

明 細 書

発明の名称：細胞凝集塊の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞凝集塊製造用基板、その製造方法、細胞凝集塊の製造方法、及び細胞凝集塊の製造時の細胞利用効率を向上させる方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞凝集塊（スフェロイドまたは細胞塊などともいう）は、三次元的に培養され、細胞同士が自己集合・凝集化した細胞集合体であり、生体様構造が構築されることから、細胞の機能を長期間維持でき、生理的機能が向上することが報告されている。そのため、細胞凝集塊の、創薬研究における、又は細胞治療や再生治療における利用についての期待が高まっている。

[0003] それに伴い、細胞凝集塊を簡便かつ迅速に、均一かつ大量に作製できる組織工学技術の開発が再生医療の実用化や創薬試験の効率化のための重要課題とされているが、従来の細胞低接着性培養皿（例えば、マルチウェルプレート）を用いた浮遊細胞のランダムな凝集化現象を利用する方法では１ウェルに１個のスフェロイドしか形成しないため、操作性及び量産性に優れないという課題があった。

[0004] 本発明者らはこれまでに、細胞培養に係る技術として、特定のアニオン性基とカチオン性基を含む共重合体を含むコーティング剤が、基体の種類を選ばず強固に固着することができ、また固着後は水系溶媒への耐性に優れたコーティング膜となり、かつ優れた生体物質（例えば、血小板やフィブリノゲン等）の付着抑制能を示すことを報告した（例えば、特許文献１、２参照）。また、同コーティング剤でコーティングされていることを特徴とする細胞培養容器が、細胞の付着抑制能に優れると共に、溶媒や放射線への耐性にも優れる、さらには長期間（例えば１４日以上、例えば２１日以上）にわたる非接着培養に用いることができ、スフェロイドの作製に適していることを報告した（例えば、特許文献３、４参照）。さらに本発明者らは接着細胞の自

発的な集合（自己集合化）を誘導するコーティング剤と、同コーティング剤でコーティングされていることを特徴とする細胞培養容器を用いたスフェロイドの作製についても報告した（例えば、PCT/JP2019/32785参照）。しかしながら、これらはいずれもスフェロイドの作製の操作性及び量産性という点では満足のいくものではなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2014/196650号
特許文献2：国際公開第2016/093293号
特許文献3：国際公開第2014/196652号
特許文献4：国際公開第2019/107503号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、スフェロイド作製の操作性及び量産性に優れる、細胞凝集塊製造用基板及びその製造方法を提供することを目的とする。

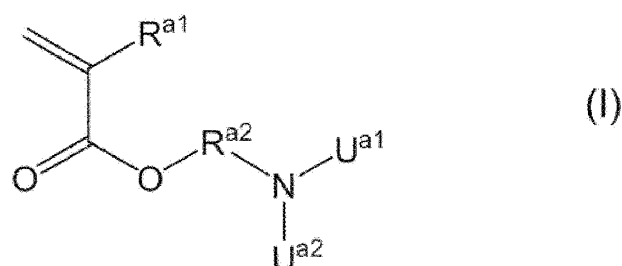
課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、接着細胞の自発的な集合（自己集合化）を誘導するコーティング剤を、例えばインクジェット装置と組み合わせて、細胞の付着抑制能を有する基板（例えば、細胞低接着シャーレ）上に高密度にスポット状に塗布することで、播種細胞のほぼ全てを塗布膜（スポット）に接着させて凝集化させることが出来ることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下のとおりである：

- [0008] [1] 細胞の付着抑制能を有する基板上に、下記式（I）：

[化1]



[式中、

U^{a1}及びU^{a2}は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a1}は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a2}は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体からなる複数のスポットを備える細胞凝集塊製造用基板であって、基板の表面積に対するスポットの総面積の割合が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000μmであり、スポット間の間隔が30～1000μmである、細胞凝集塊製造用基板。

[0009] [2] 細胞利用効率が90%以上である、[1]に記載の細胞凝集塊製造用基板。

[0010] [3] 上記細胞が幹細胞である、[1]又は[2]に記載の細胞凝集塊製造用基板。

[0011] [4] 上記重合体が、さらに式(II)：

[化2]



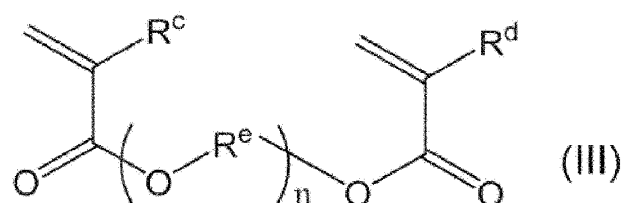
[式中、

R^bは、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む、[1]～[

3] の何れかに記載の細胞凝集塊製造用基板。

[0012] [5] 上記重合体が、さらに下記式 (III) :

[化3]

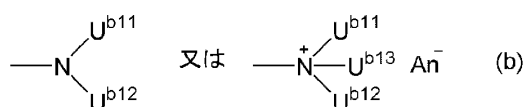


[式中、

R^c 及び R^d は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^e は、炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し、 n は 1 ~ 50 の数を表す] で表されるモノマーから誘導される構造単位を含む、[1] ~ [4] の何れかに記載の細胞凝集塊製造用基板。

[0013] [6] 上記細胞の付着抑制能を有する基板が、下記式 (a) で表される基を含む繰り返し単位と、下記式 (b) で表される基を含む繰り返し単位とを含む共重合体 (P) :

[化4]



[式中、

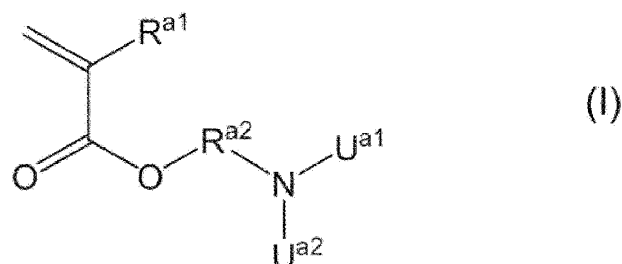
$\text{U}^{\text{a}11}$ 、 $\text{U}^{\text{a}12}$ 、 $\text{U}^{\text{b}11}$ 、 $\text{U}^{\text{b}12}$ 及び $\text{U}^{\text{b}13}$ は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 An^- は、ハロゲン化物イオン、無機酸イオン、水酸化物イオン及びイソチオシアネートイオンからなる群から選ばれる陰イオンを表す]

を含むコーティング膜を前記基板表面の少なくとも一部に含む、[1]～[5] 何れか1項に記載の細胞凝集塊製造用基板。

[0014] [7] 細胞の付着抑制能を有する基板上に、

下記式(1)：

[化5]



[式中、

$\text{U}^{\text{a}1}$ 及び $\text{U}^{\text{a}2}$ は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 $\text{R}^{\text{a}2}$ は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体を、複数のスポット状に塗布し、次いで乾燥する工程を含み、ここで基板の表面積に対するスポットの総面積が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000 μm であり、スポット間の間隔が30～1000 μm である、細胞凝集塊製造用基板の製造方法。

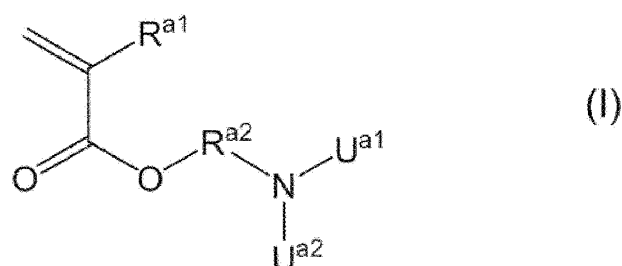
[0015] [8] 細胞利用効率が90%以上である、[7]に記載の細胞凝集塊製造用基板の製造方法。

[0016] [9] 上記塗布工程をインクジェット方式で行う、[7]又は[8]に記載の細胞凝集塊製造用基板の製造方法。

[0017] [10] 細胞の付着抑制能を有する基板上に、

下記式(1)：

[化6]



[式中、

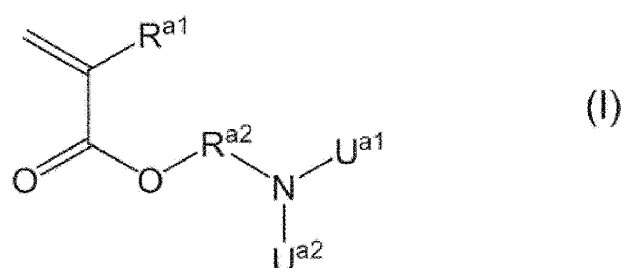
U^{a1}及びU^{a2}は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a1}は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a2}は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体を、複数のスポット状に塗布する工程、次いで細胞を播種する工程を含み、ここで基板の表面積に対するスポットの総面積が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000μmであり、スポット間の間隔が30～1000μmである、細胞凝集塊の製造方法。

[0018] [11] 細胞利用効率が90%以上である、[10]に記載の細胞凝集塊の製造方法。

[0019] [12] 細胞の付着抑制能を有する基板上に、

下記式(I)：

[化7]



[式中、

U^{a1}及びU^{a2}は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の

直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^{a1} は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^{a2} は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体を、複数のスポット状に塗布することによる、細胞凝集塊の製造時の細胞利用効率を向上させる方法であって、ここで基板の表面積に対するスポットの総面積が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000 μm であり、スポット間の間隔が30～1000 μm である、方法。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、従来のスフェロイド作製のマルチウェルプレート等を用いることなく、シャーレ又はディッシュの底面やプレート表面等であって、かつ細胞の付着抑制能を有する基板上に、接着細胞の自発的な集合（自己集合化）を誘導する、本発明に係る特定の重合体からなる複数のスポット状の塗布膜を高密度で備える、本発明の細胞凝集塊製造用基板を用いることにより、塗布膜（スポット）を有する基板平面上に細胞を播種するだけで、均一なサイズのスフェロイドを一つの基板（容器）で複数形成できることから、操作性及び量産性に優れる。また本発明の細胞凝集塊製造用基板を用いることにより、スフェロイドの製造時に播種した細胞の利用効率も向上する。したがって本発明により、スフェロイドを簡便かつ効率的に、均一かつ大量に作製できる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1] (a) は、実施例1で得られた細胞凝集塊形成用シャーレの蛍光顕微鏡画像であり、本発明に係る重合体を塗布した部分が円形に光っており、インクジェットにより塗布膜（スポット）が形成できることが示された。(b) は、実施例1の細胞凝集塊形成用シャーレの製造において、インクジェットの液滴量（塗布量）と形成された塗布膜の面積の関係を示したグラフであり、液滴量の増加に伴いスポットの面積が増加していること、すなわち液滴量によりスポットのサイズを制御できることが示された。

〔図2〕（a）は、実施例2で得られた細胞凝集塊形成用シャーレの蛍光顕微鏡画像であり、（b）は、比較例1で得られた細胞凝集塊形成用シャーレの蛍光顕微鏡画像である。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は、前者が44％であり、後者が15％であった。

〔図3〕（a）の上列は、実施例3の細胞凝集塊製造試験にて、細胞凝集塊形成用シャーレの各スポットに細胞が接着した様子（4時間後）の顕微鏡画像であり、（a）の下列は、接着した細胞が剥離して形成したスフェロイドの様子（44時間後）の顕微鏡画像である。（b）は、スポットの面積とスフェロイドの直径の関係を示したグラフであり、スポットの面積の増加に伴いスフェロイドの直径が増加していること、すなわち液滴量によりスフェロイドのサイズを制御できることが示された。

〔図4〕（a）は、実施例4の細胞接着確認試験にて、高密度でスポットを備える細胞凝集塊形成用シャーレの各スポットに細胞が接着した様子の顕微鏡画像であり、（b）は、比較例2の細胞接着確認試験にて、低密度でスポットを備える細胞凝集塊形成用シャーレの各スポットに細胞が接着した様子の顕微鏡画像である。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は、前者が52％であり、後者が15％であった。

〔図5〕実施例5の細胞凝集塊製造試験にて、細胞凝集塊形成用シャーレに播種した細胞（播種直後）が、シャーレの各スポットに経時的に接着し（2時間後）、細胞凝集塊を形成する（8時間後）様子をタイムラプスにて撮影した顕微鏡画像の一部である。

発明を実施するための形態

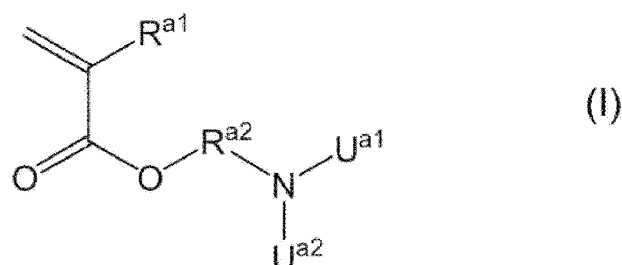
[0022] 〔細胞凝集塊製造用基板及びその製造方法〕

（重合体）

本発明の細胞凝集塊製造用基板は、細胞の付着抑制能を有する基板上に重合体からなる複数のスポットを備える。本発明において「スポット」とは、基板上に重合体により形成された直径50～5000 μ mの略円状の塗布膜を意味する。スポット部分を構成する重合体は、

下記式 (I) :

[化8]



[0023] [式中、

U^{a1} 、 U^{a2} は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^{a1} は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^{a2} は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるカチオン性モノマーから誘導される繰り返し単位を含む。

[0024] 上記重合体は、上記式 (I) で表されるカチオン性モノマーと共に、下記式 (II) :

[化9]



[式中、

R^b は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表す]で表されるアニオン性モノマーから誘導される繰り返し単位を含む共重合体であることが好ましい。

[0025] 本明細書において、他に定義のない限り、「炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基」としては、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*s*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、3-

メチルブチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、1, 2-ジメチルプロピル基、2, 2-ジメチルプロピル基又は1-エチルプロピル基が挙げられる。

R^{a1} 及び R^b は、それぞれ独立して、水素原子及びメチル基から選ばれることが好ましい。

U^{a1} 及び U^{a2} は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び n -ブチル基から選ばれることが好ましいが、メチル基又はエチル基であることが好ましく、メチル基が最も好ましい。

[0026] 本明細書において、他に定義のない限り、「炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基」としては、例えばメチレン基、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、1-メチルプロピレン基、2-メチルプロピレン基、ジメチルエチレン基、エチルエチレン基、ペンタメチレン基、1-メチル-テトラメチレン基、2-メチル-テトラメチレン基、1, 1-ジメチル-トリメチレン基、1, 2-ジメチル-トリメチレン基、2, 2-ジメチル-トリメチレン基、1-エチル-トリメチレン基等が挙げられる。これらの中で、 R^{a2} としてはエチレン基及びプロピレン基から選ばれることが好ましい。

[0027] したがって、上記式(1)で表されるカチオン性モノマーとしては、2-N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、N-イソプロピルアクリルアミドなどが挙げられ、2-N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレートが好ましい。上記式(11)で表されるアニオン性モノマーとしては、アクリル酸、メタクリル酸などが挙げられ、メタクリル酸が好ましい。

[0028] 上記重合体中の式(1)で表されるモノマー由来の単位/式(11)で表されるモノマー由来の単位のモル比が、100/0~50/50である。好ましくは98/2~50/50である。より好ましくは98/2~60/40であり、特に好ましくは98/2~70/30である。

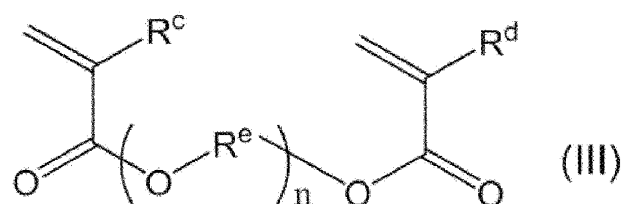
式(11)のモル比が51以上であると、重合体のアニオン性が過剰となり、細胞の接着力が低下するためである。

[0029] 上記重合体は、式（Ⅰ）／式（ⅠⅠ）で表されるモノマーと共に、さらに2つ以上の炭素－炭素不飽和結合を有するモノマーから誘導される構造単位を含むことが好ましい。2つ以上の炭素－炭素不飽和結合を有するモノマーとは、具体的には、2つ以上の炭素－炭素二重結合を有するモノマーであり、例えば多官能アクリレート化合物、多官能アクリルアミド化合物、多官能ポリエステル、又はイソプレン化合物などが挙げられる。これらのモノマーから誘導される構造単位は、重合体間の架橋構造として存在し得る。

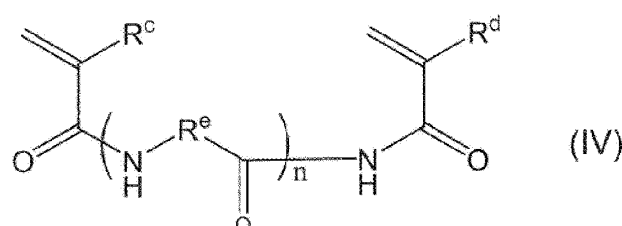
上記2つ以上の炭素－炭素不飽和結合を有するモノマーを導入することで、重合体の高分子量化および分子量分布が広がることにより、膜の基板に対する固着性や塗布性を改善できる。

[0030] 好ましい具体例としては下記式（ⅠⅠⅠ）～（Ⅴ）で表されるモノマーが挙げられる。

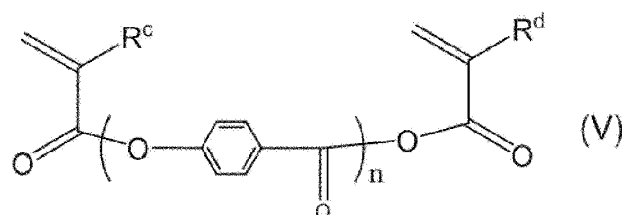
[化10]



[0031] [化11]



[0032] [化12]



- [0033] 式中、 R^c 及び R^d は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^e は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し、 n は1～50の数を表す。これらの中で、式(ⅠⅠⅠ)で表されるモノマーであることが好ましい。
- [0034] 上記重合体全体に対する式(ⅠⅠⅠ)～(Ⅴ)で表されるモノマーのモル比は、0～5%であることが好ましい。さらに好ましくは0～3%である。
- 式(ⅠⅠⅠ)～(Ⅴ)のモル比が5%以上であると、過度な架橋による高分子量化により、製造中にゲル化して製造を困難にする恐れがあるためである。
- R^c 及び R^d は、それぞれ独立して、水素原子及びメチル基から選ばれることが好ましい。
- R^e はメチレン基、エチレン基及びプロピレン基から選ばれることが好ましく、エチレン基が最も好ましい。
- n は1～50の数であるが、 n は1～30の数であることが好ましく、 n は1～10の数であることが好ましい。
- [0035] 上記重合体全体に対する式(ⅠⅠ)で表されるモノマーの占めるモル%の値と、調製工程時のモノマー仕込み量全体に対する式(ⅠⅠ)で表される単量体の占めるモル%の値の差は、0～10モル%である。本発明に係る重合体は後述する製造方法により、モノマー仕込み比と、製造された重合体の実測値との差が少なく、0～10モル%である。さらに好ましくは0～8モル%である。
- [0036] 上記重合体の数平均分子量(M_n)は、20,000～2,000,000であり、50,000～1,000,000であることがさらに好ましい。
- [0037] 上記重合体の重量平均分子量(M_w)と前記数平均分子量(M_n)との比(M_w/M_n)が、1.01～10.00であり、1.2～8.0であることが好ましく、2.0～7.0であることがより好ましく、3.0～6.0であることが特に好ましい。

重量平均分子量 (M_w) と数平均分子量 (M_n) は、例えば実施例に記載の Gel Filtration Chromatography により求めることができる。

[0038] 細胞の付着抑制能を有する基板上に、上記重合体からなる複数のスポットを備える本発明の細胞凝集塊製造用基板を利用することで、複数のスポット部分に細胞を接着させた後に剥離させて、複数の細胞凝集塊を一つの容器で一度に作製することが可能である。なお細胞凝集塊とは、細胞が凝集した結果形成する構造体を示し、球状やリング状などのように形状が限定されない。本発明は、従来の細胞低接着プレート上での非接着培養により作製される細胞凝集塊と比較し、接着面積の規定による細胞凝集塊のサイズ調整が可能（任意の大きさの細胞凝集塊が製造できる）などの点でメリットがある。

[0039] （重合体の製造方法）

本発明に係る重合体は、熱重合法により製造することができる。例えば上記式 (I) のモノマーを有機溶媒に溶解し、ラジカル重合開始剤を添加、必要に応じて次いで上記式 (II)、さらに必要に応じて2つ以上の炭素-炭素不飽和結合を有するモノマー（式 (III) ~ (V) で表されるモノマー等）を加え混合物とした後、十分に攪拌して均一とした後、窒素フローしながら、例えば51℃以上、例えば51~180℃、51~150℃、51~130℃、51~100℃、例えば溶媒のリフラックス温度（例えばテトラヒドロフランでは66~85℃）に昇温して、例えば1~48時間攪拌することで重合体を得られる。得られた重合体を再沈殿、透析により精製してもよい。

[0040] 一の実施態様では、上記式 (I) のモノマーを溶媒に溶解し、重合開始剤を添加、必要に応じて次いで上記式 (II) のモノマーを、溶媒中で、両化合物の合計濃度0.01質量%乃至40質量%にて反応（重合）させる工程を含む製造方法により調製することができる。

[0041] 上記重合において使用する有機溶媒としては、例えばテトラヒドロフラン、1,4-ジオキサンなどのエーテル溶媒、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどの炭素原子数1乃至4の脂肪族アルコール溶媒、トルエン

などの芳香族炭化水素溶媒あるいはその混合溶媒が挙げられる。

[0042] 重合反応を効率的に進めるためには、ラジカル重合開始剤を使用することが望ましい。ラジカル重合開始剤の例としては、ジメチル 1, 1'-アゾビス(1-シクロヘキサンカルボキシレート) (VE-073、富士フィルム和光純薬(株)製)、2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル) (V-65、富士フィルム和光純薬(株)製)、2, 2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (AIBN、富士フィルム和光純薬(株)製)、2, 2'-アゾビス[N-(2-カルボキシエチル)-2-メチルプロピオンアミジン] n水和物 (VA-057、富士フィルム和光純薬(株)製)、2, 2'-(N-ブチル-2-メチルプロピオンアミド) (VAm-110、富士フィルム和光純薬(株)製) などのアゾ重合開始剤が挙げられる。

重合開始剤の添加量としては、重合に用いられるモノマーの合計重量に対し、0.05質量%~5質量%である。

重合開始剤の使用は、重合反応の効率化のみならず、末端官能基の修飾による重合体物性の調整が可能となる。

[0043] 例えば、本発明に係る重合体は、その目的を損なわない範囲で、末端官能基の修飾により機能性分子を導入してもよい。機能性分子の典型例は、蛍光標識分子であり、そのような分子を導入するための試薬は、例えばAlexa Fluor (商標) 等の名称のもとで市販されている。

[0044] (スポット)

本発明の細胞凝集塊製造用基板が備える、上記重合体からなる複数のスポット(塗布膜)は、基板の表面積に対するスポットの総面積の割合が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50~5000 μ mであり、スポット間の間隔が30~1000 μ mであることを特徴とする。基板の表面積に対するスポットの総面積の割合、各スポットの直径やスポット間の間隔は、用いる細胞や基板の種類、細胞凝集塊の所望のサイズ等に応じて、所定の範囲から適宜選択することができるが、基板の表面積に対するスポットの総面積の割合は、30%以上、40%以上、50%以上であることが好ましく、か

つ99%以下であることが好ましく、各スポットの直径は、50～5000 μm であり、300～3000 μm であることが好ましく、スポット間の間隔は、30～1000 μm であり、100～500 μm であることが好ましい。本発明は、細胞の付着抑制能を有する基板上に、細胞が接着し得る独立したマイクロサイズの領域（スポット）を、このように高密度で、好ましくは規則的に配することにより、均一なサイズのスフェロイドを一つの基板（容器）で一度に複数形成できる。

[0045] また本発明の細胞凝集塊製造用基板では、播種細胞のほぼ全てをスポットに接着させて凝集化させることができる。具体的には、本発明の細胞凝集塊製造用基板では、細胞利用効率が90%以上に及び、好ましくは95%以上であり、より好ましくは99%以上である。なお細胞利用効率は、本発明の細胞凝集塊製造用基板へ細胞の播種し、所定のインキュベーション操作の後、接着細胞数（例えば、播種細胞数からインキュベーション操作後に基板から除去した培地に含まれる非接着細胞数を減じた値）を播種細胞数で除した値を百分率で示したものである。

[0046] 本発明の細胞凝集塊製造用基板が備える、上記重合体からなる複数のスポット（塗布膜）は、細胞の付着抑制能を有する基板上に、上記重合体をスポット状に塗布し、次いで乾燥する工程により形成される。

[0047] 上記重合体を基板上に塗布する工程は、上記重合体を含む塗布膜形成剤を用いて実施してもよい。塗布膜形成剤は、上記重合体に、自体公知の方法にて含水溶液を混合させることで、上記塗布膜形成剤が製造できる。

含水溶液とは、水、生理食塩水又はリン酸緩衝溶液などの塩含有水溶液、あるいは水又は塩含有水溶液とアルコールとを組み合わせた混合溶媒が挙げられる。アルコールとしては、炭素原子数2乃至6のアルコール、例えば、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、2, 2-ジメチル-1-プロパノール（＝ネオペンチルアルコール）、2-メチル

ー１－プロパノール、２－メチル－１－ブタノール、２－メチル－２－ブタノール（＝ｔ－アミルアルコール）、３－メチル－１－ブタノール、３－メチル－３－ペンタノール、シクロペンタノール、１－ヘキサノール、２－ヘキサノール、３－ヘキサノール、２，３－ジメチル－２－ブタノール、３，３－ジメチル－１－ブタノール、３，３－ジメチル－２－ブタノール、２－エチル－１－ブタノール、２－メチル－１－ペンタノール、２－メチル－２－ペンタノール、２－メチル－３－ペンタノール、３－メチル－１－ペンタノール、３－メチル－２－ペンタノール、３－メチル－３－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－２－ペンタノール、４－メチル－３－ペンタノール及びシクロヘキサノールが挙げられ、単独で又はそれらの組み合わせの混合溶媒を用いてもよい。

さらに塗布膜形成剤は、上記重合体と溶媒の他に、必要に応じて得られる塗布膜の性能を損ねない範囲で他の物質を添加することもできる。他の物質としては、ｐＨ調整剤、架橋剤、防腐剤、界面活性剤、基板との密着性を高めるプライマー、防カビ剤及び糖類等が挙げられる。

[0048] （基板）

上記塗布膜形成剤を塗布する基板としては、例えば、細胞の培養に一般的に用いられるシャーレ又はディッシュ、プレート、トレイが挙げられ、「基板上」とは、これらにおいて細胞又は細胞培養液などと接する面を指し、例えばシャーレ又はディッシュであれば、その底面を意味する。

[0049] また、基板の材質は、例えば、ガラス、金属、金属含有化合物若しくは半金属含有化合物、活性炭又は樹脂を挙げることができる。金属は、典型金属：（アルカリ金属：Li、Na、K、Rb、Cs；アルカリ土類金属：Ca、Sr、Ba、Ra）、マグネシウム族元素：Be、Mg、Zn、Cd、Hg；アルミニウム族元素：Al、Ga、In；希土類元素：Y、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu；スズ族元素：Ti、Zr、Sn、Hf、Pb、Th；鉄族元素：Fe、Co、Ni；土酸元素：V、Nb、Ta、クロム族元素：Cr、Mo、W、U；マンガン族元素：Mn、Re；貴金属：Cu、Ag、Au；白金族元素：Ru、Rh、Pd、Os、Ir、Pt等が挙げられる。金属含有化合物若しくは半金

属含有化合物は、例えば基本成分が金属酸化物で、高温での熱処理によって焼き固めた焼結体であるセラミックス、シリコンのような半導体、金属酸化物若しくは半金属酸化物（シリコン酸化物、アルミナ等）、金属炭化物若しくは半金属炭化物、金属窒化物若しくは半金属窒化物（シリコン窒化物等）、金属ホウ化物若しくは半金属ホウ化物等の無機化合物の成形体等の無機固体材料、アルミニウム、ニッケルチタン、ステンレス（SUS304、SUS316、SUS316L等）が挙げられる。

[0050] 樹脂としては、天然樹脂若しくはその誘導体、又は合成樹脂いずれでもよく、天然樹脂若しくはその誘導体としては、セルロース、三酢酸セルロース（CTA）、ニトロセルロース（NC）、デキストラン硫酸を固定化したセルロース等、合成樹脂としてはポリアクリロニトリル（PAN）、ポリエステル系ポリマーアロイ（PEPA）、ポリスチレン（PS）、ポリスルホン（PSF）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン（PU）、エチレンビニルアルコール（EVAL）、ポリエチレン（PE）、ポリエステル、ポリプロピレン（PP）、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリカーボネート（PC）、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、超高分子量ポリエチレン（UHPPE）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、アクリロニトリル-ブタジエンスチレン樹脂（ABS）又はテフロン（登録商標）が好ましく用いられる。本発明の細胞凝集塊製造用基板の製造では、重合体を、基板上に塗布する際に、高温での処理を要しないため、耐熱性が低い樹脂等も適用可能である。

[0051] 基板の材質は1種類であっても2種類以上の組み合わせであってもよい。これらの材質の中において、ガラス、シリコン、シリコン酸化物、ポリスチレン（PS）、ポリプロピレン（PP）、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリカーボネート（PC）、ポリ塩化ビニル（PVC）、テフロン（登録商標）、シクロオレフィンポリマ

ー（COP）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）若しくはステンレス（SUS304、SUS316、SUS316L等）単独、又はこれらから選ばれる組み合わせであることが好ましく、ガラス、ポリスチレン（PS）、ポリプロピレン（PP）、ステンレス（SUS304、SUS316、SUS316L等）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）であることが特に好ましい。

[0052] 塗布工程は、形成される複数のスポットが、基板の表面積に対するスポットの総面積の割合が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000 μ mであり、スポット間の間隔が30～1000 μ mとなるように実施され、塗布の方式としては、例えばインクジェット法、スクリーン印刷法、スリットコート法、ロール・トゥー・ロール法等を用いることができるが、好ましくはインクジェット法の印刷技術で行われる。インクジェット法で用いるインクジェット装置及びインクジェットヘッド等に特に限定はなく、上記重合体又は塗布膜形成剤の物性や液滴量等に合わせて、市販の製品より適宜選択することができる。

[0053] また、かかる方法により得られる基板上の塗布膜は、塗布工程後、乾燥工程を経ずにそのまま、あるいは水又は細胞培養に付される試料の媒質（例えば、水、緩衝液、培地等）を用いての洗浄後に、細胞凝集塊製造用基板として使用することができる。

[0054] 基板は、乾燥工程に付してもよい。乾燥工程は、大気下又は真空下にて、好ましくは、温度－200℃乃至200℃の範囲内で行なう。乾燥工程により、上記塗布膜形成剤中の溶媒を取り除くことで、基板へ完全に固着する。

[0055] 塗布膜は、例えば室温（10℃乃至35℃、好ましくは20℃乃至30℃、例えば25℃）での乾燥でも形成することができるが、より迅速に塗布膜を形成させるために、例えば40℃乃至50℃にて乾燥させてもよい。乾燥温度が－200℃未満であると、一般的ではない冷媒を使用しなければならず汎用性に欠けることと、溶媒昇華のために乾燥に長時間を要し効率が悪い。乾燥温度が200℃超であると、重合体の熱分解が生じる。より好ましい

乾燥温度は10℃乃至180℃、より好ましい乾燥温度は20℃乃至150℃である。

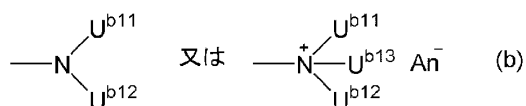
[0056] 本発明の細胞凝集塊製造用基板の塗布膜（スポット）は、以上の簡便な工程を経て製造される。

また、塗布膜に残存する不純物、未反応モノマー等を無くすために、水及び電解質を含む水溶液から選ばれる少なくとも1種の溶媒で洗浄する工程を実施してもよい。洗浄は、流水洗浄又は超音波洗浄等が望ましい。上記水及び電解質を含む水溶液は例えば40℃乃至95℃の範囲で加温されたものでもよい。電解質を含む水溶液は、PBS、生理食塩水（塩化ナトリウムのみを含むもの）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、HEPES緩衝生理食塩水及びペロナル緩衝生理食塩水が好ましく、PBSが特に好ましい。固着後は水、PBS及びアルコール等で洗浄しても塗布膜は溶出せずに基板に強固に固着したままである。

[0057] 本発明の細胞凝集塊製造用基板の塗布膜の膜厚は、最大膜厚と最小膜厚が1～1000nmの範囲であり、好ましくは5～500nmの範囲である。

[0058] 基板は、上記塗布膜の塗布・乾燥工程前に、細胞の付着抑制処理を施されたものである。細胞の付着抑制能を有する基板は、例えば公知の細胞の付着抑制能を持つコーティング膜形成用組成物（例えばWO2014/196650、WO2016/093293に記載）を塗布する工程を経て製造出来る。細胞の付着抑制能を有するコーティング膜形成組成物としては、下記式（a）で表される基を含む繰り返し単位と、下記式（b）で表される基を含む繰り返し単位とを含む共重合体（P）：

[化13]



[式中、

U_{a11} 、 U_{a12} 、 U_{b11} 、 U_{b12} 及び U_{b13} は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 A_{n-} は、ハロゲン化物イオン、無機酸イオン、水酸化物イオン及びイソチオシアネートイオンからなる群から選ばれる陰イオンを表す]

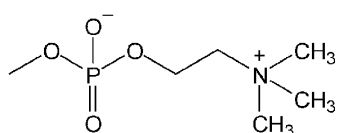
と、溶媒とを含むコーティング膜形成用組成物を容器又は基板の表面に塗布し乾燥する工程を含むことが好ましい。

本発明に係る共重合体(P)は、さらに任意の第3成分として、エチレン性不飽和モノマー、又は多糖類若しくはその誘導体が共重合していてもよい。エチレン性不飽和モノマーの例としては、(メタ)アクリル酸及びそのエステル；酢酸ビニル；ビニルピロリドン；エチレン；ビニルアルコール；並びにそれらの親水性の官能性誘導体からなる群より選択される1種又は2種以上のエチレン性不飽和モノマーを挙げることができる。多糖類又はその誘導体の例としては、ヒドロキシアルキルセルロース（例えば、ヒドロキシエチルセルロース又はヒドロキシプロピルセルロース）等のセルロース系高分子、デンプン、デキストラン、カードランを挙げることができる。

[0059] 親水性の官能性誘導体とは、親水性の官能基又は構造を有するエチレン性不飽和モノマーを指す。親水性の官能性基又は構造の例としては、ベタイン構造；アミド構造；アルキレングリコール残基；アミノ基；並びにスルフィニル基等が挙げられる。

[0060] ベタイン構造は、第4級アンモニウム型の陽イオン構造と、酸性の陰イオン構造との両性中心を持つ化合物の一価又は二価の基を意味し、例えば、ホスホリルコリン基：

[化14]

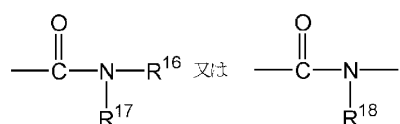


を挙げることができる。そのような構造を有するエチレン性不飽和モノマー

の例としては、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）等を挙げることができる。

[0061] アミド構造は、下記式：

[化15]



[ここで、 R^{16} 、 R^{17} 及び R^{18} は、互いに独立して、水素原子又は有機基（例えば、メチル基、ヒドロキシメチル基又はヒドロキシエチル基等）である]

で表される基を意味する。そのような構造を有するエチレン性不飽和モノマーの例としては、（メタ）アクリルアミド、N-（ヒドロキシメチル）（メタ）アクリルアミド等を挙げることができる。さらに、そのような構造を有するモノマー又はポリマーは、例えば、特開2010-169604号公報等に記載されている。

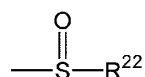
[0062] アルキレングリコール残基は、アルキレングリコール（ HO-AIk-OH ；ここでAlkは、炭素原子数1乃至10のアルキレン基である）の片側末端又は両末端の水酸基が他の化合物と縮合反応した後に残るアルキレンオキシ基（ -Alk-O- ）を意味し、アルキレンオキシ単位が繰り返されるポリ（アルキレンオキシ）基も包含する。そのような構造を有するエチレン性不飽和モノマーの例としては、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、メトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート等を挙げることができる。さらに、そのような構造を有するモノマー又はポリマーは、例えば、特開2008-533489号公報等に記載されている。

[0063] アミノ基は、式： -NH_2 、 -NHR^{19} 又は $\text{-NR}^{20}\text{R}^{21}$ [ここで、 R^{19} 、 R^{20} 及び R^{21} は、互いに独立して、有機基（例えば、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基等）である] で表される基を意味する。本発明におけるアミノ基には、4級化又は塩化されたアミノ基を包含する。その

ような構造を有するエチレン性不飽和モノマーの例としては、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-（ｔ-ブチルアミノ）エチル（メタ）アクリレート、メタクリロイルコリンクロリド等を挙げることができる。

[0064] スルフィニル基は、下記式：

[化16]



[ここで、 R^{22} は、有機基（例えば、炭素原子数1乃至10の有機基、好ましくは、1個以上のヒドロキシ基を有する炭素原子数1乃至10のアルキル基等）である]

で表される基を意味する。そのような構造を有するポリマーとして、特開2014-48278号公報等の開示された共重合体を挙げることができる。

[0065] 炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基は、上述のものと同一である。

上記コーティング膜形成用組成物は例えば、WO2014/196650に記載されているコーティング膜形成用組成物が使用できる。

上記コーティング膜形成用組成物の塗布方法としては、特に制限は無く、通常のスピコート、ディップコート、溶媒キャスト法等の塗布法が用いられる。

[0066] 上記コーティング膜の乾燥工程は、大気下又は真空下にて、温度-200℃乃至180℃の範囲内で行なう。乾燥工程により、上記コーティング膜形成用組成物中の溶媒を取り除くと共に、上記共重合体の式（a）及び式（b）同士がイオン結合を形成して基体へ完全に固着する。

[0067] 上記コーティング膜は、例えば室温（10℃乃至35℃、例えば25℃）での乾燥でも形成することができるが、より迅速にコーティング膜を形成させるために、例えば40℃乃至50℃にて乾燥させてもよい。またフリーズドライ法による極低温～低温（-200℃乃至-30℃前後）での乾燥工程を用いてもよい。フリーズドライは真空凍結乾燥と呼ばれ、通常乾燥させた

いものを冷媒で冷却し、真空状態にて溶媒を昇華により除く方法である。フリーズドライで用いられる一般的な冷媒は、ドライアイスとメタノールを混合媒体（ -78°C ）、液体窒素（ -196°C ）等が挙げられる。

[0068] 乾燥温度が -200°C 以下であると、一般的ではない冷媒を使用しなければならず汎用性に欠けることと、溶媒昇華のために乾燥に長時間を要し効率が悪い。乾燥温度が 200°C 以上であると、コーティング膜表面のイオン結合反応が進みすぎて該表面が親水性を失い、生体物質付着抑制能が発揮されない。より好ましい乾燥温度は 10°C 乃至 180°C 、より好ましい乾燥温度は 25°C 乃至 150°C である。

[0069] 乾燥後、該コーティング膜上に残存する不純物、未反応モノマー等を無くするため、さらには膜中の共重合体のイオンバランスを調節するために、水及び電解質を含む水溶液から選ばれる1以上の溶媒で流水洗浄又は超音波洗浄等で洗浄することが望ましい。上記水及び電解質を含む水溶液は例えば 40°C 乃至 95°C の範囲で加温されたものでもよい。電解質を含む水溶液は、PBS、生理食塩水（塩化ナトリウムのみを含むもの）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、HEPES緩衝生理食塩水及びペロナール緩衝生理食塩水が好ましく、PBSが特に好ましい。固着後は水、PBS及びアルコール等で洗浄してもコーティング膜は溶出せずに基体に強固に固着したままである。形成されたコーティング膜は生体物質が付着してもその後水洗等にて容易に除去することができ、上記コーティング膜が形成された基体表面は、生体物質の付着抑制能を有する。

上記コーティング膜の膜厚は、好ましくは $5\sim1000\text{nm}$ であり、さらに好ましくは $5\sim500\text{nm}$ である。

[0070] また、上記基板として、市販の細胞低接着処理済みの細胞培養皿、細胞の付着抑制能を有する細胞培養器を使用してもよい、例えば特開2008-61609号公報に記載されている細胞培養容器が使用できるが、これに限定されるものではない。

[0071] 細胞の付着抑制能を有するとは、例えばWO2016/093293の実施

例に記載した方法で行う蛍光顕微鏡によるコーティング膜無し、又は細胞低吸着処理無しと比較した場合の相対吸光度（WST O. D. 450nm）（％）（（実施例の吸光度（WST O. D. 450nm））／（比較例の吸光度（WST O. D. 450nm）））が50％以下、好ましくは30％以下、さらに好ましくは20％以下であることを意味する。

[0072]（細胞）

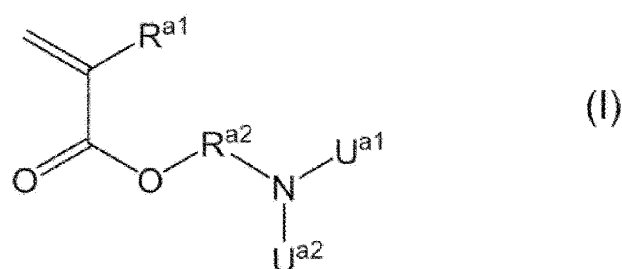
本発明における細胞とは、動物又は植物を構成する最も基本的な単位であり、その要素として細胞膜の内部に細胞質と各種の細胞小器官をもつものである。この際、DNAを内包する核は、細胞内部に含まれても含まれなくてもよい。例えば、本発明における動物由来の細胞には、精子や卵子などの生殖細胞、生体を構成する体細胞、幹細胞（多能性幹細胞等）、前駆細胞、生体から分離された癌細胞、生体から分離され不死化能を獲得して体外で安定して維持される細胞（細胞株）、生体から分離され人為的に遺伝子改変が成された細胞、生体から分離され人為的に核が交換された細胞等が含まれる。生体を構成する体細胞の例としては、以下に限定されるものではないが、線維芽細胞、骨髄細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、好中球、赤血球、血小板、マクロファージ、単球、骨細胞、骨髄細胞、周皮細胞、樹状細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経系細胞、グリア細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、星状膠細胞、心臓細胞、食道細胞、筋肉細胞（たとえば、平滑筋細胞又は骨格筋細胞）、膵臓ベータ細胞、メラニン細胞、造血前駆細胞（例えば、臍帯血由来のCD34陽性細胞）、及び単核細胞等が含まれる。当該体細胞は、例えば皮膚、腎臓、脾臓、副腎、肝臓、肺、卵巣、膵臓、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前立腺、精巣、胸腺、筋肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液（臍帯血を含む）、骨髄、心臓、眼、脳又は神経組織などの任意の組織から採取される細胞が含まれる。幹細胞とは、自分自身を複製する能力と他の複数系統の細胞に分化する能力を兼ね備えた細胞であり、その例としては、以下に限定されるも

のではないが、胚性幹細胞（E S細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（i P S細胞）、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛包幹細胞などが含まれる。多能性幹細胞としては、前記幹細胞のうち、E S細胞、胚性生殖幹細胞、i P S細胞が挙げられる。前駆細胞とは、前記幹細胞から特定の体細胞や生殖細胞に分化する途中の段階にある細胞である。癌細胞とは、体細胞から派生して無限の増殖能を獲得した細胞である。細胞株とは、生体外での人為的な操作により無限の増殖能を獲得した細胞である。これらの中でも、足場に接着することで生存及び増殖する、接着細胞が好ましく、幹細胞がより好ましい。

[0073] [細胞凝集塊の製造方法]

本発明の細胞凝集塊の製造方法は、細胞の付着抑制能を有する基板上に、下記式（I）：

[化17]



[0074] [式中、

U^{a1}及びU^{a2}は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a1}は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、R^{a2}は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体を、複数のスポット状に塗布する工程、次いで細胞を播種する工程を含み、ここで基板の表面積に対するスポットの総面積が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000μmであり、スポット間の間隔が30～1000μmである方法であり、例えば実施例に記載の

方法で行う細胞凝集塊の製造方法である。

[0075] 上記重合体は、式（Ⅰ）で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位と共に、下記式（ⅠⅠ）：

[0076] [化18]



[式中、

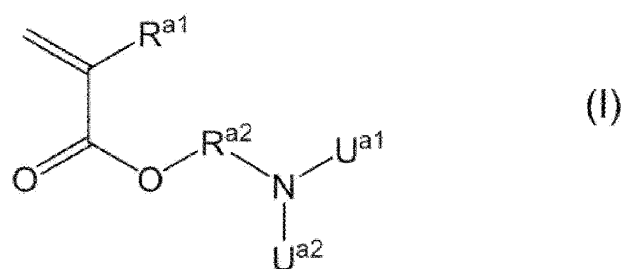
R^b は、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む共重合体であることが好ましい。

[0077] 上記方法で播種される細胞は、上記で述べたとおりであるが、接着細胞であることが好ましく、幹細胞であることがより好ましい。その他、本発明の細胞凝集塊の製造方法で用いる基板、重合体等の詳細や好ましい態様は、上記の[細胞凝集塊製造用基板及びその製造方法]で述べたとおりである。

[0078] [細胞凝集塊の製造時の細胞利用効率を向上させる方法]

本発明の細胞凝集塊の製造時の細胞利用効率を向上させる方法は、細胞の付着抑制能を有する基板上に、下記式（Ⅰ）：

[化19]



[式中、

$\text{U}^{\text{a}1}$ 及び $\text{U}^{\text{a}2}$ は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 $\text{R}^{\text{a}1}$ は、水素原子又は炭素原子数1乃至

5の直鎖若しくは分岐アルキル基を表し、 R^{a2} は、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表す]で表されるモノマーから誘導される繰り返し単位を含む重合体を、複数のスポット状に塗布することであって、基板の表面積に対するスポットの総面積が30%以上であり、かつ各スポットの直径が50～5000 μm であり、スポット間の間隔が30～1000 μm である、方法である。

[0079] 本発明の細胞凝集塊の製造時の細胞利用効率を向上させる方法はまた、で用いる基板、重合体等の詳細や好ましい態様は、上記の[細胞凝集塊製造用基板及びその製造方法]で述べたとおりである。

実施例

[0080] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0081] <分子量の測定方法>

下記合成例に示す重量平均分子量はGel Filtration Chromatography（以下、GFCと略称する）による結果である。

（測定条件）

- ・ 装置：HLC-8320GPC（東ソー（株）製）
- ・ GFCカラム：TSKgel G 6000 + 3000 PWXL-CP
- ・ 流速：1.0mL/min
- ・ 溶離液：塩含有の水／有機混合溶媒
- ・ カラム温度：40℃
- ・ 検出器：RI
- ・ 注入濃度：ポリマー固形分0.05質量%
- ・ 注入量：100 μL
- ・ 検量線：三次近似曲線
- ・ 標準試料：ポリエチレンオキサイド（Agilent社製）×10種

[0082] <合成例1>熱重合による細胞培養の塗布膜形成剤として使用するポリマーの製造（1）

メタクリル酸 2-（ジメチルアミノ）エチル（東京化成工業（株）製） 10.00g にテトラヒドロフラン 41.94g を加え十分に溶解した。次いでジメチル 1, 1'-アゾビス（1-シクロヘキサンカルボキシレート）（VE-073、富士フイルム和光純薬（株）製） 0.01g、メタクリル酸（東京化成工業（株）製） 0.48g、ポリエチレングリコールジメタクリレート（ $n \approx 4$ ）（東京化成工業（株）製） 0.21g を、20℃以下に保ちながら、上記テトラヒドロフラン溶液に加えた。十分に攪拌して均一となった上記全てのものが入った混合液を冷却管付きの 3 つ口フラスコに加えて窒素フローし、攪拌しながらリフラックス温度まで昇温した。24 時間上記環境を維持した状態で加熱攪拌することで重合体が反応生成物として得られた。反応生成物を貧溶媒であるヘキサンで再沈殿させ、析出物を濾過により回収し減圧乾燥させた。得られた粉末を純水に溶解させ、溶液を透析チューブに移した。透析を 72 時間行い、反応生成物を精製した。

反応生成物を含む溶液をグラスファイバー製の 1.0 μm フィルター（アズワン（株）製、型番：SYGF0605MNXX104）で濾過し、得られた濾液を凍結乾燥させることにより、ポリマーが得られた。GPC によるこのポリマーの重量平均分子量は 660,000、多分散度は 3.8 であった（以下、「合成例ポリマー 1」と称す）。

[0083] <合成例 2> 熱重合による細胞培養の塗布膜形成剤として使用するポリマーの製造（2）

メタクリル酸 2-（ジメチルアミノ）エチル（東京化成工業（株）製） 10.00g にエタノール 31.46g を加え十分に溶解した。次いでジメチル 1, 1'-アゾビス（1-シクロヘキサンカルボキシレート）（VE-073、富士フイルム和光純薬（株）製） 0.01g、メタクリル酸（東京化成工業（株）製） 0.48g、ポリエチレングリコールジメタクリレート（ $n \approx 4$ ）（東京化成工業（株）製） 0.21g を、20℃以下に保ちながら、上記エタノール溶液に加えた。十分に攪拌して均一となった上記全てのものが入った混合液を冷却管付きの 3 つ口フラスコに加えて窒素フローし、攪拌しな

がらリフラックス温度まで昇温した。4時間上記環境を維持した状態で加熱攪拌することで重合体が反応生成物として得られた。反応生成物を貧溶媒であるヘキサンで再沈殿させ、析出物を濾過により回収し減圧乾燥させた。得られた粉末を純水に溶解させ、溶液を透析チューブに移した。透析を72時間行い、反応生成物を精製した。

反応生成物を含む溶液をグラスファイバー製の1.0 μm フィルター（アズワン（株）製、型番：SYGF0605MNXX104）で濾過し、得られた濾液を凍結乾燥させることにより、ポリマーが得られた。GPCによるこのポリマーの重量平均分子量は770,000、多分散度は4.1であった（以下、「合成例ポリマー2」と称す）。

[0084] <合成例3>熱重合による細胞培養の塗布膜形成剤として使用する蛍光標識ポリマーの製造（3）

メタクリル酸2-（ジメチルアミノ）エチル（東京化成工業（株）製）10.00gにエタノール31.46gを加え十分に溶解した。次いでジメチル1,1'-アゾビス（1-シクロヘキサンカルボキシレート）（VE-073、富士フイルム和光純薬（株）製）0.01g、メタクリル酸（東京化成工業（株）製）0.48g、アクアリルアミド（東京化成工業（株）製）0.26g、ポリエチレングリコールジメタクリレート（ $n \approx 4$ ）（東京化成工業（株）製）0.21gを、20℃以下に保ちながら、上記エタノール溶液に加えた。十分に攪拌して均一となった上記全てのものが入った混合液を冷却管付きの3つ口フラスコに加えて窒素フローし、攪拌しながらリフラックス温度まで昇温した。4時間上記環境を維持した状態で加熱攪拌することで重合体が反応生成物として得られた。反応生成物を貧溶媒であるヘキサンで再沈殿させ、析出物を濾過により回収し減圧乾燥させた。得られた粉末0.1gを純水9.9mLに溶解した。1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（東京化成工業（株）製）0.003gを純水2.4mLに溶解し、上記で調製した溶液に加えて攪拌し混合した。Alexa Fluor（商標）488 Carboxylic Acid, tris(triethylammonium)salt（サーモフィッシュヤ

ーサイエンティフィック（株）製）0.005gをジメチルスルホキシド（純正化学（株）製）0.6mLに加えて溶解させた混合物を上記で調製した溶液に滴下した。室温で12時間攪拌し反応を進行させた。得られた反応溶液を透析チューブに移した。透析を72時間行い、反応生成物を精製した。

反応生成物を含む溶液をグラスファイバー製の1.0 μ mフィルター（アズワン（株）製、型番：SYGF0605MNXX104）で濾過し、得られた濾液を凍結乾燥させることにより、ポリマーが得られた。GFCによるこのポリマーの重量平均分子量は900,000、多分散度は5.5であった（以下「合成例ポリマー3」と称す）。

[0085] <試験例1>（ポリマーの ^1H -NMR測定による組成解析）

合成例ポリマー1～3の核磁気共鳴スペクトル（NMR）を、核磁気共鳴装置（BRUKER社製、型番：ASCEND500）を用いて、重水（ D_2O ）を標準物質として測定した。下記には、合成例ポリマー1～2に共通する代表的なピークを示す。

[0086] ^1H -NMR (in D_2O) δ 0.8-1.2 (br, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 1.6-2.0 (br, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 2.2-2.4 (br, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.5-2.7 (br, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.0-4.2 (br, $-\text{O}-\text{CH}_2-$).

[0087] ここで、主鎖のメチル基 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$ （ δ 0.8-1.2）のプロトン数（DMAEMAのホモポリマーの場合はモノマー1分子につき3個）Aと、側鎖の $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 基（ δ 4.0-4.2）のメチルプロトン数（DMAEMAのホモポリマーの場合はモノマー1分子につき2個）Bとから、側鎖が有するアミノ基の官能基数と、側鎖のカルボキシル基の官能基数との比を算出した。

その結果、合成例1の場合は89/11、合成例2の場合は90/10、合成例3の場合は84/16、となった。詳細な結果を表1に示す。

合成例1～3で合成したポリマーについて、GFCで測定した重量平均分子量Mw、分子量分布（PDI：Mw/Mn）を表1に示す。

[0088]

[表1]

	仕込み比	組成比(NMR in D2O)	Mw ($\times 10^{-4}$)	Mw/Mn
	DM/MA/PEGDMA	DM/MA		
合成例1	92/8/2	89/11	66	3.8
合成例2	92/8/2	90/10	77	4.1
合成例3	92/8/2	84/16	90	5.5

[0089] <実施例1：インクジェットによる塗布膜形成と直径の制御>

(1) 細胞低接着シャーレの調製

WO 2014 / 1 9 6 6 5 0 の実施例 3 0 に記載の製造方法に従って、共重合体含有ワニスからコーティング溶液を調製した。調製したコーティング溶液を、 ϕ 4 0 mm アズノールシャーレ（アズワン（株）製、#1-8549-01）に 5 0 0 μ L ずつ添加し、室温にて 1 時間静置後、過剰のコーティング溶液を除去した。その後、滅菌水を 1 ウェルあたり 2 mL 添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 3 0 分乾燥させて細胞低接着シャーレを得た。

[0090] (2) インクジェットによる塗布膜形成と直径の制御

合成例ポリマー 3 を滅菌水で 1 0 0 ng / μ L の濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤 3 を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：500-S-C）を用いて、上記で調製した細胞低接着シャーレに 5 5 nL、1 6 5 nL、3 3 0 nL、6 6 0 nL、1 3 2 0 nL と液滴量（吐出発数）を制御しながら塗布膜形成剤 3 をスポット状に塗布した。各塗布量で 5 点以上塗布した。室温で 3 0 分間乾燥させて膜を形成させた。純水 2 mL を添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 3 0 分乾燥させて細胞凝集塊形成用シャーレを得た。得られたシャーレを蛍光顕微鏡（オリンパス（株）製：型番 IX-83）にて蛍光観察し、膜が形成出来ているかを確認した。結果を図 1（a）に示す。

図 1（a）に示すように塗布膜形成剤を塗布した部分が円形に光っておりインクジェットにより塗布膜（スポット）が形成できることが示された。ま

た図1（b）及び表2に示すように、液滴量が増加するにつれて塗布膜の円の直径が増加した。インクジェット装置を用いて細胞培養下地材料を塗布することで、スポット状の塗布膜のサイズを制御できることが示された。

[0091] [表2]

塗布量 (nL)	直径 (mm)	面積 (mm ²)
55	0.84	0.55
165	1.03	0.83
330	1.35	1.43
660	1.77	2.46
1320	2.22	3.87

[0092] <実施例2：インクジェットによる高密度塗布膜の形成とスポット密度の定量>

合成例ポリマー3を滅菌水で100 ng/μLの濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤3を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：IJ HB-1000）を用いて、実施例1（1）で調製した細胞低接着シャーレに950 μLずつ300 μm間隔で塗布膜形成剤3をスポット状に塗布した。室温で30分間乾燥させて膜を形成させた。純水2 mLを添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに2回洗浄を行い、室温で30分乾燥させて高密度塗布した細胞凝集塊形成用シャーレを得た。得られたシャーレを蛍光顕微鏡（オリンパス（株）製：型番IX-83）にて蛍光観察した。

図2（a）に示すように、塗布膜形成剤を塗布した部分が円形に光っておりインクジェットにより高密度で塗布膜（スポット）が形成できることが示された。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は44%であった。

[0093] <比較例1：インクジェットによる低密度塗布膜の形成とスポット密度の定量>

合成例ポリマー3を滅菌水で100 ng/μLの濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤3を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：50

0-S-C) を用いて、実施例 1 (1) で調製した細胞低接着シャーレに 55 nL ずつ 2 mm 間隔で塗布膜形成剤 3 をスポット状に塗布した。室温で 30 分間乾燥させて膜を形成させた。純水 2 mL を添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 30 分乾燥させて細胞凝集塊形成用シャーレを得た。得られたシャーレを蛍光顕微鏡 (オリンパス (株) 製: 型番 IX-83) にて蛍光観察した。

図 2 (b) に示すように、塗布膜形成剤 3 を塗布した部分が円形に光っておりインクジェットにより塗布膜 (スポット) が形成できることが示された。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は 15 % であった。

[0094] <実施例 3: サイズ制御された細胞凝集塊製造試験>

(1) 細胞凝集塊形成用シャーレの調製

合成例ポリマー 2 を滅菌水で 100 ng/μL の濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤 2 を製造した。インクジェット装置 ((株) マイクロジェット製、型番: LaboJet-600)、及びインクジェットヘッド (型番: 500-S-C) を用いて、実施例 1 (1) で調製した細胞低接着シャーレに 55 nL、165 nL、330 nL、660 nL、1320 nL と液滴量 (吐出発数) を制御しながら塗布膜形成剤 2 をスポット状に塗布した。各塗布量で 5 点以上塗布した。室温で 30 分間乾燥させて膜を形成させた。純水 2 mL を添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 30 分乾燥させて細胞凝集塊形成用シャーレを得た。

[0095] (2) 細胞の調製

細胞は、マウス胎児線維芽細胞 (C3H10T1/T2細胞: DSファーマバイオメディカル (株) 製) を用いた。細胞の培養には、基礎培地となる BME 培地 (Gibco 社製) に対し FBS (Sigma-Aldrich 社製) を 10%、Glutamine/Penicillin/Streptomycin (Gibco 社製) を 1% となるように添加した培地を用いた。細胞は、37℃/CO₂ インキュベーター内にて 5% 二酸化炭素濃度を保った状態で、直径 10 cm のシャーレ (培地 10 mL) を用いて 2 日間以上静置培養した。引き続き、本細胞を PBS 溶液 (富士フイルム和光純薬 (株))

製) 3 mLで洗浄した後、トリプシン-EDTA溶液 (PromoCell社製) 3 mLを添加して室温で3分間静置し細胞を剥離した。上記培地を7 mL添加して細胞を回収した。本懸濁液を遠心分離 ((株) トミー精工製、型番LC-230、 $200 \times g$ /3分、室温) 後、上清を除き、上記の培地を添加して細胞懸濁液を調製した。

[0096] (3) 細胞接着実験

上記(1)にて調製したシャーレに対して、細胞懸濁液を 3.0×10^5 cells/cm²となるように各500 μ L加えた。その後、5%二酸化炭素濃度を保った状態で、37°C/CO₂インキュベーター内にて4時間静置した。静置後、非接着細胞と培地を除去し、PBSで洗浄することで接着細胞のみをウェル上へ残した。洗浄後、新しい培地を500 μ L/well添加し、倒立型リサーチ顕微鏡IX83 (オリンパス (株) 製) を用いて接着細胞の様子を観察、撮影した。その結果、図3(a)に示すように、細胞培養の塗布膜形成剤2をコーティングした箇所 (スポット) への細胞の接着が確認された。さらに液滴量が多くなると細胞の接着面積も大きくなることが分かった。

[0097] (4) 細胞凝集塊の観察

上記にて試験したシャーレを37°C/CO₂インキュベーター内にてさらに44時間静置した。静置後、倒立型リサーチ顕微鏡IX83 (オリンパス (株) 製) を用いて、細胞の様子を観察した。その結果、図3(a)に示すように細胞培養の塗布膜形成剤2に接着した細胞がシャーレから剥がれて凝集し、細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成していることが確認された。

また塗布量と塗布面積とスフェロイド直径の関係を図3(b)及び表3に示す。塗布量が大きくなるほど塗布面積が大きくなり、得られるスフェロイドサイズが大きくなることが示された。またn=5で評価したところサイズ誤差は3.5~8.4%となった。このことから、本発明のポリマーを含む塗布膜は、インクジェット装置と組み合わせて塗布量を制御することで、任意のサイズのスフェロイドを小さなサイズ誤差で形成する塗布膜として有用であることが示された。

[0098] [表3]

塗布量 (nL)	塗布面積 (mm ²)	誤差 (mm ²)	スフェロイド直径 の平均値 (μm)	誤差 (μm)	誤差 (%)
55	0.5	0.09	181	11	6.0
165	1.07	0.03	250	10	3.8
330	1.91	0.19	327	27	8.4
660	3.41	0.21	368	13	3.5
1320	5.6	0.47	449	27.4	6.1

[0099] <実施例4：高密度塗布による細胞接着確認試験>

(1) 細胞凝集塊形成用シャーレの調製

合成例ポリマー2を滅菌水で100ng/μLの濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤2を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：IJ HB-1000）を用いて、実施例1（1）で調製した細胞低接着シャーレに900～950μLずつ300μm間隔で塗布膜形成剤2をスポット状に塗布した。室温で30分間乾燥させて膜を形成した。純水2mLを添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに2回洗浄を行い、室温で30分乾燥させて高密度塗布した細胞凝集塊形成用シャーレを得た。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は、52%であった。

[0100] (2) 細胞接着実験

上記（1）にて調製したシャーレに対して、実施例3（1）にて調製した細胞懸濁液を $3.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ となるように500μL加えた。その後、5%二酸化炭素濃度を保った状態で、37℃/CO₂インキュベーター内にて4時間静置した。洗浄工程を経ずに倒立型リサーチ顕微鏡IX83（オリンパス（株）製）を用いて接着細胞の様子を観察、撮影した。その結果、図4（a）に示すように、細胞培養の塗布膜形成剤2をコーティングした箇所（スポット）への細胞の接着が確認された。また接着せずに浮遊している細胞は存在しなかった。

[0101] <比較例2：低密度塗布膜での細胞接着確認試験>

(2-1. 細胞凝集塊形成用シャーレの調製)

合成例ポリマー 2 を滅菌水で $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ の濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤 2 を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：500-S-C）を用いて、実施例 1（1）で調製した細胞低接着シャーレに 55 nL ずつ 2 mm 間隔で塗布膜形成剤 2 をスポット状に塗布した。室温で 30 分間乾燥させて膜を形成させた。純水 2 mL を添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 30 分乾燥させて細胞凝集塊形成用シャーレを得た。シャーレの底面積に対するスポットの総面積の割合は、 15% であった。

[0102] （2）細胞接着実験

上記（1）にて調製したシャーレに対して、実施例 3（1）にて調製した細胞懸濁液を $3.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ となるように $500\text{ }\mu\text{L}$ 加えた。その後、 5% 二酸化炭素濃度を保った状態で、 $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ インキュベーター内にて 2 時間静置した。洗浄工程を経ずに倒立型リサーチ顕微鏡 IX83（オリンパス（株）製）を用いて接着細胞の様子を観察、撮影した。その結果、図 4（b）に示すように、細胞培養の塗布膜形成剤 2 をコーティングした箇所（スポット）への細胞の接着、及びその他多数の浮遊細胞が確認された。

[0103] <実施例 5：高密度塗布による細胞凝集塊製造試験>

（1）細胞凝集塊形成用シャーレの調製

合成例ポリマー 1 を滅菌水で $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ の濃度となるように溶解させ、細胞培養の塗布膜形成剤 1 を製造した。インクジェット装置（（株）マイクロジェット製、型番：LaboJet-600）、及びインクジェットヘッド（型番：IJHB-1000）を用いて、実施例 1（1）で調製した細胞低接着シャーレに 950 pL ずつ $300\text{ }\mu\text{m}$ 間隔で塗布膜形成剤 1 をスポット状に塗布した。室温で 30 分間乾燥させて膜を形成した。純水 2 mL を添加後、除去して洗浄を行った。同様にさらに 2 回洗浄を行い、室温で 30 分乾燥させて高密度塗布した細胞凝集塊形成用シャーレを得た。

（2）細胞接着実験

上記（１）にて調製したシャーレに対して、実施例３（１）にて調製した細胞懸濁液を $3.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ となるように $500 \mu\text{L}$ 加えた。その後、 37°C 、 5% 二酸化炭素濃度を保った状態で、倒立型リサーチ顕微鏡IX83（オリンパス（株）製）にて培養しながらタイムラプスにて細胞接着及び凝集の様子を観察した。その結果、図５に示すように、播種直後は全面に分散していた細胞が、細胞培養の塗布膜形成剤１をコーティングした箇所（スポット）へ経時的に接着することが確認された。２時間後の時点では、接着せずに浮遊している細胞は存在しなかった。さらに８時間後の時点では接着した細胞がシャーレから剥がれて凝集し、細胞凝集塊（スフェロイド）を形成していることが確認された

産業上の利用可能性

[0104] 以上のことから、本発明に係る重合体を含む塗布膜を、インクジェット装置と組み合わせて、細胞の付着抑制能を有する基板（例えば、細胞低接着シャーレ）上に高密度にスポット状に塗布することで、播種細胞を全てスポットに接着させて凝集化させることが出来ることが示された。つまりスフェロイド形成用のマルチウェルプレート等を用いることなく、シャーレ又はディッシュの底面やプレート表面等の細胞の付着抑制能を有する基板上に、本発明に係る重合体からなる複数のスポットを高密度で備える、本発明の細胞凝集塊製造用基板を用いることにより、塗布膜（スポット）を有する基板平面上に細胞を播種するだけで、均一なサイズのスフェロイドを形成できることのみならず、スフェロイドの製造時に播種した細胞の利用効率も向上することが示された。