

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6911852号
(P6911852)

(45) 発行日 令和3年7月28日(2021.7.28)

(24) 登録日 令和3年7月12日(2021.7.12)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 M	1/14	(2006.01)	C 1 2 M 1/14
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C O 8 F	220/12	(2006.01)	C O 8 F 220/12
C O 8 F	220/26	(2006.01)	C O 8 F 220/26
C O 8 F	220/34	(2006.01)	C O 8 F 220/34

請求項の数 5 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-523873 (P2018-523873)	(73) 特許権者	000003986 日産化学株式会社 東京都中央区日本橋二丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成29年6月9日(2017.6.9)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/021508	(72) 発明者	広井 佳臣 千葉県船橋市鈴身町488番地6 日産化学株式会社 材料科学研究所内
(87) 国際公開番号	W02017/217336	(72) 発明者	中嶋 宏之 埼玉県白岡市白岡1470 日産化学株式会社 生物科学研究所内
(87) 国際公開日	平成29年12月21日(2017.12.21)	(72) 発明者	西野 泰斗 埼玉県白岡市白岡1470 日産化学株式会社 生物科学研究所内
審査請求日	令和2年3月13日(2020.3.13)		
(31) 優先権主張番号	特願2016-118976 (P2016-118976)		
(32) 優先日	平成28年6月15日(2016.6.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

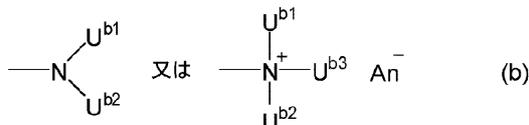
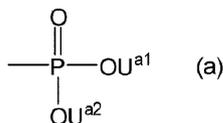
(54) 【発明の名称】凍結保存用容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

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：

【化1】



(式中、
U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及びU^{b3}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を、容器の表面の少なくとも一部に備える、細胞又はタンパク質の凍結保存用の、凍結保護剤耐性容器。

【請求項 2】

上記共重合体が、さらに下記式 (c) :

【化 2】



[式中、

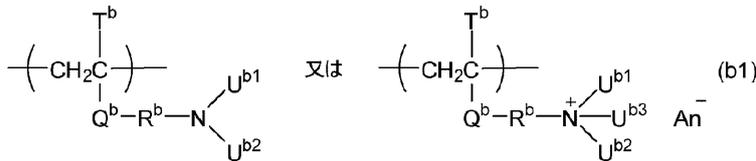
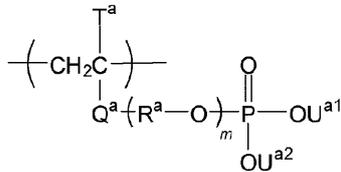
R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基 (ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい) を表す]

で表される基を含む繰り返し単位を含む、請求項 1 に記載の容器。

【請求項 3】

上記共重合体が、下記式 (a1) 及び (b1) :

【化 3】



[式中、

T^a 及び T^b 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 ;

Q^a 及び Q^b は、それぞれ独立して、単結合、エステル結合又はアミド結合を表し ;

R^a 及び R^b は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 10 の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し ;

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2} 及び U^{b3} 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し ;

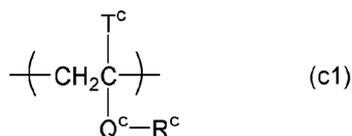
m は、0 乃至 6 の整数を表す]

で表される繰り返し単位を含む、請求項 1 に記載の容器。

【請求項 4】

上記共重合体が、さらに下記式 (c1) :

【化 4】



10

20

30

40

50

[式中、

T[○] 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；

Q[○] は、単結合、エーテル結合又はエステル結合を表し；

R[○] は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表す]

で表される繰り返し単位を含む、請求項 2 に記載の凍結保存用容器。

10

【請求項 5】

凍結保護剤が、エチレングリコール、プロパンジオール、メタノール、エタノール、ジメチルアセトアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン、アルブミン、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクタアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミド、アセトニトリル、アセトン及びジメチルスルホキシドからなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の容器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞又はタンパク質の凍結保存用容器に関する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、バイオ医薬品や再生医療への注目が高まり、研究・開発が盛んに行われている。それに伴い、その過程で得られた細胞やタンパク質を長期間にわたって、安定に保存するための種々の技術開発もまた盛んに行われている。

【0003】

凍結保存は、細胞やタンパク質を長期間にわたって、安定に保存する標準的な技術である。例えば、細胞を凍結保存する方法として、緩慢凍結法や急速凍結法が知られている。緩慢凍結法は、低濃度のジメチルスルホキシドやグリセロールなどの凍結保護剤を添加した細胞懸濁液を緩慢に冷却、凍結する方法である。凍結保護剤により、細胞内外の水分の急激な結晶化を抑制し、細胞の損傷を防ぐことができる。一方、急速凍結法は、高濃度の凍結保護剤を添加した細胞懸濁液を急速に冷却、凍結する方法である。水を結晶化させずにガラス状態で固化、凍結させることにより、細胞の損傷を防ぐことができる。急速凍結法に用いられる凍結保護剤は、例えば、高濃度のジメチルスルホキシド、アセトアミド及びプロピレングリコールの組み合わせを挙げることができる。さらに、容器や手順を改良した凍結保存方法が種々報告されている。

30

【0004】

緩慢凍結法や急速凍結法では、凍結保護剤の浸透圧による細胞への毒性を回避するために、特に融解の際には迅速な操作が必要となる。この毒性を回避するための細胞の凍結方法として、凍結保護剤を希釈するために、融解した細胞に新鮮な媒体を新たに組み込む必要性を回避する、細胞を凍結融解する方法が提案されている。具体的には、凍結保護剤を含んでいる凍結細胞溶液に加えて、媒体又は希釈物の更なる層を予め凍結することによって、二重層の凍結物を得る工程を包む方法が報告されている（例えば、特許文献 1 参照）。

40

【0005】

また、細胞を凍結保存するための方法として、ポリリジンでプレコーティングされたマイクロタイタープレートを用いて細胞を凍結保存する方法が開示されている。ポリリジンは、従前、プラスチック及びガラス表面への細胞付着を増進させるコーティングとして用いられていたが、かかる細胞付着とは独立のプロセスによって、長期保存後でさえ融解に

50

際してアッセイ性能を改善すること、またマイクロタイタープレートを用いて細胞を凍結保存することにより、操作を簡便にすることができる旨が報告されている（例えば、特許文献2参照）。

【0006】

なお、マイクロタイタープレートなどの細胞培養容器やテストチューブなどの凍結保存容器は、細胞低接着性処理が行われていることが好ましい。そのような細胞低接着性処理として、例えば、300乃至500nmの波長の光の照射により均一な被覆層が形成でき、細胞の接着量を低減して細胞塊の成長効率を向上できることから、感光性の官能基としてアジド基を有する水溶性樹脂を用いた被覆層の形成が報告されている（例えば、特許文献3参照）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特表2014-502610号公報

【特許文献2】特表2012-512637号公報

【特許文献3】国際公開第2015/178413号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

凍結保存容器にもまた、細胞又はタンパク質の付着抑制能を有するコーティングが付されることが望ましい。しかしながら、凍結保存容器に付されるコーティングには、水系溶媒への耐性だけでなく、有機溶剤（例えば、凍結保護剤、特に、ジメチルスルホキシド）への耐性も必要となるが、これらを併せ持つコーティングを備える凍結保存容器は報告されていない。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、特定のアニオン構造と、特定のカチオン構造と、場合により特定の疎水性構造とを含む共重合体を含むコーティングを、容器の表面の少なくとも一部に備える細胞又はタンパク質の凍結保存用容器が、優れた溶剤（例えば、凍結保護剤、特に、ジメチルスルホキシド）耐性と共に、優れた細胞又はタンパク質の付着抑制能を有することを見出し、本発明を完成させた。

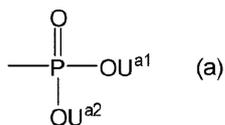
30

本発明は以下のとおりである。

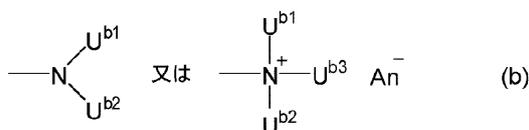
【0010】

[1] 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：

【化1】



40



（式中、

U^{a1} 、 U^{a2} 、 U^{b1} 、 U^{b2} 及び U^{b3} 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

50

オンを表す)

を含むコーティングを、容器の表面の少なくとも一部に備える、細胞又はタンパク質の凍結保存用容器。

【0011】

[2] 上記共重合体が、さらに下記式(c)：

【化2】



[式中、

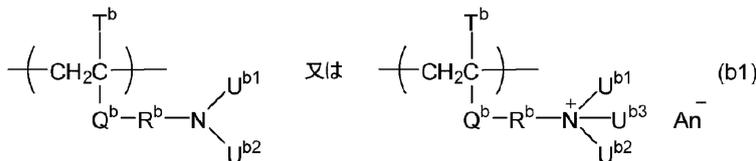
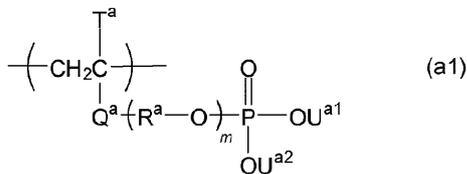
R^cは、炭素原子数1乃至18の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数3乃至10の環式炭化水素基、炭素原子数6乃至10のアリール基、炭素原子数7乃至15のアラルキル基又は炭素原子数7乃至15のアリールオキシアルキル基(ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい)を表す]

で表される基を含む繰り返し単位を含む、上記[1]に記載の容器。

【0012】

[3] 上記共重合体が、下記式(a1)及び(b1)：

【化3】



[式中、

T^a及びT^b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；

Q^a及びQ^bは、それぞれ独立して、単結合、エステル結合又はアミド結合を表し；

R^a及びR^bは、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し；

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}及びU^{b3}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し；

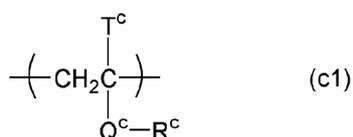
mは、0乃至6の整数を表す]

で表される繰り返し単位を含む、上記[1]に記載の容器。

【0013】

[4] 上記共重合体が、さらに下記式(c1)：

【化4】



10

20

30

40

50

[式中、

T^c 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；

Q^c は、単結合、エーテル結合又はエステル結合を表し；

R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表す]

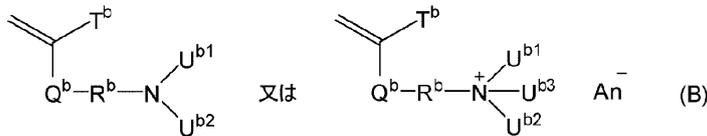
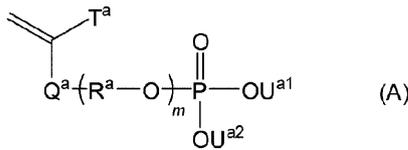
10

で表される繰り返し単位を含む、上記 [2] に記載の容器。

【 0 0 1 4 】

[5] 上記共重合体が、下記式 (A) 及び (B) :

【 化 5 】



20

[式中、

T^a、T^b、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2} 及び U^{b3} 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；

Q^a 及び Q^b は、それぞれ独立して、単結合、エステル結合又はアミド結合を表し；

R^a 及び R^b は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 10 の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し；

30

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し；

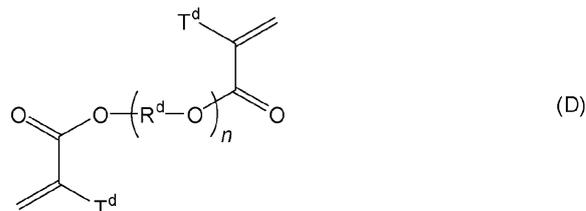
m は、0 乃至 6 の整数を表す]

で表される化合物を含むモノマー混合物を重合させることにより得られる、上記 [1] に記載の容器。

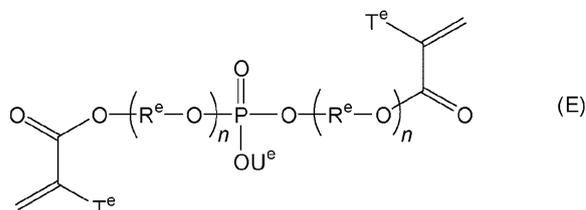
【 0 0 1 5 】

[6] 上記共重合体が、さらに下記式 (D) 又は (E) :

【 化 6 】



40



50

[式中、

T^d 、 T^e 及び U^e 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；

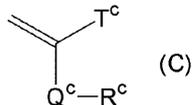
R^d 及び R^e は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 10 の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し； n は、1 乃至 6 の整数を表す]

で表される化合物を含むモノマー混合物を重合させることにより得られる、上記 [5] に記載の容器。

【 0 0 1 6 】

[7] 上記共重合体が、さらに下記式 (C) :

【 化 7 】



10

[式中、

T^c 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；

Q^c は、単結合、エーテル結合又はエステル結合を表し；

R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 14 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 14 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表わす]

で表される化合物を含むモノマー混合物を重合させることにより得られる、[5] 又は [6] に記載の容器。

【 0 0 1 7 】

[8] 前記コーティングが凍結保護剤に耐性を有する、上記 [1] 乃至 [7] のいずれかに記載の容器。

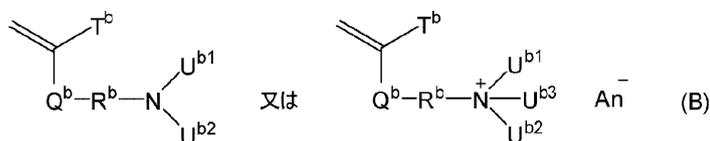
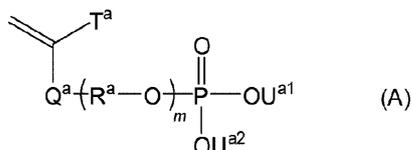
【 0 0 1 8 】

[9] 前記凍結保護剤が、エチレングリコール、プロパンジオール、メタノール、エタノール、ジメチルアセトアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン、アルブミン、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクタアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミド、アセトニトリル、アセトン及びジメチルスルホキシドからなる群より選ばれる、上記 [8] に記載の容器。

【 0 0 1 9 】

[1 0] 下記式 (A) 及び (B) :

【 化 8 】



30

40

50

は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい)を表わす]

で表される化合物を含む、[1 0] 又は [1 1] に記載の製造方法。

【発明の効果】

【 0 0 2 2 】

本発明の細胞又はタンパク質の凍結保存用容器は、特定のアニオン構造と、特定のカチオン構造と、場合により特定の疎水性構造とを含む共重合体を含むコーティングを、容器の表面の少なくとも一部に備えることにより、優れた細胞又はタンパク質の付着抑制能を有する。したがって、本発明の細胞又はタンパク質の凍結保存用容器は、容器に収容される懸濁液又は溶液に含まれる細胞又はタンパク質が、凍結、保存、融解の各工程において容器の表面（細胞又はタンパク質を含む懸濁液又は溶液と接触し得る表面）に付着することがないので、懸濁液又は溶液から細胞又はタンパク質を効率よく回収することができる。また、前記共重合体は、プラスチックなどの樹脂やステンレス等の金属との密着性がよく、容器の表面の少なくとも一部に、容易にコーティングを形成することができる。さらに、前記コーティングは、水系溶媒への耐性に優れるだけでなく、有機溶剤（例えば、凍結保護剤、特に、ジメチルスルホキシド）への耐性にも優れることから、細胞又はタンパク質の凍結、保存、融解の各工程において安定であり、細胞又はタンパク質に悪影響を及ぼすことが無い。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】実施例 1 のコーティングチューブ、非コーティングチューブ及び比較例のチューブを、試験例 4 に従いジメチルスルホキシド（DMSO、0、10、50 及び 100%）で処理後、タンパク質付着量を測定した結果を示したグラフである。

20

【図 2】実施例 1 のコーティングチューブ、非コーティングチューブ及び比較例のチューブを、試験例 4 に従いアセトニトリル（ACN、0、10、50 及び 100%）で処理後、タンパク質付着量を測定した結果を示したグラフである。

【図 3】実施例 1 のコーティングチューブ、非コーティングチューブ及び比較例のチューブを、試験例 4 に従いアセトン（ACT、0、10 及び 50%）で処理後、タンパク質付着量を測定した結果を示したグラフである。

【図 4】実施例 1 のコーティングチューブ、非コーティングチューブ及び比較例のチューブを、試験例 4 に従いメタノール（MeOH、0、10 及び 50%）で処理後、タンパク質付着量を測定した結果を示したグラフである。

30

【図 5】実施例 1 のコーティングチューブ、非コーティングチューブ及び比較例のチューブを、試験例 4 に従いエタノール（EtOH、0、10 及び 50%）で処理後、タンパク質付着量を測定した結果を示したグラフである。

【図 6】実施例 2 のコーティングチューブ、及び非コーティングチューブを、試験例 5 に従いタンパク質保管試験に付し、タンパク質回収量を測定した結果を示したグラフである。

【図 7】実施例 3 のコーティングバイアルを、試験例 6 に従い細胞保管試験に付し、保管前後の細胞数を測定した結果を示したグラフである。

40

【図 8】実施例 4 のコーティングステンレス保存容器、及び非コーティングステンレス保存容器を、試験例 7 のタンパク質付着量評価試験に付し、その結果を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 4 】

用語の説明

本発明において用いられる用語は、他に特に断りのない限り、以下の定義を有する。

【 0 0 2 5 】

本発明において、「ハロゲン原子」は、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子を意味する。

50

【0026】

本発明において、「アルキル基」は、直鎖若しくは分岐の、飽和脂肪族炭化水素の1個の基を意味する。「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。「炭素原子数1乃至18の直鎖若しくは分岐アルキル基」としては、上記炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基の例に加え、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基又はオクタデシル基、あるいはそれらの異性体が挙げられる。同様に「炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキル基」としては、「炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基」の例に加え、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、あるいはそれらの異性体が挙げられる。

10

【0027】

本発明において、「ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基」は、上記炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を意味するか、あるいは1以上の上記ハロゲン原子で置換された上記炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基を意味する。「炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基」の例は、上記のとおりである。一方「1以上のハロゲン原子で置換された炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基」は、上記炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基の1以上の任意の水素原子が、ハロゲン原子で置き換えられているものを意味し、例としては、フルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、クロロメチル基、ジクロロメチル基、トリクロロメチル基、プロモメチル基、ヨードメチル基、2,2,2-トリフルオロエチル基、2,2,2-トリクロロエチル基、ペルフルオロエチル基、ペルフルオロブチル基、又はペルフルオロペンチル基等が挙げられる。

20

【0028】

本発明において、「エステル結合」は、 $-C(=O)-O-$ 若しくは $-O-C(=O)-$ を意味し、「アミド結合」は、 $-NH-C(=O)-$ 若しくは $-C(=O)NH-$ を意味し、「エーテル結合」は、 $-O-$ を意味する。

30

【0029】

本発明において、「ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基」は、炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基、あるいは1以上のハロゲン原子で置換された炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基を意味する。ここで、「アルキレン基」は、上記アルキル基に対応する2個の有機基を意味する。「炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基」の例としては、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、ヘキサメチレン基、オクタメチレン基及びデカメチレン基等が挙げられ、これらの中で、エチレン基、プロピレン基、オクタメチレン基及びデカメチレン基が好ましく、例えば、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基等の炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキレン基がより好ましく、特にエチレン基又はプロピレン基が好ましい。「1以上のハロゲン原子で置換された炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基」は、上記アルキレン基の1以上の任意の水素原子が、ハロゲン原子で置き換えられているものを意味し、特に、エチレン基又はプロピレン基の水素原子の一部又は全部がハロゲン原子で置き換えられているものが好ましい。

40

【0030】

50

本発明において、「炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基」は、炭素原子数 3 乃至 10 の、単環式若しくは多環式の、飽和若しくは部分不飽和の、脂肪族炭化水素の 1 価の基を意味する。この中でも、炭素原子数 3 乃至 10 の、単環式若しくは二環式の、飽和脂肪族炭化水素の 1 価の基が好ましく、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基又はシクロヘキシル基等の炭素原子数 3 乃至 10 のシクロアルキル基、あるいはピシクロ[3.2.1]オクチル基、ボルニル基、イソボルニル基等の炭素原子数 4 乃至 10 のピシクロアルキル基が挙げられる。

【0031】

本発明において、「炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基」は、炭素原子数 6 乃至 10 の、単環式若しくは多環式の、芳香族炭化水素の 1 価の基を意味し、例えば、フェニル基、ナフチル基又はアントリル基等が挙げられる。「炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基」は、1 以上の上記「ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基」で置換されていてもよい。

10

【0032】

本発明において、「炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基」は、基 - R - R' (ここで、R は、上記「炭素原子数 1 乃至 5 のアルキレン基」を表し、R' は、上記「炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基」を表す) を意味し、例えば、ベンジル基、フェネチル基、又は - メチルベンジル基等が挙げられる。「炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基」のアリール部分は、1 以上の上記「ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基」で置換されていてもよい。

20

【0033】

本発明において、「炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基」は、基 - R - O - R' (ここで、R は、上記「炭素原子数 1 乃至 5 のアルキレン基」を表し、R' は、上記「炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基」を表す) を意味し、例えば、フェノキシメチル基、フェノキシエチル基、又はフェノキシプロピル基等が挙げられる。「炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基」のアリール部分は、1 以上の上記「ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基」で置換されていてもよい。

【0034】

本発明において、「ハロゲン化物イオン」とは、フッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン又はヨウ化物イオンを意味する。

30

本発明において、「無機酸イオン」とは、炭酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、リン酸水素イオン、リン酸二水素イオン、硝酸イオン、過塩素酸イオン又はホウ酸イオンを意味する。

上記 $A n^-$ として好ましいのは、ハロゲン化物イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、水酸化物イオン及びイソチオシアネートイオンであり、特に好ましいのはハロゲン化物イオンである。

【0035】

本発明において、(メタ)アクリレート化合物とは、アクリレート化合物とメタクリレート化合物の両方を意味する。例えば(メタ)アクリル酸は、アクリル酸とメタクリル酸を意味する。

40

【0036】

本発明において、タンパク質としては、フィブリノゲン、牛血清アルブミン(BSA)、ヒトアルブミン、各種グロブリン、 γ -リポタンパク質、各種抗体(IgG、IgA、IgM)、ペルオキシダーゼ、各種補体、各種レクチン、フィブロネクチン、リゾチーム、フォン・ヴィレブランド因子(vWF)、血清 α_2 -グロブリン、ペプシン、卵白アルブミン、インシュリン、ヒストン、リボヌクレアーゼ、コラーゲン、シトクローム c 等が挙げられる。

【0037】

細胞としては、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

50

小板、マクロファージ、単球、骨細胞、骨髄細胞、周皮細胞、樹枝状細胞、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（例えば、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、単核細胞、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS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、巨核球、CD34陽性脊髄由来巨核球及び各種細胞株（例えば、HCT116、Huh7、HEK293（ヒト胎児腎細胞）、HeLa（ヒト子宮頸癌細胞株）、HepG2（ヒト肝癌細胞株）、UT7/TPO（ヒト白血病細胞株）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five、Verob）等が挙げられる。

10

【0038】

本発明の説明

本発明の凍結保存用容器は、上記細胞又はタンパク質の付着抑制能を有するポリマーを含むコーティングを、容器の表面の少なくとも一部に備えるものであれば特に制限されない。

本明細書において、細胞又はタンパク質の付着抑制能を有するポリマーの例としては、エチレン性不飽和モノマーの重合体、又は多糖類若しくはその誘導体を挙げる事ができる。エチレン性不飽和モノマーの重合体の例としては、（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の重合体を挙げる事ができる。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、カドランを挙げる事ができる。

20

【0039】

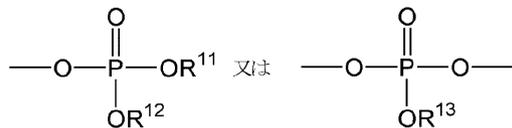
親水性の官能性誘導体の親水性官能性基の例としては、リン酸、ホスホン酸及びそれらのエステル構造；ペタイン構造；アミド構造；アルキレングリコール残基；アミノ基；並びにスルフィニル基等が挙げられる。

30

【0040】

ここで、リン酸及びそのエステル構造は、下記式：

【化11】

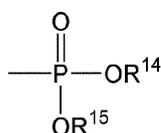


40

[ここで、R¹¹、R¹²及びR¹³は、互いに独立して、水素原子又は有機基（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し、ホスホン酸及びそのエステル構造は、下記式：

【化12】



[ここで、R¹⁴及びR¹⁵は、互いに独立して、水素原子又は有機基（例えば、炭素原

50

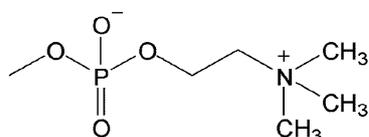
子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基等)である]

で表される基を意味する。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、アシッドホスホオキシエチル(メタ)アクリレート、ビニルホスホン酸等を挙げることができる。

【0041】

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13】



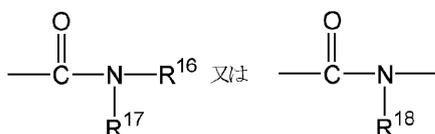
10

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。

【0042】

アミド構造は、下記式：

【化14】



20

[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号公報等に関示されている。

30

【0043】

アルキレングリコール残基は、アルキレングリコール($HO-Alk-OH$;ここで Alk は、炭素原子数1乃至10のアルキレン基である)の片側端末又は両端末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号公報等に関示されている。

40

【0044】

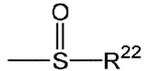
アミノ基は、式： $-NH_2$ 、 $-NHR^{19}$ 又は $-NR^{20}R^{21}$ [ここで、 R^{19} 、 R^{20} 及び R^{21} は、互いに独立して、有機基(例えば、炭素原子数1乃至5の直鎖若しくは分岐アルキル基等)である]で表される基を意味する。本明細書におけるアミノ基には、4級化又は塩化されたアミノ基を包含する。そのような構造を有するエチレン性不飽和モノマーの例としては、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、2-(t-ブチルアミノ)エチル(メタ)アクリレート、メタクリロイルコリンクロリド等を挙げることができる。

【0045】

スルフィニル基は、下記式：

50

【化 1 5】



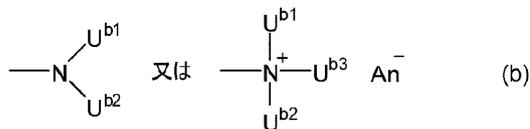
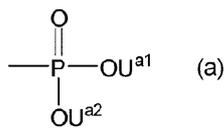
[ここで、 R^{22} は、有機基（例えば、炭素原子数 1 乃至 10 の有機基、好ましくは、1 個以上のヒドロキシ基を有する炭素原子数 1 乃至 10 のアルキル基等）である] で表される基を意味する。そのような構造を有するポリマーとして、特開 2014 - 48278 号公報等に掲載された共重合体を挙げるができる。

【0046】

その中でも、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：

【0047】

【化 1 6】



【0048】

[式中、 U^{a1} 、 U^{a2} 、 U^{b1} 、 U^{b2} 及び U^{b3} 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] が好ましい。

【0049】

また共重合体は、さらに下記式 (c)：

【化 1 7】



[式中、 R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表す]

で表される基を含む繰り返し単位を含んでもよい。

【0050】

本発明の凍結保存用容器に係る共重合体は、上記式 (a) で表される基を含む繰り返し単位と、上記式 (b) で表される基を含む繰り返し単位と、場合により上記式 (c) で表される基を含む繰り返し単位を含む共重合体であれば特に制限は無い。なお、本発明において、上記式 (c) で表される基を含む繰り返し単位は、上記式 (a) で表される基を含む繰り返し単位及び上記式 (b) で表される基を含む繰り返し単位とは異なる。該共重合体は、上記式 (a) で表される基を含むモノマーと、上記式 (b) で表される基を含むモノマーと、場合により上記式 (c) で表される基を含むモノマーとをラジカル重合して得られたものが望ましいが、重縮合、重付加反応させたものも使用できる。共重合体の例としては、オレフィンが反応したビニル重合ポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリカ

10

20

30

40

50

ーボネート、ポリウレタン等が挙げられるが、これらの中でも特にオレフィンが反応したビニル重合ポリマー又は(メタ)アクリレート化合物を重合させた(メタ)アクリルポリマーが望ましい。

【0051】

共重合体中における式(a)で表される基を含む繰り返し単位の割合は、3モル%乃至80モル%である。なお、共重合体は、2種以上の式(a)で表される基を含む繰り返し単位を含んでいてもよい。

【0052】

共重合体中における式(b)で表される基を含む繰り返し単位の割合は、3モル%乃至80モル%である。なお、共重合体は、2種以上の式(b)で表される基を含む繰り返し単位を含んでいてもよい。

10

【0053】

共重合体中における式(c)で表される基を含む繰り返し単位の割合は、全共重合体に対して上記式(a)及び(b)を差し引いた残部であってもよいが、例えば0モル%乃至90モル%である。なお、共重合体は、2種以上の式(c)で表される基を含む繰り返し単位を含んでいてもよい。

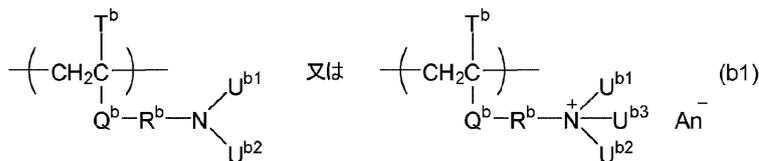
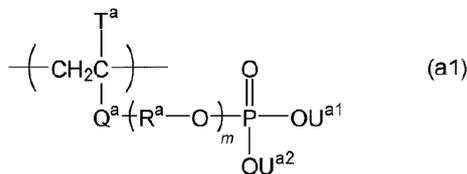
【0054】

本発明の凍結保存用容器に係る共重合体の好ましい一実施態様は、下記式(a1)及び(b1)の繰り返し単位を含む共重合体である。

【0055】

20

【化18】



30

【0056】

式中、 T^a 及び T^b 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、 Q^a 及び Q^b は、それぞれ独立して、単結合、エステル結合又はアミド結合を表し、 R^a 及び R^b は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し、 U^{a1} 、 U^{a2} 、 U^{b1} 、 U^{b2} 及び U^{b3} 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し、 m は、0乃至6の整数を表す。

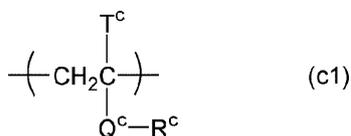
40

【0057】

共重合体は、さらに下記式(c1)の繰り返し単位を含んでもよい。

【0058】

【化19】



50

【 0 0 5 9 】

式中、 T^c 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、 Q^c は、単結合、エーテル結合又はエステル結合を表し、 R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表す。

【 0 0 6 0 】

式 (a 1) において、 m は 0 乃至 6 の整数を表すが、好ましくは 1 乃至 6 の整数を表し、より好ましくは 1 乃至 5 の整数を表し、特に好ましくは 1 である。

10

【 0 0 6 1 】

共重合体中に含まれる式 (a 1) で表される繰り返し単位の割合は、3 モル % 乃至 80 モル % である。なお、共重合体は、2 種以上の式 (a 1) で表される繰り返し単位を含んでいてもよい。

【 0 0 6 2 】

共重合体に含まれる式 (b 1) で表される繰り返し単位の割合は、3 モル % 乃至 80 モル % である。なお、共重合体は、2 種以上の式 (b 1) で表される繰り返し単位を含んでいてもよい。

【 0 0 6 3 】

共重合体に含まれる式 (c 1) で表される繰り返し単位の割合は、全共重合体に対して上記式 (a 1) 及び式 (b 1) を差し引いた残部であってもよいが、例えば 0 モル % 乃至 90 モル % である。なお、共重合体は、2 種以上の式 (c 1) で表される繰り返し単位を含んでいてもよい。

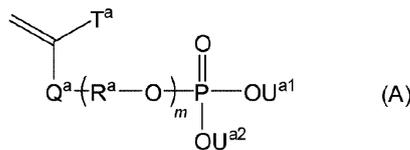
20

【 0 0 6 4 】

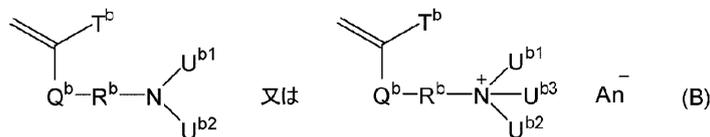
本発明の凍結保存用容器に係る共重合体の好ましい別の実施態様は、下記式 (A) 及び (B) :

【 0 0 6 5 】

【 化 2 0 】



30



【 0 0 6 6 】

[式中、
 T^a 及び T^b 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；
 Q^a 及び Q^b は、それぞれ独立して、単結合、エステル結合又はアミド結合を表し；
 R^a 及び R^b は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 10 の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し；
 U^{a1} 、 U^{a2} 、 U^{b1} 、 U^{b2} 及び U^{b3} 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し；
 m は、0 乃至 6 の整数を表す]

40

50

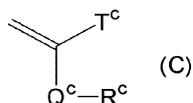
で表される化合物を含むモノマー混合物を、溶媒中にて反応（重合）させることにより得られる共重合体である。

【0067】

共重合体は、さらに下記式（C）：

【0068】

【化21】



10

【0069】

[式中、

T^c 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；

Q^c は、単結合、エーテル結合又はエステル結合を表し；

R^c は、炭素原子数 1 乃至 18 の直鎖若しくは分岐アルキル基、炭素原子数 3 乃至 10 の環式炭化水素基、炭素原子数 6 乃至 10 のアリール基、炭素原子数 7 乃至 15 のアラルキル基又は炭素原子数 7 乃至 15 のアリールオキシアルキル基（ここで、前記アリール部分は、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖若しくは分岐アルキル基で置換されていてもよい）を表す]

20

で表わされる化合物を含むモノマー混合物より得られる共重合体であってよい。

【0070】

T^a、T^b 及び T^c としては、水素原子、メチル基又はエチル基が好ましく、水素原子又はメチル基がより好ましい。Q^a、Q^b 及び Q^c としては、単結合又はエステル結合が好ましく、エステル結合がより好ましい。R^a 及び R^b としては、炭素原子数 1 乃至 5 の直鎖もしくは分岐アルキレン基が好ましく、メチレン基、エチレン基又はプロピレン基がより好ましい。R^c としては、炭素原子数 4 乃至 18 の直鎖もしくは分岐アルキル基又は炭素原子数 3 乃至 10 のシクロアルキル基が好ましく、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基若しくはそれらの異性体、又はシクロヘキシル基がより好ましい。U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2} 及び U^{b3} としては、水素原子、メチル基、エチル基又は t-ブチル基が好ましく、式 (a) の U^{a1} 及び U^{a2} としては、水素原子がより好ましく、式 (b) の U^{b1}、U^{b2} 及び U^{b3} としては、水素原子、メチル基、エチル基又は t-ブチル基がより好ましい。

30

【0071】

上記式 (A) の具体例としては、ビニルホスホン酸、アシッドホスホオキシエチル（メタ）アクリレート、3-クロロ-2-アシッドホスホオキシプロピル（メタ）アクリレート、アシッドホスホオキシプロピル（メタ）アクリレート、アシッドホスホオキシメチル（メタ）アクリレート、アシッドホスホオキシポリオキシエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、アシッドホスホオキシポリオキシプロピレングリコールモノ（メタ）アクリレート等が挙げられるが、この中でもビニルホスホン酸、アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（=リン酸 2-（メタクリロイルオキシ）エチル）又はアシッドホスホオキシポリオキシエチレングリコールモノメタクリレートが好ましく用いられ、最も好ましいのはアシッドホスホオキシエチルメタクリレート（=リン酸 2-（メタクリロイルオキシ）エチル）である。

40

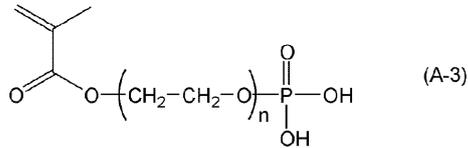
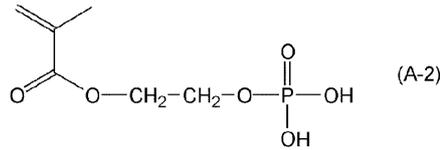
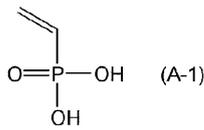
【0072】

ビニルホスホン酸、アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（=リン酸 2-（メタクリロイルオキシ）エチル）、アシッドホスホオキシポリオキシエチレングリコールモノメタクリレート及びアシッドホスホオキシポリオキシプロピレングリコールモノメタクリレートの構造式は、それぞれ下記式 (A-1) 乃至式 (A-4) で表される。

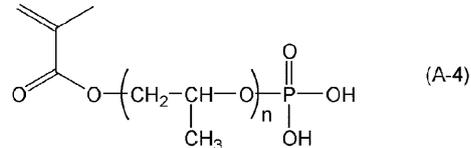
【0073】

50

【化22】



n=4-5



n=5-6

10

【0074】

これらの化合物は、合成時において、後述する一般式(D)又は(E)で表されるような、2つの官能基を有する(メタ)アクリレート化合物を含む場合がある。

【0075】

上記式(B)の具体例としては、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、ジメチルアミノプロピル(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が挙げられるが、この中でもジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、メタクリロイルコリンクロリド又は2-(t-ブチルアミノ)エチル(メタ)アクリレートが好ましく用いられ、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレートが最も好ましく用いられる。

20

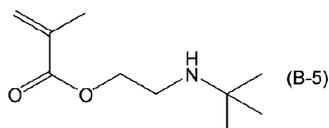
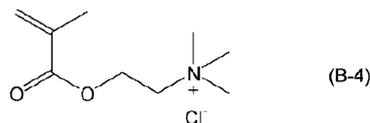
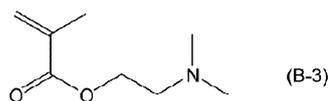
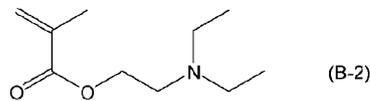
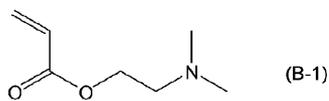
【0076】

ジメチルアミノエチルアクリレート(=アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチル)、ジエチルアミノエチルメタクリレート(=メタクリル酸2-(ジエチルアミノ)エチル)、ジメチルアミノエチルメタクリレート(=メタクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチル)、メタクリロイルコリンクロリド及び2-(t-ブチルアミノ)エチルメタクリレート(=メタクリル酸2-(t-ブチルアミノ)エチル)の構造式は、それぞれ下記式(B-1)乃至式(B-5)で表される。

30

【0077】

【化23】



40

【0078】

上記式(C)の具体例としては、ブチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート等の(メタ)アクリル酸の直鎖若しくは分岐アルキルエステル類；シクロヘキシル(メタ)アクリレート、イソボルニル(メタ)アクリレート等の(メタ)アクリル酸の環状アル

50

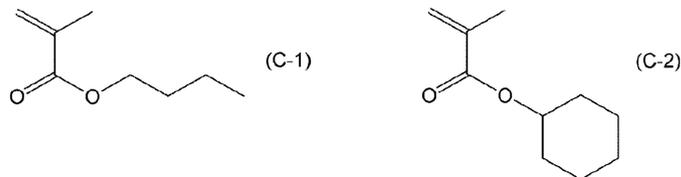
キルエステル類；ベンジル（メタ）アクリレート、フェネチル（メタ）アクリレート等の（メタ）アクリル酸のアラルキルエステル類；スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系モノマー；メチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系モノマー；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系モノマーが挙げられる。この中でもブチル（メタ）アクリレート又はシクロヘキシル（メタ）アクリレートが好ましく用いられる。

【0079】

ブチルメタクリレート（＝メタクリル酸ブチル）及びシクロヘキシルメタクリレート（＝メタクリル酸シクロヘキシル）の構造式は、それぞれ下記式（C-1）及び式（C-2）で表される。

【0080】

【化24】

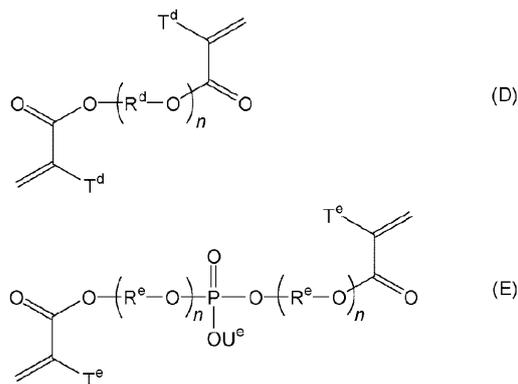


【0081】

本発明に係る共重合体の別の実施態様では、上記式（A）、（B）及び場合により（C）で表される化合物に加えて、さらに任意の第4成分が共重合していてもよい。例えば、第4成分として2以上の官能基を有する（メタ）アクリレート化合物が共重合しており、ポリマーの一部が部分的に3次元架橋していてもよい。そのような第4成分として、例えば、下記式（D）又は（E）：

【0082】

【化25】



【0083】

[式中、 T^d 、 T^e 及び U^e 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^d 及び R^e は、それぞれ独立して、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至10の直鎖若しくは分岐アルキレン基を表し； n は、1乃至6の整数を表す]で表される2官能性モノマーが挙げられる。すなわち本発明に係る共重合体は、好ましくは、このような2官能性モノマーから誘導される架橋構造を含むものである。

【0084】

式（D）及び（E）において、 T^d 及び T^e は、好ましくは、それぞれ独立して、水素原子、メチル基又はエチル基であり、より好ましくは、それぞれ独立して、水素原子又はメチル基である。

【0085】

式（E）において、 U^e は、好ましくは、水素原子、メチル基又はエチル基であり、より好ましくは、水素原子である。

10

20

30

40

50

【0086】

式(D)において、 R^d は、好ましくは、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至3の直鎖若しくは分岐アルキレン基であり、より好ましくは、それぞれ独立して、エチレン基若しくはプロピレン基であるか、あるいは1つの塩素原子で置換されたエチレン基若しくはプロピレン基であり、特に好ましくは、エチレン基若しくはプロピレン基である。また式(D)において、 n は、好ましくは、1乃至5の整数を表し、特に好ましくは1である。

【0087】

式(E)において、 R^e は、好ましくは、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1乃至3の直鎖若しくは分岐アルキレン基であり、より好ましくは、それぞれ独立して、エチレン基若しくはプロピレン基であるか、あるいは1つの塩素原子で置換されたエチレン基若しくはプロピレン基であり、特に好ましくは、エチレン基若しくはプロピレン基である。また式(E)において、 n は、好ましくは、1乃至5の整数を表し、特に好ましくは1である。

10

【0088】

式(D)で表される2官能性モノマーは、好ましくは、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレートが挙げられる。

式(E)で表される2官能性モノマーは、好ましくは、リン酸ビス(メタクリロイルオキシメチル)、リン酸ビス[(2-メタクリロイルオキシ)エチル]、リン酸ビス[3-(メタクリロイルオキシ)プロピル]、あるいは上記式(A-3)又は(A-4)由来の2官能性モノマーが挙げられる。

20

式(D)と式(E)の中では、式(E)で表される2官能性モノマーがより好ましく用いられる。

【0089】

また、3官能(メタ)アクリレート化合物としては、トリアクリル酸ホスフィニリジントリス(オキシ-2,1-エタンジイル)が挙げられる。

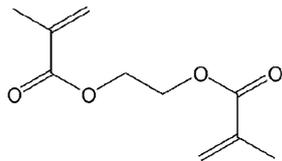
【0090】

これら第4成分の中でも、特に、エチレングリコールジメタクリレート、上記式(A-3)及び(A-4)由来の2官能性モノマーのうち、エチレングリコール及びプロピレングリコールの繰り返し単位を有するジメタクリレート、リン酸ビス[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]、並びに上記式(A-3)及び(A-4)由来の2官能性モノマーのうち、リン酸エステル基を介してエチレングリコール及びプロピレングリコールの繰り返し単位を有するジメタクリレートが好ましく、その構造式は、それぞれ、下記式(D-1)乃至(D-3)及び式(E-1)乃至(E-3)で表される。

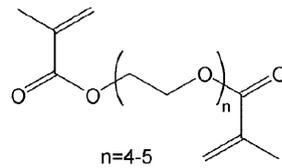
30

【0091】

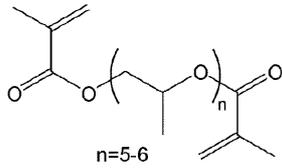
【化 2 6】



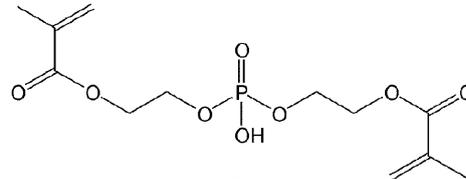
(D-1)



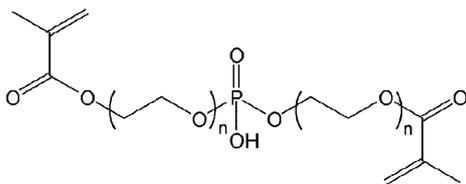
(D-2)



(D-3)

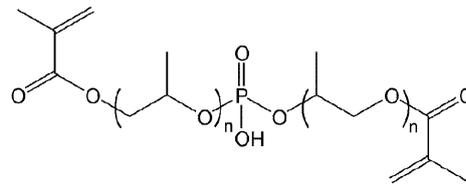


(E-1)



n=4-5

(E-2)



n=5-6

(E-3)

10

20

【 0 0 9 2 】

これらの中でも、式 (E - 1) 乃至 (E - 3) が特に好ましい。

【 0 0 9 3 】

共重合体には、これらの第 4 成分の 1 種又は 2 種以上が含まれていてもよい。

上記共重合体中における第 4 成分、例えば、上記式 (D) 又は (E) で表される 2 官能性モノマーから誘導される架橋構造の割合は、0 モル% 乃至 50 モル% であり、好ましくは 5 モル% 乃至 45 モル% であり、最も好ましくは 10 モル% 乃至 40 モル% である。

【 0 0 9 4 】

式 (A) で表される化合物の、上記共重合体を形成するモノマー全体に対する割合は、3 モル% 乃至 80 モル% である。また、式 (A) で表される化合物は、2 種以上であってもよい。

30

式 (B) で表される化合物の、上記共重合体を形成するモノマー全体に対する割合は、3 モル% 乃至 80 モル% である。また、式 (B) で表される化合物は、2 種以上であってもよい。

【 0 0 9 5 】

式 (C) で表される化合物の、上記共重合体を形成するモノマー全体に対する割合は、上記式 (A) 及び (B) の割合を差し引いた残部であってもよいが、例えば 0 モル% 乃至 90 モル% である。また、式 (C) で表される化合物は、2 種以上であってもよい。

【 0 0 9 6 】

本発明の実施態様に係る共重合体は、一般的なアクリルポリマー又はメタクリルポリマー等の合成方法であるラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合などの方法により合成することができる。その形態は溶液重合、懸濁重合、乳化重合、塊状重合など種々の方法が可能である。

40

【 0 0 9 7 】

重合反応における溶媒としては、水、リン酸緩衝液又はエタノール等のアルコール又はこれらを組み合わせた混合溶媒でもよいが、水又はエタノールを含むことが望ましい。さらには水又はエタノールを 10 質量% 以上 100 質量% 以下含むことが好ましい。さらには水又はエタノールを 50 質量% 以上 100 質量% 以下含むことが好ましい。さらには水又はエタノールを 80 質量% 以上 100 質量% 以下含むことが好ましい。さらには水又はエタノールを 90 質量% 以上 100 質量% 以下含むことが好ましい。好ましくは水とエタ

50

ノールの合計が100質量%である。

【0098】

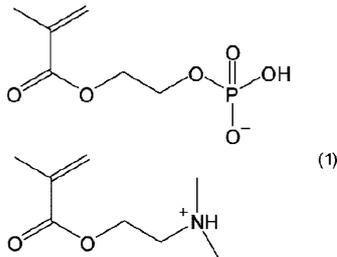
反応濃度としては、例えば上記式(A)又は式(B)で表される化合物の反応溶媒中の濃度を、0.01質量%乃至4質量%とすることが好ましい。濃度が4質量%超であると、例えば式(A)で表されるリン酸基の有する強い会合性により共重合体が反応溶媒中でゲル化してしまう場合がある。濃度0.01質量%未満では、得られたワニスの濃度が低すぎるため、十分な膜厚のコーティング膜を得るためのコーティング膜形成用組成物の作成が困難である。濃度が、0.01質量%乃至3質量%、例えば3質量%、2質量%又は1質量%であることがより好ましい。

【0099】

また本発明に係る共重合体の合成においては、例えば下記式(1)に記載の塩とした後、場合により式(C)で表される化合物と共に重合して共重合体を作製してもよい。

【0100】

【化27】



【0101】

リン酸基含有モノマーは会合し易いモノマーのため、反応系中に滴下されたとき、速やかに分散できるように反応溶媒中に少量ずつ滴下してもよい。

【0102】

さらに、反応溶媒はモノマー及びポリマーの溶解性を上げるために加温(例えば40乃至100)してもよい。

【0103】

重合反応を効率的に進めるためには、重合開始剤を使用することが望ましい。重合開始剤の例としては、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(和光純薬工業(株)製;VA-065、10時間半減期温度;51)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)、1,1'-アゾビス(シクロヘキサン-1-カルボニトリル)、1-[(1-シアノ-1-メチルエチル)アゾ]ホルムアミド、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド](和光純薬工業(株)製;VA-086、10時間半減期温度;86)、過酸化ベンゾイル(BPO)、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(和光純薬工業(株)製;VA-057、10時間半減期温度;57)、4,4'-アゾビス(4-シアノペンタノイックアシド)(和光純薬工業(株)製;V-501)、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジヒドロクロリド(和光純薬工業(株)製;VA-044、10時間半減期温度;44)、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジスルファートジヒドレート(和光純薬工業(株)製;VA-046B、10時間半減期温度;46)、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン](和光純薬工業(株)製;VA-061、10時間半減期温度;61)、2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ジヒドロクロリド(和光純薬工業(株)製;V-50、10時間半減期温度;56)、ペルオキソ二硫酸又はt-ブチルヒドロペル

10

20

30

40

50

オキシド等が用いられる。

水への溶解性、イオンバランス及びモノマーとの相互作用を考慮した場合、2, 2' - アゾビス [2 - メチル - N - (2 - ヒドロキシエチル) プロピオンアミド]、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、4, 4' - アゾビス (4 - シアノペンタノイックアシッド)、2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] ジヒドロクロリド、2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] ジスルファートジヒドレート、2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン]、2, 2' - アゾビス (2 - アミジノプロパン) ジヒドロクロリド及びベルオキシソ二硫酸から選ばれることが好ましい。

10

有機溶媒への溶解性、イオンバランス及びモノマーとの相互作用を考慮した場合、2, 2' - アゾビス (2, 4 - ジメチルバレロニトリル) 又は 2, 2' - アゾビス (イソブチロニトリル) を用いることが望ましい。

【 0 1 0 4 】

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%乃至10質量%である。

【 0 1 0 5 】

反応条件は反応容器をオイルバス等で50乃至200に加熱し、1時間乃至48時間、より好ましくは80乃至150、5時間乃至30時間攪拌を行うことで、重合反応が進み本発明の共重合体が得られる。反応雰囲気は窒素雰囲気が好ましい。

20

【 0 1 0 6 】

反応手順としては、全反応物質を室温の反応溶媒に全て入れてから、上記温度に加熱して重合させてもよいし、あらかじめ加温した溶媒中に、反応物質の混合物全部又は一部を少々ずつ滴下してもよい。

【 0 1 0 7 】

後者の反応手順によれば、本発明の共重合体は、上記式 (A)、(B) 及び場合により (C) で表される化合物、溶媒及び重合開始剤を含む混合物を、重合開始剤の10時間半減期温度より高い温度に保持した溶媒に滴下し、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。

【 0 1 0 8 】

本発明に係る共重合体の分子量は数千から数百万程度であれば良く、好ましくは5,000乃至5,000,000である。さらに好ましくは、10,000乃至2,000,000、最も好ましくは5,000乃至1,000,000である。また、ランダム共重合体、ブロック共重合体、グラフト共重合体のいずれでも良く、該共重合体を製造するための共重合反応それ自体には特別の制限はなく、ラジカル重合やイオン重合や光重合、乳化重合を利用した重合等の公知の溶液中で合成される方法を使用できる。これらは目的の用途によって、本発明の共重合体のうちいずれかを単独使用することもできるし、複数の共重合体を混合し、且つその比率は変えて使用することもできる。

30

【 0 1 0 9 】

本発明に係る凍結保存用容器に係るコーティングを形成するために用いられるコーティング剤は、所望の共重合体を、場合により所望の溶媒にて所定の濃度に希釈することにより調製してもよい。

40

【 0 1 1 0 】

そのような溶媒としては、水、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、アルコールが挙げられる。アルコールとしては、炭素数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 - 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 -

50

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が、共重合体の溶解の観点から、水、PBS、エタノール、プロパノール、及びそれらの混合溶媒から選ばれるのが好ましく、水、エタノール、及びそれらの混合溶媒から選ばれるのがより好ましい。

10

【0111】

さらにコーティング剤は、共重合体含有ワニスから調製してもよい。共重合体含有ワニスは、例えば、上記式(A)、(B)及び場合により(C)で表される化合物を、溶媒中で、化合物の合計濃度0.01質量%乃至20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。

【0112】

コーティング剤中の固形分の濃度としては、均一にコーティング膜を形成させるために、0.01乃至50質量%が望ましい。また、コーティング剤中の共重合体の濃度としては、好ましくは0.01乃至4質量%、より好ましくは0.01乃至3質量%、特に好ましくは0.01乃至2質量%、さらに好ましくは0.01乃至1質量%である。共重合体の濃度が0.01質量%未満であると、コーティング剤中の共重合体の濃度が低すぎて十分な膜厚のコーティング膜が形成できず、4質量%超であると、コーティング剤の保存安定性が悪くなり、溶解物の析出やゲル化が起こる可能性がある。

20

【0113】

さらにコーティング剤は、上記共重合体と溶媒の他に、必要に応じて得られるコーティング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、防腐剤、界面活性剤、基材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。

【0114】

コーティング剤中の共重合体のイオンバランスを調節するために、さらにコーティング剤中のpHを予め調整する工程を含んでもよい。pH調整は、例えば上記共重合体と溶媒を含む組成物にpH調整剤を添加し、該組成物のpHを3.5乃至8.5、さらに好ましくは4.0乃至8.0とすることにより実施してもよい。使用しうるpH調整剤の種類及びその量は、上記共重合体の濃度や、そのアニオンとカチオンの存在比等に応じて適宜選択される。

30

pH調整剤の例としては、アンモニア、ジエタノールアミン、ピリジン、N-メチル-D-グルカミン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン等の有機アミン；水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属水酸化物；塩化カリウム、塩化ナトリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物；硫酸、リン酸、塩酸、炭酸等の無機酸又はそのアルカリ金属塩；コリン等の4級アンモニウムカチオン、あるいはこれらの混合物(例えば、リン酸緩衝生理食塩水等の緩衝液)を挙げることができる。これらの中でも、アンモニア、ジエタノールアミン、水酸化ナトリウム、コリン、N-メチル-D-グルカミン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンが好ましく、特にアンモニア、ジエタノールアミン、水酸化ナトリウム及びコリンが好ましい。

40

【0115】

本発明の凍結保存用容器は、上記コーティング剤より形成されたコーティングを、凍結保存用容器の表面の少なくとも一部に有する。具体的には、細胞又はタンパク質を含む懸濁液又は溶液と接触し得る、容器の内部及び/又は外部の表面の少なくとも一部に有する。

上記凍結保存用容器は、ボトル、チューブ、バイアル、プレート、アンプル等の、通常

50

、細胞又はタンパク質の保存に用いられる容器であってよい。

【0116】

また、容器の材質は、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などの無機化合物の成形体など無機固体材料、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。

10

【0117】

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。

20

【0118】

容器の材質は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）であることが特に好ましい。

30

【0119】

本発明は、上述したようなコーティング剤を、容器の表面の少なくとも一部と接触させる工程を含む、容器の部表面の少なくとも一部にコーティングを備える凍結保存用容器の製造方法に関する。コーティング剤と容器の表面との接触には特に制限は無いが、容器をコーティング剤に浸漬する、コーティング剤を容器に添加し、所定の時間静置する、又はコーティング剤を容器の表面に塗布する等の方法が用いられるが、コーティング剤を容器に添加し、所定の時間静置する方法が好ましい。添加は、例えば、容器の全容積の0.5乃至1倍量のコーティング剤を、シリンジ等を用いて添加することによって行うことができる。静置は、容器の材質やコーティング剤の種類に応じて、時間や温度を適宜選択して実施されるが、例えば、5分から24時間、好ましくは30分から3時間、10乃至35、好ましくは20乃至30、最も好ましくは25で実施される。これにより、容器の表面の少なくとも一部に、好ましくは全体にわたって、コーティングを有する凍結保存

40

50

用容器を製造することができる。

【0120】

また、かかる方法により得られる容器の表面のコーティングは、上記容器の表面の少なくとも一部と接触させる工程後、好ましくはコーティング剤を添加し、所定の時間静置する工程後、乾燥工程を経ずにそのまま、あるいは水又は凍結保存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、凍結保存用容器として使用することができる。

すなわち、上記容器の表面の少なくとも一部と接触させる工程後、好ましくはコーティング剤を添加し、所定の時間静置する工程後、48時間以内、好ましくは24時間以内、さらに好ましくは12時間以内、さらに好ましくは6時間以内、さらに好ましくは3時間以内、さらに好ましくは1時間以内に乾燥工程を経ずにそのまま、あるいは水又は凍結保存に付される試料の媒質（例えば、水、緩衝液、培地等、特に好ましくは培地（例えば、DMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地））を用いての洗浄後に、凍結保存用容器として使用することができる。

10

【0121】

容器は、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、上記コーティング剤中の溶媒を取り除くと共に、本発明に係る共重合体の式(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。

コーティングは、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、より迅速にコーティング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乃至低温（-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の混合媒体（-78）、液体窒素（-196）等が挙げられる。

20

【0122】

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、コーティング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、細胞又はタンパク質の付着抑制能が発揮されない。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25乃至150である。

30

本願のコーティングは、以上の簡便な工程を経て製造される。特許文献3のような光の照射工程は不要である。

【0123】

また、コーティングに残存する不純物、未反応モノマー等を無くするため、さらにはコーティング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は細胞又はタンパク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、本発明のコーティングが形成された容器の表面は、細胞又はタンパク質の付着抑制能を有する。

40

【0124】

本発明の容器の表面に付与されるコーティングの膜厚は、容器の形状や、試料の種類等に応じて適宜調整でき、また容器の表面全体にわたってほぼ均一であっても、部分的に不均一であってもよいが、特に限定はなく、好ましくは10乃至1000であり、さらに

50

好ましくは10乃至500であり、最も好ましくは10乃至300である。

【0125】

前記コーティングが凍結保護剤に耐性を有するとは、実施例に記載の<試験例1>の耐薬品性膜厚試験にて、コーティングの膜厚減少が50%以下、好ましくは35%以下、最も好ましくは20%以下であることを言う。

【0126】

前記凍結保護剤は、エチレングコール、プロパンジオール、メタノール、エタノール、ジメチルアセトアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン、アルブミン、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクトアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミド、アセトニトリル、アセトン及びジメチルスルホキシドからなる群より選ばれるが、これらの中でも、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン及びジメチルスルホキシドが好ましく、メタノール、アセトニトリル、アセトン及びジメチルスルホキシドが特に好ましい。

これらの凍結保護剤は、保存される細胞又はタンパク質を含む保存液中に通常1質量%乃至100質量%、好ましくは2質量%乃至50質量%、最も好ましくは5質量%乃至20質量%の濃度で加えられる。特に好ましいのは、細胞の場合5質量%乃至10質量%、タンパク質の場合10質量%乃至20質量%の濃度で加えられる。

【実施例】

【0127】

以下、合成例、実施例、試験例等に基づいて、本発明をさらに詳細に説明するが本発明はこれらに限定されない。

【0128】

下記合成例に示す共重合体の重量平均分子量はGel Filtration Chromatography (以下、GFCと略称する)、もしくはGel Permeation Chromatography (以下、GPCと略称する)による測定結果である。測定条件等は次のとおりである。

【0129】

(GFC測定条件)

- ・装置：Prominence (島津製作所製)
- ・GFCカラム：TSKgel GMPWXL (7.8mmI.D. x 30cm) x 2乃至3本
- ・流速：1.0mL/min
- ・溶離液：イオン性物質含有水溶液、もしくは、EtOHの混合溶液
- ・カラム温度：40
- ・検出器：RI
- ・注入濃度：ポリマー固形分0.05乃至0.5質量%
- ・注入量：100μL
- ・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) x 10種

【0130】

(GPC測定条件)

- ・装置：HLC-8220 (東ソー(株)製)
- ・GPCカラム：Shodex (登録商標)・Asahipak (登録商標) (昭和電工(株)製) x 3本
- ・流速：0.6mL/min
- ・溶離液：N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)
- ・カラム温度：40
- ・検出器：RI
- ・注入濃度：ポリマー固形分0.05乃至0.5質量%
- ・注入量：100μL
- ・検量線：三次近似曲線

・標準試料：ポリスチレン（東ソー（株）製）× 10種

【0131】

（シリコンウェハの準備）

半導体評価用の市販のシリコンウェハをそのまま用いた。

【0132】

（QCMセンサー（PS）の作成）

Au蒸着された水晶振動子（Q-Sense, QSX304）を、UV / オゾン洗浄装置（UV253E、フィルジェン（株）製）を用いて10分間洗浄し、直後に2 - アミノエタンチオール（東京化成工業（株）製）0.0772gをエタノール1000mLに溶解した溶液中に24時間浸漬した。エタノールでセンサー表面を洗浄後自然乾燥し、ポリスチレン（Aldrich社製）1.00gをトルエン99.00gに溶解したワニスをスピコートにて3500rpm / 30secで膜センサー側にスピコートし、120 / 1min乾燥することでQCMセンサー（PS）とした。

10

【0133】

<合成例1>

アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（製品名；ホスマーM、ユニケミカル（株）製、乾固法100・1時間における不揮発分：91.8%、アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（44.2質量%）、リン酸ビス[2 - (メタクリロイルオキシ)エチル]（28.6質量%）、その他の物質（27.2質量%）の混合物）28.00gを60に維持しながら攪拌し、メタクリル酸2 - (ジメチルアミノ)エチル21.37gを滴下した。そこに純水133.96g、次いで、エタノール44.65g、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、和光純薬工業（株）製）0.25gを、20以下に保ちながら順に加えた。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、滴下ロートに導入した。一方で、別途純水267.93gを冷却管付きの3つ口フラスコに入れ、これを窒素フローし、攪拌しながらリフラックス温度まで昇温した。この状態を維持しつつ、上記混合液を導入した滴下ロートを3つ口フラスコにセットし、2時間かけて混合液を純水とエタノールの沸騰液内に滴下した。滴下後、24時間上記環境を維持した状態で加熱攪拌することで固形分約9.70質量%の共重合体含有ワニス496.16gを得た。得られた透明液体のGFCにおける重量平均分子量は約280,000であった。

20

30

【0134】

<合成例2>

アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（製品名；ホスマーM、ユニケミカル（株）製、乾固法100・1時間における不揮発分：91.8%、アシッドホスホオキシエチルメタクリレート（44.2質量%）、リン酸ビス[2 - (メタクリロイルオキシ)エチル]（28.6質量%）、その他の物質（27.2質量%）の混合物）25.00gを35以下に冷却しながらコリン（48 - 50%水溶液：東京化成工業（株）製）29.95gを加えて均一になるまで攪拌した。この混合液にメタクロイルコリンクロリド80%水溶液（東京化成工業（株）製）20.95g、メタクリル酸ブチル（東京化成工業（株）製）28.67g、2,2' - アゾビス（2,4 - ジメチルバレロニトリル）（V - 65、和光純薬工業（株）製）0.70g、エタノール110.84gを35以下に保ちながら順に加えた。さらに、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、和光純薬工業（株）製）0.70gを純水27.71gに溶解させた水溶液を35以下に保ちながら上記の溶液に加え、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、滴下ロートに導入した。一方で、別途純水56.81gとエタノール131.62g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。この状態を維持しつつ、上記混合液を導入した滴下ロートを3つ口フラスコにセットし、1時間かけて混合液を純水とエタノールの沸騰液内に滴下した。滴下後、24時間上記環境を維持した状態で加熱攪拌する。24時間後に冷却することで固形分約19.86質量%の共重合体含有

40

50

ワニス432.97gを得た。得られたコロイド状液体のGPCにおける重量平均分子量は約8,500であった。

【0135】

<調製例1>

上記合成例1で得られた共重合体含有ワニス5.00gに、純水31.5g、エタノール1.35g、1mol/L水酸化ナトリウム水溶液(1N)(関東化学(株)製)0.24gを加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pHは7.3であった。得られたコーティング剤中に、上記シリコンウェハをディップし、オープンにて45、24時間乾燥させた。その後、PBSと純水で十分に洗浄を行って、コーティング膜が形成されたシリコンウェハを得た。光学式干渉膜厚計でシリコンウェハのコーティング膜の膜厚を確認したところ105であった。

10

また、上記コーティング剤を3500rpm/30secでQCMセンサー(PS)にスピンコートし、乾燥工程として45のオープンで24時間ベークした。その後、PBSと超純水にて各2回ずつ洗浄し、表面処理済QCMセンサー(PS)を得た。

また、上記コーティング剤を3500rpm/30secでプラズマ洗浄処理をしたSUS316L製のQCMセンサー(メイワフォーシス製)にスピンコートし、乾燥工程として50のオープンで24時間ベークした。その後、PBSと超純水にて各2回ずつ洗浄し、表面処理済QCMセンサー(SUS316L)を得た。

【0136】

<調製例2>

上記合成例2で得られた共重合体含有ワニス10.00gに、1mol/L塩酸(1N)(関東化学(株)製)1.19gと純水26.78g、エタノール62.54gを加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pHは3.5であった。調製例1と同様の方法にて、コーティング膜が形成されたシリコンウェハ及び表面処理済QCMセンサー(PS、SUS316L)を得た。光学式干渉膜厚計でシリコンウェハのコーティング膜の膜厚を確認したところ451であった。

20

【0137】

<試験例1>

(耐薬品性膜厚試験)

上記調製例にてコーティングしたシリコンウェハを、純水、50%アセトニトリル水溶液(ACN50%と略)、アセトニトリル(ACN100%と略)、20%ジメチルスルホキシド水溶液(DMSO20%と略)に25で24時間浸漬させ、純水にて洗浄し、ホットプレート上で50・1分間乾燥させた。その後、再び、光学式干渉膜厚計でコーティング膜の膜厚を確認した。以下の表1に結果を示す。

30

【0138】

【表1】

	未処理	純水	ACN50%	ACN100%	DMSO20%
調製例1	105	105	71	103	91
調製例2	451	451	-	-	523

40

※単位はÅである。

【0139】

調製例1では、50%アセトニトリル水溶液以外は、薬品浸漬前後のほぼ膜厚変化が無いことが確認された。調製例2では、DMSO20%において膜厚減少が無く、薬液耐性を示した。

【0140】

<試験例2>

(QCM-Dによる耐薬品性試験：QCMセンサー(PS))

50

各調製例によって得た表面処理済QCMセンサー（PS）を、純水と、ACN50%、ACN100%、DMSO20%に24時間浸漬させ、純水にて洗浄し、ホットプレート上で50・1分間乾燥させた。散逸型水晶振動子マイクロバランスQCM-D（E4、Q-Sense）に取り付け、周波数の変化が1時間で1Hz以下となる安定したベースラインを確立するまでPBSを流した。次に、安定したベースラインの周波数を0Hzとして約10分間PBSを流した。引き続き、 α -グロブリン ヒト血液由来（Aldrich社製）0.1gをPBS 1Lに溶解した液を約30分流し、その後再びPBSを約20分流した後の11次オーバートーンの吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を読み取った。分析のためにQ-Tools（Q-Sense）を使用して、吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を、Sauerbrey式で説明される吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を単位面積当たりの質量（ng/cm²）と換算したものをタンパク質の付着量として表2に示す。比較例として、未処理のPSセンサーを用いた。

【0141】

【表2】

	未処理	純水	ACN50%	ACN100%	DMSO20%
調製例1	1144	204	657	402	194
調製例2	1144	9	8	62	1

※単位はng/cm²である。

【0142】

いずれの溶媒であっても、未処理状態に比べてタンパク質の付着抑制効果があることが確認できた。調製例2では、調製例1に比較し1乃至2桁以上タンパク質の付着抑制効果が高かった。

【0143】

<試験例3>

（QCM-Dによる耐薬品性試験：QCMセンサー（SUS316L））

各調製例によって得た表面処理済を、散逸型水晶振動子マイクロバランスQCM-D（E4、Q-Sense）に取り付け、周波数の変化が1時間で1Hz以下となる安定したベースラインを確立するまでPBSを流した。次に、安定したベースラインの周波数を0Hzとして約10分間PBSを流した。引き続き、 α -グロブリン ヒト血液由来（Aldrich社製）0.1gをPBS 1Lに溶解した液を約30分流し、その後再びPBSを約20分流した後の11次オーバートーンの吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を読み取った。分析のためにQ-Tools（Q-Sense）を使用して、吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を、Sauerbrey式で説明される吸着誘起周波数のシフト（ Δf ）を単位面積当たりの質量（ng/cm²）と換算したものをタンパク質の付着量として表3に示す。比較例として、未処理のSUS316Lセンサーを用いた。

【0144】

【表3】

	未処理	調製例1	調製例2
タンパク質付着量（ng/cm ² ）	178	1	0

【0145】

<実施例1>

上記合成例2で得られた共重合体ワニス10.00gに、1mol/L塩酸（1N）（関東化学（株）製）1.19gと純水26.78g、エタノール62.54gを加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pHは3.5であった。得られたコーティング剤をマイクロチューブ 1.5mL（Quality Scientific Plastics社製、材質：ポリプロピレン（

PP))に1.5mL入れ、25、1時間静置した。コーティング剤を除去後25、18時間乾燥させた。その後、純水で十分に洗浄を行って、コーティング膜が形成されたマイクロチューブを得た。

【0146】

<試験例4>

(有機溶媒耐性評価)

[有機溶媒処理]

純水によりDMSO、ACNを10、50%にそれぞれ希釈し、同様に純水によりアセトン(ACTと略)、メタノール(MeOHと略)、エタノール(EtOHと略)を10、50%にそれぞれ希釈した。上記希釈溶媒と純水、100%DMSO、100%ACNそれぞれを上記実施例1のコーティングチューブ及び非コーティングチューブ、並びに住友ベークライト(株)製プロテオセーブ(登録商標)SS1.5mLマイクロチューブ(MS-4215M、比較例)に1.5mLずつ入れ、室温で5時間静置した。有機溶媒を除去後、純水で十分に洗浄し、室温で乾燥させた。

10

【0147】

[タンパク質付着量評価による有機溶媒耐性評価]

Horseradish peroxidase(HRPと略記)標識Goat Anti-Mouse IgG(SouthernBiotech社製)をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、有機溶媒処理を施した上記コーティングチューブ及び非コーティングチューブ、並びに比較例のチューブに入れ、室温で30分静置した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.製、TMBと略記)を加えてHRPと反応させ、TMB Stop Solution(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.製)を加えて反応を停止させた。この時のTMB溶液の光学濃度(450nm)をプレートリーダー(SP ECTRAMAX 190、Molecular Devices)により測定し、タンパク質付着量として評価した。

20

図1乃至5に結果を示す。

【0148】

図1乃至5に示したように、コーティングチューブは有機溶媒で処理しても、非コーティングチューブと比べて優れたタンパク質付着抑制能があることが確認できた。また、コーティングチューブは、比較例のチューブと同等以上のタンパク質付着抑制能を示したことから、各種有機溶媒に対する耐性が、比較例のチューブと同等又は優れていると考えられる。特に、凍結保護剤として慣用のDMSOに対する耐性が、比較例のチューブと比べて優れていることが確認できた。

30

【0149】

<実施例2>

上記合成例2で得られた共重合体ワニス10.00gに、1mol/L塩酸(1N)(関東化学(株)製)1.19gと純水26.78g、エタノール62.54gを加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pHは3.5であった。得られたコーティング剤をマイクロチューブ1.5mL(Quality Scientific Plastics社製、材質:ポリプロピレン(PP))に1.5mL入れ、25、1時間静置した。コーティング剤を除去後25、18時間乾燥させた。その後、純水で十分に洗浄を行って、コーティング膜が形成されたマイクロチューブを得た。

40

【0150】

<試験例5>

(タンパク質保管試験)

リン酸緩衝水溶液を用いて10%DMSOを調製した。続いて、FLUORESCEIN-5-isothiocyanate標識牛血清アルブミン(FITC-BSAと略記)を上記希釈溶媒に希釈した。これらタンパク質溶液を上記実施例2のコーティングチューブ及び非コーティングチューブに入れ、-80で1週間保管した。各チューブから回収したタンパク質溶液の蛍光強度をプレートリーダー(Enspire、PerkinElmer)により測定し(Ex.494nm、Em.521nm)、タンパク質の回収量とした。図6に結果を示す。

50

【 0 1 5 1 】

図 6 に示したように、コーティングチューブはタンパク質の回収量が多いことが確認できた。

【 0 1 5 2 】

< 実施例 3 >

上記合成例 2 で得られた共重合体ワニス 10.00g に、1 mol/L 塩酸 (1 N) (関東化学 (株) 製) 1.19g と純水 26.78g、エタノール 62.54g を加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pH は 3.5 であった。得られたコーティング剤を細胞保管用バイアル (Cryogenic Vial, 2.0mL, Thermo SCIENTIFIC、材質: ポリプロピレン製) に 2.0mL 入れ、25℃、1 時間静置した。コーティング剤を除去後 25℃、18 時間乾燥させた。その後、純水で十分に洗浄を行って、コーティング膜が形成された細胞保管用バイアルを得た。

10

【 0 1 5 3 】

< 試験例 6 >

(細胞保管試験)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (和光純薬工業 (株) 製) に 10 (v/v) % DM SO 及び 10 % Fetal Bovine Serum (CORNING) を添加して細胞培養培地を作製した。この培地にマウス胚繊維芽細胞 C3H10T1/2 (DS ファーマバイオメディカル社) を 1×10^5 cell/mL となるように調製し、上記実施例 3 のコーティングバイアルに 1mL 入れた。その後、各バイアルを BIO FREEZING VESSEL BICELL (登録商標) (NIHON FREEZER CO., LTD.) 中に入れ、-80℃ の冷凍庫で 1 週間保管した。保管後、各細胞懸濁液を 37℃ の水浴中で融解させ、細胞懸濁液を 0.4 (w/v) % TrypanBlue Solution (和光純薬工業 (株) 製) と 1:1 で混ぜ、TC20 (商標) Automated Cell Counter (BIORAD) を用いて細胞数を計測した。図 7 に結果を示す。

20

【 0 1 5 4 】

図 7 に示したように、実施例 3 のコーティングバイアルを使用して細胞を -80℃ で保管しても細胞数に関して保管前後で大きな変化はなかった。すなわち、細胞の保管に大きな影響はないことが確認された。

【 0 1 5 5 】

< 実施例 4 >

上記合成例 2 で得られた共重合体ワニス 10.00g に、1 mol/L 塩酸 (1 N) (関東化学 (株) 製) 1.19g と純水 26.78g、エタノール 62.54g を加えて十分に攪拌し、コーティング剤を調製した。pH は 3.5 であった。得られたコーティング剤をプラズマ洗浄処理したステンレス保存容器 50mL (アズワン (株) 製、材質: SUS316) に 1.0mL 入れ、25℃、1 時間静置した。本操作により、主に容器内壁の底面部にコーティングが形成された。コーティング剤を除去後、乾燥工程として 50℃ のオーブンで 24 時間ベークした。その後、純水で十分に洗浄を行って、コーティング膜が形成されたステンレス保存容器を得た。

30

【 0 1 5 6 】

< 試験例 7 >

[ステンレス保存容器のタンパク質付着量評価]

Horseshoe peroxidase (HRP と略記) 標識 Goat Anti-Mouse IgG (Southern Biotech 社製) をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、上記コーティングステンレス保存容器及び非コーティングステンレス保存容器に入れ、室温で 30 分静置した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 製、TMB と略記) を加えて HRP と反応させ、TMB Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 製) を加えて反応を停止させた。この時の TMB 溶液の光学濃度 (450nm) をプレートリーダー (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) により測定し、タンパク質付着量として評価した。図 8 に結果を示す。

40

コーティング有りの保存容器の方が、タンパク質付着量が少ないことが確認された。

50

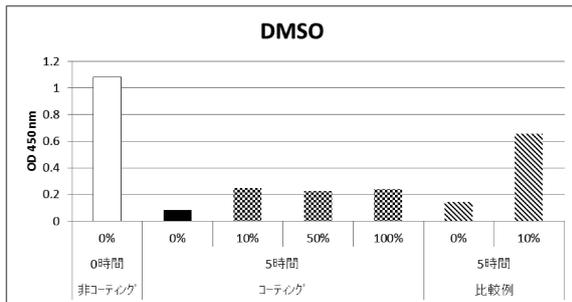
【産業上の利用可能性】

【0157】

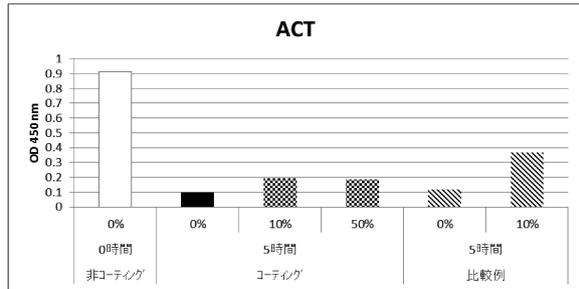
本発明の細胞又はタンパク質の凍結保存用容器は、容器に収容される懸濁液又は溶液に含まれる細胞又はタンパク質が、凍結、保存、融解の各工程において容器の表面（細胞又はタンパク質を含む懸濁液又は溶液と接触し得る表面）に付着することがないので、懸濁液又は溶液から細胞又はタンパク質を効率よく回収することができる。また、本発明の容器が備えるコーティングは、プラスチックなどの樹脂との密着性がよく、容器の表面の少なくとも一部に、容易に形成することができる。さらに、前記コーティングは、水系溶媒への耐性に優れるだけでなく、有機溶剤（例えば、凍結保護剤、特に、ジメチルスルホキシド）への耐性にも優れることから、細胞又はタンパク質の凍結、保存、融解の各工程において安定であり、細胞又はタンパク質に悪影響を及ぼすことが無いため、本発明の細胞又はタンパク質の凍結保存用容器は、各種の凍結保存溶液を用いることができる。

10

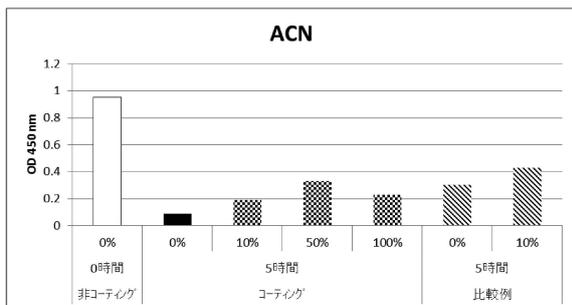
【図1】



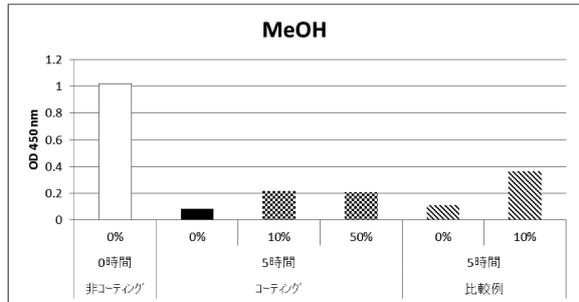
【図3】



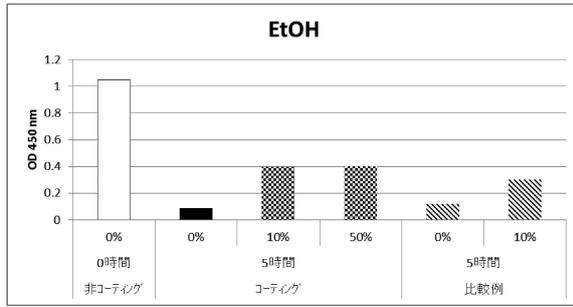
【図2】



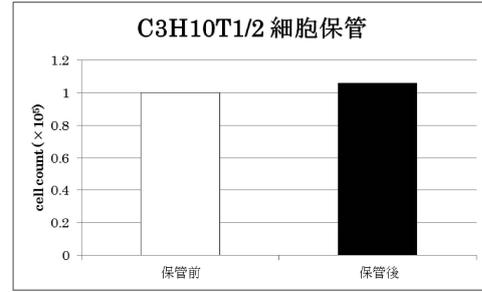
【図4】



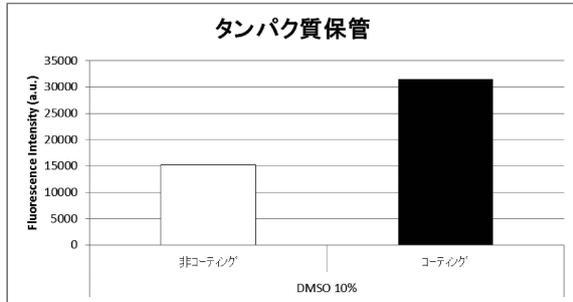
【 図 5 】



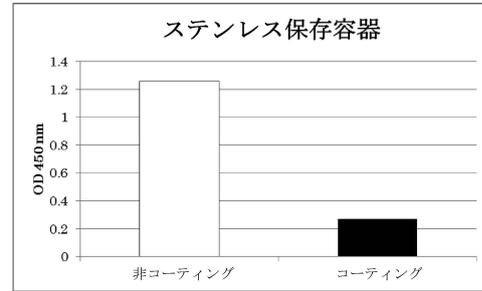
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<i>C 0 8 F 220/54</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F 220/54
<i>C 0 8 F 220/58</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F 220/58
<i>C 0 8 F 220/60</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F 220/60
<i>C 0 8 F 216/02</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F 216/02
<i>C 0 9 D 133/14</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 9 D 133/14

審査官 関 景輔

(56)参考文献 国際公開第2014/196652(WO,A1)
国際公開第2014/196650(WO,A1)
特開2016-059690(JP,A)
特開2015-226497(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C 1 2 M 1 / 1 4
C 0 8 F 2 1 6 / 0 2
C 0 8 F 2 2 0 / 1 2
C 0 8 F 2 2 0 / 2 6
C 0 8 F 2 2 0 / 3 4
C 0 8 F 2 2 0 / 5 4
C 0 8 F 2 2 0 / 5 8
C 0 8 F 2 2 0 / 6 0
C 0 9 D 1 3 3 / 1 4
C 1 2 M 1 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)