

(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
2014 年 3 月 6 日(06.03.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/034146 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/005172
- (22) 国際出願日: 2013 年 9 月 2 日(02.09.2013)
- (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 2012-192980 2012 年 9 月 3 日(03.09.2012) JP
特願 2012-265436 2012 年 12 月 4 日(04.12.2012) JP
特願 2013-051179 2013 年 3 月 14 日(14.03.2013) JP
特願 2013-101805 2013 年 5 月 14 日(14.05.2013) JP
- (71) 出願人: 三菱レイヨン株式会社(MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008253 東京都千代田区丸の内一丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 渋谷 望(SHIBUYA, Nozomu); 〒2300053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン株式会社横浜研究所内 Kanagawa (JP). 柳 麻美子(YANAGI, Mamiko); 〒2300053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン株式会社横浜研究所内 Kanagawa (JP). 松下 ▲ 琢▼(MATSUSHITA, Taku); 〒8600082 熊本県熊本市北区池田 3 - 3 0 - 8 Kumamoto (JP). 石井 貴晃(ISHII, Takaaki); 〒8350007 福岡県みやま市瀬高町長田 2 0 1 3 - 1 0 Fukuoka (JP). 原田 耕志(HARADA, Kouji); 〒4408601 愛知県豊橋市牛川通四丁目 1 番地の 2 三菱レイヨン株式会社豊橋事業所内 Aichi (JP). 後藤 武彦(GOTOU, Takehiko); 〒1008253 東京都千代田区丸の内一丁目 1

番 1 号 三菱レイヨン株式会社内 Tokyo (JP). 掛伸二(KAKE, Shinji); 〒2300053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン株式会社横浜事業所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 丁目 6 番 5 号丸の内北口ビル 2 1 階 大野総合法律事務所 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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: CELL CULTURE MODULE

(54) 発明の名称: 細胞培養用モジュール

(57) Abstract: Disclosed are: a cell culture module wherein a substance with an arbitrary size can be taken in and out at an arbitrary position in the module; a cell culture module which can be highly liquid-tightly or air-tightly connected to a fluid conveying means such as a tube or a syringe; a cell culture module whereby cells can be efficiently cultured over a long period of time while sustaining the inherent function thereof; and a cell culture device which comprises the aforesaid cell culture module.

(57) 要約: 本発明は、モジュール内の任意の位置へ任意の大きさの物質を出し入れすることができる細胞培養用モジュール、チューブやシリンジなどの送流手段と液密性あるいは気密性高く接続できる細胞培養用モジュール、及び、細胞を本来の機能を維持したまま効率よく長期間培養することができる細胞培養用モジュール、並びに、前記細胞培養用モジュールを含む細胞培養装置に関する。



WO 2014/034146 A1

明 細 書

発明の名称：細胞培養用モジュール

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養用モジュールに関する。より詳しくは、モジュール内の任意の位置へ任意の大きさの物質を出し入れすることができる細胞培養用モジュール、チューブやシリンジなどの送流手段と液密性あるいは気密性高く接続できる細胞培養用モジュール、及び、細胞を本来の機能を維持したまま効率よく長期間培養することができる細胞培養用モジュール、並びに、前記細胞培養用モジュールを含む細胞培養装置に関する。

背景技術

[0002] 培養細胞を用いた薬効、毒性、安全性等の評価試験系は、動物実験に代替する試験方法として重要である。しかしながら、細胞、特に初代細胞を生体外で長期間培養することは必ずしも容易ではない。また、培養細胞を用いた評価試験系では、生体内と同様の機能を保持した細胞を用いる必要があるが、本来の機能を維持しつつ細胞を効率よく分化増殖させることも容易ではない。

[0003] 生体外で細胞を効率的に培養するためには、培養細胞に栄養と空気（酸素）を補給する必要がある。そのための技術としては、従来から中空糸膜を用いて培養液を供給・排出する方法が知られている（特許文献１～３）。

[0004] 一方、細胞本来の機能を維持しながら培養するためには、生体内に類似した環境で細胞を培養することが好ましい。そのための技術としては、従来ハイドロキシアパタイトやポリ乳酸等の多孔質材料を足場として、細胞を三次元的に培養する方法が知られている（特許文献４）。

[0005] 近年では、生体内組織の繊維状の構造を高度に模倣できることから、ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーを、細胞培養や組織形成の足場材料として用いる技術が注目されている（非特許文献１、非特許文献２）。例えば、熔融紡糸によって作製されたナノファイバーを足場材料に用いる方法

(特許文献5)や、有機系ナノファイバーを溶媒に分散した混合液を利用してナノファイバーのパターンを形成し、さらに細胞培養に有効な機能性薬剤をこのパターンに吸着させることにより、細胞の接着、増殖、分化を制御する方法が示されている(特許文献6)。

[0006] 発明者らは、メッシュ状に配置した中空糸膜と、足場材料としてのナノファイバー層とを用いることにより、生体外で効率的に細胞を培養できる細胞培養用モジュールを開発している(特許文献7～10)。このモジュールでは、ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーが生体内類似の環境を創出し、中空糸膜が該環境に培養液と空気(酸素)を補給するとともに、培養細胞からの代謝老廃物の除去を行う。

[0007] 上記細胞培養用モジュールへ細胞懸濁液や培地(培養液)、ガスなどの流体を導入するため、モジュールを構成する基板に設けられた通流口(開口)にチューブを接続したり、注射針を刺し込んだりすることが行われている。この際、モジュールの内部空間の液密性あるいは気密性を確保するため、通流口をシリコンゴムからなるシートによって封止する技術が提案されている(例えば特許文献10参照)。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開平4-341176号公報
特許文献2：特開2004-166717号公報
特許文献3：特開2000-189189号公報
特許文献4：特開2006-254722号公報
特許文献5：特開2007-44149号公報
特許文献6：特開2007-44149号公報
特許文献7：特開2009-100号公報
特許文献8：特開2010-148496号公報
特許文献9：特開2010-148497号公報
特許文献10：特開2011-239756号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：高分子，2006，Vol.55，No.3，pp.142

非特許文献2：Tissue Engineering，2005，Vol.11，No.1-2，pp.101

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上述のような細胞培養用モジュールでは、外部から内部に物質を導入したり、内部から外部へ物質を取り出したりするために、モジュールを構成する基板に、チューブやシリンジ等を接続可能な開孔（インレットあるいはアウトレット）を設けることが行われている。例えば、物質の導入は、インレットに接続したチューブ等から該物質を含む液体を送液することによって行われている。

[0011] これらのインレットあるいはアウトレットは、通常0.5～5mm程度の孔径とされるため、これを超える大きさの物質をモジュールの内部へ導入したり、外部へ排出したりすることはできない。また、これよりも小さな物質であっても、液体の流れにのせて内部へ導入する構成であるため、モジュール内部の任意の位置に物質を配置することはできない。同様に、モジュール内部の任意の物体を選択して外部へ排出させることもできない。

[0012] 上述のような細胞培養用モジュールを利用することで、生体外での細胞培養技術は一定の成果を挙げている。しかしながら、培養細胞を用いた試験系が、動物実験に代替する評価系として完成するためには、生体内と同様の機能を保持した状態で細胞が培養され、生体組織に類似した系が再現されなければならない。そのための検討は、まだ十分になされていない。

[0013] そこで、本発明は、モジュール内の任意の位置へ任意の大きさの物質を出し入れすることができる細胞培養用モジュールを提供することを第1の課題とする。

[0014] また本発明は、細胞培養用モジュールにおいて、細胞懸濁液や培地、ガスなどの通流口の封止性を高め、細胞の導入時等に細胞懸濁液等の漏れが生じるのを防止するための技術を提供することを第2の課題とする。

[0015] さらに本発明は、脱分化等を抑制し、生体内と同様の機能を保持した状態で細胞を長期間培養でき、動物試験に代替する培養細胞評価系を提供することを第3の課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] 上記第1の課題解決のため、本発明は、中空糸膜とが配置された培養場と、該培養場を含む内部空間を構成する枠体と、取り外し可能な蓋体と、を備え、該蓋体に取り付けられる開口が、前記培養場全体を露出可能な大きさに設けられている細胞培養用モジュールを提供する。

[0017] この細胞培養用モジュールでは、蓋体を取り外して培養場全体を露出させることで、培養場の任意の位置に物質を導入したり、任意の位置の物質を外部に取り出したりすることが、物質の大きさの制約なく可能とされる。

[0018] 前記細胞培養用モジュールにおいて、前記蓋体及び／又は枠体は、外部から前記内部空間へ又は前記内部空間から外部へ流体を通流させる通流口を有することが好ましく、該通流口は、外部から前記内部空間へ向かって縮径するメス型ルアーテーパーを有することが好ましい。

[0019] 通流口は1つであっても複数であってもよく、蓋体及び／又は枠体（枠体を構成する2枚の基板あるいは型枠）の任意の位置に設けることができるが、後述のとおり、前記繊維集合体の中心に対して対称に設けられていることが特に好ましい。

[0020] 第2の課題解決のため、本発明は、2枚の基板と、該基板の間に形成された培養領域内に中空糸膜が配設された培養場と、前記培養領域の外部から内部へ又は内部から外部へ流体を通流させる複数の通流口と、を有し、前記通流口は、前記基板の前記足場材料に対応する位置に配設され、かつ、前記培養領域の外部から内部へ向かって縮径するメス型ルアーテーパーを備える細胞培養用モジュールを提供する。

[0021] 通流口にメス型ルアーテーパーを備える細胞培養用モジュールは、オス型ルアーテーパーを有する、チューブやシリンジなどの送流手段と液密性あるいは気密性高く接続できる。

- [0022] 前記細胞培養用モジュールにおいて、複数の通流口は、同一の前記基板に設けられていても、異なる前記基板に設けられていてもよいが、異なる基板に設けられていることが好ましい。
- [0023] 本発明の細胞培養用モジュールにおいて、通流口は、培養場の中心に対して対称に設けられていることが好ましい。
- [0024] 本発明の細胞培養用モジュールにおいて、繊維集合体は中空糸膜から分離可能に配置されていることが好ましい。また、前記繊維集合体はナノファイバーからなるものとすることができる。
- [0025] 第3の課題解決のため、本発明は、中空糸膜と、平均直径250nm～950nmのナノファイバーからなる繊維集合体とが、配置された培養場を備える細胞培養用モジュールを提供する。
- [0026] 上記した第1、第2の課題解決のための細胞培養用モジュールにおいても、繊維集合体は平均直径250nm～950nmのナノファイバーからなるものとすることができる。なお、ナノファイバーの平均直径は約300nm又は約600nmがより好ましく、約600nmが特に好ましい。
- [0027] 本発明の細胞培養用モジュールを用いて培養することで、高い活性を有する細胞が得られる。得られる細胞のチトクロム450 (CYP) 活性は2 pmol/10⁶cells/min以上であることが好ましく、3 pmol/10⁶cells/min以上であることがより好ましく、4 pmol/10⁶cells/min以上であることが特に好ましい。
- [0028] 本発明の細胞培養用モジュールにおいて、中空糸膜は、酸素供給用中空糸膜と培地供給用中空糸膜とからなることが好ましい。酸素供給用中空糸膜は、モジュール内に酸素を供給して吸気を促進させ、培地供給用中空糸膜は、モジュール内に培地を供給して、代謝（栄養添加・老廃物排出）を促進させる。
- [0029] 本発明は、前記細胞培養用モジュールと、酸素供給手段と、培地供給手段とを含む、細胞培養用装置も提供する。
- [0030] 本発明の細胞培養用装置は、さらに、モニター手段と、分析手段と、サンプリング手段から選ばれるいずれか1又は2以上の手段を含んでいてもよい。

。

発明の効果

[0031] 本発明により、モジュール内の任意の位置へ任意の大きさの物質を出し入れすることができる細胞培養用モジュールが提供される。さらには、細胞シートのような組織を形成することで、ばらばらの細胞とは異なる挙動を示す細胞塊を培養時の状態で取り出すことが可能となり、精度の高い評価試験が行える。

[0032] また本発明により、細胞培養用モジュールの細胞懸濁液や培地、ガスなどの通流口の封止性を高め、細胞の導入時等に細胞懸濁液等の漏れが生じるのを防止するための技術が提供される。

[0033] さらに本発明により、細胞をその本来の機能を維持した状態で効率よく長期間培養することができる。本発明の技術は、既存の足場材料やこれを用いた細胞培養用モジュールへの適用が可能であり、これにより、より優れた生体外での薬効、毒性、安全性等の評価が可能となる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]本発明の第一実施形態に係る細胞培養用モジュール101Aの構成を説明する図である。Aはキャップ150の取り外し時の断面図、Bは上面図である。

[図2]通流口153の構成を説明する図である。

[図3]培養場110の構成を説明する図である。Aは上面図、BはA中P-P線の断面図、CはA中Q-Q線の断面図である。

[図4]第一実施形態に係る細胞培養用モジュール101Aの変形例の構成を説明する図であり、キャップ150の取り外し時の断面図を示す。

[図5]培養場110の変形例の構成を説明する図である。Aは上面図、BはA中P-P線の断面図である。

[図6]本発明の第二実施形態に係る細胞培養用モジュール101Bの構成を説明する図である。Aはキャップ150の取り外し時の上面図、Bは断面図である。

[図7]本発明の第三実施形態に係る細胞培養用モジュール101Cの構成を説明する図である。Aはキャップ150の取り外し時の上面図、Bは側面図である。

[図8]本発明の第四実施形態に係る細胞培養用モジュール101Dの構成を説明する図である。Aはキャップ150の取り外し時の上面図、Bは断面図である。

[図9]本発明の第五実施形態に係る細胞培養用モジュール201Aの構成を説明する図である。Aは平面図、BはA中P-P線の断面図である。

[図10]ルアーテーパによるポートとシリンジとの接続態様を説明する図である。

[図11]ポートの封止態様を説明する図である。

[図12]足場材料210の構成を説明する図である。Aは平面図、BはA中P-P線の断面図、CはA中Q-Q線の断面図である。

[図13]細胞培養用モジュール201Aを用いた細胞培養方法の手順を説明する図である。

[図14]本発明の第六実施形態に係る細胞培養用モジュール201Bの構成を説明する図である。Aは平面図、BはA中P-P線の断面図である。

[図15]細胞培養用モジュール201Bを用いた細胞培養方法の手順を説明する図である。

[図16]本発明の細胞培養装置の構成の一例を示す。

[図17]Hc細胞（上）とHc細胞から誘導した肝芽細胞を、各ナノファイバー不織布（No. 1～No. 6）を足場として静置培養したときのチトクロム3A4（CYP）酵素活性を示す。

[図18A]各ナノファイバー不織布を足場としてHc細胞由来肝芽細胞を静置培養したときの細胞増殖状態を位走査顕微鏡で観察した結果を示す（上から、No. 1、No. 2、No. 3）。

[図18B]各ナノファイバー不織布を足場としてHc細胞由来肝芽細胞を静置培養したときの細胞増殖状態を位走査顕微鏡で観察した結果を示す（上から、

No. 4、No. 5、No. 6)。

[図19]ヒト凍結肝細胞をナノファイバー不織布又はシャーレを足場として静置培養したときのチトクロム3A4 (CYP3A4) 酵素活性を示す(左からNo. 2、No. 4、No. 6、シャーレ)。

[図20]Hc細胞由来肝芽細胞を各ナノファイバー不織布を用いて静置培養したときの細胞数($\times 10^6$ cells/プレート)の経日変化を示す(-□-: No. 2、-△-: No. 3、-■-: No. 4、-▲-: No. 5、-◇-: No. 6)。

[図21]本発明の細胞培養装置を用いてHc細胞を肝芽細胞に誘導し、さらに還流培養したときの細胞密度($\times 10^7$ cells/cm³)の経日変化を示す。

[図22]本発明の細胞培養装置を用いてヒト凍結肝細胞を環流培養したときの、細胞密度($\times 10^7$ cells/cm³)の経日変化を示す。

[図23]本発明の細胞培養装置を用いてヒト凍結肝細胞を環流培養したときの、溶存酸素濃度の経日変化を示す。

[0035] 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2012-192980号、特願2012-265436号、特願2013-051179号、及び特願2013-101805号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための形態

[0036] 1. 第一実施形態に係る細胞培養用モジュール

(1) 枠体及び蓋体の構成

図1に、本発明の第一実施形態に係る細胞培養用モジュール101Aの構成を示す。細胞培養用モジュール101Aは、基板120、130及び型枠140を含んだ枠体、並びに蓋体150(以下「キャップ150」と称する)を含んで構成されている。基板130には、キャップ150が取り付けられる開口131が設けられている。

[0037] 開口131周面(内周面)にはネジ溝132が周設されている。キャップ150は、ネジ山151が周設され、開口131と同径とされた外周面を有している。キャップ150は、ネジ山151とネジ溝132との係合によって、開口131へ取り付けあるいは取り外し可能(スクリューキャップ)と

されている。図1Aは、キャップ150の取り外し時の細胞培養用モジュール101Aの断面図を示し、図1Bは、キャップ150の取り外し時の基板120、130及び型枠140の上面図を示す。

[0038] キャップ150は、開口131へ取り付けられた状態において、基板120、130及び型枠140とともに、液密な（あるいは気密な）内部空間102（後述の図2B参照）を構成する。図1中符号152は、内部空間102の液密性（あるいは気密性）を高めるための封止部材（例えばOリング等）を示す。封止部材152は、キャップ150の基板130との接触部に配設され、キャップ150の開口131への取り付け時において該接触部を封止する。

[0039] 内部空間102内には、中空糸膜111a（113a）及び中空糸膜111b（113b）がメッシュ状に配設されて構成された培養場110が位置している。中空糸膜111a（113a）は、型枠140の対向する2辺を貫通して型枠140に挿通されており、ポッティング樹脂によって型枠140に固定されている。同様に、中空糸膜111b（113b）は、型枠140の他の対向する2辺を貫通して型枠140に挿通されて型枠140に固定されている。なお、中空糸膜111a（113a）、111b（113b）及び培養場110の構成については、図3を参照して詳しく後述する。

[0040] 基板120、130は、中空糸膜111a（113a）、111b（113b）及び型枠140を挟んでしっかりと固定するのに適した強度を有するものであればよく、例えば、アクリル板とされる。基板120、130はそれぞれ一枚のアクリル板等から構成されるものであっても、それぞれ2枚以上のアクリル板等から構成されるものであってもよい。キャップ150も、例えばアクリル板であってよく、一枚あるいは2枚以上のアクリル板等から構成されるものであってよい。

[0041] 型枠140の材料は、ポッティング樹脂との接着性が十分に得られるものであればよく、例えば、シリコンゴムとされる。また、ポッティング樹脂は、十分な接着性を有するものであればよく、例えば、エポキシ樹脂、ウレタ

ン樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、シリコン樹脂等の各種の熱硬化性樹脂や熱可塑性樹脂等が用いられる。

[0042] 基板 130 の開口 131 は、キャップ 150 の取り外し時において、培養場 110 全体を露出可能な大きさに設けられている。換言すると、上方視した場合（図 1 B 参照）、開口 131 は、その内側に培養場 110 の全体が位置し得るような大きさとされている。

[0043] 開口 131 の径 D は、培養場 110 の径 d 以上とされていることが好ましい。より具体的には、開口 131 と培養場 110 は同心状に配置され、かつそれらの径は開口 131 の径 D が培養場 110 の径 d 以上となるようにされていることが好ましい。換言すれば、上方視した場合（図 1 B 参照）、開口 131 の開口面積は、培養場 110 の面積以上とされていることが好ましい。より具体的には、上方視した場合（図 1 B 参照）、開口 131 と培養場 110 は、開口 131 の内側に培養場 110 の全体が位置するように配設されていることが好ましい。

[0044] これにより、細胞培養用モジュール 101 A では、キャップ 150 の取り外し時において、培養場 110 全体を外部から視認したり操作したりすることが可能なように露出させることができる。従って、細胞培養用モジュール 101 A では、キャップ 150 を取り外して培養場 110 全体を露出させることで、培養場 110 の任意の位置に物質を導入したり、任意の位置の物質を外部に取り出したりすることが、物質の大きさの制約なく可能とされる。

[0045] (2) 通流口

次に、図 2 を参照する。キャップ 150 は、モジュールの外部から内部空間 102 へ又は内部空間 102 から外部へ、細胞懸濁液等の流体を通流させるための通流口 153 を有していてもよい（図 A 参照）。通流口 153 は、キャップ 150 を貫通して設けられている。通流口 153 は、キャップ 150 の取り付け時において、外部と内部空間 102 とを連絡する。図では、キャップ 150 に穿設されたネジ溝穴に、ポート（接続部材） 154 をネジ込んで取り付けることにより、通流口 153 を構成する例を示した。

[0046] 図には、キャップ 150 に通流口 153 を 2 つ設けた例を示すが、通流口 153 は 1 つ又は 3 つ以上を設けることができる。また、通流口 153 は、図 2 B に示すように基板 120 にも設けることができる。通流口 153 は、細胞懸濁液や培地、ガスなどの流体を、内部空間 102 の外部から内部へ又は内部から外部へ通流させることができる限りにおいて、キャップ 150、基板 120、130 及び型枠 140 の任意の位置に任意の数で設けることができる。

[0047] ポート 154 の材質は、特に限定されないが、通常、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA)、環状ポリオレフィン、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン及びポリジメチルシロキサン (PDMS) 等とされる。ポート 154 には、医療分野で汎用される、いわゆるシリンジポートを好適に用いることができる。

[0048] ポート 154 はメス型ルアーテーパを備え、その内壁が内部空間 102 の外部から内部へ向かう方向に徐々に縮径されていることが好ましい。これによって、ポート 154 は、オス型ルアーテーパを有する、チューブやシリンジなどの送流手段と液密性良く接続される。メス型及びオス型ルアーテーパのテーパ角度や大きさ等の規格は、従来公知のものを適用できる。

[0049] 通流口 153 の大きさや形状は、特に限定されないが、例えば円形で、直径が $500\ \mu\text{m}$ ~ $5\ \text{mm}$ 程度とされる。ポート 154 のメス型ルアーテーパは、その内壁の少なくとも一部に、オス型ルアーテーパを有する送流手段を刺し込み可能に設けられていればよいものとする。

[0050] (3) 培養場

次に、図 3 を参照して、培養場 110 の構成を説明する。培養場 110 は、中空糸膜 111 a、111 b (中空糸膜 111 a、111 b を併せて中空糸膜 111 と称する) がメッシュ状に配置された中空糸膜メッシュ 112 と、繊維集合体からなる足場材料 115 と、中空糸膜 113 a、113 b (中空糸膜 113 a、113 b を併せて中空糸膜 113 と称する) がメッシュ状に配置された中空糸膜メッシュ 114 とが、この順に積層されている。

[0051] (3-1) 中空糸膜

中空糸膜メッシュ 112 を形成する中空糸膜 111 の膜基材ポリマーは、中空糸膜上に成形できるものであればよく、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアリルスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアクリロニトリル、セルロースアセテート、ポリフッ化ビニリデン、これらの2種類以上を混合した混合物等が挙げられる。

[0052] 中空糸膜 111 の外径は、50～3000 μm が好ましく、100～2000 μm がより好ましい。外径が50 μm 以上であれば、中空糸膜 111 において十分な大きさの中空部分を確保しやすいため、培養液を送液する際の差圧が大きくなったり、代謝老廃物の除去が不十分になったりすることを抑制しやすい。また、外径が3000 μm 以下であれば、単位体積あたりの中空糸膜 111 の表面積をより大きくすることができるため、培養細胞に十分な栄養及びガスを供給することが容易になる。

[0053] 中空糸膜 111 の膜厚は、5～500 μm が好ましい。膜厚が5 μm 以上であれば、栄養供給やガス供給の際の加圧によって中空糸膜が破壊されることを防止しやすい。また、膜厚が500 μm 以下であれば、ろ過抵抗がより小さくなるため、培養細胞への栄養供給やガス供給や、培養細胞からの代謝老廃物の除去の効率が向上する。なお、中空糸膜 111 が多層膜である場合の膜厚は、各層の膜厚の総和（全層の膜厚）である。中空糸膜 111 の内径は、10 μm 以上2995 μm 以下が好ましい。

[0054] 中空糸膜 111 としては、精密ろ過膜、限外ろ過膜、ガス分離膜等を用いることができる。これらは必要に応じて適宜選択することができる。物質選択透過性を有する中空糸膜を用いることにより、特定の物質を培養細胞に供給したり、特定の代謝老廃物を培養細胞から除去したりすることができる。また、培養液中の特定成分、化学物質、薬物等の被験物質を培養細胞に効率的に供給することや、老廃物や代謝物を系外に排出させてこれらをモニタリングすることが可能となる。物質選択透過性を有する中空糸膜としては、前

記精密ろ過膜や限外ろ過膜を挙げることができ、さらに、膜素材そのものに物質選択透過性を有する中空糸膜や、中空部分に選択透過性を有する物質が充填された多孔質中空糸膜を挙げることができる。

[0055] また、ガス分離膜を用いることにより、培養細胞に空気、酸素、及びその他のガスを効率的、かつ選択的に供給することができる。ガス供給は多孔質中空糸膜を用いて行ってもよく、この場合、ガス分離機能を有する非多孔性の膜基材を、多孔性の膜基材で支持した中空糸膜が好ましい。このようなガス分離機能を有する中空糸膜を用いることにより、培養液中にバブルレスでガスを供給できるので、培養細胞へのダメージを防止しやすい。また、培養液等の液体が中空糸膜の中空部分に入り込んで該中空部を閉塞することを防止しやすい。

[0056] また、中空糸膜 1 1 1 は、親水化処理されていることが好ましい。中空糸膜を親水化処理することにより、培養細胞への培養液等の液体成分の供給が容易になり、また中空糸膜表面への細胞接着の抑制も容易になる。中空糸膜を親水化処理する方法としては、例えば、中空糸膜をエチレンービニルアルコール共重合体等の親水性高分子や、グリセリン、エタノールで処理する方法が挙げられる。

[0057] また、中空糸膜メッシュ 1 1 2 には、2 種類以上の中空糸膜を用いることもできる。例えば、栄養の供給を行う精密ろ過膜、ガスの供給を行うガス分離膜、培養細胞への特定成分の供給あるいは培養細胞からの特定の代謝老廃物の排出を行う物質選択透過性を有する中空糸膜を、任意に組み合わせて用いることができる。

[0058] 中空糸膜メッシュ 1 1 2 は、複数の中空糸膜を網目が形成するようにメッシュ状に配置したものである。中空糸膜メッシュ 1 1 2 の形態としては、例えば、複数の中空糸膜 1 1 1 a を所定の間隔で平行に配置してシート状とし、それら中空糸膜 1 1 1 a に対して直交する方向に沿って複数の中空糸膜 1 1 1 b を所定の間隔で平行に配置してシート状とすることにより、メッシュ状とした形態が挙げられる（図 3 A）。中空糸膜メッシュ 1 1 2 における中

中空糸膜 1 1 1 からなるシートの層数は特に制限されず、2～10層が好ましい。この例では、シートは2層（中空糸膜 1 1 1 a からなる層と中空糸膜 1 1 1 b からなる層）である。

[0059] 中空糸膜メッシュ 1 1 4 及び中空糸膜 1 1 3 は、中空糸膜メッシュ 1 1 2 及び中空糸膜 1 1 1 と同じものを用いることができ、好ましい形態も同じである。

[0060] 中空糸膜メッシュ 1 1 2、1 1 4 の形態は、中空糸膜 1 1 1、1 1 3 を介する栄養や気体の供給、代謝老廃物の除去に応じて選択すればよく、中空糸膜 1 1 1、1 1 3 をモジュール化する際のポート部の設計にも依存する。培養場 1 1 0 では、中空糸膜メッシュ 1 1 2 の中空糸膜 1 1 1 a と中空糸膜メッシュ 1 1 4 の中空糸膜 1 1 3 a は同一種類の中空糸膜であることが好ましい。同様に、中空糸膜メッシュ 1 1 2 の中空糸膜 1 1 1 b と中空糸膜メッシュ 1 1 4 の中空糸膜 1 1 3 b は同一種類の中空糸膜であることが好ましい。このような形態とすることで、中空糸膜 1 1 1、1 1 3 をモジュール化する際に、例えば中空糸膜 1 1 1 a 及び中空糸膜 1 1 3 a を集結させて一つのポート部に繋いでガス供給用中空糸膜とし、中空糸膜 1 1 1 b 及び中空糸膜 1 1 3 b を集結させて他のポート部につないで培地供給用中空糸膜として用いることができる。

[0061] (3-2) 足場材料

足場材料 1 1 5 を構成する繊維集合体には、ナノファイバーの集合体が好適に用いられる。ナノファイバーの集合体は、基材上で、エレクトロスピニング（電界紡糸）により形成されたものであることが好ましい。基材は、特に制限されず、エレクトロスピニングにより表面にナノファイバーの集合体を形成できるものであればよく、例えば、アルミ箔等が挙げられる。

[0062] ナノファイバーの材質は、紡糸が容易である点から、溶剤可溶性のポリマーであることが好ましい。特にエレクトロスピニングが可能な溶剤可溶性のポリマーとしては、例えば、ナイロン 4、6、ナイロン 6、ナイロン 6, 6、ナイロン 12、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポ

リカーボネート、ポリエーテルイミド、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリフッ化ビニリデン、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、シルク、酢酸セルロース、キトサン、コラーゲン等が挙げられる。しかし、これらに限定されるものではなく、これらのポリマーの混合物や、無機物や炭素材料を含有させたものであってもよい。

[0063] また、ポリマーの分子量は特に限定されないが、分子量が低すぎると曳糸性が低下するおそれがあり、分子量が高すぎると粘度が高くなって紡糸が困難になるおそれがある。また、溶剤に不溶なポリマーであっても、レーザーエレクトロスピニング法を適用する場合は熱可塑性ポリマーを用いることができる。レーザーエレクトロスピニング法に適用できる熱可塑性ポリマーとしては、例えば、ポリエチレンテレフタレートが挙げられる。

[0064] ナノファイバー（単繊維）の平均直径（糸径）は250nm～950nmが好ましく、約300又は約600nmがより好ましく、約600nmがさらに好ましい。この範囲の糸径を有するナノファイバーを用いれば、細胞を高い活性で長期間培養することができる。得られる細胞のチトクロームP450（CYP）活性は2以上であることが好ましく、3以上であることがより好ましく、4以上であることが特に好ましい。

[0065] なお、ナノファイバーの単繊維の直径は、上記特許文献10に記載の方法により測定することができる。例えば、ナノファイバーの単繊維の平均直径は、例えば、以下のようにして測定することができる。ナノファイバー、又はその集合体（ナノファイバー層）の表面を電子顕微鏡により観察し、得られた電子顕微鏡写真中の任意の20本のナノファイバー表面の幅を計測し、その平均をナノファイバーの単繊維の直径とする。電子顕微鏡としては、走査型電子顕微鏡（SEM）が好ましい。観察倍率は5000倍～5万倍が好ましい。観察倍率が5000倍以上であれば、ナノファイバーの直径の決定が容易になる。また、単繊維の直径を求める際には、画像解析ソフトを用いることが好ま

しい。画像解析ソフトによって得られるナノファイバーの単繊維の直径は、画像解析のための画質調整、画像解析ソフトの種類等によって若干変動があるが、その差は通常の実験誤差の範囲内である。

[0066] 繊維集合体の厚みは、 $0.5 \sim 100 \mu\text{m}$ が好ましく、 $1 \sim 50 \mu\text{m}$ がより好ましい。厚みが $0.5 \mu\text{m}$ 以上であれば、繊維集合体 115 を中空糸膜メッシュ間に配置するのが容易になる。厚みが $100 \mu\text{m}$ 以下であれば、栄養やガスの供給や代謝老廃物の除去が足場材料 15 に接着した細胞全体に均一に行えるため、細胞培養の効率が向上する。

[0067] 足場材料 115 に生理活性物質を吸着または固定させることにより、培養細胞の接着、増殖、分化、機能発現の制御を行うことができる。生理活性物質としては、機能性ポリマー、アミノ酸、タンパク質、糖鎖、ビタミン類等が挙げられる。特に、細胞培養に有効な生理活性物質、例えば培養細胞の増殖、分化、機能発現に重要な役割を有する生理活性物質の総称であるサイトカインを用いると効果的である。サイトカインとしては、インターロイキン、増血因子、増殖因子等が挙げられる。また、細胞－細胞外マトリックス、細胞－細胞間の接着に関与するインテグリン、カドヘリン等の細胞接着基質を用いることも効果的である。また、薬剤や化学物質等の被験物質を足場材料 115 に吸着または固定することにより、細胞培養試験を行うことも可能である。

[0068] 培養場 110 は、以上説明した中空糸膜メッシュ 112 と中空糸膜メッシュ 114 との間に、足場材料 115 が配置された積層体を有する。このように、ナノファイバー層を中空糸膜メッシュ間に配置することにより、足場材料 115 を中空糸膜メッシュ 112、114 に強固に固定することができ、培養細胞への栄養やガスの供給や、細胞培養からの代謝老廃物の除去をより安定して行うことができる。また、足場材料 115 を中空糸膜メッシュ 112、114 間に配置することで、足場材料 115 に接着させた培養細胞と中空糸膜 111、113 との距離が近くなるため、培養細胞への栄養やガスの供給や、細胞培養からの代謝老廃物の除去をより高い効率で行うことができ

、培養細胞のネクロシスが減少して細胞培養の効率が向上する。

[0069] 培養場 110 の大きさは、薬物試験に必要な細胞個数が確保できる大きさであればよく、1 m²～0.1 c m²が好ましく、600 c m²～0.2 c m²がより好ましく、59 c m²～0.35 c m²が特に好ましい。この範囲内であると足場材の均一性が上昇する。

[0070] なお、本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、培養場 10 の中空糸膜メッシュ 112、114 と足場材料 115 の積層数は特に限定されず、中空糸膜メッシュ 114、足場材料 115、中空糸膜メッシュ 112、足場材料 115、中空糸膜メッシュ 112 がこの順に積層されてもよく、これ以上の数の中空糸膜メッシュ 112、114 と足場材料 115 が積層されもよいものとする。

[0071] 細胞培養用モジュール 101A では、上述のポート 154 に、例えばチューブ等を接続することにより、栄養やガスの供給や、代謝老廃物の除去の行う経路として、中空糸膜メッシュ 112、114 の中空糸膜 111、113 以外の第 3 の経路を設けることができる。そのため、中空糸膜のみを用いて栄養やガスを供給したり、代謝老廃物を除去したりする場合に比べて、より多くの条件でかつそれらの条件を独立に制御しながらの細胞培養を、より簡便に行うことができる。

[0072] (4) 変形例

(4-1) 蓋体の変形例

上記では、基板 130 の開口 131 周面（内周面）にネジ溝 132 を設け、キャップ 150 の外周面にネジ山 151 を設けて、キャップ 150 の開口 131 への着脱を行う例を説明した。この形態は、構造が単純で加工が容易であり、キャップ 150 の着脱も容易である。また、モジュールのサイズも小さくできる。

[0073] キャップ 150 の開口 131 への着脱は、図 4 に示すように、基板 130 の開口 131 の外周面にネジ溝 132 を設け、キャップ 150 の内周面にネジ山 151 を設けることによって行ってもよい。図 4A は、キャップ 150

の取り外し時の細胞培養用モジュール１０１Ａの断面図を示す。

[0074] この変形例では、ネジ山１５１とネジ溝１３２が、内部空間１０２に導入される培地等と接触することがない。このため、乾燥した培地等によるネジ山１５１とネジ溝１３２との固着を防止して、キャップ１５０の着脱操作性を高めることができる。

[0075] （４－２）培養場の変形例

また、上記では、中空糸膜メッシュ１１２と中空糸膜メッシュ１１４との間に足場材料１１５を配して培養場１１０を構成する例を説明した。培養場１１０は、図５に示すように、中空糸膜メッシュ１１４、中空糸膜メッシュ１１２及び足場材料１１５をこの順に積層して構成してもよい。これにより、足場材料１１５を中空糸膜メッシュ１１２上に分離可能に配置することができる。従って、キャップ５０を取り外して培養場１１０全体を露出させれば、培養場１１０から中空糸膜メッシュ１１２上の足場材料１１５をそのまま外部に取り出すことができる。

[0076] ２．第一実施形態に係る細胞培養用モジュールにおける細胞培養方法

上述の細胞培養用モジュール１０１Ａを用いた細胞培養方法について説明する。

[0077] （１）細胞導入手順

まず、培養場１１０に細胞を導入する。細胞の導入は、キャップ１５０を取り外した状態で行うことができる（図１参照）。キャップ１５０を取り外した状態では、開口１３１を通して培養場１１０全体が露出される。このため、培養場１１０全体を視認しながら、細胞を培養場１１０上の任意の位置に細胞を導入することが可能である。細胞の導入は、例えばピペット等を開口２３１から内部空間１０２内に挿入し、培養場１１０上の任意の位置に細胞懸濁液を滴下することによって行う。細胞懸濁液とともに試験物質等の物質を導入してもよい。例えばピンセット等を培養空間１０２内に挿入し、固形物質を培養場１１０上に配置することによって、物質の大きさに制約なく任意の位置に導入できる。

[0078] 細胞の導入は、キャップ 150 に通流口 153 を設ける場合（図 2 参照）には、ポート 154 に細胞懸濁液の送液手段を接続して行ってもよい。通流口 153 から細胞懸濁液を送液することにより、内部空間 102 に細胞懸濁液の流れが形成され、該流れによって細胞が運搬されて培養場 110 上に分散される。ただし、この場合には、細胞を培養場 110 上の任意の位置にのみ導入することは難しい。また、細胞懸濁液とともに試験物質等の物質を導入してもよいが、この場合には、物質は溶液又は分散液で導入される必要があり、物質を培養場 110 上の任意の位置のみに導入することは難しい。

[0079] （２）培養手順

細胞の導入完了後、例えば中空糸膜 111a 及び中空糸膜 113a を集結させて一つのポート部に繋いでガス供給を行い、中空糸膜 111b 及び中空糸膜 113b を集結させて他のポート部につないで培地供給を行って細胞培養を行う。

[0080] 細胞培養は、具体的には、例えば中空糸膜 111a、113a としてガス分離膜である中空糸膜、中空糸膜 111b、113b として物質選択透過性を有する中空糸膜を用い、中空糸膜 111a、113a の片端より酸素を含むガスを供給しつつ、他方の端部より該ガスを排出させる。また、中空糸膜 111b、113b の片端より培養細胞の栄養を供給し、他方の端部より該培養細胞の老廃物や代謝物を排出させる。これにより、排出される成分をオンラインで分析し、培養細胞を培養しながら連続的に培養細胞の生育状況を評価することも可能である。

[0081] また、培養細胞に、中空糸膜 111b、113b の片端より被験物質を投与し、老廃物や代謝物を含む溶液を中空糸膜 111b、113b の他方の端部より排出させ、この溶液を分析しモニタリングすることによって、被験物質を投与した場合の培養細胞が受けるストレスや培養細胞の状態を経時的に評価できる。

[0082] （３）細胞回収手順

培養後の細胞は、再度キャップ 150 を取り外して回収することができる

。キャップ１５０を取り外した状態では、開口１３１を通して培養場１１０全体が露出される。このため、培養場１１０全体を視認しながら、培養場１１０上の任意の位置の細胞を選択的に回収することが可能である。細胞の回収は、例えばピペットを開口１３１から培養空間１０２内に挿入し、培養場１１０上の任意の位置の細胞を吸引することによって行う。あるいは、例えばスパチュラを培養空間１０２内に挿入し、培養場１１０上の任意の位置の細胞を掻き取って回収することもできる。

[0083] さらに、細胞の回収は、足場材料１１５を中空糸膜メッシュ１１２上に分離可能に配置した場合には、細胞が付着した足場材料１１５をそのまま外部に取り出すことによって行ってもよい。

[0084] また、培養場１１０に試験物質等の物質が導入されている場合には、細胞とともに該物質の回収を行うこともできる。例えばピンセット等で培養場１１０上の任意の位置の固形物質を選択的に取り出すことによって、物質の大きさに制約なく任意の位置から回収できる。

[0085] ３．第二実施形態に係る細胞培養用モジュール

図６に、本発明の第二実施形態に係る細胞培養用モジュール１０１Ｂの構成を示す。上述した第一実施形態に係る細胞培養モジュール１０１Ａでは、キャップ１５０の開口１３１への着脱を、開口１３１のネジ溝１３２と、キャップ１５０のネジ山１５１との係合によって行う構成を説明した。本実施形態に係る細胞培養用モジュール１０１Ｂは、キャップ１５０の開口１３１への着脱をネジ１６１とネジ穴１６２とによって行う構成となっている点で、細胞培養モジュール１０１Ａと異なっている。

[0086] ネジ穴１６２は、キャップ１５０、基板１３０、型枠１４０及び基板１２０を貫通して設けられている。また、ネジ穴１６２は、開口１３１及び内部空間１０２、中空糸膜１１１ａ（１１３ａ）及び中空糸膜１１１ｂ（１１３ｂ）に干渉しない位置（好ましくは図に示すように細胞培養モジュール１Ｂの四隅）に設けられている。開口１３１へのキャップ１５０の取り付けは、キャップ１５０、基板１３０、型枠１４０及び基板１２０を、それぞれに穿

設されたねじ穴１６２の位置を一致させるように重ね合わせ、ネジ穴１６２にネジ１６１をねじ込むことによって行う。

[0087] 細胞培養用モジュール１０１Ｂは、加工が容易であり、細胞培養用モジュール１０１Ａで生じ得る培地の乾燥等によるネジ山５１とネジ溝１３２との固着の問題がない。なお、ネジ穴１６２は、開口１３１へのキャップ１５０の取り付けのため、キャップ１５０を貫通し、基板１３０の少なくとも一部にまで穿設されていることが必要である。しかし、ネジ穴１６２は、基板１３０全部、さらには型枠１４０及び基板１２０にまで穿設されていることは必須とはならない。また、ネジ穴１６２の数及び位置についても、図に示した形態に限られず、適宜変更が可能である。

[0088] ４．第三実施形態に係る細胞培養用モジュール

図７に、本発明の第三実施形態に係る細胞培養用モジュール１０１Ｃの構成を示す。細胞培養用モジュール１０１Ｃは、キャップ１５０の開口１３１への着脱を、基板１３０に設けた係合穴１３３と、キャップ１５０に設けた係合ツメ１５５との係合によって行う構成となっている点で、上述した第一実施形態に係る細胞培養モジュール１０１Ａと異なっている。

[0089] 係合穴１３３は、基板１３０の開口１３１周縁部に設けられている。また、係合ツメ１５５は、開口１３１にキャップ１５０を閉蓋した際に、係合穴１３３の位置に対応し得る位置に設けられている。係合穴１３３及び係合ツメ１５５は、係合可能な形状を有していればよいが、例えば図に示すように、係合ツメ１５５を係合穴１３３に挿入した後、キャップ１５０を回転させることによって係合ツメ１５５を係合穴１３３に係止させる構造を一般に採用可能である。

[0090] ５．第四実施形態に係る細胞培養用モジュール

図８に、本発明の第四実施形態に係る細胞培養用モジュール１０１Ｄの構成を示す。細胞培養用モジュール１０１Ｄは、キャップ１５０の開口１３１への着脱を、留め具１６３によって行う構成となっている点で、上述した第一実施形態に係る細胞培養モジュール１０１Ａと異なっている。

[0091] 留め具１６３には、例えば、開口１３１を閉蓋したキャップ１５０と基板１２０とを挟み込んで保持するものを採用できる。この場合、キャップ１５０の上面と基板１２０の下面には、留め具１６３をはめ込むための凹部（図中符号１６４参照）を設けてもよい。

[0092] 細胞培養用モジュール１０１Ｃ、１０１Ｄは、キャップ１５０の着脱操作性に優れる。また、細胞培養用モジュール１０１Ｃ、１０１Ｄでは、細胞培養用モジュール１０１Ａで生じ得る培地の乾燥等によるネジ山１５１とネジ溝１３２との固着の問題がない。

[0093] 以上のように、本発明に係る細胞培養用モジュールでは、キャップ１５０の取り外し時において、培養場１１０全体を外部から視認したり操作したりすることが可能なように露出させることができる。このため、本発明に係る細胞培養用モジュールでは、キャップ１５０を取り外して培養場１１０全体を露出させることで、培養場１１０の任意の位置に物質を導入したり、任意の位置の物質を外部に取り出したりすることが、物質の大きさの制約なく可能とされる。また、内部空間１０２内にｐＨ測定や溶存酸素濃度測定などのためのプローブを挿入し、計測を行うことも可能となる。

[0094] ６．第五実施形態に係る細胞培養用モジュール

（１）概略構成

図８に、本発明の第五実施形態に係る細胞培養用モジュール２０１Ａの構成を示す。細胞培養用モジュール２０１Ａでは、基板２２０、２３０と型枠２４０によって液密な（あるいは気密な）培養空間（培養領域）２０２が構成されている。培養空間２０２には、中空糸膜と繊維集合体とからなる足場材料２１０が配設されている。足場材料２１０はポッティング樹脂で型枠２４０に固定されており、基板２２０、２３０はこれらを挟み込んで培養空間２０２を形成している。

[0095] 基板２２０、２３０は、足場材料２１０及び型枠２４０を挟んでしっかりと固定するのに適した強度を有するものであればよく、例えば、アクリル板とされる。細胞培養用モジュール２０１Ａにおいて、基板２２０、２３０は

それぞれ一枚のアクリル板等から構成されるものであっても、それぞれ2枚以上のアクリル板等から構成されるものであってもよい。また、細胞培養用モジュール201Aにおいて複数の培養空間202が設けられる場合には、これらを形成する基板220、230もそれぞれ2以上存在し得る。

[0096] 型枠240の材料は、ポッティング樹脂との接着性が十分に得られるものであればよく、例えば、シリコンゴムとされる。また、ポッティング樹脂は、十分な接着性を有するものであればよく、例えば、エポキシ樹脂、ウレタン樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、シリコン樹脂等の各種の熱硬化性樹脂や熱可塑性樹脂等が用いられる。

[0097] (2) 通流口

基板220にはねじ穴221が穿設されている。ねじ穴221は、基板層220を貫通し、細胞培養用モジュール201Aの外部と内部の培養空間202とを連絡している。ねじ穴221の一部にはねじが切られており、ポート(接続部材)222がねじ込まれて取り付けられている。

[0098] ねじ穴221及びポート222は、細胞懸濁液や培地、ガスなどの流体を、培養空間202の外部から内部へ又は内部から外部へ通流させるための通流口を構成している。ねじ穴221及びポート222、並びにこれらから構成された通流口は、基板220において足場材料210(具体的には後述する繊維集合体215)に対応する位置に配設されている。また、2つの通流口は、足場材料210(具体的には後述する繊維集合体215)の中心に対して対称(点对称)となる位置に配設されている。

[0099] ポート222の材質は、特に限定されないが、通常、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)、環状ポリオレフィン、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン及びポリジメチルシロキサン(PDMS)等とされる。ポート222には、医療分野で汎用される、いわゆるシリンジポートを好適に用いることができる。

[0100] 基板230にはねじ穴231が穿設されており、ねじ穴231にはポート232が取り付けられている。ねじ穴231及びポート232の構成は、ね

じ穴 2 2 1 及びポート 2 2 2 と同様である。

[0101] ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 はメス型ルアーテーパを備え、その内壁が培養空間 2 0 2 の外部から内部へ向かう方向に徐々に縮径されている。これによって、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 は、オス型ルアーテーパを有する、チューブやシリンジなどの送流手段と液密性良く接続される。メス型及びオス型ルアーテーパのテーパ角度や大きさ等の規格は、従来公知のものを適用できる。

[0102] ねじ穴 2 2 1、2 3 1 及びポート 2 2 2、2 3 2 の大きさや形状も、特に限定されないが、例えば円形で、直径が 5 0 0 μ m ~ 5 mm 程度とされる。ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 のメス型ルアーテーパは、それらの内壁の少なくとも一部に、オス型ルアーテーパを有する送流手段を刺し込み可能に設けられていればよいものとする。なお、ねじ穴 2 2 1、2 3 1 は、細胞培養用モジュール 2 0 1 A の外部と培養空間 2 0 2 内とを連絡し、かつポート 2 2 2、2 3 2 の取り付けが可能であれば、きり穴であってもよいものとする。

[0103] (3) ルアーテーパによる接続

図 9 に、シリンジを送液手段として用いる場合を例にとり、ポートとの接続態様を示す。図中符号 2 0 5 で示されるシリンジでは、プランジャ 2 5 3 をシリンジ本体 2 5 2 に押し込むことにより、シリンジ本体 2 5 2 の内部に保持された流体（ここでは、細胞懸濁液を例とする）を先端部 2 5 1 の開口から外部に排出できる。シリンジ 2 0 5 には、医療分野で汎用される使い捨ての注射筒を好適に用いることができる。

[0104] シリンジ 2 0 5 の先端部 2 5 1 は、細胞培養用モジュール 2 0 1 A のポート 2 2 2 及び／又は、シリンジ本体 2 5 2 との接続部から開口に向かって縮径するオス型ルアーテーパを備えている。シリンジ 2 0 5 の先端部 2 5 1 のオス型ルアーテーパと、細胞培養用モジュール 2 0 1 A のポート 2 2 2 及び／又はポート 2 3 2 のメス型ルアーテーパとは、ほぼ同一の形状とされており、嵌合可能とされている。従って、シリンジ 2 0 5 と細胞培養用モジュール

ル 2 0 1 A とは、先端部 2 5 1 をポート 2 2 2 及び／又はポート 2 3 2 に差し込むことによって簡単に液密に接続できる。これにより、細胞培養用モジュール 2 0 1 A では、シリンジ 2 0 5 内の細胞懸濁液を、漏れを生じることなく、培養空間 2 0 2 内に導入することが可能とされる。

[0105] さらに、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 は、ルアープラグ（封止部材）によって簡単に封止することができる（図 1 0 参照）。図 1 3 A は、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 に着脱可能に被せることが可能なルアープラグ 2 2 3 a、2 3 3 a を示している。また、図 1 0 B には、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 のメス型ルアーテーパに嵌合可能なオス型ルアーテーパを備えたルアープラグ 2 2 3 b、2 3 3 b を示した。

[0106] これらのルアープラグによれば、シリンジ 2 0 5 内の細胞懸濁液を培養空間 2 0 2 内に導入した後、シリンジ 2 0 5 を抜き取ったポート 2 2 2 及び／又はポート 2 3 2 を簡単に封止できる。なお、ルアープラグは未使用状態の細胞培養用モジュール 2 0 1 A のポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 に取り付けしておくことも可能である。また、使用中の細胞培養用モジュール 2 0 1 A においても、シリンジ 2 0 5 等の取り付けが不要の際には、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 に取り付けしておくことができる。

[0107] 図 9 では、ポート 2 2 2 及びポート 2 3 2 に接続される送流手段としてシリンジ 2 0 5 を例に説明したが、ルアーテーパによる同様の接続は、培地などの液体及び酸素などのガスを含む種々の流体を送流するためのチューブやポンプ、活栓などの種々の送流手段との間で行い得る。チューブやポンプを接続する場合には、ポート 2 2 2 又はポート 2 3 2 のメス型ルアーテーパに嵌合可能なオス型ルアーテーパを備えたルアーフィッティングを介して、ポート 2 2 2 又はポート 2 3 2 に接続する。また、活栓には、ポート 2 2 2 又はポート 2 3 2 のメス型ルアーテーパに嵌合可能なオス型ルアーテーパを備えたものを用いればよい。

[0108] ルアーテーパによる送流手段との接続により、細胞培養用モジュール 2 0 1 A では、硬化性樹脂などを用いて接続部を封止することなく、細胞懸濁液

や培地、ガスなどの流体を簡便に導入（又は排出）することが可能となった。

[0109] (4) 足場材料

次に、図 11 を参照して、足場材料 210 の構成を説明する。足場材料 210 は、中空糸膜 211a、211b (211) がメッシュ状に配置された中空糸膜メッシュ 212 と、繊維集合体 215 と、中空糸膜 213a、213b (213) がメッシュ状に配置された中空糸膜メッシュ 214 とが、この順に積層されている。

[0110] (4-1) 中空糸膜

中空糸膜メッシュ 212 を形成する中空糸膜 111 の膜基材ポリマー、外径、膜厚等については、第一実施形態で記載したとおりである。

[0111] 中空糸膜メッシュ 212 は、複数の中空糸膜を網目が形成するようにメッシュ状に配置したものである。中空糸膜メッシュ 212 の形態としては、例えば、複数の中空糸膜 211a (中空糸膜 211) を所定の間隔で平行に配置してシート状とし、それら中空糸膜 211a に対して直交する方向に沿って複数の中空糸膜 211b (中空糸膜 211) を所定の間隔で平行に配置してシート状とすることにより、メッシュ状とした形態が挙げられる (図 11A)。中空糸膜メッシュ 212 における中空糸膜 211 からなるシートの層数は特に制限されず、2~10 層が好ましい。この例では、シートは 2 層 (中空糸膜 211a からなる層と中空糸膜 211b からなる層) である。

[0112] 中空糸膜メッシュ 214 及び中空糸膜 213 は、中空糸膜メッシュ 212 及び中空糸膜 211 と同じものを用いることができ、好ましい形態も同じである。

[0113] 中空糸膜メッシュ 212、214 の形態は、中空糸膜を介する栄養や気体の供給、代謝老廃物の除去に応じて選択すればよく、足場材料 210 をモジュール化する際のポート部の設計にも依存する。足場材料 210 では、中空糸膜メッシュ 212 の中空糸膜 211a と中空糸膜メッシュ 214 の中空糸膜 213a は同一種類の中空糸膜であることが好ましい。同様に、中空糸膜

メッシュ 2 1 2 の中空糸膜 2 1 1 b と中空糸膜メッシュ 2 1 4 の中空糸膜 2 1 3 b は同一種類の中空糸膜であることが好ましい。このような形態とすることで、足場材料 2 1 0 をモジュール化する際に、例えば中空糸膜 2 1 1 a 及び中空糸膜 2 1 3 a を集結させて一つのポート部に繋いでガス供給用中空糸膜とし、中空糸膜 2 1 1 b 及び中空糸膜 2 1 3 b を集結させて他のポート部につないで培地供給用中空糸膜として用いることができる。

[0114] (4-2) 繊維集合体

繊維集合体 2 1 5 には、ナノファイバーの集合体が好適に用いられる。ナノファイバーの集合体の材質、分子量、直径、厚みについては、後述する。

[0115] 足場材料 2 1 0 は、以上説明した中空糸膜メッシュ 2 1 2 と中空糸膜メッシュ 2 1 4 との間に、繊維集合体 2 1 5 が配置された積層体を有する。このように、ナノファイバー層を中空糸膜メッシュ間に配置することにより、ナノファイバーを中空糸膜メッシュに強固に固定することができ、培養細胞への栄養やガスの供給や、細胞培養からの代謝老廃物の除去をより安定して行うことができる。

[0116] 細胞培養用モジュール 2 0 1 A では、上述のポート 2 2 2, 2 3 2 に、例えばチューブ等を接続することにより、栄養やガスの供給や、代謝老廃物の除去の行う経路として、中空糸膜メッシュ 2 1 2、2 1 4 の中空糸膜 2 1 1、2 1 3 以外の第 3 の経路を設けることができる。そのため、中空糸膜のみを用いて栄養やガスを供給したり、代謝老廃物を除去したりする場合に比べて、より多くの条件でかつそれらの条件を独立に制御しながらの細胞培養を、より簡便に行うことができる。

[0117] (5) 変形例

本実施形態では、基板 2 2 0 に通流口（ねじ穴 2 2 1 及びポート 2 2 2）を一つ、基板 2 3 0 に通流口（ねじ穴 2 3 1 及びポート 2 3 2）を一つ配設する例を説明した。本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、通流口は、1 つであってもよく、この場合には基板 2 2 0 及び基板 2 3 0 のいずれに配設されてもよい。また、本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、通

流口は3つ以上を配設してもよく、この場合には基板220及び基板230にそれぞれ1以上を配設すればよい。

[0118] また、本実施形態では、ねじ穴221、231とポート222、232によって通流口を構成する例を説明した。本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、通流口は、メス型ルアーテーパーを備え、対応するオス型ルアーテーパーを備えた送流手段と液密な接続可能な構成であればよい。通流口の他の形態としては、例えば、基板220、230に穿設される穴そのものを、メス型ルアーテーパーを有したものとした形態が挙げられる。

[0119] さらに、本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、足場材料210の中空糸膜メッシュと繊維集合体の積層数は特に限定されず、中空糸膜メッシュ、ナノファイバー層、中空糸膜メッシュ、ナノファイバー層、中空糸膜メッシュがこの順に積層された細胞培養足場材料であってもよく、これ以上の数が積層された細胞培養足場材料であってもよいものとする。

[0120] 7. 第五実施形態に係る細胞培養用モジュールにおける細胞培養方法

上述の細胞培養用モジュール201Aを用いた細胞培養方法について、図12を参照しながら説明する。

[0121] (1) 細胞導入手順

[手順1]

まず、細胞培養用モジュール201Aのポート222、232に細胞懸濁液の送液手段を接続する。図12中では図示を省略するが、送液手段には図9で説明したシリンジ(シリンジ205)を用いるものとして説明する。ただし、送液手段は、チューブやポンプなどであってもよい。

[0122] 本手順では、シリンジを2つ用意する。一方のシリンジは、シリンジ本体にプランジャを押し込んだ状態とし、ポート222に接続する。もう一方のシリンジは、シリンジ本体に細胞懸濁液を充填した状態で、ポート232に接続する。

[0123] ポート222、232とシリンジとの接続は、シリンジの先端部のオス型ルアーテーパーを、ポート222、232のメス型ルアーテーパーに差し込むこ

とによって液密に行うことができる。

[0124] [手順 2]

次に、ポート 2 3 2 に接続した細胞懸濁液が充填されたシリンジのプランジャを押し込み、細胞懸濁液を培養空間 2 0 2 内へ導入する（図 1 2 A 参照）。同時に、ポート 2 2 2 に接続したシリンジのプランジャを引いて、培養空間 2 0 2 内に導入された細胞懸濁液の少なくとも一部を培養空間 2 0 2 からシリンジ本体内部へ回収する。

[0125] これにより、培養空間 2 0 2 内には、ポート 2 3 2 側からポート 2 2 2 側へ細胞懸濁液の流れが形成される（図 1 2 A 矢印参照）。ここで先に説明したように、ポート 2 2 2、2 3 2 は、基板 2 2 0、2 3 0 において足場材料 2 1 0（具体的には繊維集合体 2 1 5）に対応する位置に配設されている。このため、培養空間 2 0 2 内に導入された細胞は、上記流れに運搬されて、繊維集合体 2 1 5 上に分散する。

[0126] さらに、細胞培養用モジュール 2 0 1 A では、ポート 2 2 2、2 3 2 は、足場材料 2 1 0（具体的には繊維集合体 2 1 5）の中心に対して対称（点対称）となる位置に配設されている。このため、ポート 1 3 2 側からポート 2 2 2 側へ向かう細胞懸濁液の流れを、培養空間 2 0 2 内全体に効果的に発生させることができ、該流れによって細胞を繊維集合体 2 1 5 上に効率よく分散させることが可能である。

[0127] [手順 3]

ポート 2 3 2 に接続されたシリンジの細胞懸濁液が全てあるいは大部分なくなったら、今度は、ポート 2 2 2 に接続したシリンジのプランジャを押し込み、シリンジ本体内部に回収されている細胞懸濁液を再度培養空間 2 0 2 内へ導入する（図 1 2 B 参照）。同時に、ポート 2 3 2 に接続されたシリンジのプランジャを引いて、培養空間 2 0 2 内に再導入された細胞懸濁液の少なくとも一部を培養空間 2 0 2 からシリンジ本体内部へ回収する。

[0128] これにより、培養空間 2 0 2 内には、ポート 2 2 2 側からポート 2 3 2 側へ細胞懸濁液の流れが形成され（図 1 2 B 矢印参照）、培養空間 2 0 2 内に

導入されて繊維集合体 2 1 5 上に分散された細胞が、上記流れに運搬されることによって繊維集合体 2 1 5 上においてさらに均一に分散される。

[0129] [手順 4]

ポート 2 2 2 に接続されたシリンジの細胞懸濁液が全てあるいは大部分なくなったら、必要に応じて、手順 2 と手順 3 を所望の回数繰り返す。手順 2 及び手順 3 において、それぞれポート 2 3 2 側からポート 2 2 2 側への流れ及びその逆方向の流れを交互に発生させることで、繊維集合体 2 1 5 上に細胞を万遍なく分散させることができる。

[0130] 手順 2 と手順 3 の繰り返し回数は、細胞の種類や懸濁液中の量（濃度）、目的とする培養密度などの条件によって適宜設定され得る。ただし、手順 4 は必須ではなく、上記条件によっては、手順 2、3 のみ（手順 4 なし）でも、細胞を繊維集合体 2 1 5 上に十分に均一に分散させられる場合もある。

[0131] [手順 5]

最後に、ポート 2 2 2 に接続されたシリンジ及びポート 2 3 2 に接続されたシリンジの両方のプランジャを押し込んで、細胞懸濁液を全て培養空間 2 0 2 内へ導入する。この際、培養空間 2 0 2 の容積を超過した液は、中空糸膜 2 1 1、2 1 3（図 1 1 参照）を通して排出される。

[0132] 以上の手順 1 ～ 5 により、細胞培養用モジュール 2 0 1 A 内に、具体的には繊維集合体 2 1 5 上に、細胞を偏在させることなく、均一性の高い濃度分布で細胞導入を行うことが可能となる。

[0133] (2) 培養手順

細胞の導入完了後、例えば中空糸膜 2 1 1 a 及び中空糸膜 2 1 3 a を集結させて一つのポート部に繋いでガス供給を行い、中空糸膜 2 1 1 b 及び中空糸膜 2 1 3 b を集結させて他のポート部につないで培地供給を行って細胞培養を行う。この際、細胞は細胞培養用モジュール 2 0 1 A 内に均一に導入されているため、細胞が偏在した場合に生じる、高密度部分での栄養・酸素の不足による増殖速度低下や細胞の変性・壊死などを防止できる。

[0134] 細胞培養は、具体的には、例えば中空糸膜 2 1 1 a、2 1 3 a としてガス

分離膜である中空糸膜、中空糸膜 2 1 1 b、2 1 3 b として物質選択透過性を有する中空糸膜を用い、中空糸膜 2 1 1 a、2 1 3 a の片端より酸素を含むガスを供給しつつ、他方の端部より該ガスを排出させる。また、中空糸膜 2 1 1 b、2 1 3 b の片端より培養細胞の栄養を供給し、他方の端部より該培養細胞の老廃物や代謝物を排出させる。これにより、排出される成分をオンラインで分析し、培養細胞を培養しながら連続的に培養細胞の生育状況を評価することも可能である。

[0135] また、培養細胞に、中空糸膜 2 1 1 b、2 1 3 b の片端より被験物質を投与し、老廃物や代謝物を含む溶液を中空糸膜 2 1 1 b、2 1 3 b の他方の端部より排出させ、この溶液を分析しモニタリングすることによって、被験物質を投与した場合の培養細胞が受けるストレスや培養細胞の状態を経時的に評価できる。

[0136] (3) 変形例

ここでは、基板 2 2 0 に通流口を一つ、基板 2 3 0 に通流口を一つ配設した細胞培養用モジュール 2 0 1 A を用いた細胞培養方法を説明した。本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、3 つ以上の通流口を配設する場合には、いずれか 2 つの通流口を選択し、細胞懸濁液を一方の通流口から導入し、他方の通流口から排出することで、図 1 2 で説明したような細胞懸濁液の流れを生じさせればよい。この場合、2 つの通流口は、足場材料 2 1 0 の中心に対して対称（点対称）の位置にあるものを選択することが好ましい。あるいは、一又は 2 以上の通流口を一つの群として通流口を 2 つの群に分け、一方の通流口群 A から細胞懸濁液を導入し、他方の通流口群 B から排出を行って、図 1 2 で説明したような細胞懸濁液の流れを生じさせてもよい。この場合においても、通流口群 A と通流口群 B は、足場材料 2 1 0（具体的には繊維集合体 2 1 5）の中心に対して対称（点対称）となるようにされることが好ましい。

[0137] 8. 第六実施形態に係る細胞培養用モジュール

(1) 概略構成

図13に、本発明の第六実施形態に係る細胞培養用モジュール201Bの構成を示す。細胞培養用モジュール201Bは、ねじ穴221及びポート222、並びにこれらから構成された通流口が基板230に配設されている点で、第五実施形態に係る細胞培養用モジュール201Aと異なっている。すなわち、細胞培養用モジュール201Aでは、2つの通流口が異なる基板220、220に設けられているのに対して（図8参照）、細胞培養用モジュール201Bでは、2つの通流口が同一の基板230に設けられている。細胞培養用モジュール201Bにおいても、2つの通流口は、足場材料210（具体的には後述する繊維集合体215）の中心に対して対称（ただし本実施形態では線対称）となる位置に配設されている。

[0138] 上記の通流口の構成以外の細胞培養用モジュール201Bの構成は、細胞培養用モジュール201Aと同じである。

[0139] （2）変形例

本実施形態では、基板230に通流口を2つ（ねじ穴221及びポート222、ねじ穴231及びポート232）配設している。本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、通流口は3つ以上を配設してもよく、この場合、通流口は基板220及び基板230のいずれに配設されてもよい。

[0140] 9. 第六実施形態に係る細胞培養用モジュールにおける細胞培養方法

（1）細胞導入手順

細胞培養用モジュール201Bを用いた細胞培養方法の細胞導入手順を図12に示す。細胞培養用モジュール201Bにおいても、上述の手順1～5に従ってポート232側からポート222側への流れ及びその逆方向の流れを交互に発生させることで、繊維集合体215上に細胞を万遍なく分散させ、均一性の高い濃度分布で導入できる。そして、これにより、細胞の増殖速度低下や変性・壊死を引き起こすことなく、培養を行うことが可能である。

[0141] （2）変形例

本発明に係る細胞培養用モジュールにおいて、3つ以上の通流口を配設する場合には、いずれか2つの通流口を選択し、細胞懸濁液を一方の通流口か

ら導入し、他方の通流口から排出することで、図12で説明したような細胞懸濁液の流れを生じさせればよい。あるいは、一又は2以上の通流口を一つの群として通流口を2つの群に分け、一方の通流口群Aから細胞懸濁液を導入し、他方の通流口群Bから排出を行って、図12で説明したような細胞懸濁液の流れを生じさせてもよい。この点は、第五実施形態に係る細胞培養用モジュールにおける細胞培養方法の項でも説明した通りである。

[0142] 10. 第七実施形態に係る細胞培養用モジュール

本発明は、中空糸膜と、平均直径250nm～950nmのナノファイバーからなる繊維集合体とが、配置された培養場を備える細胞培養用モジュールを提供する。ナノファイバーの平均直径は約300nm又は約600nmが好ましく、約600nmがより好ましい。

[0143] 中空糸膜は好ましくはメッシュ状に配置され、ナノファイバーの集合体からなるナノファイバー層が、これと接する状態で中空糸膜外表面上及び／又は前記中空糸膜間に2枚のカバー（平板）に挟まれて、液密に配置される。前記カバーのナノファイバー層に対応する位置には、培養細胞を注入する細胞注入口と、該細胞注入口以外の開口とが形成される。開口は、チューブの接続による栄養や空気の供給もしくは代謝老廃物の除去、又は顕微鏡の接続による培養状態の観察等に使用される。細胞注入口と開口は、必要に応じて顕微鏡、チューブ等の接続、注射針の刺し込み等が可能なシートによって密封される。

[0144] 本発明の細胞培養用モジュールでは、栄養やガスの供給や、代謝老廃物の除去の行う経路として、開口部にチューブ等を接続することができる。これにより、より多くの条件でかつそれらの条件を独立に制御しながらの細胞培養を、より簡便に行うことができる。

[0145] モジュールには、中空糸膜メッシュの中空糸膜の両端を集結させたものの開口部をポート部に繋げ、中空糸膜から排出された老廃物や代謝物等を外部機器に導入することで、オンラインでの分析が可能になる。

[0146] また、モジュール中で培養した培養細胞に、中空糸膜の片端より被験物質

を投与し、老廃物や代謝物を含む溶液を中空糸膜の他方の端部より排出させ、この溶液を分析しモニタリングすることによって、被験物質を投与した場合の培養細胞が受けるストレスや培養細胞の状態を経時的に評価することができる。この場合、被験物質の投与、及び老廃物や代謝物を含む溶液の排出を、開口部に接続したチューブ等によって行ってもよい。

[0147] 以上説明した本発明の細胞培養用モジュールは、2枚のカバーの間に細胞培養足場材料を配置し、液密に封入することで、培養領域を一定の領域に分画しているため、培養条件の制御が容易である。また、細胞培養足場材料を容器中の培養液に浸漬させるような形態のモジュールに比べ、モジュールをコンパクト化することができるため、複数のモジュールを並べて多検体、多条件の同時培養を行う場合でも培養スペースをより小さくすることができる。

[0148] 本発明の細胞培養用モジュールのカバーは、細胞注入口と該細胞注入口以外の開口を有し、それら細胞注入口と開口がシートで塞がれた形態である。そのため、カバーの開口にチューブ等を接続することにより、中空糸膜メッシュの中空糸膜以外の新たな経路を設けることができる。これにより培養細胞への経路が増えるため、より簡便な手法で、栄養やガスの供給や、代謝老廃物の除去の条件を多くでき、かつそれらの条件を独立に制御した細胞培養を行うことができる。また、培養細胞を注入する細胞注入口を独立して設けているため、モジュールの製造後に前記開口にチューブや顕微鏡等が接続された状態でも、モジュール内の細胞培養足場材料に容易に培養細胞を注入して接着できる。

[0149] また、細胞培養ディッシュやプレートを用いた通常の培養では、細胞培養ディッシュやプレート上での平面的な細胞培養しか行えないのに対し、本発明の細胞培養用モジュールは、ナノファイバー層を有する細胞培養足場材料を備えているため、培養細胞が該ナノファイバー層の内部にまで入り込んで三次元的に付着増殖できる。そのため、培養された細胞形態が生体内の形態に近く、医薬品、化学物質、化粧品等の物質の薬効試験、毒性試験、安全性

試験等において、より評価の信頼性の高い培養細胞が得られる。

[0150] 本発明の第七実施形態に係る細胞培養用モジュールの好ましい構成は、例えば、特開２００９－１００号公報、特開２０１０－１４８４９６号公報、特開２０１０－１４８４９７号公報、特開２０１１－２３９７５６号公報に記載されている。

[0151] １１．細胞培養用装置

本発明は、本発明の細胞培養用モジュールを含む（環流）細胞培養用装置も提供する。本発明の細胞培養用装置は、細胞培養用モジュールと、酸素供給手段と、培地供給手段とを含む。また、必要に応じて、モニター手段、分析手段、サンプリング手段等を含んでいてもよい。本発明の細胞培養用装置の一例を図１６に示す（以下、括弧内の数字は図１６の番号に対応する）。

[0152] （１）酸素供給手段

酸素供給手段は、前記中空糸膜を通じて細胞に酸素を供給するための手段であって、例えば、酸素を送り出すエアポンプ３０２、モジュール３０１への酸素供給回路を構成するチューブ３０３、必要以上の細かいゴミ（例えば、径 $0.22\mu\text{m}$ ）が中空糸膜中に入り込まないようにするためのフィルター３０４、保湿用水の貯留槽３０５の等を含むことができる。

[0153] （２）培地供給手段

培地供給手段は、例えば、供給する培地の貯液槽（培地ビン３０６）、培地を中空糸膜を通じて細胞に供給し、代謝老廃物を除去しつつ循環させるための培地供給（循環）用ポンプ３０７、培地供給（循環）回路としてのチューブ３０８を含む。

[0154] （３）サンプリング手段

サンプリング手段は、細胞培養用モジュール３０１から適宜培地を採取するための手段で、細胞培養用モジュール３０１に接続したサンプリングポート３０９、採取した培地の貯液槽等３１０を含む。

[0155] （４）その他

本発明の細胞培養用モジュールは、上記の手段のほか、サンプリングした

培地や循環する培地の成分、被験物質、代謝産物の濃度等を経時的にモニターする手段（モニター手段）や、分析する手段（分析手段）を含んでいてもよい。

[0156] 本発明の細胞培養モジュールは、細胞を、脱分化等を防いで、その機能を維持した状態で長期間培養することができる。

[0157] 本発明の細胞培養モジュールに用いられる細胞は特に限定されないが、接着性の動物細胞、例えばヒト胎児包皮線維芽細胞、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞、ニワトリ胎児線維芽細胞、シリアンハムスター新生児腎臓細胞などの線維芽細胞、ヒト子宮頸部癌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウス乳癌細胞、アフリカミドリザル腎細胞などの上皮細胞、血管内皮細胞などが挙げられる。特に、細胞の機能を維持したまま培養することが困難な細胞、例えば肝実質細胞、冠状動脈内皮細胞、ゴールデンハムターランゲルハンス島細胞群、ラット胸腺上皮細胞、ラット腎上皮細胞などの初代細胞の培養に好適である。

[0158] 本発明の細胞培養モジュールはまた、凍結細胞にも適用可能である。凍結細胞は一般に増殖速度の立ち上がりが遅く、機能を長期維持することが難しい。特に、肝細胞では数日で機能が大幅に低下してしまうことが知られている。本発明の細胞培養方法によれば、高い機能を維持したまま長期間培養することが可能である。

[0159] 培養に用いられる培地は、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。

実施例

[0160] 以下、実施例を示して本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の記載によっては限定されない。

[0161] [実施例1] ナノファイバー層からなる細胞培養足場材料を用いた細胞培養

1. 不織布の作成及び分析

1. 1 ナノファイバー層の作成

80℃恒温水槽にて加熱したジメチルアセトアミド（和光純薬工業）に重量比10%～15%ポリアクリロニトリル粉体を添加し、良く攪拌して完全に溶解させて、室温に放置して安定なポリアクリロニトリルのドープを作製した。さらに、ドープをディスポシリンジ（テルモ20ml、SS-20ESz）に充填し、ノズル（18G×11/2）を装着し、エレクトクロスピンニング装置（カテック社）に設置した。

[0162] 装置には、ターゲット（ロール）には銀紙を一周はりつけておく。電圧は12kVにて、シリンジのプランジャー押し出し速度0.03mm/min、ターゲット（ロール）との距離200mm、ターゲット回転速度1m/min、シリンジの左右反復移動（トラバース）速度 10cm/minで、紡糸時間120minで紡糸し、ナノファイバー層（不織布）を作製した。最後に銀紙毎不織布を剥がし、実験使用時には、銀紙からピンセットにて必要なシートで採取し、後述する細胞培養実験に使用した。

[0163] 1. 2 不織布の分析（ナノファイバーの単繊維の平均直径の分析）

不織布を、日本電子（株）製の走査型電子顕微鏡JSM-6060Aを用いて観察した。ナノファイバーの単繊維の直径は、得られたSEM写真を画像解析ソフト（（株）プラネترون製、Image-Pro Plus ver. 4.5.0.24）を用いて画像解析することによって求めた。SEM写真のスケールに対して、画像解析のスケールが合うように調整した後、SEM写真中の任意の20本のナノファイバーの表面の幅を求め、その平均値をナノファイバーの単繊維の直径（糸径）とした。以下、各糸径のナノファイバーにより作製された不織布を表1に示す番号（No. 1～6）を用いて記載する。

[0164] [表1]

不織布 No.	糸径
No. 1	170
No. 2	300
No. 3	500
No. 4	600
No. 5	1000
No. 6	1300

[0165] 2. 細胞培養実験

2. 1 材料及び使用機器

[使用機器]

(1) 細胞培養モジュール

細胞培養モジュールは、既報にしたがって作製した（特開2011-239756号公報）。モジュール内部には酸素供給用中空糸膜、及び培地の栄養供給用中空糸膜が配列され、中空糸膜の間に細胞付着用ナノファイバー不織布シートが仕込まれて密封されている。不織布に付着した細胞は、三次元培養の状態で培地ビン中の多量の培地とエアポンプから常に豊富な栄養と酸素が供給を受け増殖することができる。

[0166] (2) 細胞培養装置

以下の構成からなる環流細胞培養装置（図16）を用いた。

- ・ 培地循環用チューブポンプ（ペリスタポンプ）1台 流量8mL/hr、60mL/hr
- ・ エア供給用ポンプ1台 流量1.2L/hr、3L/hr（ポンプは、フィルター（ADVANTEC社 孔径0.2 μ m）により、吸引ガスを0.2 μ m以上のものが中空糸膜中に入り込まないようにしている。）
- ・ 瓶3本（培地ビン、エア廃棄用空ビン、吸気エアの保湿用水ビン）
- ・ エア用ライン、培地循環用ライン（いずれもシリコンチューブ）
- ・ サンプリングポート（培地を採取するためのポート）
- ・ チューブのジョイント（樹脂製）
- ・ 装置を載せるプレート

[0167] (3) その他

- ・ CO₂インキュベーター：ダイレクトインキュベーター（サーモ社）
- ・ エアポンプ：CHIKARA N α 1500（NISSO社）
- ・ 培地ポンプ：低流量対応 SJ-1211L型（TOTO社）
- ・ SEM：キーエンス社製

[0168] [細胞]

- ・ Hc細胞：正常ヒト胎児肝細胞（DSファーマバイオメディカル社より購

入)

- ・ ヒト凍結肝細胞：フランスBIOPREDIC International社販売の成人肝細胞 (Human Cryopreserved Hepatocytes, Bach:HEP187082を、国内のケー・エー・シー (株) より購入)

[0169] [培地]

- ・ H c 細胞用培地：GIBCO社 D-MEM/F-12・11330032 500mlにFetal Bovine Serum、Hyclone・10437028/必要培地量の10パーセントを添加し、さらに、ナカライテスク社製・炭酸水素ナトリウム、及び注射用ペニシリンGカリウム (明治製菓社製)及び硫酸ストレプトマイシン (明治製菓社)、Human-acidic FGF (コスモバイオ社) が添加したものを用了。
- ・ 凍結保存用培地：正常細胞用凍結保存液・R-055-50 (クラボウ社)
- ・ 成人肝細胞用培地：静置培養用培地 (Incubation medium) (BIOPREDIC社)
長期維持培養用培地 (Long-Term culture medium) (BIOPREDIC社)
細胞融解用培地 (Thawing medium) (BIOPREDIC社)
細胞播種用培地 (Seeding medium) (BIOPREDIC社)

[0170] [試薬・器具]

- ・ PBSバッファー (Invitrogen)
- ・ トリパンブルー：Trypan Blue solution・T8154 (20mL) (SIGMA)
- ・ トリプシン：Trypsin-EDTA (Cat : 27250-018, Lot : 1219490) (GIBCO BRL)
- ・ n - 酪酸ナトリウム (生化学実験用) (SIGMA)
- ・ ジクマロール (和光純薬社)
- ・ β グルクロニダーゼ / アリールスルファターゼ (ROCHE)
- ・ ベンジルオキシレゾルフィン (Molecular Probes)
- ・ レゾルフィン (Molecular Probes)
- ・ リファンピシン 生化学実験用 (和光純薬工業)
- ・ グルコース測定キット：グルコースCII-テストワコー・439-90901 (WAKO社)
- ・ 血球計算盤 (含カバーガラス)：ビルケルチュルク血球計算盤・A112 (富士理

科工業株式会社)

[0171] 2. 2 細胞培養

(1) Hc細胞由来肝芽細胞の静置培養による機能評価

1. 1の方法にしたがい、様々な糸径（平均直径）を有するナノファイバー不織布を調製した。各不織布に解凍した細胞を播種し、以下の方法で細胞の機能発現を分析した。

[0172] シャーレ(直径35mm)は足場のための不織布を底面に敷き、直径2mmシリコンチューブで底面に固定した。次に、予め37℃に温めておいた培地を15mL遠沈管に9mL分注しておき、フリーザーから細胞入りチューブを取り出し、恒温水槽で温めた。0.5分程度温めてから取り出し、ピペットで穏やかに攪拌して完全に解凍した。さらに、スウィング遠心機(1000G)で遠沈後、上澄みを除去し、ピペットで沈殿した細胞を培地に懸濁させた。トリパンブルーで染色し、位相差顕微鏡下、血球計算盤により細胞数をカウントし、懸濁培地中の細胞密度を推算した。

[0173] 細胞を培養に適した密度(104cells~105cells/2mL)に培地で希釈し、不織布を底面に固定したシャーレに2mLの培地懸濁液を添加して播種した。蓋をして、シャーレの底面の不織布上を培地が揺らぐようにやさしく前後・左右に数回ずつゆすり、細胞が均一に分散するようにした。そして、CO2インキュベーターに静置し培養を開始した。5時間~12時間後に培地を交換して、底面に接着しなかった細胞を培地毎除去し、CO2インキュベーターにて静置した。

[0174] 培地を2日~3日で交換し、培養7日目に、酪酸ナトリウムを1mM 添加した培地に交換し、さらに、8日目には、酪産ナトリウム1mMとチトクロム3 A 4 (CYP3A4) 酵素の誘導剤であるリファンブシン10μMを添加した培地に交換し14日目に、基質のベンジルオキシリゾルフィン添加して37℃30分反応させ、反応液をβ-グルクロニダーゼとアリールスルファターゼ酢酸緩衝液で処理し、沈殿物を取り除き、エタノール中に溶解した生成物のレゾルフィンを蛍光測定(励起550nm蛍光600nm)で定量した数値を酵素活性として、培養した細胞の機能を計測した。濃度の算出には、レゾルフィンを溶解させたエ

タノールにて作成した検量線を用いた。

[0175] (2) ヒト凍結肝細胞の静置培養による機能評価

細胞融解の方法としては、アンプルの融解まではH cの時と同様、DMSOを薄めるために、細胞融解用培地を使用(30ml)し、 $160\times g$ で1分間遠心し、細胞融解用培地のみを除いた。そして、播種用培地(1ml)で細胞を懸濁し、シャーレに播種して使用した。

[0176] (1)と同様に、35mmシャーレにN o. 2、N o. 4、N o. 6の不織布(対照：シャーレのみ)を敷き詰め、融解用培地にて、解凍した成人肝細胞を播種用培地に交換した後、105cells/シャーレで播種して培養した。このとき、静置培養用培地を2mL加え、播種直後の24hrで培地をリファンピシン $10\mu M$ 入りの培地と交換をして固着せず浮遊している細胞を取り除き、播種後毎日リファンピシン $10\mu M$ 入りの培地と交換した。細胞の機能は、上述のCYP3A4酵素の活性分析により比較した。

[0177] (3) H c細胞の静置培養による増殖速度評価

解凍した細胞を1.1にしたがって作製した不織布に播種し、細胞の増殖速度を分析した。

表1に記載した不織布N o. 1～N o. 6をそれぞれ底面に固定したシャーレにH c細胞(105cells)を播種し、不織布を35mm径シャーレの底面に敷き詰め、H c細胞を105cells/シャーレ播種した。このとき、H c細胞用培地を2mL加え、播種直後の5hrで培地交換をして固着せず浮遊している細胞を取り除き、培養3日、5日、7日以降毎日培地を交換した。細胞数は添加培地中のグルコースが経過日数辺りに減少した濃度を分析比較した。

[0178] (4) H c細胞由来肝芽細胞の還流培養による機能評価

還流培養にてH c細胞を増殖培養して、誘導・成熟化により、肝実質細胞にして長期維持培養を行い、細胞の機能を測定した。

[0179] 1) 細胞準備

H c細胞(胎児ヒト肝細胞)を解凍し、シャーレに播種し、シャーレにて細胞に増殖能があることを確認した。

[0180] 2) 培養の準備

ジョイントが接続されたライン及び、ビン、フィルターを銀紙で包装し、そのままオートクレーブ滅菌処理した。クリーンベンチ中で、包装をはずし、開発した細胞培養モジュールと接続して環流培養装置を組み立てた（図16）。

[0181] エタノール水を培地用のラインで循環運転してモジュール内を殺菌し、エタノール水を廃棄し、水で培地用のラインで循環運転して、エタノール水を完全に除去した。水を廃棄し、培地で培地用のラインで循環運転し、安定稼働を確認した。

[0182] 3) 環流細胞培養

C O₂インキュベーター中に装置を設置し、培地で循環運転し、装置の安定稼働を確認した。培地ビンの培地量は40mLで開始した。

[0183] ディスポシリンジ1mLにて、26針をシリコンゴムシート刺し、モジュール内部に、所定の細胞が分散した培地を注入した。モジュール中にはナノファイバー不織布に細胞を付着させて三次元培養にて細胞を増殖させた。その後、C O₂インキュベーターで環流培養を開始した。

[0184] サンプリングポートから培地をサンプリングして、グルコース濃度を分析し、グルコースの消費速度から、モジュール中の細胞数を推算して、経日変化をトレースした。また、細胞増殖の阻害因子であるアンモニアの増加も同様にトレースし、2mMを超えないところで培地を交換した。一回目の培地交換は最初9日間までに、50mg/dL以上のグルコースの消費が見られないときは、グルコース濃度と関係なく培地を交換した。培地のグルコース濃度が250mg/dL下回ったとき、及び、1日で50mg/dL以上のグルコースの消費速度のときに培地を新鮮な培地に交換した。細胞が増殖して、グルコース消費速度が向上したときは、培地交換の頻度に合わせ、必要に応じて培地ビン中の培地量を増加させた。

[0185] 細胞密度 1×10^8 cells/mL達成した段階で酪酸ナトリウム添加し、Hc細胞を肝芽細胞に誘導し、肝実質細胞に成熟させた。

[0186] 細胞の機能は、細胞にチトクロム 3 A 4 酵素を誘導し、与えた基質と反応速度との関係から定量的に評価した。具体的には、培地中に酪酸ナトリウムに加えて、さらに誘導剤のリファンプシンを添加して細胞中にチトクロム 3 A 4 酵素を誘導し、基質のベンジルオキシリゾルフィンを追加して 37℃30 分反応させた。反応液を β -グルクロニダーゼとアリールスルファターゼ酢酸緩衝液で処理し、沈殿物を除去した後、エタノール（特級、和光純薬工業）中に溶解した生成物のレゾルフィンを用いて蛍光測定（励起 550nm 蛍光 600nm）で定量した。この数値を酵素活性と定義して、培養した細胞の機能を計測した。濃度の算出には、レゾルフィンを溶解させたエタノールにて作成した検量線を用いた。

[0187] 培地中に酪酸ナトリウムをさらに添加し、肝芽細胞を維持培養し、上述した方法で細胞の機能を分析した。

[0188] 3. 結果

(1) Hc 細胞由来肝芽細胞の静置培養による機能評価

不織布 No. 1 ~ No. 6 を足場として Hc 細胞を培養したときの細胞におけるチトクロム 3 A 4 酵素活性を図 17（上）に示す。また、Hc 細胞から誘導した肝芽細胞を機能不織布 No. 1 ~ No. 6 を足場として維持培養したときのチトクロム 3 A 4 酵素活性を図 4（下）に示す。

[0189] 不織布 No. 2 と No. 4 を用いて培養した場合に、肝芽細胞は高い機能を発現していた（図 17）。一方、No. 5 の場合には肝芽細胞の機能は低かった（図 17 下）。なお、細胞密度（到達密度）は Hc 細胞から肝芽細胞への成熟化前後で差異はなかった。

[0190] また、図 18 に各不織布における細胞増殖状態を位相顕微鏡で観察した結果を示す。

No. 1（平均直径 約 170nm）では、不織布一面を細胞が覆い尽くして表面で多層化し、細胞形状も崩れていた。この結果は、細胞密度が高すぎると細胞機能（チトクロム 3 A 4 酵素活性）が低くなる可能性を示唆する。

[0191] No. 2（平均直径 約 300nm）では、不織布のほぐれた層断面において、

不織布内部で細胞が球状に成長し、微絨毛(小さい玉)の高い発達がみられた。これらは細胞の高い機能を示唆する。

[0192] N o. 3 (平均直径 約500nm) では、空隙が大きく、細胞はファイバーに沿って増殖しており、微絨毛が見られなかった。

[0193] N o. 4 (平均直径 約600nm) では、細胞は不織布の表面に増殖しており、細胞数個の集塊が確認された。不織布内部には細胞はあまり多くないが、不織内部の細胞はファイバーに囲まれ、微絨毛が発達していた。これらは細胞の高い機能を示唆する。

[0194] N o. 5 (平均直径 約1000nm) では、細胞は空隙の大きい所で増殖しており、ファイバーが密な所では増殖していなかった。少し潜り込んでいるのは、不織布表面の毛羽立ちの下の不織布の上に増殖していたためと考えられる。なお、細胞には微絨毛が見られなかった。これらは細胞の低い機能を示唆する。

[0195] N o. 6 (平均直径 約1300nm) では、細胞は不織布の内部多層でファイバーに絡んで高密度に増殖していた。細胞に微絨毛は見られなかった。この結果は、細胞密度が高すぎると細胞機能(チトクロム 3 A 4 酵素活性)が低くなる可能性を示唆する。

[0196] (2) ヒト凍結肝細胞の静置培養による機能評価

N o. 2、N o. 4、N o. 6の不織布(対照:シャーレのみ)を用いて培養したときの細胞におけるチトクロム 3 A 4 酵素活性を図19に示す。

ヒト凍結肝細胞を用いた場合にも、Hc細胞由来肝芽細胞と同様に、不織布N o. 2とN o. 4で細胞は高い機能を発現し、を有する不織布N o. 6やシャーレの場合には低い機能しか発現しなかった(図19)。

[0197] (3) Hc細胞の静置培養による増殖速度評価

N o. 2~N o. 6の不織布を用いて培養したときの細胞密度の経日変化を図20に示す。N o. 2~N o. 5の不織布に比較して、N o. 6の不織布では良好な増殖速度がみられ、このことから、糸径が $\phi 1000\text{nm}$ 以下の不織布では増殖速度は抑制されることが確認された。また、還流培養でもN o.

6の不織布のみ増殖速度が上がることを確認された（結果は示していない）。

[0198] (4) Hc細胞由来肝芽細胞の還流培養による機能維持

No. 2の不織布を足場とする細胞培養用モジュールにより、図16に示す装置を用いて環流培養を行ったときの、細胞密度の経日変化を図21に示す。本発明の細胞培養用モジュールを用いることで、環流培養によりHc細胞を細胞密度 2.5×10^8 cells/mLの高密度まで増殖させることが確認できた。

[0199] (5) ヒト凍結肝細胞の還流培養による機能維持

成人肝細胞は静置培養と同様に解凍し、播種用ポートからモジュール中に播種して、還流細胞培養を行った。長期維持用培地を用いて、培地交換頻度は、培養3日目までは培地量80mlで毎日培地交換、培養4日目からは100mlで毎日培地交換を行った。

[0200] ヒト凍結肝細胞を 4.8×10^6 cells/moduleで播種して、No. 2の不織布を足場とする細胞培養用モジュールにより、図16に示す装置を用いて環流培養を行ったときの、細胞密度の経日変化を図22に示す。本発明の細胞培養用モジュールを用いることで、環流培養により播種した細胞密度で33日間の長期維持培養できることが確認できた。

[0201] さらに、長期培養中に、ラインの溶存酸素濃度を分析したところ、図23に示すように初期の溶存酸素濃度6.6ppmが細胞の消費されることにより5.8ppmで安定維持できたまま、細胞を維持できていることが確認できた。

[0202] 4. 考察 本発明の細胞培養足場材料（ナノファイバー不織布）により、Hc細胞から高機能の肝実質細胞を得ることができた。また、用いる不織布の糸径（平均直径）が250-950nmの場合、高い機能発現を実現させることができた。

[0203] 本発明の細胞培養用モジュールを用いた装置により環流培養を行うことで、Hc細胞を高い機能（CYP3A4酵素活性）を示す肝芽細胞に分化誘導させ、これを長期間培養・維持できた。また、ヒト凍結肝細胞についても、本発明の細胞培養用モジュールを用いた装置により環流培養を行うことで、

高い機能を維持したまま長期間培養・維持できた。

産業上の利用可能性

[0204] 本発明によれば、細胞を本来の機能を維持したまま効率よく長期間培養することができる。よって、本発明は、医薬品、化学物質、化粧品等の物質の薬効、毒性、安全性評価のための、動物実験に代替する細胞培養評価系の構築に有用である。

[0205] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

符号の説明

[0206] 101A、101B、101C、101D：細胞培養用モジュール、110：培養場、111、111a、111b、113、113a、113b：中空糸膜、112、114：中空糸膜メッシュ、115：足場材料、102：内部空間、120、130：基板、131：開口、132：ネジ溝、133：係合穴、140：型枠、150：蓋体（キャップ）、151：ネジ山、152：封止部材、153：通流口、154：ポート、155：係合ツメ、161：ネジ、162：ネジ穴、163：留め具、164：凹部

201A、201B：細胞培養用モジュール、210：足場材料、211、211a、211b、213、213a、213b：中空糸膜、212、214：中空糸膜メッシュ、215：繊維集合体、202：培養空間（培養領域）、220、230：基板、221、231：ねじ穴、222、232：ポート、223a、223b、233a、233b：ルアープラグ、240：型枠、250：シリンジ、251：先端部、252：シリンジ本体、253：プランジャ

301：細胞培養用モジュール、302：エアポンプ、303：酸素供給回路を構成するチューブ、304：フィルター、305：保湿用水の貯留槽、306：培地の貯液槽、307：培地供給（循環）用ポンプ、308：培地供給（循環）回路としてのチューブ、309：サンプリングポート、310：採取した培地の貯液槽等

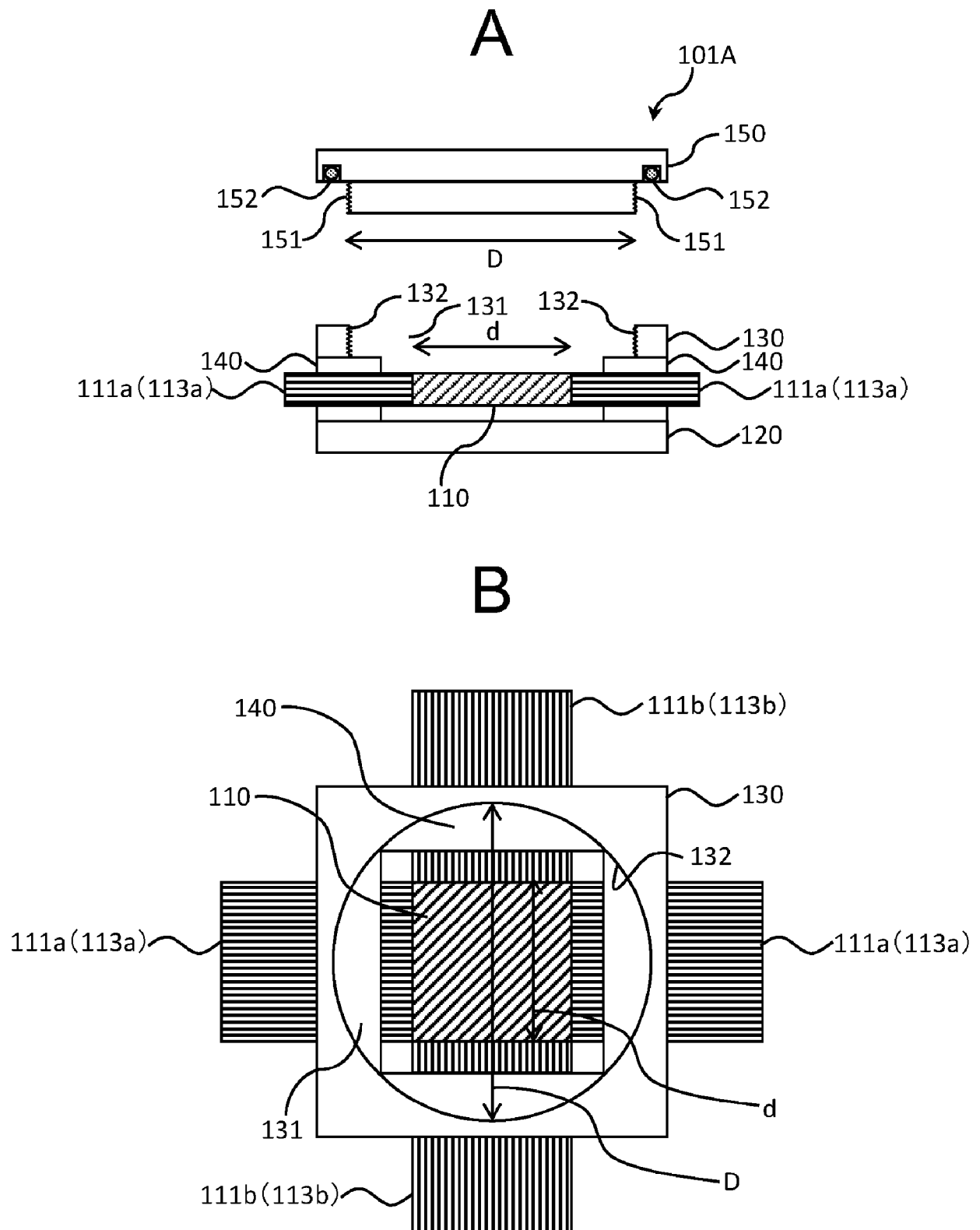
請求の範囲

- [請求項1] 中空糸膜が配置された培養場と、
該培養場を含む内部空間を構成する枠体と、
取り外し可能な蓋体と、
を備え、
該蓋体に取り付けられる開口が、前記培養場全体を露出可能な大きさで設けられている細胞培養用モジュール。
- [請求項2] 前記蓋体及び／又は枠体が、外部から前記内部空間へ又は前記内部空間から外部へ流体を通流させる通流口を有する請求項1に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項3] 前記通流口が、外部から前記内部空間へ向かって縮径するメス型ルアーテーパを有する請求項1又は2に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項4] 複数の通流口が設けられている請求項3記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項5] 2枚の基板と、
該基板の間に形成された培養領域内に中空糸膜が配置された培養場と、
、
前記培養領域の外部から内部へ又は内部から外部へ流体を通流させる複数の通流口と、を有し、前記通流口は、前記基板の前記培養場に対応する位置に配設され、かつ、前記培養領域の外部から内部へ向かって縮径するメス型ルアーテーパを備える細胞培養用モジュール。
- [請求項6] 複数の通流口が、異なる基板に設けられている請求項5に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項7] 通流口が、培養場の中心に対して対称に設けられている請求項4又は6記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項8] 繊維集合体が、中空糸膜から分離可能に配置されている請求項1～7のいずれか1項に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項9] 繊維集合体がナノファイバーからなる請求項8に記載の細胞培養用

モジュール。

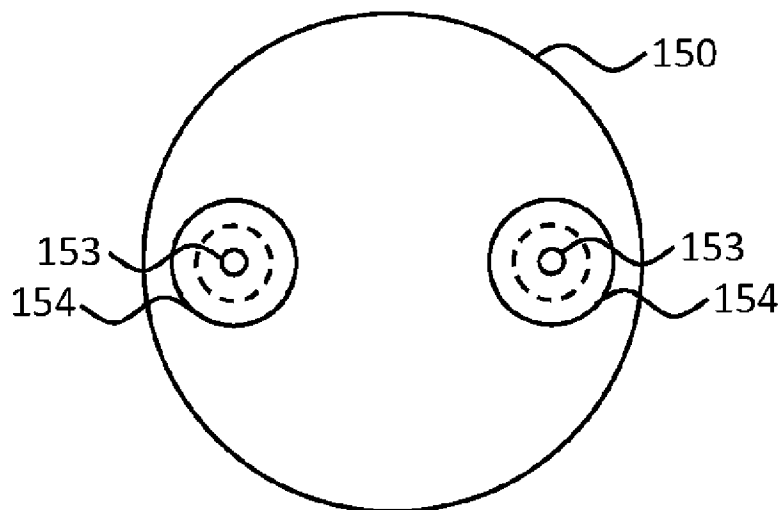
- [請求項10] 繊維集合体が、平均直径250nm～950nmのナノファイバーからなる請求項9に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項11] 中空糸膜と、
平均直径250nm～950nmのナノファイバーからなる繊維集合体とが、配置された培養場を備える細胞培養用モジュール。
- [請求項12] 中空糸膜が、ガス供給用中空糸膜及び培地供給用中空糸膜を含む請求項1～11のいずれか1項に記載の細胞培養用モジュール。
- [請求項13] 請求項1～12のいずれか1項に記載の細胞培養用モジュールと、酸素供給手段と、培地供給手段とを含む、細胞培養用装置。
- [請求項14] さらに、モニター手段、分析手段、及びサンプリング手段から選ばれるいずれか1又は2以上の手段を含む、請求項13に記載の細胞培養用装置。

[図1]

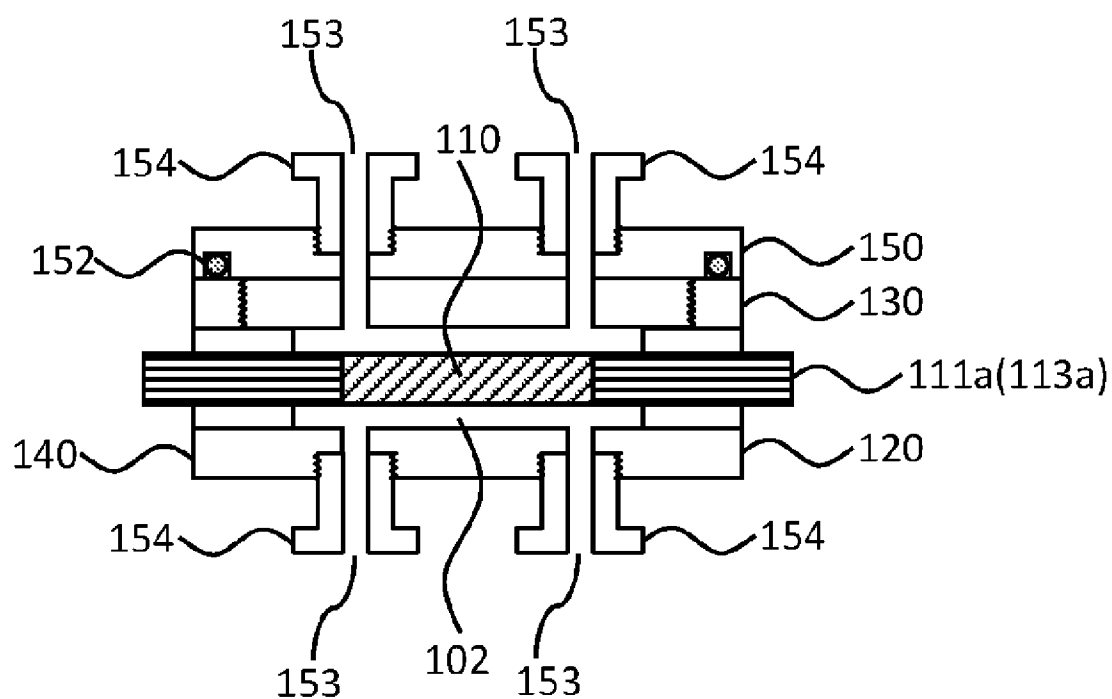


[図2]

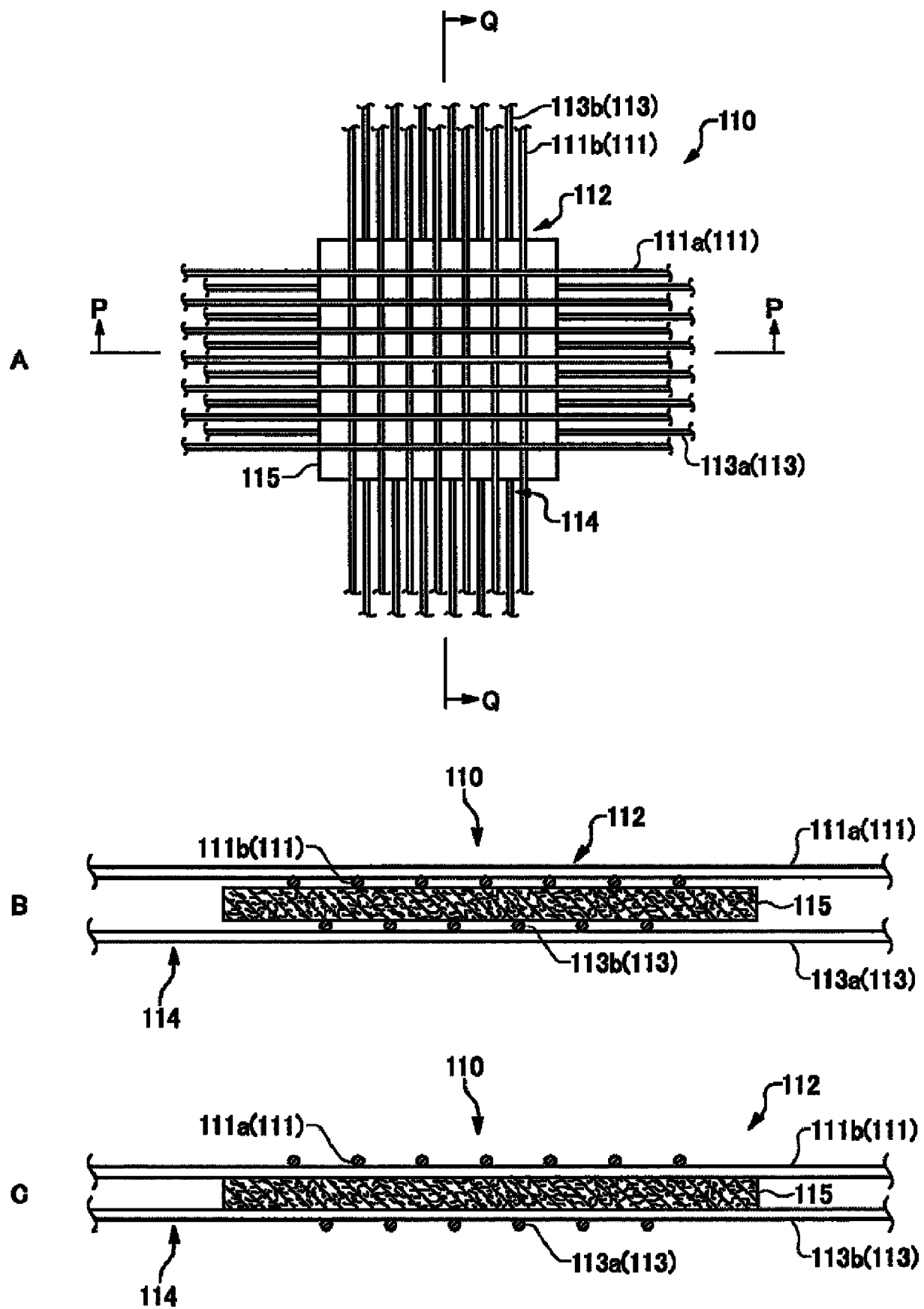
A



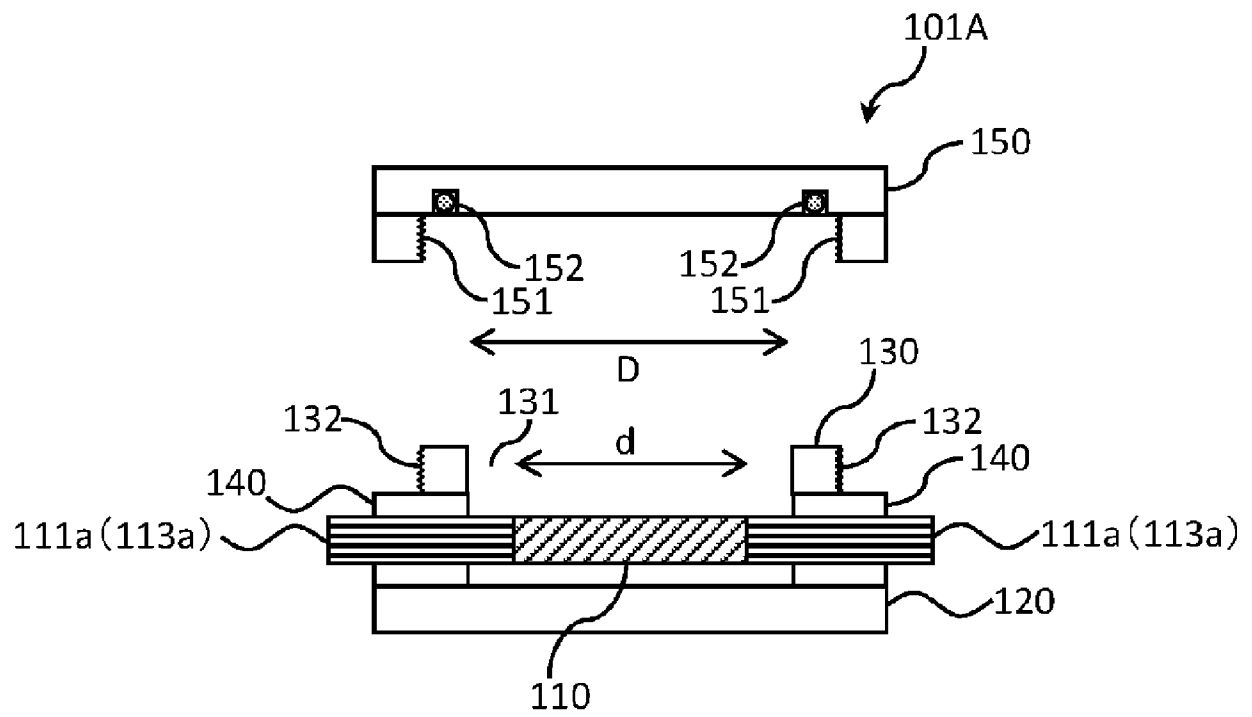
B



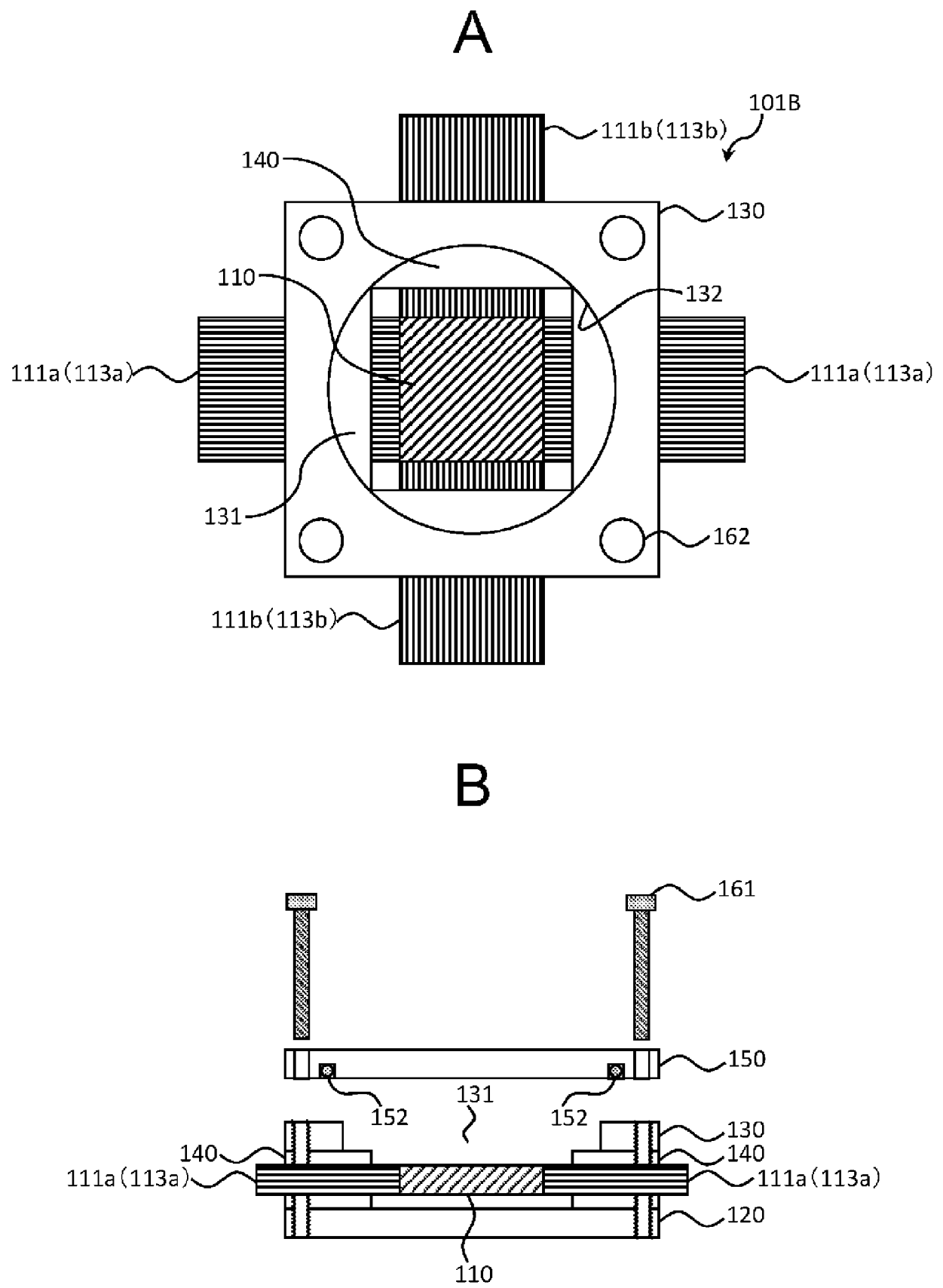
[図3]



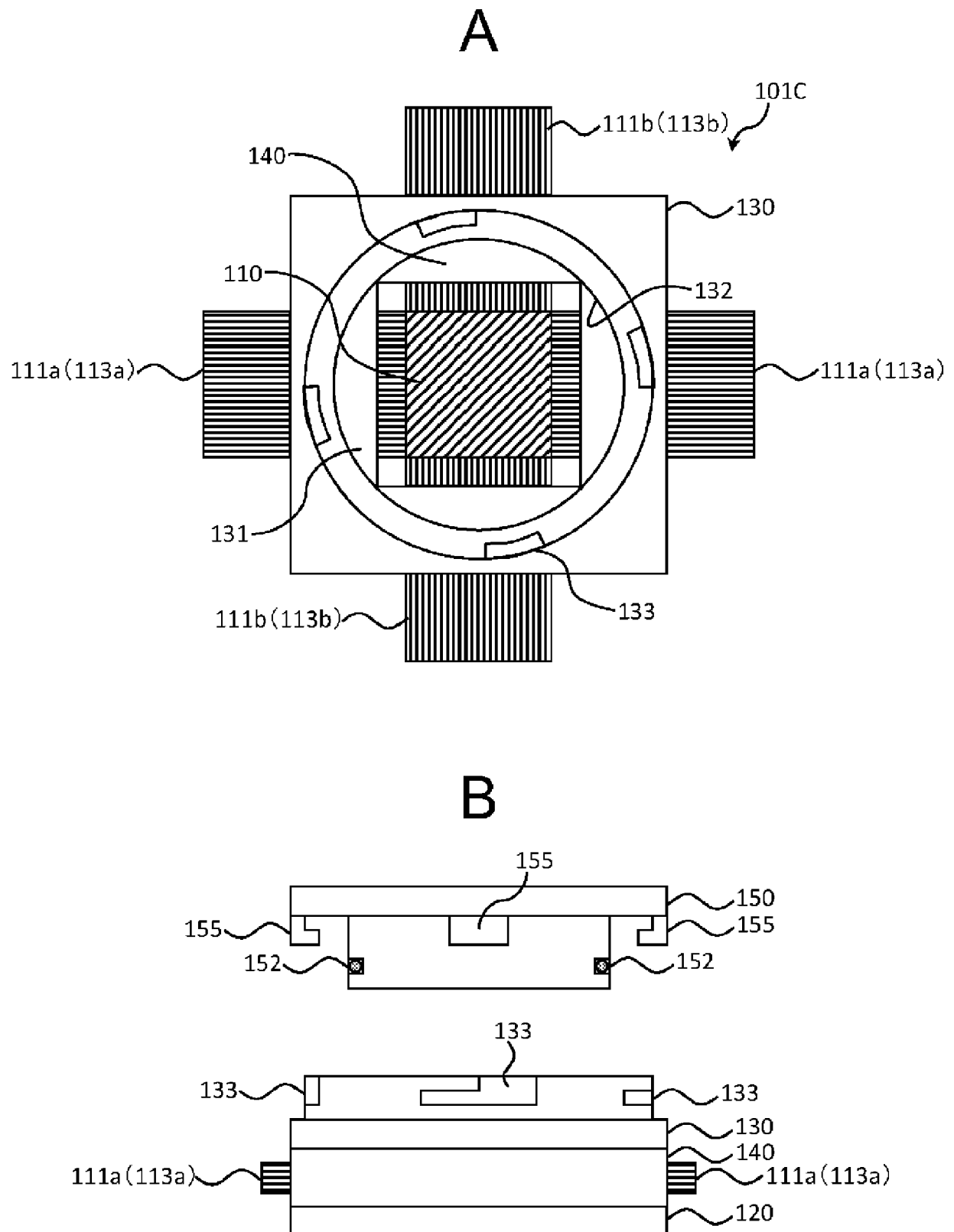
[図4]



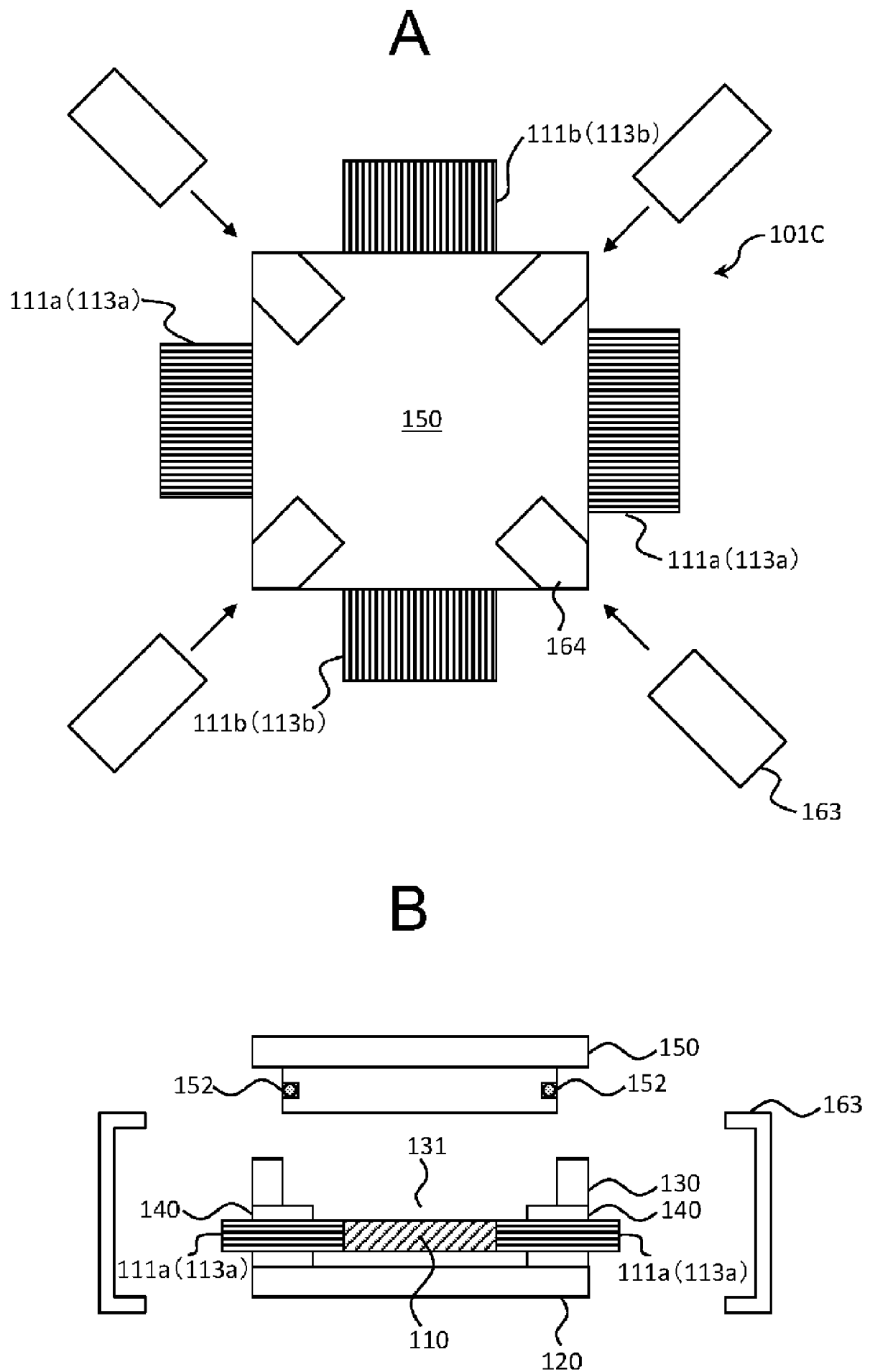
[図6]



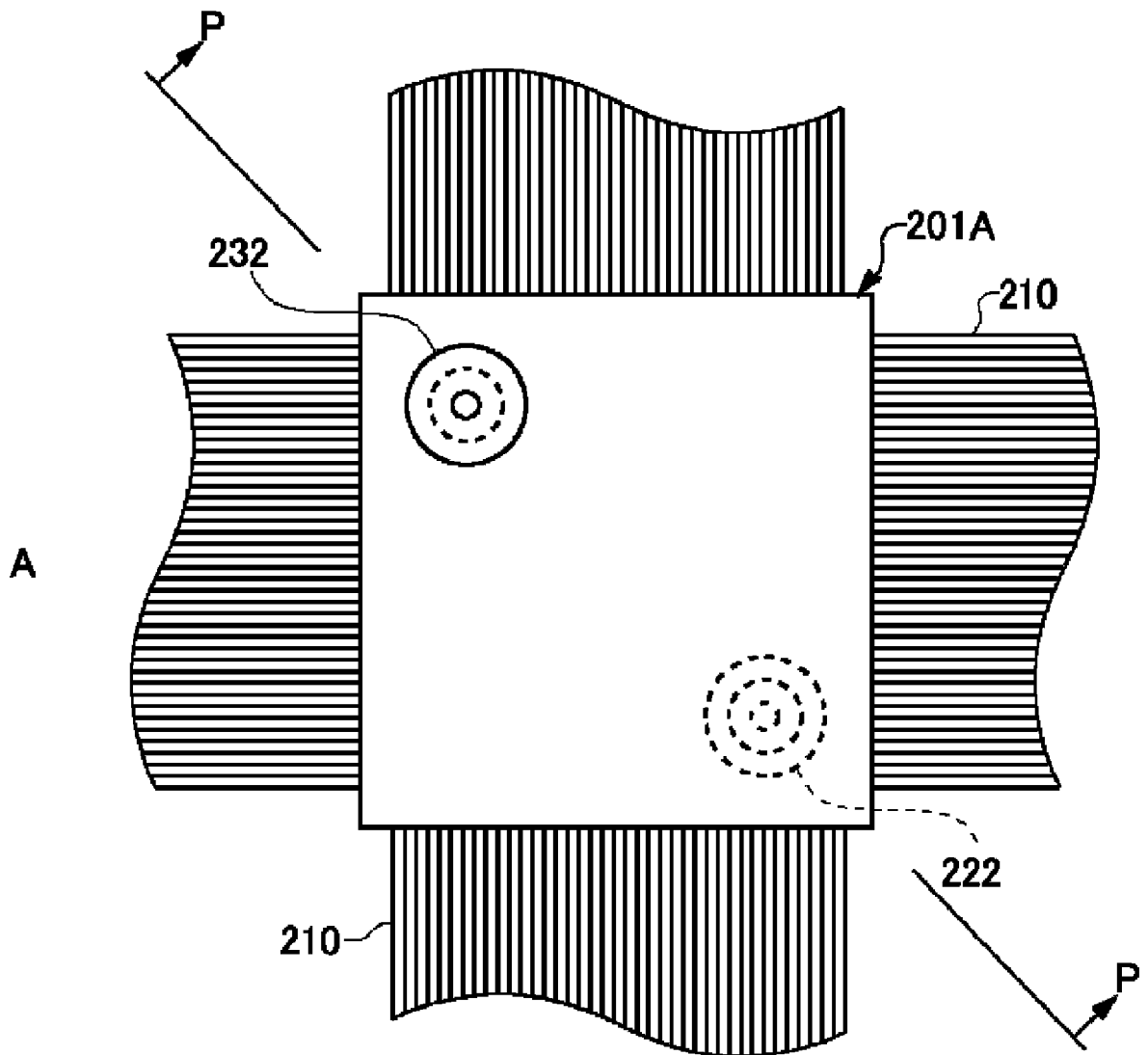
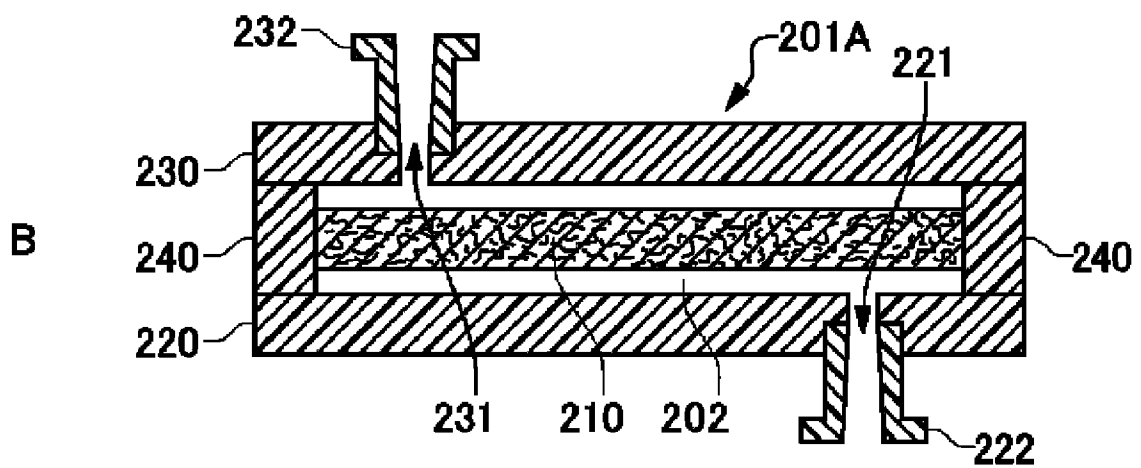
[図7]



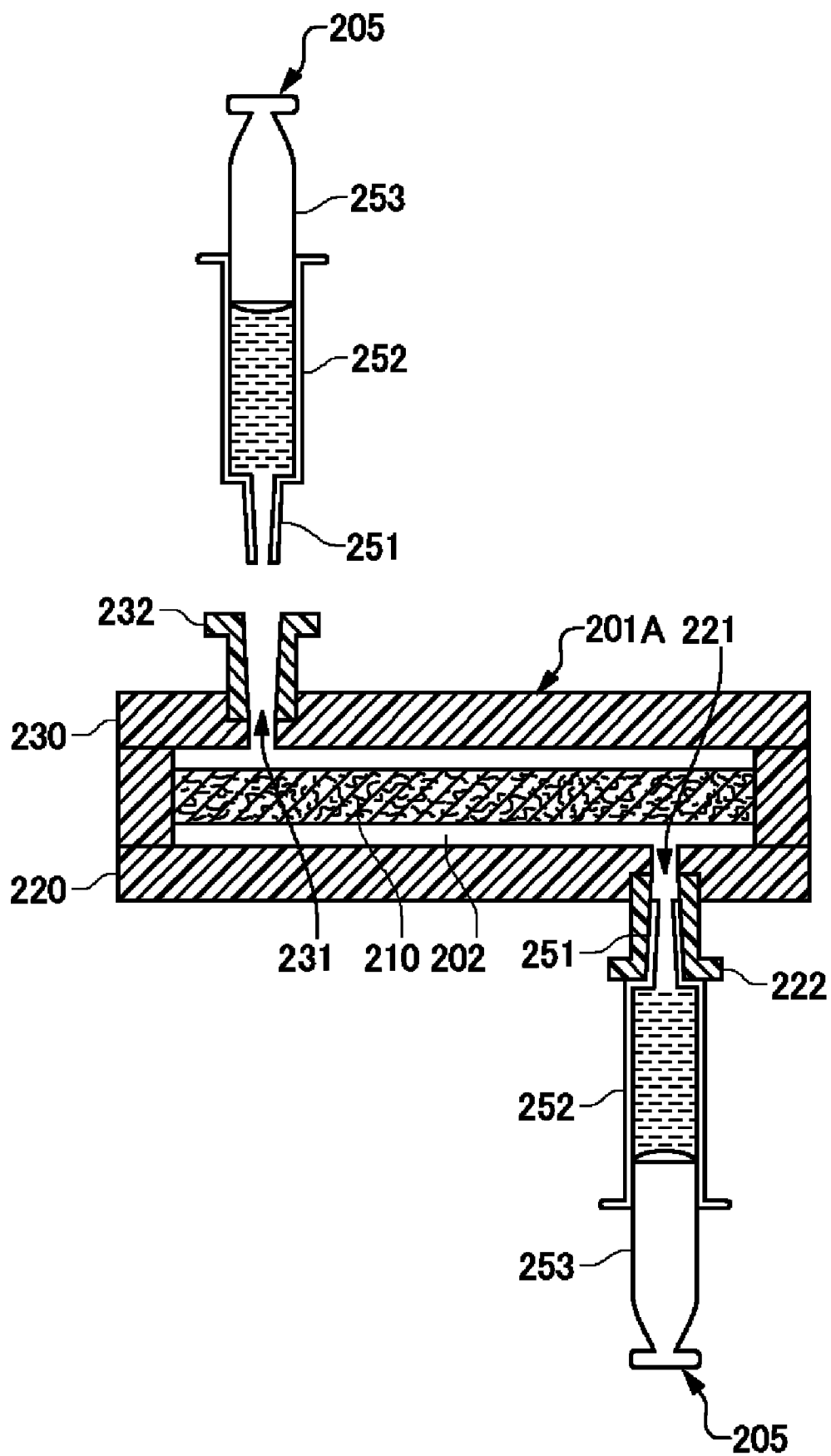
[図8]



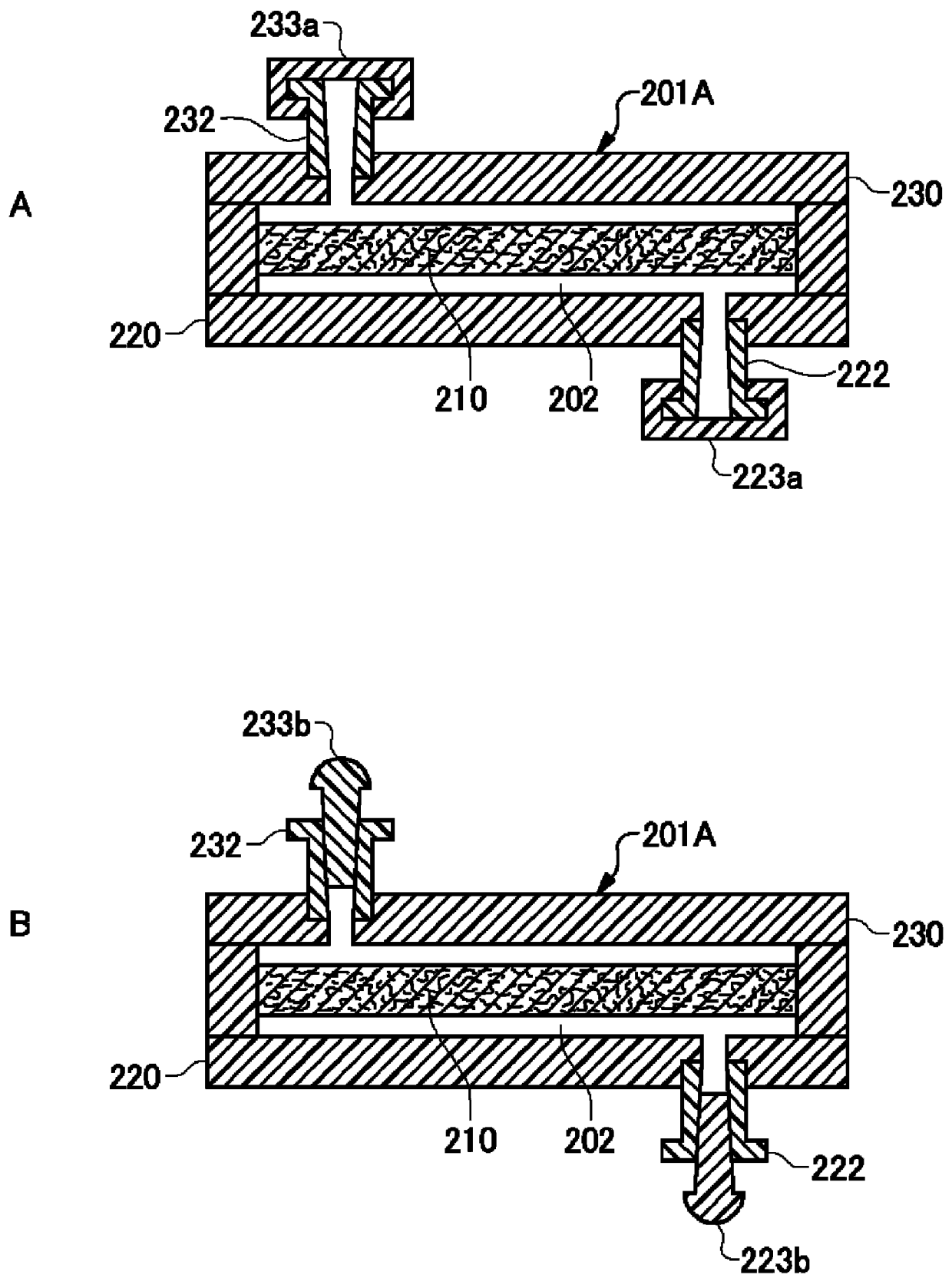
[図9]



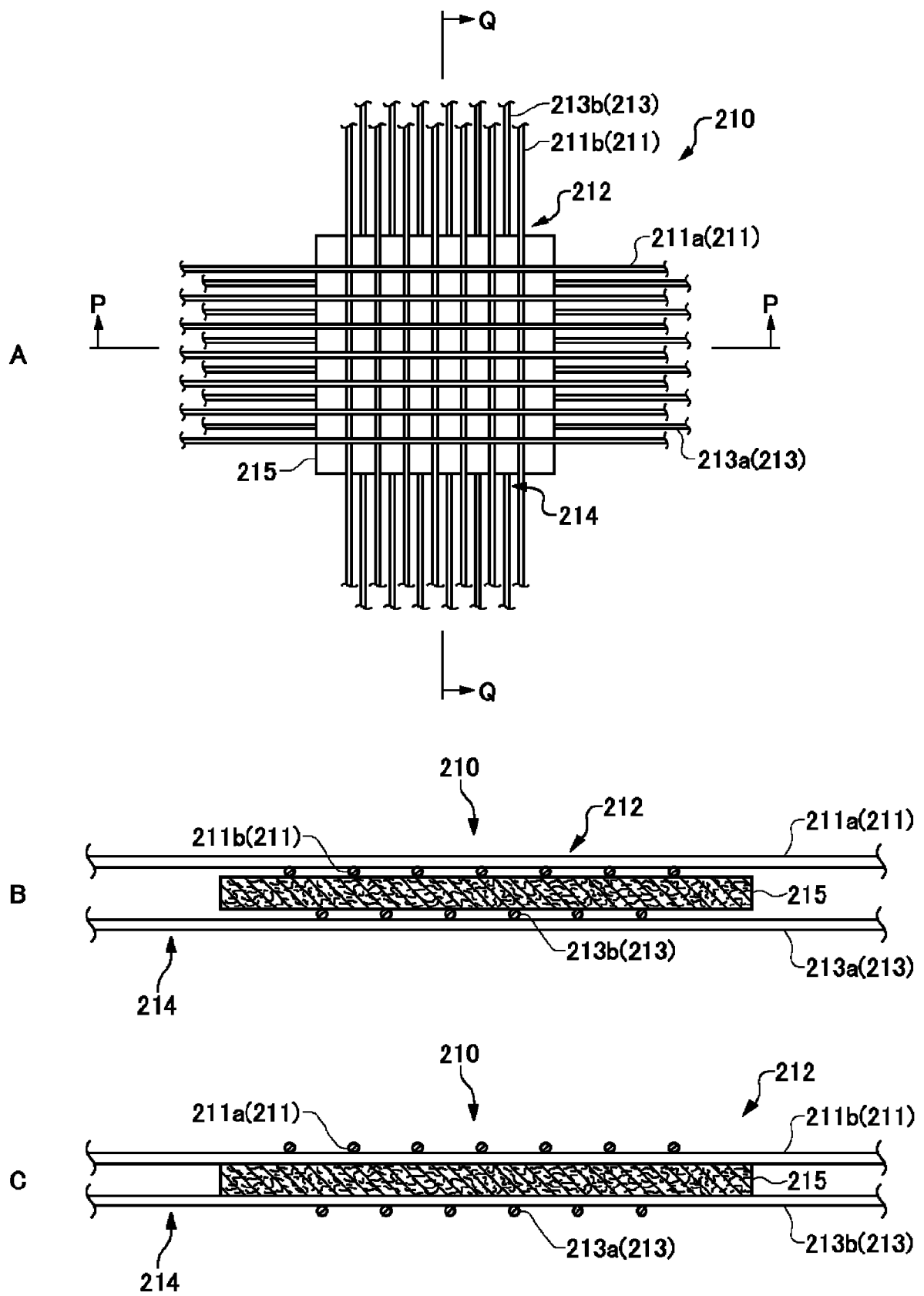
[図10]



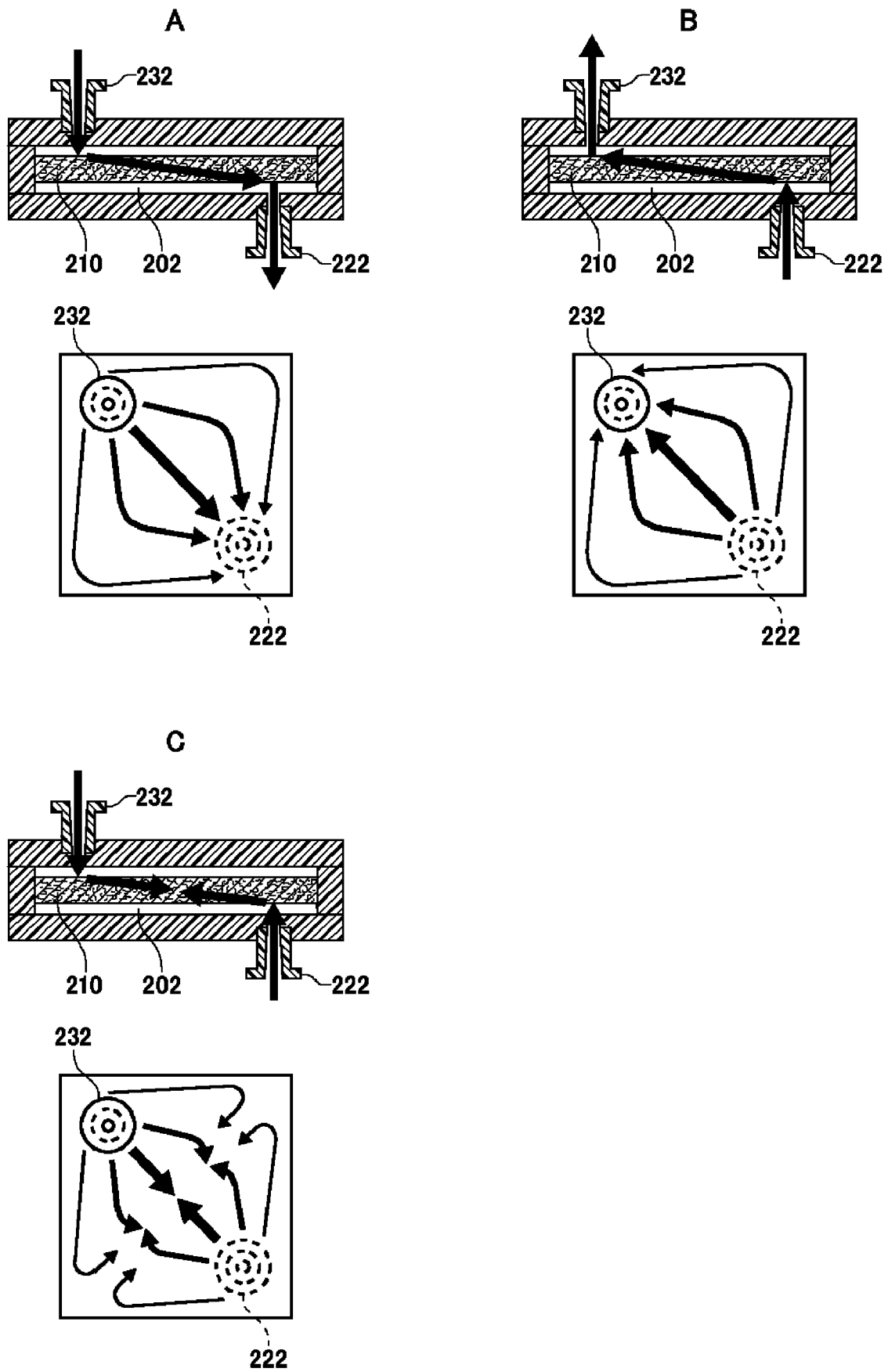
[図11]



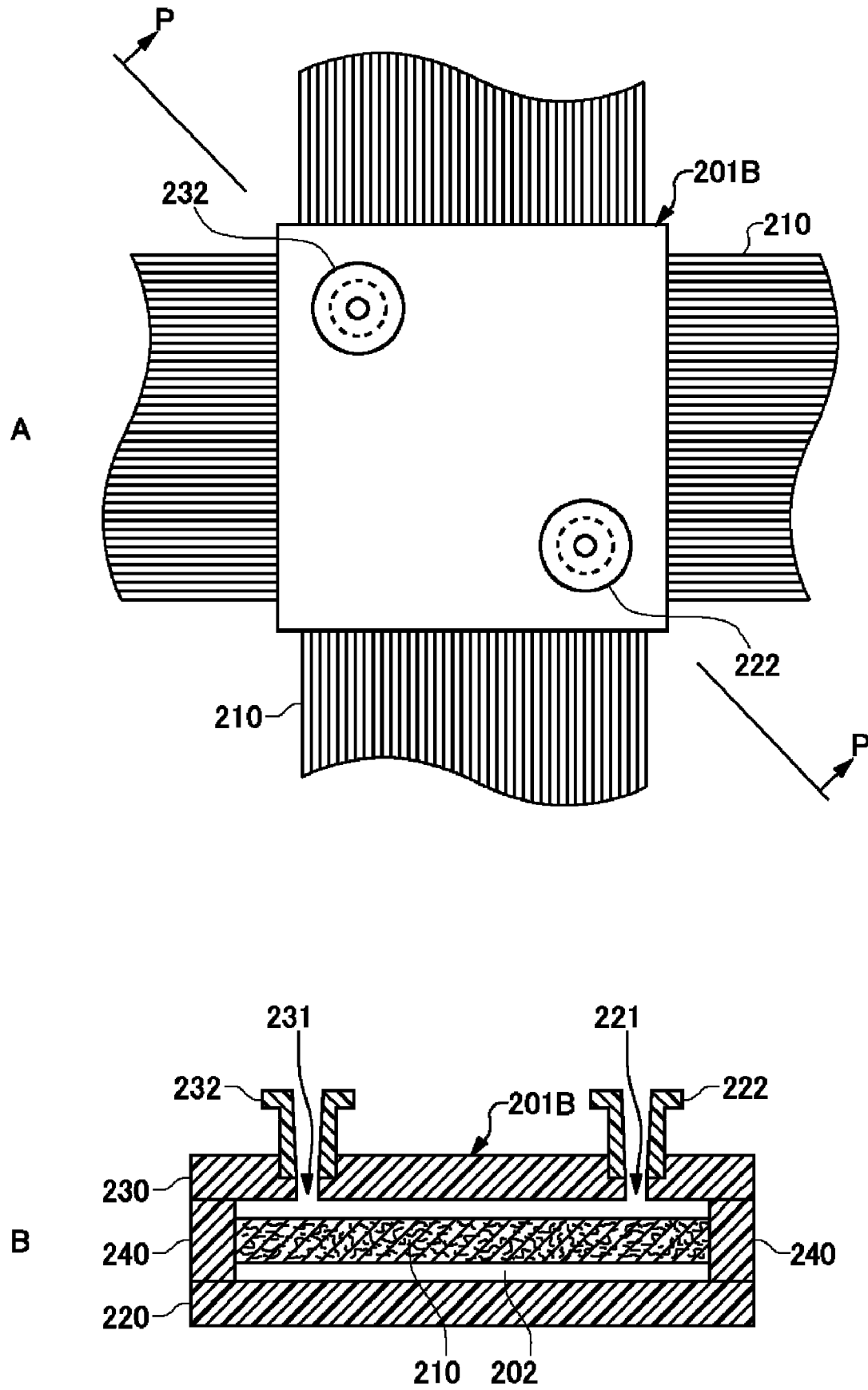
[図12]



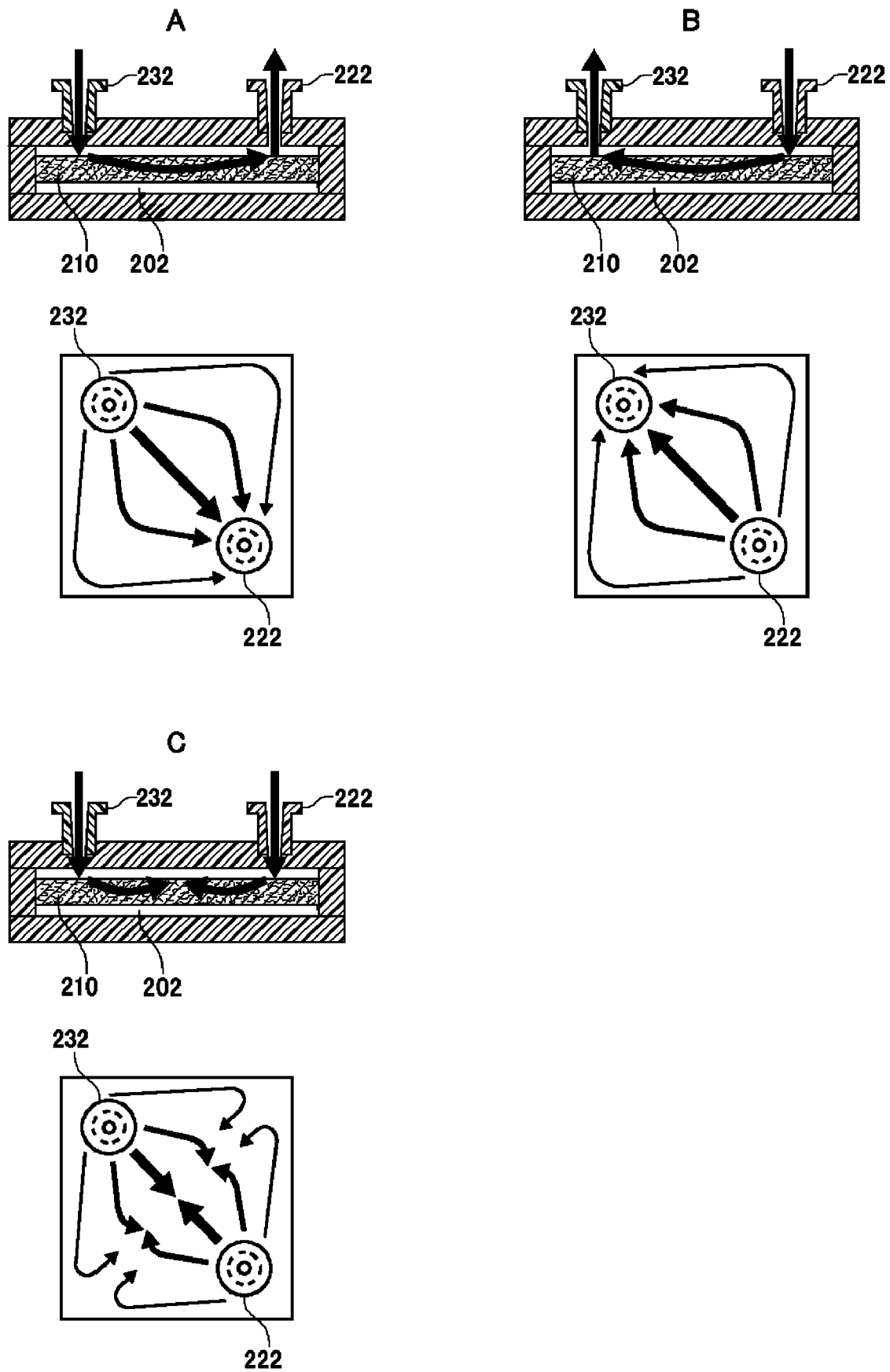
[図13]



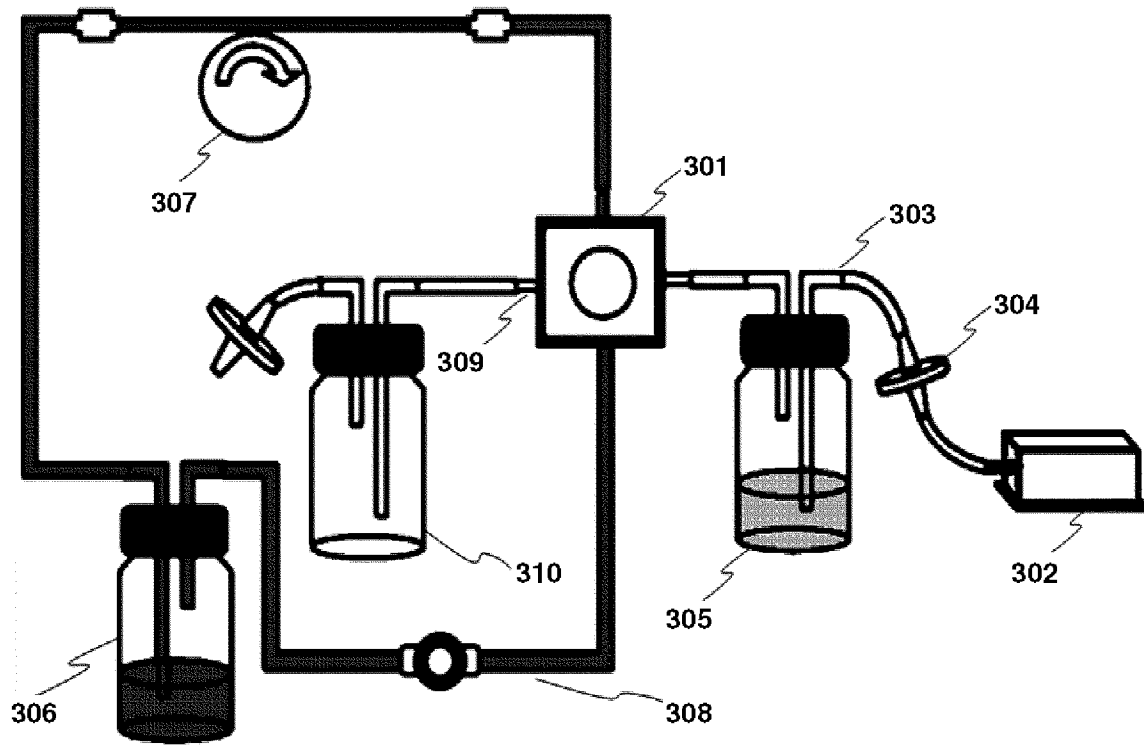
[図14]



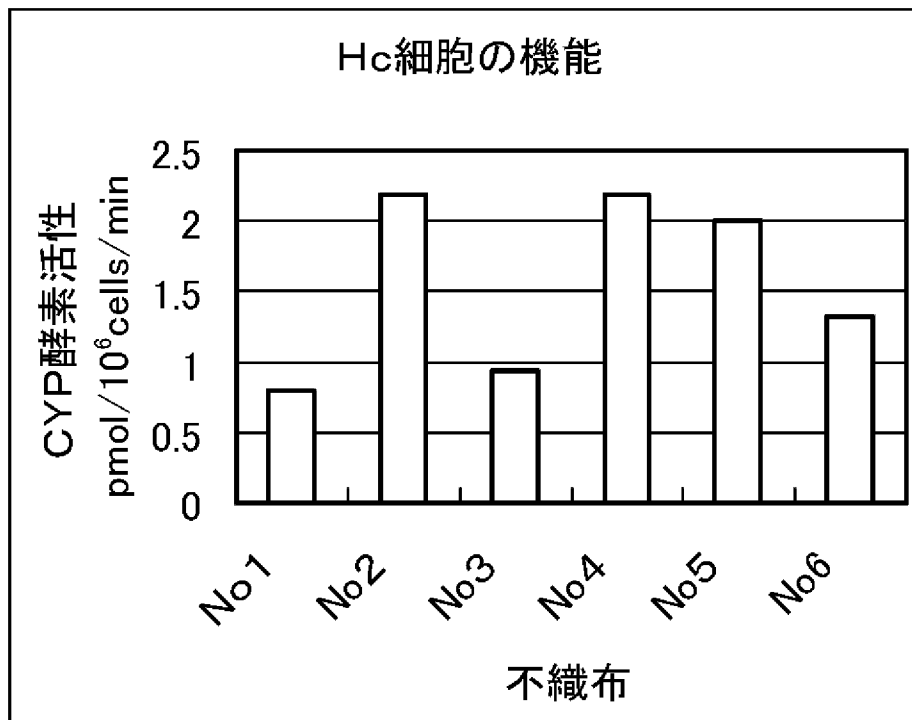
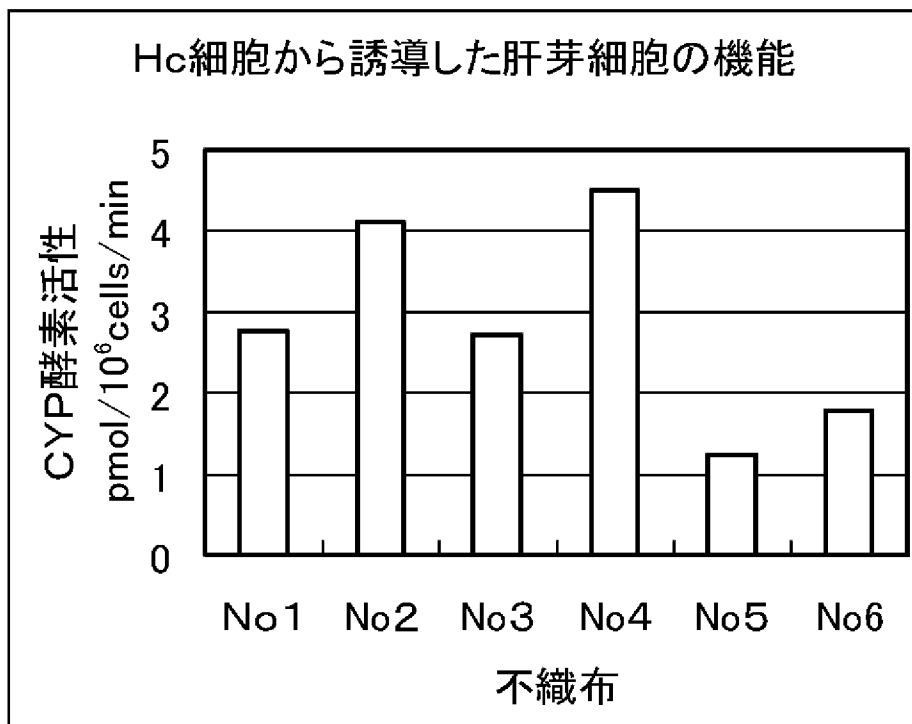
[図15]



[図16]



[図17]

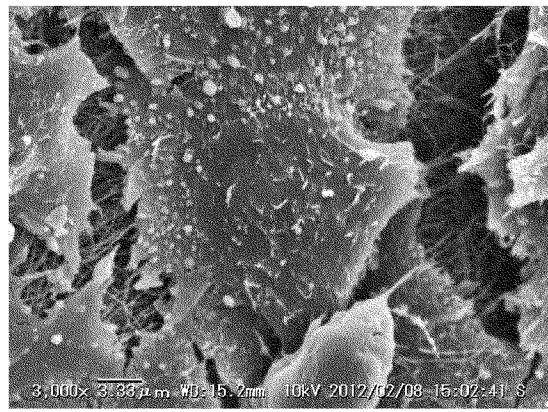


[図18A]

No. 1

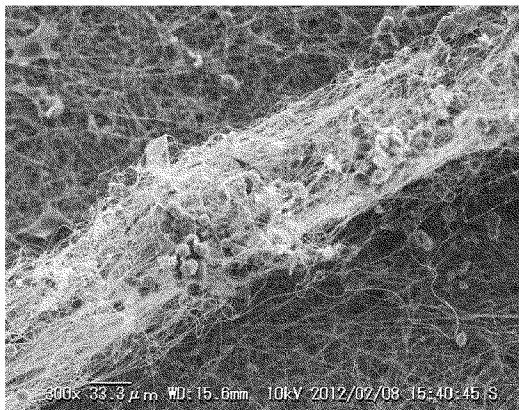


(×300)

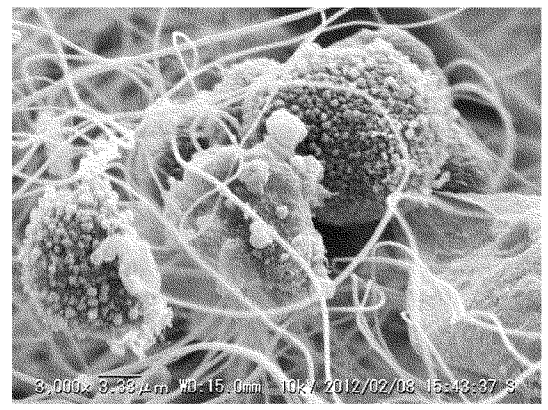


(×3000)

No. 2

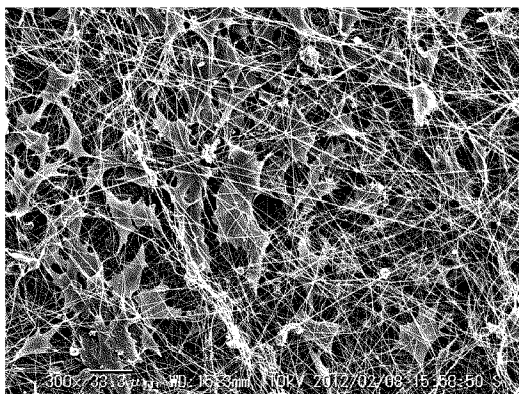


(×300)

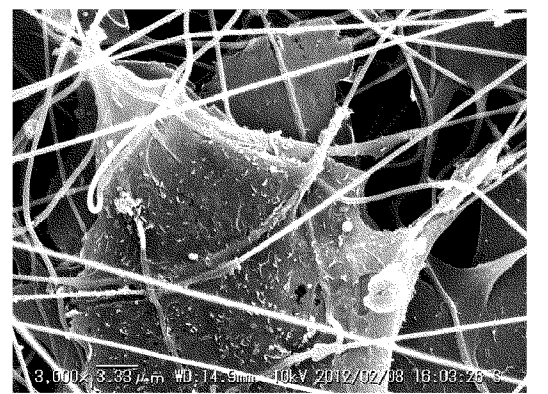


(×3000)

No. 3



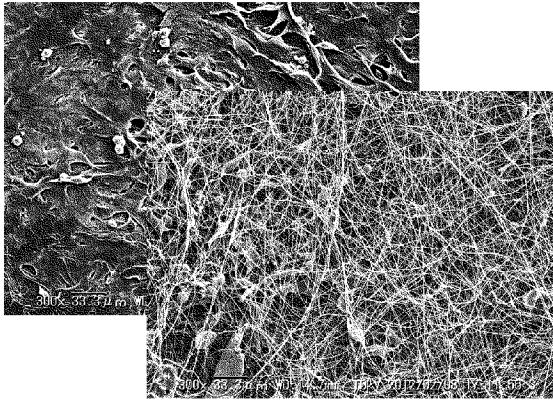
(×300)



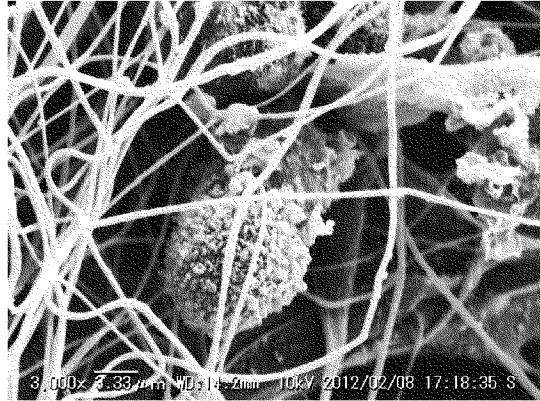
(×3000)

[図18B]

No. 4

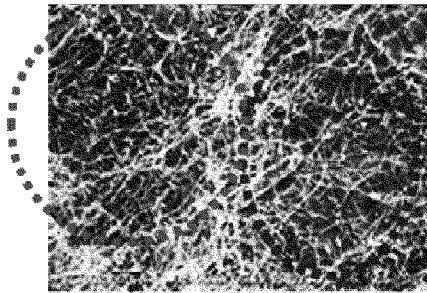


(× 300)

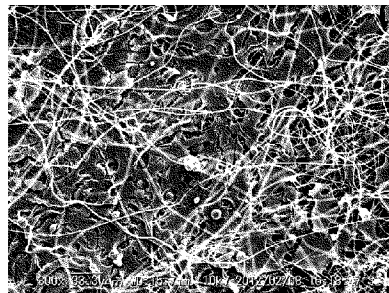


(× 3000)

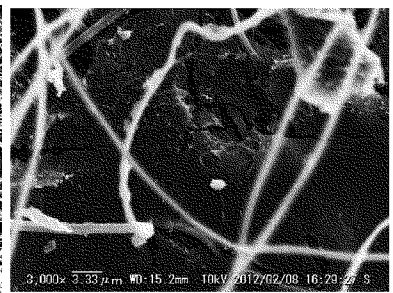
No. 5



(× 150)

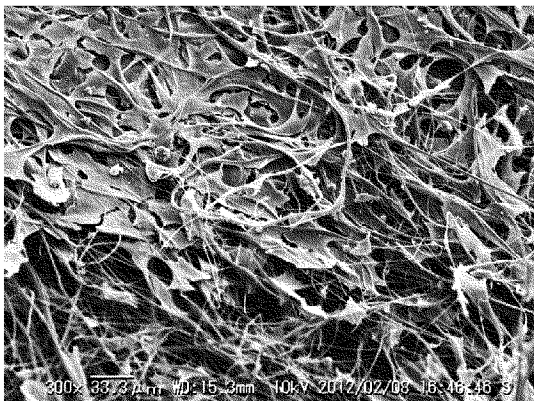


(× 300)

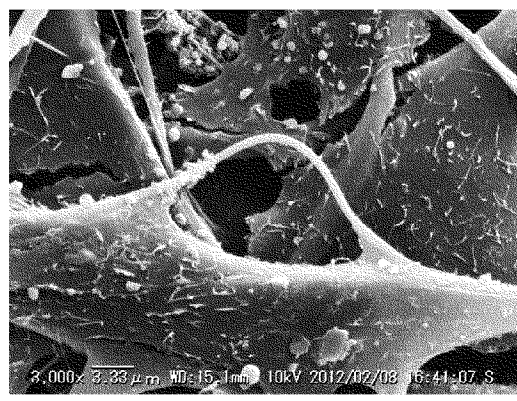


(× 3000)

No. 6

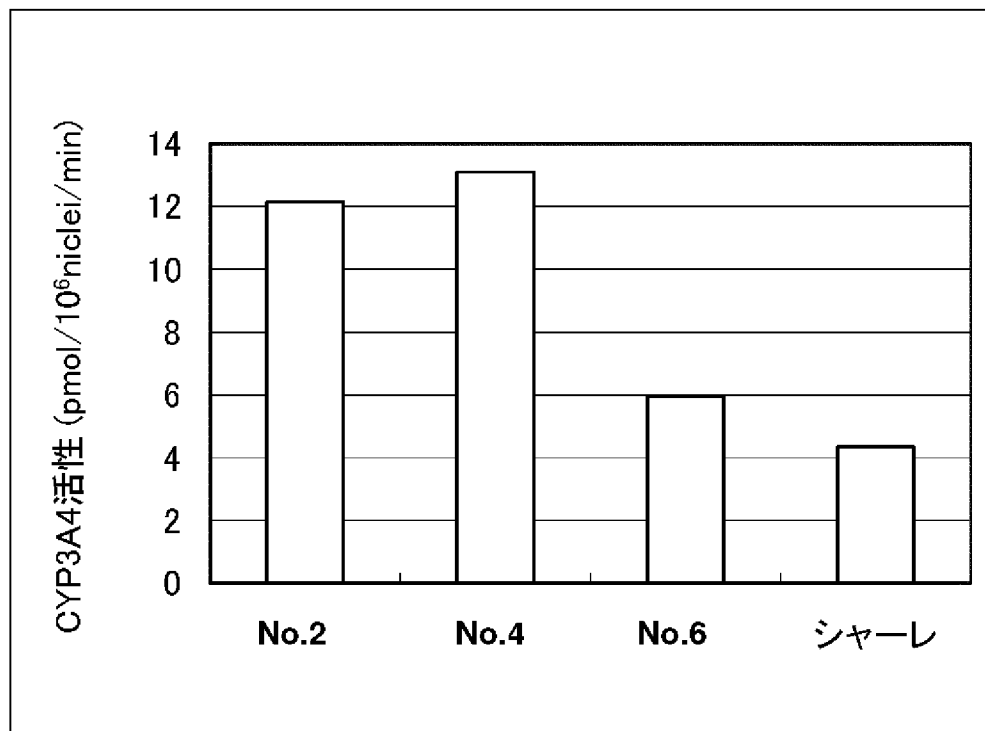


(× 300)

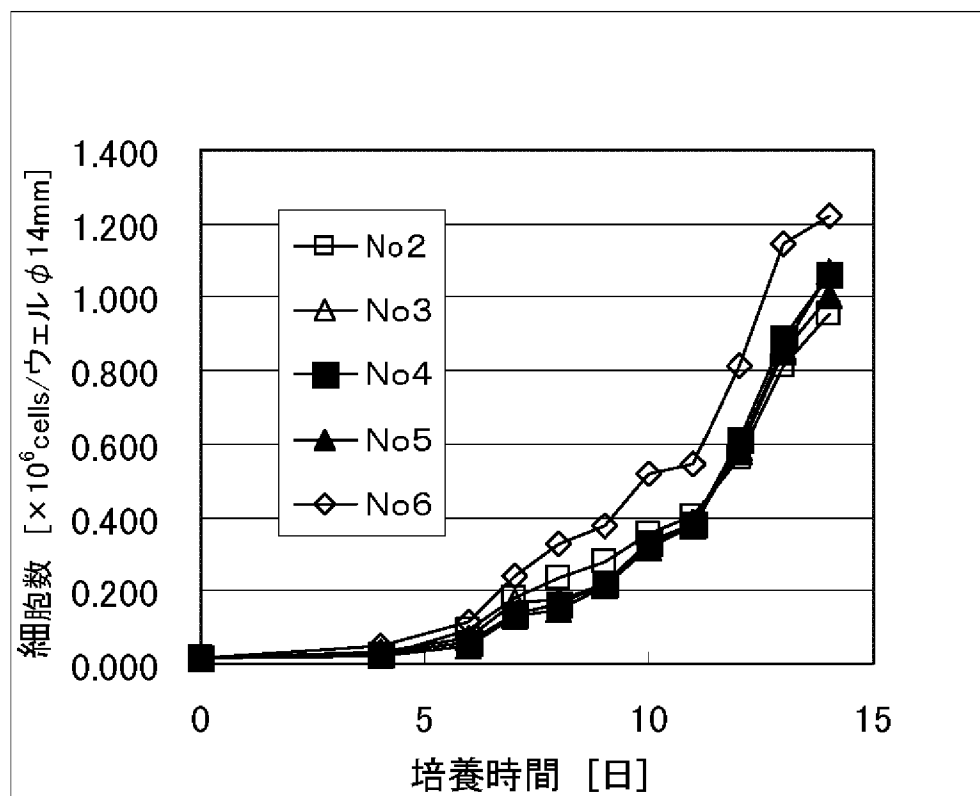


(× 3000)

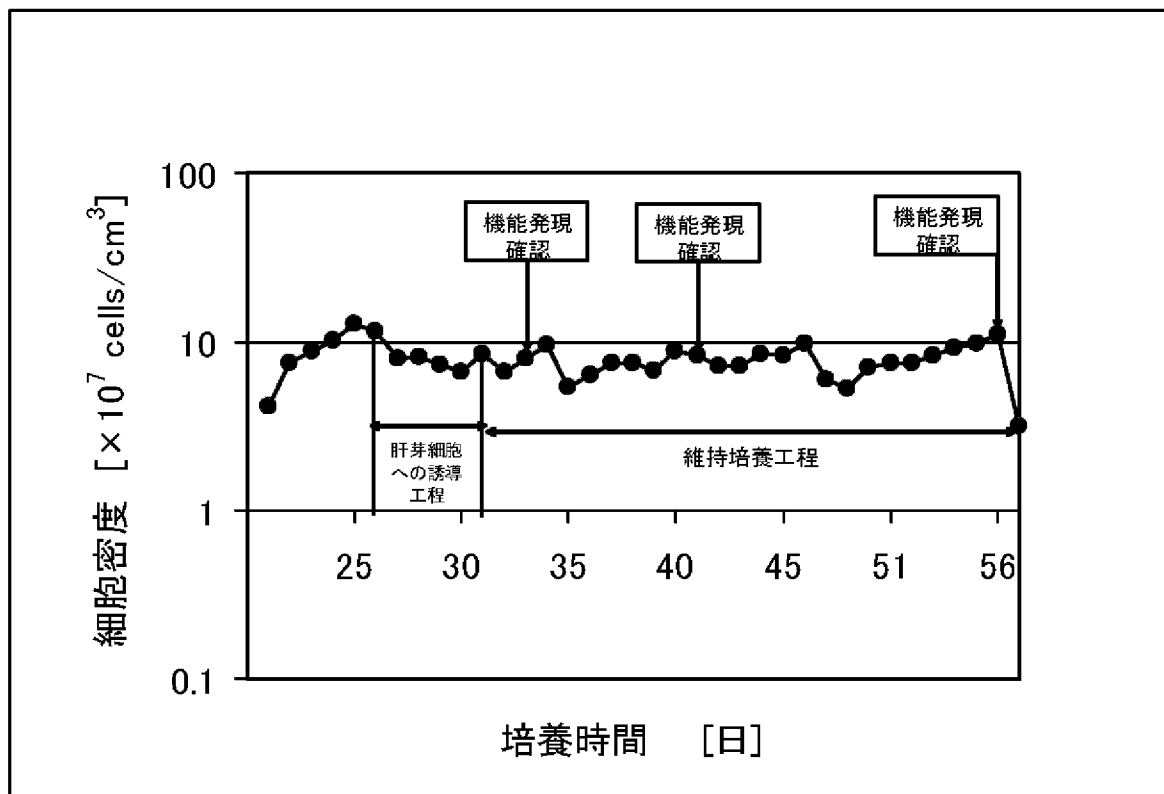
[図19]



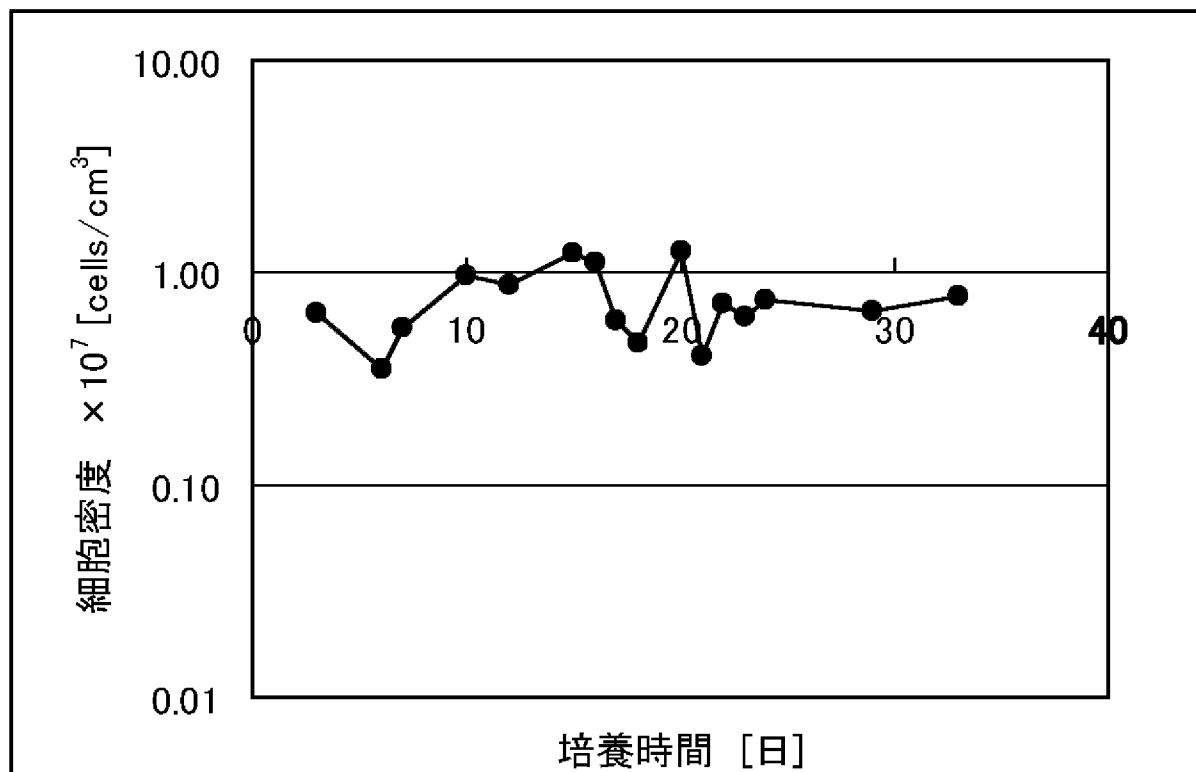
[図20]



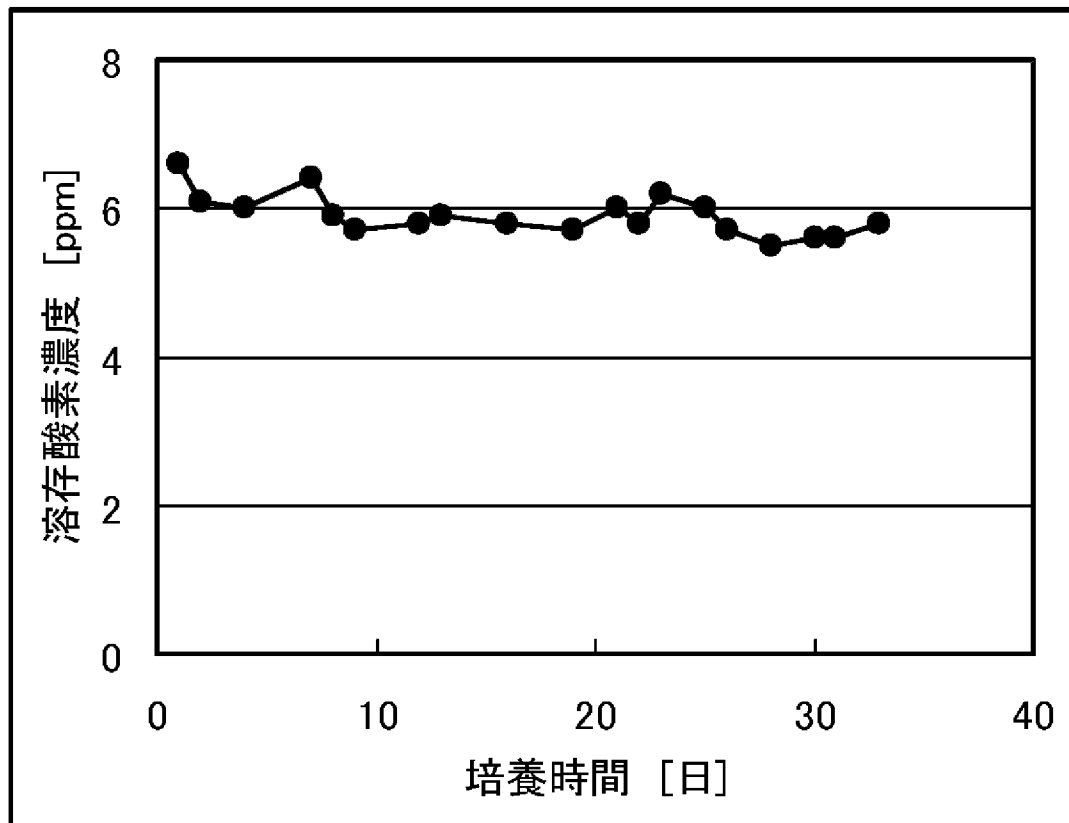
[図21]



[図22]



[図23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/005172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)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, C12M1/00, C12N1/00

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

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 2011-239756 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 01 December 2011 (01.12.2011), entire text (Family: none)	1, 2, 4, 7-14/3
X/Y	JP 2010-148497 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 08 July 2010 (08.07.2010), entire text (Family: none)	1, 2, 4, 7-14/3
X/Y	JP 2010-148496 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 08 July 2010 (08.07.2010), entire text (Family: none)	1, 2, 4, 7-14/3

☒ 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

"I" 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 November, 2013 (01.11.13)

Date of mailing of the international search report
12 November, 2013 (12.11.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/005172

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 3726597 A (DVORAK J. A. and STOTLER W. F.), 10 April 1973 (10.04.1973), fig. 2; 3rd paragraph, lines 37 to 41; 4th paragraph, lines 6 to 12 (Family: none)	3
Y	US 4974952 A (FOCHT D. C.), 04 December 1990 (04.12.1990), 6th paragraph, lines 20 to 27 (Family: none)	3
Y	US 6403369 B1 (WOOD G. W.), 11 June 2002 (11.06.2002), fig. 1; 5th paragraph, lines 59 to 64 & WO 2002/057159 A1	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/005172

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.:
1-4 and 7-14

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/JP2013/005172

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

The technical feature common to claim 1 and claim 5 is to use "a cell culture module that comprises a culture space in which a hollow fiber membrane is placed".

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 each of the following documents 1-3.

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

Accordingly, claims are classified into two inventions each of which has a special technical feature indicated below.

(Invention 1) the inventions of claim 1 and claims 2-4, 7-10 and 12-14 which are dependent on claim 1, and the inventions of claim 11 and claims 12-14 which are dependent on claim 11

The inventions according to claim 1 and claims 2 to 4, 7 to 10 and 12 to 14, said claims depending on claim 1, relate to a cell culture module (STF1) that is provided with a culture space in which a hollow fiber membrane is placed, a frame constituting an inner space including the culture space, and a detachable lid, wherein an opening for attaching the lid is formed in such a size as allowing the exposure of the whole culture space.

The inventions according to claim 11 and claims 12 to 14, said claims depending on claim 11, relate to a cell culture module that is provided with a culture space in which a hollow fiber membrane and a fiber assembly consisting of nanofibers with an average diameter of 250-950 nm are placed. These inventions do not fall within the same category that includes all the specific matters of the invention of claim 1.

However, as a result of the search which has been carried out with respect to the inventions of claim 1 and claims 2-4, 7-10 and 12-14 dependent on claim 1 which are classified into invention 1, it was substantially possible to carry out a search with respect to the inventions of claim 11 and claims 12-14 dependent on claim 11 without an additional prior-art search and judgment, and consequently, the inventions of claim 11 and claims 12-14 dependent on claim 11 were classified into invention 1.

(Invention 2) the invention of claim 5, and the inventions of claims 6-10 and 12-14 which are dependent on claim 5

The inventions according to claim 5 and claims 6 to 10 and 12 to 14, said claims depending on claim 5, relate to a cell culture module (STF2) that comprises two substrates, a culture space in which a hollow fiber membrane is placed in a culture area that is formed between the substrates, and a plurality of flow ports that allow a fluid to flow from the outside of the culture area to the inside thereof or vice versa, wherein the flow ports are located at such positions on the substrates as facing the culture space and provided with a female type luer taper reducing the diameter thereof from the outside of the culture area toward the inside thereof.

The inventions of claim 5 and claims 6-10 and 12-14 which are dependent on claim 5 are not relevant to inventions which involve all of the matters to define the invention in claim 1 and which have a same category.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/005172

Further, as a result of the search which has been carried out with respect to the inventions of claims classified into invention 1, the inventions of claim 5 and claims 6-10 and 12-14 dependent on claim 5 are not relevant to inventions on which it is substantially possible to carry out a search without an additional prior-art search and judgment, and there is no other reason for that it can be considered that it is efficient to carry out a search on the inventions of claim 5 and claims 6-10 and 12-14 dependent on claim 5 together with the inventions of claim 1 and claims 2-4, 7-10 and 12-14 dependent on claim 1, and consequently, it is impossible to classify the inventions of claim 5 and claims 6-10 and 12-14 dependent on claim 5 into invention 1.

Document 1: JP 2011-239756 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 01 December 2011 (01.12.2011)

Document 2: JP 2010-148497 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 08 July 2010 (08.07.2010)

Document 3: JP 2010-148496 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 08 July 2010 (08.07.2010)

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, C12M1/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)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, C12M1/00, C12N1/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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), Thomson Innovation

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 2011-239756 A（三菱レイヨン株式会社）2011.12.01, 全文 （ファミリーなし）	1, 2, 4, 7-14/ 3
X/ Y	JP 2010-148497 A（三菱レイヨン株式会社）2010.07.08, 全文 （ファミリーなし）	1, 2, 4, 7-14/ 3
X/ Y	JP 2010-148496 A（三菱レイヨン株式会社）2010.07.08, 全文 （ファミリーなし）	1, 2, 4, 7-14/ 3

☒ 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

0 1 . 1 1 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 2 . 1 1 . 2 0 1 3

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 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

鈴木 崇之

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 1 5 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
Y	US 3726597 A (DVORAK J. A. and STOTLER W. F.) 1973.04.10, 図2、縦段3第37－41行、縦段4第6－12行 (ファミリーなし)	3
Y	US 4974952 A (FOCHT D. C.) 1990.12.04, 縦段6第20－27行 (ファミリーなし)	3
Y	US 6403369 B1 (WOOD G. W.) 2002.06.11, 図1、縦段5第59－64行 & WO 2002/057159 A1	3

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（P C T 17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P C T 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。

請求項 1 - 4、7 - 14

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。

請求項 1 及び請求項 5 は、「中空糸膜が配置された培養場を含む細胞培養用モジュール」を使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、下記の文献 1－3 それぞれ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。

以上より、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する 2 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1、及び請求項 1 の従属項である請求項 2－4、7－10、12－14 に係る発明、並びに、請求項 11、及び請求項 11 の従属項である請求項 12－14 に係る発明。

請求項 1、及び請求項 1 の従属項である請求項 2－4、7－10、12－14 に係る発明は、中空糸膜が配置された培養場と、該培養場を含む内部空間を構成する枠体と、取り外し可能な蓋体とを備え、該蓋体に取り付けられる開口が、前記培養場全体を露出可能な大きさに設けられている細胞培養用モジュール (STF1) に関する。

また、請求項 11、及び請求項 11 の従属項である請求項 12－14 に係る発明は、中空糸膜と、平均直径 250 nm～950 nm のナノファイバーからなる繊維集合体とが配置された培養場を備える細胞培養用モジュールに関し、当該発明は、請求項 1 の発明特定事項を全て含む同一カテゴリーの発明ではない。しかしながら、請求項 11、及び請求項 11 の従属項である請求項 12－14 に係る発明は、発明 1 に区分された請求項 1、及び請求項 1 の従属項である請求項 2－4、7－10、12－14 に係る発明について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく調査を行うことが可能であったため、請求項 11、及び請求項 11 の従属項である請求項 12－14 に係る発明を、発明 1 に区分した。

(発明 2) 請求項 5、及び請求項 5 の従属項である請求項 6－10、12－14 に係る発明。

請求項 5、及び請求項 5 の従属項である請求項 6－10、12－14 に係る発明は、2 枚の基板と、該基板の間に形成された培養領域内に中空糸膜が配置された培養場と、前記培養領域の外部から内部へ又は内部から外部へ流体を通流させる複数の通流口と、を有し、前記通流口は、前記基板の前記培養場に対応する位置に配設され、かつ、前記培養領域の外部から内部へ向かって縮径するメス型ルーアーを備える細胞培養用モジュール (STF2) に関する。

請求項 5、及び請求項 5 の従属項である請求項 6－10、12－14 に係る発明に係る発明は、請求項 1 の発明特定事項を全て含む同一カテゴリーの発明ではない。そして、請求項 5、及び請求項 5 の従属項である請求項 6－10、12－14 に係る発明に係る発明は、発明 1 に区分された請求項に係る発明について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく調査を行うことが可能である発明ではなく、請求項 1、及び請求項 1 の従属項である請求項 2－4、7－10、12－14 に係る発明とまとめて調査を行うことが効率的であるといえる他の事情もないから、請求項 5、及び請求項 5 の従属項である請求項 6－10、12－14 に係る発明を、発明 1 に区分することはできない。

文献 1 : JP 2011-239756 A (三菱レイヨン株式会社) 2011.12.01

文献 2 : JP 2010-148497 A (三菱レイヨン株式会社) 2010.07.08

文献 3 : JP 2010-148496 A (三菱レイヨン株式会社) 2010.07.08