

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

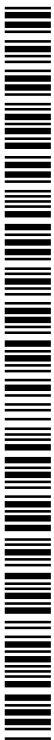
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月4日(04.08.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/121767 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)
C08J 9/28 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
C12M 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/052206
- (22) 国際出願日: 2016年1月26日(26.01.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-012537 2015年1月26日(26.01.2015) JP
特願 2015-012810 2015年1月26日(26.01.2015) JP
- (71) 出願人: 宇部興産株式会社 (UBE INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 萩原 昌彦 (HAGIHARA, Masahiko); 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 宇部興産株式会社内 Yamaguchi (JP). 清水基久 (SHIMIZU, Motohisa); 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 宇部興産株式会社内 Yamaguchi (JP). 和田 幸周 (WADA, Yukinori); 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 宇部興産株式会社内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2016/121767 A1

(54) Title: LONG-TERM CELL-CULTIVATION USING POLYIMIDE POROUS MEMBRANE AND CELL-CRYOPRESERVATION METHOD USING POLYIMIDE POROUS MEMBRANE

(54) 発明の名称: ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の長期培養、及びポリイミド多孔質膜を用いる細胞の凍結保存方法

(57) Abstract: The present invention relates to a long-term cell-cultivation method, a cell-cultivation apparatus and a cell-cultivation kit that use a polyimide porous membrane. Furthermore, the present invention relates to a cell-cryopreservation method and a cell-cryopreservation kit that use a polyimide porous membrane.

(57) 要約: 本発明は、ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の長期培養方法、細胞培養装置及びキットに関する。また、本発明は、ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の凍結保存方法及びキットに関する。

明 細 書

発明の名称：

ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の長期培養、及びポリイミド多孔質膜を用いる細胞の凍結保存方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞の長期培養方法、細胞培養装置及びキットに関する。詳細には、ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の長期培養方法、細胞培養装置及びキットに関する。また、本発明は、細胞の凍結保存方法及びキットに関する。詳細には、ポリイミド多孔質膜を用いる細胞の凍結保存方法及びキットに関する。

背景技術

[0002] 細胞培養

細胞は生体内では一般に三次元的な集団として存在するが、古典的な平面培養では、細胞が容器に張り付く形で単層状に培養される。付着細胞の培養においては、古くより、様々な培養法がシャーレ等により開発されている。このシャーレ等による培養を行った場合、培養細胞は増殖を続け、“コンフルエント”と呼ばれるこれ以上増殖出来ない状況になり、増殖が停止する。細胞種にもよるが、継代せずにこのコンフルエントな状態を継続した場合、ある程度の期間の後に自発的に剥離が始まり、細胞が継代出来なくなること、多くの細胞で見出されている。

[0003] 再生医療における細胞移植や細胞による物質産生が注目を集めるにつれ、付着細胞の培養方法の需要が高まりつつある。これまでに、マイクロキャリア等の担体による擬似浮遊培養や加工表面を用いたスフェロイド培養あるいは中空糸を細胞の培養場として用いる中空糸培養等、各種の立体培養及び担体培養等が開発されている。中空糸培養は、堅牢な中空糸に守られた環境下で、細胞を定常的かつ長期に培養する方法論として取り組まれており、また、マイクロキャリア培養でも、エアリフト法や連続培養を目指した装置的工

夫により長期的培養が多く試みられている。

[0004] これらの方法論の特長は、担体を用いた生育空間への3次元環境の付与による増殖場所の拡大であり、この大きな生育場所に装置的工夫や方法的工夫で担体そのものを強固な環境にて保護し、培養期間を長期化させることを目的としている。その一方で、これらの方法に用いるシステムは、複雑な装置や大きな容積の装置を必要とするものであったり、あるいは一旦培養が始まってしまうと、培養環境そのものには関与し難い閉鎖系システムであるケースが多く見られる。そのため、細胞を長期に培養し、かつ、簡便にそのシステムを取り扱う事の出来る方法論が希求されるが、適切な方法論は開拓されていない。

[0005] 一方、非特許文献1及び2に示されるように、生体内器官を模した長期細胞培養法に関しては、立体的な担体を用いた研究例が報告されている。これらは、膵臓のランゲルハンス島の再構築物生体包埋実験や試験管内での骨髄細胞の長期培養などであり、部位選択的な再構築を目指す研究成果事例である。長期培養という課題に対して3次元立体環境での細胞培養の意義や価値が示された重要な成果であるが、それぞれの担体は用途毎の特異性が高く、使用される材料は生体適合素材の繊維性構造体やプロテッキングにより構成された高次構造体であるため、汎用性に乏しく、取り扱いも一般性に欠けている。より簡便かつ多様な状態に適応して使用可能な方法論の開拓が希求されている。

[0006] 細胞はその生存形態の特徴により、大きくは、浮遊細胞と付着性細胞の2種に大別される。いずれの細胞も、人工的な培養に供する場合は、細胞の播種・培養・増殖・継代そして凍結による保存といったサイクルを経る。

[0007] 近年、培養細胞を用いるワクチン、酵素、ホルモン、抗体、サイトカイン等生体内タンパク質等の産生やあるいは再生医療における細胞移植等が注目を集めるに伴い、大量の細胞を効率的かつ簡便に培養する方法の開発が進められている。特に、担体を用いる細胞培養方法は、その効率面での魅力や汎用性から多方面より注目を集め、多種多様な方法が開発されつつある。これ

ら細胞培養全般において、細胞の凍結保存に関する技術に関しても、多方面からの検討が進められている。古典的な凍結法を脱して、より簡便に培養プレートそのもので細胞の凍結を試みる技術や（特許文献4）、立体的担体を用いて凍結における細胞の生存率向上を目指す方法（特許文献5）、あるいは、繊維性担体を用いて、培養細胞の凍結保存特性を向上させた例（特許文献6）や、幹細胞の生存効率を検証する例（非特許文献3）などの報告がある。

[0008] しかしながら凍結保存媒体としては、特異な構造を有する繊維性素材に限定されており、さらにこの素材は、凍結保存媒体としての機能を有するものの、細胞培養担体としてそのまま使用されうる素材ではなく、一時的保存体として利用されるに留まっている。簡便かつ効率的に、細胞の凍結保存から細胞の解凍（細胞起こし）、使用から再凍結までを一貫して実施し得る、新規な方法論の構築が希求されている。

[0009] 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る。芳香族ポリイミドは、芳香族化合物が直接イミド結合で連結された高分子を意味する。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。

[0010] ポリイミド多孔質膜は、本発明前よりフィルター、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7～9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。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特開平5－123168
特許文献2：特開平10－108673
特許文献3：特公平6－30570
特許文献4：特開2002－34551
特許文献5：特許第5140155号
特許文献6：特開2003－47464
特許文献7：WO2010／038873
特許文献8：特開2011－219585
特許文献9：特開2011－219586

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Mortera-Blanco et al., Biomaterials 32 (2011) 9263-9270
非特許文献2：Daoud et al., Biomaterials 32 (2011) 1536-1542
非特許文献3：A. Bissoyi et al. / Cryobiology 68 (2014) 332-342

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明は、必要な状況や形態に合わせて簡便かつ安定的に細胞を長期培養することが可能であり、培養中の変化に対しても容易に対応することのできる細胞の培養方法、並びに、当該培養方法に使用するための細胞培養装置及びキットを提供することを目的とする。

- [0014] また、本発明は、簡便かつ効率的に、細胞の凍結保存から細胞の解凍（細胞起こし）、使用から再凍結までを一貫して実施し得る、細胞の凍結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

- [0015] 本発明者等は、ポリイミド多孔質膜を用いて細胞培養を実施することで、細胞を効率良く長期間にわたって培養できることを見出した。

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。

[態様1]

細胞の長期培養方法であって、

- (1) 細胞をポリイミド多孔質膜に適用することと、
 - (2) 細胞を適用したポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、30日以上細胞を培養することと
- を含む、方法。

[態様2]

工程(2)において、60日以上細胞を培養する、態様1に記載の方法。

[態様3]

工程(2)において、120日以上細胞を培養する、態様1に記載の方法

。

[態様4]

2以上のポリイミド多孔質膜を、上下又は左右に細胞培養培地中に積層して用いる、態様1～3のいずれか一項に記載の方法。

[態様5]

ポリイミド多孔質膜を

- 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、あるいは、
- iv) 縄状に結んで

細胞培養容器中の細胞培養培地中で浮遊もしくは固定させて用いる、態様1～4のいずれか一項に記載の方法。

[態様6]

工程(2)における培養において、ポリイミド多孔質膜の一部又は全体が、細胞培養培地の液相と接触していない、態様1～5のいずれか一項に記載の方法。

[態様7]

工程(2)における培養において、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イミド多孔質膜体積の総和の1000

0倍又はそれより少ない、態様1～6のいずれか一項に記載の方法。

[態様8]

工程(2)における培養において、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イミド多孔質膜体積の総和の100倍又はそれより少ない、態様1～7のいずれか一項に記載の方法。

[態様9]

工程(2)における培養が、細胞培養容器外に設置された細胞培養培地供給手段から連続的又は間歇的に細胞培養培地が細胞培養容器中に供給される系で行われる、態様1～8のいずれか一項に記載の方法。

[態様10]

細胞培養培地が細胞培養培地供給手段と細胞培養容器との間を循環する、態様9に記載の方法。

[態様11]

態様9又は10に記載の方法であって、前記系が、細胞培養容器である培養ユニットと細胞培養培地供給手段である培地供給ユニットとを含む細胞培養装置であり、ここで

培養ユニットは細胞を担持するための1又は複数のポリイミド多孔質膜を収容する培養ユニットであって、培地供給口および培地排出口を備えた培養ユニットであり、

培地供給ユニットは培地収納容器と、培地供給ラインと、培地供給ラインを介して連続的又は間歇的に培地を送液する送液ポンプとを備え、ここで培地供給ラインの第一の端部は培地収納容器内の培地に接触し、培地供給ラインの第二の端部は培養ユニットの培地供給口を介して培養ユニット内に連通している、培地供給ユニットである、

方法。

[態様12]

培養ユニットが空気供給口、空気排出口、及び酸素交換膜を備えない培養ユニットである、態様13に記載の方法。

[態様 13]

培養ユニットが培地排出ラインをさらに備え、ここで培地排出ラインの第一の端部は培地収納容器に接続し、培地排出ラインの第二の端部は培養ユニットの培地排出口を介して培養ユニット内に連通し、培地が培地供給ユニットと培養ユニットとを循環可能である、態様 11 又は 12 に記載の方法。

[態様 14]

細胞が、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、態様 1～13 のいずれかに記載の方法。

[態様 15]

動物細胞が、脊椎動物門に属する動物由来の細胞である、態様 14 に記載の方法。

[態様 16]

細胞が、CHO細胞、CHO-K1細胞株、CHO DP-12細胞株、CHO細胞関連株、Vero細胞、及びMDCK細胞からなる群より選択される、態様 15 に記載の方法。

[態様 17]

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 1～16 のいずれかに記載の方法。

[態様 18]

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℃以上で熱処理する事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 17 に記載の方法。

[態様 19]

ポリイミド多孔質膜を含む、請求項 1～18 のいずれかに記載の方法に使用するための細胞培養装置。

[態様 20]

2以上のポリイミド多孔質膜が、上下又は左右に積層している、請求項19に記載の細胞培養装置。

[態様21]

ポリイミド多孔質膜を含む、請求項1～13のいずれかに記載の方法に使用するためのキット。

[態様22]

細胞の長期培養方法のための、ポリイミド多孔質膜の使用。

[態様23]

細胞の凍結保存方法であって、

(1) 細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる工程、

(2) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程、及び

(3) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程

を含む、方法。

[態様24]

工程(1)において、細胞をポリイミド多孔質膜に播種することにより、細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる、態様23に記載の方法。

[態様25]

工程(1)において、細胞をポリイミド多孔質膜に播種して培養することにより、細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる、態様23に記載の方法。

[態様26]

工程(3)に続いて、

(4) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が解凍する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を解凍する工程をさらに含む、態様23～25のいずれか一項に記載の方法。

[態様27]

工程(4)に続いて、

(5) 細胞を解凍したポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、細胞を培養する工程をさらに含む、態様 26 に記載の方法。

[態様 28]

工程 (5) において、培養した細胞がポリイミド多孔質膜外においても増殖するまで細胞を培養する、態様 27 に記載の方法。

[態様 29]

工程 (5) において、細胞を解凍したポリイミド多孔質膜と共に、細胞を担持させていない別の 1 又は複数のポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、培養することにより、別の 1 又は複数のポリイミド多孔質膜に細胞を担持させる、態様 27 又は 28 に記載の方法。

[態様 30]

工程 (5) に続いて、

(6) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜の一部又はすべてを、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程、及び

(7) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程をさらに含む、態様 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 31]

工程 (1)～(7) を複数回繰り返す、態様 30 に記載の方法。

[態様 32]

細胞が、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、態様 23～31 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 33]

動物細胞が、脊椎動物門に属する動物由来の細胞である、態様 32 に記載の方法。

[態様 34]

細胞が付着性細胞である、態様 3 2 又は 3 3 に記載の方法。

[態様 3 5]

細胞が浮遊性細胞である、態様 3 2 又は 3 3 に記載の方法。

[態様 3 6]

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、態様 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 7]

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℃以上で熱処理する事により得られる着色したポリイミド多孔質膜である、態様 3 6 に記載の方法。

[態様 3 8]

ポリイミド多孔質膜が、2つの異なる表層面とマクロポイド層を有する多層構造のポリイミド多孔質膜である、態様 3 6 又は 3 7 に記載の方法。

[態様 3 9]

細胞の凍結保存のためのポリイミド多孔質膜。

[態様 4 0]

態様 2 3 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法に用いるためのポリイミド多孔質膜。

[態様 4 1]

ポリイミド多孔質膜を含む、態様 2 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

[態様 4 2]

態様 2 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法のためのポリイミド多孔質膜の使用。

発明の効果

[0016] 本発明は、ポリイミド多孔質膜を用いることで、細胞を簡便かつ安定的に

長期間培養することを可能とする。本発明では、培養担体となるポリイミド多孔質膜が、細胞が通過可能な大口径連結孔を有するために、非常に大量の細胞がその空間で生息しても、最終的に3次元的な空間が確保されている。したがって、古典的な平面培養においてコンフルエントな状態が生じた場合のような培養期間の限界が発生し難くなる。また、本発明では、細胞の培養に際して、特にポリイミド多孔質膜をコラーゲン等によって前処理する必要はない。また、ポリイミド多孔質膜はフレキシブルな薄膜素材であるため、自由な形状に曲げたり畳んだり切ったりすることが簡便にできる。したがって、培養を通じて、必要に応じていつでも、細胞を含むポリイミド多孔質膜を取り出し、処理や測定等に供することが可能である。また、細胞培養の自動化等にも応用可能である。さらに、ポリイミド多孔質膜は非常に耐熱性に優れた素材であるため、滅菌等の操作も極めて簡便に実施可能である。

[0017] ポリイミド多孔質膜を用いて細胞を凍結することで、効率的に大量の細胞を凍結保存し、効率的に細胞を運用することが可能となる。凍結状態から解凍した後には、そのままポリイミド多孔質膜上で細胞培養を継続することができる。さらに、細胞培養を継続しているポリイミド多孔質膜を、細胞の育成していないポリイミド多孔質膜等の他の担体と接触させて、またはその近傍に配置して、細胞を移動・増殖させることができる。細胞の移動終了後には元のポリイミド多孔質膜を取り出して再凍結し、次回の使用まで保存することもできる。このようにして、細胞起こしから使用・凍結までの一連の操作を同じ素材で実施することが可能となる。これらの作業において、トリプシン等の細胞剥離作業や、コラーゲンコーティング等の煩雑な作業は特に必要がないため、作業は簡便で効率的であり、迅速な操作が可能となる。また、本発明の方法は、自動化された工程を含む用途への応用にも適している。効率面においても、少なくとも25マイクロメートルという極めて薄い膜に大量の細胞を育成し得るため、体積あたりの効率は、これまでに類を見ない高いものとなる。例えば、有望な細胞株等を用いて物質産生を行なった場合、長期間の使用に加え、そのまま凍結して細胞を保存して、必要な時期に再

度利用する事が可能となる。有望細胞株のライブラリ化等も容易に実行し得る。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、ポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養のモデル図を示す。

[図2]図2は、細胞培養装置の一例を示す。

[図3]図3は、ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養の結果を示す。

[図4]図4は、ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養の結果を示す。

[図5]図5は、Vero細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養の結果を示す。

[図6]図6は、ポリイミド多孔質膜を用いる細胞凍結及び融解の工程概念図を示す。細胞懸濁液の凍結・融解プロセスとは異なり、直接細胞集合体をポリイミド多孔質膜として取り扱う事が可能となる為、飛躍的に遠心分離等の工程が省略される。

[図7]図7は、ポリイミド多孔質膜を用いる、浮遊系細胞の凍結・融解及び運用に関して概念図を示す。浮遊系細胞は、増殖のプロセスでポリイミド多孔質膜からあふれ出るという特性を活かして、サンプルとしての繰り返し使用に関する利点を示している。

[図8]図8は、ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養の結果を示す。

[図9]図9は、ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養の結果を示す。

[図10]図10は、ポリイミド多孔質膜を用いてCHO DP-12細胞を凍結後、解凍して培養した結果を示す。

[図11]図11は、ポリイミド多孔質膜を用いてヒト皮膚線維芽細胞を凍結後、解凍して培養した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 1. 細胞の培養方法

本発明は、細胞の長期培養方法に関する。なお、国際出願番号PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 0 4 0 7の全内容を、参照により本明細書に援用する。

[0020] 本発明の細胞の培養方法は、細胞をポリイミド多孔質膜に適用し、培養することを含む。本発明者らは、ポリイミド多孔質膜が細胞の接着、培養に適していることを見出し、本発明に想到した。本発明の方法は、ポリイミド多孔質膜に細胞を適用し、ポリイミド膜の表面又は内部で細胞を培養することを含むことを特徴とするものである。

[0021] 1. 細胞のポリイミド多孔質膜への適用

細胞のポリイミド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、細胞のポリイミド多孔質膜への適用は、例えば、以下のような態様を含む。

[0022] (A) 細胞を前記ポリイミド多孔質膜の表面に播種する工程を含む、態様；

(B) 前記ポリイミド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、あるいは前記ポリイミド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) 前記ポリイミド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、

前記湿潤したポリイミド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。

[0023] (A) の態様は、ポリイミド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、ポリイミド多孔質膜を細胞懸濁液中に入れて、膜の表面から細胞培養液を浸潤させる態様も含む。

[0024] ポリイミド多孔質膜の表面に播種された細胞は、ポリイミド多孔質膜に接着し、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、細胞はポリイミド多孔質膜に自発的に接着する。ポリイミド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。

[0025] (B)の態様において、ポリイミド多孔質膜の乾燥した表面に細胞懸濁液を載せる。ポリイミド多孔質膜を放置するか、あるいは前記ポリイミド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、これはポリイミド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。

[0026] あるいは、(C)の態様のように、前記ポリイミド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、湿潤したポリイミド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。

[0027] 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、ポリイミド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、ポリイミド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。

[0028] (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。

[0029] (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。

[0030] 限定されるわけではないが、好ましくは、ポリイミド多孔質膜には生細胞が選択的に留まる。よって、本発明の好ましい態様において、生細胞が前記ポリイミド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。

[0031] 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。

[0032] [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

[0033] さらに、本発明の方法において、細胞のポリイミド多孔質膜への適用は、浮遊状態にある接着性細胞をポリイミド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、本発明の細胞の培養方法において、細胞をポリイミド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イミド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イミド多孔質膜は細胞培養培地中に浮遊した状態である。ポリイミド多孔質膜の性質から、細胞はポリイミド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、ポリイミド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、ポリイミド多孔質膜に自発的に接着する。「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、細胞がポリイミド多孔質膜の表面又は内部に留まることを意味する。

[0034] 細胞培養は、細胞培養における存在形態により培養細胞は接着培養系細胞と浮遊培養系細胞に分類することができる。接着培養系細胞は培養容器に付着し増殖する培養細胞であり、継代には培地交換を行う。浮遊培養系細胞は培地中において浮遊状態で増殖する培養細胞であり、一般的には継代の際には培地交換は行わず、希釈培養を行う。浮遊培養は、浮遊状態、即ち液体中での培養が可能のため、大量培養が可能であり、培養容器表面にのみ生育する付着細胞と比較すると、立体的な培養である為に、単位空間当りの培養可能細胞数は多いという利点がある。

[0035] 本発明の長期培養方法において、ポリイミド多孔質膜を細胞培養培地中に浮遊した状態で用いる場合、2以上の前記ポリイミド多孔質膜の小片を用いてもよい。ポリイミド多孔質膜はフレキシブルな薄膜であるため、例えばその小片を培養液中に浮遊させて用いることにより、一定容量の細胞培養培地中に多くの表面積を有するポリイミド多孔質膜を持ち込むことが可能となる。通常培養の場合、容器底面積が細胞培養可能な面積の上限となるが、本発明のポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養では、先の持ち込まれたポリイミド多孔質膜の大表面積の全てが細胞培養可能な面積となる。ポリイミド多孔質膜は細胞培養液を通過させるので、例えば折りたたまれた膜内にも栄養や酸素等の供給が可能となる。

[0036] ポリイミド多孔質膜の小片の大きさ、形状は、特に限定されない。形状は、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。

[0037] 本発明のポリイミド多孔質膜は柔軟性があるため形状を変化させて用いることができる。ポリイミド多孔質膜を平面状ではなく、立体状に形状を加工して用いてもよい。例えば、ポリイミド多孔質膜を、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、あるいは、i v) 縄状に結んで、細胞培養容器中の細胞培養培地中で浮遊もしくは固定させてもよい。i) ~ i v) のように形状を加工することにより、小片を用いる場合と同様に、一定容量の細胞培養培地中に多くのポリミド多孔質膜を入れることができる。さらに、各小片を集合体として取り扱うことができるため、細胞体を集合化して移動させることが可能となり、総合的な応用性が高い。

[0038] 小片集合体と同様の考え方として、2以上のポリミド多孔質膜を、上下又は左右に細胞培養培地中に積層して用いてもよい。積層とは、ポリミド多孔質膜が一部重なる態様も含む。積層培養により、狭いスペースで高密度に細胞を培養することが可能になる。既に細胞が育成している膜上にさらに膜を積層させて設置して別種細胞との多層系を形成することも可能である。積層するポリミド多孔質膜の数は特に限定されない。

[0039] 上述した本発明の細胞の培養方法を、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)のいずれかの方法を用いて先ずポリミド多孔質膜に細胞を適用し、次いで、細胞が接着したポリミド多孔質膜を浮遊培養してもよい。あるいは、ポリミド多孔質膜に適用する工程として、上記態様(A) ~ (C)のいずれかの方法を2種類又はそれより多くを組み合わせ用いてもよい。

[0040] 本発明の長期培養方法において、好ましくは、細胞はポリミド多孔質膜の表面及び内部に生育し増殖する。

本発明の長期培養方法により、細胞は従来のようにトリプシン処理等を行う継代操作を行う事なく、30日以上、60日以上、120日以上、200日以上、または300日以上にわたって培養することができる。また、本発明の長期培養方法により、従来の平面培養で培養することができる期間以上、例えば、平面培養期間の1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上の期間、細胞を培養することができる。本発明によれば、シャーレ等の平面培養での長期間の細胞培養で発生する細胞の剥離や死滅等を生じる事なく、休止状態ではなく動的な

生命を長期間維持する事ができる。また、本発明によれば、長期培養した細胞であってもセルバイアビリティ又は細胞の性質（例えば、分化誘導効率、細胞表面マーカーの発現量等）が、長期培養前の細胞と比較してほとんど変化しない。また、本発明によれば、細胞がポリイミド多孔質膜内において三次元的に増殖するため、従来の平面培養で見られるような培養領域の制限及び平面環境によりおこるコンタクトインヒビションが起こりにくいため、長期間、生育させる培養が可能となる。また、本発明によれば、細胞が接着したポリイミド多孔質膜に別のポリイミド多孔質膜を接触させることによって、細胞培養可能な空間を任意に増加することが可能であり、従来のようなトリプシン処理を伴った継代操作を行うことなく、コンタクトインヒビションが引き起こされるコンフルエント状態を回避しながら長期間、増殖させる培養が可能となる。また、本発明によれば、細胞を凍結等行うことなく、生きたまま長期間保存するという新たな保存方法までも提供するものである。

[0041] 2. 細胞

本発明の方法に利用し得る細胞の種類は特に限定されず、任意の細胞の増殖に利用可能である。

[0042] 例えば、細胞は、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。

[0043] 本明細書における植物細胞の由来は特に限定されない。コケ植物、シダ植物、種子植物を含む植物の細胞が対象となる。

種子植物細胞が由来する植物は、単子葉植物、双子葉植物のいずれも含ま

れる。限定されるわけではないが、単子葉植物には、ラン科植物、イネ科植物（イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、ソルガム等）、カヤツリグサ科植物などが含まれる。双子葉植物には、キク亜綱、モクレン亜綱、バラ亜綱など多くの亜綱に属する植物が含まれる。

[0044] 藻類も、細胞由来生物として見なす事が出来る。真正細菌であるシアノバクテリア（藍藻）から、真核生物で単細胞生物であるもの（珪藻、黄緑藻、渦鞭毛藻など）及び多細胞生物である海藻類（紅藻、褐藻、緑藻）などの異なるグループを含む。

[0045] 本明細書における古細菌及び細菌の種類も特に限定されない。古細菌は、メタン菌・高度好塩菌・好熱好酸菌・超好熱菌等からなる群から構成される。細菌は、例えば、乳酸菌、大腸菌、枯草菌及びシアノバクテリアなどからなる群から選択される。

[0046] 本発明の方法に利用しうる動物細胞又は植物細胞の種類は、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。

[0047] 本発明において「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WO2009/123349（PCT/JP2009/057041）に記載の多能性幹細胞を使用可能である。

[0048] 「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。

[0049] 「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。

[0050] 「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、無性生殖のための胞子などを含む。

[0051] 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）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。動物細胞、植物細胞、細菌の形質転換については、各々適した方法が公知である。

[0052] 3. 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。

[0053] 本発明において用いるポリイミド多孔質膜は、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。

[0054] 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℃以上で熱処理する事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。

[0055] ポリアミック酸

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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 着色前駆体

本発明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物を生成する前駆体を意味する。

[0059] 本発明で用いられ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280℃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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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て用いることもできる。

[0063] これらの中でも、特に、ビ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。ビフェニルテトラカルボン酸二無水物としては、3, 3', 4, 4'-ビ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。

[0064] 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ことができる。

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'-ジアミノビフェニル、2, 2'-ジメチル-4, 4'-ジアミノビフェニル、2, 2'-ビス(トリフルオロメチル)-4, 4'-ジアミノビフェニル、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) ビフェニル、3, 3'-ビス (4-アミノフェノキシ) ビフェニル、4, 4'-ビス (3-アミノフェノキシ) ビフェニル、4, 4'-ビス (4-アミノフェノキシ) ビフェニル、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。

[0065] 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。

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。

[0066] 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。

[0067] 本発明の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、

(iii) 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、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。

[0068] 限定されるわけではないが、ポリイミド多孔質膜として、少なくとも、2つの表面層(A面及びB面)と、当該2つの表面層の間に挟まれたマクロポイド層とを有する多層構造のポリイミド多孔質膜を、本発明の方法に使用することが可能である。好ましくは、ポリイミド多孔質膜は、前記マクロポイド層が、前記表面層(A面及びB面)に結合した隔壁と、当該隔壁並びに前記表面層(A面及びB面)に囲まれた、膜平面方向の平均孔径が10~500μmである複数のマクロポイドとを有し、前記のマクロポイド層の隔壁、

並びに前記表面層（A面及びB面）はそれぞれ、厚さが0.01～20 μm であり、平均孔径0.01～100 μm の複数の孔を有し、当該細孔同士が連通しても良く、更に前記マクロポイドに連通して部分的あるいは全面的に多層構造を有しており、そして、総膜厚が5～500 μm であり、空孔率が40%以上95%未満である、ポリイミド多孔質膜である。

[0069] 本発明において用いられるポリイミド多孔質膜の総膜厚は、限定されるわけではないが、一態様として20～75 μm としてもよい。膜厚の相違により、細胞の増殖速度、細胞の形態、面内における細胞の飽和度等に相違が観察されうる。

[0070] 本発明において、2つの異なる表面層（A面及びB面）と、当該2つの表面層の間に挟まれたマクロポイド層とを有するポリイミド多孔質膜が使用される場合、A面に存在する孔の平均孔径は、B面に存在する孔の平均孔径と差があってもよい。好ましくは、A面に存在する孔の平均孔径は、B面に存在する孔の平均孔径よりも小さい。より好ましくは、A面に存在する孔の平均孔径がB面に存在する孔の平均孔径よりも小さく、A面に存在する孔の平均孔径が0.01～50 μm 、0.01 μm ～40 μm 、0.01 μm ～30 μm 、0.01 μm ～20 μm 、又は0.01 μm ～15 μm であり、B面に存在する孔の平均孔径が20 μm ～100 μm 、30 μm ～100 μm 、40 μm ～100 μm 、50 μm ～100 μm 、又は60 μm ～100 μm である。特に好ましくは、ポリイミド多孔質膜のA面が平均孔径15 μm 以下、例えば0.01 μm ～15 μm の小さい穴を有するメッシュ構造であり、B面が平均孔径20 μm 以上、例えば20 μm ～100 μm の大穴構造である。

[0071] 本発明において用いられるポリイミド多孔質膜の総膜厚の測定は、接触式の厚み計で行うことができる。

ポリイミド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。

[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。)

[0072] 本発明において用いられるポリイミド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]

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

(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 はポリイミドの密度をそれぞれ意味する。ポリイミドの密度は 1.34 g/cm^3 とする。)

[0073] 例えば、国際公開 WO 2010/038873、特開 2011-219585、又は特開 2011-219586 に記載されているポリイミド多孔質膜も、本発明の方法に使用可能である。

[0074] ポリイミド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。細胞は膜中の生育・増殖する位置に応じて、種々の異なる形態をとりうる。本発明の一態様において、細胞の種類に応じて、ポリイミド多孔質膜の表面及び内部を移動しながら、形状を変化させながら増殖することもある。

[0075] 本発明の方法において細胞を適用するポリイミド多孔質膜は、当然、適用する以外の細胞を含まない状態、即ち、滅菌されていることが好ましい。本発明の方法は、好ましくは、ポリイミド多孔質膜を予め滅菌する工程を含む。ポリイミド多孔質膜は、耐熱性に極めて優れており、軽量であり、形・大

きさも自由に選択可能であり、滅菌処理が容易である。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が可能である。

[0076] 4. 細胞培養と培養体積

ポリイミド多孔質膜を用いた細胞培養のモデル図を図1に示す。本発明の方法では、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。たとえば、ポリイミド多孔質膜の一部又は全体が、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イミド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。

[0077] 本明細書において、細胞を含まないポリイミド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「見かけ上ポリイミド多孔質膜体積」と呼称する（図1の左の状態）。そして、ポリイミド多孔質膜に細胞を適用し、ポリイミド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、ポリイミド多孔質膜、細胞、及びポリイミド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イミド多孔質膜体積」と呼称する（図1の右の状態）。膜厚25 μ mのポリイミド多孔質膜の場合、細胞生存域を含むポリイミド多孔質膜体積は、見かけ上ポリイミド多孔質膜体積より、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イミド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イミド多孔質膜のそれぞれについての細胞生存域を含むポリイミド多孔質膜体積の総和を、単に「細胞生存域を含むポリイミド多孔質膜体積の総和」と記載することがある。

[0078] 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イミド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イミド多孔質膜体積の総和の1000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イミド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イミド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。

[0079] 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、積層するポリイミド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イミド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。この集積化の概念は、凍結においても重要であり、極小空間に大量の細胞を凍結させて保存する事が可能となる。

[0080] 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。たとえば、ポリイミド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。たとえば、実施例1で用いた方法のように、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、ポリイミド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、培養したポリミド多孔質膜を、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。

[0081] 3. 細胞の培養システム及び培養条件

本発明の方法において、細胞の培養システム及び培養条件は、細胞の種類等に応じて適宜決定することができる。動物細胞、植物細胞、及び細菌の各細胞に適した培養方法が公知であり、当業者は任意の公知の方法を用いてポリミド多孔質膜に適用した細胞を培養することができる。細胞培養培地も細胞の種類に応じて適宜調製することができる。

[0082] 動物細胞の細胞培養方法、細胞培養培地は、例えば、ロンザ社の細胞培養培地カタログに記載されている。植物細胞の細胞培養方法、細胞培養培地は、例えば、WAKO社の植物組織培地シリーズ等に記載されている。細菌の細胞培養方法、細胞培養培地は、例えば、BD社の一般細菌用培地カタログに記載されている。本発明の方法に用いることの細胞培養培地は、液体培地、半固形培地、固形培地等のいずれの形態であってもよい。また、液滴状とした液体培地を細胞培養容器中に噴霧することにより、細胞を担持したポリミド多孔質膜に培地が接触するようにしてもよい。

[0083] ポリミド多孔質膜を用いる細胞の培養に関して、マイクロキャリアやセルローススポンジ等、他の浮遊型培養担体と共存させることもできる。

本発明の方法において、培養に用いるシステムの形状、規模などは特に限定されず、細胞培養用のシャーレ、フラスコ、プラスチックバッグ、試験管から大型のタンクまで適宜利用可能である。例えば、BD Falcon社製のセルカルチャーディッシュやサーモサイエンティフィック社製のNuncセルファクトリー等が含まれる。なお、本発明においてポリミド多孔質膜を用いることにより、生来浮遊培養が可能でなかった細胞についても浮遊培養向け装置にて、浮遊培養類似状態での培養を行うことが可能になった。浮遊培養用の装置としては、例えば、コーニング社製のスピナーフラスコ

や回転培養等が使用可能である。また、同様の機能を実現出来る環境として、VERITAS社のFiberCell（登録商標）Systemの様な中空糸培養も使用することが可能である。

[0084] 本発明の方法における培養は、ポリミド多孔質膜上に連続的に培地を添加し回収するような連続循環もしくは開放型の装置を用いて、空気中にポリミド多孔質膜シートを露出させるような型式で実行することも可能である。

[0085] 本発明において、細胞の培養は、細胞培養容器外に設置された細胞培養培地供給手段から連続的又は間歇的に細胞培養培地が細胞培養容器中に供給される系で行ってもよい。その際、細胞培養培地が細胞培養培地供給手段と細胞培養容器との間を循環する系であることができる。

[0086] 細胞の培養を、細胞培養容器外に設置された細胞培養培地供給手段から連続的又は間歇的に細胞培養培地が細胞培養容器中に供給される系で行う場合、その系は、細胞培養容器である培養ユニットと細胞培養培地供給手段である培地供給ユニットとを含む細胞培養装置であってよく、ここで

培養ユニットは細胞を担持するための1又は複数のポリミド多孔質膜を収容する培養ユニットであって、培地供給口および培地排出口を備えた培養ユニットであり、

培地供給ユニットは培地収納容器と、培地供給ラインと、培地供給ラインを介して連続的又は間歇的に培地を送液する送液ポンプとを備え、ここで培地供給ラインの第一の端部は培地収納容器内の培地に接触し、培地供給ラインの第二の端部は培養ユニットの培地供給口を介して培養ユニット内に連通している、培地供給ユニットである細胞培養装置であってよい。

[0087] また、上記細胞培養装置において、培養ユニットは空気供給口、空気排出口、及び酸素交換膜を備えない培養ユニットであってよく、また、空気供給口及び空気排出口、又は酸素交換膜を備えた培養ユニットであってよい。培養ユニットは空気供給口及び空気排出口、並びに酸素交換膜を備えないもの

であっても、細胞の培養に必要な酸素等が培地を通じて十分に細胞に供給される。さらに、上記細胞培養装置において、培養ユニットが培地排出ラインをさらに備え、ここで培地排出ラインの第一の端部は培地収納容器に接続し、培地排出ラインの第二の端部は培養ユニットの培地排出口を介して培養ユニット内に連通し、培地が培地供給ユニットと培養ユニットとを循環可能であってよい。

[0088] 上記細胞の培養システムの一例である細胞培養装置の例を図2に示すが、本発明の目的のために用いることができる細胞の培養システムはこれに限定されるものではない。

[0089] 11. 細胞培養装置

本発明はまた、ポリイミド多孔質膜を含む、本発明の培養方法に使用するための細胞培養装置に関する。本発明の細胞培養装置において、ポリイミド多孔質膜は固定されて用いられてもよく、あるいは細胞培養培地中に浮遊して用いられてもよく、培地中に置かれても、培地から露出しても良い。細胞培養装置において、2以上のポリイミド多孔質膜が、上下又は左右に積層してもよい。積層された集合体や集積体は、培地中に置かれても培地から露出してもかまわない。

[0090] 本発明の細胞培養装置としては、ポリイミド多孔質膜を含むものであれば任意の形態を取ってよい。たとえば、上述した本発明の長期培養方法において用いる細胞の培養システムは、いずれも本発明の細胞培養装置として用いることができる。

[0091] 111. 細胞の培養方法に使用するためのキット

本発明はさらに、ポリイミド多孔質膜を含む、細胞の培養方法に使用するためのキットに関する。

[0092] 本発明のキットは、ポリイミド多孔質膜の他に、細胞培養に必要な構成要素を適宜含みうる。例えば、ポリイミド多孔質膜に適用する細胞、細胞培養培地、連続的培地供給装置、連続的培地循環装置、ポリイミド多孔質膜を支持する足場もしくはモジュール、細胞培養装置、キットの取り扱い説明書な

どが含まれる。

[0093] 限定されるわけではないが、一態様として、透明なパウチ内に滅菌されたポリイミド多孔質膜が単独で又は複数枚保存され、そのまま細胞培養に使用可能な形態を含むパッケージや、あるいは、同パウチ内にポリイミド多孔質膜と共に滅菌液体が封入されており、効率的吸込み播種が可能になっている膜・液体の一体型形態のキットを含む。

[0094] I V. 使用

本発明は、細胞の長期培養方法のための、ポリイミド多孔質膜の使用にも関する。また、細胞の長期培養方法のための、上述した細胞培養装置の使用にも関する。

[0095] V. 細胞の凍結保存方法

本発明は、細胞の凍結保存方法であって、

(1) 細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる工程、

(2) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程、及び

(3) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程

を含む、方法に関する。本発明によれば、高密度に培養された細胞を担持した状態でポリイミド多孔質膜を凍結することが可能であり、従来の非接着状態で凍結させる細胞の凍結方法と比較して、圧倒的に高密度の状態を細胞を凍結することが可能となる。

[0096] 1. 細胞

本発明の方法に利用し得る細胞の種類は特に限定されず、上述の任意の細胞が利用可能である。

[0097] 2. 細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる工程

本発明の方法は、細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる工程を含む。

ポリイミド多孔質膜に細胞を担持させる方法としては任意の方法を用いることができるが、たとえば以下のような方法を用いることができる。

[0098] (A) 細胞を前記ポリイミド多孔質膜の表面に播種する工程を含む、態様；

(B) 前記ポリイミド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、あるいは前記ポリイミド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) 前記ポリイミド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、

前記湿潤したポリイミド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。

ポリイミド多孔質膜の表面に播種された細胞は、ポリイミド多孔質膜に接着し、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、細胞はポリイミド多孔質膜に自発的に接着する。ポリイミド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。

[0099] なお、細胞を担持させたポリイミド多孔質膜と共に、細胞を担持させていない別の1又は複数のポリイミド多孔質膜を同じ細胞培養培地に適用し、培養することにより、別の1又は複数のポリイミド多孔質膜に細胞を担持させてもよい。その際、細胞を担持させたポリイミド多孔質膜と、細胞を担持させていない別の1又は複数のポリイミド多孔質膜とは、積層等によって互いに接触させてもよいし、単に同じ細胞培養培地内に設置してもよい。

[0100] 3. 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程

細胞が凍結する条件としては、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞の一

部又はすべてが、凍結後に解凍された際に生命機能を保持しているような条件であれば、適宜設定することができる。また、ポリイミド多孔質膜を入れるための凍結用チューブや凍結用ケーン等も、市販されている製品を使用することができる。

[0101] たとえば、ポリイミド多孔質膜を細胞凍結保存液中に浸漬し、それを第一の低温条件下において凍結させた後、第一の低温条件より低い第二の低温条件下に移して凍結させることができる。第一の低温条件としては、たとえばマイナス20～25℃程度の条件を用いることができ、第二の低温条件としては、マイナス80～90℃程度の条件を用いることができる。

[0102] 第一の低温条件下におく工程は省略してもよい。第一の低温条件より低い第二の低温条件下への移行は、直線的、段階的、曲線的、又は即時のいずれの形態を取ってもよい。

第一の低温条件を提供する装置と、第二の低温条件を提供する装置は別個のものでもよいし、同じでもよい。第一の低温条件を提供する装置と、第二の低温条件を提供する装置とが別個のものである場合としては、たとえば第一の低温条件を提供する装置が通常のフリーザーであり、第二の低温条件を提供する装置がディープフリーザーである場合が挙げられるが、これに限定されない。また、第一の低温条件を提供する装置と、第二の低温条件を提供する装置とが同じ場合としては、一定の速度で温度を低下させることができるプログラムフリーザー（たとえばネッパジーン株式会社製プログラムフリーザー等）を用いる場合が挙げられるが、これに限定されない。

[0103] 細胞凍結保存液としては、公知のものを適宜使用することができる。たとえば、細胞培養液にDMSOを5%～20%程度になるよう添加したもの、細胞培養液にグリセロールを5%～20%程度になるよう添加したもの、ZENOAQ社製のカタログに記載されている各種セルバンカーのような市販の細胞凍結保存液を好適に用いることができる。

[0104] 4. 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程

本発明の方法は、上述したように細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程を含む。凍結状態を保つ条件としては、上記第二の低温条件下でそのまま保存する条件や、第二の低温条件よりさらに低温である第三の低温条件下で保存する条件が挙げられる。第三の低温条件の例としては、たとえば液体窒素中におく場合が挙げられるが、これに限定されない。

[0105] 本発明の方法によれば、浮遊性細胞であっても付着性細胞であっても、細胞の種類を問わず、良好に凍結保存することができる。本発明の方法によって浮遊性細胞を凍結保存した場合は、球形を保ったまま、ポリイミド多孔質膜の立体構造内に細胞が收容されて保存される。また、本発明の方法によって付着性細胞を凍結保存した場合は、ポリイミド多孔質膜内で生育・増殖していたときと同様の非球形状態を保ったまま、ポリイミド多孔質膜の立体構造内に細胞が收容されて保存される。

[0106] 本発明の方法において細胞を担持させるポリイミド多孔質膜は、当然、担持させる以外の細胞を含まない状態、即ち、滅菌されていることが好ましい。本発明の方法は、好ましくは、ポリイミド多孔質膜を予め滅菌する工程を含む。ポリイミド多孔質膜は、耐熱性に極めて優れており、軽量であり、形・大きさも自由に選択可能であり、滅菌処理が容易である。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が可能である。

[0107] 5. ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を解凍する工程

本発明の方法では、細胞を担持したポリイミド多孔質膜を凍結保存後に解凍することができる。ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を解凍する方法としては、凍結保存されたポリイミド多孔質膜を保存容器の外部から加温し、解凍する方法が挙げられる。加温の方法としては、37℃程度の恒温の温湯に容器を浸す等の方法を適宜用いることができる。

[0108] 6. 細胞を解凍したポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、細胞を培養する工程

本発明の方法では、細胞を解凍したポリイミド多孔質膜をそのまま細胞培養培地に適用することで、解凍された細胞を同じポリイミド多孔質膜上で培養することができる。

[0109] その際、培養した細胞がポリイミド多孔質膜外においても増殖するまで細胞を培養してもよい。浮遊性細胞の場合、ポリイミド多孔質膜内から細胞培養培地中に移行したものは、そのまま培地中で増殖することができる。付着性細胞の場合、ポリイミド多孔質膜内又は表面に留まるものが多いものの、一部の細胞はポリイミド多孔質膜に接した培養容器や、細胞を担持していない別の培養担体に移行することができる。

[0110] したがって、細胞を解凍したポリイミド多孔質膜と共に、細胞を担持させていない別の1又は複数のポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、培養することにより、別の1又は複数のポリイミド多孔質膜に細胞を担持させ、必要であれば培養を続けることも可能となる。

[0111] この場合、細胞を解凍したポリイミド多孔質膜、及び新たに細胞を担持させた別のポリイミド多孔質膜のうちの一部又はすべてを細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結させ、保存することが可能となる。

[0112] 上述したような凍結、保存、解凍、及び培養の工程は複数回繰り返すことができる。本発明によれば、細胞を大量に担持した状態でポリイミド多孔質膜を凍結、保存することが可能であり、任意の時に解凍し、プレ培養工程を経ることなく、所望の用途（例えば、タンパク質の産生等）に使用可能である。従来、解凍した細胞を使用するためには、解凍した細胞をプレ培養し、生存している細胞を所望の基材又は担体に担持させて培養する必要があった。しかし、本発明によれば、従来必要である解凍後のプレ培養工程を経ることなく、ポリイミド多孔質膜に細胞を接着させたまま培養、凍結、保存、解凍、そして再培養が可能である。そのため、例えば、細胞を担持した状態で凍結したポリイミド多孔質が大量に準備されていれば、拡大培養工程を経ずに、所望の時に大量の細胞を使用することが可能である。

[0113] V I . 細胞の凍結保存のためのポリイミド多孔質膜

本発明は、細胞の凍結保存のためのポリイミド多孔質膜にも関する。本発明の、細胞の凍結保存のためのポリイミド多孔質膜は、上述した細胞の凍結保存方法のためのポリイミド多孔質膜であってよい。

[0114] V I I . キット

本発明は、ポリイミド多孔質膜を含む、細胞の凍結保存のためのキットにも関する。

本発明のキットは、ポリイミド多孔質膜の他に、細胞培養に必要な構成要素を適宜含む。例えば、ポリイミド多孔質膜、細胞凍結保存液、凍結用チューブ、凍結用ケーン及びキットの取り扱い説明書などが含まれる。

[0115] 限定されるわけではないが、一態様として、透明なパウチ内に滅菌されたポリイミド多孔質膜が単独で又は複数枚保存され、そのまま細胞凍結に使用可能な形態を含むパッケージや、あるいは、同パウチ内にポリイミド多孔質膜と共に細胞凍結保存液が封入されており、迅速使用が可能になっている膜・液体の一体型形態のキットを含む。

[0116] 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。以後、特に記述しない場合には、「ポリイミド多孔質膜」は総膜厚 $25\ \mu\text{m}$ 、空孔率 73% のポリイミド多孔質膜をいうものとする。当該ポリイミド多孔質膜は、2つの異なる表面層（A面及びB面）と、当該2つの表面層の間に挟まれたマクロポイド層とを有した。A面に存在する穴の平均孔径は $6\ \mu\text{m}$ であり、B面に存在する穴の平均孔径は $46\ \mu\text{m}$ であった。

[0117] なお、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 $3, 3', 4, 4'$ -ビ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、調製された。

[0118] <使用した細胞、材料等>

- ・ヒト線維芽細胞 (LONZA社 product code CC-2511)
- ・Vero細胞 (DSファーマバイオメディカル社、cat. DS1U002)
- ・CHO-K1 (パブリックヘルスイングランド cat. 85051005)
- ・CHO DP-12 (Summit Pharmaceuticals Intl CRL-12445)
- ・ヒト線維芽細胞用培地 (LONZA社 product code CC-3132)
- ・Vero細胞用培地 (和光純薬工業株式会社 E-MEM 051-07615)
- ・CHO-K1用培地 (和光純薬工業株式会社 Ham's F-12 087-08335)
- ・CHO DP-12用培地 (和光純薬工業株式会社 IMDM, -06465)
- ・3.5cmシャーレ (Falcon社 cat. 353001)
- ・Cell Counting Kit 8 (株式会社同仁化学研究所 CK8 CK04)
- ・クライオチューブ (Thermo Fisher Scientific 社 1.8ml cat. 377267)
- ・2cm×2cmの滅菌された正方形容器 (Thermo Fisher Scientific 社 cat. 103)
- ・セルバンカー (日本全薬工業株式会社 CELLBANKER 1 Plus cat. CB021)

・顕微鏡名、使用した画像ソフト名 (Carl Zeiss 社製 LSM 700 使用ソフト ZEN

実施例 1

[0119] ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養

2 cm × 2 cm の滅菌された正方形容器に細胞培養培地 0.5 ml を加え、滅菌した 1.4 cm 角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造の A 面もしくは大穴構造の B 面を上にしてそれぞれ浸漬させた。1 枚のシートあたり 5×10^4 個のヒト皮膚線維芽細胞及び、1 枚のシートあたり 3×10^5 個のヒト皮膚線維芽細胞懸濁液をそれぞれ添加し、1 週間に 2 回の割合で培地交換し、細胞培養を継続的に実施した。これらシートを各 5 枚ずつ用意し、20 cm² シャーレに移動し、4 ml の培地を加えて培養を継続した。4 日間、7 日間、13 日間、31 日間、56 日間、84 日間後に CCK8 を用いて細胞数を計測し、増殖挙動を観察した。結果を図 3 に示す。参照例として、平面培養 (播種密度: 3.5×10^3 個/cm²) で 14 日までの経過も併記する。

実施例 2

[0120] ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養

2 cm × 2 cm の滅菌された正方形容器に細胞培養培地 0.5 ml を加え、滅菌した 1.4 cm 角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造の A 面もしくは大穴構造の B 面を上にして浸漬させた。1 枚のシートあたり 4×10^4 個の細胞を播種し、CO₂ インキュベータ内で培養を継続的に行った。週 2 回培地 (1 ml) を交換した。培養開始後、89 日間、118 日間、127 日間、139 日間後に CCK8 を用いて細胞数を計測し、細胞生育挙動を観察した。観測期間を通じて、1 cm² 当り 1.5×10^5 個以上の細胞数が観測された。結果を図 4 に示す。

実施例 3

[0121] Verob細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養

2 cm × 2 cm の滅菌された正方形容器に細胞培養培地 1 ml を加え、滅

菌した1.4cm角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造のA面もしくは大穴構造のB面を上にして浸漬させた。1枚のシートあたり 4×10^4 個及び 1×10^5 個の細胞を播種し、CO₂インキュベータ内で培養を継続的に行った。この際、通常使用の厚み25 μ mのポリイミド多孔質膜に加え、75 μ mのポリイミド多孔質膜を使用した。また、FBS量も、培地に対して10%もしくは5%の量を使用した。週2回培地(1ml)を交換して、培養を継続した。140日の期間で、CCK8を用いて間歇的に細胞数を計測し、細胞生育挙動を観察した。安定した細胞の生育が観察された。図5に結果を示す。

実施例 4

[0122] 2cm \times 2cmの滅菌された正方形容器に細胞培養培地1mlを加え、滅菌した1.4cm角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造のA面を上にして浸漬させた。1枚のシートあたり 4×10^4 個のCHO-K1株細胞を添加し、20日間細胞培養した後、CCK8を用いて細胞数を測定したところ、シート上の細胞数は 7.7×10^6 個であった。

[0123] この細胞が生育しているシートを3枚の縦長シートに切り、培地に入れたまま5 $^{\circ}$ Cに20時間保存後、ポリイミド多孔質膜を取り出してセルバンカー1mlを加えたクライオチューブに入れ、-20 $^{\circ}$ Cにて24時間保存後更に-80 $^{\circ}$ Cにて24時間保存し、液体窒素中に移動させた。20日後、チューブを37 $^{\circ}$ Cに加温して内容物を融解し、インキュベータ内に16時間放置した。CCK8を用いて細胞数を測定したところ、シート上の細胞数は 4.6×10^6 個であった。

実施例 5

[0124] 2cm \times 2cmの滅菌された正方形容器に細胞培養培地1mlを加え、滅菌した1.4cm角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造のA面を上にして浸漬させた。1枚のシートあたり 4×10^4 個のヒト皮膚線維芽細胞を添加し、5日間細胞培養した後、CCK8を用いて細胞数を測定したところ、シート上の細胞数は 7.7×10^6 個であった。

[0125] この細胞が生育しているシートを3枚の縦長シートに切り、培地に入れたまま5℃に8時間保存後、ポリイミド多孔質膜を取り出してセルバンカー1mlを加えたクライオチューブに入れ、-80℃にて24時間保存し、液体窒素中に移動させた。2日後、チューブを37℃に加温して内容物を融解し、インキュベータ内の培養条件下に移動させた。3日後と5日後にCCK8を用いて吸光度による比活性を測定したところ、3日目、5日目の比活性は、36%及び64%であった。

実施例 6

[0126] ヒト皮膚線維芽細胞長期培養

ヒト皮膚線維芽細胞のポリイミド多孔質膜を用いる長期培養

2cm×2cmの滅菌された正方形容器に2%FBS入細胞培養培地0.5mlを加え、滅菌した1.4cm角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造のA面を上にしてそれぞれ浸漬させた。1枚のシートあたり4×10⁴個のヒト皮膚線維芽細胞懸濁液をそれぞれ添加し、1週間に2回の割合で培地交換し、細胞培養を継続的に実施した。231日間、261日間、294日間、324日間、365日間、401日間、471日間後にCCK8を用いて細胞数を計測し、増殖挙動を観察した。結果を図8に示す。培養期間を通じて、安定した生細胞数が確認された。

実施例 7

[0127] ヒト皮膚線維芽細胞長期培養時の気相継代による増殖確認

直径6cmのシャーレに2mlの2%FBS入培地を加え、滅菌した1.4cm角の正方形のポリイミド多孔質膜のメッシュ構造のA面に1枚のシートあたり4×10⁴個のヒト皮膚線維芽細胞を播種し、1ヶ月培養した。その後、シートを4分の1に切断し、更に培養を継続して合計230日培養した。その後、3.5cmディッシュ中央に、1.4cm角のステンレスメッシュを3枚重ねて設置し、その上に、前記ポリイミド多孔質膜を置き、滅菌した1.4cm角の空のポリイミド多孔質膜2枚で挟んだ。その状態で培地1mlを加えると、培地は、シートと同様の高さとなった。この状態でCO₂I

ンキュベータ内に移動させ、1週間に2回の割合で培地交換して細胞培養を継続的に実施した。培養7日後、各シートを1枚ずつに分け、単一のシートとして培養を継続した。7日、10日、16日、21日、28日、42日、56日後にCCK8を用いて細胞数を計測し、元のシートと後から接地させた空のポリイミド多孔質膜について、細胞の増殖挙動をCCK8での染色法を用いて観察した。ヒト皮膚線維芽細胞を長期間培養したポリイミド多孔質膜から、効率的に細胞が空のポリイミド多孔質膜に移動し、継続的に増殖してゆく挙動が観察された。結果を図9に示す。

実施例 8

[0128] CHO DP-12細胞を用いる細胞培養と凍結及び物質産生

2 cm × 2 cmの滅菌された正方形容器に細胞培養培地（2% FBS、1 MDM、和光純薬工業株式会社）0.5 mlを加え、滅菌した1.4 cm角の正方形のポリイミド多孔質膜をメッシュ構造のA面を上にしてそれぞれ浸漬させた。1枚のシートあたり4 × 10⁴個のヒト抗IL-8産生CHO DP-12細胞懸濁液をそれぞれ培地内シート上に添加し、1週間に2回の割合で培地交換し、細胞培養を継続的に実施した。78日間細胞培養した後、CCK8を用いて細胞数を測定した。

[0129] このシート4枚を滅菌条件下で凍結保存バッグ4枚に1バッグ1シートとなる様に移送し、各バッグにセルバンカー3 mlずつを加えた。プログラムフリーザーで2条件（1分ごとに1℃、もしくは、10分ごとに1℃）にて-80℃に凍結後、-80℃にて24時間保存し、液体窒素中に移動させた。3日後、バックを37℃に加温して内容物を融解し、事前に用意した培地2 mlを満たした10 cm²シャーレ4枚にそれぞれのシートを移動させてインキュベータ内に24時間放置した。その後、2 cm × 2 cmの滅菌された正方形容器にシートを移し、細胞培養培地1 mlを加え更に3日間培養した。24時間後、2日後、3日後、4日後にCCK8を用いて細胞数を測定した。結果を図10に示す。

[0130] 上記で細胞培養した凍結シート4枚と同じく上記で同時に播種・培養を続

けた非凍結シート2枚を1枚ずつ10cm²シャーレに入れ、細胞培養培地をそれぞれ2ml加え、5%のCO₂、37℃で24時間インキュベートし、培地上清を回収した。回収した上清に含まれる抗ヒトIL-8抗体量をELISA法により定量した。表2に示す通り、凍結による抗IL-8産生量変化は認められなかった。結果を表2に示す。

[0131] [表2]

	ヒト抗IL-8抗体量 (pg/cell/day)
凍結シート①	26.4
凍結シート②	18.0
凍結シート③	24.0
凍結シート④	28.7
非凍結シート①	16.2
非凍結シート②	19.3

実施例 9

[0132] ヒト皮膚線維芽細胞の凍結及び物質産生

2cm×2cmの滅菌された正方形容器に細胞培養培地0.5mlを加え、滅菌した1.4cm角の正方形のポリミド多孔質膜をメッシュ構造のA面を上にしてそれぞれ浸漬させた。1枚のシートあたり4×10⁴個のヒト皮膚線維芽細胞懸濁液を培地内シート上にそれぞれ添加し、CO₂インキュベータ内で培養を開始した。1週間に2回の割合で培地交換して細胞培養を継続的に実施し、49日間細胞培養した後に、CCK8を用いて細胞数を測定したところ、9.1×10⁴個であった。

[0133] この、細胞が生育しているシートを培地から取り出し、予め用意した、セルバンカー3mlを加えた凍結保存バックに移動し、プログラムフリーザーで10分ごとに1℃下げて-80℃に凍結後、-80℃にて24時間保存し、液体窒素中にて保存した。5日後、バックを37℃に加温して内容物を融解し、事前に用意した、培地2mlを満たした10cm²シャーレにシートのみを移動し、CO₂インキュベータ内にて培養を継続した。培地交換は、週2回のペースで行なった。24時間後、5日後、8日後、13日後、21日後

、29日後及び35日後にCCK8を用いてシートに生息する細胞数を測定した。結果を図11に示す。24時間後、8日後、21日後及び35日後の比活性は、34%、91%、105%及び152%であった。35日培養後に、同シートに生育するヒト皮膚線維芽細胞のフィブロネクチン産生量をELISA法により測定した。結果を以下の表に示す。凍結による損傷を受けず、物質産生が継続される事を確認した。結果を表3に示す。

[0134] [表3]

エントリー (培養日数と状況)	面積当たりのfibronectin産生量 (ng/cm ² /day)
ポリイミド多孔質膜培養通常培養 day 13 (Run 1)	480
ポリイミド多孔質膜培養通常培養 day 13 (Run 2)	376
凍結・解凍後35日培養したシート	685

請求の範囲

- [請求項1] 細胞の長期培養方法であって、
- (1) 細胞をポリイミド多孔質膜に適用することと、
 - (2) 細胞を適用したポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、30日以上細胞を培養することと
- を含む、方法。
- [請求項2] 工程(2)において、60日以上細胞を培養する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 工程(2)において、120日以上細胞を培養する、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 2以上のポリイミド多孔質膜を、上下又は左右に細胞培養培地中に積層して用いる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] ポリイミド多孔質膜を
- 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、あるいは、
 - iv) 縄状に結んで
- 細胞培養容器中の細胞培養培地中で浮遊もしくは固定させて用いる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 工程(2)における培養において、ポリイミド多孔質膜の一部又は全体が、細胞培養培地の液相と接触していない、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 工程(2)における培養において、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イミド多孔質膜体積の総和の10000倍又はそれより少ない、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 工程(2)における培養において、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イミド多孔質膜体積の総和の100倍又はそれより少ない、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 工程(2)における培養が、細胞培養容器外に設置された細胞培養培地供給手段から連続的又は間歇的に細胞培養培地が細胞培養容器中に供給される系で行われる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 細胞培養培地が細胞培養培地供給手段と細胞培養容器との間を循環する、請求項9に記載の方法。

[請求項11] 請求項9又は10に記載の方法であって、前記系が、細胞培養容器である培養ユニットと細胞培養培地供給手段である培地供給ユニットとを含む細胞培養装置であり、ここで

培養ユニットは細胞を担持するための1又は複数のポリイミド多孔質膜を収容する培養ユニットであって、培地供給口および培地排出口を備えた培養ユニットであり、

培地供給ユニットは培地収納容器と、培地供給ラインと、培地供給ラインを介して連続的又は間歇的に培地を送液する送液ポンプとを備え、ここで培地供給ラインの第一の端部は培地収納容器内の培地に接触し、培地供給ラインの第二の端部は培養ユニットの培地供給口を介して培養ユニット内に連通している、培地供給ユニットである、方法。

[請求項12] 培養ユニットが空気供給口、空気排出口、及び酸素交換膜を備えない培養ユニットである、請求項13に記載の方法。

[請求項13] 培養ユニットが培地排出ラインをさらに備え、ここで培地排出ラインの第一の端部は培地収納容器に接続し、培地排出ラインの第二の端部は培養ユニットの培地排出口を介して培養ユニット内に連通し、培地供給ユニットと培養ユニットとを循環可能である、請求項11又は12に記載の方法。

- [請求項14] 細胞が、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、請求項1～13のいずれかに記載の方法。
- [請求項15] 動物細胞が、脊椎動物門に属する動物由来の細胞である、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 細胞が、CHO細胞、CHO-K1細胞株、CHO DP-12細胞株、CHO細胞関連株、Vero細胞、及びMDCK細胞からなる群より選択される、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 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1～16のいずれかに記載の方法。
- [請求項18] 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℃以上で熱処理する事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17に記載の方法。
- [請求項19] ポリイミド多孔質膜を含む、請求項1～18のいずれかに記載の方法に使用するための細胞培養装置。
- [請求項20] 2以上のポリイミド多孔質膜が、上下又は左右に積層している、請求項19に記載の細胞培養装置。
- [請求項21] ポリイミド多孔質膜を含む、請求項1～13のいずれかに記載の方法に使用するためのキット。
- [請求項22] 細胞の長期培養方法のための、ポリイミド多孔質膜の使用。
- [請求項23] 細胞の凍結保存方法であって、
- (1) 細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる工程、
 - (2) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程、及び
 - (3) 細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件で保存する工程

を含む、方法。

[請求項24] 工程（１）において、細胞をポリイミド多孔質膜に播種することにより、細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる、請求項２３に記載の方法。

[請求項25] 工程（１）において、細胞をポリイミド多孔質膜に播種して培養することにより、細胞をポリイミド多孔質膜に担持させる、請求項２３に記載の方法。

[請求項26] 工程（３）に続いて、

（４）細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、細胞が解凍する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を解凍する工程

をさらに含む、請求項２３～２５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項27] 工程（４）に続いて、

（５）細胞を解凍したポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、細胞を培養する工程

をさらに含む、請求項２６に記載の方法。

[請求項28] 工程（５）において、培養した細胞がポリイミド多孔質膜外においても増殖するまで細胞を培養する、請求項２７に記載の方法。

[請求項29] 工程（５）において、細胞を解凍したポリイミド多孔質膜と共に、細胞を担持させていない別の１又は複数のポリイミド多孔質膜を細胞培養培地に適用し、培養することにより、別の１又は複数のポリイミド多孔質膜に細胞を担持させる、請求項２７又は２８に記載の方法。

[請求項30] 工程（５）に続いて、

（６）細胞を担持させたポリイミド多孔質膜の一部又はすべてを、細胞が凍結する条件下に置くことで、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結する工程、及び

（７）細胞を担持させたポリイミド多孔質膜を、凍結状態を保つ条件下で保存する工程

をさらに含む、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項31] 工程(1)～(7)を複数回繰り返す、請求項30に記載の方法。

[請求項32] 細胞が、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、請求項23～31のいずれか一項に記載の方法。

[請求項33] 動物細胞が、脊椎動物門に属する動物由来の細胞である、請求項32に記載の方法。

[請求項34] 細胞が付着性細胞である、請求項32又は33に記載の方法。

[請求項35] 細胞が浮遊性細胞である、請求項32又は33に記載の方法。

[請求項36] 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23～25のいずれか一項に記載の方法。

[請求項37] 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℃以上で熱処理する事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36に記載の方法。

[請求項38] ポリイミド多孔質膜が、2つの異なる表層面とマクロポイド層を有する多層構造のポリイミド多孔質膜である、請求項36又は37に記載の方法。

[請求項39] 細胞の凍結保存のためのポリイミド多孔質膜。

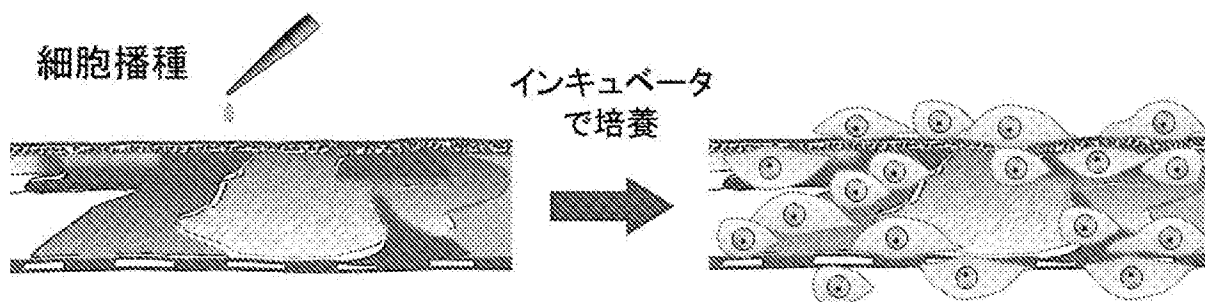
[請求項40] 請求項23～38のいずれか一項に記載の方法に用いるためのポリイミド多孔質膜。

[請求項41] ポリイミド多孔質膜を含む、請求項23～38のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

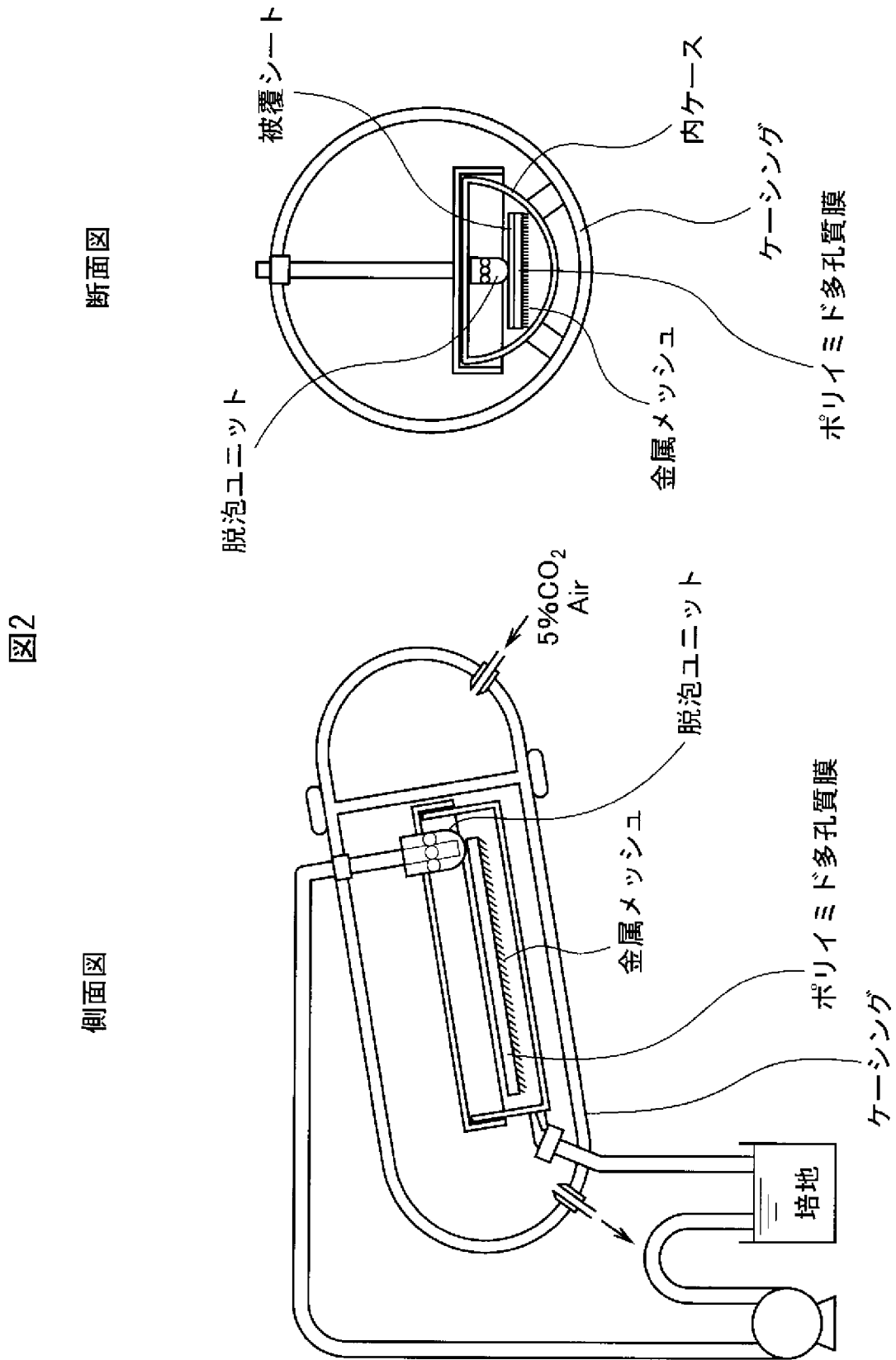
[請求項42] 請求項23～38のいずれか一項に記載の方法のためのポリイミド多孔質膜の使用。

[図1]

図1

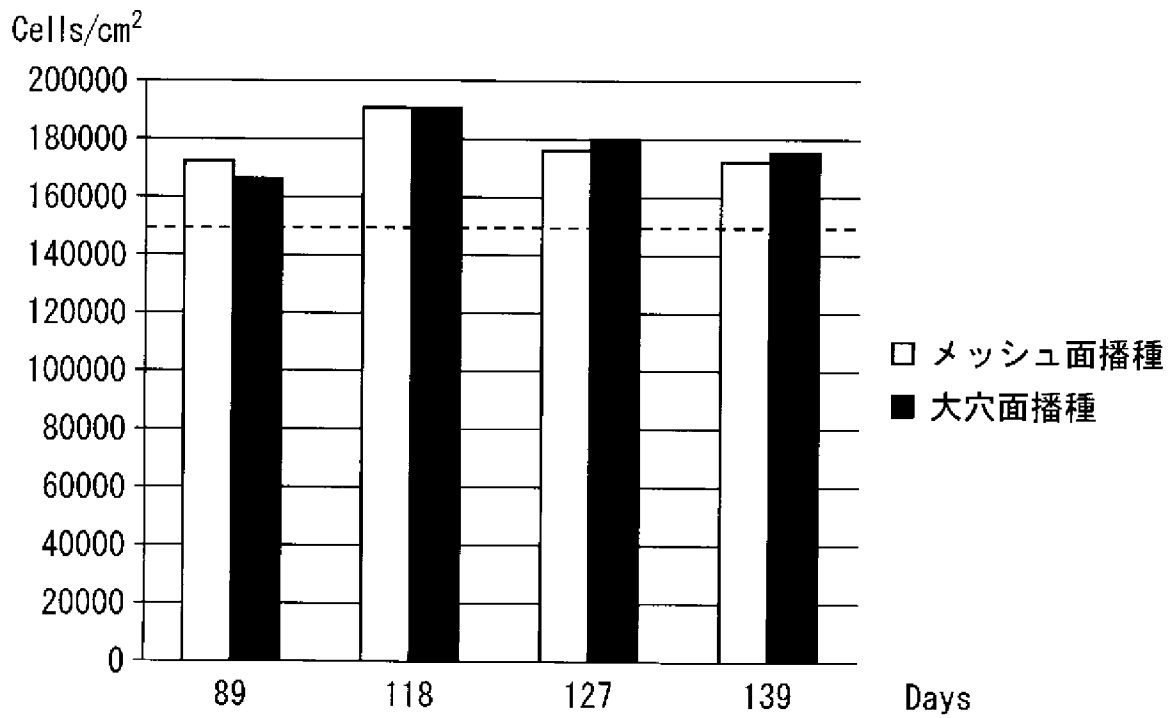


[図2]



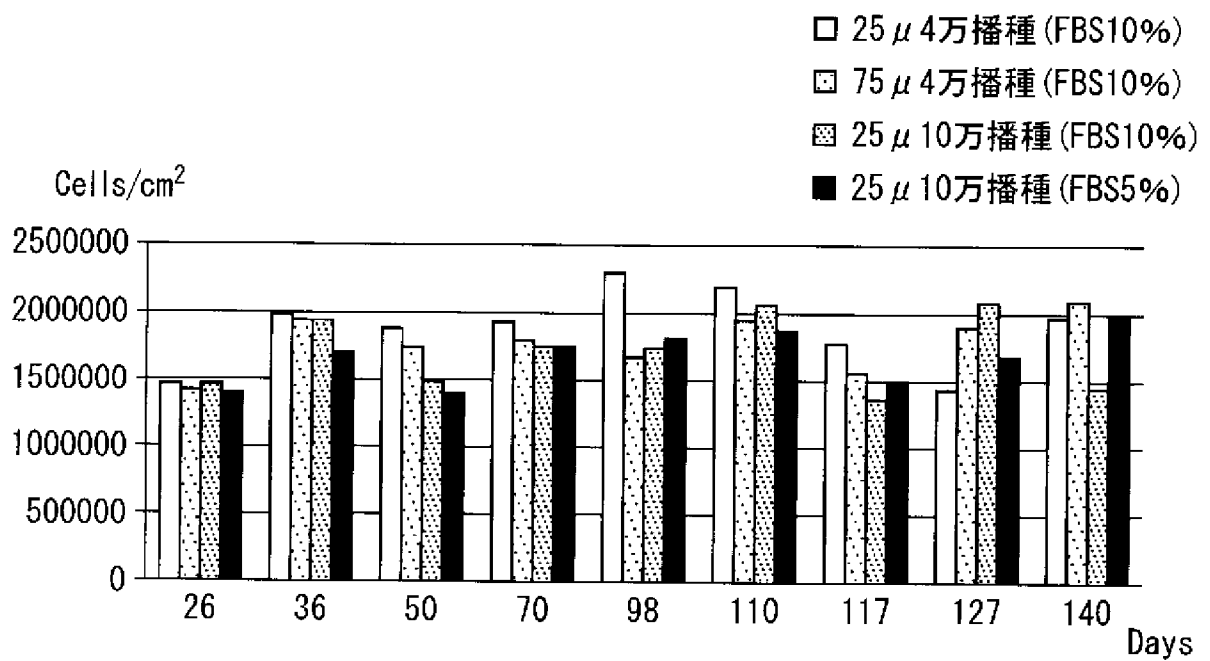
[図4]

図4



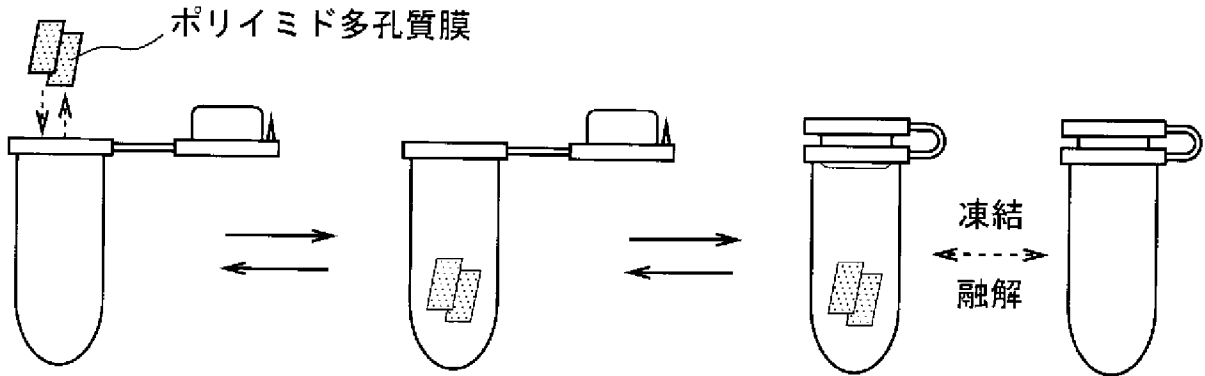
[図5]

図5



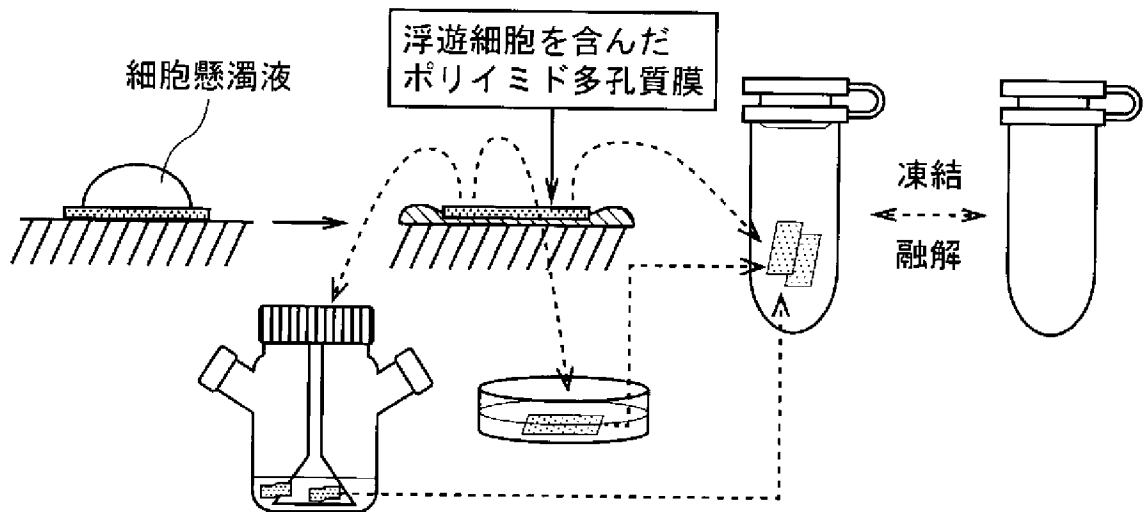
[図6]

図6

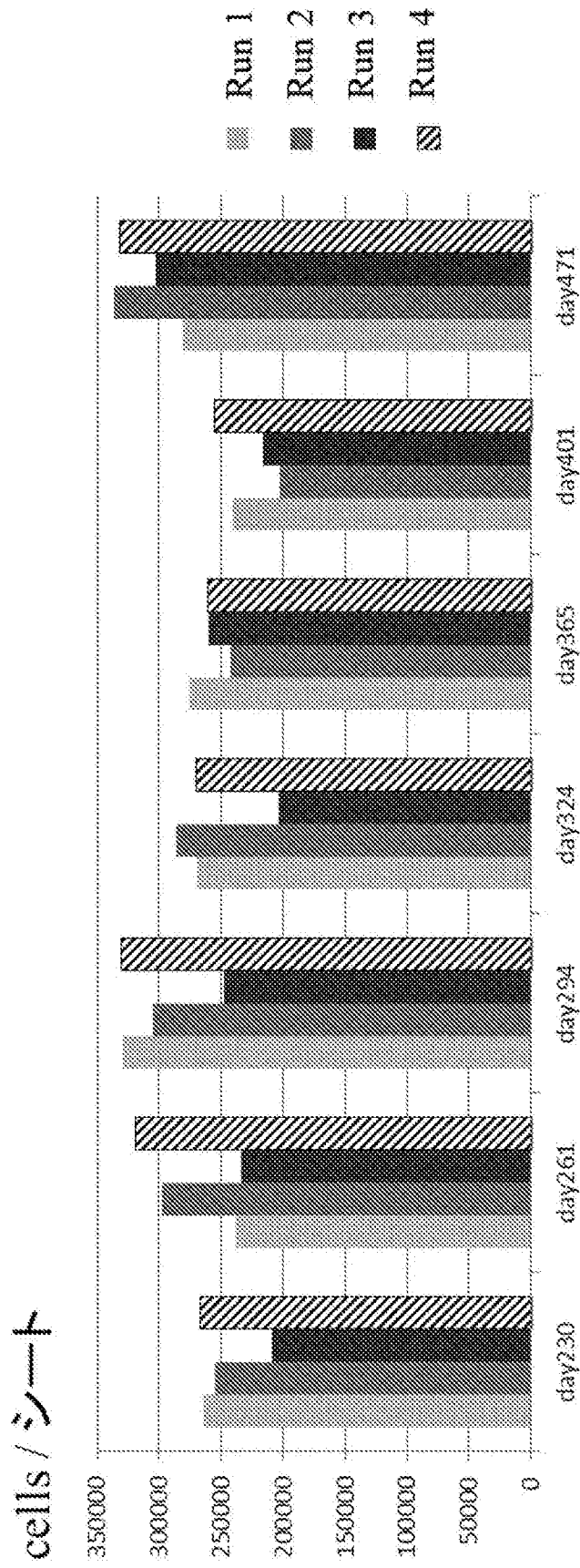


[図7]

図7



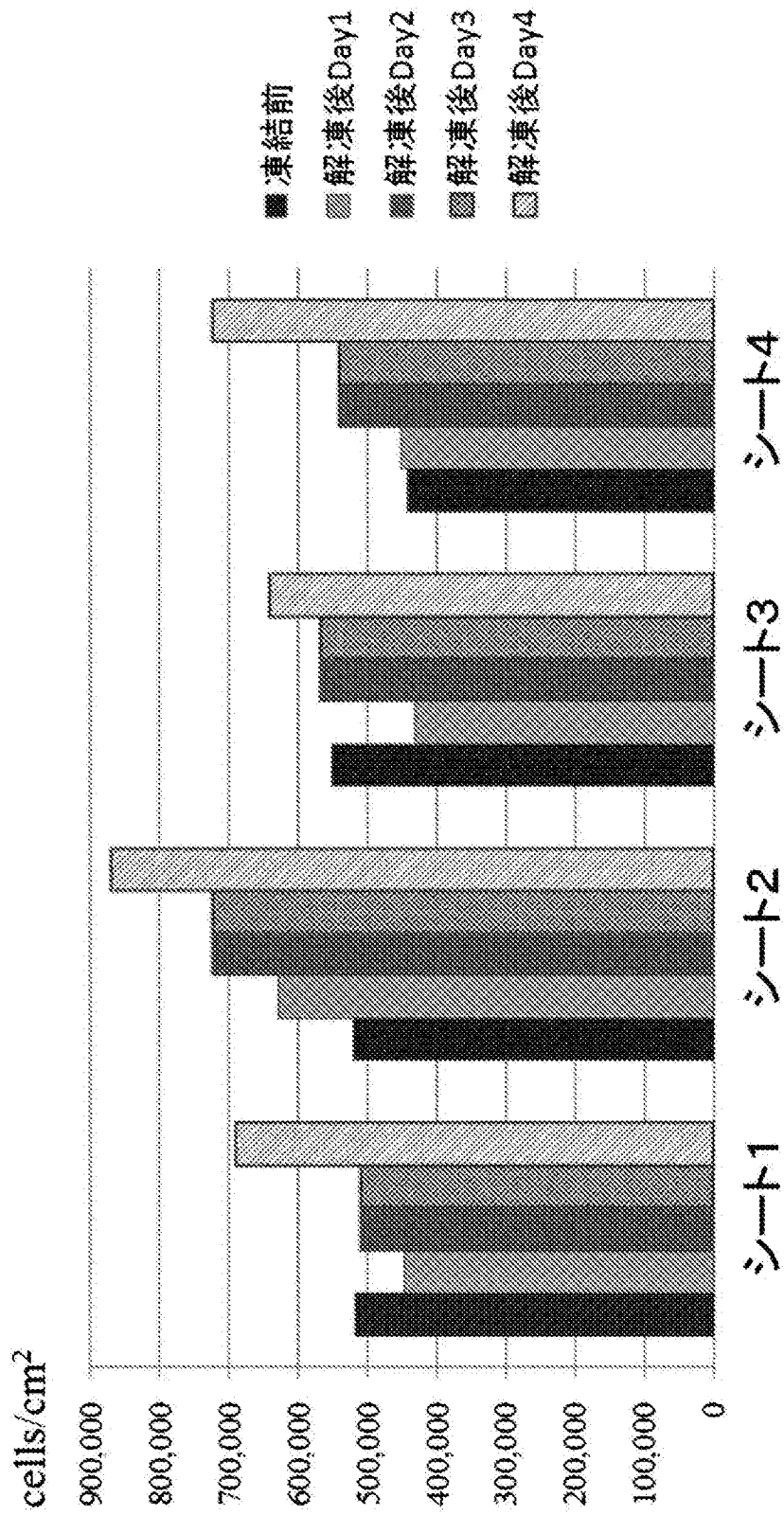
[図8]



[図8]

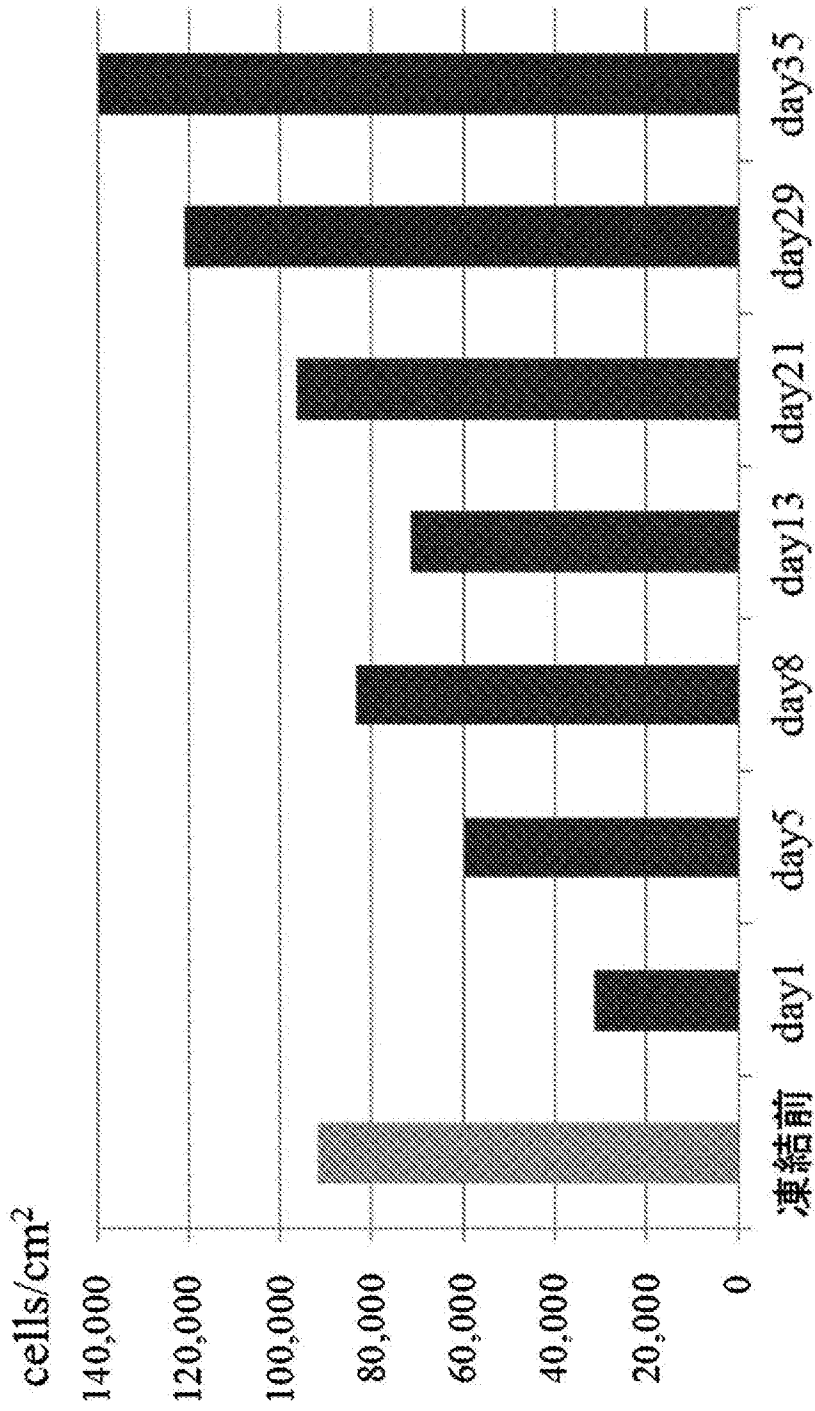
[図10]

図10



[図11]

図11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, C08J9/28(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N5/07(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)

C12N5/00, C08J9/28, C12M1/00, C12M3/00, C12N1/16, C12N1/20, C12N5/07

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 63-196286 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 15 August 1988 (15.08.1988), claims; example 1; page 2, lower right column, lines 11 to 13; page 2, upper right column, lines 11 to 13 (Family: none)	22, 39, 40/ 1-42
X/Y	JP 63-198975 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 17 August 1988 (17.08.1988), claims; example 2; page 3, upper right column, lines 17 to 19; page 2, lower left column, lines 2 to 5 (Family: none)	22, 39, 40/ 1-42

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April 2016 (20.04.16)

Date of mailing of the international search report
10 May 2016 (10.05.16)

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/JP2016/052206

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 63-198978 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 17 August 1988 (17.08.1988), claims; example 2; page 3, upper right column, lines 14 to 16; page 2, lower left column, lines 1 to 4 (Family: none)	22,39,40/ 1-42
X/Y	TAO, C-T and YOUNG, T-H, Polyetherimide membrane formation by the cononsolvent system and its biocompatibility of MG63 cell line, Journal of Membrane Science, 2006, Vol.269, p.66-74, ISSN: 0376-7388, abstract, items '2.2', '3.1', '3.3', fig. 2 to 5	22,39,40/ 1-42
X/Y	JULIEN, S., et al., Implantation of ultrathin, biofunctionalized polyimide membranes into the subretinal space of rats, Biomaterials, 2011, Vol.32, p.3890-3898, ISSN: 0142-9612, abstract, items '2.6', '3.4', fig. 5	22,39,40/ 1-42
Y	JP 2005-536233 A (Bioprocessors Corp.), 02 December 2005 (02.12.2005), paragraphs [0125], [0148], [0172] & US 2004/0058437 A1 paragraphs [0066], [0083], [0105] & EP 1530626 A1 & WO 2004/016727 A1	1-22
Y	JP 2003-524404 A (Sony International), 19 August 2003 (19.08.2003), paragraph [0132] & US 7041343 B1 paragraph 13, line 65 to paragraph 14, line 3 & EP 1054055 A1 & WO 2000/071677 A1	1-22
Y	JP 2011-172533 A (Fusao KOMADA), 08 September 2011 (08.09.2011), paragraph [0057] (Family: none)	1-22
Y	JP 2011-219585 A (Ube Industries, Ltd.), 04 November 2011 (04.11.2011), claims; examples (Family: none)	1-42
Y	WO 2010/038873 A1 (Ube Industries, Ltd.), 08 April 2010 (08.04.2010), claims; examples (Family: none)	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052206

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-173563 A (Applied Cell Biotechnologies, Inc.), 24 June 2004 (24.06.2004), claims; example 8 (Family: none)	23-42
A	SEIFERT, B., et al., Polyetherimide: a new membrane-forming polymer for biomedical applications, Artificial Organs, (2002) Vol.26, No.2, pp.189-199, ISSN: 0160-564X, entire text	1-42
A	Hiroyoshi KAWAKAMI, "Cell Culture on Nano- or Micro-relief pattern Surface", Membrane (2007) vol.32, no.5, pages 266 to 270, ISSN: 0385-1036 entire text	1-42
P,X/P,Y	WO 2015/012415 A1 (Ube Industries, Ltd.), 29 January 2015 (29.01.2015), claims; examples 1 to 12 (Family: none)	22,39,40/ 1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052206

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052206

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(i) Number of inventions involved in claims

2

(ii) Number of claim classified into each invention

Invention 1: claims 1-22

Invention 2: claims 23-42

(iii) Reason for that unity of invention is not satisfied

(Invention 1) claims 1-22

Documents 1 to 3 describe that cells are cultured for 1 week on a polyether imide porous film, document 4 describes that human osteoblasts are cultured for 7 days on a polyether imide porous film, and document 5 describes that rat retinal cells are cultured for 5000 hours on a polyimide porous film.

Thus, claims 1 to 21 have a special technical feature in which cells are cultured for "30 days or longer", and are classified into Invention 1.

In claim 22, it is unclear as to how long period the term "a long period" means specifically. However, as the result of the examination on claims 1 to 21, it is found that the examination on this claim can be completed. Therefore, this claim is classified into Invention 1.

(Invention 2) claims 23-42

Claims 23 to 42 share a common technical feature "cells are applied onto a polyimide porous film" with claim 1 which is classified into Invention 1.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the documents 1-5.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Further, claims 23-42 are not dependent on claim 1.

Further, claims 23-42 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claims 23-42 cannot be classified into Invention 1.

And claims 23 to 42 have a special technical feature in which "cells are supported on a polyimide porous film, and the cells supported on the polyimide porous film are frozen and stored under conditions where the cells can be maintained in a frozen state", and are classified into Invention 2.

[List of cited documents]

Document 1: JP 63-196286 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 15 August 1988 (15.08.1988), claims; example 1; page 2, lower right column, lines 11 to 13 (Family: none)

Document 2: JP 63-198975 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 17 August 1988 (17.08.1988), claims; example 2; page 3, upper right column, lines 17 to 19 (Family: none)

Document 3: JP 63-198978 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 17 August 1988 (17.08.1988), claims; example 2; page 3, upper right column, lines 14 to 16 (Family: none)

Document 4: TAO, C-T and YOUNG, T-H, Polyetherimide membrane formation by the cononsolvent system and its biocompatibility of MG63 cell line, Journal of Membrane Science, 2006, Vol.269, p.66-74, ISSN: 0376-7388, abstract, items '2.2', '3.1', '3.3', fig. 2 to 5

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052206

Document 5: JULIEN, S., et al., Implantation of ultrathin, biofunctionalized polyimide membranes into the subretinal space of rats, *Biomaterials*, 2011, Vol.32, p.3890-3898, ISSN: 0142-9612, abstract, items '2.6', '3.4', fig. 5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C08J9/28(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N5/07(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. C12N5/00, C08J9/28, C12M1/00, C12M3/00, C12N1/16, C12N1/20, C12N5/07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2016年
 日本国実用新案登録公報 1996-2016年
 日本国登録実用新案公報 1994-2016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)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 63-196286 A (住友電気工業株式会社), 1988.08.15, 特許請求の範囲, 実施例1, 第2頁右下欄第11行-13行, 第2頁右上欄第11行-13行 (ファミリーなし)	22, 39, 40/ 1-42
X/ Y	JP 63-198975 A (住友電気工業株式会社), 1988.08.17, 特許請求の範囲, 実施例2, 第3頁右上欄第17行-19行, 第2頁左下欄第2行-5行 (ファミリーなし)	22, 39, 40/ 1-42

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 20.04.2016	国際調査報告の発送日 10.05.2016
--------------------------	--------------------------

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) 坂崎 恵美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B	5 8 0 2
---	---	-----	---------

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
X/ Y	JP 63-198978 A (住友電気工業株式会社), 1988. 08. 17, 特許請求の範囲, 実施例 2, 第 3 頁右上欄第 1 4 行ー 1 6 行, 第 2 頁左下欄第 1 行ー 4 行 (ファミリーなし)	22, 39, 40/ 1-42
X/ Y	TAO, C-T and YOUNG, T-H, Polyetherimide membrane formation by the cononsolvent system and its biocompatibility of MG63 cell line, Journal of Membrane Science, 2006, Vol. 269, p. 66-74, ISSN: 0376-7388 要約, 項目「2.2」, 「3.1」, 「3.3」, 図 2-5	22, 39, 40/ 1-42
X/ Y	JULIEN, S., et al., Implantation of ultrathin, biofunctionalized polyimide membranes into the subretinal space of rats, Biomaterials, 2011, Vol. 32, p. 3890-3898, ISSN: 0142-9612 要約, 項目「2.6」, 「3.4」, 図 5	22, 39, 40/ 1-42
Y	JP 2005-536233 A (バイオプロセッサーズ コーポレイション), 2005. 12. 02, 【0125】、【0148】、【0172】 & US 2004/0058437 A1, [0066], [0083], [0105] & EP 1530626 A1 & WO 2004/016727 A1	1-22
Y	JP 2003-524404 A (ソニー インターナショナル), 2003. 08. 19, 【0132】 & US 7041343 B1, 第 1 3 段第 6 5 行ー 第 1 4 段第 3 行 & EP 1054055 A1 & WO 2000/071677 A1	1-22
Y	JP 2011-172533 A (駒田富佐夫), 2011. 09. 08, 【0057】 (ファミリーなし)	1-22
Y	JP 2011-219585 A (宇部興産株式会社), 2011. 11. 04, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-42
Y	WO 2010/038873 A1 (宇部興産株式会社), 2010. 04. 08, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-42

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
Y	JP 2004-173563 A (株式会社エーシーバイオテクノロジーズ), 2004. 06. 24, 特許請求の範囲、実施例 8 (ファミリーなし)	23-42
A	SEIFERT, B., et al., Polyetherimide: a new membrane-forming polymer for biomedical applications, Artificial Organs, (2002) Vol. 26, No. 2, pp. 189-199, ISSN: 0160-564X 全文	1-42
A	川上浩良, 微細凹凸表面を用いた細胞培養操作, 膜 (2007) Vol. 32, No. 5, pp. 266-270, ISSN: 0385-1036 全文	1-42
P, X/ P, Y	WO 2015/012415 A1 (宇部興産株式会社), 2015. 01. 29, 特許請求の範囲, 実施例 1 - 1 2 (ファミリーなし)	22, 39, 40/ 1-42

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第Ⅲ欄の続き

(i) 請求の範囲に含まれる発明の数
2

(ii) 各発明に区分した請求項の番号

発明1：請求項1-22

発明2：請求項23-42

(iii) 発明の単一性を満たさないと判断した理由

(発明1) 請求項1-22

文献1～3には、ポリエーテルイミド多孔質フィルム上で1週間細胞を培養した旨記載されており、文献4には、ポリエーテルイミド多孔質膜上でヒト骨芽細胞を7日間培養した旨記載されており、文献5には、ポリイミド多孔質膜上でラット網膜細胞を5000時間培養した旨記載されている。

よって、請求項1-21は、「30日以上」培養するという特別な技術的特徴を有しているため、発明1に区分する。請求項22は、「長期」が具体的にどの程度以上の期間を意味するかが不明瞭であるが、請求項1-21について審査をした結果、審査が終了するので、発明1に区分する。

(発明2) 請求項23-42

請求項23-42は、発明1に区分された請求項1と、「細胞をポリイミド多孔質膜に適用する」という共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、文献1～5の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項23-42は、請求項1の従属請求項ではない。また、請求項23-42は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項23-42は発明1に区分できない。

そして、請求項23-42は、「細胞をポリイミド多孔質膜に担持させ、ポリイミド多孔質膜に担持された細胞を凍結し、凍結状態を保つ条件で保存する」という特別な技術的特徴を有しているため、発明2に区分する。

<引用文献等一覧>

文献1：JP 63-196286 A (住友電気工業株式会社), 1988. 08. 15, 特許請求の範囲, 実施例1, 第2頁右下欄第11行-13行 (ファミリーなし)

文献2：JP 63-198975 A (住友電気工業株式会社), 1988. 08. 17, 特許請求の範囲, 実施例2, 第3頁右上欄第17行-19行 (ファミリーなし)

文献3：JP 63-198978 A (住友電気工業株式会社), 1988. 08. 17, 特許請求の範囲, 実施例2, 第3頁右上欄第14行-16行 (ファミリーなし)

文献4：TAO, C-T and YOUNG, T-H, Polyetherimide membrane formation by the cononsolvent system and its biocompatibility of MG63 cell line, Journal of Membrane Science, 2006, Vol.269, p.66-74, ISSN: 0376-7388, 要約, 項目「2.2」, 「3.1」, 「3.3」, 図2-5

文献5：JULIEN, S., et al., Implantation of ultrathin, biofunctionalized polyimide membranes into the subretinal space of rats, Biomaterials, 2011, Vol.32, p.3890-3898, ISSN: 0142-9612, 要約, 項目「2.6」, 「3.4」, 図5