

(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
2017年6月22日(22.06.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/104558 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *B01D 71/68* (2006.01)
B01D 63/04 (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)
B01D 69/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/086686
- (22) 国際出願日: 2016年12月9日(09.12.2016)
- (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 2015-244001 2015年12月15日(15.12.2015) JP
- (71) 出願人: 東洋紡株式会社(TOYOBO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 山口 達哉(YAMAGUCHI, Tatsuya); 〒5200292 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡株式会社内 Shiga (JP). 平岡 真希子(HIRAOKA, Makiko); 〒5200292 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡株式会社内 Shiga (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, DJ, 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, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

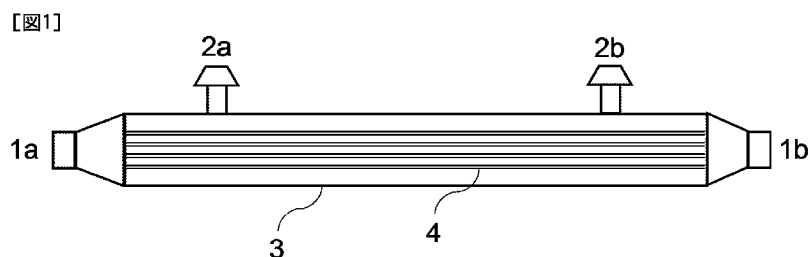
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, 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))

(54) Title: HOLLOW-FIBER MEMBRANE AND HOLLOW-FIBER MODULE FOR CELL CULTURE

(54) 発明の名称: 細胞培養用の中空糸膜および中空糸モジュール



(57) Abstract: [Problem] The present invention addresses the problem of providing a hollow-fiber membrane whereby cell adhesion and culture is possible without the need for a cell adhesion factor coating, and a cell culture method which uses the hollow-fiber membrane. [Solution] The present invention is: a hollow-fiber membrane for culturing cells, the membrane being inoculated with cells on the inner surface and/or outer surface thereof, the hollow-fiber membrane for cell culture characterized in that the hollow-fiber membrane comprises only a hydrophobic polymer; a hollow-fiber module which houses a hollow-fiber bundle in which a plurality of the hollow-fiber membranes are bundled; and a cell culture method which uses the hollow-fiber module as a cell culture container.

(57) 要約: 【課題】本発明は、細胞接着因子のコーティングを必要とせず、細胞の接着、培養が可能な中空糸膜および前記中空糸膜を用いる細胞培養方法を提供することを課題とする。【解決手段】細胞を内表面および/または外表面に播種して培養するための中空糸膜であって、該中空糸膜が疎水性高分子のみからなることを特徴とする細胞培養用の中空糸膜および前記中空糸膜を複数本束ねた中空糸束が格納された中空糸モジュールおよび前記中空糸モジュールを細胞培養容器として用いる細胞培養方法。



WO 2017/104558 A1

明 細 書

発明の名称：細胞培養用の中空糸膜および中空糸モジュール

技術分野

[0001] 本発明は、細胞を培養するための培養基材として用いる中空糸膜および中空糸モジュールに関する。

背景技術

[0002] 幹細胞は臓器や組織を形成し得る細胞であり、成体であってもほとんどの臓器や組織に存在していると考えられている。幹細胞のうち胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）は万能細胞であり全ての組織や臓器に分化する能力を持っている。一方、体性幹細胞は全ての臓器や組織に分化できるわけではなく特定の組織や臓器に分化する。ヒト組織から採取できる体性幹細胞は患者自身から採取でき、拒絶反応の恐れがないため細胞移植治療に用いる移植用細胞として注目されている。

[0003] ヒトにおける体性幹細胞は現在までに間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、心筋幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、骨髄幹細胞、網膜幹細胞、角膜内皮幹細胞などが知られている。しかし、これら体性幹細胞は組織中には極めて少数しか存在しない。

[0004] そこで、生体組織から得られた体性幹細胞を生体外で培養し、治療に必要な細胞数まで増幅した後、同一人又は他人の治療に使用するという細胞移植治療の研究が進展し、実用化され始めている。

[0005] しかしながら、一般に実施されている細胞培養の作業では、生物学的な汚染のリスクが高いことや、人件費によるコスト高などが課題となるため、細胞移植治療の更なる発展には安全かつ低コストで幹細胞を培養することが求められる。

[0006] ところで、生体内において接着性であった細胞は、生体外においても培養基材に接着しなければ増殖あるいは生存することが出来ない。このため、接着性の幹細胞を培養するには、培養基材への接着を促すコラーゲンやフィブ

ロネクチンのような細胞接着因子の存在が必要である。

[0007] 特許文献1には、中空糸膜を用いた細胞培養システムが開示されている。2種類の中空糸膜が細胞を播種する基材として示されており、デスモパン（登録商標）（0.5%熱可塑性ポリウレタン）およびポリフラックス（商品名）（ポリアミド+ポリアリールエーテルスルホン+ポリビニルピロリドン混合物）が試験されている。これらの膜特性は不明であるが、ポリフラックスに関しては、ポリビニルピロリドンの混合物であることから親水化膜である。また、特許文献2には、65-95%の疎水性高分子と5-35%の親水性高分子からなる中空糸膜を用いた細胞培養システムが開示されており、前述のポリフラックスの使用例が示されている。これらの文献からは、中空糸膜型の細胞培養装置により、効率的な拡大培養を実施できることが示されている。しかしながら、本文献によれば、培養を行うに際して、膜の使用に先立ち、血小板溶解物、血漿、フィブロネクチンのような表面処理を施すことで、所望の培養が行えることが示されており、接着性細胞の培養においては、予め何らかの細胞接着因子を基材にコーティングすることが必要となることが示されている。特許文献3には、浮遊細胞の培養において中空糸膜を用いた技術が開示されている。該文献には、疎水性の中空糸膜を用いることにより、ガスの供給と培地交換を行うことが示されているが、中空糸膜を細胞培養のための基材として用いるものではない。また、特許文献4には、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンまたはポリアリールエーテルスルホン、およびポリビニルピロリドンを含む膜に、4~100vol%の濃度の酸素の存在下で、12.5~175kGyのガンマ線またはベータ線または電子ビームを照射することにより、表面修飾物質での何らかの前処理なしに接着細胞を培養できる技術が開示されている。

[0008] しかしながら、こうした細胞接着因子を培養基材へコーティングすることは、接着因子の材料コストおよび作業にかかるコスト増をもたらす。さらに、こうしたコスト増の問題もさることながら、細胞接着因子が動物由来成分である場合には、未知の感染のリスクを新たに生むこととなる。近年、遺伝

子組換え大腸菌により製造された細胞接着因子を用いることにより、感染リスクの低減がもたらされてはいるものの、こうした製造においては組換え大腸菌の培養工程に用いられる培地成分一つ一つの由来追跡など煩雑な作業が必要となる場合もある。

したがって、これら課題を解決するためには、細胞接着因子のコーティングを必要とせずに細胞を接着させ、かつ培養・増殖することが出来る培養基材を提供する必要がある。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特表2009-540865号公報
特許文献2：特表2010-523118号公報
特許文献3：特開2014-117190号公報
特許文献4：特表2012-503688号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、細胞接着因子のコーティング処理や電子線等による表面改質等の前処理を必要としない、細胞の接着、培養が可能な中空糸膜および中空糸膜を用いる細胞培養方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、以下に示す手段により、上記課題を解決できることを見出し、本発明に到達した。
- [0012] すなわち、本発明は、以下の構成からなる。
1. 細胞を内表面および／または外表面に播種して培養するための中空糸膜であって、該中空糸膜が疎水性高分子のみからなることを特徴とする細胞培養用の中空糸膜。
 2. 前記疎水性高分子が70度以上93度以下の接触角を有する高分子である1に記載の中空糸膜。

3. 前記疎水性高分子が、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレンからなる群から選ばれる１種以上である１または２に記載の中空糸膜。
4. １～３のいずれかに記載の中空糸膜を複数本束ねた中空糸束が格納された細胞培養用の中空糸モジュール。
5. ４に記載の中空糸モジュールを細胞培養容器として用いる細胞培養方法。
6. ４に記載の中空糸モジュールを細胞培養容器として含む細胞培養装置。

発明の効果

- [0013] 本発明により、細胞接着因子のコーティング処理が不要な培養基材としての中空糸膜を提供することが可能となる。また、本発明の中空糸膜を用いることにより、間葉系幹細胞などの各種細胞を、安全、簡便かつ高効率に培養することができる細胞培養系の構築、提供を可能とする。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]本発明の中空糸モジュールの一例を示す模式図である。
[図2]本発明の細胞培養装置の一例を示す模式図である。

発明を実施するための形態

- [0015] 本発明において、「疎水性」とは水との馴染み難さ（「親水性」の場合は、水との馴染み易さ）を表している。例えば、高分子と水との疎水性、親水性を客観的に示す指標の例として、接触角が挙げられる。接触角は、高分子のシート、フィルムまたは膜の表面に置いた水滴の固体、液体及び気体の接する部位から、液体の曲面に接線を引いたとき、この接線と固体表面のなす角度と定義するものであり、例えば、J I S R 3 2 5 7（１９９９）の静滴法に準拠して測定された値である。接触角が小さいほど親水性が高く、接触角が大きくなるほど疎水性が高くなる。
- [0016]（中空糸膜）

本発明において、中空糸膜を構成する高分子は、細胞を中空糸膜表面に保

持でき、溶液や低分子の物質を透過させるような構造をとることができるものであれば、特に限定されず、ポリテトラフルオロエチレン（接触角：104度）、ポリウレタン（同：96度）、ポリエーテルスルホン（同：85～90度）、ポリフッ化ビニリデン（同：82度）、ポリスルホン（同：77度）、ポリエチレン（同：73～88度）、セルローストリアセテート（同：67度）、エチレンビニルアルコール共重合体（同：55～65度）、これらの誘導体などが挙げられる。しかし、疎水性が強すぎると、細胞接着性は良いが、液体培地（以下、単に培地と称することがある）に対する濡れ性が低下する問題がある。一方、親水性が強すぎると、培地に対する濡れ性は良いが、細胞接着性が低下する問題がある。したがって、本発明においては、細胞接着性と培地に対する濡れ性を両立するために、接触角が概ね70度以上、93度以下の高分子を選択するのが好ましい。このような高分子を用いて作製された中空糸膜の表面に培地が触れると、フィブロネクチンをはじめとするタンパク質が短時間のうちに吸着する。これにより、中空糸膜表面に細胞が速やかに接着することが出来るため、その後に増殖へと移行させることができる。

[0017] 本発明において、中空糸膜は、前記疎水性高分子のみからなるものが好ましいが、他の成分として、水濡れ性を付与する目的でグリセリン等の低分子成分や製膜に用いた溶媒、非溶媒の残留成分、架橋防止剤や抗酸化剤等の低分子添加剤が含まれていてもよい。

[0018] 本発明において、中空糸膜の大きさについても特に制限はないが、内径は好ましくは100～1000 μm 、より好ましくは150～500 μm 程度のものが利用される。膜厚についても、特に制限はないが、中空糸膜が適度な強度を保ち、かつ物質の透過性に大きな支障がない範囲で設定すればよく、例えば10～150 μm 程度が好ましい。中空糸膜の内側に細胞を播種し、培地をかん流する培養を行う場合は、中空糸膜の内径は、二次元的な効果として、細胞の播種、増殖する面積、細胞密度だけでなく、三次元的な効果である、コンパクト性のみならず、培地との接触容積、培地の流れ、線速度

、せん断力などに影響する設計や操作条件と関わる事項となることから、中空糸培養のメリットを活かす要件となる。

- [0019] 本発明において、中空糸膜の孔径は、細胞は通過させないが水、塩類、タンパク質などの培地成分は通過させる通孔であれば、特に限定されるものではないが、細胞の培養を考慮すると物質交換の効率のよい比較的大きな孔径を有する方が望ましく、平均孔径が $0.001 \sim 0.5 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{m}$ 程度がより好ましい。また、分画分子量（篩係数が 0.1 未満となる分子量）は、 $1 \sim 100$ 万が好ましく、 $2 \sim 20$ 万程度がより好ましい。さらに、膜の孔径は、培養に伴う各種生体成分の吸着や目詰まりの影響も受けることになる。すなわち、最適な設計は、これらの物質との相互作用を鑑みて実施されるべきである。
- [0020] 本発明において、中空糸膜の透水性についても特に制限はないが、好ましくは $10 \sim 1000 \text{ mL} / \text{m}^2 / \text{hr} / \text{mmHg}$ 、より好ましくは $20 \sim 500 \text{ mL} / \text{m}^2 / \text{hr} / \text{mmHg}$ である。透水性が小さすぎると、十分な物資移動を発現できない。また、透水性が大きすぎると、中空糸膜の内腔および外腔に培地などを流した場合に、膜間の圧力差が生じ、勝手にろ過が発生したり、中空糸膜の長さ方向で流れ（培地成分）の分布（濃度差）ができてしまうため好ましくない。
- [0021] 前記したように、本発明の中空糸膜は、培地に接触することにより速やかに培地中に含まれるタンパク質の吸着が起こるが、それによって細胞培養中の膜の透水性や物質透過性が損なわれることは好ましくない。本発明の中空糸膜は、細胞接着を促すタンパク質の付着と共に、培養中の細胞に対し、栄養素やガスの供給と老廃物の除去などの物質交換を培養基材である膜を介して効率よく実施することが可能である。
- [0022] また、本発明において、中空糸膜は、フィブロネクチンのような分子量（約 40 万）の大きなタンパク質を透過しないことが好ましい。膜に付着したタンパク質を足場にして細胞が接着し、更に、細胞自身が作り出すタンパク質も加えた十分な細胞外マトリックスが形成され、培養に適した良好な細胞

増殖環境を形成・維持することが可能となる。

[0023] 本発明において、中空糸膜を培養基材として用いるメリットは、通常のシャーレやフラスコ培養では実現できない膜を介した物質交換ができることであり、栄養分や酸素、二酸化炭素の供給（濃度調整）と老廃物の除去を効率的に行うことができる。しかしながら同時に、必要な成分が過剰に除かれてしまう懸念もあるため、細孔径を最適にコントロールすることにより、細胞近傍の培養環境を良好なものとし、培養効率の向上を達成できる。ただし、細孔径（物質透過性）は、培地中のタンパクや細胞分泌タンパク（主に細胞接着性の細胞外マトリックスを形成するフィブロネクチンなど）の吸着による影響を非常に受けやすい。従って、これらの影響下においても、十分な物質交換がなされることが必要となる。従来技術では、この点を補うために、膜の親水化が好ましく実施されていた。しかし、細胞の接着性を向上するためには、高度に精製された細胞接着因子を長時間（1晩～1日）かけて基材にコーティングする処理が必要であった。本発明は、特定の範囲の接触角を有する高分子からなる中空糸膜を用いることにより、前記タンパクが膜表面に速やかに付着し、細胞の接着性が向上されたものである。

[0024] （中空糸モジュール）

本発明において、例えば、筒状容器に数十～数万本の中空糸束を格納することにより細胞培養容器である中空糸モジュールを作製することができる。このような中空糸モジュールは、中空糸膜の大きさにもよるが、単位容積あたりの培養面積を大きくとることができ、また、培養操作も簡便化することが出来るため、省スペースで安全性の高い細胞培養を実施することが出来る。

[0025] このような中空糸膜を用いたモジュールの構成は特に限定されないが、例えば、図1に示すように、4つの開口部（端部導管および側部導管）を有するモジュールケース3に中空糸膜4が適宜必要な本数束ねられて充填されている形態が挙げられる。前記4つの開口部のうち、2つの端部導管1aまたは1bは、それぞれ前記中空糸束の両端において各中空糸膜の内腔（中空部

）と外腔を分離した状態で、中空糸膜の中空部を閉塞しないように適当なシール材（例えば、ポリウレタン系ポッティング剤）によりモジュールケース端部に接着固定されており、前記端部導管 1 a または 1 b の一方から導入された液体などが中空糸膜の中空部を通ってもう一方の端部導管 1 b または 1 a から導出される（すなわち、一方向に流れる）ように構成されている。一方、前記開口部のうち、残りの 2 つの側部導管 2 a または 2 b は、前記モジュールケース 3 の内側であって、かつ前記中空糸束の外側である空間（以下、単に「外腔」とも呼ぶ）と接続されており、前記側部導管 2 a または 2 b の一方から導入された液体などがモジュールの外腔を通ってもう一方の側部導管 2 b または 2 a から導出される（すなわち、一方向に流れる）ように構成されている。

[0026] 本発明において、細胞培養容器として前記中空糸モジュールを用いる場合、細胞培養は、中空糸膜の内腔または外腔のいずれにおいて行っても良いが、内腔で培養を行うのが好ましい。例えば、内腔にて、細胞を培養する際は、細胞懸濁液を端部導管より注入して内腔に充填することにより中空糸膜の内表面に細胞を播種し、播種終了後、細胞懸濁液を培地に切り換えてかん流し、一定期間培養を行う。この間、同時に、外腔へも培地を側部導管より注入し、かん流するのが好ましい。

[0027] 液体培地は、細胞に必要な養分や酸素・二酸化炭素などのガスを供給する役割を有する。培養期間中、ガス交換および細胞への栄養供給、老廃物除去のため、内腔、外腔ともに培地を一方向に供給し続けることが好ましい。その際、ポンプ等を用いることにより、適切な速度で循環させたり、供給・排出したりすることができる。

[0028] 前記中空糸モジュールは、適切な方法で滅菌し、市場に供給される。滅菌方法については、特に制限はないが、例えば、高圧蒸気滅菌、電子線滅菌、放射線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌等が挙げられる。

[0029] 本発明において、培養容器として中空糸モジュールを用いることにより、細胞へ常に新鮮な培地を供給することができるため、培養容器としてシャー

レや多段フラスコ等を用いる際に必要な培地の交換作業は不要となり、作業者の拘束時間やコンタミネーションのリスクを減らすことができる。

[0030] (培養の対象となる細胞)

本発明において、培養の対象となる細胞は、特に限定されるものではないが、接着性の動物細胞が好適である。細胞の由来も特に限定されず、ヒト、ブタ、イヌ、マウス等のいずれの動物由来のものも使用できる。また、接着性の動物細胞は、初代培養細胞及び株化細胞の双方を対象とすることができる。また、表皮角化細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞などのプライマリー細胞や、さらに胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、脂肪前駆細胞、肝幹細胞などの幹細胞、前駆細胞でもよい。また、これらの細胞は、培養前に外来遺伝子が導入された細胞であってもよいし、抗体やリガンドなどの刺激因子などで予め刺激、加工されている細胞であっても良い。

[0031] (細胞培養装置)

図2は、本発明の細胞培養装置の構成例の一つを示す。図2において、5および6はそれぞれ、液体培地貯留容器（培養バッグなど）である。液体培地貯留容器5からは、無菌接続コネクタ41およびバルブ21を経由して、細胞培養容器10（中空糸モジュール）の端部導管（図1の1a）に回路が接続され、液体培地貯留容器5に入っている培地が細胞培養容器10の内腔に移送できるようになっている。一方、液体培地貯留容器6からは、無菌接続コネクタ42およびバルブ23を経由して、細胞培養容器10の側部導管（図1の2a）に回路が接続され、液体培地貯留容器6に入っている培地が細胞培養容器10の外腔に移送できるようになっている。

[0032] 細胞培養容器10の端部導管（図1の1b）からは、ポンプ31を経由して、廃液回収容器（または細胞回収容器）7まで回路が接続され、細胞培養容器10を通過した培地が廃棄できるようになっている。なお、前記回路に設けられたポンプ31により、液体培地貯留容器5から細胞培養容器10への液体（培地など）の供給、前記細胞培養容器10からの前記液体の排出、および前記液体の廃棄などにおける流速等を制御することができる。一方、

細胞培養容器 10 の側部導管（図 1 の 2 b）からは、ポンプ 30 を経由して、廃液回収容器 7 まで回路が接続され、細胞培養容器 10 を通過した培地が廃棄できるようになっている。なお、前記回路に設けられたポンプ 30 により、液体培地貯留容器 6 から細胞培養容器 10 への液体（培地など）の供給、前記細胞培養容器 10 からの前記液体の排出、および前記液体の廃棄などにおける流速等を制御することができる。

[0033] 図 2 において、少なくとも液体培地貯留容器 5、6 および細胞培養容器 10 は、CO₂ インキュベータ 50 内に收容されているのが好ましい。また、上記の操作や工程の制御、およびモニタリングを行うため作業コントローラ（作業パネル）60 を付加してもよい。

[0034] （細胞の培養）

本発明の中空糸膜を用い、例えば、中空糸膜内腔において細胞を培養する場合には、前述の中空糸モジュールを用い、端部導管の一方から細胞を懸濁した液を中空糸膜内腔に流入させることにより、細胞を播種することが出来る。一定時間静置し、細胞を中空糸膜表面に接着させた後、インキュベータ内に設置した中空糸モジュールに連続あるいは間欠的に培地を送り込むことにより細胞を培養、増殖させることが出来る。培地は、細胞に必要な養分や酸素・二酸化炭素などのガスを供給する役割を有する。また、培地は、培養細胞の種類に応じて決定され、当該細胞の培地として通常用いられるものであればよい。本発明の培養方法は、無血清培養にも用いることができる。

[0035] また、培地の供給にあたり、液体培地貯留容器は内腔および外腔に対して別々のものを用いても良いし、1つの容器から内腔および外腔の両方に培地を分配供給しても良い。この場合、内腔の培地組成と外腔の培地組成は同一であっても異なっても良い。また、内腔の培地流速と外腔の培地流速は同一であっても異なっても良いが、外腔の培地流速を早めるのがより好ましい。

[0036] 細胞培養中の培地の流速については、特に制限はないが、細胞が増殖するのに応じて適宜流速を調整するのが好ましい。特に、対数増殖期に入るまで

の培養初期段階においては、栄養供給と細胞周囲の微小環境の維持のために、流速を厳密に制御する必要がある。即ち、流速が遅すぎると、細胞への栄養供給が十分になされず、細胞が増殖しにくくなる。逆に、流速が速すぎると、細胞の周囲の環境変化が大きくなる。流速の調整は、培地中のグルコースや乳酸の濃度変化をモニターし、これをもとに行うことが好ましい。

[0037] 本発明において、前記中空糸モジュール内の培地の流れは、一方向であることが好ましい。具体的には、培地が常に一方の端部導管から導入され、反対側の導管（導出口）に向けて流れる形態が挙げられる。一旦、中空糸モジュールから導出された培地を再度導入口から導入する、いわゆる循環式であってもよい。また、中空糸膜の内腔と外腔の少なくとも一方が循環式であってもよいし、その両方が循環式であってもよい。

[0038] 本発明において、細胞播種後および／または細胞培養中は、中空糸モジュールの回転、震とう、あるいはローリング等を行っても良い。このような操作を行うことは、例えば、中空糸膜の内腔に播種した細胞を中空糸膜の表面に均一に分散・接着させるとか、気泡が発生した場合に除去しやすいとか、培養細胞に満遍なく培地の栄養を行き渡らせる、などの点で好ましい。

[0039] （細胞の回収）

本発明において、中空糸膜を用いて培養された細胞を回収するための手段は、特に限定されない。例えば、中空糸膜の内腔において細胞を培養した場合には、培地のかん流を停止した後、中空糸膜の内腔および外腔に存在する培地を除去するため、二価陽イオンフリーのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を一定時間かん流させ、培地を充分PBSに置換する。次に、PBSを除去し、トリプシン等のプロテアーゼ溶液を中空糸膜の内腔と外腔へ充填し、一定時間インキュベートする。このような処理により、培養細胞を中空糸膜から剥離させた後、培地などを中空糸膜の内腔へ流入することにより中空糸膜から流し出し、細胞を回収することが出来る。

実施例

[0040] 以下、本発明の有効性について実施例を挙げて説明するが、本発明はこれ

らに限定されるものではない。なお、実施例における中空糸膜の製造に関して、以下に代表的な製造方法を記載する。本発明における中空糸膜の製造は、非溶媒誘起型相分離法、または熱誘起型相分離法により製造される。非溶媒誘起型相分離による製膜は、高分子を溶媒に溶解した紡糸原液および水を主体とした内部凝固液を作製し、円筒2重管ノズルの中心口から内部凝固液、外周スリットから紡糸原液を吐出し、エアギャップ部を経た後に、外部凝固液に浸漬し、相分離による膜形成を起こすと共に脱溶媒を行い、その後洗浄、必要によりグリセリンなどの付与を行った後に、乾燥させるものである。また、熱誘起型相分離法での製膜は、高分子と潜溶媒を高温溶融させた紡糸原液を作製し、中空部の形成のための内部液（またはガス）と共に円筒2重管ノズルの中心口から内部液、外周スリットから紡糸原液を吐出し、エアギャップ部での急速冷却による相分離による膜形成を経た後に、洗浄、必要によりグリセリンなどの付与を行った後、乾燥させるものである。なお、グリセリンは、中空糸膜そのものの疎水性や親水性に影響を与えるのではなく、中空糸膜の細孔にグリセリンを充填しておくことにより、乾燥による細孔変形の抑制や培養への使用直前の水や培地への置換を容易に行うための細孔への水の導入材として機能するものである。疎水性の膜の場合は、水との接触のみでは、表面張力により、細孔内を容易に水に置換することが難しい場合があるため、何らかの水への置換処理を行うことが必要となる。アルコール処理から水に置換するなどの操作も採用することができる。

[0041] （内径、膜厚の測定）

中空糸膜の内径、外径および膜厚は、中空糸膜をスライドガラスの中央に開けられたφ3mmの孔に中空糸膜が抜け落ちない程度に適当本数通し、スライドガラスの上下面でカミソリによりカットし、中空糸膜断面サンプルを得た後、投影機N i k o n - V - 1 2 Aを用いて中空糸膜断面の短径、長径を測定することにより得られる。真円に近い中空糸膜について2方向の短径および長径を測定し、それらの算術平均値を中空糸膜断面1個の内径および外径とした。また、膜厚は（外径－内径）／2で算出した。最小および最大

を含む5断面について同様に測定を行い、平均値を内径、外径および膜厚とした。

[0042] [実施例1]

(中空糸膜の作製)

ポリエーテルスルホン(4800P、住友化学社製)20質量%、Nメチルピロリドン(三菱化学社製)36質量%、トリエチレングリコール(三井化学社製)44質量%を均一に溶解し、製膜原液を作製した。70℃に加温した円筒2重管ノズルの外側スリットより前記製膜原液を吐出し、同時に前記ノズルの中心孔よりNメチルピロリドン13.5質量%、トリエチレングリコール16.5質量%、水70質量%からなる中空形成剤(内部凝固液)を吐出し、300mmの乾式部を通過後、75℃の水中に浸漬し凝固させ、十分な水洗浄を実施した後に、束状に巻き取った。糸束は切断後、50℃、50%グリセリン水溶液に浸漬した後、過剰なグリセリン水溶液を除き、60℃にて通風乾燥させた。得られた中空糸膜の内径は200 μ m、外径は300 μ m、膜厚は50 μ mであった。

[0043] (中空糸モジュール1の作製)

試験用の中空糸モジュール1を以下のように作製した。直径1cm、長さ10cmの円筒状のポリカーボネート製モジュールケース内に、得られたポリエーテルスルホン製中空糸膜を100本挿入した後、中空糸膜の中空部を閉塞しないようにポリウレタン系ポッティング剤で両末端をモジュールケースに固定し、図1に示すような形状の中空糸モジュールを作製した。

[0044] [実施例2]

(中空糸膜の作製)

ポリスルホン(アモコ社製P-3500)30質量%、N,N-ジメチルアセトアミド45質量%、エチレングリコール25質量%を均一に溶解し、製膜原液を作製した。110℃に加温した円筒2重管ノズルの外側スリットより前記製膜原液を吐出し、前記ノズルの中心孔よりN,N-ジメチルアセトアミド51.4質量%、エチレングリコール28.6質量%、水20質量

%からなる中空形成剤を吐出し、300mmの乾式部を通過後、50℃の水中に浸漬し凝固させ、十分な水洗浄を実施した後に、束に巻き取った。糸束は切断後、50℃、50%グリセリン水溶液に浸漬した後、過剰なグリセリン液を除き、60℃にて通風乾燥させた。得られた中空糸膜の内径は200μm、外径は300μm、膜厚は50μmであった。

[0045] (中空糸モジュール2の作製)

得られた中空糸膜(束)を用いて、試験用の中空糸モジュール2を実施例1と同様にして作製した。

[0046] [実施例3]

(中空糸膜の作製)

ポリフッ化ビニリデン(SOLVAY社製:SOLEF6020(登録商標))20質量%、ジエチレングリコールモノエチルエーテルアセテート80質量%を148℃にて均一に溶解し、製膜原液を作製した。148℃に加温した円筒2重管ノズルの外側スリットより吐出し、前記ノズルの中心孔よりトリエチレングリコールを中空形成剤として吐出し、20mmの乾式部を通過後、10℃のジエチレングリコールモノエチルエーテルアセテート60質量%水溶液からなる冷却浴に浸漬し凝固させ、十分な水洗浄を実施した後に、束に巻き取った。糸束は切断後、50℃、50%グリセリン水溶液に浸漬した後、過剰なグリセリン液を除き、60℃にて通風乾燥させた。得られた中空糸膜の内径は250μm、外径は350μm、膜厚は50μmであった。

[0047] (中空糸モジュール3の作製)

得られた中空糸膜(束)を用いて、試験用の中空糸モジュール3を実施例1と同様にして作製した。

[0048] [比較例1]

(中空糸膜の作製)

ポリエーテルスルホン(PES)20質量%、ポリビニルピロリドン(PVP、BASF社製Luvitec(商品名)K90PH)3.5質量%、

N, N-ジメチルアセトアミド 72 質量%、純水 4.5 質量%を 50℃で均一に溶解し、製膜原液を作製した。75℃に加温した円筒 2 重管ノズルの外側スリットより前記製膜原液を吐出し、前記ノズルの中心孔より N, N-ジメチルアセトアミド 55 質量%の水溶液を中空形成剤として吐出し、500 mm の乾式部を通過後、60℃の N, N-ジメチルアセトアミド 25 質量%水溶液中に浸漬し凝固させ、十分な水洗浄を実施した後に、束に巻き取った。糸束は切断後、過剰な水を除いた後に、60℃にて通風乾燥させた。得られた中空糸膜の内径は 200 μm 、外径は 280 μm 、膜厚は 40 μm であった。こうして得られた膜は、PVP の含有により、グリセリンやアルコール処理無しでも、自発的に水に濡れるものであった。

[0049] 作製した PVP 含有 PES 製中空糸膜の内表面の PVP の含有率を X 線光電子分光法 (ESCA) にて測定したところ、24.4%であった。

測定は、中空糸膜 1 本を内表面の一部が露出するようにカミソリで斜めに切断し、内表面が測定できるように試料台に貼り付けて測定を行った。

測定条件は次に示す通りである。

測定装置：アルバック・ファイ ESCA 5800

励起 X 線：Mg K α 線

X 線出力：14 kV, 25 mA

光電子脱出角度：45°

分析径：400 μm ϕ

パスエネルギー：29.35 eV

分解能：0.125 eV / step

真空度：約 10^{-7} Pa 以下

窒素の測定値 (N) と硫黄の測定値 (S) から、次の式により中空糸膜内表面の PVP 含有率を算出した。

$$\begin{aligned} \text{PVP 含有率 (H}_{\text{pvp}}) [\%] \\ = 100 \times (N \times 111) / (N \times 111 + S \times 232) \end{aligned}$$

[0050] (中空糸モジュール 4 の作製)

得られた中空糸膜（束）を用いて、試験用中空糸モジュール 4 を実施例 1 と同様にして作製した。

[0051] [比較例 2]

（中空糸膜）

市販の中空糸ダイアライザー（ニプロ社製、FB-210UB）を解体し、中空糸膜を取り出し、試験に用いた。中空糸膜は、セルローストリアセテートからなるものであり、グリセリンが付与されていた。中空糸膜は、内径が $200\text{ }\mu\text{m}$ 、外径が $230\text{ }\mu\text{m}$ 、膜厚が $15\text{ }\mu\text{m}$ であった。

[0052] （中空糸モジュールの 5 作製）

前記中空糸膜（束）を用いて、試験用中空糸モジュール 5 を実施例 1 と同様にして作製した。

[0053] [比較例 3]

（中空糸膜）

市販の中空糸型血漿成分分離器（旭化成メディカル社製、カスケードフロー EC-20W）を解体し、試験に用いた。膜は、エチレンビニルアルコール共重合体からなるものであり水が付着していた。中空糸膜は、内径が $175\text{ }\mu\text{m}$ 、外径が $255\text{ }\mu\text{m}$ 、膜厚が $40\text{ }\mu\text{m}$ であった。乾燥後でも、再湿潤化が可能であった。

[0054] （中空糸モジュール 6 の作製）

前記中空糸膜（束）を用いて、試験用中空糸モジュール 6 を実施例 1 と同様にして作製した。

[0055] （透水性の測定）

中空糸膜にグリセリンが付与されているモジュールに対し、純水を中空糸膜の内腔への通液口の片端（図 1 の 1 a）から導入し、他方の片端（1 b）から流出させ、膜を十分に洗浄し、グリセリンの除去と膜孔および中空部を純水に置換した。その後、中空糸膜の外腔も同様に図 1 の 2 a から 2 b に向かって通水することにより洗浄した。出口部回路（圧力測定点よりも出口側）を鉗子で挟んで封止した。25℃に保温した純水を加圧タンクに入れ、レ

ギュレータにより圧力を制御しながら、25℃恒温槽で保温したモジュールの内腔（1a）へ純水を送り、出口（1b）および透過側出口（2b）を閉じることにより、膜の透過側（2a）から流出する濾液量を一定時間測定した。膜間圧力差は、モジュール入り口側への加圧圧力（タンクへの加圧と同一）とし、100 mmHgで測定した。使用モジュールの膜透過部分の面積（中空糸膜の内径基準の膜面積）を用いて、中空糸膜の透水性（ $\text{mL} / \text{m}^2 / \text{hr} / \text{mmHg}$ ）を算出した。

[0056]（ろ過実験）

（1）試験液を以下の通り準備した。即ち、イヌリン（分子量5,500、ナカライテスク社）、デキストランT10（分子量10,000、シグマアルドリッチ社）、デキストランT40（分子量40,000、シグマアルドリッチ社）を注射用蒸留水（大塚製薬社）に溶解して、各々1,000 ppm濃度の水溶液を調製し、試験液として以降の実験に用いた。

（2）中空糸モジュールの中空糸膜内腔に、各試験液を通液し充分置換した後、透水性測定と同様に、25℃に保った蒸留水または各試験液を100 mmHgの圧を加え一定時間ろ過し、それぞれの篩（ふるい）係数（Sieving Coefficient、以下、SCと略記することがある）を求めた。液のサンプリングは、ろ液が出始めた時点を起点として、その2分後からサンプリングを開始し、数分間（3乃至4分間）のろ液を全量回収した。SCは、供給液のデキストラン等の濃度に対する、透過液のデキストラン等の濃度の比で定義される。デキストラン等の濃度は、GPC法、比色法（アンスロン硫酸法）などの定法にて定量されるが、本法のような分子量の規定されている単分散性のデキストラン試薬を用いる場合は、簡便な比色法を用いることができる。また、実験の際に、各試験液での透水性も併せて、測定を実施した。

（3）次に、各中空糸モジュールの中空糸膜の内腔に10 vol %になるようにウシ胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を充填し、25℃で30分間放置した後、充填液を除去し、中空糸膜の内腔部体

積の100倍量の純水で通液洗浄を実施後、(2)と同様に各試験液をろ過し、SCおよび透水性を求めた。なお、変化率は、接触後値/接触前値である。

[0057] (フィブロネクチン吸着テスト)

実施例1および比較例2の中空糸モジュールの中空部側に1vol%になるように血清を添加したDMEMを充填し、60分間静置した後、培地を回収した。充填前の培地中のフィブロネクチン濃度および回収液中のフィブロネクチン濃度から中空糸膜に吸着したフィブロネクチン量を算出した。なお、フィブロネクチンの測定は、Fibronectin EIA Kit (タカラバイオ社)を用いて行った。

[0058] 前記ろ過実験の結果を表1および表2に示す。また、フィブロネクチン吸着テストの結果を表3に示す。表1は、上記(3)に記載の培地を接触させる前と接触させた後の篩い係数(SC)の変化を示したものである。一方、表2は、上記(3)に記載の培地を接触させる前と接触させた後の透水性の変化を示したものである。本発明の中空糸膜は、比較例の中空糸膜と比べると、分子量が4万以上の高分子に対しては若干透過性が下がる傾向があるものの、何れも良好な物質透過性を示している。

これらの中空糸膜に、一般的な培地であるウシ胎児血清を10vol%になるように添加したDMEMを25℃で2時間接触させることにより、中空糸膜の膜特性が変化した。即ち、実施例1～3の中空糸膜は、比較例1～3の中空糸膜に比べ、篩い係数が大きく変化する。これは、本発明の中空糸膜の表面には、表3に示されるように培地中に含まれるタンパク質がより効率的に吸着するためである。また、タンパク質が吸着した後においても一定以上の物質透過性を保持しているため、細胞培養には何ら影響を与えることは無い。このことにより、実施例1～3の中空糸膜(中空糸モジュール)は、細胞接着性に優れた培養基材(容器)となる特性を有していることが示された。

[0059]

[表1]

	SCイヌリン			SCデキストランT10			SCデキストランT40		
	培地 接触前	培地 接触後	変化率	培地 接触前	培地 接触後	変化率	培地 接触前	培地 接触後	変化率
実施例1	0.945	0.930	0.984	0.959	0.730	0.761	0.859	0.301	0.350
実施例2	0.942	0.925	0.982	0.952	0.719	0.755	0.853	0.291	0.341
実施例3	0.940	0.934	0.994	0.951	0.716	0.753	0.857	0.307	0.358
比較例1	0.979	1.007	1.029	0.943	0.886	0.940	0.598	0.400	0.669
比較例2	0.981	1.001	1.020	0.805	0.710	0.882	0.235	0.155	0.660
比較例3	0.983	0.998	1.015	0.941	0.829	0.881	0.752	0.506	0.673

[0060] [表2]

	透水性(純水)			透水性(イヌリン)			透水性(デキストランT10)			透水性(デキストランT40)		
	培地 接触前	培地 接触後	変化率	培地 接触前	培地 接触後	変化率	培地 接触前	培地 接触後	変化率	培地 接触前	培地 接触後	変化率
実施例1	341	60	0.176	227	54	0.238	150	54	0.360	75	41	0.547
実施例2	339	63	0.186	225	55	0.244	148	51	0.345	73	39	0.534
実施例3	336	65	0.193	221	49	0.222	151	49	0.325	71	35	0.493
比較例1	258	230	0.891	223	230	1.031	238	216	0.908	196	168	0.857
比較例2	215	208	0.967	215	190	0.884	210	185	0.881	186	160	0.860
比較例3	350	307	0.877	348	295	0.848	347	290	0.836	335	263	0.785

[0061] 表3の結果より、実施例1の中空糸膜は、比較例2の中空糸膜に対して4倍以上のフィブロネクチンが短時間のうちに吸着することがわかった。すなわち、本発明の中空糸膜は、例えば、間葉系幹細胞の培養に必要な細胞外マトリックス等が吸着し易く、細胞増殖の足場として良好な環境を速やかに整えることができるため、細胞の接着性およびその後の増殖に優れた効果を発揮できることが示唆される。

[0062] [表3]

培地	中空糸モジュール	フィブロネクチン吸着量(ng/cm^2)
1%血清添加培地	実施例1	0.234
	比較例2	0.053

[0063] (中空糸モジュールを用いた細胞培養実験1：一般培地使用)

図2に、細胞培養実験に用いた培養装置の構成を簡略化して示す。細胞培養実験には、中空糸モジュール1-6を用いた。細胞は、タカラバイオ株式会社より購入したプライマリーのヒト間葉系幹細胞を用いた。細胞播種密度は、 $1900\text{ cells}/\text{cm}^2$ とした。培地の流速は、中空糸膜の内腔は0

、33mm/min、中空糸膜の外腔は3.46mm/minとした。また、培地供給には培養バッグ1L（ニプロ社製）（図2の5（内腔用）および6（外腔用））を用いた。培地はウシ胎児血清を10vol%になるように添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を用いた。培地かん流用ポンプとして、中空糸膜の内腔側かん流用と外腔側かん流用に計2台のペリスタ・バイオミニポンプ（アトー社製）（図2の31（内腔用）および30（外腔用））を用い、CO₂インキュベータ内で37℃、7日間培養した。培地供給方法は、中空糸膜の内腔、中空糸膜の外腔ともに一方向とした。中空糸膜の内腔に間葉系幹細胞を播種し、2日間静置した後に中空糸膜の内腔のかん流を開始した。7日間培養後、培地かん流を停止し、中空糸モジュール内にて増殖した細胞を回収した。細胞回収時は、細胞解離試薬である0.25%トリプシン溶液（ライフテクノロジーズ社製）を用いた。

[0064] （中空糸モジュールを用いた細胞培養実験2：低血清培地使用）

細胞培養実験1と同様の細胞培養装置を用い、細胞培養実験2を行った。中空糸モジュール1-6を用い、細胞は、タカラバイオ株式会社より購入したプライマリーのヒト間葉系幹細胞を用いた。この実験では、培地として、ウシ胎児血清を1vol%になるように添加したMF-medium（登録商標）間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡社製）を用いた。その他の条件は、前記細胞培養実験1と同様とした。

[0065] （中空糸モジュールを用いた細胞培養実験3：無血清培地使用）

細胞培養実験1と同様の細胞培養装置を用い、細胞培養実験3を行った。中空糸モジュール1-6を用い、細胞は、タカラバイオ株式会社より購入したプライマリーのヒト間葉系幹細胞を用いた。この実験では、培地として、血清無添加のMF-medium（登録商標）間葉系幹細胞増殖培地（東洋紡社製）を用いた。その他の条件は、前記細胞培養実験2と同様とした。

[0066] 細胞培養実験1-3の結果を表4にまとめて示す。

細胞培養実験1においては、本発明の疎水性高分子のみからなる中空糸膜を格納した中空糸モジュールを用いることにより、一般的な培地であるウシ

胎児血清を 10 v o l % になるように添加したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) を使った培養にて良好な細胞増殖率が得られた。

また、細胞培養実験 2 においては、間葉系幹細胞培養に特化した低血清濃度 (1 v o l %) 間葉系幹細胞専用培地を用い、培養実験を実施した。この培養実験においても、本発明の疎水性高分子のみからなる中空糸膜を格納した中空糸モジュールが良好な細胞増殖率を示した。

さらに、細胞培養実験 3 においては、この間葉系幹細胞専用培地に血清を添加しない無血清培地を用い、培養実験を実施した。このような細胞培養実験においても、本発明の疎水性高分子のみからなる中空糸膜を格納した中空糸モジュールが良好な細胞増殖率を示した。

一方、比較例の中空糸モジュールを使用すると、ほとんど細胞の増殖が見られなかった。

即ち、細胞培養基材として優れるのは、親水性高分子を含まない疎水性高分子のみからなる中空糸膜であると言える。

[0067] (細胞増殖率の測定)

培養終了後の細胞培養容器 (中空糸モジュール) より、回収した生細胞数と初期の播種細胞数を用いて以下の式により細胞増殖率を算出した。

$$\text{細胞増殖率 (\%)} = (\text{回収した生細胞数} - \text{播種細胞数}) / \text{播種細胞数} \times 100$$

[0068] (細胞数の測定)

細胞を含む回収液は、遠心分離操作により最終的に 1 m l の培養液に懸濁した。この懸濁液とトリパンブルー染色液を 1 : 1 で混和した液を血球計算盤に添加し、顕微鏡下で細胞数の計測を行った。

1. 血球計算盤およびカバーガラスの表面を 70 % イソプロパノールで洗浄し、余分なイソプロパノールをふき取り風乾する。
2. R e a g e n t g r a d e w a t e r でカバーガラスの側面を濡らし、血球計算盤に貼りつける。
3. 細胞懸濁液をパスツールピペット等でよく攪拌後、すぐに血球計算盤に

流し込み、溝の上まで満たす。

4. 1～3の操作を別の血球計算盤を使用して行う（2回測定し平均をとる）。

5. 顕微鏡に血球計算盤を置き、グリッドラインに焦点を合わせる（10×対物レンズ）。

6. カウンターを用いて1mm²エリアの細胞数を速やかに計測する。

※誤差が生じやすいので正確に数えるためには少なくとも100～500細胞を計測する。

計算方法：

$$C = N \times 10^4$$

C：1ml当たりの細胞数

N：計測した細胞数の平均

10⁴：1mm²に対する容量の変換値

$$\text{全体の数} = C \times V$$

V＝細胞を懸濁した液体の容量

[0069] [表4]

	細胞増殖率(倍)		
	培養実験1	培養実験2	培養実験3
	10%血清添加培地	1%血清添加培地	無血清培地
モジュール1	12.6	15.1	6.6
モジュール2	11.3	14.5	5.8
モジュール3	10.8	13.9	5.3
モジュール4	2.4	2.8	1.9
モジュール5	2.1	2.5	1.6
モジュール6	1.8	2.3	1.5

[0070] (細胞表面マーカー測定)

培養後においても、間葉系幹細胞の性能を維持していることを確認するために、培養前および7日間培養後の表面マーカー測定を行った。表面マーカーは、ISC T (International Society for Ce

l l u l a r T h e r a p y) のステートメントに基づき、CD105、CD73、CD90は陽性($\geq 95\%$)、CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DRは陰性($\leq 2\%$)であることを基準とした。

表面マーカー発現の測定は、フローサイトメーター (BD FACSCalibur、BD社製) を用いて実施した。抗体は、Human MSC Analysis Kit (BD社製) を用いた。

細胞培養実験1にて実施した培養前後の間葉系幹細胞の表面マーカー測定を行った結果を表5 (培養前) および表6 (培養後) に示す。培養前後において、細胞表面マーカーの発現パターンに変化がないことから、間葉系幹細胞の性質を維持していることを確認できた。

このことより、本発明の疎水性高分子のみからなる中空糸膜が、接着性の細胞、特に接着性の幹細胞の細胞培養基材として優れていると言える。

[0071] [表5]

	CD105	CD73	CD90	CD45	CD34	CD11b	CD19	HLA-DR
実施例1	+	+	+	−	−	−	−	−
実施例2	+	+	+	−	−	−	−	−
実施例3	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例1	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例2	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例3	+	+	+	−	−	−	−	−

+: 陽性 ($\geq 95\%$)、−: 陰性 ($\leq 2\%$)

[0072] [表6]

	CD105	CD73	CD90	CD45	CD34	CD11b	CD19	HLA-DR
実施例1	+	+	+	−	−	−	−	−
実施例2	+	+	+	−	−	−	−	−
実施例3	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例1	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例2	+	+	+	−	−	−	−	−
比較例3	+	+	+	−	−	−	−	−

+: 陽性 ($\geq 95\%$)、−: 陰性 ($\leq 2\%$)

産業上の利用可能性

[0073] 本発明により、細胞接着因子のコーティング処理が不要な培養基材としての中空糸膜を提供することが可能となる。更に、本発明の中空糸膜を用いることにより、間葉系幹細胞などの各種細胞を、簡便かつ高効率に培養するこ

とができる細胞培養系の構築、提供が可能となる。

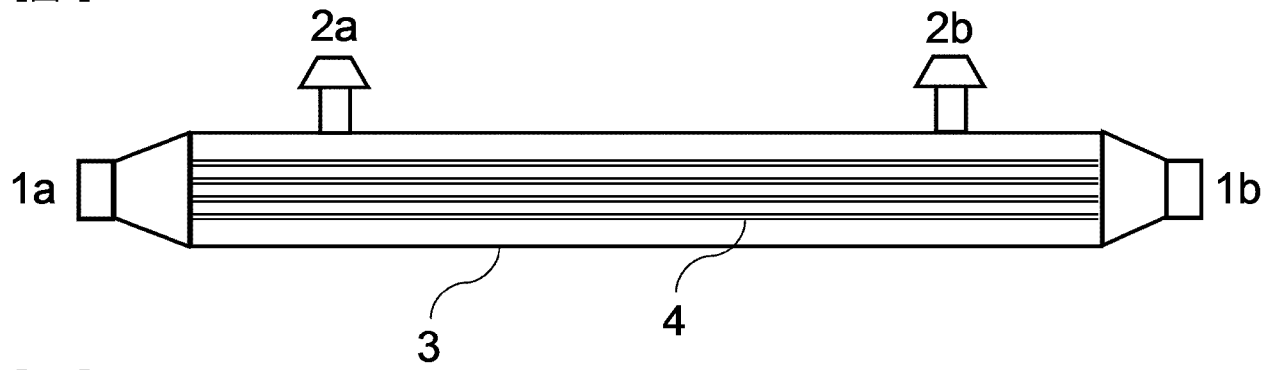
符号の説明

- [0074] 1 a、1 b : 端部導管
2 a、2 b : 側部導管
3 : モジュールケース
4 : 培養基材（中空糸膜）
5、6 : 液体培地貯留容器
7 : 廃液回収溶液または細胞回収容器
2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8 : バルブ
4 1、4 2、4 3 : 無菌接続コネクタ
8 : 細胞培養容器（中空糸モジュール）
3 0、3 1 : ポンプ
5 0 : CO₂インキュベータ
6 0 : 作業コントローラ（作業パネル）

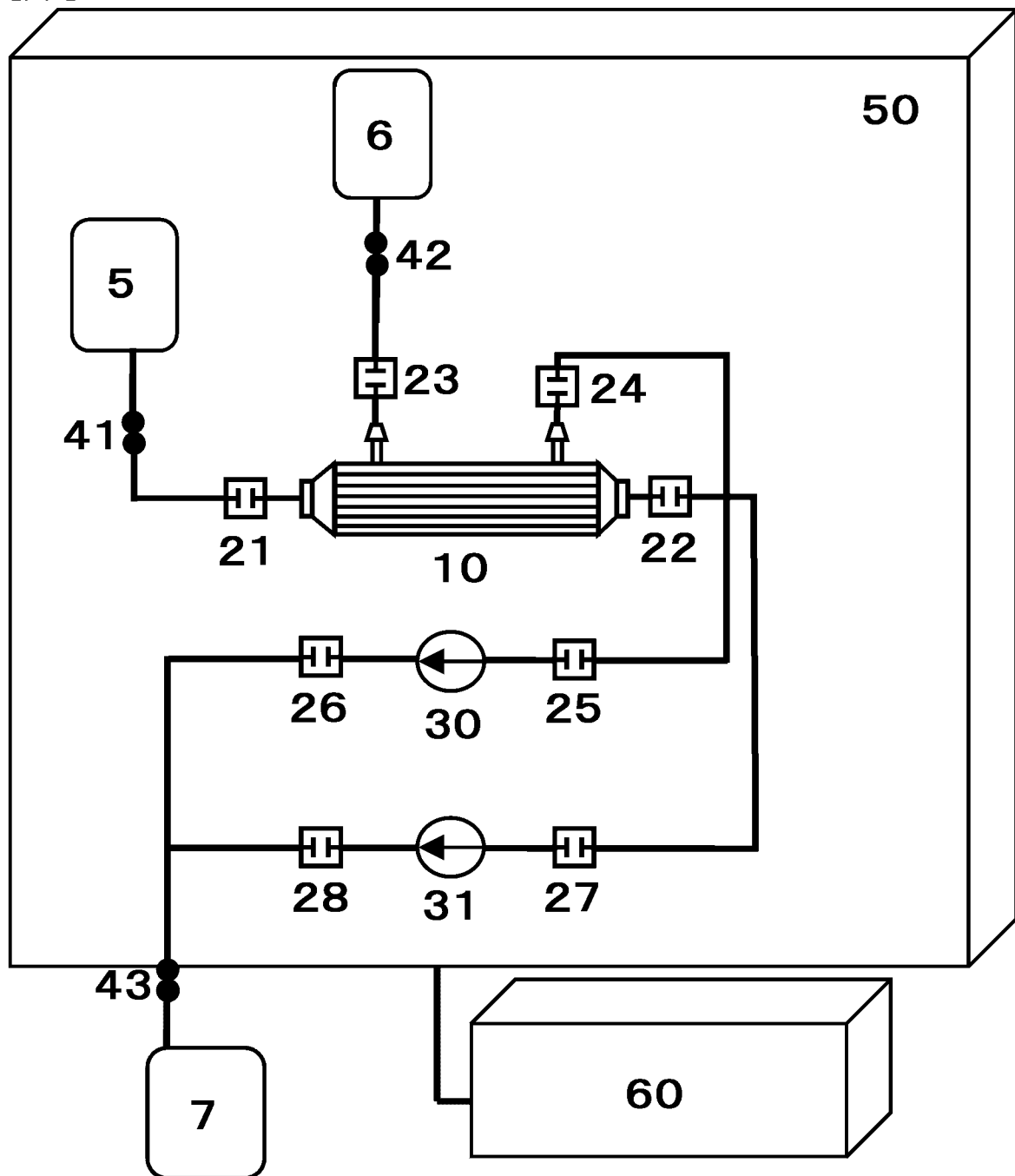
請求の範囲

- [請求項1] 細胞を内表面および／または外表面に播種して培養するための中空糸膜であって、該中空糸膜が疎水性高分子のみからなることを特徴とする細胞培養用の中空糸膜。
- [請求項2] 前記疎水性高分子が70度以上93度以下の接触角を有する高分子である請求項1に記載の中空糸膜。
- [請求項3] 前記疎水性高分子が、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレンからなる群から選ばれる1種以上である請求項1または2に記載の中空糸膜。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載の中空糸膜を複数本束ねた中空糸束が格納された細胞培養用の中空糸モジュール。
- [請求項5] 請求項4に記載の中空糸モジュールを細胞培養容器として用いる細胞培養方法。
- [請求項6] 請求項4に記載の中空糸モジュールを細胞培養容器として含む細胞培養装置。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/086686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, B01D63/04(2006.01)i, B01D69/08(2006.01)i, B01D71/68(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)

C12M3/00, B01D63/04, B01D69/08, B01D71/68, 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	1996-2017
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)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-130678 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 12 June 1987 (12.06.1987), claims; page 2, upper right column, 6th line from the bottom to the last line; examples; page 5, lower right column, lines 1 to 4 (Family: none)	1-6

☐ 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
01 February 2017 (01.02.17)

Date of mailing of the international search report
21 February 2017 (21.02.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, B01D63/04(2006.01)i, B01D69/08(2006.01)i, B01D71/68(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 (I P C))

Int.Cl. C12M3/00, B01D63/04, B01D69/08, B01D71/68, 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	1971-2017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)

JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)
WPI

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	JP 62-130678 A (旭メディカル株式会社) 1987.06.12, 特許請求の範囲、2 ページ右上欄下から 6 行ー末行、実施例、5 頁右下欄 1ー4 行 (ファミリーなし)	1-6

☐ 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

「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

「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

「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)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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

「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

「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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.02.2017

国際調査報告の発送日

21.02.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / 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)

川口 裕美子

4 N

9 8 2 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488