なお、シェイプファクター（SF）とは、細胞を培養した後の細胞の平面視における領域の形状評価係数であり、下記式により求められる。

[0168] 式： $SF = 4 \times \pi \times (\text{細胞の平面積}) / (\text{細胞の外周縁の長さ})^2$

[0169] 図3(a)、(b)及び(c)は、SFと細胞の平面形状との関係を示す図である。図3(a)に示すように、上記SFが1であれば細胞の平面形状は円形となる。SFが小さくなるほど、円形から遠ざかり、細胞の仮足が良好に伸展していることを意味する。図3(b)は、SF≒0.3の場合の細胞の平面形状を示す写真であり、図3(c)は、SF≒1である場合の細胞の平面形状を示す写真である。

[0170] <仮足の伸展性の判定基準>

○：SFが0.1以上0.6以下

×：SFが0.6を超え1以下

[0171] (3-4) 細胞の増殖性(1)

細胞播種から5日経過後の細胞を位相差顕微鏡にて観察した。細胞塊が播種時よりも大きくなっているか否かを目視にて確認した。

[0172] <細胞の増殖性(1)の判定基準>

○：播種時と比べて細胞塊が大きくなっており、細胞の増殖が確認できる

×：播種時と比べて細胞塊が変化しない、又は、細胞塊が剥離しており、細胞塊が存在しない

[0173] (3-5) 細胞の増殖性(2)

細胞播種から5日経過後の細胞数をセルカウンター（Chemomete

c社製「NucleoCounter Nc-3000」)を用いて求めた。
次に、下記式を用いて参考例Aに対する細胞増殖率を求めた。

[0174] 参考例Aに対する細胞増殖率(%) = (実施例・比較例における細胞数)
／ (参考例Aにおける細胞数) × 100

[0175] <細胞の増殖性(2)の判定基準>

AA : 参考例Aに対する細胞増殖率が100%以上

A : 参考例Aに対する細胞増殖率が50%以上100%未満

B : 参考例Aに対する細胞増殖率が10%以上50%未満

C : 参考例Aに対する細胞増殖率が10%未満

[0176] 詳細及び結果を下記の表1, 2に示す。

[0177]

[表1]

		実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6
ポリビニルアセタール樹脂部	種類	—	PVB1	PVB1	PVB1	PVB1	PVB1
	アセタール化度(ブチラール化度)	モル%	69.3	69.3	64.2	51.3	23.8
	水酸基の含有率	モル%	26.7	26.7	22.1	18.9	9.0
	アセチル基の含有率	モル%	3.0	3.0	2.7	2.3	1.2
リンカー	カルボキシル基の含有率	モル%	0.9	0.9	1.0	2.5	6.0
ペプチド部	種類	—	RGDS	GRGDS	GRGDS	GRGDS	GRGDS
	含有率	モル%	0.1	0.1	10	25	60
水酸基価		mgKOH/g	560	560	440	380	180
酸価		mgKOH/g	12	12	130	350	800
海島構造の有無		—	B	B	A	A	A
細胞培養 評価	iPS細胞 (253G1)	仮足の伸展性	○	○	○	○	○
		細胞の増殖性(1)	○	○	○	○	○
		細胞の増殖性(2)	—	A	AA	AA	A
	MSC	仮足の伸展性	○	○	○	○	○
		細胞の増殖性(1)	○	○	○	○	○
		細胞の増殖性(2)	B	A	AA	AA	A

[0178] [表2]

		実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	比較例 1	比較例 2	参考例 A
ポリビニルアセタール樹脂部	種類	—	PVB2	PVB3	PVB4	PVB1	PVB1	VTN
	アセタール化度(ブチラール化度)	モル%	62.8	56.2	44.6	64.2	0.0	
	水酸基の含有率	モル%	23.5	30.1	41.8	22.1	90.0	
	アセチル基の含有率	モル%	2.7	2.7	2.6	2.7	9.8	
	カルボキシ基の含有率	モル%	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	
	種類	—	GRGDS	GRGDS	GRGDS	GRGDSP	GRGDS	—
	含有率	モル%	10	10	10	10	0.1	
	水酸基価	mgKOH/g	450	750	950	440	1400	
	酸価	mgKOH/g	130	130	130	130	2	
	海島構造の有無	—	A	A	A	A	B	
細胞培養 評価	仮足の伸展性	—	○	○	○	○	○	—
	細胞の増殖性(1)	—	○	○	○	○	○	○
	細胞の増殖性(2)	—	AA	AA	A	AA	C	—
	仮足の伸展性	—	○	○	○	○	○	—
	細胞の増殖性(1)	—	○	○	○	○	○	○
	細胞の増殖性(2)	—	AA	AA	A	AA	C	—

符号の説明

- [0179] 1 …細胞培養用容器
 2 …容器本体
 2 a …表面
 3 …細胞培養用足場材料

請求の範囲

- [請求項1] ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含み、
 水酸基価が、 1100 mg KOH/g 以下である、細胞培養用足場材料。
- [請求項2] ポリビニルアルコール誘導体部と、ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体を含み、
 前記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体の水酸基価が、 1100 mg KOH/g 以下である、細胞培養用足場材料。
- [請求項3] 前記ペプチド部が、細胞接着性のアミノ酸配列を有する、請求項1又は2に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項4] 前記細胞接着性のアミノ酸配列が、RGD配列、YIGSR配列、又はPDSGR配列を少なくとも有する、請求項3に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項5] 前記細胞接着性のアミノ酸配列が、下記式(1)で表されるRGD配列を少なくとも有する、請求項3又は4に記載の細胞培養用足場材料。
$$\text{Arg-Gly-Asp-X} \cdots \text{式(1)}$$

 前記式(1)中、Xは、Gly、Ala、Val、Ser、Thr、Phe、Met、Pro、又はAsnを表す。
- [請求項6] 前記ペプチド部が、3個以上10個以下のアミノ酸により構成される、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。
- [請求項7] 前記ポリビニルアルコール誘導体部と前記ペプチド部とが、リンカ一部を介して結合している、請求項1～6のいずれか1項に記載の細胞培養用足場材料。
- [請求項8] 前記ペプチド含有ポリビニルアルコール誘導体が、ポリビニルアセタール樹脂部と、前記ペプチド部とを有するペプチド含有ポリビニルアセタール樹脂である、請求項1～7のいずれか1項に記載の細胞培

養用足場材料。

[請求項9]

容器本体と、

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の細胞培養用足場材料とを備え

、

前記容器本体の表面上に、前記細胞培養用足場材料が配置されている、細胞培養用容器。