

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/021365

発行日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(43) 国際公開日 平成30年2月1日(2018.2.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 M 3/00 Z	4 B 0 6 5
	C 1 2 N 5/071	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

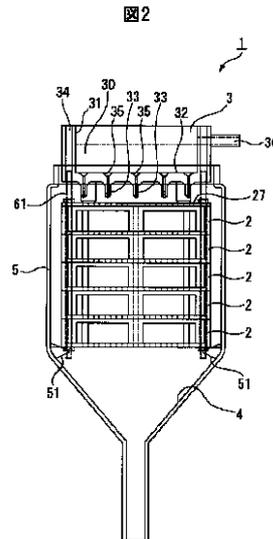
出願番号 特願2018-530325 (P2018-530325)	(71) 出願人 000000206 宇部興産株式会社 山口県宇部市大字小串1978番地の96
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/026945	
(22) 国際出願日 平成29年7月25日(2017.7.25)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-145833 (P2016-145833)	(74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤
(32) 優先日 平成28年7月25日(2016.7.25)	(74) 代理人 100123582 弁理士 三橋 真二
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100128495 弁理士 出野 知
	(74) 代理人 100093665 弁理士 蛭谷 厚志
	(74) 代理人 100173107 弁理士 胡田 尚則
	(74) 代理人 100197169 弁理士 柴田 潤二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養装置、及び、それを使用した細胞培養方法

(57) 【要約】

本発明は、ポリマー多孔質膜と、前記ポリマー多孔質膜が收容された細胞培養部と、前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、を備え、ここで、前記ポリマー多孔質膜が、複数の孔を有する表面層A及び表面層Bと、前記表面層A及び表面層Bの間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層Aに存在する孔の平均孔径は、前記表面層Bに存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層A及びBに結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層A及びBに囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層A及びBにおける孔が前記マクロポイドに連通し、ここで、前記細胞培養部が、1以上の培地排出口を有する底部と、側部とを備えた、細胞培養装置を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリマー多孔質膜と、
前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、
前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、
前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、
を備え、

ここで、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径よりも小さく、
前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層 A 及び B における孔が前記マクロポイドに連通し、

ここで、前記細胞培養部が、1 以上の培地排出口を有する底部と、前記底部に略垂直に配置された側部とを備えた、
細胞培養装置。

【請求項 2】

2 以上の前記細胞培養部が積層された、請求項 1 に記載の細胞培養装置。

【請求項 3】

前記側部が、さらに、1 以上の培地供給口を有する、請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養装置。

【請求項 4】

前記培地回収手段と一端部で連通した培地排出ラインと、
前記培地排出ラインの他端部と連通した培地貯槽と、
前記培地貯槽と一端部で連通した培地供給ラインと、
をさらに備え、

ここで、前記培地供給ラインの他端部が、前記培地供給手段と連通されており、培地が循環することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 5】

さらに、前記培地貯槽内の培地を前記培地供給手段へ汲み上げるポンプを備えた、請求項 4 に記載の細胞培養装置。

【請求項 6】

前記培地回収手段が、漏斗状である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 7】

前記培地供給手段が、培地貯留部と、前記培地貯留部の底部に設けられた 2 以上の培地滴下ノズルとを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 8】

前記培地供給手段が、液滴化培地供給手段である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 9】

前記細胞培養部を収容する外筒をさらに備え、
ここで、前記培地供給手段が、前記外筒内であって、かつ、前記細胞培養部の上部に配置され、

ここで、前記培地回収手段が、前記外筒内であって、かつ、前記細胞培養部の下部に配置されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 10】

前記ポリマー多孔質膜が、
i) 折り畳まれて、
ii) ロール状に巻き込まれて、

10

20

30

40

50

- i i i) シートもしくは小片を糸状の構造体で連結されて、
- i v) 縄状に結まれて、及び / 又は
- v) 2以上が積層されて、

前記細胞培養部に収容されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 1】

前記ポリマー多孔質膜が、ケーシングを備えたモジュール化ポリマー多孔質膜であって

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、

(i) 2 以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が、集約されて、

(i i) 前記ポリマー多孔質膜が、折り畳まれて、

(i i i) 前記ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、及び / 又は、

(i v) 前記ポリマー多孔質膜が、縄状に結ばれて、

前記ケーシング内に収容されたものであって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、前記細胞培養部に収容されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 2】

前記ポリマー多孔質膜が、平均孔径 $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の複数の細孔を有する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 3】

前記表面層 A の平均孔径が、 $0.01 \sim 50 \mu\text{m}$ である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 4】

前記表面層 B の平均孔径が、 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 5】

前記ポリマー多孔質膜の総膜厚が、 $5 \sim 500 \mu\text{m}$ である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 6】

前記ポリマー多孔質膜が、ポリイミド多孔質膜である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 7】

前記ポリイミド多孔質膜が、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミドを含む、ポリイミド多孔質膜である、請求項 1 6 に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 8】

前記ポリイミド多孔質膜が、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリアミック酸溶液と着色前駆体とを含むポリアミック酸溶液組成物を成形した後、 250 以上で熱処理することにより得られる着色したポリイミド多孔質膜である、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の細胞培養装置。

【請求項 1 9】

前記ポリマー多孔質膜が、ポリエーテルスルホン (P E S) 多孔質膜である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置を使用する、細胞の培養方法。

【請求項 2 1】

ポリマー多孔質膜と、

前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、

前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、

前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、

を備え、

ここで、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に

10

20

30

40

50

挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層 A 及び B における孔が前記マクロポイドに連通し、

ここで、前記培地回収手段が、前記細胞培養部を収容する外筒の一部である、細胞培養装置。

【請求項 2 2】

前記培地供給手段が、液滴化培地供給手段である、請求項 2 1 に記載の細胞培養装置。

【請求項 2 3】

前記ポリマー多孔質膜が、ケーシングを備えたモジュール化ポリマー多孔質膜であって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、

(i) 2 以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が、集約されて、

(i i) 前記ポリマー多孔質膜が、折り畳まれて、

(i i i) 前記ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、及び / 又は、

(i v) 前記ポリマー多孔質膜が、縄状に結ばれて、

前記ケーシング内に収容されたものであって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、前記細胞培養部に載置されている、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の細胞培養装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリマー多孔質膜を備えた細胞培養装置に関する。また、ポリマー多孔質膜を備えた細胞培養装置を使用した細胞培養方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、治療やワクチンに用いられる酵素、ホルモン、抗体、サイトカイン、ウイルス（ウイルスタンパク質）等のタンパク質が培養細胞を用いて工業的に産生されている。しかし、こうしたタンパク質の生産技術はコストが高く、それが医療費を引き上げていた。そのため、大幅なコスト削減を目指して、高密度に細胞を培養する技術や、タンパク質の産生量を増大させるような革新的な技術が求められていた。

【0003】

タンパク質を産生させる細胞として、培養基材に接着する足場依存性の接着細胞が用いられることがある。こうした細胞は、足場依存的に増殖するため、シャーレ、プレート又はチャンバーの表面に接着させて培養する必要がある。従来、こうした接着細胞を大量に培養するためには、接着するための表面積を大きくする必要があった。ところが、培養面積を大きくするには、空間を必然的に増大させる必要があり、それがコストを増大させる要因となっていた。

【0004】

培養空間を小さくしつつ、接着細胞を大量に培養する方法として、微小多孔を有する担体、特に、マイクロキャリアを用いた培養法が開発されている（例えば、特許文献 1）。マイクロキャリアを用いた細胞培養系は、マイクロキャリアが互いに凝集しないようにするために十分に攪拌・拡散される必要がある。そのため、マイクロキャリアを分散させた培地を十分に攪拌・拡散することができるだけの容積が必要となるため、培養できる細胞の密度には上限がある。また、マイクロキャリアと培地とを分離するためには、細かな粒子を分別できるフィルターで分離させる必要があり、それがコストを増大させる原因ともなっていた。こうした状況から、高密度の細胞を培養する革新的な細胞培養の方法論が希求されていた。

【0005】

10

20

30

40

50

< ポリイミド多孔質膜 >

ポリイミド多孔質膜は、本出願前よりフィルター、低誘電率フィルム、燃料電池用電解質膜など、特に電池関係を中心とする用途のために利用されてきた。特許文献 2 ~ 4 は、特に、気体などの物質透過性に優れ、空孔率の高い、両表面の平滑性が優れ、相対的に強度が高く、高空孔率にもかかわらず、膜厚み方向への圧縮応力に対する耐力に優れるマクロポイドを多数有するポリイミド多孔質膜を記載している。これらはいずれも、アミック酸を経由して作成されたポリイミド多孔質膜である。

【 0 0 0 6 】

細胞をポリイミド多孔質膜に適用して培養することを含む、細胞の培養方法が報告されている（特許文献 5）。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 3 / 0 5 4 1 7 4 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 8 8 7 3 号

【 特許文献 3 】 特開 2 0 1 1 - 2 1 9 5 8 5 号公報

【 特許文献 4 】 特開 2 0 1 1 - 2 1 9 5 8 6 号公報

【 特許文献 5 】 国際公開第 2 0 1 5 / 0 1 2 4 1 5 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、ポリマー多孔質膜を備えた細胞培養装置を提供することを目的とする。また、本発明は、ポリマー多孔質膜を備えた細胞培養装置を使用した細胞培養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 】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、所定の構造を有するポリマー多孔質膜が、細胞を大量に培養可能な最適な空間を提供するのみならず、乾燥に強い湿潤環境を提供することを見出し、細胞を気相暴露して培養する装置及びそれを使用する培養方法を完成させた。すなわち、限定されるわけではないが、本発明は好ましくは以下の態様を含む。

【 0 0 1 0 】

[1] ポリマー多孔質膜と、前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、を備え、

ここで、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層 A 及び B における孔が前記マクロポイドに連通し、

ここで、前記細胞培養部が、1 以上の培地排出口を有する底部と、前記底部に略垂直に配置された側部とを有する、細胞培養装置。

[2] 2 以上の前記細胞培養部が積層された、[1] に記載の細胞培養装置。

[3] 前記側部が、さらに、1 以上の培地供給口を有する、[1] 又は [2] に記載の細胞培養装置。

[4] 前記培地回収手段と培地排出ラインで連通した培地排出ラインと、前記培地排出ラインの他端部と連通した培地貯槽と、前記培地貯槽と一端部で連通した培地供給ラインと、をさらに備え、

ここで、前記培地供給ラインの他端部が、前記培地供給手段と連通されており、培地が循環することを特徴とする、[1] ~ [3] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

10

20

30

40

50

[5] さらに、前記培地貯槽内の培地を前記培地供給手段へ汲み上げるポンプを備えた、[1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[6] 前記培地回収手段が、漏斗状である、[1] ~ [5] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[7] 前記培地供給手段が、培地貯留部と、前記培地貯留部の底部に設けられた 2 以上の培地滴下ノズルとを有する、[1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[8] 前記培地供給手段が、液滴化培地供給手段である、[1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[9] 前記細胞培養部を収容する外筒をさらに備え、

ここで、前記培地供給手段が、前記外筒内であって、かつ、前記細胞培養部の上部に配置され、

ここで、前記培地回収手段が、前記外筒内であって、かつ、前記細胞培養部の下部に配置されている、[1] ~ [8] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[10] 前記ポリマー多孔質膜が、

i) 折り畳まれて、

ii) ロール状に巻き込まれて、

iii) シートもしくは小片を糸状の構造体で連結されて、

iv) 縄状に結まれて、及び / 又は

v) 2 以上が積層されて、

前記細胞培養部に収容されている、[1] ~ [9] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置

[11] 前記ポリマー多孔質膜が、ケーシングを備えたモジュール化ポリマー多孔質膜であって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、

(i) 2 以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が、集約されて、

(ii) 前記ポリマー多孔質膜が、折り畳まれて、

(iii) 前記ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、及び / 又は、

(iv) 前記ポリマー多孔質膜が、縄状に結ばれて、

前記ケーシング内に収容されたものであって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、前記細胞培養部に収容されている、[1] ~ [9] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[12] 前記ポリマー多孔質膜が、平均孔径 $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の複数の細孔を有する、[1] ~ [11] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[13] 前記表面層 A の平均孔径が、 $0.01 \sim 50 \mu\text{m}$ である、[1] ~ [12] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[14] 前記表面層 B の平均孔径が、 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ である、[1] ~ [13] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[15] 前記ポリマー多孔質膜の総膜厚が、 $5 \sim 500 \mu\text{m}$ である、[1] ~ [14] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[16] 前記ポリマー多孔質膜が、ポリイミド多孔質膜である、[1] ~ [15] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[17] 前記ポリイミド多孔質膜が、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミドを含む、ポリイミド多孔質膜である、[16] に記載の細胞培養装置。

[18] 前記ポリイミド多孔質膜が、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリアミック酸溶液と着色前駆体とを含むポリアミック酸溶液組成物を成形した後、 250 以上で熱処理することにより得られる着色したポリイミド多孔質膜である、[16] 又は [17] に記載の細胞培養装置。

[19] 前記ポリマー多孔質膜が、ポリエーテルスルホン (P E S) 多孔質膜である、[1] ~ [15] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

【 0011 】

10

20

30

40

50

[2 0] [1] ~ [1 9] のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置を使用する、細胞の培養方法。

【 0 0 1 2 】

[2 1] ポリマー多孔質膜と、
前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、
前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、
前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、
を備え、

ここで、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層 A 及び B における孔が前記マクロポイドに連通し、

ここで、前記培地回収手段が、前記細胞培養部を収容する外筒の一部である、細胞培養装置。

[2 2] 前記培地供給手段が、液滴化培地供給手段である、[2 1] に記載の細胞培養装置。

[2 3] 前記ポリマー多孔質膜が、ケーシングを備えたモジュール化ポリマー多孔質膜であって、

- ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、
- (i) 2 以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が、集約されて、
- (i i) 前記ポリマー多孔質膜が、折り置かれて、
- (i i i) 前記ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、及び / 又は、
- (i v) 前記ポリマー多孔質膜が、縄状に結ばれて、

前記ケーシング内に収容されたものであって、

ここで、前記モジュール化ポリマー多孔質膜が、前記細胞培養部に載置されている、[2 1] 又は [2 2] に記載の細胞培養装置。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 3 】

本発明は、細胞培養担体としてポリマー多孔質膜を用いることにより、培養スペースを削減可能である。また、本発明の細胞培養装置を採用することにより、培地の量が少ない条件下でも、簡便かつ効率的な細胞培養を可能とする。さらに、本発明で使用されるポリマー多孔質膜は微親水性の多孔質特性を有し、ポリマー多孔質膜内に安定的に液を保持することができるため、乾燥に強い湿潤環境を提供する。そのため、従来の細胞培養装置と比較しても極めて少量の培地でも、細胞の生存及び増殖を達成することができる。さらにまた、ポリマー多孔質膜の一部又はすべてが空気に露出した状態であっても培養が可能であり、細胞に対して効率的に酸素を供給することが可能であり、大量の細胞の培養に適している。

【 0 0 1 4 】

本発明の細胞培養装置を採用すれば、用いる培地の量を極めて少なくすることができる。また、本発明の細胞培養装置に使用されるポリマー多孔質膜は、気相中に露出させながら培養可能であるため、ポリマー多孔質膜に担持された細胞への酸素供給は拡散によって十分に行われる。したがって、本発明の細胞培養装置は、別途酸素供給手段を必要としない。さらにまた、本発明の細胞培養装置は、任意の方向から液滴化した培地をポリマー多孔質膜へ供給するための供給手段を有しているため、ポリマー多孔質膜や細胞培養モジュールの任意の部位に存在する細胞に対し均質な培地を供給する事ができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、実施形態における細胞培養部を示す図である。上は平面図、下は側面図

10

20

30

40

50

を示す。

【図 2】図 2 は、実施形態における細胞培養装置の構成例を示す断面図である。

【図 3】図 3 は、実施形態における培地供給手段を示す図である。(A) 平面図、(B) 断面図、(C) 斜視図。

【図 4】図 4 は、実施形態における細胞培養装置の構成例を示す斜視図である。

【図 5】図 5 は、実施形態における細胞培養装置の構成例を示す断面図である。

【図 6】図 6 は、ポリマー多孔質膜を用いた細胞培養のモデル図を示す。

【図 7】図 7 は、一実施形態における細胞培養装置の構成例を示す図である。

【図 8】図 8 は、一実施形態の細胞培養装置における、液滴化培地供給手段から滴下される培地の様式を示す概念図である。(A) ドロップ型、(B) メッシュ型、(C) シャワー型を示す。(D) ドロップ型及びメッシュ型の液滴を供給するために使用される、外筒蓋体の構成を示す図である。外筒蓋体の培地供給口には、ステンレス鋼製のメッシュを巻いて形成したメッシュ束が挿入される。

10

【図 9】図 9 は、一実施形態における細胞培養装置の構成例を示す図である。(A) 細胞培養装置の概要図、(B) 実際の細胞培養装置の外観を示す写真である。

【図 10】図 10 は、一実施形態における細胞培養装置に適用されるモジュール化ポリマー多孔質膜を示す図である。

【図 11】図 11 は、実施例 6 において示される、一実施態様の本発明の細胞培養装置を使用した場合の、ヒト皮膚線維芽細胞から産生されるフィブロネクチンの量を示したグラフである。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明の実施形態について、必要に応じて図面を参照しながら説明する。実施形態の構成は例示であり、本発明の構成は、実施形態の具体的構成に限定されない。

【0017】

1. ポリマー多孔質膜

本発明で使用されるポリマー多孔質膜中の表面層 A (以下で、「A 面」又は「メッシュ面」とも呼ぶ) に存在する孔の平均孔径は、特に限定されないが、例えば、 $0.01 \mu\text{m}$ 以上 $200 \mu\text{m}$ 未満、 $0.01 \sim 150 \mu\text{m}$ 、 $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $0.01 \sim 50 \mu\text{m}$ 、 $0.01 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ 、 $0.01 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ 、 $0.01 \mu\text{m} \sim 20 \mu\text{m}$ 、又は $0.01 \mu\text{m} \sim 15 \mu\text{m}$ であり、好ましくは、 $0.01 \mu\text{m} \sim 15 \mu\text{m}$ である。

30

【0018】

本発明で使用されるポリマー多孔質膜中の表面層 B (以下で、「B 面」又は「大穴面」とも呼ぶ) に存在する孔の平均孔径は、表面層 A に存在する孔の平均孔径よりも大きい限り特に限定されないが、例えば、 $5 \mu\text{m}$ 超 $200 \mu\text{m}$ 以下、 $20 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $40 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 、又は $60 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ であり、好ましくは、 $20 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ である。

【0019】

ポリマー多孔質膜表面の平均孔径は、多孔質膜表面の走査型電子顕微鏡写真より、 200 点以上の開孔部について孔面積を測定し、該孔面積の平均値から下式(1)に従って孔の形状が真円であるとした際の平均直径を計算より求めることができる。

40

【数 1】

$$\text{平均孔径} = 2 \times \sqrt{(S_a / \pi)} \quad (1)$$

(式中、 S_a は孔面積の平均値を意味する。)

【0020】

50

表面層 A 及び B の厚さは、特に限定されないが、例えば 0.01 ~ 50 μm であり、好ましくは 0.01 ~ 20 μm である。

【0021】

ポリマー多孔質膜におけるマクロポイド層中のマクロポイドの膜平面方向の平均孔径は、特に限定されないが、例えば 10 ~ 500 μm であり、好ましくは 10 ~ 100 μm であり、より好ましくは 10 ~ 80 μm である。また、当該マクロポイド層中の隔壁の厚さは、特に限定されないが、例えば 0.01 ~ 50 μm であり、好ましくは、0.01 ~ 20 μm である。一の実施形態において、当該マクロポイド層中の少なくとも 1 つの隔壁は、隣接するマクロポイド同士を連通する、平均孔径 0.01 ~ 100 μm の、好ましくは 0.01 ~ 50 μm の、1 つ又は複数の孔を有する。別の実施形態において、当該マクロポイド層中の隔壁は孔を有さない。

10

【0022】

本発明で使用されるポリマー多孔質膜表面の総膜厚は、特に限定されないが、5 μm 以上、10 μm 以上、20 μm 以上又は 25 μm 以上であってもよく、500 μm 以下、300 μm 以下、100 μm 以下、75 μm 以下又は 50 μm 以下であってもよい。好ましくは、5 ~ 500 μm であり、より好ましくは 25 ~ 75 μm である。

【0023】

本発明で使用されるポリマー多孔質膜の膜厚の測定は、接触式の厚み計で行うことができる。

【0024】

本発明で使用されるポリマー多孔質膜の空孔率は特に限定されないが、例えば、40% 以上 95% 未満である。

20

【0025】

本発明において用いられるポリマー多孔質膜の空孔率は、所定の大きさに切り取った多孔質フィルムの膜厚及び質量を測定し、目付質量から下式(2)に従って求めることができる。

【数2】

$$\text{空孔率 (\%)} = (1 - w / (S \times d \times D)) \times 100 \quad (2)$$

30

(式中、S は多孔質フィルムの面積、d は総膜厚、w は測定した質量、D はポリマーの密度をそれぞれ意味する。ポリマーがポリイミドである場合は、密度は 1.34 g/cm³ とする。)

【0026】

本発明において用いられるポリマー多孔質膜は、好ましくは、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は 0.01 μm ~ 15 μm であり、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径は 20 μm ~ 100 μm であり、前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記マクロポイド層の隔壁、並びに前記表面層 A 及び B の厚さは 0.01 ~ 20 μm であり、前記表面層 A 及び B における孔がマクロポイドに連通しており、総膜厚が 5 ~ 500 μm であり、空孔率が 40% 以上 95% 未満である、ポリマー多孔質膜である。一の実施形態において、マクロポイド層中の少なくとも 1 つの隔壁は、隣接するマクロポイド同士を連通する、平均孔径 0.01 ~ 100 μm の、好ましくは 0.01 ~ 50 μm の、1 つ又は複数の孔を有する。別の実施形態において、隔壁は、そのような孔を有さない。

40

【0027】

本発明において用いられるポリマー多孔質膜は、滅菌されていることが好ましい。滅菌

50

処理としては、特に限定されないが、乾熱滅菌、蒸気滅菌、エタノール等消毒剤による滅菌、紫外線やガンマ線等の電磁波滅菌等任意の滅菌処理などが挙げられる。

【0028】

本発明で使用されるポリマー多孔質膜は、上記した構造的特徴を備える限り、特に限定されないが、好ましくはポリイミド多孔質膜、又はポリエーテルスルホン（PES）多孔質膜である。

【0029】

1-1. ポリイミド多孔質膜

ポリイミドとは、繰り返し単位にイミド結合を含む高分子の総称であり、通常は、芳香族化合物が直接イミド結合で連結された芳香族ポリイミドを意味する。芳香族ポリイミドは芳香族と芳香族とがイミド結合を介して共役構造を持つため、剛直で強固な分子構造を持ち、かつ、イミド結合が強い分子間力を持つために非常に高いレベルの熱的、機械的、化学的性質を有する。

10

【0030】

本発明で使用され得るポリイミド多孔質膜は、好ましくは、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミドを（主たる成分として）含むポリイミド多孔質膜であり、より好ましくはテトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミドからなるポリイミド多孔質膜である。「主たる成分として含む」とは、ポリイミド多孔質膜の構成成分として、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミド以外の成分は、本質的に含まない、あるいは含まれていてもよいが、テトラカルボン酸二無水物とジアミンとから得られるポリイミドの性質に影響を与えない付加的な成分であることを意味する。

20

【0031】

一実施形態において、本発明で使用され得るポリイミド多孔質膜は、テトラカルボン酸成分とジアミン成分とから得られるポリアミック酸溶液と着色前駆体とを含むポリアミック酸溶液組成物を成形した後、250 以上で熱処理することにより得られる着色したポリイミド多孔質膜も含まれる。

【0032】

ポリアミック酸は、テトラカルボン酸成分とジアミン成分とを重合して得られる。ポリアミック酸は、熱イミド化又は化学イミド化することにより閉環してポリイミドとすることができるポリイミド前駆体である。

30

【0033】

ポリアミック酸は、アミック酸の一部がイミド化していても、本発明に影響を及ぼさない範囲であればそれを用いることができる。すなわち、ポリアミック酸は、部分的に熱イミド化又は化学イミド化されていてもよい。

【0034】

ポリアミック酸を熱イミド化する場合は、必要に応じて、イミド化触媒、有機リン含有化合物、無機微粒子、有機微粒子等の微粒子等をポリアミック酸溶液に添加することができる。また、ポリアミック酸を化学イミド化する場合は、必要に応じて、化学イミド化剤、脱水剤、無機微粒子、有機微粒子等の微粒子等をポリアミック酸溶液に添加することができる。ポリアミック酸溶液に前記成分を配合しても、着色前駆体が析出しない条件で行うことが好ましい。

40

【0035】

本明細書において、「着色前駆体」とは、250 以上の熱処理により一部または全部が炭化して着色化合物を生成する前駆体を意味する。

【0036】

上記ポリイミド多孔質膜の製造において使用され得る着色前駆体としては、ポリアミック酸溶液又はポリイミド溶液に均一に溶解または分散し、250 以上、好ましくは260 以上、更に好ましくは280 以上、より好ましくは300 以上の熱処理、好ましくは空気等の酸素存在下での250 以上、好ましくは260 以上、更に好ましくは2

50

80 以上、より好ましくは300 以上の熱処理により熱分解し、炭化して着色化物を生成するものが好ましく、黒色系の着色化物を生成するものがより好ましく、炭素系着色前駆体がより好ましい。

【0037】

着色前駆体は、加熱していくと一見炭素化物に見えるものになるが、組織的には炭素以外の異元素を含み、層構造、芳香族架橋構造、四面体炭素を含む無秩序構造のものを含む。

【0038】

炭素系着色前駆体は特に制限されず、例えば、石油タール、石油ピッチ、石炭タール、石炭ピッチ等のタール又はピッチ、コークス、アクリロニトリルを含むモノマーから得られる重合体、フェロセン化合物（フェロセン及びフェロセン誘導体）等が挙げられる。これらの中では、アクリロニトリルを含むモノマーから得られる重合体及び/又はフェロセン化合物が好ましく、アクリロニトリルを含むモノマーから得られる重合体としてはポリアクリルニトリルが好ましい。

【0039】

また、別の実施形態において、本発明で使用され得るポリイミド多孔質膜は、上記の着色前駆体を使用せずに、テトラカルボン酸成分とジアミン成分とから得られるポリアミック酸溶液を成形した後、熱処理することにより得られる、ポリイミド多孔質膜も含まれる。

【0040】

着色前駆体を使用せずに製造されるポリイミド多孔質膜は、例えば、極限粘度数が1.0~3.0であるポリアミック酸3~60質量%と有機極性溶媒40~97質量%とからなるポリアミック酸溶液をフィルム状に流延し、水を必須成分とする凝固溶媒に浸漬又は接触させて、ポリアミック酸の多孔質膜を作製し、その後当該ポリアミック酸の多孔質膜を熱処理してイミド化することにより製造されてもよい。この方法において、水を必須成分とする凝固溶媒が、水であるか、又は5質量%以上100質量%未満の水と0質量%を超え95質量%以下の有機極性溶媒との混合液であってもよい。また、上記イミド化の後、得られた多孔質ポリイミド膜の少なくとも片面にプラズマ処理を施してもよい。

【0041】

上記ポリイミド多孔質膜の製造において使用され得るテトラカルボン酸二無水物は、任意のテトラカルボン酸二無水物を用いることができ、所望の特性などに応じて適宜選択することができる。テトラカルボン酸二無水物の具体例として、ピロメリット酸二無水物、3,3',4,4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物(s-BPDA)、2,3,3',4'-ビフェニルテトラカルボン酸二無水物(a-BPDA)などのビフェニルテトラカルボン酸二無水物、オキシジフタル酸二無水物、ジフェニルスルホン-3,4,3',4'-テトラカルボン酸二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)スルフィド二無水物、2,2-ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)-1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロプロパン二無水物、2,3,3',4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、3,3',4,4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物、ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)メタン二無水物、2,2-ビス(3,4-ジカルボキシフェニル)プロパン二無水物、p-フェニレンビス(トリメリット酸モノエステル酸無水物)、p-ビフェニレンビス(トリメリット酸モノエステル酸無水物)、m-ターフェニル-3,4,3',4'-テトラカルボン酸二無水物、p-ターフェニル-3,4,3',4'-テトラカルボン酸二無水物、1,3-ビス(3,4-ジカルボキシフェノキシ)ベンゼン二無水物、1,4-ビス(3,4-ジカルボキシフェノキシ)ベンゼン二無水物、1,4-ビス(3,4-ジカルボキシフェノキシ)ビフェニル二無水物、2,2-ビス[(3,4-ジカルボキシフェノキシ)フェニル]プロパン二無水物、2,3,6,7-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物、4,4'-(2,2-ヘキサフルオロイソプロピリデン)ジフタル酸二無水物等を挙げることができる。また、2,3,3',4'-ジフェニルスルホンテトラカルボン

10

20

30

40

50

酸等の芳香族テトラカルボン酸を用いることも好ましい。これらは単独でも、2種以上を組み合わせることもできる。

【0042】

これらの中でも、特に、ピフェニルテトラカルボン酸二無水物及びピロメリット酸二無水物からなる群から選ばれる少なくとも一種の芳香族テトラカルボン酸二無水物が好ましい。ピフェニルテトラカルボン酸二無水物としては、3, 3', 4, 4'-ピフェニルテトラカルボン酸二無水物を好適に用いることができる。

【0043】

上記ポリイミド多孔質膜の製造において使用され得るジアミンは、任意のジアミンを用いることができる。ジアミンの具体例として、以下のものを挙げる事ができる。

1) 1, 4-ジアミノベンゼン(パラフェニレンジアミン)、1, 3-ジアミノベンゼン、2, 4-ジアミノトルエン、2, 6-ジアミノトルエンなどのベンゼン核1つのベンゼンジアミン；

2) 4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル、3, 4'-ジアミノジフェニルエーテルなどのジアミノジフェニルエーテル、4, 4'-ジアミノジフェニルメタン、3, 3'-ジメチル-4, 4'-ジアミノピフェニル、2, 2'-ジメチル-4, 4'-ジアミノピフェニル、2, 2'-ビス(トリフルオロメチル)-4, 4'-ジアミノピフェニル、3, 3'-ジメチル-4, 4'-ジアミノジフェニルメタン、3, 3'-ジカルボキシ-4, 4'-ジアミノジフェニルメタン、3, 3', 5, 5'-テトラメチル-4, 4'-ジアミノジフェニルメタン、ビス(4-アミノフェニル)スルフィド、4, 4'-ジアミノベンズアニリド、3, 3'-ジクロロベンジジン、3, 3'-ジメチルベンジジン、2, 2'-ジメチルベンジジン、3, 3'-ジメトキシベンジジン、2, 2'-ジメトキシベンジジン、3, 3'-ジアミノジフェニルエーテル、3, 4'-ジアミノジフェニルエーテル、4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル、3, 3'-ジアミノジフェニルスルフィド、3, 4'-ジアミノジフェニルスルフィド、4, 4'-ジアミノジフェニルスルフィド、3, 3'-ジアミノジフェニルスルホン、3, 4'-ジアミノジフェニルスルホン、4, 4'-ジアミノジフェニルスルホン、3, 3'-ジアミノベンゾフェノン、3, 3'-ジアミノ-4, 4'-ジクロロベンゾフェノン、3, 3'-ジアミノ-4, 4'-ジメトキシベンゾフェノン、3, 3'-ジアミノジフェニルメタン、3, 4'-ジアミノジフェニルメタン、4, 4'-ジアミノジフェニルメタン、2, 2'-ビス(3-アミノフェニル)プロパン、2, 2'-ビス(4-アミノフェニル)プロパン、2, 2'-ビス(3-アミノフェニル)-1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン、2, 2'-ビス(4-アミノフェニル)-1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロプロパン、3, 3'-ジアミノジフェニルスルホキシド、3, 4'-ジアミノジフェニルスルホキシド、4, 4'-ジアミノジフェニルスルホキシドなどのベンゼン核2つのジアミン；

3) 1, 3-ビス(3-アミノフェニル)ベンゼン、1, 3-ビス(4-アミノフェニル)ベンゼン、1, 4-ビス(3-アミノフェニル)ベンゼン、1, 4-ビス(4-アミノフェニル)ベンゼン、1, 3-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゼン、1, 4-ビス(3-アミノフェノキシ)ベンゼン、1, 4-ビス(4-アミノフェノキシ)ベンゼン、1, 3-ビス(3-アミノフェノキシ)-4-トリフルオロメチルベンゼン、3, 3'-ジアミノ-4-(4-フェニル)フェノキシベンゾフェノン、3, 3'-ジアミノ-4, 4'-ジ(4-フェニルフェノキシ)ベンゾフェノン、1, 3-ビス(3-アミノフェニルスルフィド)ベンゼン、1, 3-ビス(4-アミノフェニルスルフィド)ベンゼン、1, 4-ビス(4-アミノフェニルスルフィド)ベンゼン、1, 3-ビス(3-アミノフェニルスルホン)ベンゼン、1, 3-ビス(4-アミノフェニルスルホン)ベンゼン、1, 4-ビス(4-アミノフェニルスルホン)ベンゼン、1, 3-ビス[2-(4-アミノフェニル)イソプロピル]ベンゼン、1, 4-ビス[2-(3-アミノフェニル)イソプロピル]ベンゼン、1, 4-ビス[2-(4-アミノフェニル)イソプロピル]ベンゼンなどのベンゼン核3つのジアミン；

4) 3, 3'-ビス(3-アミノフェノキシ)ピフェニル、3, 3'-ビス(4-アミ

10

20

30

40

50

ノフェノキシ)ピフェニル、4, 4' - ビス(3 - アミノフェノキシ)ピフェニル、4, 4' - ビス(4 - アミノフェノキシ)ピフェニル、ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]エーテル、ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]エーテル、ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]エーテル、ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]エーテル、ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]ケトン、ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]ケトン、ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]ケトン、ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]ケトン、ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]スルフィド、ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]スルフィド、ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]スルフィド、ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]スルフィド、ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]スルホン、ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]スルホン、ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]スルホン、ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]スルホン、ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]メタン、ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]メタン、ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]メタン、ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]メタン、2, 2 - ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]プロパン、2, 2 - ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]プロパン、2, 2 - ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル]プロパン、2, 2 - ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル]プロパン、2, 2 - ビス[3 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル] - 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロプロパン、2, 2 - ビス[3 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル] - 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロプロパン、2, 2 - ビス[4 - (3 - アミノフェノキシ)フェニル] - 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロプロパン、2, 2 - ビス[4 - (4 - アミノフェノキシ)フェニル] - 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロプロパンなどのベンゼン核4つのジアミン。

10

20

40

50

【0044】

これらは単独でも、2種以上を混合して用いることもできる。用いるジアミンは、所望の特性などに応じて適宜選択することができる。

【0045】

これらの中でも、芳香族ジアミン化合物が好ましく、3, 3' - ジアミノジフェニルエーテル、3, 4' - ジアミノジフェニルエーテル、4, 4' - ジアミノジフェニルエーテル及びパラフェニレンジアミン、1, 3 - ビス(3 - アミノフェニル)ベンゼン、1, 3 - ビス(4 - アミノフェニル)ベンゼン、1, 4 - ビス(3 - アミノフェニル)ベンゼン、1, 4 - ビス(4 - アミノフェニル)ベンゼン、1, 3 - ビス(4 - アミノフェノキシ)ベンゼン、1, 4 - ビス(3 - アミノフェノキシ)ベンゼンを好適に用いることができる。特に、ベンゼンジアミン、ジアミノジフェニルエーテル及びビス(アミノフェノキシ)フェニルからなる群から選ばれる少なくとも一種のジアミンが好ましい。

30

【0046】

本発明で使用され得るポリイミド多孔質膜は、耐熱性、高温下での寸法安定性の観点から、ガラス転移温度が240 以上であるか、又は300 以上で明確な転移点がないテトラカルボン酸二無水物とジアミンとを組み合わせ得られるポリイミドから形成されていることが好ましい。

【0047】

本発明で使用され得るポリイミド多孔質膜は、耐熱性、高温下での寸法安定性の観点から、以下の芳香族ポリイミドからなるポリイミド多孔質膜であることが好ましい。

(i) ビフェニルテトラカルボン酸単位及びピロメリット酸単位からなる群から選ばれる少なくとも一種のテトラカルボン酸単位と、芳香族ジアミン単位とからなる芳香族ポリイミド、

(ii) テトラカルボン酸単位と、ベンゼンジアミン単位、ジアミノジフェニルエーテル単位及びビス(アミノフェノキシ)フェニル単位からなる群から選ばれる少なくとも一種の芳香族ジアミン単位とからなる芳香族ポリイミド、

及び/又は、

(i i i) ピフェニルテトラカルボン酸単位及びピロメリット酸単位からなる群から選ばれる少なくとも一種のテトラカルボン酸単位と、ベンゼンジアミン単位、ジアミノジフェニルエーテル単位及びビス(アミノフェノキシ)フェニル単位からなる群から選ばれる少なくとも一種の芳香族ジアミン単位とからなる芳香族ポリイミド。

【0048】

本発明において用いられるポリイミド多孔質膜は、好ましくは、複数の孔を有する表面層A及び表面層Bと、前記表面層A及び表面層Bの間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリイミド多孔質膜であって、ここで前記表面層Aに存在する孔の平均孔径は $0.01\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ であり、前記表面層Bに存在する孔の平均孔径は $20\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ であり、前記マクロポイド層は、前記表面層A及びBに結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層A及びBに囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記マクロポイド層の隔壁、並びに前記表面層A及びBの厚さは $0.01 \sim 20\mu\text{m}$ であり、前記表面層A及びBにおける孔がマクロポイドに連通しており、総膜厚が $5 \sim 500\mu\text{m}$ であり、空孔率が40%以上95%未満である、ポリイミド多孔質膜である。ここで、マクロポイド層中の少なくとも1つの隔壁は、隣接するマクロポイド同士を連通する、平均孔径 $0.01 \sim 100\mu\text{m}$ の、好ましくは $0.01 \sim 50\mu\text{m}$ の、1つ又は複数の孔を有する。

10

【0049】

例えば、国際公開第2010/038873号、特開2011-219585号公報、又は特開2011-219586号公報に記載されているポリイミド多孔質膜も、本発明に使用可能である。

20

【0050】

1-2. ポリエーテルスルホン(PES)多孔質膜

本発明で使用され得るPES多孔質膜は、ポリエーテルスルホンを含み、典型的には実質的にポリエーテルスルホンからなる。ポリエーテルスルホンは当業者に公知の方法で合成されたものであってよく、例えば、二価フェノール、アルカリ金属化合物及びジハロゲノジフェニル化合物を有機極性溶媒中で重縮合反応させる方法、二価フェノールのアルカリ金属二塩を予め合成しジハロゲノジフェニル化合物と有機極性溶媒中で重縮合反応させる方法等によって製造できる。

【0051】

アルカリ金属化合物としては、アルカリ金属炭酸塩、アルカリ金属水酸化物、アルカリ金属水素化物、アルカリ金属アルコキシド等が挙げられる。特に、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウムが好ましい。

30

【0052】

二価フェノール化合物としては、ヒドロキノン、カテコール、レゾルシン、4,4'-ビフェノール、ビス(ヒドロキシフェニル)アルカン類(例えば2,2-ビス(ヒドロキシフェニル)プロパン、及び2,2-ビス(ヒドロキシフェニル)メタン)、ジヒドロキシジフェニルスルホン類、ジヒドロキシジフェニルエーテル類、又はそれらのベンゼン環の水素の少なくとも1つが、メチル基、エチル基、プロピル基等の低級アルキル基、又はメトキシ基、エトキシ基等の低級アルコキシ基で置換されたものが挙げられる。二価フェノール化合物としては、上記の化合物を二種類以上混合して用いることができる。

40

【0053】

ポリエーテルスルホンは市販品であってもよい。市販品の例としては、スミカエクセル7600P、スミカエクセル5900P(以上、住友化学(株)製)等が挙げられる。

【0054】

ポリエーテルスルホンの対数粘度は、多孔質ポリエーテルスルホン膜のマクロポイドを良好に形成する観点で、好ましくは0.5以上、より好ましくは0.55以上であり、多孔質ポリエーテルスルホン膜の製造容易性の観点から、好ましくは1.0以下、より好ましくは0.9以下、更に好ましくは0.8以下、特に好ましくは0.75以下である。

【0055】

50

また、P E S多孔質膜、又はその原料としてのポリエーテルスルホンは、耐熱性、高温下での寸法安定性の観点から、ガラス転移温度が、200以上であるか、又は明確なガラス転移温度が観察されないことが好ましい。

【0056】

本発明で使用され得るP E S多孔質膜の製造方法は特に限定されないが、例えば、対数粘度0.5~1.0のポリエーテルスルホンの0.3質量%~60質量%と有機極性溶媒40質量%~99.7質量%とを含むポリエーテルスルホン溶液を、フィルム状に流延し、ポリエーテルスルホンの貧溶媒又は非溶媒を必須成分とする凝固溶媒に浸漬又は接触させて、空孔を有する凝固膜を作製する工程、及び

前記工程で得られた空孔を有する凝固膜を熱処理して前記空孔を粗大化させて、P E S多孔質膜を得る工程

を含み、前記熱処理は、前記空孔を有する凝固膜を、前記ポリエーテルスルホンのガラス転移温度以上、若しくは240以上まで昇温させることを含む、方法で製造されてもよい。

【0057】

本発明で使用され得るP E S多孔質膜は、好ましくは、表面層A、表面層B、及び前記表面層Aと前記表面層Bとの間に挟まれたマクロポイド層、を有するP E S多孔質膜であって、

前記マクロポイド層は、前記表面層A及びBに結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層A及びBに囲まれた、膜平面方向の平均孔径が10 μ m~500 μ mである複数のマクロポイドとを有し、

前記マクロポイド層の隔壁は、厚さが0.1 μ m~50 μ mであり、

前記表面層A及びBはそれぞれ、厚さが0.1 μ m~50 μ mであり、

前記表面層A及びBのうち、一方が平均孔径5 μ m超200 μ m以下の複数の細孔を有し、かつ他方が平均孔径0.01 μ m以上200 μ m未満の複数の細孔を有し、

表面層A及び表面層Bの、一方の表面開口率が15%以上であり、他方の表面層の表面開口率が10%以上であり、

前記表面層A及び前記表面層Bの前記細孔が前記マクロポイドに連通しており、

前記P E S多孔質膜は、総膜厚が5 μ m~500 μ mであり、かつ空孔率が50%~95%である、

P E S多孔質膜である。

【0058】

本発明の細胞培養装置に用いられる、細胞培養担体としての上述のポリマー多孔質膜は、微親水性の多孔質特性を有するため、ポリマー多孔質膜内に安定した液保持がなされ、乾燥にも強い湿潤環境が保たれる。そのため、従来の細胞培養担体を用いる細胞培養装置と比較して、極めて少量の培地でも細胞の生存及び増殖を達成することができる。また、ポリマー多孔質膜の一部又はすべてが空気に露出した状態であっても培養が可能であるため、細胞に対して効率的な酸素供給を行うことができ、大量の細胞を培養することができる。

【0059】

本発明によれば、用いる培地の量が極めて少なく、また、培養担体であるポリマー多孔質膜を気相に露出することができるため、細胞への酸素供給は拡散によって十分に行われる。したがって、本発明では特に酸素供給装置を必要としない。

【0060】

2. 細胞培養装置

【0061】

本発明の一態様は、

ポリマー多孔質膜と、前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、を備え、

10

20

30

40

50

ここで、前記ポリマー多孔質膜が、複数の孔を有する表面層 A 及び表面層 B と、前記表面層 A 及び表面層 B の間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層 A に存在する孔の平均孔径は、前記表面層 B に存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層 A 及び B に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層 A 及び B に囲まれた複数のマクロポイドとを有し、

ここで、前記細胞培養部が、1 以上の培地排出口を有する底部と、前記底部に略垂直に配置された側部とを有する、細胞培養装置に関する。該細胞培養装置を、以下で、「本発明の細胞培養装置」とも呼ぶ。以下に本発明の細胞培養装置の実施態様について、図を示しながら説明する。

【0062】

図 1 は、本発明の細胞培養装置を構成する細胞培養部 2 を示す図である。細胞培養部 2 は、上述のポリマー多孔質膜を載置するための底部 2 2 と、底部 2 2 に略垂直に配置された側部 2 1 とを有している。底部 2 2 には、後述する培地供給手段 3 から滴下された培地を排出するための培地排出口 2 3 を 1 以上備えている。培地排出口 2 3 の形状や数は、ポリマー多孔質膜が脱落せず、かつ、培地を下段の細胞培養部 2 又は培地回収手段 4（後述）へ排出する機能を有していれば特に限定されない。本実施例においては、スリット状に培地排出口 2 3 を設けている。細胞培養部 2 の側面方向から培地が供給されるように、側部 2 1 はさらに培地供給口 2 6 を 1 以上備えていてもよい。培地供給口 2 6 の位置、大きさは、目的に応じて適宜設計を変更してもよい。本実施形態においては、細胞培養部 2 の外観は円筒形であったが、これに限定されず、例えば、三角柱形、角柱形など、任意の形態であってもよい。ただし、後述するように、細胞培養部 2 は積層して使用することがあるため、細胞培養部 2 の上面と下面（底部 2 2）の形状が同一かつ平行であることが好ましい。

【0063】

本明細書において、「培地」とは、細胞、特に動物細胞を培養するための細胞培養培地のことを指す。培地は、細胞培養液と同義の意味として用いられる。そのため、本発明において用いられる培地とは、液体培地のことを指す。培地の種類は、通常使用される培地を使用することが可能であり、培養する細胞の種類によって適宜決定される。

【0064】

図 2 は、本発明の細胞培養装置の構成例を示す図である。細胞培養部 2 が 5 段積層されており、最上段の細胞培養部 2 には、蓋部 2 7 が載置される。蓋部 2 7 には、底部 2 2 に設けられた培地排出口 2 3 と同様、複数の培地排出口 2 7 1（図 4 参照）がスリット状に設けられている。培地排出口 2 7 1 の形状や数は、培地を下段の細胞培養部 2 へ排出する機能を有していれば特に限定されない。

【0065】

各段の細胞培養部 2 には、上述のポリマー多孔質膜が収容される。積層された細胞培養部 2 の最下段は、外筒 5 の内部に設けられたストッパー 5 1 上に載せられる。本実施態様において、外筒 5 は、積層した細胞培養部 2 を収容する円筒形部分と、細胞培養部 2 の各段を滴下してきた培地を回収するための漏斗形状の培地回収手段 4 とから形成されている。本実施態様では、外筒 5 の一部に培地回収手段 4 が含まれている。培地回収手段 4 は、上部から滴下した培地を回収可能な形状であれば限定されないが、効率的に培地を集約する観点から、漏斗状であることが好ましい。外筒 5 の形状は、上述の細胞培養部 2 の形状に応じて適宜変更することが可能である。最上段の細胞培養部 2 の上部には、培地供給手段 3 が配置される。細胞培養部 2 に設けられた固定具挿入口 2 4 と、培地供給手段 3 に設けられた固定具挿入口 3 4 の位置が垂直になるように合わせ、固定具挿入口 3 4 側から固定具 6 1 を挿入することで、培地供給手段 3 及び細胞培養部 2 が適切な位置に配置される。

【0066】

図 3 は、培地供給手段 3 を示す図である。図 3 に示す培地供給手段 3 は、側部 3 1 と底部 3 2 とから形成された細胞の培地貯留部 3 0 を備えている。底部 3 2 には複数の培地滴

10

20

30

40

50

下孔 3 5 を備えており、培地滴下孔 3 5 は、中心に向かってテーパ状になっている。また、底部 3 2 において、培地貯留部 3 0 の反対側（外側）には、培地滴下孔 3 5 と連通した培地滴下ノズル 3 3 を形成する。培地滴下ノズル 3 3 の中心には、該培地滴下孔 3 5 と連通したノズル孔 3 3 0 を有している。培地貯留部 3 0 に貯留された培地は、培地滴下孔 3 5 を通り、培地滴下ノズル 3 3 のノズル孔 3 3 0 を通って、所定量が滴下される。培地滴下孔 3 5 の径及びテーパ形状の角度、培地滴下ノズル 3 3 の先端の形状、ノズル孔 3 3 0 の径等を適宜調整することで、ノズル孔 3 3 0 から滴下される培地の量、滴下速度を調節可能である。底部 3 2 において、培地滴下孔 3 5 は、円の中心から同心円状に等間隔に配置されている。これにより、培地が、培地滴下ノズル 3 3 から同等に滴下される。

【 0 0 6 7 】

培地供給手段 3 の側部 3 1 の任意の位置にオーバーフロー管 3 6 が設けられている。オーバーフロー管 3 6 によって、培地貯留部 3 0 から培地があふれ出し、側部 3 1 を伝って培地が流れ出ることを防止する。オーバーフロー管 3 6 の位置により、培地貯留部 3 0 に収容する培地の量が決定される。脚部 3 7 は、底部 3 2 の培地滴下ノズル 3 3 と同じ側に設けられ、その長さは、培地滴下ノズル 3 3 より長い。脚部 3 7 の長さを調節することにより、細胞培養部 2 に供給される培地の位置を決定することが可能である。同一の長さの脚部 3 7 が少なくとも 3 つ設けられ、それによって、細胞培養部 2 の上部に培地供給手段 3 を設置することができる。脚部 3 7 は設けられなくてもよく、例えば、脚部 3 7 が設けられていない場合は、外筒 5 の上部に、例えば、嵌合されて設置されてもよい。

【 0 0 6 8 】

図 4 は、本発明の細胞培養装置 1 の構成例を示す斜視図であり、図 2 の構成例から、細胞培養部 2 及び培地供給手段 3 を垂直方向にそれぞれ独立させた状態を示している。本実施態様では、細胞培養部 2 a の底部 2 2 a に平行に設けられたスリット状の培地排出口 2 3 a に対し、一段下の細胞培養部 2 b の底部 2 2 b に平行に設けられたスリット状の培地排出口 2 3 b が、反時計回りに 3 0 度回転した位置に設けられている。培地排出口 2 3 c ~ 2 3 e も同様に上段と下段で 3 0 度ずつ回転した位置に培地排出口 2 3 が設けられている。これにより、培地が、複数積層した細胞培養部の上段から下段へ効率的に滴下される。

【 0 0 6 9 】

図 5 は、本発明の細胞培養装置 1 のさらなる構成例を示す図である。外筒 5 の一部である培地回収手段 4 は漏斗状であり、滴下した培地が培地排出部 4 1 へ集約される。培地排出部 4 1 には培地排出ライン 7 2 の一端部と連通し、培地排出ライン 7 2 の他端部は、培地貯槽 7 と連通している。培地貯槽 7 は、さらに、培地供給ライン 7 3 の一端部と連通しており、培地供給ライン 7 3 の他端部は培地供給手段 3 と連通している。これにより、培地貯槽 7 は、細胞培養装置 1 から排出された培地が貯留され、貯留された培地が再び細胞培養装置 1 内に供給され、培地が循環させる。培地を循環させることで、ポリマー多孔質膜に担持された細胞によって産生されるタンパク質の濃度が高くなり、タンパク質回収効率を上げることが可能となる。培地貯槽 7 内に排出される培地 7 1 を定期的に交換することで、新鮮な培地を供給することも可能である。ここでは図示しないが、別途新鮮な培地を供給する培地貯槽が設けられてもよい。この場合、培地貯槽 7 は使用済みの培地のみを貯留し、培地貯槽から培地供給ライン 7 3 を介して細胞供給手段 3 へ新鮮な培地が供給される。培地供給ライン 7 3 の途中には、培地を汲み上げるためのポンプ 8 を備える。ポンプ 8 の種類は、特に限定されないが、例えばペリスタポンプ等が使用可能である。

【 0 0 7 0 】

本発明の別の実施形態において、培地供給手段 3 は、培地を液滴化培地として供給する液滴化培地供給手段であってもよい（例えば、図 7 の液滴化培地供給手段 3'）。本明細書において、「液滴化培地」とは、ミスト状化又は水滴化された培地をいい、本発明に用いられるポリマー多孔質膜に噴射又は噴霧可能な状態の培地をいう（例えば、図 8（C））。液滴化培地の径は限定されないが、例えば、重力によって自由落下せず、空気中に浮遊可能な程度に小さいミスト状の液滴化培地であってもよい。ミスト状の液滴化培地の径

10

20

30

40

50

は、例えば、 $1\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ 程度であってもよく、さらに小さい径であってもよい。また、液滴化培地は、例えば、重力によって自由落下する水滴状の培地であってもよく、例えば、 $100\ \mu\text{m}$ 以上であってもよい。培地を液滴化する方法については、公知の手段により液滴化する方法を用いればよく、例えば、ミスト状ノズルやシャワーノズル等を用いて液滴化させればよい。ただし、液滴化方法は、培地の成分を変化させない方法によって液滴化されなければならない、例えば、液滴化させる方法からは、蒸発させる方法は除かれる。

【0071】

本発明の実施態様において、液滴化培地は、細胞を担持したポリマー多孔質膜に供給される。液滴化した培地は、ポリマー多孔質膜へ到達するまでの間に気相を通過し、培地中に酸素が溶け込むことになる。これにより、十分な量の酸素を有する培地が、継続的に供給されることとなり、細胞が虚血に陥ることなく、培養することが可能となる。また、ポリマー多孔質膜が常に気相に暴露されているため、ポリマー多孔質膜に付着している培地も常に酸素を取り込むことが可能となり、酸素を効率的に供給できる培養が可能となる。

10

【0072】

液滴化培地供給手段は、細胞培養部2の上部に配置されてもよく、細胞培養部2の側面に配置されてもよく、細胞培養部2の下部に配置されてもよく、複数設けられてもよい。本発明の実施形態において、液滴化培地供給手段は、密閉された外筒5内に設けられてもよい。これにより、外筒5の内部で、ミスト状の培地が充満し、細胞が担持されたポリマー多孔質膜に一樣に培地が供給されることとなる。

20

【0073】

本発明の他の実施態様は、
 ポリマー多孔質膜と、
 前記ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部と、
 前記細胞培養部の上部に配置された培地供給手段と、
 前記細胞培養部の下部に配置された培地回収手段と、
 を備え、

ここで、複数の孔を有する表面層A及び表面層Bと、前記表面層A及び表面層Bの間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリマー多孔質膜であって、ここで前記表面層Aに存在する孔の平均孔径は、前記表面層Bに存在する孔の平均孔径よりも小さく、前記マクロポイド層は、前記表面層A及びBに結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層A及びBに囲まれた複数のマクロポイドとを有し、前記表面層A及びBにおける孔が前記マクロポイドに連通し、

30

ここで、前記培地回収手段が、前記細胞培養部を収容する外筒の一部である、細胞培養装置に関する。

【0074】

図7(A)に示すように、一実施態様の細胞培養装置1'において、培地回収手段4'は外筒5'の一部であり、滴下した培地が培地排出部41'へ集約される。また、外筒5'の内部には、ポリマー多孔質膜9を載置し、外筒5'の内部に収容するための細胞培養部2'が設けられている。細胞培養部2'は、液滴化培地供給手段3'から滴下された培地を排出するための培地排出口を1以上備えている。培地排出口の形状や数は、ポリマー多孔質膜が脱落せず、培地回収手段4'へ排出する機能を有していれば特に限定されず、例えば、スリット状、メッシュ状、小孔の培地排出口が設けている。

40

【0075】

図7(B)に示すように、他の実施形態の細胞培養装置1'aにおいて、培地回収手段4'は、細胞培養部2'の機能を兼ねた、細胞培養部兼培地回収手段4'aであってもよい。この場合、ポリマー多孔質膜9は、直接、細胞培養部兼培地回収手段4'aの上に乗置することができる。細胞培養部兼培地回収手段4'aの上には、後述のモジュール化ポリマー多孔質膜90を載置することが好ましい。モジュール化ポリマー多孔質膜を用いることにより、細胞培養部兼培地回収手段4'a上に、容易に任意の数のモジュール化ポリ

50

マ-多孔質膜を収容することができる。

【0076】

液滴化培地供給手段3'からは、例えば、図8(A)のようにドロップ型、及び図8(C)のようにシャワー型の液滴331が供給される。液滴331の形状は、液滴化培地供給手段3'として公知のノズルを適宜選択することによって変更することができる。また、図8(B)のように、液滴化培地供給手段3'aから放出された液滴331を、さらに液滴メッシュ30'に適用することにより、液滴をポリマー多孔質膜全体に均質に供給することができる。液滴メッシュ30'は、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ステンレス鋼製のメッシュを用いることができるが、これに限定されない。他の実施態様において、液滴メッシュ30'は、例えば、図9(A)のように、液滴化培地供給手段3'の下部に設けることができる。また、他の実施形態においては、図9(B)のように、ポリマー多孔質膜及び/又はモジュール化ポリマー多孔質膜の間にも液滴メッシュ30'を用いることにより、多段化してもよい。液滴メッシュ30'のメッシュ構造は、液滴の培地が適用された場合に、培地の表面張力によって液滴メッシュ30'全体に拡散して、液滴メッシュ30'の下面側に培地を供給できる程度の目開きを有していればよい。液滴化培地供給手段3'の一実施態様としては、例えば、ステンレス鋼製のメッシュを巻いて形成したメッシュ束31'を用いてもよい。図8(D)に示すように、メッシュ束31'は、外筒蓋部52の内面側に設けられた蓋部培地供給口52aに挿入されている。これにより、培地が外筒の内壁を伝うことなく、直接ポリマー多孔質膜へ培地を滴下させることができる。また、外筒と外筒蓋部との嵌合部分からのコンタミネーションも防止することができる。本実施態様では、ステンレス鋼製のメッシュ束31'を用いているが、培地が外筒の内壁を伝うことなく、直接ポリマー多孔質膜へ培地を滴下させる機能を発揮する構成であれば、これに限定されない。また、メッシュ束31'は、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ステンレス鋼製のメッシュを用いることができるが、これに限定されない。

10

20

【0077】

本発明の実施形態で使用されるポリマー多孔質膜は、例えば、i)折り畳んで、ii)ロール状に巻き込んで、iii)シートもしくは小片を糸状の構造体で連結させて、及び/又は、iv)縄状に結んで、細胞培養部2の底部22上に適用されてもよい。また、本発明の実施形態で使用されるポリマー多孔質膜は、v)2以上が積層されて、細胞培養部2の底部22上に適用されてもよい。i)~v)のように形状を加工することにより、一定容量の細胞培養培地中に多くのポリマー多孔質膜を入れることができる。

30

【0078】

本発明の実施態様で使用されるポリマー多孔質膜は、モジュール化されたポリマー多孔質膜(以下、「モジュール化ポリマー多孔質膜」という。)が使用されてもよい。本明細書において「モジュール化ポリマー多孔質膜」とは、ケーシングに収容されたポリマー多孔質膜をいう。本明細書において、「モジュール化ポリマー多孔質膜」との記載は、単に「モジュール」と記載することができ、相互に変更しても同一のことを意味する。

【0079】

本発明の実施態様で使用されるモジュール化ポリマー多孔質膜が備えるケーシングは、2以上の細胞培地流出入口を有し、該細胞培地流出入口によって培地がケーシングの内外へ流出入する。該ケーシングの細胞培地流出入口の径は、ケーシングの内部へ細胞が流入可能であるように、前記細胞の径よりも大きいことが好ましい。また、細胞培地流出入口の径が、該細胞培地流出入口よりポリマー多孔質膜が流出する径よりも小さいことが好ましい。ポリマー多孔質膜が流出する径よりも小さい径は、ケーシングに収容されたポリマー多孔質膜の形状、大きさによって適宜選択可能である。例えば、ポリマー多孔質膜がひも状である場合、該ポリマー多孔質膜の短辺の幅より小さく、該ポリマー多孔質膜が流出しない適度の径であれば特に限定されない。該細胞培地流出入口の数は、細胞培地がケーシング内外へ供給及び/又は排出されやすいように、出来るだけ多く設けられていること

40

50

が好ましい。好ましくは、5以上、好ましくは10以上、好ましくは20以上、好ましくは50以上、好ましくは100以上である。細胞培地流出口は、ケーシングの一部又は全部が、メッシュ状の構造を有していてもよい。また、該ケーシング自体がメッシュ状であってもよい。本発明において、メッシュ形状の構造とは、例えば、縦、横、及び/又は斜めの格子状の構造を有するものであって、各目開きが、流体が通過出来る程度に細胞培地流出口を形成するものであるが、これに限定されない。例えば、図10のような構造を有する。

【0080】

本発明の実施態様で使用されるモジュール化ポリマー多孔質膜のケーシングは、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ステンレス鋼などの金属などが挙げられるが、細胞の培養に影響を与えない素材であれば特に限定されない。

10

【0081】

本発明の実施態様で使用されるモジュール化ポリマー多孔質膜は、

- (i) 2以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が、集約されて、
- (ii) 前記ポリマー多孔質膜が、折り畳まれて、
- (iii) 前記ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、及び/又は、
- (iv) 前記ポリマー多孔質膜が、縄状に結ばれて、

該ケーシング内に収容されたものであって、該モジュール化ポリマー多孔質膜を細胞培養部2へ適用することが可能である。

20

【0082】

本明細書において、「ケーシング内に2以上の独立した該ポリマー多孔質膜が集約されて収容されている」とは、互いに独立した2以上のポリマー多孔質膜が、ケーシングで囲まれた一定空間内に集約されて収容されている状態を指す。本発明において、2以上の独立した該ポリマー多孔質膜は、該ポリマー多孔質膜の少なくとも1カ所と該ケーシング内の少なくとも1カ所とを任意の方法によって固定され、該ポリマー多孔質膜がケーシング内で動かない状態に固定されたものであってもよい。また、2以上の独立したポリマー多孔質膜は、小片であってもよい。小片の形状は、例えば、円、楕円形、四角、三角、多角形、ひも状など、任意の形をとりうるが、好ましくは、ひも状、又は四角が好ましい。本発明において、小片の大きさは、任意の大きさをとりうるが、ひも状である場合、長さは任意の長さでよいが、幅は、80mm以下がよく、好ましくは30mm以下がよく、より好ましくは10mm以下がよい。これによって、ポリマー多孔質膜内で生育される細胞にストレスが加えられることが防止される。本発明において、ポリマー多孔質膜の小片が四角である場合、略正方形であることがより好ましく、その一辺の長さは、ポリマー多孔質膜がケーシング内で動かない状態となるように、ケーシングの内壁に沿って、又は内壁の一辺の長さより短く(例えば、0.1mm~1mm程度短い)形成されたものであればよい。また、本発明において、ポリマー多孔質膜の小片が略正方形である場合、長さは任意の長さでよいが、例えば、80mm以下がよく、好ましくは50mm以下がよく、より好ましくは30mm以下がよく、さらにより好ましくは20mm以下がよく、10mm以下であってもよい。

30

40

【0083】

本明細書において、「折り畳まれたポリマー多孔質膜」とは、該ケーシング内にて折り畳まれていることで、ポリマー多孔質膜の各面及び/又はケーシング内の表面との摩擦力によってケーシング内で動かない状態となったポリマー多孔質膜である。本明細書において、「折り畳まれた」とは、ポリマー多孔質膜に折り目がついた状態であってもよく、折り目がついていない状態であってもよい。

【0084】

本明細書において、「ロール状に巻き込まれたポリマー多孔質膜」とは、ポリマー多孔質膜が、ロール状に巻き込まれて、ポリマー多孔質膜の各面及び/又はケーシング内の表面との摩擦力によってケーシング内で動かない状態となったポリマー多孔質膜をいう。ま

50

た、本発明において、縄状に編み込まれたポリマー多孔質膜とは、例えば短冊状の複数のポリマー多孔質膜を、任意の方法によって縄状に編み込み、ポリマー多孔質膜同士の摩擦力によって互いに動かない状態のポリマー多孔質膜をいう。(i) 2以上の独立した前記ポリマー多孔質膜が集約されたポリマー多孔質膜、(ii) 折り置かれたポリマー多孔質膜、(iii) ロール状に巻き込まれたポリマー多孔質膜、及び(iv) 縄状に結ばれたポリマー多孔質膜、が、組み合わせられてケーシング内に収容されていてもよい。

【0085】

本明細書において、「該ポリマー多孔質膜がケーシング内で動かない状態」とは、該モジュール化ポリマー多孔質膜を細胞培養培地中で培養する場合に、該ポリマー多孔質膜が継続的に形態変化しない状態になるようにケーシング内に収容されている状態をいう。換言すれば、該ポリマー多孔質膜自体が、流体によって、継続的に波打つ動きを行わないように抑制された状態である。ポリマー多孔質膜がケーシング内で動かない状態を保つため、ポリマー多孔質膜内で生育されている細胞にストレスが加えられることが防止され、細胞が死滅されることなく安定的に細胞が培養可能となる。

10

【0086】

3. 細胞培養装置を使用した細胞培養方法

【0087】

<細胞をポリマー多孔質膜へ適用する工程>

本発明で使用される細胞のポリマー多孔質膜への適用の具体的な工程は特に限定されない。本明細書に記載の工程、あるいは、細胞を膜状の担体に適用するのに適した任意の手法を採用することが可能である。限定されるわけではないが、本発明の方法において、細胞のポリマー多孔質膜への適用は、例えば、以下のような態様を含む。

20

【0088】

(A) 細胞を前記ポリマー多孔質膜の表面に播種する工程を含む、態様；

(B) 前記ポリマー多孔質膜の乾燥した表面に細胞懸濁液を載せ、

放置するか、あるいは前記ポリマー多孔質膜を移動して液の流出を促進するか、あるいは表面の一部を刺激して、細胞懸濁液を前記膜に吸い込ませ、そして、

細胞懸濁液中の細胞を前記膜内に留め、水分は流出させる、

工程を含む、態様；並びに、

(C) 前記ポリマー多孔質膜の片面又は両面を、細胞培養液又は滅菌された液体で湿潤し、

30

前記湿潤したポリマー多孔質膜に細胞懸濁液を装填し、そして、

細胞懸濁液中の細胞を前記膜内に留め、水分は流出させる、

工程を含む、態様。

【0089】

(A) の態様は、ポリマー多孔質膜の表面に細胞、細胞塊を直接播種することを含む。あるいは、ポリマー多孔質膜を細胞懸濁液の中に入れて、膜の表面から細胞培養液を浸潤させる態様も含む。

【0090】

ポリマー多孔質膜の表面に播種された細胞は、ポリマー多孔質膜に接着し、多孔の内部に入り込んでいく。好ましくは、特に外部から物理的又は化学的な力を加えなくても、細胞はポリマー多孔質膜に接着する。ポリマー多孔質膜の表面に播種された細胞は、膜の表面及び/又は内部において安定して生育・増殖することが可能である。細胞は生育・増殖する膜の位置に応じて、種々の異なる形態をとりうる。

40

【0091】

(B) の態様において、ポリマー多孔質膜の乾燥した表面に細胞懸濁液を載せる。ポリマー多孔質膜を放置するか、あるいは前記ポリマー多孔質膜を移動して液の流出を促進するか、あるいは表面の一部を刺激して、細胞懸濁液を前記膜に吸い込ませることにより、細胞懸濁液が膜中に浸透する。理論に縛られるわけではないが、これはポリマー多孔質膜の各表面形状等に由来する性質によるものであると考えられる。本態様により、膜の細胞

50

懸濁液が装填された箇所細胞が吸い込まれて播種される。

【0092】

あるいは、(C)の態様のように、前記ポリマー多孔質膜の片面又は両面の部分又は全体を、細胞培養液又は滅菌された液体で湿潤してから、湿潤したポリマー多孔質膜に細胞懸濁液を装填してもよい。この場合、細胞懸濁液の通過速度は大きく向上する。

【0093】

例えば、膜の飛散防止を主目的として膜極一部を湿潤させる方法(以後、これを「一点ウェット法」と記載する)を用いることができる。一点ウェット法は、実質上は膜を湿潤させないドライ法((B)の態様)にほぼ近いものである。ただし、湿潤させた小部分については、細胞液の膜透過が迅速になると考えられる。また、ポリマー多孔質膜の片面又は両面の全体を十分に湿潤させたもの(以後、これを「ウェット膜」と記載する)に細胞懸濁液を装填する方法も用いることができる(以後、これを「ウェット膜法」と記載する)。この場合、ポリマー多孔質膜の全体において、細胞懸濁液の通過速度が大きく向上する。

10

【0094】

(B)及び(C)の態様において、細胞懸濁液中の細胞を前記膜内に留め、水分は流出させる。これにより細胞懸濁液中の細胞の濃度を濃縮する、細胞以外の不要な成分を水分とともに流出させる、などの処理も可能になる。

【0095】

(A)の態様を「自然播種」、(B)及び(C)の態様を「吸込み播種」と呼称する場合がある。

20

【0096】

限定されるわけではないが、好ましくは、ポリマー多孔質膜には生細胞が選択的に留まる。よって、本発明の方法の好ましい実施形態において、生細胞が前記ポリマー多孔質膜内に留まり、死細胞は優先的に水分とともに流出する。

【0097】

態様(C)において用いる滅菌された液体は特に限定されないが、滅菌された緩衝液若しくは滅菌水である。緩衝液は、例えば、(+)及び(-)Dulbecco's PBS、(+)及び(-)Hank's Balanced Salt Solution等である。緩衝液の例を以下の表1に示す。

【0098】

30

【表1】

成分	濃度 (mmol/L)	濃度 (g/L)
NaCl	137	8.00
KCl	2.7	0.20
Na ₂ HPO ₄	10	1.44
KH ₂ PO ₄	1.76	0.24
pH (-)	7.4	7.4

40

【0099】

さらに、本発明の方法において、細胞のポリマー多孔質膜への適用は、浮遊状態にある接着性細胞をポリマー多孔質膜と懸濁的に共存させることにより細胞を膜に付着させる態様(絡め取り)も含む。例えば、本発明の方法において、細胞をポリマー多孔質膜に適用するために、細胞培養容器中に、細胞培養培地、細胞及び1又はそれ以上の前記ポリマー多孔質膜を入れてもよい。細胞培養培地が液体の場合、ポリマー多孔質膜は細胞培養培地中に浮遊した状態である。ポリマー多孔質膜の性質から、細胞はポリマー多孔質膜に接着しうる。よって、生来浮遊培養に適さない細胞であっても、ポリマー多孔質膜は細胞培養培地中に浮遊した状態で培養することが可能である。好ましくは、細胞は、ポリマー多孔

50

質膜に接着する。「自発的に接着する」とは、特に外部から物理的又は化学的な力を加えなくても、細胞がポリマー多孔質膜の表面又は内部に留まることを意味する。

【0100】

上述した細胞のポリマー多孔質膜への適用は、2種類又はそれより多くの方法を組み合わせ用いてもよい。例えば、態様(A)~(C)のうち、2つ以上の方法を組み合わせ用いてもよい。細胞を担持させたポリマー多孔質膜を、上述の細胞培養装置1における、細胞培養部2へ適用して、培養することが可能である。

【0101】

その他、予め、ポリマー多孔質膜が収容された細胞培養部2に、懸濁された細胞が含まれる培地を、細胞供給手段3より滴下して播種してもよい。

10

【0102】

本明細書において、「懸濁された細胞」とは、例えば、トリプシン等のタンパク質分解酵素によって、接着細胞を強制的に浮遊させて培地中に懸濁して得られた細胞や、公知の馴化工程によって、培地中に浮遊培養可能となった接着細胞などを含んでいる。

【0103】

本発明に利用し得る細胞の種類は、例えば、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌及び細菌からなる群から選択される。動物細胞は、脊椎動物門に属する動物由来の細胞と無脊椎動物(脊椎動物門に属する動物以外の動物)由来の細胞とに大別される。本明細書における、動物細胞の由来は特に限定されない。好ましくは、脊椎動物門に属する動物由来の細胞を意味する。脊椎動物門は、無顎上綱と顎口上綱を含み、顎口上綱は、哺乳綱、鳥綱、両生綱、爬虫綱などを含む。好ましくは、一般に、哺乳動物と言われる哺乳綱に属する動物由来の細胞である。哺乳動物は、特に限定されないが、好ましくは、マウス、ラット、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ヒツジ、ヤギなどを含む。

20

【0104】

本発明に利用しうる動物細胞の種類は、限定されるわけではないが、好ましくは、多能性幹細胞、組織幹細胞、体細胞、及び生殖細胞からなる群から選択される。

【0105】

本明細書において「多能性幹細胞」とは、あらゆる組織の細胞へと分化する能力(分化多能性)を有する幹細胞の総称することを意図する。限定されるわけではないが、多能性幹細胞は、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性生殖幹細胞(EG細胞)、生殖幹細胞(GS細胞)等を含む。好ましくは、ES細胞又はiPS細胞である。iPS細胞は倫理的な問題もない等の理由により特に好ましい。多能性幹細胞としては公知の任意のものを使用可能であるが、例えば、国際公開第2009/123349号(PCT/JP2009/057041)に記載の多能性幹細胞を使用可能である。

30

【0106】

「組織幹細胞」とは、分化可能な細胞系列が特定の組織に限定されているが、多様な細胞種へ分化可能な能力(分化多能性)を有する幹細胞を意味する。例えば骨髄中の造血幹細胞は血球のもととなり、神経幹細胞は神経細胞へと分化する。このほかにも肝臓をつくる肝幹細胞、皮膚組織になる皮膚幹細胞などさまざまな種類がある。好ましくは、組織幹細胞は、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞、又は造血幹細胞から選択される。

40

【0107】

「体細胞」とは、多細胞生物を構成する細胞のうち生殖細胞以外の細胞のことを言う。有性生殖においては次世代へは受け継がれない。好ましくは、体細胞は、肝細胞、膵細胞、筋細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、皮膚細胞、線維芽細胞、膵細胞、腎細胞、肺細胞、又は、リンパ球、赤血球、白血球、単球、マクロファージ若しくは巨核球の血球細胞から選択される。

【0108】

「生殖細胞」は、生殖において遺伝情報を次世代へ伝える役割を持つ細胞を意味する。例えば、有性生殖のための配偶子、即ち卵子、卵細胞、精子、精細胞、無性生殖のための

50

胞子などを含む。

【0109】

細胞は、肉腫細胞、株化細胞及び形質転換細胞からなる群から選択してもよい。「肉腫」とは、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血液等の非上皮性細胞由来の結合組織細胞に発生する癌で、軟部肉腫、悪性骨腫瘍などを含む。肉腫細胞は、肉腫に由来する細胞である。「株化細胞」とは、長期間にわたって体外で維持され、一定の安定した性質をもつに至り、半永久的な継代培養が可能になった培養細胞を意味する。PC12細胞（ラット副腎髄質由来）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）、HEK293細胞（ヒト胎児腎臓由来）、HL-60細胞（ヒト白血球細胞由来）、Hela細胞（ヒト子宮頸癌由来）、Verob細胞（アフリカミドリザル腎臓上皮細胞由来）、MDCk細胞（イヌ腎臓尿管上皮細胞由来）、HepG2細胞（ヒト肝癌由来細胞株）、BHK細胞（新生児ハムスター腎臓細胞）、NIH3T3細胞（マウス胎児線維芽細胞由来）などヒトを含む様々な生物種の様々な組織に由来する細胞株が存在する。「形質転換細胞」は、細胞外部から核酸（DNA等）を導入し、遺伝的性質を変化させた細胞を意味する。

10

【0110】

本明細書において、「接着細胞」とは、一般に、増殖のために適切な表面に自身を接着させる必要がある細胞であって、付着細胞又は足場依存性細胞ともいわれる。本発明のいくつかの実施形態では、使用する細胞は接着細胞である。本発明に用いられる細胞は、接着細胞であって、より好ましくは、培地中に懸濁した状態でも培養可能な細胞である。懸濁培養可能な接着細胞とは、公知の方法によって、接着細胞を懸濁培養に適した状態へ馴化させることによって得ることが可能であり、例えば、CHO細胞、HEK293細胞、Verob細胞、NIH3T3細胞などや、これらの細胞から派生して得られた細胞株が挙げられる。

20

【0111】

ポリマー多孔質膜を用いた細胞培養のモデル図を図1に示す。図1は理解を助けるための図であり、各要素は実寸ではない。本発明の細胞の培養方法では、ポリマー多孔質膜に細胞を適用し、培養することにより、ポリマー多孔質膜の有する内部の多面的な連結多孔部分や表面に、大量の細胞が生育するため、大量の細胞を簡単に培養することが可能となる。また、本発明の細胞の培養方法では、細胞培養に用いる培地の量を従来の方法よりも大幅に減らしつつ、大量の細胞を培養することが可能となる。例えば、ポリマー多孔質膜の一部分又は全体が、細胞培養培地の液相と接触していない状態であっても、大量の細胞を長期にわたって培養することができる。また、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和に対して、細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地の総体積を著しく減らすことも可能となる。

30

【0112】

本明細書において、細胞を含まないポリマー多孔質膜がその内部間隙の体積も含めて空間中に占める体積を「見かけ上ポリマー多孔質膜体積」と呼称する（図1参照）。そして、ポリマー多孔質膜に細胞を適用し、ポリマー多孔質膜の表面及び内部に細胞が担持された状態において、ポリマー多孔質膜、細胞、及びポリマー多孔質膜内部に浸潤した培地が全体として空間中に占める体積を「細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積」と呼称する（図1参照）。膜厚25 μ mのポリマー多孔質膜の場合、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積は、見かけ上ポリマー多孔質膜体積より、最大で50%程度大きな値となる。本発明の方法では、1つの細胞培養容器中に複数のポリマー多孔質膜を収容して培養することができるが、その場合、細胞を担持した複数のポリマー多孔質膜のそれぞれについての細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和を、単に「細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和」と記載することがある。

40

【0113】

本発明の方法を用いることにより、細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地の総体積が、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和の10000倍又はそれより少ない条件でも、細胞を長期にわたって良好に培養することが可能となる。また、細胞培養容器中に

50

含まれる細胞培養培地の総体積が、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和の100倍又はそれより少ない条件でも、細胞を長期にわたって良好に培養することができる。さらに、細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地の総体積が、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和の100倍又はそれより少ない条件でも、細胞を長期にわたって良好に培養することができる。そして、細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地の総体積が、細胞生存域を含むポリマー多孔質膜体積の総和の10倍又はそれより少ない条件でも、細胞を長期にわたって良好に培養することができる。

【0114】

つまり、本発明によれば、細胞培養する空間（容器）を従来の二次元培養を行う細胞培養装置に比べて極限まで小型化可能となる。また、培養する細胞の数を増やしたい場合は、積層するポリマー多孔質膜の枚数を増やす等の簡便な操作により、柔軟に細胞培養する体積を増やすことが可能となる。本発明に用いられるポリマー多孔質膜を備えた細胞培養装置であれば、細胞を培養する空間（容器）と細胞培養培地を貯蔵する空間（容器）とを分離することが可能となり、培養する細胞数に応じて、必要となる量の細胞培養培地を準備することが可能となる。細胞培養培地を貯蔵する空間（容器）は、目的に応じて大型化又は小型化してもよく、あるいは取り替え可能な容器であってもよく、特に限定されない。

10

【0115】

本発明の細胞の培養方法において、例えば、ポリマー多孔質膜を用いた培養後に細胞培養容器中に含まれる細胞の数が、細胞がすべて細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地に均一に分散しているものとして、培地1ミリリットルあたり 1.0×10^5 個以上、 1.0×10^6 個以上、 2.0×10^6 個以上、 5.0×10^6 個以上、 1.0×10^7 個以上、 2.0×10^7 個以上、 5.0×10^7 個以上、 1.0×10^8 個以上、 2.0×10^8 個以上、 5.0×10^8 個以上、 1.0×10^9 個以上、 2.0×10^9 個以上、または 5.0×10^9 個以上となるまで培養することをいう。

20

【0116】

なお、培養中または培養後の細胞数を計測する方法としては、種々の公知の方法を用いることができる。例えば、ポリマー多孔質膜を用いた培養後に細胞培養容器中に含まれる細胞の数を、細胞がすべて細胞培養容器中に含まれる細胞培養培地に均一に分散しているものとして計測する方法としては、公知の方法を適宜用いることができる。例えば、CCK8を用いた細胞数計測法を好適に用いることができる。具体的には、Cell Counting Kit 8；同仁化学研究所製溶液試薬（以下、「CCK8」と記載する。）を用いて、ポリマー多孔質膜を用いない通常の培養における細胞数を計測し、吸光度と実際の細胞数との相関係数を求める。その後、細胞を適用し、培養したポリマー多孔質膜を、CCK8を含む培地に移し、1～3時間インキュベータ内で保存し、上清を抜き出して480nmの波長にて吸光度を測定して、先に求めた相関係数から細胞数を計算する。

30

【0117】

また、別の観点からは、細胞の大量培養とは、例えば、ポリマー多孔質膜を用いた培養後にポリマー多孔質膜1平方センチメートルあたりに含まれる細胞数が 1.0×10^5 個以上、 2.0×10^5 個以上、 1.0×10^6 個以上、 2.0×10^6 個以上、 5.0×10^6 個以上、 1.0×10^7 個以上、 2.0×10^7 個以上、 5.0×10^7 個以上、 1.0×10^8 個以上、 2.0×10^8 個以上、または 5.0×10^8 個以上となるまで培養することをいう。ポリマー多孔質膜1平方センチメートルあたりに含まれる細胞数は、セルカウター等の公知の方法を用いて適宜計測することが可能である。

40

【実施例】

【0118】

以下、本発明を実施例に基づいて、より具体的に説明する。なお本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0119】

50

以下の実施例で使用されたポリイミド多孔質膜は、テトラカルボン酸成分である3,3',4,4'-ピフェニルテトラカルボン酸二無水物(s-BPDA)とジアミン成分である4,4'-ジアミノジフェニルエーテル(ODA)とから得られるポリアミック酸溶液と、着色前駆体であるポリアクリルアミドを含むポリアミック酸溶液組成物を成形した後、250以上で熱処理することにより、調製された。得られたポリイミド多孔質膜は、複数の孔を有する表面層A及び表面層Bと、当該表面層A及び表面層Bの間に挟まれたマクロポイド層とを有する三層構造のポリイミド多孔質膜であり、表面層Aに存在する孔の平均孔径は6µmであり、表面層Bに存在する孔の平均孔径は46µmであり、膜厚が25µmであり、空孔率が73%であった。

【0120】

(実施例1)

筒型気相培養装置によるポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養法

【0121】

抗ヒトIL-8抗体産生CHO-DP12細胞(ATCC CRL-12445)を馴化・浮遊化した細胞を、培地(Balanced(商標) CHO GROWTH A)を用いて浮遊培養し、1mlあたりの生細胞数が、 9.9×10^6 になるまで培養を継続した。振盪培養向け酸素透過バッグにモジュール10個を入れ、CO₂インキュベータ内で終夜振盪培養を行った。

【0122】

翌日、モジュールを取り出し、図5に示す筒型気相培養装置の細胞培養部(各細胞培養部の培地排出口は平行の位置関係である)にモジュール10個を設置し、液溜め(図5の培地貯槽7に相当)には、350mlの培地(コージンバイオ製KBM270)を貯留し同培地をチューブポンプ経由で毎分20mlの速度で循環させた。4日後に培養を終了した所、細胞密度 2.5×10^5 Cells/cm²で総細胞数 5.0×10^7 個の細胞が観察された。酸素供給装置を使用せず、コンパクトかつ簡便な設備で、大量の抗体産生細胞を培養出来る事実が示された。

【0123】

(実施例2)

筒型気相培養装置によるポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養法

【0124】

抗ヒトIL-8抗体産生CHO-DP12細胞(ATCC CRL-12445)を馴化・浮遊化した細胞を、培地(Balanced(商標) CHO GROWTH A)を用いて浮遊培養し、1mlあたりの生細胞数が、 2.4×10^6 になるまで培養を継続した。ナイロンメッシュ(30#、目開き547µm)にて外套(ケーシング)を形成し滅菌的にポリイミド多孔質膜を一定量(1モジュールあたり20cm²)加えて封じたモジュール30個を酸素透過型培養バッグに滅菌的に封入し、上記培養液30mlを注加した。CO₂インキュベータ内で終夜放置した後、翌日、モジュールを取り出し、図5に示す筒型気相培養装置の細胞培養部(各細胞培養部の培地排出口は、反時計回りに30度ずれた位置関係である、図4参照)にモジュール30個を設置し、液溜め(図5の培地貯槽7に相当)には、300mlの培地(コージンバイオ製KBM270)を貯留し、同培地をチューブポンプ経由で毎分20mlの速度で循環させた。

【0125】

4日後に培養を終了した所、細胞密度 7.1×10^4 Cells/cm²で総細胞数 5.8×10^7 個の細胞が観察された。酸素供給装置を使用せず、コンパクトかつ簡便な設備で、大量の抗体産生細胞を培養出来る事実が示された。

【0126】

(実施例3)

液滴化培地供給手段を備えた細胞培養装置(以下、「ミスト及びシャワー型リアクター」という)によるポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養法

【0127】

10

20

30

40

50

抗ヒトIL-8抗体産生CHO-DP12細胞(ATCC CRL-12445)を馴化・浮遊化した細胞を、培地(Balanced(商標) CHO GROWTH A)を用いて浮遊培養し、1mlあたりの生細胞数が、 3.9×10^6 になるまで培養を続けた。10cm径シャーレ1枚に上記浮遊培養液を夫々12ml注加した後、ナイロンメッシュ(30#、目開き547 μ m)にて外套(ケーシング)を形成し滅菌的にポリイミド多孔質膜を一定量(1モジュールあたり20cm²)加えて封じたモジュール12個を同シャーレに加えた。モジュールを細胞懸濁液で湿潤した後、CO₂インキュベータ内で終夜放置した。

【0128】

翌日、モジュールを取り出し、ミスト及びシャワー型リアクターの内部にモジュール12個を設置し(図9(A)参照)、培地貯槽には、200mlの培地を(FBS2%を含むIMDM)貯留し、同培地をチューブポンプ経由で毎分60mlの速度で循環させた。2日後に培養を終了した所、細胞密度 3.4×10^4 Cells/cm²で総細胞数 8.2×10^6 個の細胞が観察された。

【0129】

(実施例4)

ミスト及びシャワー型リアクターによるポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養法

【0130】

抗ヒトIL-8抗体産生CHO-DP12細胞(ATCC CRL-12445)を馴化・浮遊化した細胞を、培地(Balanced(商標) CHO GROWTH A)を用いて浮遊培養し、1mlあたりの生細胞数が、 9.9×10^6 になるまで培養を続けた。振盪培養向け酸素透過バッグにモジュール10個を入れ、CO₂インキュベータ内で終夜振盪培養を行った。

【0131】

翌日、振盪バッグよりモジュールを取り出し、実施例4と同様の条件で、ミスト及びシャワー型リアクターによる細胞培養を行った。培地貯槽には、200mlの培地(コーンバイオ製KBM270)を貯留し同培地をチューブポンプ経由で毎分60mlの速度で循環させた。4日後に培養を終了した所、細胞密度 8.8×10^4 Cells/cm²で総細胞数 1.8×10^7 個の細胞が観察された。

【0132】

(実施例5)

ステンレス鋼製ケーシングを有するモジュール化ポリマー多孔質膜(以下、「メタルモジュール」という)による筒型気相培養装置(以下、「気筒型バイオリアクター」という)の準備及びそれを使用した細胞培養

【0133】

ポリイミド多孔質膜の有する耐熱性を最大限に活用し、簡単な全体乾熱滅菌で滅菌作業を完了すべく、ステンレス鋼メッシュ製のケーシング、中敷、及びポリイミド多孔質膜で構成されるメタルモジュールを作製した(図10を参照)。具体的には、1cm \times 1cmのポリイミド多孔質膜及びポリイミド多孔質膜と同面積のステンレス鋼メッシュ(「中敷」という。図示しない)を積層したもの(ポリイミド多孔質3枚、中敷1枚、ポリイミド多孔質4枚、中敷1枚、ポリイミド多孔質3枚、の順番で積層)を、ステンレスメッシュ製のケーシングで封止して、メタルモジュールを作製した(図10)。作業は、開放空間下で非滅菌的に実施した。

【0134】

このメタルモジュールを運用するためのガラス製耐熱気筒型リアクターは、ガラスチャンバ内にメタルモジュールが据付けられ、液滴下により、培地を気筒内に供給可能である。メタルモジュールを備えた気筒型バイオリアクターは、耐熱素材のみで作製されている為、滅菌は簡便な乾熱滅菌のみで実行可能となる。メタルモジュール30個を耐熱気筒内に設置後、非滅菌的に組み立てられた装置をアルミホイルで包み、摂氏190度にて80分間乾熱滅菌し、放冷した事で滅菌作業を完了した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

作製した気筒型バイオリアクターを用いて、ヒト皮膚線維芽細胞の培養実験に着手した。

【 0 1 3 6 】

上述に示す通り、気筒型リアクター全体を滅菌的に組み立て、CO₂ インキュベータ内に装置全体を設置した。シャーレで培養していたヒト皮膚線維芽細胞をトリプシン処理にて剥離させ、図 8 に示す各反応形式に対し、70 ml ずつの細胞懸濁液を準備した。その時の細胞密度は、1 ml あたりの生細胞数が、 1.4×10^5 であった。吸着後の細胞増殖挙動に関して、表 2 にて説明する。

【表 2】

培地添加方式	液供給 (1) ドロップ型 (図 8 (A))	液供給 (2) メッシュ型 (図 8 (B))	液供給 (3) シャワー型 (図 8 (C))
液中残留細胞密度 Cells/ml (※ 1)	検出限界以下	1.4×10^4	検出限界以下
細胞吸着率 (※ 2)	~ 100%	90%	~ 100%
初期予想成熟度 (最大値との比較) (※ 3)	15%	14%	15%
5日目の成熟度 (※ 4)	12.8% (上部) 10.2% (下部)	26.7%	19.3% (上部) 20.8% (下部)

10

20

【 0 1 3 7 】

1 : 液中残留細胞密度とは、ポリミド多孔質膜に細胞を吸着させた後の、細胞懸濁液中に残存した細胞数 (密度) を示している。

2 : 細胞吸着率とは、播種に使用した細胞懸濁液中の細胞がどれだけポリミド多孔質膜に吸着したかを示している。

3 : 初期予想成熟度とは、ポリミド多孔質膜での細胞の最大生息数を 100% とした場合の、実際の細胞の吸着細胞数を % として表したものである。

4 : 3 と同じものを示している (培養 5 日目を測定して算出した)。上部 ; 最上部のモジュール、下部 ; 最上部のモジュール、の値をそれぞれ示している。

30

【 0 1 3 8 】

なお、ドロップ型の液滴は、図 8 (D) に示すように、巻き取ったステンレス鋼メッシュ (久宝金属製作所製、品番 E9103, 20#) (図 8 (D) のメッシュ束に相当) を蓋体に設けられた培地供給口に挿入することにより実現させた。メッシュ型の液滴は、ドロップ型の方法に加え、メッシュ束の直下に、平面状のステンレス鋼メッシュ (久宝金属製作所製、品番 E9103, 20#) を設けて、モジュールをカバーすることにより実現させた。シャワー型の液滴は、いけうち社製、品番 1/8 MVVP6503PP-IN 番のノズルを用いることにより実現させた。

40

【 0 1 3 9 】

その後、ポンプを用いて連続的に培地 (コージンバイオ株式会社製_KBM Fibro Assist を使用) を供給する事で培地循環が開始され、連続培養を進めた。3 日に一回培地交換を実施しながら、培養を継続した。細胞数の評価に関しては、30 個あるモジュールの内、1~2 個を取り出し、それらのモジュールに生育するヒト皮膚線維芽細胞を、Cell Counting Kit 8 ; 同仁化学研究所製溶液試薬 (以下、「CCCK8」と記載する。) の呈色反応を用いて細胞数を測定した。この実験結果から明らかかな様に、本実験に於いては、培地液の注加方法がその後の各システムに於けるモジュール内細胞数を決定付ける事となる事実が判明した。また、興味深い事に、メッシュによる

50

液浸透平準化の効果は非常に大きく、しっかりと細胞が増殖する結果が観察された。一方で、ドロップの添加方式では培地がリアクター内部全体に広がらず、偏流が生じる事で細胞生育領域が限定されて細胞数の減少を招いたと思われる。シャワー式に培地を注加する方法もある程度の液平準化効果に寄与すると思われる。

【0140】

引き続き、本培養方法のバイオリアクターとしての効率を検証すべく、物質産生能の評価を進めた。タカラバイオ製ヒトフィブロネクチン測定用E l i s a k i tを用いて、産生されたフィブロネクチン量を測定した。図11に測定結果を示す。

【0141】

図11からも自明な様に、この物質産生評価に於いても、メッシュ培養法が圧倒的に優位を示しており、フィブロネクチン産生力を着実に伸ばしつつある。1ヶ月の安定運転を実現する事が出来た。一方で、シャワー型及びドロップ型においても、安定的な物質は達成されたが、産生力の向上を見出す事は出来なかった。非常に簡便な装置で、気相暴露型培養にてヒト初代細胞を安定的に培養し、高効率で有用物質の産生を実現し得る事を実証する事が出来た。

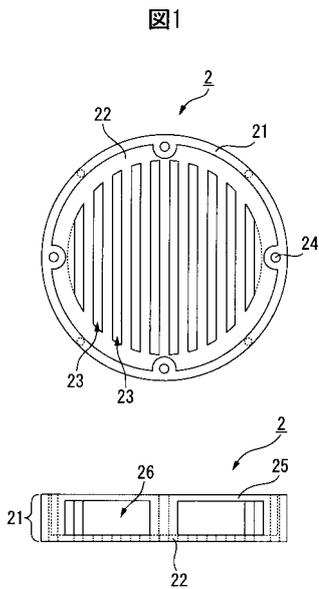
【符号の説明】

【0142】

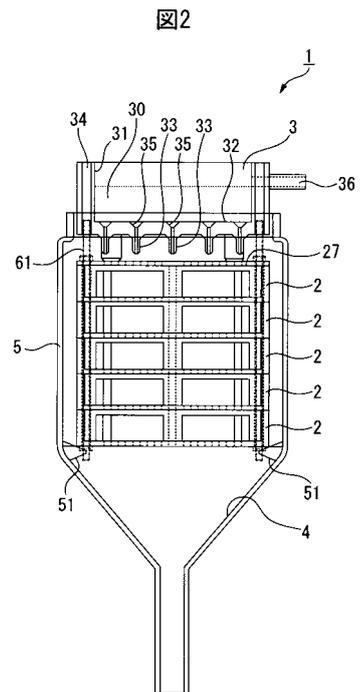
- | | | |
|-------------|--------------|----|
| 1、1'、1'a | 細胞培養装置 | |
| 2、2a~2e、2' | 細胞培養部 | |
| 21、21a~21e | 側部 | 20 |
| 22、22a~22e | 底部 | |
| 23、23a~23e | 培地排出口 | |
| 24 | 固定具挿入口 | |
| 25 | 上部 | |
| 26 | 培地供給口 | |
| 27 | 蓋部 | |
| 271 | 培地排出口 | |
| 3 | 培地供給手段 | |
| 30 | 培地貯留部 | |
| 31 | 側部 | 30 |
| 32 | 底部 | |
| 33 | 培地滴下ノズル | |
| 330 | ノズル孔 | |
| 331 | 液滴 | |
| 34 | 固定具挿入口 | |
| 35 | 培地滴下孔 | |
| 36 | オーバーフロー管 | |
| 37 | 脚部 | |
| 3'、3'a、3'b | 液滴化培地供給手段 | |
| 30' | 液滴メッシュ | 40 |
| 31' | メッシュ束 | |
| 4、4' | 培地回収手段 | |
| 4'a | 細胞培養部兼培地回収手段 | |
| 41、41'、41'a | 培地排出部 | |
| 5、5'、5'a | 外筒 | |
| 51 | ストッパー | |
| 52 | 外筒蓋部 | |
| 52a | 蓋部培地供給口 | |
| 61 | 固定具 | |
| 7 | 培地貯槽 | 50 |

- 7 1 培地
- 7 2 培地 排出ライン
- 7 3 培地 供給ライン
- 8 ポンプ
- 9 ポリマー多孔質膜
- 9 0 モジュール化ポリマー多孔質膜
- 9 0 0 ケーシング

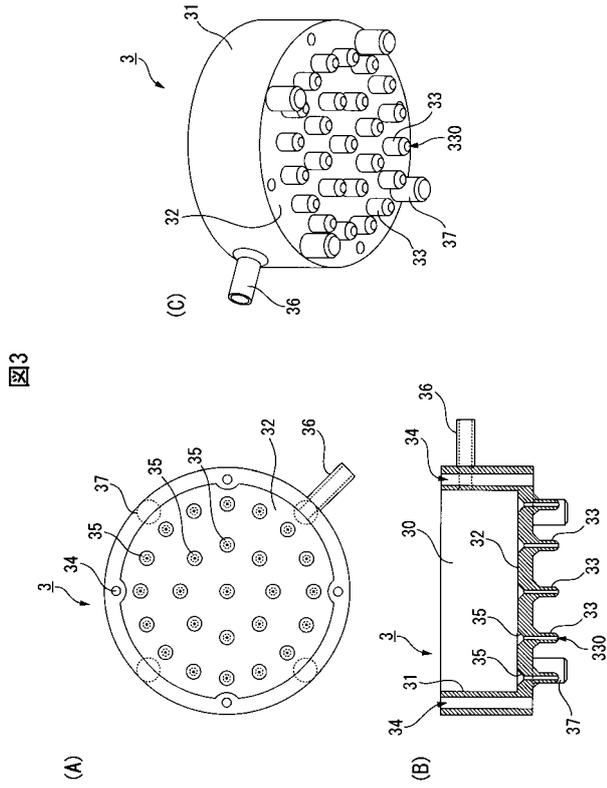
【 図 1 】



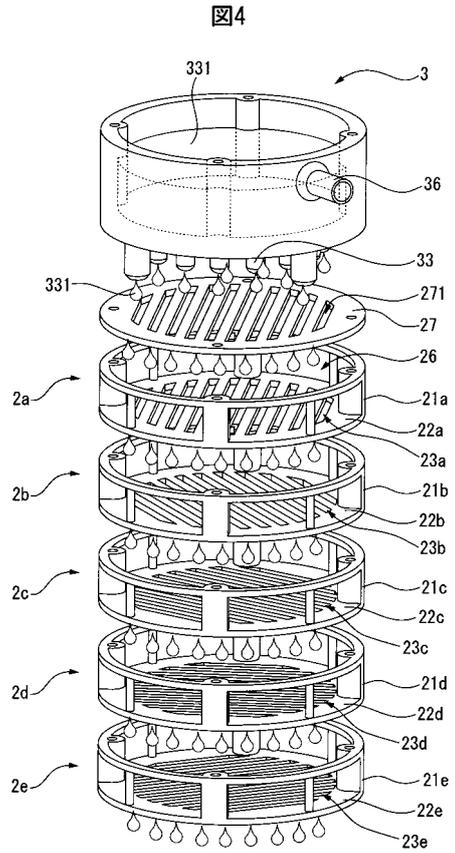
【 図 2 】



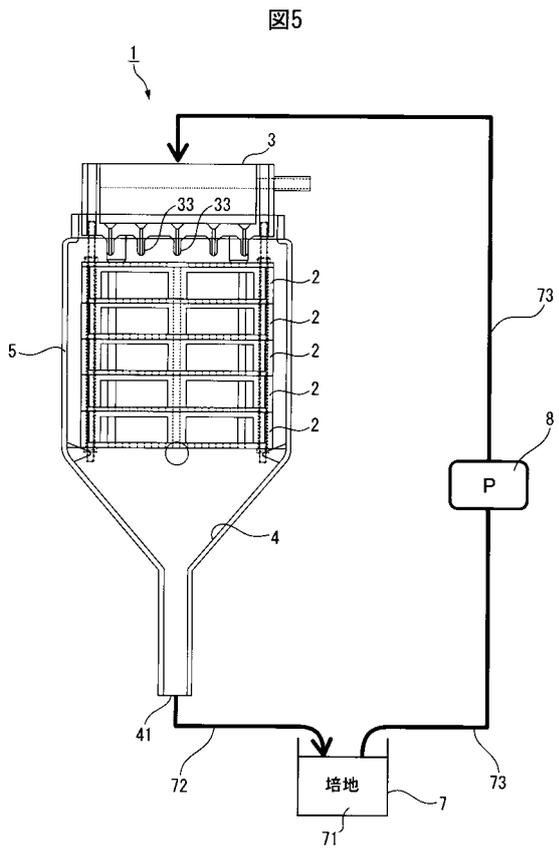
【 図 3 】



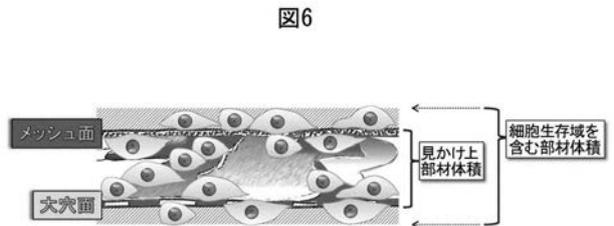
【 図 4 】



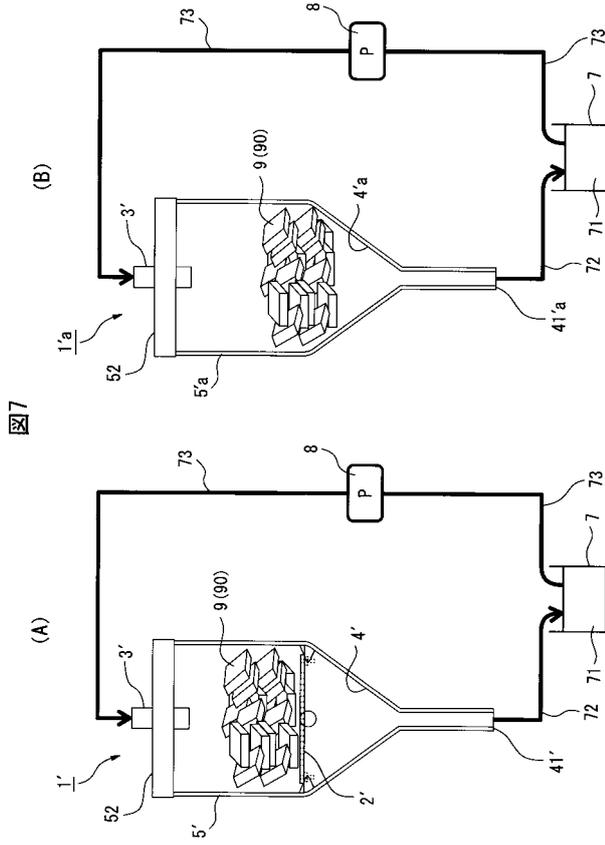
【 図 5 】



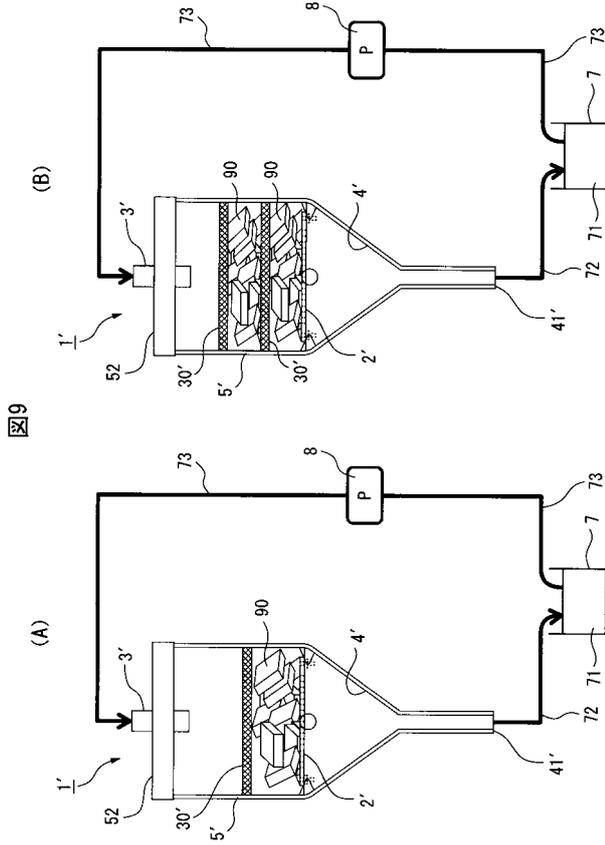
【 図 6 】



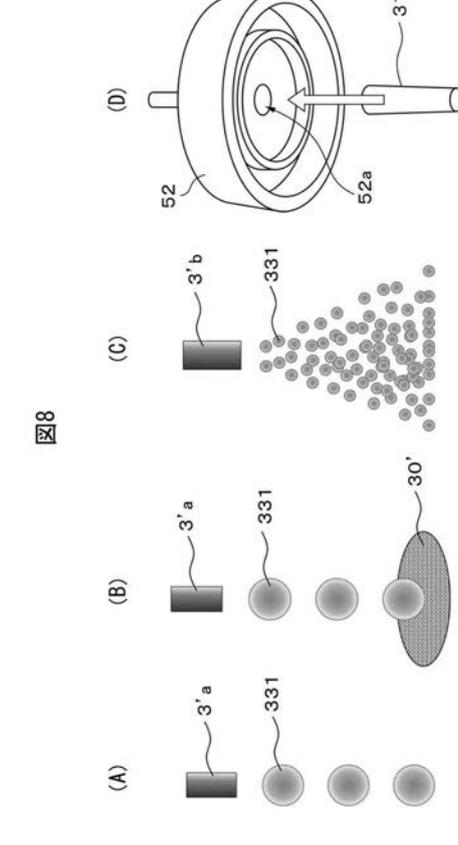
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



【 図 10 】

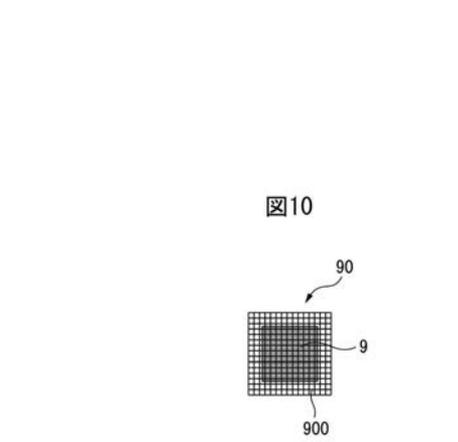


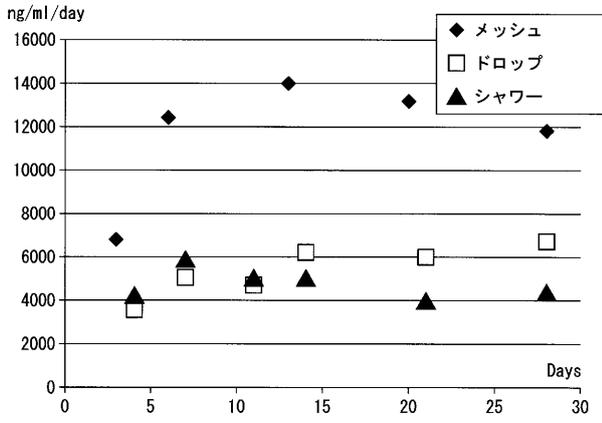
図9

図10

【 図 1 1 】

図11

1日当りのフィブロネクチン産生量



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/026945
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M3/00, C12N5/071 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2016/121775 A1 (Ube Industries, Ltd.), 04 August 2016 (04.08.2016), claims 1 to 37; paragraphs [0065], [0068] & CA 2974278 A	1-23
<u>X</u> A	WO 2015/012415 A1 (Ube Industries, Ltd.), 29 January 2015 (29.01.2015), claims 1 to 23; paragraphs [0057], [0093] to [0095], [0100] to [0101] & US 2016/0168560 A particularly, claims 1 to 23; paragraphs [0098], [0137] to [0139], [0144] to [0145] & EP 3026108 A1 & CN 105452440 A & KR 10-2016-0034303 A	<u>1-6, 9-21, 23</u> 7-8, 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 October 2017 (06.10.17)		Date of mailing of the international search report 17 October 2017 (17.10.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026945

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/136953 A2 (CAPSANT NEUROTECHNOLOGIES LTD.), 28 December 2006 (28.12.2006), claim 6 & JP 2008-543303 A & US 2009/0042288 A1 & EP 1896572 A2 & CN 101268184 A	1-23
A	JP 2012-175964 A (IHI Corp.), 13 September 2012 (13.09.2012), claims 1 to 11; fig. 1 to 6 (Family: none)	1-23
A	JP 2013-021976 A (IHI Corp.), 04 February 2013 (04.02.2013), claims 1 to 10; fig. 1 to 3 (Family: none)	1-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 2 6 9 4 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M3/00, C12N5/071											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
P, X	WO 2016/121775 A1 (宇部興産株式会社) 2016.08.04, 請求項 1-37、段落 65, 68 & CA 2974278 A	1-23									
X A	WO 2015/012415 A1 (宇部興産株式会社) 2015.01.29, 請求項 1-23、段落 57, 93-95, 100-101 & US 2016/0168560 A, 特に請求項 1-23、段落 98, 137-139, 144-145 & EP 3026108 A1 & CN 105452440 A & KR 10-2016-0034303 A	1-6, 9-21, 23 7-8, 22									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 06.10.2017		国際調査報告の発送日 17.10.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 野村 英雄	4 B 4 1 5 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 2 6 9 4 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/136953 A2 (CAPSANT NEUROTECHNOLOGIES LTD) 2006.12.28, 請求項 6 & JP 2008-543303 A & US 2009/0042288 A1 & EP 1896572 A2 & CN 101268184 A	1-23
A	JP 2012-175964 A (株式会社 I H I) 2012.09.13, 請求項 1-11、図 1-6 (ファミリーなし)	1-23
A	JP 2013-021976 A (株式会社 I H I) 2013.02.04, 請求項 1-10、図 1-3 (ファミリーなし)	1-23

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 萩原 昌彦

山口県宇部市大字小串 1 9 7 8 番地の 9 6 宇部興産株式会社内

(72) 発明者 布施 新作

山口県宇部市大字小串 1 9 7 8 番地の 9 6 宇部興産株式会社内

(72) 発明者 清水 基久

山口県宇部市大字小串 1 9 7 8 番地の 9 6 宇部興産株式会社内

(72) 発明者 和田 幸周

山口県宇部市大字小串 1 9 7 8 番地の 9 6 宇部興産株式会社内

F ターム(参考) 4B029 AA02 AA21 BB01 BB11 CC02 CC10 CC11 DA04 DA08 DF05
 DG06 DG08 EA16 GB04 GB05 GB09
 4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA88X AA90X AA93X BC25 BC41 BC42
 BD18

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