

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3693180号

(P3693180)

(45) 発行日 平成17年9月7日(2005.9.7)

(24) 登録日 平成17年7月1日(2005.7.1)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 M 3/06

C 1 2 N 5/06

F I

C 1 2 M 3/06

C 1 2 N 5/00

E

請求項の数 21 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平8-529654	(73) 特許権者	ウォルフ, マーティン エル.
(86) (22) 出願日	平成8年3月28日(1996.3.28)		アメリカ合衆国, ミネソタ 55108,
(65) 公表番号	特表平11-502716		セントポール, ケストン ストリート 1
(43) 公表日	平成11年3月9日(1999.3.9)		280
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/004280	(73) 特許権者	ウィルソン, ジョン アール.
(87) 国際公開番号	W01996/030497		アメリカ合衆国, ミネソタ 55112,
(87) 国際公開日	平成8年10月3日(1996.10.3)		ニューブライトン, ウィンザー レーン
審査請求日	平成15年3月26日(2003.3.26)		173
(31) 優先権主張番号	08/413,335	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成7年3月30日(1995.3.30)	(74) 代理人	弁理士 吉田 維夫
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンパートメント付き組織培養バッグ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 基本培地アクセスポート(90)および開口部を有する容器、
b) 選ばれたサイズの化合物に対して選択的に透過性であり且つ前記開口部にわたって横切って配置されている上側の膜(20)、ここで、前記容器および前記上側の膜(20)は一緒に基本培地コンパートメント(30)を画定している、
c) 前記上側の膜(20)の下方に配置された気体透過性フィルム(120)、ここで、前記上側の膜(20)とともに、細胞培養コンパートメント(40)を画定している、
d) 前記細胞培養コンパートメント(40)の内側とその外側の間の1つのアクセスポート(70)、ここで、培養細胞が細胞培養コンパートメント(40)中に導入され、そしてそこから取り出されることができる、および、
e) 前記気体透過性フィルム(120)の下方にあり、且つ、それと部分的に接触している気体フィルム支持体(130)、ここで、前記気体透過性フィルム(120)の少なくとも一部分は実質的に平行の位置に保持されており、それにより、前記気体透過性フィルム(120)の水平部分にわたって細胞が分布し、そして気体が前記気体透過性フィルム(120)の下側に接触することができる、
を含む、自給式の細胞培養装置。

【請求項2】

前記上側の膜(20)の表面積が前記気体透過性フィルム(120)の表面積の少なくとも1/4である、請求項1記載の装置。

10

20

【請求項 3】

前記気体透過性フィルムの実質的に水平な部分と前記上側のシートとの間の平均距離が約 5 ミリメートル未満である、請求項 1 記載の装置。

【請求項 4】

周囲環境に気体連絡して開いている前記気体フィルム支持体（130）の最小の断面積が気体と接触している前記気体透過性フィルム（120）の下側の合計の表面積より小さい、請求項 1 記載の装置。

【請求項 5】

前記気体透過性フィルムが前記細胞培養コンパートメント（40）中に突き出しているセクションを含む、請求項 1 記載の装置。

10

【請求項 6】

前記基本培地コンパートメント（30）が気体透過性である壁を含む、請求項 1 記載の装置。

【請求項 7】

前記基本培地コンパートメント（30）が可撓性である壁を含む、請求項 1 記載の装置。

【請求項 8】

（e）前記気体透過性フィルム（120）の下方の空間と前記基本培地コンパートメント（30）の内部の上方の空間とを連絡する気体交換コンパートメントを含む、請求項 1 記載の装置。

【請求項 9】

前記気体透過性フィルム（120）が前記細胞培養コンパートメント（40）の中に突き出しているセクションを含む、請求項 8 記載の装置。

20

【請求項 10】

前記気体交換コンパートメントが基本培地がそこに入ることを防止している、請求項 8 記載の装置。

【請求項 11】

前記気体交換コンパートメントのためのアクセスポートを含み、ここで、凝縮物が除去されることができ、そして前記基本培地コンパートメント（30）の気体以外の気体が前記気体透過性フィルム（120）の下側と連絡することができる、請求項 8 記載の装置。

【請求項 12】

前記基本培地コンパートメント（30）が気体透過性である壁を含む、請求項 8 記載の装置。

30

【請求項 13】

前記基本培地コンパートメント（30）が可撓性である壁を含む、請求項 8 記載の装置。

【請求項 14】

i) 第一の前記気体透過性フィルム（120）の下方に水平位置に配置された第二の気体透過性フィルム（200）、

i i) 前記第二の気体透過性フィルム（200）から第一の前記気体透過性フィルム（120）を分離し、流体を閉じ込めるように調節された可変酸素制御コンパートメント（190）を形成するための手段、および、

i i i) 気体輸送速度を制御するために液体が加えられ、または除去されることができ、前記可変酸素制御コンパートメント（190）へのアクセスポート、を含む、請求項 1 記載の自給式の細胞培養装置。

40

【請求項 15】

第一の前記気体透過性フィルム（120）が前記細胞培養コンパートメント（40）中に突き出しているセクションを含む、請求項 14 記載の装置。

【請求項 16】

前記基本培地コンパートメント（30）が気体透過性である壁を含む、請求項 14 記載の装置。

【請求項 17】

50

前記基本培地コンパートメント（３０）が可撓性である壁を含む、請求項１４記載の装置。

【請求項１８】

請求項１記載の装置中において細胞を培養するための方法であって、

- a) 基本培地コンパートメント中に基本培地（６０）を導入すること、
 - b) 前記細胞培養コンパートメント（４０）中に細胞および細胞培地（３０）を導入すること、および、
 - c) 前記細胞培養コンパートメント（４０）を予め決められた温度に維持すること、ここで、細胞は前記気体透過性フィルム（１２０）の上側の表面上で繁殖し、そして前記細胞培養コンパートメント（４０）中で発生した気体が前記気体透過性フィルム（１２０）を
- 10 通って通過する、を含む方法。

【請求項１９】

前記装置のための支持体から前記気体透過性フィルム（１２０）を確実に離して空間を開け、それにより、前記気体透過性フィルム（１２０）の下方に気体の空間を提供することを

含む、請求項１８記載の方法。

【請求項２０】

請求項１４記載の装置中で細胞を培養するための方法であって、

- a) 基本培地（６０）を前記基本培地コンパートメント（３０）中に導入すること、
 - b) 前記細胞培養コンパートメント（４０）中に細胞および細胞培地（５０）を導入する
- 20 こと、
- c) 前記可変酸素制御コンパートメント（１９０）中に液体を導入すること、および、
 - d) 前記細胞培養コンパートメント（４０）を予め決められた温度に維持すること、を含む方法。

【請求項２１】

前記可変酸素制御コンパートメント（１９０）が前記基本培地コンパートメント（３０）と連絡されている、請求項２０記載の方法であって、基本培地を前記酸素制御コンパートメント（１９０）中に導入することの更なる工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は細胞または組織のインビトロでの成育のための装置および方法に関する。

従来技術の背景説明

哺乳類の細胞のインビトロでの成育は、Lifecell（商標）バッグ（Baxter Travenol）、SteriCell（商標）（DuPont）のような静置培養容器中で行われることができる。これらの培養装置は、使用するのが容易で、且つ、細胞の代謝要求値を扶養するために受動拡散（passive diffusion）によるので、人気がある。このタイプの培養において、細胞は養分を消費しそして排産物を生じるので、細胞の培地の一部分はバッグから周期的に取り出され、そして取り替えられなければならない。このプロトコールは制限された細胞密度、制限された細胞分泌物濃度、および、養分濃度の周期的シフトといった欠点をもたらす。

40 これらの欠点を克服するためには、養分が補充されるときに、細胞および細胞の分泌物は培養容器内に保持される必要がある。Marbrookは基本培地から細胞および細胞の分泌物を分離するために透析膜を使用し、受動拡散が細胞の代謝要求値を満たす（Marbrook, J., “Primary Immune Response in Cultures of Spleen Cells”, the Lancet, 2, 1279~1281 [1967]）。この装置において、内側同心円チャンバーは外側同心円チャンバー中にある。内側同心円チャンバーの底は透析膜を含み、そして、それは、外側同心円チャンバー中に含まれる基本培地中に埋まっている。細胞は膜の上にあり、養分を受取り、そして排産物を送りだす。連続透析は、細胞物質が膜上にあるために基質輸送能力を失ったときに制限されることになる。この為、長期間の培養を行う能力は妥協される。

Verma（1981年10月20日に付与された米国特許第4,296,205号）は細胞が透析膜に直接接触

10

20

30

40

50

しそして閉塞することがないように、細胞培養コンパートメント内に配置された組織培養棚の使用を教示している。細胞培養棚は細胞への養分の移動ができるようにパーホレーションを有している。浮遊細胞培養の際に、細胞および細胞断片はパーホレーションを通して移動し、そして透析膜上に來ることができ、長期間の培養において連続培養を制限する。また、棚の建築的構造は、濃度勾配がプレートの表面にわたって不均一に分布されるような微細環境を生じることができる。

Vogler (1988年5月31日に付与された米国特許第4,748,124号) は、下側の気体透過性で液体不透性のシートおよび上側の透析膜により画定された細胞培養コンパートメントを記載している。この形態は、細胞が透析膜上にあることがないので、透析膜が閉塞しないが、透析は他の手段により制限される。従来の細胞培養バッグでは、Voglerの形態はMarbrook
10
およびVermaのものと比較して、酸素圧を変化させる能力が制限される。更に、気体の透過を可能にするために使用される材料の表面化学的性質は制限され、そして、ある場合には、タンパク質または細胞の接触には望ましくないことがある。結局、この教示は従来の静置培養法と比較して高密度の細胞培養ができない。

Voglerの構造は、細胞コンパートメントの透析が制限されることになることができる。成育チャンバーから液体が蒸発するとき問題が起こることができる。気体透過性の表面を横切る蒸気の透過はかなりのものであることができ、そして、液体の損失によって、透析膜と接触している液体がなくなると透析が止まってしまうであろう。

Voglerのバッグと同様の従来のバッグ形態においては、細胞培養コンパートメントの気体透過性で液体不透性のシートは細胞近傍pHおよび P_{O_2} を制御するための選択肢が制限され
20
る。MarbrookおよびVermaの従来の形態においては、細胞培養コンパートメントの液体レベルを調節することにより酸素圧が変化できた。Voglerにより教示された構造および方法は装置を取り巻く雰囲気の周囲条件を変えることにより酸素圧を変える必要がある。

酸素圧は、細胞の生存およびタンパク質分泌にとって非常に重要である (Ruevenyらの“Factors Affecting Cell Growth and Monoclonal Antibody Production in Stirred Reactors”, Journal of Immunological Methods, 86, 53~59 [1986])。市販の液体不透性シートの気体透過性並びに細胞近傍(pericellular) pHおよび P_{O_2} に与える影響はJenson
30
らにより詳細に記載されている (Jenson M.D., Wallach D.F.H.およびSherwood P., “Diffusion in Tissue Cultures on Gas-permeable and Impermeable Supports”, J. Theor, Biol. (1976) 56, 443~458)。様々な気体透過性で液不透性のシートの気体透過率との組み合わせでの様々なタイプの細胞の酸素要求値は、各々の組み合わせのために特異的な安定状態での細胞近傍pHおよび P_{O_2} を要求するであろう。このことは細胞ラインが非常に制限された細胞近傍条件を受けることを意味する。異なる細胞近傍条件を作ることは、装置をインキュベータ中に入れ、インキュベータの周囲条件を変えることにより達成される。実際上は、幅広い同時使用のために標準条件でインキュベータを維持している研究者にとって困難である。

気体透過性で液体不透性のシートは、また、細胞およびタンパク質の構造を支持するために表面化学的性質を制限する。多くの細胞のタイプの増殖および機能はそれらが接している表面の化学的性質によって強く影響を受ける。液体不透性で気体透過性のシートの表面の化学的性質は、多くの細胞のタイプおよびタンパク質構造に適さないものである。また
40
、しばしば気体透過性で液体不透性のフィルムの基礎となる疎水性材料は、また、非特異的なタンパク質の結合をもたらすことができる。これは、また、可溶性の成長因子の枯渇をもたらすことができる。この為、細胞環境の最適化のために材料の更なる変性が要求される。

Volgerの構造は、また、制限された細胞密度をもたらすことができる。成育チャンバーはその上にある液体の重量および流体膨張の圧力により形状が変形し、たるんだ気体透過性シートとするであろう。これにより、浮遊細胞はシートの最下点に沈降することができる。シートの最下点に高度に局在化した細胞密度は、養分の流れを過度に抑制し、そして細胞の生存性を局所的に減少させる。更に、細胞は気体透過性シートの他の領域に広がる
50
ことができない。

従って、本発明の目的は、高密度での足場依存性細胞および浮遊細胞の長期間培養のためのコンパートメント付き細胞培養バッグ構成体中で、同時に、可変的な酸素圧、培養コンパートメントの底にわたっての細胞の均一分布、阻害されない透析、および、幅広い表面化学的性質の選択肢を可能とする方法および装置を提供することである。

発明の要旨

従来技術の多くの問題点は、細胞が高密度で長期間にわたって培養されうる、本発明によるコンパートメント付き細胞培養バッグによって解決される。

基本培地アクセスポートおよび開口部を具備した容器、

選ばれたサイズの化合物に対して選択的に透過性であり且つ前記開口部にわたって横切って配置された上側の膜、ここで、前記容器および前記上側の膜は一緒に基本培地コンパートメントを画定している、

10

前記上側の膜の下に配置された気体透過性フィルム、ここで、それは前記上側の膜とともに細胞培養コンパートメントを画定している、

前記細胞培養コンパートメントの内側およびその外側の間のアクセス手段、ここで、培養細胞 (cell culture) は前記細胞培養コンパートメント中に導入され、そしてそこから取り出されることができる、および、

前記気体透過性フィルムの下でそしてそれと部分的に接触している気体フィルム支持体、ここで、前記気体透過性フィルムの少なくとも一部分は実質的に水平の位置に保持され、それにより、細胞は前記気体透過性フィルムの水平部分にわたって分布することができ、そして気体が前記気体透過性フィルムの下側と接触することができる、

20

を含む細胞培養装置が提供される。

高密度の細胞培養のためには、前記上側の膜の表面積は前記気体透過性フィルムの表面積の少なくとも1/4であり、そして、前記気体透過性フィルムの実質的に水平の部分と前記上側の膜の間の平均距離は約5ミリメートル未満である。周囲環境と気体連絡し開放されている前記気体フィルム支持体の最も小さい断面積は、気体と接触している前記気体透過性フィルムの下側の合計表面積よりも小さい。

本発明の更なる特徴によれば、前記気体透過性フィルムは前記細胞培養コンパートメント中に突き出しているセクションを含む。

本発明の更なる特徴によれば、前記基本培地コンパートメントは可撓性である壁を含む。

本発明の更なる特徴によれば、前記気体透過性フィルムの下方の空間と前記基本培地コンパートメントの内部の上方の空間を連結する気体交換コンパートメントは前記細胞培養コンパートメントからの蒸発損失を制限する。気体交換コンパートメントは、基本培地がそこに入るのを防止するような構造となっていることができ、そして、前記気体交換コンパートメントのためのアクセスポートを含むことができ、ここで、凝縮物が除去されることができ、そして前記基本培地コンパートメントの気体以外の気体が前記気体透過性フィルムの下側と連絡することができる。

30

本発明の更なる特徴によると、前記細胞培養コンパートメント内の酸素圧 (oxygen tension) は、第一の前記気体透過性フィルムの下方に水平位置に配置された第二の気体透過性フィルムを含み、第一の前記透過性フィルムを第二の気体透過性フィルムから分離して、流体を閉じ込めるように調節された可変酸素制御コンパートメントを形成するための手段、および、前記酸素制御コンパートメントへのアクセスポートを提供することにより変えることができ、ここで、気体輸送速度を制御するために液体が加えられまたは除去されてもよい。

40

これらの構造で、高密度で細胞を培養するための方法が提供されうる。また、細胞の周囲の酸素圧を制御するための方法は酸素流束に対する液体バリアを使用することにより提供されうる。

このように、記載された特徴の装置内において、細胞を培養するための方法が提供され、この方法は、

a) 前記基本培地コンパートメント中に基本培地を導入すること、

b) 前記細胞培養コンパートメント中に細胞および細胞培地を導入すること、および、

50

c) 前記細胞培養コンパートメントを予め決められた温度に保持すること、ここで、細胞は、前記気体透過性フィルムの上側表面上で増殖し、そして前記細胞培養コンパートメント内に発生した気体は前記気体透過性フィルムを通過する、を含む。

このように記載した本発明では、従来技術に関連する問題は解決される。長期間の高密度の浮遊細胞および付着細胞の両方のインビトロでの培養は可能であり、可変の酸素圧、制御された蒸発、小さい細胞コンパートメント液体体積の長期間の保全、および、阻害されない透析を同時に備えるものである。

【図面の簡単な説明】

図1は本発明によるコンパートメント付き細胞培養バッグの垂直断面図であり、
図2は細胞培養コンパートメント中への突起部を有する気体透過性膜を使用した態様を示す、コンパートメント付き細胞培養バッグの断面図であり、
図3は図1または2の気体フィルム支持体の斜視図であり、
図4は図3の気体フィルム支持体の垂直断面図であり、
図5は細胞培地の蒸発を制御する態様の垂直断面図であり、
図6は可変酸素圧を可能にする態様の垂直断面図であり、そして、
図7は細胞培養コンパートメントの体積を制限する態様の垂直断面図である。

図中の参照番号は、以下の通りである。

- | | | |
|-----|-------------------------|----|
| 10 | コンパートメント付き細胞培養バッグ | |
| 20 | 膜 | 20 |
| 30 | 基本培地コンパートメント | |
| 40 | 細胞培養コンパートメント | |
| 50 | 培地 | |
| 60 | 基本培地 | |
| 70 | 細胞培養コンパートメントアクセスポート | |
| 80 | 細胞培養コンパートメントアクセスポートキャップ | |
| 90 | 基本培地アクセスポート | |
| 100 | 基本培地アクセスポートキャップ | |
| 120 | 気体透過性フィルム | |
| 130 | 気体フィルム支持体 | 30 |
| 140 | 気体アクセス開口部 | |
| 150 | 脚 | |
| 160 | 気体アクセスチャンネル | |
| 170 | 気体アクセスチャンネルカバー | |
| 180 | ドレンポート | |
| 190 | 可変酸素制御コンパートメント | |
| 200 | 下側気体透過性フィルム | |
| 210 | 酸素制御コンパートメントの底 | |
| 220 | 酸素制御コンパートメントのアクセスポート | |
| 230 | 液体レジスター | 40 |
| 240 | 上側膜支持体 | |
| 250 | 支持体ポスト | |

詳細な説明

次に、図1を詳細に参照して、図1はコンパートメント付き細胞培養バッグ10の断面図を示す。膜20はコンパートメント付き細胞培養バッグ10を、基本培地コンパートメント30と細胞培養コンパートメント40とに分離する。細胞または組織を含む培地50は細胞培養コンパートメント40中にある。基本培地60は基本培地コンパートメント30中にある。細胞培養コンパートメント40へのアクセスは、細胞培養コンパートメントアクセスポート70により提供される。基本培地コンパートメント30へのアクセスは、基本培地アクセスポート90により提供される。気体透過性フィルム120は気体フィルム

支持体 130 の上にあり、それは、気体アクセス開口部 140 により気体透過性フィルム 120 の表面の大半と、気体、例えば、周囲雰囲気とが接触できるように調節されている。脚 150 は、コンパートメント付き細胞培養バッグ 10 が載っている表面より上に気体フィルム支持体 130 の上部を配置する。

運転において、基本培地 60 は基本培地コンパートメントアクセスポート 90 より基本培地コンパートメント 30 に送られる。基本培地アクセスポートキャップ 100 は基本培地アクセスポート 90 の上に配置されている。膜 20 は基本培地の重量により気体透過性フィルム 120 の表面上に圧迫される。基本培地 60 の導入の前にこの位置に膜を配置することは、また、細胞培養コンパートメントアクセスポート 70 により細胞培養コンパートメント 40 に真空を生じさせることによっても行える。所望の培養体を含む、予め決められた体積の培地 50 は、細胞培養コンパートメント 40 中に細胞培養コンパートメントアクセスポート 70 により導入される。細胞培養コンパートメントアクセスポートキャップ 80 は細胞培養コンパートメントアクセスポート 70 の上に配置されている。

膜 20 は、養分を基本培地 60 から細胞培地 50 に自由に通過させ、そして、排産物を細胞培地 50 から基本培地 60 に自由に通過させることができる。膜 20 は、細胞培養コンパートメント 40 中に細胞および選ばれた化合物を保持する。

膜 20 は、ある種の分子を選択的に透過させることができる材料である。幾つかのタイプの材料は許容され、セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリスルホン、ポリカーボネートおよびポリアクリルアミドを含む。例えば、15,000 を越える分子量を有する分子および化合物を保持する透析膜は、ネズミのハイブリドーマ細胞を培養するために一般に使用される。この特性を有する膜を使用することにより、細胞、成長因子および分泌された抗体は細胞培養コンパートメント 40 中に保持される。他の用途において、より大きな分子および化合物を基本培地 60 および培地 50 の間に自由に通過させることができることは有利であることができる。例えば、リンパ球の高密度培養は多量の成長刺激因子が存在することを要求する。これらの因子、例えば、インターロイキン 2 は基本培地 60 および培地 50 中に導入されうる。膜 20 の孔径を適切に選択することにより、これらの因子の多くの源がリンパ球に供給されうる。

膜 20 は殆どの用途で 150,000 ダルトンの分子量カットを越えないであろう。それでも、更により大きな孔径が望まれるであろう用途がある。例えば、もし、多数の細胞を培養することのみが目的であるならば、細胞培養コンパートメント中 40 中に細胞を保持するいずれの孔径でも使用できる。この場合、Poretics Corporation (Livermore, California) から市販されているような 0.2 μm または 0.45 μm の微細孔ポリカーボネート膜は使用できる。気体透過性フィルム 120 は気体を細胞培養コンパートメント 40 中にまたはそこから外に輸送することができる生体適合性の材料である。気体透過性フィルム 120 は、液体透過性または不透性のいずれかの疎水性または親水性の多孔性または無孔性のものであってよい。厚さは 0.25 mm を越えるかまたはそれを下回る範囲であることができる。最も良好な選択は特定の用途による。一般的なガイドラインとして、与えられる膜の気体透過性は、細胞またはタンパク質構造のいずれかと膜との相互作用に加えて、考慮されるべきである。同一の厚さの液体不透性のフィルムは、細胞／気体透過性フィルム界面で様々な安定した状態の酸素圧を形成するであろう。FEP テフロン、シリコーンおよびシリコーンポリカーボネートコポリマーは、同一の厚さのポリエチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリスルホンまたはポリプロピレンフィルムよりも高い酸素圧を形成するであろう。タンパク質の変性、非特異的タンパク質結合、細胞膜破壊または細胞結合がフィルムの表面の化学的性質に影響を受ける用途では、親水性表面がより好ましい。細胞膜全体を水と接触させておくことが望ましい用途では、水和したゲルが最も適切であろう。

気体交換を通常に伴わない特定の材料の使用は、細胞／気体透過性フィルム界面での酸素圧を制御するための選択肢を広げることができる。例えば、無孔性のセルロースアセテートは、約 $7.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} / (\text{秒} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{atm})$ の比較的に低い酸素気体透過率を有する。セルロースアセテートが多孔性で作られるときには、それは培地 50 を吸

10

20

30

40

50

収するので酸素透過率が増加し、 $1.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} / (\text{秒} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{atm})$ の酸素透過率となる。このように、細胞培養コンパートメント40の細胞／気体透過性フィルム界面での酸素圧を変更することは、気体透過性フィルム120内に存在する培地50の量を制御することにより達成できる。このように、酸素圧の変更は気体透過性フィルム120の孔径、多孔度またはくねり性 (tortuosity) を変えることにより起こるのである。

図2の態様は、気体輸送のための追加の領域を提供するために気体透過性フィルム120の一部が細胞培養コンパートメント中に突き出している形態を示す。シリコーンは、適切な形状に成形することが容易であるので、材料として良好な選択であろう。壁の厚さは最小にすることができ、それにより、細胞培養コンパートメント40中への追加の気体輸送が可能になる。シリコーンの場合には、平均の壁の厚さは約0.015インチ未満にすべきであり、好ましくは約0.004~0.012インチの間である。

気体フィルム支持体130は気体透過性フィルム120を実質的に水平の位置に保持し、そしてたるみを防止するように気体透過性フィルム120を安定化させる。細胞が低い位置に転がっていき、または集まってくることをないように、気体透過性フィルムの平坦性を確保するように注意が払われるべきである。このことは、細胞の集積は拡散の制約をもたらす、そして細胞を死に導くであろうから望ましくないことがある。他方、気体フィルム支持体130の気体透過性フィルム120との接触量は、気体透過性フィルム120の剛性および気体透過性、並びに、特定の細胞培養用途の代謝要求量および気体交換によるであろう。殆どの細胞ラインは約10~15個の細胞の層で拡散的に制限されるであろうことが期待されるはずである。

気体フィルム支持体130は、また、気体透過性フィルム120が汚染またはパンクすることから保護されるようにも作用する。気体透過性フィルム120との接触が最小であると、気体輸送のための表面積が最大の可能な面積となることができる。気体アクセス開口部140は、蒸発を最小限としながら、細胞培養コンパートメント40の十分な気体交換を可能とするようなサイズとされる。好ましい態様において、気体フィルム支持体130は、コンパートメント付きバッグ10は最小の体積の容器中に梱包されうるように、ロール巻されうる可撓性のメッシュである。コンパートメント付きバッグ10が運転のために取り出されるときに、気体フィルム支持体130は構造的に安定な表面を提供し、それにより、基本培地60および細胞培地50の重量下で気体透過性フィルム120がたるむことを防止する。

図3および図4は、このことがどのように達成されうるかの例を示す。図3は、気体フィルム支持体の小さいセクションの斜視図である。図4は図3の断面図である。脚150は気体フィルム支持体130を立て、気体アクセス開口部140への通過を可能にする。スパイク250は、基本培地60の重量を脚150に移しながら、実質的に水平の位置に気体透過性フィルム120を保持する。ポリプロピレンのような可撓性材料から気体フィルム支持体を製造することにより、運転しないときに気体フィルム支持体130はロールされることができる。

気体透過性フィルム120の材料選択に関する別の考慮点は湿分蒸気透過速度である。培地50は、気体透過性フィルム120の材料によって様々な速度で蒸発させるであろう。気体アクセス開口部140の断面積を制限することにより、蒸発の速度が低下することができるが、液体の損失速度は周囲湿度にも関係し、それは制御することがより困難である。図5の態様はこの問題に挑むものである。

基本培地60と基本培地コンパートメント30の上部との間にある気体は基本培地60により湿潤化される。この気体は、気体アクセスチャンネル160により気体透過性フィルム120の下側と連絡されている。気体アクセスチャンネルカバー170はあってもなくてもよい。それは基本培地が気体アクセスチャンネル160に入り、そして気体輸送を制限することを防止するであろう。気体アクセスチャンネルカバー170は多孔性の気体透過性で液体不透性の通気膜である。気体アクセスチャンネルカバー170上に凝縮物が蓄積し、そして気体輸送を減じることを防止するために、それは水平位置にはない。このよ

10

20

30

40

50

うにして、凝縮物は重力により基本培地 60 へと戻ることができる。気体アクセスチャンネル 160 は凝集物をドレンポート 180 中に回収することができる。

この態様において、基本培アクセスポートキャップ 100 は通気されて、 O_2 および CO_2 が基本培地コンパートメント 30 へ移動し、そしてそこから移動することができる。もし、基本培地コンパートメント 30 の壁が非常に気体透過性であるならば、通気は必要ないであろう。

基本培地上部空間 170 を気体透過性フィルム 120 と連絡させる多くの他の方法がありうる。気体アクセスチャンネルカバー 170 が使用されるときには凝縮物または基本培地 60 が気体輸送を減じることを防止するように注意が払われるべきである。

気体透過性フィルム 120 のために使用される材料のタイプが所望の酸素圧を提供しないならば、図 6 に示す形態を使用することができる。可変酸素制御コンパートメント 190 は酸素制御コンパートメントの底 210 で水平位置に支持されている下側気体透過性フィルム 200 を含む。酸素制御コンパートメントアクセスポート 250 は液体レジスター 230 を可変酸素制御コンパートメント 190 中に導入することを可能にする。気体透過性フィルム 120 の底での酸素圧は、Fick の法則により、下側気体透過性フィルム 200 上にある液体の高さを変化させることにより注意深く制御されうる。下側透過性フィルム 200 は、非常に気体透過性のフィルムまたはシートであることができる。好ましい態様において、それは液体不透性である。酸素制御コンパートメントの底 210 は、下側気体透過性フィルム 200 の大半が周囲環境と連絡できるようになっている。下側気体透過性フィルム 200 と酸素制御コンパートメントの底 210 との間は気密シールが存在する。このシールは溶接、接着剤または他のいずれかの適切な方法により作られることができる。下側気体透過性フィルム 200 の上部と気体透過性フィルム 120 の下部との間の距離は好ましくは約 5 ~ 20 mm であろう。

好ましい態様において、細胞培養コンパートメントアクセスポート 70 中にある培地 50 の体積は、膜 20 と気体透過性フィルム 120 との間にある培地 50 の体積よりも少量であろう。もし膜 20 を横切って十分な浸透勾配ができれば、培地 50 からの水が細胞培養コンパートメント 40 へと移動することが可能である。これは、図 7 に示すような上側膜支持体 240 により補償されうる。上側膜支持体 240 は膜 20 の上側への移動を制限する。

膜 20 が、濡れたときに膨潤しまたは膨らむセルロースのような材料である場合に、それは上側膜支持体 240 で膜 20 を拘束することも望ましいであろう。上側膜支持体 240 は、培地 50 が細胞培養コンパートメント 40 に入るときに、膜 20 が上へ移動するのを止めるものである。培地 50 は上側膜支持体 240 に対して膜 20 を押圧し、しわを滑らかにする。

膜 20 中のしわは接種の際の細胞の不均一分布をもたらしうるものである。膜 20 がひどくしわになっているならば、培地 50 はしわの中に入るであろう。その後、気体透過性フィルム 120 の上の特定の領域は他よりも多量の培地 50 を有するであろう。接種体は培地 50 の全体にわたって均等に分布される。最終的に、これらの細胞は気体透過性フィルム 120 上に沈降する。より多量の培地 50 がある気体透過性フィルム 120 の領域はより多量の細胞を受けることになるであろう。それ故、膜 20 のしわは最小にされるべきである。

上側膜支持体 240 は、いずれの生体適合性材料であってもよい。好ましい態様において、それはコンパートメント付き細胞培養バッグが運転されていないときにロールされうるように可撓性であろう。ポリプロピレンはこのことを可能にするものである。それが透析を制限しないことを確保するように注意されるべきである。好ましい態様において、それは約 70 % ~ 90 % 開放されているべきである。

培地 50 の細胞培養コンパートメント 40 への導入は、基本培地 60 の流体静圧を打ち消すために十分な圧力を要求するであろう。これは、細胞培養アクセスポート 70 をピペット、シリンジ、または、バック若しくはボトルのような特定の他の培地容器と気密シールを形成するような形態にすることにより達成できる。培地 50 は同様に取り出すことができ

10

20

30

40

50

る。

全ての態様は、培地 50 の蒸発が膜 20 を培地 50 との接触を失わせることを防止する。膜 20 は培地 50 の上に本質的に浮いており、そして、培地 50 が気体透過性フィルム 120 を通して蒸発するときに、膜 20 は気体透過性フィルム 120 に単純に近づく。膜 20 は常に培地 50 と接触しているので透析の制限は起こらない。培地 50 が蒸発損失により減少するならば、それは周期的に補充されることができる。

細胞培養コンパートメント 40 の形状またはサイズに対する制約はないが、気体透過性フィルム 120 と膜 20 との有利な距離は、高濃度の細胞および細胞分泌物を得るために約 1 ～ 約 5 ミリメートルである。気体透過性フィルム 120 は実質的に平坦であり、そして水平であるときに、約 30×10^6 細胞 / cm^2 までの表面積は生存可能であると期待できる。これらの細胞は約 300 マイクロメートルの高さまで積み上げられる。この為、膜 20 は、膜 20 が気体透過性フィルム 120 から少なくとも約 1 mm 離れているときには、細胞を接触させ、そして閉塞させる危険性がない。

10

基本培地 60 の交換の頻度を最少にするために、基本培地 30 の体積は、気体透過性フィルム 120 の表面積に対してサイズ決定される。約 1,000,000 個の細胞 / ミリリットルの静置培養の浮遊細胞のためには、 1 cm^2 の気体透過性フィルム 120 当たりには約 5 ～ 10 ml の基本培地 60 が必要である。単層で成育させる足場依存性細胞を培養するときには、有利には、基本培地 60 の体積 (ミリリットル) が気体透過性フィルム 120 の表面積 (平方センチメートル) の少なくとも約 2 倍を越える。

細胞培養コンパートメント 40 の中およびそこから外への溶質の物質移動に影響を及ぼす要因は膜 20 の表面積を含む。一般的なガイドラインとして、膜 20 の表面積は気体透過性フィルム 120 の表面積と略等しいべきである。1 ～ 2 百万個の中程度の代謝活性の細胞が気体透過性フィルム 120 の 1 cm^2 当たりには支持されようとするような用途では、膜 20 の表面積を気体透過性フィルム 120 の表面積の約 $1/4 \sim 1/2$ に減じることができる。

20

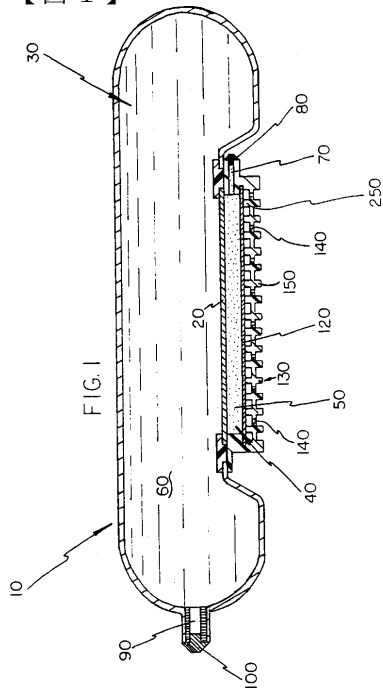
基本培地コンパートメント 30 のハウジングは、どんな可撓性の液体不透性の生体適合性の材料であってもよい。梱包に関する考慮に加えて、基本培地ハウジングの可撓性は、基本培地コンパートメント 30 中の液体または気体の温度が上昇するときに、この流体の膨張を補償する。培地の pH を決定し、または、可能な微生物汚染を検知するために培地が視覚的にモニターされうるように、ハウジングは光学的に透明であることが好ましい。その材料は、基本培地 60 の pH を調節するために CO_2 が移動できるように気体透過性であることも好ましい。推奨できるものはポリプロピレンおよびポリエチレンを含む。細胞培養コンパートメント 40 の製造は超音波溶接、機械ファスナー、溶剤接着、または漏れ防止一体性を提供する他のいずれかの方法により行われることができる。気体透過性フィルム 120 および膜 20 はオーリング、ガスケット、溶接、接着剤、または漏れ防止一体性を提供する他のいずれかの方法によりシールされうる。好ましい態様において、コンパートメント付き細胞培養バッグ 10 中に使用される全ての材料はガンマー滅菌できるものである。

30

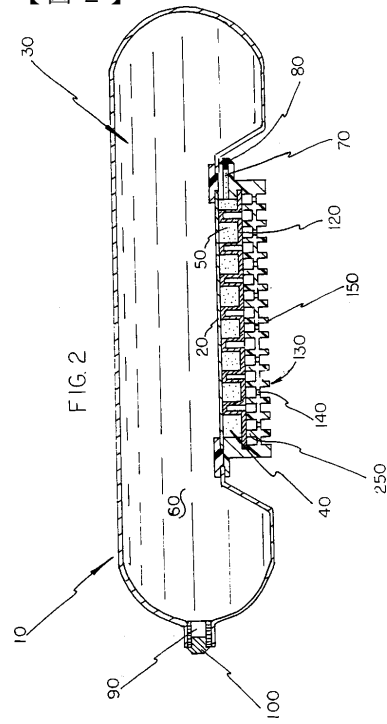
当業者は、本発明の精神を逸脱することなく多くの変更がなされたと評価するであろう。それ故、本発明の範囲を例示しそして記載した態様に制限することは意図されない。むしろ、本発明の範囲は添付の請求の範囲およびその等価物により決められるべきである。

40

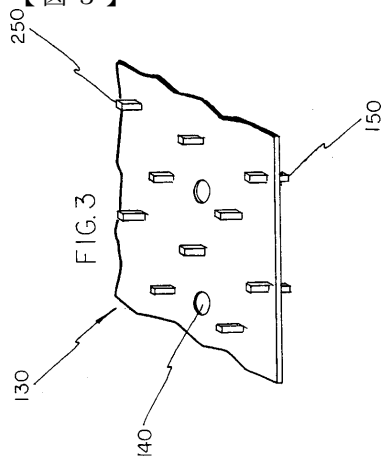
【 図 1 】



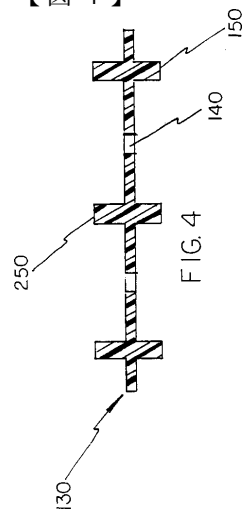
【図 2】



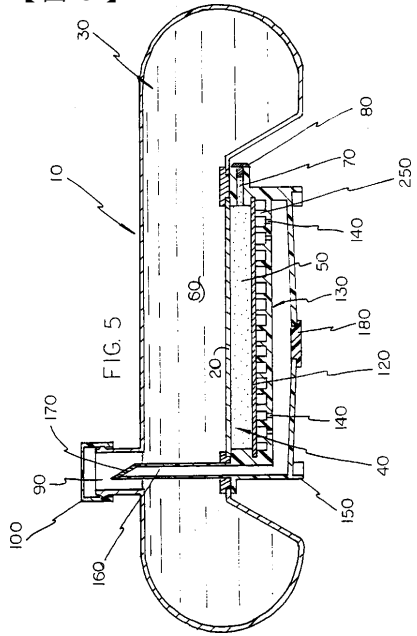
【図 3】



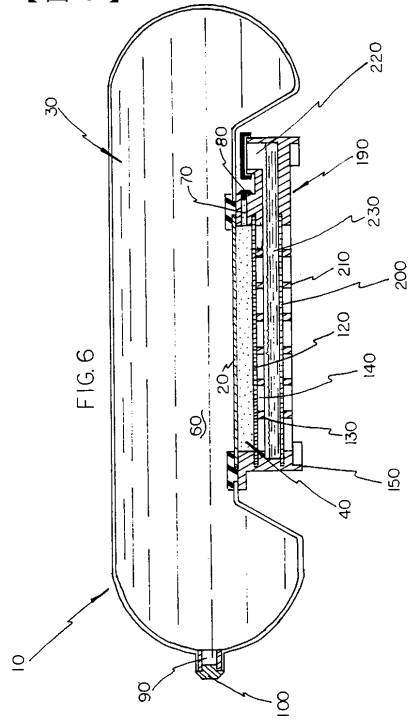
【图 4】



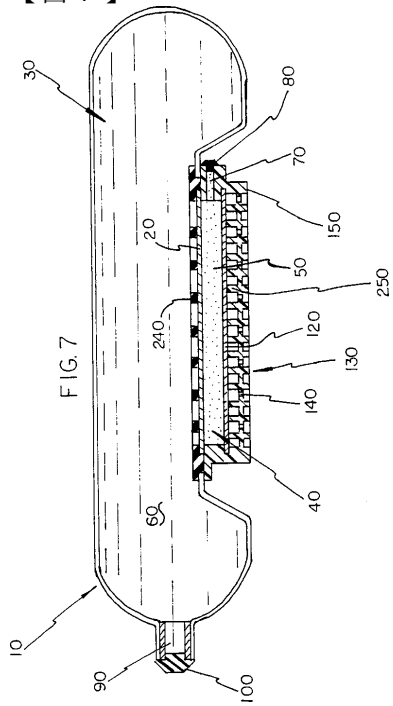
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 戸田 利雄

(74)代理人

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ウォルフ, マーティン エル.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55108, セントポール, ケストン ストリート 1280

(72)発明者 ウィルソン, ジョン アール.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55112, ニューブライトン, ウィンザー レーン 173

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特開昭62-228269 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12M 1/00 - 3/10

C12P 1/00 - 41/00

C12N 1/00 - 7/08

PubMed, MEDLINE (STN)

BIOSIS/WPI (DIALOG)