

(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
2025年1月23日(23.01.2025)



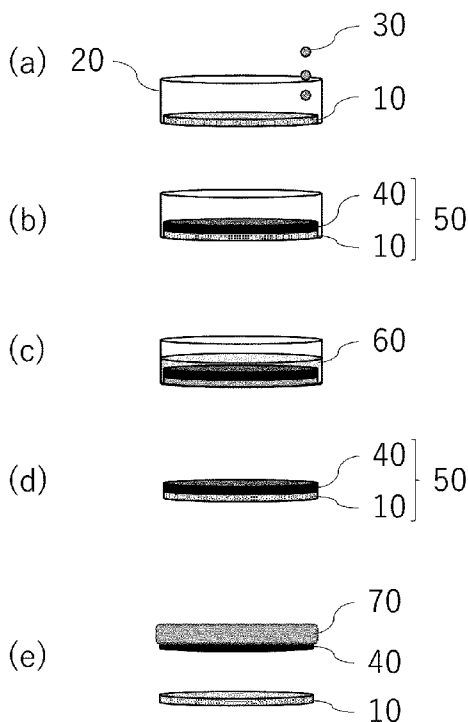
(10) 国際公開番号

WO 2025/018249 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 11/08 (2020.01)
C12M 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/024961
- (22) 国際出願日: 2024年7月10日(10.07.2024)
- (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 2023-115623 2023年7月14日(14.07.2023) JP
特願 2023-220506 2023年12月27日(27.12.2023) JP
- (71) 出願人: セントラル硝子株式会社
(CENTRAL GLASS COMPANY, LIMITED) [JP/
JP]; 〒7550001 山口県宇部市大字沖宇部
- 5 2 5 3 番地 Yamaguchi (JP). 国立大学
法人山口大学 (YAMAGUCHI UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6
7 7 - 1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 河合 亘(KAWAI Wataru); 〒1010054 東
京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 セン
トラル硝子株式会社内 Tokyo (JP). 吉田 佳汰
(YOSHIDA Keita); 〒1010054 東京都千代田区
神田錦町 3 丁目 7 番地 1 セントラル硝子株
式会社内 Tokyo (JP). 中西 由貴(NAKANISHI
Yuki); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3
丁目 7 番地 1 セントラル硝子株式会社内
Tokyo (JP). 濱野 公一(HAMANO Kimikazu);
〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1
国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi
(JP). 上野 耕司(UENO Koji); 〒7558505 山口

(54) Title: GRAFT METHOD, CULTURE CARRIER SUBSTRATE, PACKAGE, CULTURE CARRIER SUBSTRATE EQUIPPED WITH CELL SHEET, METHOD FOR PRODUCING CULTURE CARRIER SUBSTRATE EQUIPPED WITH CELL SHEET, CRYOPRESERVATION METHOD, AND FROZEN PRODUCT OF CULTURE CARRIER SUBSTRATE EQUIPPED WITH CELL SHEET

(54) 発明の名称: 移植方法、培養キャリア基材、包装体、細胞シート付き培養キャリア基材、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法、凍結保存方法、および細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物



(57) Abstract: A graft method according to the present invention comprises: a culture step in which a cell sheet is cultured on a culture surface of a culture carrier substrate; and a graft step in which the cell sheet formed on the culture surface of the culture carrier substrate is attached to a recipient site, after which the culture carrier substrate is detached from the cell sheet.

(57) 要約: 本発明の移植方法は、培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、培養キャリア基材の培養面に形成された細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、細胞シートから培養キャリア基材を剥離する、移植工程と、を含むものである。

県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人
山口大学医学部内 Yamaguchi (JP).

(74) 代理人: 速水 進治 (HAYAMI Shinji); 〒1410031
東京都品川区西五反田7丁目9番2号 K
DX五反田ビル9階 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

移植方法、培養キャリア基材、包装体、細胞シート付き培養キャリア基材、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法、凍結保存方法、および細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物

技術分野

[0001] 本発明は、移植方法、培養キャリア基材、包装体、細胞シート付き培養キャリア基材、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法、凍結保存方法、および細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物に関する。

背景技術

[0002] これまで移植技術の技術要素を構成する、細胞シートの「培養」と「搬送」について様々な開発がなされてきた。この種の技術として、例えば、特許文献1に記載の技術が知られている。

特許文献1の背景技術には、細胞シートを、目的とする患部に移植するには、温度応答性材料の上で培養した細胞シートを温度変化により剥離させ、得られた細胞シートに別途用意したシートを被せて該シートに細胞シートを付着させた状態で容器から取り出し、患部まで搬送し、その患部に移植（貼付）するといった一連の操作が必要になることが記載されている。

[0003] これに対して、特許文献1の請求項1や段落0007等には、温度応答性高分子層を有する細胞培養容器で培養した細胞シートを搬送させる方法として、細胞培養容器の底部を、細胞シートが付着した状態のまま剥離して、剥離した底部と共に底部に付着した細胞シートを搬送させる技術が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2016-013111号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、本発明者が検討した結果、特許文献1の技術を活用した移植方法において、温度応答性高分子層から細胞シートを剥離する際に細胞シートと基材との密着状態を低温処理により解除する必要があること、または、低温処理により基材と細胞シートとの密着性が低下することから、温度応答性高分子層を有する細胞培養容器で培養した細胞シートを、温度応答性高分子層を有する細胞培養容器に接着させた状態での凍結保存が難しいこと等が判明した。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、鋭意検討した結果、個別に検討されてきた細胞シートの「培養」と「搬送」とを統合した新しいコンセプトに着想して、移植方法および培養キャリア基材等を具体化し、本発明を完成するに至った。

[0007] 本発明の一態様によれば、以下の移植方法、培養キャリア基材、包装体、細胞シート付き培養キャリア基材、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法、凍結保存方法、および細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物が提供される。

1. 培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、前記培養キャリア基材の前記培養面に形成された前記細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、前記細胞シートから前記培養キャリア基材を剥離する、移植工程と、を含む、移植方法。

2. 1. に記載の移植方法であって、前記培養キャリア基材の基材厚みが5 μ m以上250 μ m以下であり、前記培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムであり、前記培養キャリア基材の前記培養面は親水化処理がなされている、移植方法。

3. 1. または2. に記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の基材厚みが10 μm 超であり、前記培養工程において、前記培養キャリア基材が培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、移植方法。

4. 1. ~ 3. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記移植工程において、貼り付けた後から剥離するまでの時間が、10分以下である、移植方法。

5. 1. ~ 4. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養工程により得られた前記細胞シートの面積が、0.3 cm^2 以上である、移植方法。

6. 培養面に培養された細胞シートを搬送するために用いられる、培養キャリア基材であって、

当該培養キャリア基材の基材厚みが5 μm 以上250 μm 以下である、培養キャリア基材。

7. 6. に記載の培養キャリア基材であって、

前記培養キャリア基材の基材厚みが10 μm 超であり、前記細胞シートの培養中に培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、培養キャリア基材。

8. 6. または7. に記載の培養キャリア基材であって、

前記培養面が、親水化処理がなされている、培養キャリア基材。

9. 8. に記載の培養キャリア基材であって、

前記親水化処理は、プラズマ処理された、培養キャリア基材。

10. 6. ~ 9. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、

当該培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムである、培養キャリア基材。

11. 6. ~ 10. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、

前記培養面が、温度応答性ポリマーを含まない、培養キャリア基材。

12. 6. ~ 11. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材を包装材料で包装した包装体。

13. 6. ~ 11. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材と、細胞シートとの積層体を有しており、

前記細胞シートが、前記培養キャリア基材の前記培養面側における表面の少なくとも50%を被覆した状態である、細胞シート付き培養キャリア基材。

14. 13. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記細胞シートの面積が、 0.3 cm^2 以上である、細胞シート付き培養キャリア基材。

15. 培養容器の内部に、複数の細胞、培地、および6. ~ 11. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材を導入して、前記培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、

前記培養容器から、前記細胞シート付きの前記培養キャリア基材を取り出す、取出工程と、を含む、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

16. 15. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法であって、

前記培養工程において、前記培養キャリア基材を培養容器の内部に固着せずに、前記細胞シートを培養する、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

17. 15. または16. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法であって、

前記取出工程において、前記培養容器から前記培養キャリア基材を物理的手段により分離する操作が不要である、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

18. 培養キャリア基材と前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シートとを含む細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保存液中で冷却する冷却工程を含む、凍結保存方法。

19. 18. に記載の凍結保存方法であって、

前記冷却工程において、前記細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保

存液中で非貫流式の冷却装置を用いて冷却する、凍結保存方法。

20. 18. または19. に記載の凍結保存方法であって、

前記冷却工程において、0～-5℃における冷却速度が、0.1℃/分以上1.5℃/分以下である、凍結保存方法。

21. 18. ～20. のいずれか一つに記載の凍結保存方法であって、

前記冷却工程の後、-196～-60℃にて前記細胞シート付き培養キャリア基材を保存する、凍結保存工程を含む、凍結保存方法。

22. 培養キャリア基材と、

前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シート、を含み

前記培養キャリア基材および前記細胞シートが凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。

23. 22. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、

-196℃～-60℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。

24. 22. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、

-196℃～-135℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。

25. 22. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、

-134℃～-60℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。

26. 22. ～25. のいずれか一つに記載の凍結物を包装材料で包装した包装体。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、細胞シートの培養と搬送との両方が可能な移植方法、培養キャリア基材、包装体、細胞シート付き培養キャリア基材、細胞シート付

き培養キャリア基材の製造方法、凍結保存方法、および細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物が提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本実施形態の移植方法の工程の一例を模式的に示す工程断面図である。

[図2]本実施形態の細胞シート付きキャリア基材の構成の一例を模式的に示す断面図である。

[図3]本実施形態の凍結方法の変形例を模式的に示す工程断面図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施の形態について、図面を用いて説明する。なお、すべての図面において、同様な構成要素には同様の符号を付し、適宜説明を省略する。また、図は概略図であり、実際の寸法比率とは一致していない。

[0011] <移植方法>

本実施形態の移植方法は、培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、培養キャリア基材の培養面に形成された細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、細胞シートから培養キャリア基材を剥離する、移植工程と、を含む。

[0012] 被移植部位は、例えば、哺乳類、鳥類、両生類、魚類、昆虫、植物、微生物などの移植対象者における体の少なくとも一部が挙げられる。哺乳類及び鳥類の具体例としては、例えば、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット、ニワトリなどが挙げられる。ただし、被移植部位は、ヒトの身体の内部および外部を除外してもよい。移植対象者以外の被移植部位として、例えば、他の細胞シート、医療器具などの器具、移植対象者から分離された状態の組織単独または器官単独などが挙げられる。組織単独または器官単独の例としては、皮膚、口腔内組織、食道、気管、気管支、肺、肺葉、胃、十二指腸、すい臓、脾臓、小腸、大腸、筋組織、骨等が挙げられる（ただし、移植対象者から採取したものと同一人に治療のために戻すものを除く）。

[0013] 本実施形態の移植方法について、図1を用いて具体的に説明する。

図1は、移植方法の工程の一例を模式的に示す工程断面図である。図1中、(a)は細胞播種、(b)は細胞培養、(c)は凍結保存・解凍、(d)は取出、(e)は貼付、の各プロセスを示す。(c)の凍結保存・解凍は任意のプロセスである。ここでは(c)を実施しない移植方法を説明し、(c)の詳細は後述の〈凍結保存方法〉で説明する。

[0014] 培養工程は、図1(a)に示される細胞播種工程、および図1(b)に示される細胞培養工程を含んでもよい。図2には、培養工程で得られた細胞シート付き培養キャリア基材50の一例の断面模式図を示す。

図1(a)の細胞播種工程では、培養容器20中に設置した培養キャリア基材10に、細胞を含む培養液30を接触させる。細胞は、培養液30に予め懸濁しておいてもよいが、細胞を含む細胞懸濁液を培養液30に加えてもよい。

培養キャリア基材10は、培養工程中、その一部または全体が培養液30中に浸漬した状態としてもよい。具体的には、細胞播種工程では、培養キャリア基材10の表面の一部に培養液30を滴下してもよいが、培養キャリア基材10の培養面12および側面のそれぞれの少なくとも一部が培養液30に接触した状態となるように、培養キャリア基材10を培養液30中に浸漬してもよい。後者の浸漬方法の方が、前者の滴下方法と比べて、次の細胞培養工程中の培養環境を安定的に維持することが可能になる、および／または、培養キャリア基材10の培養面12の面積化を図ることが可能になる。

[0015] 図1(b)の細胞培養工程では、適当な培養条件下で培養を行い、培養キャリア基材10の培養面12上に細胞シート40を形成する。培養時には蓋(図示せず)をして培養してもよい。

[0016] 細胞培養工程において、培養キャリア基材10を培養容器20の内部に固着せずに、細胞シート40を培養することができる。このとき、培養キャリア基材10は、細胞培養時に自立膜として機能する。培養キャリア基材10が固着されていないため、取出工程において、培養容器20からの細胞シート付き培養キャリア基材50を簡便に取り出すことが可能になる。また、取

出時における細胞シート40の破損も抑制できる。ここで、固着とは、取出時に物理的手段によって引き剥がし操作が必要な程度に密着した状態を言う。自重以外の荷重で押さえつけて動かないようにする固定手段は、ここでいう「固着」手段には含まれない。

本明細書において、物理的手段とは、例えば、フィルムを把持しながら引き剥がす方法やナイフ等で傷つけて剥がす方法等が挙げられる。

なお、培養キャリア基材10を固着せずに、培養液30中に浸漬する方法の一つとして、培養キャリア基材10の比重を培養液30よりも大きくする方法、培養キャリア基材10の培養面12の一部に対して重りにより荷重固定する方法、あるいは、培養キャリア基材10を器具により位置固定する方法等の一つ又は二つ以上を採用してもよい。すなわち、上記細胞培養工程中、荷重固定および／または位置固定により、培養キャリア基材10を培養液30中に浸漬した状態で細胞培養することができる。

[0017] 移植工程は、図1(d)に示される細胞シート付き培養キャリア基材50の取出工程、および図1(e)に示される細胞シート40の貼付工程を含んでもよい。

図1(d)の取出工程では、培養容器20から、細胞シート付き培養キャリア基材50を取り出し、例えば、被移植部位等の所望の場所まで搬送させる。

本実施形態の取出工程では、取出方法はとくに限定されないが、例えば、細胞シート付き培養キャリア基材50を構成する培養キャリア基材10をつまんで取り出す方法、培養キャリア基材10を吸引ノズルに接触させて吸引しながら持ち上げる方法、培養キャリア基材10を糸掛けして引き上げる方法等が挙げられる。

[0018] 図1(e)の貼り付け工程では、細胞シート付き培養キャリア基材50の細胞シート40を被移植部位70に貼り付けた後、細胞シート40から培養キャリア基材10を剥離する。

[0019] 本実施形態では、貼り付け工程において、貼り付けから剥離までの時間を

短時間化することが可能である。短時間化することで、異物として、長時間さらされないので、基材フィルムに対して免疫的に拒絶反応が起こるリスク低減、細胞が死ぬ可能性低減、操作が簡便になる。開胸して体内に細胞シートを貼り付けるような手術にも使用できる。

貼り付けから剥離までの時間は、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下、さらに好ましくは3分以下、一層好ましくは1分以下である。

詳細なメカニズムは定かではないが、培養キャリア基材10の培養面12と細胞シート40の表面との密着が適度な強さであるため、細胞シート40が被移植部位70に対して生物的に結合する前でも、細胞シート40から培養キャリア基材10を剥離可能であると推察される。

[0020] また、本実施形態では、剥離後、培養キャリア基材10の上に細胞シート40が残存することを抑制できる。剥離後の培養キャリア基材10上の細胞シート40の残存率は、面積比換算で、好ましくは50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは10%以下である。

[0021] 細胞移植療法は、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止するものである。細胞移植療法の対象疾患としては、例えば、脊髄損傷、膝関節軟骨損傷、虚血性心疾患、加齢黄斑変性、角膜上皮幹細胞疲弊症、再生不良性貧血、重症下肢虚血、難治性皮膚潰瘍、術後合併症予防（例えば、各種臓器の縫合不全、気管支断端瘻、脾液瘻、胆汁漏）、熱傷などが挙げられる。

また、細胞移植療法に用いる細胞は、自己由来細胞、同種非自己由来細胞、異種由来細胞であってもよい。好ましい細胞としては、臨床応用及び安全性の観点から自己由来細胞であり、臨床応用及び生産性の観点から、非自己由来細胞である。

[0022] 以下、移植方法の各工程における要素を説明する。

[0023] (培養容器)

培養容器20は、培養液中で細胞を培養するための容器であり、培養する細胞の種類及び用途に適したものであれば、特に制限されるものではない。

培養容器20としては、例えば、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、フラスコ、組織培養用フラスコ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルなどが挙げられる。

また培養容器20は、表面処理された細胞接着性を付与された培養容器（接着細胞用）でも、表面処理されていない培養容器（浮遊細胞用）でもよい。培養容器20の表面処理の有無は、培養キャリア基材10には影響しない。以降、特に明記しない場合は、どちらでも使用ができる。

[0024] 培養容器20の素材としては、培養液30を透過させないものであれば、特に制限されるものではないが、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリエチレンテレフタレート、ポリアセタール、ポリ塩化ビニル、アクリル樹脂、ポリカーボネート、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリイミド、ポリアミド、セルロース、シリコーン、ナイロン6, 6、ガラス、ステンレスやアルミニウムなどの金属などが挙げられる。

[0025] 培養容器20の面積は、特に制限されるものではないが、市販されている培養容器の面積であれば問題なく培養を行える。例えば、 0.3 cm^2 以上 1000 cm^2 以下である。下限値としては、より好ましくは 0.35 cm^2 以上、更に好ましくは 1.0 cm^2 以上、特に好ましくは 1.9 cm^2 以上である。一方、上限値としては、より好ましくは 900 cm^2 以下、更に好ましくは 800 cm^2 以下、特に好ましくは 500 cm^2 以下である。

[0026] (細胞)

細胞は、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状を治療又は予防するための臨床上有用な細胞、非臨床試験などで使用する培養可能な細胞であって、生体から分離された細胞あれば、特に制限されるものではない。

細胞としては、例えば、生体組織細胞、間葉系組織に属する細胞に分化す

る能力を有する間葉系幹細胞、様々な生体組織に分化する能力を有する多能性幹細胞、分化誘導される幹細胞や前駆細胞などが挙げられる。なお、細胞は、接着細胞であっても浮遊細胞であってもよい。

[0027] 生体組織細胞の具体例としては、例えば、線維芽細胞、筋線維芽細胞、角膜上皮細胞、網膜細胞、神経細胞、筋細胞、心筋細胞、筋芽細胞、骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、内皮細胞などが挙げられる。

間葉系幹細胞の具体例としては、例えば、脂肪組織由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞、臍帯由来間葉系幹細胞などが挙げられる。

多能性幹細胞の具体例としては、例えば、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、核移植胚性幹細胞、胚性腫瘍細胞、胚性生殖細胞などが挙げられる。

また、これらの細胞は、単独で培養してもよいし、二種以上を組み合わせることで培養してもよい。これらの細胞については、細胞の用途などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0028] なお、細胞の由来は、特に制限されるものではないが、例えば、哺乳類、鳥類、両生類、魚類、昆虫、植物、微生物などが挙げられる。哺乳類及び鳥類の具体例としては、例えば、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット、ニワトリなどが挙げられる。

[0029] (培養条件)

細胞培養は、特に制限されるものではなく、医療、医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、動物用薬品などの技術分野、及び再生医療、生物学などの基礎技術分野において使用されている通常の手段を用いることができる。

[0030] 培養条件は、培養細胞を目的とする状態にできるのであれば、特に制限されるものではない。一般的な培養条件としては、例えば、調製した基礎培養液を用いた37℃、5%CO₂の環境下である。

細胞培養の期間は、培養細胞が目的とする状態になるのであれば、特に制

限されるものではない。細胞培養の期間としては、例えば、28日以内、21日以内、14日以内、7日以内、5日以内、3日以内である。長期間培養する際は、培地交換しても良い。培地交換の頻度と方法は特に制限されるものではない。一般的には1日～7日毎に交換することが好ましい。特に好ましくは、1日～5日である。この時、全量培地を交換しても良く、一部培地を残し、新しい培地を加えても良い。

[0031] 培養する細胞の密度は、培養する細胞、培養容器、培養細胞の用途に適したものであれば、特に制限されるものではないが、例えば、 5×10^2 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下である。細胞密度の下限値としては、より好ましくは 1×10^3 細胞/cm²以上、更に好ましくは 5×10^3 細胞/cm²以上、特に好ましくは 5×10^4 細胞/cm²以上である。一方、細胞密度の上限値としては、より好ましくは 1×10^8 細胞/cm²以下、更に好ましくは 5×10^7 細胞/cm²以下、特に好ましくは 1×10^7 細胞/cm²以下である。

培養する細胞の密度は例えば、 5×10^2 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下、 5×10^2 細胞/cm²以上 1×10^8 細胞/cm²以下、 5×10^2 細胞/cm²以上 5×10^7 細胞/cm²以下、 5×10^2 細胞/cm²以上 1×10^7 細胞/cm²以下、 1×10^3 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下、 1×10^3 細胞/cm²以上 1×10^8 細胞/cm²以下、 1×10^3 細胞/cm²以上 5×10^7 細胞/cm²以下、 1×10^3 細胞/cm²以上 1×10^7 細胞/cm²以下、 5×10^3 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下、 5×10^3 細胞/cm²以上 1×10^8 細胞/cm²以下、 5×10^3 細胞/cm²以上 5×10^7 細胞/cm²以下、 5×10^3 細胞/cm²以上 1×10^7 細胞/cm²以下、 5×10^4 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下、 5×10^4 細胞/cm²以上 1×10^8 細胞/cm²以下、 5×10^4 細胞/cm²以上 5×10^7 細胞/cm²以下、 5×10^4 細胞/cm²以上 1×10^7 細胞/cm²以下である。

[0032] (培養液)

培養液30は、培養する細胞に適したものであれば、特に制限されるものではない。培養液成分としては、例えば、糖類、アミノ酸、ビタミン類、無機塩、微量元素、添加物などが挙げられる。

また、これらの培養液成分は、単独で配合してもよいし、二種以上を組み合わせ合わせて配合してもよい。これらの培養液成分については、培養する細胞などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0033] 糖類の具体例としては、例えば、グルコースやフルクトース、マンノース、ガラクトースなどの単糖類、スクロースやスクラロース、トレハロース、マルトース、ラクトースなどの二糖類、グルコシルスクロースやラクトスクロース、ラフィノースなどの三糖類、アカルボースやマルトテトラオースなどの四糖類、シクロデキストリン、オリゴ糖などが挙げられる。

[0034] アミノ酸の具体例としては、例えば、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、L-シスチン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-ヒドロキシプロリンなどが挙げられる。

[0035] ビタミン類の具体例としては、例えば、L-アスコルビン酸ナトリウム、L-アスコルビン酸-ニリン酸、コリン、葉酸、ナイアシン、ビオチン、パントテン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、チミジン、ビタミンB12などが挙げられる。

[0036] 無機塩の具体例としては、例えば、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化カリウム、水酸化カリウム、硫酸カリウム、リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、硝酸カルシウム、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。

微量金属の具体例としては、例えば、硫酸鉄、硝酸鉄、硫酸銅、硝酸銅、硫酸亜鉛などが挙げられる。

[0037] 添加物の具体例としては、例えば、ウシ血清やウマ血清、ヒト血清などの血清、FGF2やEGF、HGF、VEGF、PDGFなどの増殖因子、アルブミンなどのタンパク質、グルタチオンやアスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体などの抗酸化剤、ペニシリンやストレプトマイシンなどの抗生物質、HEPESなどのpH調整剤、乳酸やプロピオン酸などの有機酸、コレステロールなどの脂質、リノレン酸などの脂肪酸、エタノールアミンやプトレシンなどのアミン類、メルカプトエタノールや3-メルカプト-1, 2-プロパンジオールなどの還元剤、アルギン酸ナトリウムやポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、プルランなどの増粘剤、フェノールレッドなどのpH指示薬などが挙げられる。

[0038] 上記の培養液成分を含有する培養液30としては、例えば、AIM V medium、HFDM-1 Medium、ダルベッコリン酸緩衝食塩液(D-PBS)やハンクス平衡塩溶液(HBSS)などの平衡緩衝液、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)やEMEM(Eagle's Minimum Essential Medium)、 α -MEM(Minimum Essential Medium alpha Modification)、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、GMEM(Glasgow's MEM)、Ham's F-10 medium、Ham's F-12 medium、Ham's F-12K medium、RPMI medium 1640、M-199 medium、L-15 medium、McCoy's 5A Medium、MCDB105 medium、MCDB107 medium、MCDB131 medium、MCDB153 medium、MCDB201 medium、NCTC109 medium、NCTC135 medium、Weymouth's MB752/1 medium、CMRL-10

66 medium、Williams' medium E、Brinster's BMOC-3 Medium、E8 mediumなどの基礎培養液などが挙げられる。

また、これらの基礎培養液は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。さらに、基礎培養液は、細胞の種類や状態に応じて、培養液成分を追加、除去、増量、減量してもよい。これらの基礎培養液については、培養する細胞などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0039] (細胞シート)

細胞シート40は、細胞同士が接着分子、細胞外マトリックスなどを介して物理的、機能的に連結してシート構造を有するものである。

細胞シート40は、1の細胞層から構成される単層構造であってもよいし、2以上の細胞層から構成される積層構造でもよい。積層構造としては、特に制限されるものではないが、2層、3層、4層、5層などの多層構造が挙げられる。

[0040] 細胞シート40が多層構造を持つ場合、培養キャリア基材10で培養した際に多層構造が得られることもあるし、単層構造を持つ細胞シートを積層して得ることもできる。特に、本発明の細胞シート付き培養キャリア基材50を複数用意し、ある細胞シートの上に別の細胞シートを重ね合わせ、別の細胞シートから培養キャリア基材を剥がすことで、多層構造を持つ細胞シートを得ることができる。

[0041] 細胞シート40の厚みは、特に制限されるものではないが、例えば、0.001mm以上2.0mm以下である。細胞シート40の厚みの下限値としては、より好ましくは0.01mm以上、更に好ましくは0.03mm以上、特に好ましくは0.05mm以上である。一方、細胞シート40の厚みの上限値としては、より好ましくは1.5mm以下、更に好ましくは1.2mm以下、特に好ましくは1.0mm以下である。細胞シート40の厚みは例えば、0.001mm以上2.0mm以下、0.001mm以上1.5mm以下、0.001mm以上1.2mm以下、0.001mm以上1.0mm

以下、0.01mm以上2.0mm以下、0.01mm以上1.5mm以下、0.01mm以上1.2mm以下、0.01mm以上1.0mm以下、0.03mm以上2.0mm以下、0.03mm以上1.2mm以下、0.03mm以上1.0mm以下、0.05mm以上2.0mm以下、0.05mm以上1.5mm以下、0.05mm以上1.2mm以下、0.05mm以上1.0mm以下である。細胞シート40の厚みを上記範囲とすることにより、細胞シート40内での高い細胞活性率、及び細胞移植に有利な優れた形状維持能を発揮することができる。

[0042] 細胞シート40の面積は、特に制限されるものではないが、例えば、0.3cm²以上1000cm²以下である。細胞シート40の面積の下限値としては、より好ましくは0.6cm²以上、更に好ましくは1.6cm²以上、特に好ましくは8cm²以上であり、3cm²以上、6cm²以上又は10cm²以上であってもよい。一方、細胞シート40の面積の上限値としては、より好ましくは900cm²以下、更に好ましくは800cm²以下、特に好ましくは500cm²以下であり、100cm²以下、50cm²以下又は20cm²以下であってもよい。例えば、細胞シート40の面積は、0.6cm²以上900cm²以下、1.6cm²以上800cm²以下、3cm²以上500cm²以下、6cm²以上100cm²以下、8cm²以上50cm²以下又は10cm²以上20cm²以下である。従来、細胞シート単独での移植の際は、細胞シートの強度は低いため、大面積の場合は搬送時に破損する可能性が高かったが、本開示においては、細胞シート40が培養キャリア基材に支持されているため、移植時に細胞シートが破れることを防ぐことができるため、細胞シート40の大きさを8cm²以上に大きくできる。また、大きく細胞シートを作製し、適宜患部のサイズに調製して使用することもできる。

なお、培養キャリア基材の形状は、図1において円形が示されているが、円形以外の適宜の形状であってもよく、例えば正方形、正五角形、正六角形、正八角形等の正多角形や、長円形、矩形等であってもよい。

[0043] <培養キャリア基材>

本実施形態の培養キャリア基材10は、細胞を培養して細胞シート40を形成するための細胞シート足場材と、培養された細胞シート40を運搬する細胞シート支持体との両方に用いられ、細胞シートの被移植部位への貼付後に前記細胞シートから剥離される基材である。

[0044] 培養キャリア基材10の面積は、特に制限されるものではないが、培養容器より小さく、細胞シートと同じもしくは大きいことが望まれる。例えば、 0.3 cm^2 以上 1000 cm^2 以下である。培養キャリア基材10の面積の下限値としては、より好ましくは 0.6 cm^2 以上、更に好ましくは 1.6 cm^2 以上、特に好ましくは 8 cm^2 以上であり、 3 cm^2 以上、 6 cm^2 以上又は 10 cm^2 以上であってもよい。一方、培養キャリア基材10の面積の上限値としては、より好ましくは 900 cm^2 以下、更に好ましくは 800 cm^2 以下、特に好ましくは 500 cm^2 以下であり、 100 cm^2 以下、 50 cm^2 以下又は 20 cm^2 以下であってもよい。培養容器より大きい場合は、細胞シートが得られない可能性がある。例えば、培養キャリア基材10の面積は、 0.6 cm^2 以上 900 cm^2 以下、 1.6 cm^2 以上 800 cm^2 以下、 3 cm^2 以上 500 cm^2 以下、 6 cm^2 以上 100 cm^2 以下、 8 cm^2 以上 50 cm^2 以下又は 10 cm^2 以上 20 cm^2 以下である。

[0045] 培養キャリア基材10の基材厚みは、とくに限定されないが、好ましくは $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $250\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。基材厚みの下限値としては、より好ましくは $6\text{ }\mu\text{m}$ 以上、さらに好ましくは $8\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $12\text{ }\mu\text{m}$ 以上である。一方、基材厚みの上限値としては、より好ましくは $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 以下、 $25\text{ }\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。例えば、培養キャリア基材10の基材厚みは、 $6\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下、 $8\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $30\text{ }\mu\text{m}$ 以下、又は $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。

上記下限値以上とすることにより、培養キャリア基材10が搬送時に破れたり丸まってしまったりすることを防ぎ、取り扱い性を向上できる。上記上限値以下とすることにより、移植時に患部への追従性を向上できる。特に基材厚みを $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすると、より曲率の高い患部への追従性を高めるこ

とができ、例えば、手術により体内の器官を縫合した箇所などにも適用できる。

[0046] また、培養時における自立膜として機能する観点から、培養キャリア基材 10 の基材厚みの下限は、 $10\ \mu\text{m}$ 越えが好ましく、 $11\ \mu\text{m}$ 以上がより好ましく、 $12\ \mu\text{m}$ 以上がさらに好ましい。これにより、基材厚みが $10\ \mu\text{m}$ 越えの培養キャリア基材 10 を用いることにより、細胞培養工程時において、培養キャリア基材 10 を培養容器 20 の内部に固定または固着しない状態で、細胞シート 40 を製造することが可能となる。

自立膜とは、培養キャリア基材 10 の培養面 12 の平面状態が、培養液 30 中でも維持される膜であることが好ましく、培養面 12 上に細胞シート 40 が形成された後も平面状態が維持されることがより好ましい。培養面 12 の平面状態が維持されるため、丸まらない培養キャリア基材 10 は、固着しないで培養液 30 中での細胞培養特性を高められる。

また、この自立膜は、鑷子で一端を掴んで持ち上げたとき、シート形状を一定程度保持できるものであってもよい。その際、培養キャリア基材 10 の面積は $1.6\ \text{cm}^2$ 以上であることが好ましい。

[0047] 培養キャリア基材 10 の培養面 12 は、親水化処理が施されていることが好ましい。これにより、細胞密着性を向上できる。この親水化処理は、例えば、UV オゾン処理、プラズマ処理等が挙げられる。

この中でも、培養面 12 がプラズマ処理された培養キャリア基材 10 を用いることが好ましい。

本明細書において、親水化された面とは、 $\theta/2$ 法で測定された水滴接触角 θ の上限が 70° 以下である表面を意味する。一方、親水化された面の水滴接触角 θ の下限は 3° 以上が好ましいが、これに限定されない。水滴接触角 θ は、基材に、 25°C 環境下、 $2\ \mu\text{l}$ の純水を置き、ISO 19403-2:2017 に準拠した $\theta/2$ 法にて、水滴と基材とのなす角を接触角計で測定する。

また、親水化処理された培養面の表面粗さ R_a の下限が、 $0.3\ \text{nm}$ 以上

、好ましくは0.5 nm以上であり、上限が100 nm以下、好ましくは10 nm以下、より好ましくは2 nm以下である。

なお、ここでの表面粗さR_aとは、原子間力顕微鏡（AFM）にて測定した表面形状データを用いて、一辺100 nmの正方形の領域における算術平均粗さを指す。

[0048] 培養キャリア基材10を構成する材料として、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリスチレン（PS）、ポリカーボネート（PC）、変性ポリフェニレンエーテル（mPPE）、ポリフェニレンスルフィド（PPS）、ポリスルフォン（PSU）、ポリアリレート（PAR）、液晶ポリマー（LCP）、ポリエチレン（PE）、ポリプロピレン（PP）等の樹脂材料が挙げられる。

培養キャリア基材10の一例は、これらの樹脂材料の少なくとも一つを主成分に含むフィルムで構成されていてもよく、好ましくはポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルム、より好ましくはポリエーテルエーテルケトンフィルムである。

培養キャリア基材10は、上記樹脂材料からなる樹脂層を1層または2層以上含むものが好ましい。2層以上の樹脂層は、互いに異なる種類の材料を含んでもよい。

培養キャリア基材10は、上記材料からなる樹脂層を含む樹脂基材からなる構成であってもよく、上記材料からなる樹脂層と他の材料からなる無機層とを含むラミネート基材からなる構成でもよい。ただし、樹脂層には、パリレンなどの化学蒸着によって形成される層やウェットコーティング層は含まなくてよい。また、ラミネート基材における無機層は、ガラス層を含まないことが好ましく、金属箔を含んでもよい。また、培養キャリア基材10は、培養面12側に不織布および繊維基材を含まないことが好ましい。

PEEKを含む培養キャリア基材10は、低線膨張係数、耐溶剤性、耐熱性の観点から総合的に検討すると、PETを含む場合と比べて好ましい。

また、培養キャリア基材10は、培養液30よりも比重が高い材料で構成されているものが好ましい。

[0049] 培養キャリア基材10の培養面12を、レーザー顕微鏡で測定した際に、100 μm 四方の範囲に、直径1 μm 以上100 μm 以下、かつ深さ0.5 μm 以上100 μm 以下の穴が3つ以下である培養キャリア基材である。前記穴の直径は、例えば1 μm 以上100 μm 以下、好ましくは2 μm 以上50 μm 以下、より好ましくは3 μm 以上30 μm 以下である。前記穴の深さは、例えば0.5 μm 以上100 μm 以下、好ましくは1 μm 以上50 μm 以下、より好ましくは2 μm 以上20 μm 以下である。

穴の直径と穴の深さの範囲の組み合わせは、例えば穴の直径が1 μm 以上100 μm 以下かつ穴の深さが0.5 μm 以上100 μm 以下、穴の直径が1 μm 以上100 μm 以下かつ穴の深さが1 μm 以上50 μm 以下、穴の直径が1 μm 以上100 μm 以下かつ穴の深さが2 μm 以上20 μm 以下、穴の直径が2 μm 以上50 μm 以下かつ穴の深さが0.5 μm 以上100 μm 以下、穴の直径が2 μm 以上50 μm 以下かつ穴の深さが1 μm 以上50 μm 以下、穴の直径が2 μm 以上50 μm 以下かつ穴の深さが2 μm 以上20 μm 以下、穴の直径が3 μm 以上30 μm 以下かつ穴の深さが0.5 μm 以上100 μm 以下、穴の直径が3 μm 以上30 μm 以下かつ穴の深さが1 μm 以上50 μm 以下、穴の直径が3 μm 以上30 μm 以下かつ穴の深さが2 μm 以上20 μm 以下である。

また、培養キャリア基材10の空隙率の上限は、例えば、15%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下である。一方、培養キャリア基材10の空隙率の下限は、とくに限定されないが、0%以上でもよい。

培養面12の上記穴が3つ以下であること、および／または、培養キャリア基材10の空隙率を上記上限値以下とすることにより、細胞シート40との密着力を適度なものとすることができる。

なお、穴の有無は、培養キャリア基材10が培養面12側に形成される樹脂層の表面を測定対象としてもよい。

空隙率は、理論密度と実測密度から算出する。具体的には、空隙率 = $\{1 - (\text{実密度} / \text{理論密度})\} \times 100$ の計算式により算出する。

また、培養キャリア基材10の培養面12は、温度応答性ポリマーを含まないように構成されてもよい。これにより、凍結保存工程などの低温環境下で、細胞シート40と培養キャリア基材10との密着性が低下することを抑制できる。

[0050] 温度応答性ポリマーは、細胞を培養する際の温度で細胞接着性を発揮し、そこから温度変化を行うことで細胞非接着性を発揮して細胞シートを容易に剥離することが可能となる材料である。温度応答性ポリマーが細胞接着性を発揮する温度領域が10℃～45℃、特に33℃～40℃の範囲であると、細胞を安定的に培養することができ好ましい。また、温度応答性ポリマーが細胞非接着性を発揮する温度領域は、1℃～36℃、特に4℃～32℃の範囲内であると、細胞シートの剥離に与えるダメージを減らすことができるため好ましい。温度応答性ポリマーを構成する材料としては、具体的には、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm)、ポリ-N-n-プロピルアクリルアミド、ポリ-N-n-プロピルメタクリルアミド、ポリ-N-エトキシエチルアクリルアミド、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド、ポリ-N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド、および、ポリ-N,N-ジエチルアクリルアミドなどの温度応答性高分子を挙げることができ、なかでもPNIPAAm、ポリ-N-n-プロピルメタクリルアミド、ポリ-N,N-ジエチルアクリルアミドが好ましい。

[0051] 細胞シートの培養に使用される前の培養キャリア基材10は、包装材料に包装された包装体とすることができる。密封された包装体とすることで、培養面を汚損させずに保存、流通させることができる。また、この包装体は滅菌してもよい。滅菌方法は電子線滅菌、ガンマ線滅菌、EOG滅菌、高圧蒸気滅菌、等が挙げられる。

[0052] 包装材料は、例えば、アルミニウム、ポリエチレンテレフタレート、アイオノマー、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニ

ルアルコール、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレンービニルアルコール共重合体、エチレンーメタクリル酸共重合体、ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂、ナイロン、セロファン、紙材などが挙げられる。これらを単独で用いてもよいし、これらから二つ以上を組み合わせてもよい。E O G滅菌や高圧蒸気滅菌のようにガス透過性が求められる滅菌を行う場合は、紙材と上記材料とを組合せた包装材料が好ましく用いられる。なお、包装材料は多重梱包としてもよく、滅菌後にさらに包装を重ねてもよく、包装体の最外部分は樹脂のフィルム状の包装材料であることが好ましい。

[0053] 培養キャリア基材10上で細胞シート40を培養することにより、細胞シート40と培養キャリア基材10の積層体を含む細胞シート付き培養キャリア基材50が得られる。

細胞シート付き培養キャリア基材50において、細胞シート40が、培養面12側における表面のうち細胞が堆積可能な領域を、例えば、50%以上100%以下被覆した状態となる。培養キャリア基材10の培養面12の一部に対して重りで荷重固定する方法や、培養キャリア基材10を器具により位置固定する方法を採用した場合は、細胞が堆積可能な領域とは、重りや器具などが接触しておらず細胞が堆積可能な領域である。また、培養キャリア基材10の培養面12に親水化処理が施されている場合は、細胞が堆積可能な領域とは、親水化処理がなされた領域である。細胞シート40の被覆面積の下限値は、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上である。細胞シート40の被覆面積の上限値は、100%以下でもよく、99%以下でもよく、98%以下でもよい。細胞シート40の被覆面積は、例えば50%以上100%以下、50%以上99%以下、50%以上98%以下、70%以上100%以下、70%以上99%以下、70%以上98%以下、90%以上100%以下、90%以上99%以下、90%以上98%以下である。なお、培養キャリア基材10の面積は、細胞シート40の細胞が堆積可能な領域の面積と同じかそれより大きいことが好ましい。上記下限値以上とする

ことにより、治癒効果を向上できる。

[0054] また、培養キャリア基材上で細胞シートを形成することにより、培養容器や凍結保存容器から細胞シートを取り出す際に破れたりする可能性を低くでき、容易に取り出すことができる。また、被移植部位に細胞シートを貼り付けた後、容易に培養キャリア基材から細胞シートを剥離できる。細胞シートの取り扱いが容易になることから、大きいサイズの細胞シートの作製が可能となる。

[0055] <細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法>

本実施形態の細胞シート付き培養キャリア基材50の製造方法の一例は、例えば、培養容器20の内部に、複数の細胞、培地（培養液30）、および培養キャリア基材10を導入して、培養キャリア基材10の培養面12に細胞シート40を培養する、培養工程と、培養液30から、細胞シート付き培養キャリア基材50を取り出す、取出工程と、を含んでもよい。

[0056] 本実施形態の細胞シート40は、細胞シート付き培養キャリア基材50から剥離したものであり、細胞移植療法などの治療、予防などに用いることができる。

剥離方法は、特に制限されるものではなく、医療、医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、動物用薬品などの技術分野、及び再生医療、生物学などの基礎技術分野において使用されている通常の手段を用いることができる。剥離方法としては、例えば、物理的処理などが挙げられる。

[0057] <凍結保存方法>

本実施形態の凍結保存方法の一例は、図1(c)に示すように、培養容器20の内部の培養キャリア基材10と培養キャリア基材10の表面（培養面12）に形成された細胞シート40とを含む細胞シート付き培養キャリア基材50を、凍結保存液60中で冷却する冷却工程を含む。培養容器には、培養用の蓋（図示せず）または液漏れおよび微生物混入を防ぐ蓋（図示せず）をして凍結してもよい。図1(c)では、培養容器20の内部で細胞シート付き培養キャリア基材50の凍結保存を行っているが、培養容器20とは別

の凍結保存容器に細胞シート付き培養キャリア基材50を移し替えて凍結保存を行ってもよい。凍結保存容器としては、特に制限されるものではないが、例えば、培養容器20で例示されたものを使用することができる。

[0058] 冷却工程において、細胞シート付き培養キャリア基材50は、様々な態様を採用することが可能である。図3(a)(b)に示すように、細胞シート付き培養キャリア基材50は、細胞シート40の片側に培養キャリア基材10が形成された構造を有してもよく、図3(c)に示すように、細胞シート40の両面を2枚の培養キャリア基材10a、10bで挟み込む構造を備えてもよい。図3(a)では、培養キャリア基材10が培養容器20の底面に向いた状態で配置される。図3(b)では、細胞シート40が培養容器20の底面に向いた状態で配置される。図3(c)では、培養キャリア基材10a、10bは、同一材料で構成されてもよく、互いに別の材料で構成されてもよい。例えば、培養キャリア基材10a、10bは、両方とも、PEEKを含む培養キャリア基材でもよく、一方が、PEEKを含む培養キャリア基材であり、他方が、PEEKを含まない培養キャリア基材でもよい。

[0059] (凍結保存液)

凍結保存液60は、凍結保存による細胞の損傷を低減するための溶液である。

凍結保存液60は、細胞の凍結保存に適したものであれば、特に制限されるものではないが、培養液に含まれる培養液成分、凍結保護剤などを含有してもよい。

培養液成分である糖類、アミノ酸、ビタミン類、無機塩、微量金属、添加物については、上記(培養液)の項の説明を充足するものであればよい。また、凍結保存液は、凝固開始温度が -15°C 以上 -5°C 以下の範囲にあるものが好ましい。

[0060] 凍結保護剤は、凍結保存時の凍結や解凍による細胞への損傷を低減するために使用する物質である。凍結保護剤としては、例えば、細胞非浸透性凍結保護剤、細胞浸透性凍結保護剤が挙げられる。

細胞非浸透性凍結保護剤の具体例としては、例えば、アルブミン、スクロース、トレハロース、デキストラン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリリジンなどが挙げられる。

細胞浸透性凍結保護剤の具体例としては、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、プロパンジオールなどが挙げられる。

また、これらの凍結保護剤は、単独で配合してもよいし、二種以上を組み合わせ合わせて配合してもよい。これらの凍結保護剤については、細胞の種類、凍結保存液の組成などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0061] DMSOを含まない市販の凍結保存液としては、例えば、ステムセルバンカー（登録商標）DMSOフリーGMPグレード（日本全薬工業社）、バンバンカー（登録商標）DMSOフリー（CGリンフォテック社）、クライオスカーレス（登録商標）DMSOフリー（バイオベルデ社）、ステムセルキープ（バイオベルデ社）、CryoNovo（登録商標）X12（Akron BioProducts LLC社）、CryoNovo（登録商標）P24（Akron BioProducts LLC社）、ヒトES/iPS細胞凍結保存用DMSOフリー細胞凍結保存液（リプロセル社）、Cell Reservoir One（ナカライテスク社）、TheLioKeep（登録商標：バイオベルデ社）、Cellvation（登録商標：Protide Pharmaceuticals社）、ReproCryo RM（リプロセル社）、SOFORO Cryo（SARAYA社）などが挙げられる。また、DMSOを含む市販の凍結保存液としては、例えば、ステムセルバンカー（登録商標）GMPグレード（日本全薬工業社）、ステムセルバンカー（登録商標）EX GMPグレード（日本全薬工業社）、バンバンカー（登録商標）hRM（CGリンフォテック社）、バンバンカー（登録商標）（CGリンフォテック社）、iStock（CGリンフォテック）、CryoStor CS5（Charles River Laboratories Cell Solutions, inc）、Cryo

Stor CS10 (Charles River Laboratories Cell Solutions, inc) などが挙げられる。

[0062] (冷却工程)

冷却工程において、細胞シート付き培養キャリア基材50を、凍結保存液中で非貫流式の冷却装置を用いて冷却することが好ましい。適当な培養キャリア基材10上で、細胞シート40を、非貫流式の冷却装置により、冷却対象物である細胞シートを均一な温度で冷却することが可能となるため、細胞へのダメージが少なく、細胞活性率の低下を抑制できる。

[0063] 冷却工程において、0～-5℃における冷却速度は、例えば、0.1℃/分以上1.5℃/分以下、好ましくは0.25℃/分以上12.5℃/分以下、より好ましくは0.5℃/分以上10℃/分以下である。

上記下限値以上とすることにより、不必要な液状の凍結保護材と細胞の接触時間を減らすことができる。上記上限値以下とすることにより、細胞内氷晶の形成を抑制することができる。

[0064] 冷却工程において、凍結処理の温度は、培養細胞及び凍結保存液を凍結することができるのであれば、特に制限されるものではない。凍結処理の温度としては、例えば、-196℃以上-25℃以下である。下限値としては、より好ましくは-180℃以上、更に好ましくは-160℃以上、特に好ましくは-150℃以上である。一方、上限値としては、より好ましくは-25℃以下、更に好ましくは-30℃以下、特に好ましくは-35℃以下である。凍結処理の温度は例えば、-196℃以上-25℃以下、-196℃以上-30℃以下、-196℃以上-35℃以下、-180℃以上-25℃以下、-180℃以上-30℃以下、-180℃以上-35℃以下、-160℃以上-25℃以下、-160℃以上-30℃以下、-160℃以上-35℃以下、-150℃以上-25℃以下、-150℃以上-30℃以下、-150℃以上-35℃以下である。

[0065] 凍結処理に用いる冷却装置は、特に制限されるものではなく、例えば、急速冷凍装置、極低温冷蔵装置などが挙げられる。冷却装置としては、培養容

器に伝熱手段を接触させて培養容器及び細胞を凍結させるよりも、伝熱手段と非接触であり、冷気を一方向ではなく多方向、好ましくは全方向から培養容器に吹き付けて凍結する冷凍装置であることが、均一な温度で細胞を凍結して、解凍後の細胞の生存率を高める観点から好ましい。冷気を培養容器に吹き付けて凍結する冷凍装置としては、具体的には、冷却ファンによる冷気循環により、被冷却物を冷却させる冷却装置、例えば、特開2005-127666号公報に開示されている、冷却ファンを備えた非貫流方式の冷却装置などが挙げられる。なお、上記「非貫流方式」とは、被冷却物からの貫流空気の大半が冷却器を通過（貫流）しない方式を意味する。

[0066] (冷凍保存工程)

凍結保存方法は、冷却工程の後、例えば $-196\sim-60^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-180\sim-65^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $-150\sim-80^{\circ}\text{C}$ にて細胞シート付き培養キャリア基材50を保存する、凍結保存工程を含むことが好ましい。これにより、長期間にわたり細胞シートを安定に維持することができる。

冷却工程の温度は、冷却装置の設定温度を採用してもよい。

[0067] 凍結保存は、細胞を安定に凍結保存することができれば、特に制限されるものではない。

凍結保存の方法としては、例えば、冷却剤の液相、気相との接触、超低温冷凍庫の使用などが挙げられる。好ましい凍結保存の方法としては、温度の観点から冷却剤の液相、気相との接触である。

冷却剤としては、例えば、液体窒素、液体エタン、液体プロパン、液体ヘリウム、ドライアイスなどが挙げられる。

[0068] 凍結保存の温度は、細胞を安定に凍結保存することができれば、特に制限されるものではない。凍結保存の温度としては、例えば、 -196°C 以上 -60°C 以下、 -196°C 以上 -134°C 以下、 -134°C 以上 -60°C 以下のいずれの範囲内でもよい。

凍結保存の温度は、凍結対象となる細胞シート40の表面温度を採用してもよい。表面温度は、例えば、K熱電対を用いて測定できる。

[0069] 細胞シート付き培養キャリア基材50の凍結物は、培養キャリア基材10と、培養キャリア基材10の表面（培養面12）に形成された細胞シート40と、を含むものである。細胞シート付き培養キャリア基材50中、培養キャリア基材10および細胞シート40が凍結保存状態である。

[0070] 上記凍結物において、培養キャリア基材10および細胞シート40が例えば、上述の凍結保存の温度にて、具体的には、好ましくは -60°C 以下、より好ましくは -135°C 以下で凍結保存状態である。また、凍結物は、 -134°C 以上 -60°C 以下の範囲で凍結保存状態としてもよい。なお、凍結物は、 -196°C 以上で凍結保存状態とする。

[0071] 培養容器や凍結保存容器の内部で凍結した細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物は、培養容器内や凍結保存容器で凍結された状態か、容器から取り出された状態で、包装材料で包装された包装体とすることができる。密封された包装体とすることで、細胞シートへの微生物混入防止および細胞シートを汚損させずに保存、流通させることができる。一例として、細胞シート付き培養キャリア基材と凍結保存液を有する容器をフィルム状の包装材料で包装して密封した状態で凍結することで、凍結物の包装体を得ることができる。包装材料としては、アルミニウム、ポリエチレンテレフタレート、アイオノマー、ポリエチレン、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリロニトリル、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレン-ビニルアルコール共重合体、エチレン-メタクリル酸共重合体、ポリイミド、ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂や四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体（FEP）等のフッ素系樹脂、ナイロンが好ましい。これらを単独で用いてもよいし、これらから二つ以上を組み合わせてもよい。

[0072] （解凍工程）

本実施形態の移植方法が、上記冷凍保存方法を含む場合、冷凍保存方法は、さらに、細胞シート付き培養キャリア基材50を解凍する、解凍工程を含む。

[0073] 解凍方法は、特に制限されるものではなく、医療、医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、動物用薬品などの技術分野、及び再生医療、生物学などの基礎技術分野において使用されている通常の手段を用いることができる。

解凍の方法としては、例えば、ウォーターバス、インキュベータ、ホットプレート、デフロスターなどの使用や、凍結温度よりも高い温度の融解液に浸漬する、凍結温度よりも高い温度環境下に静置することなどが挙げられる。

解凍時の凍結物に接する環境温度は、凍結温度より高い温度且つ50℃未満であれば、特に制限されるものではない。上記の環境温度の上限は、例えば、49℃以下、好ましくは45℃以下、より好ましくは40℃以下である。一方、環境温度の下限は、例えば、0℃以上、好ましくは5℃以上、より好ましくは10℃、さらに好ましくは15℃以上である。

解凍時の凍結物に接する環境温度の範囲は例えば、0℃以上49℃以下、0℃以上45℃以下、0℃以上40℃以下、5℃以上49℃以下、5℃以上45℃以下、5℃以上40℃以下、10℃以上49℃以下、10℃以上45℃以下、10℃以上40℃以下、15℃以上49℃以下、15℃以上45℃以下、15℃以上40℃以下である。

なお、解凍温度が50℃以上である場合、細胞に熱ダメージが生じる可能性があるため好ましくない。また、解凍において凝固点以下の温度環境に一時的に保管してもよい。例えば、-80℃に保管された凍結物を-30℃の環境温度に曝した後に凝固点以上の環境温度で解凍することができる。

凍結物の解凍に要する時間は、細胞に凍結による傷害が生じなければ、特に制限されない。通常、10秒超、60分以下であれば問題なく解凍できる。凍結物の解凍に要する時間の下限値としては、10秒超であれば良く、20秒以上が好ましく、30秒以上がより好ましく、1分以上がさらに好ましい。上限値としては、60分以下であれば良く、好ましくは50分以下、より好ましくは40分以下、さらに好ましく30分以下である。例えば、解凍に要する時間は、10秒超60分以下、10秒超50分以下、10秒超40

分以下、10秒超30分以下、20秒以上60分以下、20秒以上50分以下、20秒以上40分以下、20秒以上30分以下、30秒以上60分以下、30秒以上50分以下、30秒以上40分以下、30秒以上30分以下、1分以上60分以下、1分以上50分以下、1分以上40分以下、1分以上30分以下である。

解凍が早すぎる場合、温度差による熱衝撃で凍結物に亀裂が生じ細胞シートが破損する恐れがある。解凍が遅すぎる場合、氷点下条件で水分子が再結晶し、氷晶が大きくなり、細胞に重篤な傷害が生じるため好ましくない。

上記の解凍時間中において、上記の環境温度は、一定となるように設定されてもよく、段階的に上昇等の変動するように設定されてもよい。

[0074] 融解液は、培養細胞に損傷を与えないものであれば、特に制限されるものではない。融解液に含有する成分としては、例えば、スクロース、グルコース、マルトース、トレハロース、フルクトースなどが挙げられる。また、融解液は、上記（培養液）の項に記載の成分を含有してもよい。

[0075] 融解液の温度は、凍結温度よりも高い温度であれば、特に制限されるものではない。融解液の温度としては、例えば、0℃以上45℃以下である。下限値としては、より好ましくは4℃以上、更に好ましくは25℃以上、特に好ましくは28℃以上である。一方、上限値としては、より好ましくは40℃以下、更に好ましくは39℃以下、特に好ましくは38℃以下である。融解液の温度は例えば、0℃以上45℃以下、0℃以上40℃以下、0℃以上39℃以下、0℃以上38℃以下、4℃以上45℃以下、4℃以上40℃以下、4℃以上39℃以下、4℃以上38℃以下、25℃以上45℃以下、25℃以上40℃以下、25℃以上39℃以下、25℃以上38℃以下、28℃以上45℃以下、28℃以上40℃以下、28℃以上39℃以下、28℃以上38℃以下である。

[0076] 解凍した細胞シート40および培養キャリア基材10（細胞シート付き培養キャリア基材50）は、必要に応じて、解凍処理直後に細胞洗浄液で洗浄してもよい。細胞洗浄液は、特に制限されるものではなく、上記（培養液）

の項に記載の成分を含有してもよい。

細胞洗浄液の温度は、特に制限されるものではない。細胞洗浄液の温度としては、例えば、0℃以上45℃以下である。下限値としては、より好ましくは4℃以上、更に好ましくは25℃以上、特に好ましくは28℃以上である。一方、上限値としては、より好ましくは40℃以下、更に好ましくは39℃以下、特に好ましくは38℃以下である。

培養細胞の洗浄回数は、特に制限されるものではなく、1回又は複数回（例えば、2回、3回、4回、5回など）である。

[0077] 本開示においては、培養面12に温度応答性ポリマーを含まないため、凍結保存工程などの低温環境下で、細胞シート40が培養キャリア基材10から剥離することを抑制でき、凍結保存工程と解凍工程を経ても、細胞シートとフィルムの接着性を維持したままの細胞シート付き培養キャリア基材50を得ることができる。

[0078] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することができる。また、本発明は上述の実施形態に限定されるものではなく、本発明の目的を達成できる範囲での変形、改良等は本発明に含まれる。

以下、参考形態A～Jの例を付記する。

<A. 培養キャリア基材>

培養キャリア基材の参考形態Aとして、以下の1.～13.が挙げられる。

1. 培養面に培養された細胞シートを搬送するために用いられる、培養キャリア基材であって、

当該培養キャリア基材の基材厚みが5μm以上250μm以下である、培養キャリア基材。

2. 1.に記載の培養キャリア基材であって、

前記培養キャリア基材の基材厚みが10μm超であり、前記細胞シートの培養中に培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、培養キャリ

ア基材。

3. 1. または2. に記載の培養キャリア基材であって、
前記培養面が、親水化処理がなされている、培養キャリア基材。
4. 3. に記載の培養キャリア基材であって、
前記親水化処理は、UVオゾン処理あるいはプラズマ処理された、培養キャリア基材。
5. 1. ~4. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
当該培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムである、培養キャリア基材。
6. 1. ~5. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養面が、温度応答性ポリマーを含まない、培養キャリア基材。
7. 1. ~6. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養キャリア基材の面積が、 0.3 cm^2 以上 1000 cm^2 以下である、培養キャリア基材。
8. 1. ~7. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養キャリア基材が、樹脂材料からなる樹脂層を1層または2層以上含む、培養キャリア基材。
9. 1. ~8. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養面を、レーザー顕微鏡で測定した際に、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 四方の観測範囲の少なくとも一つにおいて、直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下、かつ深さ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ の穴が3つ以下である、培養キャリア基材。
10. 1. ~9. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
空隙率が15%以下である、培養キャリア基材。
11. 1. ~10. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養面における水接触角が 70° 以下である、培養キャリア基材。
12. 1. ~11. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、
前記培養面に形成された細胞シートを凍結保存するために用いる、培養キャリア基材。

13. 1. ~ 12. のいずれか一つに記載の培養キャリア基材であって、前記培養面に形成された細胞シートを移植部位に貼り付けるために用いる、培養キャリア基材。

<B. 細胞シート付き培養キャリア基材>

細胞シート付き培養キャリア基材の参考形態Bとして、以下の1. ~ 21. が挙げられる。

1. 培養キャリア基材と、細胞シートとの積層体を有しており、前記細胞シートが、前記培養キャリア基材の前記培養面側における表面の少なくとも50%を被覆した状態である、細胞シート付き細胞シート付き培養キャリア基材。
2. 1. に記載の細胞シート付き細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記培養キャリア基材の基材厚みが5 μ m以上250 μ m以下である、細胞シート付き培養キャリア基材。
3. 1. または2. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記培養面が、親水化処理がなされている、細胞シート付き培養キャリア基材。
4. 3. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記親水化処理は、UVオゾン処理あるいはプラズマ処理された、細胞シート付き培養キャリア基材。
5. 1. ~ 4. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムである、細胞シート付き培養キャリア基材。
6. 1. ~ 5. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記培養面が、温度応答性ポリマーを含まない、細胞シート付き培養キャ

リア基材。

7. 1. ~ 6. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養キャリア基材の面積が、 0.3 cm^2 以上 1000 cm^2 以下である、細胞シート付き培養キャリア基材。

8. 1. ~ 7. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養キャリア基材が、樹脂材料からなる樹脂層を1層または2層以上含む、細胞シート付き培養キャリア基材。

9. 1. ~ 8. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養面を、レーザー顕微鏡で測定した際に、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 四方の観測範囲の少なくとも一つにおいて、直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下、かつ深さ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ の穴が3つ以下である、細胞シート付き培養キャリア基材。

10. 1. ~ 9. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

空隙率が15%以下である、細胞シート付き培養キャリア基材。

11. 1. ~ 10. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養面における水接触角が 70° 以下である、細胞シート付き培養キャリア基材。

12. 1. ~ 11. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

培養面に培養された細胞シートを搬送するために用いられる、細胞シート付き培養キャリア基材。

13. 1. ~ 12. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養面に形成された細胞シートを凍結保存するために用いる、細胞シート付き培養キャリア基材。

14. 1. ~ 13. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

前記培養面に形成された細胞シートを移植部位に貼り付けるために用いる、細胞シート付き培養キャリア基材。

15. 1. ~ 14. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

細胞移植療法に用いる、細胞シート付き培養キャリア基材。

16. 1. ~ 15. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

細胞移植療法が、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止の少なくとも一つを含むものである、細胞シート付き培養キャリア基材。

17. 1. ~ 16. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

脊髄損傷、膝関節軟骨損傷、虚血性心疾患、加齢黄斑変性、角膜上皮幹細胞疲弊症、再生不良性貧血、重症下肢虚血、難治性皮膚潰瘍、術後合併症予防、熱傷の少なくとも一つを治療するために用いる、細胞シート付き培養キャリア基材。

18. 1. ~ 17. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、

細胞シートの培養工程、細胞シートの凍結保存工程、細胞シートの凍結物の解凍工程、および細胞シートの被移植部位への貼り付け工程の少なくとも一つを含む、移植方法に用いる、細胞シート付き培養キャリア基材。

19. 1. ~ 18. のいずれか一つに記載の細胞シート付き培養キャリア基材を含む移植材料。

20. 19. に記載の移植材料であって、

疾病部位に細胞シートを貼り付けるために用いる、移植材料。

21. 19. または 20. に記載の移植材料であって、

脊髄損傷、膝関節軟骨損傷、虚血性心疾患、加齢黄斑変性、角膜上皮幹細胞疲弊症、再生不良性貧血、重症下肢虚血、難治性皮膚潰瘍、術後合併症予防、熱傷の少なくとも一つを治療するための治療用の移植材料。

上記の細胞シート付き培養キャリア基材は、参考形態 A の 1. ~ 13. のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよい。

<C. 細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物>

細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物の参考形態 C として、以下の 1. ~ 8. が挙げられる。

1. 培養キャリア基材と、

前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シート、を含み、

前記培養キャリア基材および前記細胞シートが凍結保存状態である、凍結物。

2. 1. に記載の凍結物であって、

-196℃~-60℃で凍結保存状態である、凍結物。

3. 1. に記載の凍結物であって、

-196℃~-135℃で凍結保存状態である、凍結物。

4. 1. に記載の凍結物であって、

-134℃~-60℃で凍結保存状態である、凍結物。

5. 1. ~ 4. のいずれか一つに記載の凍結物であって、

凍結保存液を含む、凍結物。

6. 5. に記載の凍結物であって、

前記凍結保存液が、培養液成分および凍結保護剤の少なくとも一つを含む、凍結物。

7. 5. または 6. に記載の凍結物であって、

前記保存液が、DMSOを含まない、凍結物。

8. 1. ~ 4. のいずれか一つに記載の凍結物であって、

前記培養キャリア基材および前記細胞シートの全体が凍結保存液で覆われた凍結保存状態である、凍結物。

上記の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物において、参考形態Aの1.～13.のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Bの1.～21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材を含んでもよい。

<D. 包装体>

包装体の参考形態Dとして、以下の1.～8.が挙げられる。

1. 培養キャリア基材と、前記培養キャリア基材を包装する包装材料と、を備える、包装体。
2. 培養キャリア基材と、キャリア基材の培養面に形成された細胞シートと、を含む細胞シート付き培養キャリア基材と、

前記細胞シート付き培養キャリア基材を包装する包装材料と、を備える、包装体。

3. 培養キャリア基材と、キャリア基材の培養面に形成された細胞シートと、を含む細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物と、

前記凍結物を包装する包装材料と、を備える、包装体。

4. 1.～3.のいずれか一つに記載の包装体であって、

前記包装材料の内部に、培養容器および／または凍結保存容器を含む、包装体。

5. 1.～4.のいずれか一つに記載の包装体であって、

前記包装材料の内部が密封された状態である、包装体。

6. 1.～5.のいずれか一つに記載の包装体であって、

搬送および／または保管するために用いられる、包装体。

上記の包装体において、参考形態Aの1.～13.のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Bの1.～21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Cの1.～8のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を含んでもよい。

<E. 凍結保存方法、または解凍方法>

凍結保存方法または解凍方法の参考形態Eとして、以下の1. ~ 10. が挙げられる。

1. 培養キャリア基材と前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シートとを含む細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保存液中で冷却する冷却工程を含む、凍結保存方法。

2. 1. に記載の凍結保存方法であって、
前記冷却工程において、前記細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保存液中で非貫流式の冷却装置を用いて冷却する、凍結保存方法。

3. 1. または2. に記載の凍結保存方法であって、
前記冷却工程において、0 ~ -5℃における冷却速度が、0.1℃/分以上1.5℃/分以下である、凍結保存方法。

4. 1. ~ 3. のいずれか一つに記載の凍結保存方法であって、
前記冷却工程の後、-196 ~ -60℃にて前記細胞シート付き培養キャリア基材を保存する、凍結保存工程を含む、凍結保存方法。

5. 1. ~ 4. のいずれか一つに記載の凍結保存方法であって、
前記冷却工程により、前記培養キャリア基材および前記細胞シートを含む凍結物を得る、凍結保存方法。

6. 培養キャリア基材と、
前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シート、を含み、
前記培養キャリア基材および前記細胞シートが凍結保存状態である、凍結物を解凍する解凍工程を含む、解凍方法。

7. 6. に記載の解凍方法であって、
1. ~ 4. のいずれか一つに記載の凍結保存方法の冷却工程の後、前記解凍工程を含む、解凍方法。

8. 6. または7. に記載の解凍方法であって、
5. に記載の凍結保存方法で得られた凍結物を解凍する解凍工程を含む、解凍方法。

9. 6. ~ 8. のいずれか一つに記載の解凍方法であって、
前記解凍工程において、解凍時の環境温度が0℃以上50℃未満である、
解凍方法。

10. 6. ~ 9. のいずれか一つに記載の解凍方法であって、
前記解凍工程において、解凍時間が10秒超、60分以下である、解凍方
法。

上記の凍結保存方法または凍結方法において、参考形態Aの1. ~ 13.
のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Bの1. ~ 2
1のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材を含んでもよい。

凍結保存方法で得られた凍結物は、参考形態Cの1. ~ 8. のいずれか一
つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を含んでもよい。

また、凍結保存方法で得られた凍結物および／または解凍方法で得られた
解凍物は、後述の移植方法に使用できる。

<F. 細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法>

細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法の参考形態Fとして、以下の
1. ~ 3. が挙げられる。

1. 培養容器の内部に、複数の細胞、培地、および培養キャリア基材を導
入して、前記培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程
と、

前記培養容器から、前記細胞シート付きの前記培養キャリア基材を取り出
す、取出工程と、を含む、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

2. 1. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法であって、
前記培養工程において、前記培養キャリア基材を培養容器の内部に固着せ
ずに、前記細胞シートを培養する、細胞シート付き培養キャリア基材の製造
方法。

3. 1. または2. に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法
であって、

前記取出工程において、前記培養容器から前記培養キャリア基材を物理的

手段により分離する操作が不要である、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

上記細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法において、参考形態Aの1.～13.のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよい。

<G. 移植方法>

移植方法の参考形態Gとして、以下の1.～25.が挙げられる。

1. 培養キャリア基材と前記培養キャリア基材の培養面に形成された細胞シートとを含む細胞シート付き培養キャリア基材を用いて、前記細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、前記細胞シートから前記培養キャリア基材を剥離する、移植工程と、を含む、移植方法。

2. 1.に記載の移植方法であって、

前記移植工程において、前記培養キャリア基材と、前記細胞シートとの積層体を有しており、前記細胞シートが、前記培養キャリア基材の前記培養面側における表面の少なくとも50%を被覆した状態である、前記細胞シート付き培養キャリア基材を用いる、移植方法。

3. 1.又は2.に記載の移植方法であって、

前記移植工程において、包装体から前記細胞シート付き培養キャリア基材を取り出して用いる、または、包装体から前記細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を取り出し、当該凍結物を解凍してから用いる、移植方法。

4. 1.～3.のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の前記培養面に前記細胞シートを培養し、前記細胞シート付き培養キャリア基材を得る、培養工程を含む、移植方法。

5. 4.に記載の移植方法であって、

前記培養工程において、前記培養キャリア基材の前記培養面および側面のそれぞれの少なくとも一部が培養液に接触した状態で、前記細胞シートを培養する、移植方法。

6. 4.または5.に記載の移植方法であって、

前記培養工程において、前記培養キャリア基材を重りにより荷重固定した

状態手段および／または前記培養キャリア基材を器具により位置固定した状態で、前記細胞シートを培養する、移植方法。

7. 4. ～6. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養工程において、培養する細胞の密度が、 5×10^2 細胞/cm²以上 1×10^9 細胞/cm²以下である、移植方法。

8. 4. ～7. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の基材厚みが10 μm超であり、前記培養工程において、前記培養キャリア基材が培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、移植方法。

9. 1. ～8. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記細胞シート付き培養キャリア基材を凍結保存液中で冷却し、前記細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を得る冷却保存工程を含む、移植方法。

10. 1. ～9. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を解凍する解凍工程を含む、移植方法。

11. 1. ～10. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の基材厚みが5 μm以上250 μm以下であり、前記培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムであり、

前記培養キャリア基材の前記培養面は親水化処理がなされている、移植方法。

12. 1. ～11. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記移植工程において、貼り付けた後から剥離するまでの時間が、10分以下である、移植方法。

13. 1. ～12. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記細胞シートの面積が、0.3 cm²以上である、移植方法。

14. 1. ～13. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記移植工程の後、前記剥離後における前記培養キャリア基材上の前記細胞シートの残存率は、面積比換算で、50%以下である、移植方法。

15. 1. ~ 14. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記細胞シートの厚みが、0.001mm以上2.0mm以下である、移植方法。

16. 1. ~ 15. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の面積が、0.3cm²以上1000cm²以下である、移植方法。

17. 1. ~ 16. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材が、樹脂材料からなる樹脂層を1層または2層以上含む、移植方法。

18. 1. ~ 17. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養面を、レーザー顕微鏡で測定した際に、100μm四方の観測範囲の少なくとも一つにおいて、直径1μm以上100μm以下、かつ深さ0.5μm以上100μmの穴が3つ以下である前記培養キャリア基材を用いる、移植方法。

19. 1. ~ 18. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の空隙率が15%以下である、移植方法。

20. 1. ~ 19. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の前記培養面における水接触角が70°以下である、移植方法。

21. 1. ~ 20. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記培養キャリア基材の前記培養面における細胞堆積可能領域のうち、前記細胞シートが50%以上100%以下被覆した状態となる、細胞シート付き培養キャリア基材を得る、移植方法。

22. 1. ~ 21. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

細胞移植療法に用いる、移植方法。

23. 22. に記載の移植方法であって、

細胞移植療法が、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止の少なくとも一つを含むものである、移植方法。

24. 1. ~ 23. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記移植工程において、疾病部位に前記細胞シートを貼り付ける、移植方法。

25. 1. ~ 24. のいずれか一つに記載の移植方法であって、

前記疾病が、脊髄損傷、膝関節軟骨損傷、虚血性心疾患、加齢黄斑変性、角膜上皮幹細胞疲弊症、再生不良性貧血、重症下肢虚血、難治性皮膚潰瘍、術後合併症予防、熱傷の少なくとも一つを含む、移植方法。

上記の移植方法において、参考形態Aの1. ~ 13. のいずれか一つの培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Bの1. ~ 21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材を含んでもよく、参考形態Cの1. ~ 8. のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物を含んでもよい。

また、上記の移植方法において、参考形態Fの1. ~ 3. のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法またはその培養工程を含んでもよく、参考形態Eの1. ~ 10. のいずれか一つの凍結保存方法または解凍方法を含んでもよい。

また、参考形態Hとして、参考形態Aの1. ~ 13. のいずれか一つの培養キャリア基材、参考形態Bの1. ~ 21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材、および参考形態Cの1. ~ 8. のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物の少なくとも一つを用いる、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止の少なくとも一つを含む治療方法が挙げられる。この治療方法は、かかる関連する症状として、上述の疾病の少なくとも一つを含んでもよい。

また、参考形態Iとして、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止の少なくとも一つを含む治療

するための、参考形態Aの1.～13.のいずれか一つの培養キャリア基材、参考形態Bの1.～21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材、および参考形態Cの1.～8.のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物の少なくとも一つの使用が挙げられる。この使用は、かかる関連する症状として、上述の疾病の少なくとも一つを含んでもよい。

また、参考形態Jとして、細胞、組織、臓器の欠損及び機能障害、機能不全に関連する症状の発症及び再発を抑制、防止の少なくとも一つを含む治療するための治療薬の製造における、参考形態Aの1.～13.のいずれか一つの培養キャリア基材、参考形態Bの1.～21のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材、および参考形態Cの1.～8.のいずれか一つの細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物の少なくとも一つの使用が挙げられる。この使用は、かかる関連する症状として、上述の疾病の少なくとも一つを含んでもよい。

実施例

[0079] 以下、本発明について実施例を参照して詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例の記載に何ら限定されるものではない。

[0080] [実施例1]

<培養キャリア基材の製造>

PEEKフィルム（信越ポリマー社製、ポリエーテルエーテルケトンフィルム、Shin-Etsu Sepla Film（登録商標）低結晶タイプ 12 μ m厚さ）の培養面（表面）に対して、プラズマ処理を実施した。プラズマ処理後における表面粗さは、プラズマ処理前よりも粗面化されており、そのRaが0.6nmであった。なお、Raの測定を以下のように行った。AFM（島津製作所製SPM-9700）を用い、探針は先端径が小さいシリコン単結晶探針（曲率半径約10nm）を用いた。表面を範囲1 μ m \times 1 μ mで観察した。Raの算出には装置に付属する解析ソフトを用い、XおよびY方向の平滑化処理を行った後に、異物や表面の傷を避けた範囲100nm \times 100nmで表面粗さ解析を実行した。算術平均粗さRaは、基

準長さ内での基準線からの距離の平均値である。

また、PEEKフィルムは、空隙率が5%以下であり、培養面をレーザー顕微鏡で測定した際に、100 μ m四方の範囲に、直径1 μ m以上100 μ m以下、かつ深さ0.5 μ m以上100 μ mの穴が1つもない、中実なフィルムであった。空隙率は、「 $\{1 - (\text{実測密度} / \text{理論密度})\} \times 100$ 」から算出した。

その後、得られた表面処理済みのフィルムを $\Phi 33.5$ mmサイズに切断し、円盤状の培養キャリア基材を得た。

[0081] <細胞シートの製造>

上記<培養キャリア基材の製造>で製造された培養キャリア基材を、70%エタノール、リン酸緩衝液、培地の順に洗浄した後、細胞培養マルチウェルプレート（6穴）における各穴の平底にそれぞれ設置した。このとき、培養キャリア基材の培養面がウェルプレートの開口を向くように、すなわち培養キャリア基材の裏面がウェルプレートの穴部の平底と接触するように配置した。ただし、培養キャリア基材とウェルプレート（培養容器）の内部とを固着させなかった。

凍結保存されたヒト線維芽細胞（ヒト口腔内組織由来）を37 $^{\circ}$ Cで解凍し、培地を用いて洗浄した。5 $\times 10^5$ 個の細胞を5%血清含有培地に懸濁し、2枚のディッシュ（60.1 cm^2 ）に2.5 $\times 10^5$ 個ずつ播種した後、3日間培養した。培養した細胞を回収し、5%血清含有培地に懸濁し、4個のフラスコ（225 cm^2 ）に2.5 $\times 10^5$ 個ずつ播種して継代した後、4日間培養した。

培養した細胞を回収し、2%血清含有培地に懸濁し、培養キャリア基材が設置済みの細胞培養マルチウェルプレート中の各穴に55.8 $\times 10^4$ 個/ cm^2 の播種密度で播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の環境で1日間インキュベートし、培養キャリア基材の培養面上に細胞シートを作製した。

[0082] <移植>

上記<細胞シートの製造>の後、マルチプレートから細胞シート付き培養

キャリア基材を取り出した。取り出した細胞シート付き培養キャリア基材を、別の場所に用意した、細胞組織を模した豚肉片（被移植部位）の上まで搬送した。細胞シートの表面を豚肉片の表面に貼り付けた後、細胞シートから培養キャリア基材を剥離した。

なお、貼付後剥離するまでの間、特に基材を冷却することは行わなかったため、基材の温度は30℃以上が保たれていた。

[0083] [実施例2]

上記＜培養キャリア基材の製造＞において、ポリエーテルエーテルケトンフィルムに代えて、厚さ25μmのPETフィルム（東レ社製、ポリエチレンテレフタレートフィルム、ルミラー（登録商標））を使用した以外、実施例1と同様に、＜培養キャリア基材の製造＞、＜細胞シートの製造＞および＜移植＞を実施した。

[0084] [実施例3]

上記＜培養キャリア基材の製造＞において、表面処理済みのフィルムの切断サイズをΦ33.5mmに代えて、Φ14.0mmとし、上記＜細胞シートの製造＞において、播種の際に、24穴・平底の細胞培養マルチウェルプレートの使用、および播種密度を 27.9×10^4 個/cmに変更した以外は、実施例1と同様に、＜細胞シートの製造＞および＜移植＞を実施した。

[0085] [比較例1]

上記＜培養キャリア基材の製造＞で製造された培養キャリア基材を使用しないで、＜細胞シートの製造＞において、接着細胞用マルチウェルプレートの穴内の平底上に細胞シートを製造し、＜移植＞において、その平底から細胞シートを剥離したものを、豚肉片の表面に貼り付けた以外、実施例1と同様に、＜細胞シートの製造＞および＜移植＞を実施した。

[0086] [比較例2]

上記＜培養キャリア基材の製造＞において、基材の培養面に対してプラズマ処理を実施しない以外、実施例1と同様に、＜培養キャリア基材の製造＞、＜細胞シートの製造＞および＜移植＞を実施した。

[0087] [比較例3]

上記＜培養キャリア基材の製造＞において、基材の培養面に対してプラズマ処理を実施しない以外、実施例2と同様に、＜培養キャリア基材の製造＞、＜細胞シートの製造＞および＜移植＞を実施した。

[0088] 各実施例、各比較例について、細胞シートの培養および移植について評価を行った。結果を表1に示す。

[0089] [表1]

表1

	培養キャリア基材		評価	
	基材の材料	表面処理	細胞シート培養	移植
実施例1	PEEK	プラズマ処理有り	良好	良好
実施例2	PET	プラズマ処理有り	良好	良好
実施例3	PEEK	プラズマ処理有り	良好	良好
比較例1	※使用しない		良好	不良
比較例2	PEEK	プラズマ処理無し	不良	—
比較例3	PET	プラズマ処理無し	不良	—

[0090] 実施例1～3は、＜細胞シートの製造＞において、細胞シートが基材培養面の100%以上を被覆している、細胞シート付き培養キャリア基材を得ることができた。

＜移植＞において、細胞シート付き培養キャリア基材は、マルチプレートに固着されていないため、容易に取り出すことができた。なお、実施例2のPETフィルムでは、細胞シートを少しピンセットで押さえて基材を剥離したが、実施例1および3のPEEKフィルムでは、細胞シートを押さえずに基材をスライドすることでより容易に剥離でき、取扱容易性に優れることが分かった。

また、＜移植＞において、細胞シートから培養キャリア基材が容易に取れた。具体的には、細胞シートと豚肉はすぐに密着するため、貼付から剥離まで1分以内に行った。つまり、移植時の操作が簡便となるため操作時間を短時間化することが可能となる。なお、＜移植＞の後、豚肉上で細胞シートを培養する必要はなかった。

実施例1～3結果より、プラズマ処理されたPEEKフィルムまたはプラズマ処理されたPETフィルムを培養キャリア基材として使用することにより、細胞シートの培養と移植の両方を実施できることが確認できた。

また、実施例1～3の〈移植〉の剥離後において、培養キャリア基材の培養面に残存する細胞シートは、面積比換算で、1%以下であった。このため、移植工程時の細胞シート残りを低減することが可能となる。なお、細胞シートから培養キャリア基材を剥離する際、培養前の培養面にディスパーゼ処理を施すことは不要であった。

[0091] 比較例1では、〈細胞シートの製造〉において、接着細胞用マルチウェルプレート内で細胞シートを製造できた。しかしながら、〈移植〉において、接着細胞用マルチウェルプレートから細胞シートを取り出す際に鑷子等で細胞シートが破損しないように、接着細胞用マルチウェルプレートの平底から細胞シートを剥がす操作が困難であった。また、細胞シートを剥がすことができたとしても、細胞シートを把持することができず細胞シートの貼り付け作業が困難であった。

比較例2、3では、細胞シートが製造できなかったため、移植操作を実施しなかった。

[0092] [実施例4]

〈細胞シートの製造〉

実施例1の〈培養キャリア基材の製造〉で表面処理済みのフィルムの切断サイズをΦ33.5mmに代えて、Φ14.0mmとして得られた培養キャリア基材を用いて、播種の際に、24穴・平底の細胞培養マルチウェルプレートの使用、および播種密度を 27.9×10^4 個/cm²に変更した以外は、実施例1の〈細胞シートの製造〉と同様にして、培養キャリア基材の培養面上に細胞シート（培養キャリア基材付きの細胞シート）を製造した。

なお、下記の手順に従って、凍結前の細胞活性率を測定した。

[0093] 〈細胞シートの凍結保存〉

上記〈細胞シートの製造〉の後、細胞培養マルチウェルプレートを氷上に

設置し、培養キャリア基材付きの細胞シートをリン酸緩衝液で洗浄した後、凍結保護剤（STEMCELL-BANKER GMP grade、日本全薬工業社製）を0.3 mL/ウェルとなるように添加した。

その後、細胞培養マルチウェルプレートをチャック付きポリ袋で包装した包装体を、 -35°C に冷やされた非貫流方式の冷却装置（3Dフリーザー（登録商標）、KSS-40BLW-2400V、コガサン社製）に投入し、30分間保持した。なお、 $0\sim-5^{\circ}\text{C}$ における冷却速度は $3.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。

その後、冷却処理された包装体を速やかに、 -80°C の冷凍庫（RDE50086FD型 超低温フリーザー、thermoscientific社製）に投入し、1時間保持した。

K熱電対を用いて、 80°C の冷凍庫で保存された細胞シート（培養キャリア基材付きの細胞シート）の温度を測定したところ、 -70°C であった。

[0094] <細胞シートの解凍>

上記凍結期間の後、 -80°C の冷凍庫から包装体を取り出し、その中にある細胞培養マルチウェルプレートを安全キャビネット内の室温で解凍した。この時の解凍時間は16分であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

解凍後、凍結保護剤を吸引し、2%血清含有培地を2 mL加えた。その後、 37°C 、5% CO_2 の環境で24時間インキュベートした。インキュベート後、細胞活性を測定した。その結果、凍結前の細胞活性を C_0 とし、凍結後の細胞活性を C_1 としたとき、 $(C_1/C_0) \times 100$ により算出される「凍結前後の細胞活性の変動割合」が89%であることが分かった。また、培養上清を回収し、 -80°C で上清を凍結した翌日以降に血管内皮細胞増殖因子（VEGF）および肝細胞増殖因子（HGF）の測定を実施したところ、上清中のVEGFは1451 pgであり、HGFは4608 pgであることが分かった。

（解凍時間の測定方法）

解凍時間は、凍結保護剤を加えて、凍結保存した凍結物を解凍するのに要した時間であって、解凍される環境に曝された時点から、凍結物が完全に液体となった時点を終点として、解凍時間を測定した。

[0095] (細胞活性率の測定)

細胞活性は、生細胞数測定試薬 (Cell Count Reagent SF、ナカライテスク社製) とプレートリーダー (iMark、BIO-RAD社製) を用いて測定した。生細胞測定試薬を培地で20倍希釈 (試薬/培地 = 1/19体積比) して試験溶液を作製した。培養後の細胞シートを含む細胞培養マルチウェルプレートの各ウェルの上清を吸引し、試験溶液を0.5 mL/ウェルずつ添加し、37℃、5%CO₂の環境で1時間インキュベートした。インキュベート後、細胞培養マルチウェルプレート (96穴、CORNING社製) に上清を0.1 mL/ウェル加え、この上清をプレートリーダーで測定した。細胞活性の計算は以下のとおりである。

・細胞活性 [Abs.] = {測定試料の吸光度 [吸光度 (450 nm) - 測定試料の吸光度 (630 nm)]} - {ブランクの吸光度 [吸光度 (450 nm) - ブランクの吸光度 (630 nm)]}

ブランクは試験溶液を用いた。

[0096] (血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) および肝細胞増殖因子 (HGF) の測定)

血管新生に関わるサイトカインとしてVEGFおよびHGFを測定した。これらサイトカインは、それぞれVEGF, Human, ELISA Kit, Quantikine (96well) (R&D Systems社、DVE00)、HGF, Human, ELISA Kit, Quantikine (96well) (R&D Systems社、DHG00B) とプレートリーダー (iMark、BIO-RAD社製) を用いて測定した。使用方法は、各キットの使用説明書に従って使用した。試験サンプルは、解凍後に24時間培養した上清を回収し凍結保存した。凍結翌日以降の測定時に試験サンプルを解凍した。またキットに付属している希釈液で試験サンプル

を2～4倍に希釈して測定を行った。検量線は、各キットに付属するスタンダードを使用した。各サンプルおよび検量線用スタンダードの吸光度は以下の計算式から算出し、得られた吸光度を検量線に当てはめてVEGFおよびHGFの濃度を算出した。

・サンプルおよび検量線用スタンダードの吸光度 [Abs.] = 吸光度 (450nm) - 吸光度 (570nm)

[0097] <解凍後の移植>

解凍後の培養キャリア基材付きの細胞シートを細胞培養マルチプレートから取り出し、細胞シート面を豚肉へ貼付し、基材を剥離した。なお、貼付後剥離するまでの間、特に基材を加熱や冷却することは行わなかったため、基材の温度は室温(23℃)が保たれていた。

[0098] [実施例5～11]

上記<細胞シートの凍結保存>の凍結期間を表2に示す値に変更した以外、実施例4と同様にして、<細胞シートの製造>、<細胞シートの凍結保存>、<細胞シートの解凍>、および<解凍後の移植>を実施した。

[0099] [比較例4]

比較例4では、培養キャリア基材を使用せず、かつ、細胞培養マルチウェルプレートをシャーレ(UpCell(登録商標)、セルシード社製)に変更する以外は、実施例4と同様にして、<細胞シートの製造>を実施した。

[0100] [比較例5]

比較例5では、培養キャリア基材を使用せず、かつ、細胞培養マルチウェルプレートを接着細胞用マルチウェルプレート(24穴)に変更する以外は、実施例4と同様にして、<細胞シートの製造>、<細胞シートの凍結保存>、および<細胞シートの解凍>を実施した。

[0101] 各実施例、各比較例について、冷凍保存および解凍後の移植について評価を行った。結果を表2に示す。

[0102]

[表2]

	培養キャリア基材	凍結期間	評価				VEGF (pg)	HGF (pg)
			凍結保存	凍結前後の細胞活性の変動割合 (%)	解凍後の移植			
実施例4	実施例1	1時間	良好	89	良好	1451	4608	
実施例5		1日	良好	116	良好	1392	4611	
実施例6		7日	良好	97	良好	1293	3478	
実施例7		14日	良好	90	良好	1344	4088	
実施例8		28日	良好	94	良好	914	5292	
実施例9		56日	良好	81	良好	1952	5662	
実施例10		70日	良好	71	良好	777	4939	
実施例11		86日	良好	66	良好	869	4108	
比較例4		※使用しない	—	不良	—	—	—	
比較例5		※使用しない	86日	良好	36	—	869	3755

[0103] 比較例4では、シャーレを冷却する際に、細胞シートがシャーレから剥離したため、細胞シートを凍結保存することができなかった。そのため、凍結後の細胞活性率の測定、および解凍後の移植操作を実施しなかった。

比較例5では、細胞シートがマルチウェルプレートに密着した状態で凍結保存できたが、凍結前後の細胞活性率の変動割合が低下する結果が示された。

[0104] これに対して、実施例4～11では、細胞シートが培養キャリア基材に密着したまま冷凍保存でき、凍結前後の細胞活性率の変動割合やVEGFおよびHGFの少なくとも一方が、比較例5よりも高くなる結果を示した。また、解凍後の移植においても、細胞シートから培養キャリア基材を容易に剥離することができた。なお、細胞シートと豚肉はすぐに密着するため、貼付から剥離まで1分以内に行い、豚肉上で細胞シートを培養する必要はなかった。

実施例4～11の結果より、プラズマ処理されたPEEKフィルムを培養キャリア基材として使用することにより、細胞シートを凍結し、解凍後に移植することが可能であり、また、解凍後の細胞シートは長期間凍結されていても高い細胞活性率を維持できることが確認できた。

[0105] [実施例12～23]

上記〈細胞シートの凍結保存〉の凍結期間を表3に示す値に変更し、凍結保護剤をバンバンカー（登録商標）hRM（CGリンフォテック社）を使用し、 -150°C の冷凍庫を使用した以外、実施例4と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉、および〈解凍後の移植〉を実施した。この時の解凍時間は18分であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

なお、K熱電対を用いて、 -150°C の冷凍庫で保存された細胞シート（培養キャリア基材付きの細胞シート）の温度を測定したところ、 -140°C であった。

各実施例について、冷凍保存および解凍後の移植について評価を行った。結果を表3に示す。

[0106]

[表3]

	培養キャリア基材	凍結期間	評価				
			凍結保存	凍結前後の細胞活性率の変動割合(%)	解凍後の移植	VEGF (pg)	HGF (pg)
実施例12	実施例1	1日	良好	117	良好	1806	3945
実施例13		7日	良好	108	良好	1794	3250
実施例14		14日	良好	104	良好	1750	3600
実施例15		21日	良好	129	良好	1461	3480
実施例16		28日	良好	119	良好	1416	3644
実施例17		56日	良好	120	良好	1754	4492
実施例18		70日	良好	118	良好	1730	4250
実施例19		84日	良好	114	良好	1368	5397
実施例20		112日	良好	112	良好	1748	4113
実施例21		168日	良好	114	良好	2168	4573
実施例22		252日	良好	113	良好	2679	3989
実施例23		364日	良好	121	良好	3019	5007

[0107] 実施例12～23では、細胞シートが培養キャリア基材に密着したまま冷凍保存でき、凍結前後の細胞活性率の変動割合やVEGFおよびHGFのいずれも、比較例5よりも高くなる結果を示した。また、解凍後の移植におい

ても、細胞シートから培養キャリア基材を容易に剥離することができた。なお、細胞シートと豚肉はすぐに密着するため、貼付から剥離まで1分以内に行い、豚肉上で細胞シートを培養する必要はなかった。

[0108] [実施例24～26]

上記〈細胞シートの凍結保存〉の凍結期間を表4に示す値に変更した以外、実施例12と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉、および〈解凍後の移植〉を実施した。

ただし、各実施例の凍結時の状態を、図3(a)～図3(c)に示すように構成した。

図3(a)では、培養キャリア基材10側が培養容器20の底面を向くように配置した状態で、図3(b)では、細胞シート40側が培養容器20の底面を向くように配置した状態で、図3(c)では、細胞シート40を2枚の培養キャリア基材10で挟んだ状態で、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉を実施した。

各実施例について、冷凍保存および解凍後の移植について評価を行った。結果を表4に示す。

[0109]

[表4]

表4	凍結時の状態	凍結期間	評価		
			凍結保存	凍結前後の細胞活性の変動割合(%)	解凍後の移植
実施例24	図3(a)	6日	良好	103	良好
実施例25	図3(b)	6日	良好	96	良好
実施例26	図3(c)	6日	良好	100	良好

[0110] 実施例24～26では、細胞シートが培養キャリア基材に密着したまま冷凍保存でき、凍結前後の細胞活性率の変動割合が、比較例5よりも高くなる結果を示した。また、解凍後の移植においても、細胞シートから培養キャリア基材を容易に剥離することができた。なお、細胞シートと豚肉はすぐに密着するため、貼付から剥離まで1分以内に行い、豚肉上で細胞シートを培養する必要はなかった。

なお、PEEKフィルムは、低線膨張特性を有することから、凍結処理にも有用な培養キャリア基材として用いることができることが分かった。

[0111] [実施例 27]

実施例 12 の〈細胞シートの解凍〉に示す方法において、安全キャビネット内の室温での解凍を、デフロスター（DEC 社製）のヒートシンク上に細胞培養マルチウェルプレートを設置して解凍した以外は、実施例 12 と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉および〈解凍後の移植〉を実施した。デフロスターの設定温度は、ヒートシンクの温度を示し、37℃に設定して解凍した。この時の解凍時間は3分であった。

なお、K熱電対を用いて、-150℃の冷凍庫で保存された細胞シート（培養キャリア基材付きの細胞シート）の温度を測定したところ、-140℃であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

[実施例 28]

実施例 27 のデフロスターの設定温度を20℃にした以外は、実施例 26 と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉、および〈解凍後の移植〉を実施した。この時の解凍時間は5分であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

[実施例 29]

実施例 27 のデフロスターの設定温度を4℃にした以外は、実施例 26 と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉、および〈解凍後の移植〉を実施した。この時の解凍時間は8分であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

[実施例 30]

実施例 12 の〈細胞シートの解凍〉に示す方法において、安全キャビネット内の室温での解凍を、4℃に設定した冷蔵庫内での解凍に変更した以外は、実施例 26 と同様にして、〈細胞シートの製造〉、〈細胞シートの凍結保存〉、〈細胞シートの解凍〉、および〈解凍後の移植〉を実施した。この時の解凍時間は37分であった。解凍後、細胞シートの外観は良好であった。

実施例 27～30 について、細胞シートの外観、細胞活性率の測定、およ

び解凍後の移植について評価を行った。結果を表5に示す。なお、表5には、参考のため、実施例4および実施例12の結果を再度示した。

[0112] [表5]

表5

実施例	解凍時間(分)	評価		
		解凍後の細胞シートの外観	凍結前後の細胞活性の変動割合(%)	解凍後の移植
実施例4	16	良好	89	良好
実施例12	18	良好	117	良好
実施例27	3	良好	102	良好
実施例28	5	良好	89	良好
実施例29	8	良好	99	良好
実施例30	37	良好	63	良好

[0113] 実施例4、12、および27～30では、いずれも細胞シートの外観に問題はなかった。また、実施例4、12、および27～30は、比較例5と比べて、「凍結前後の細胞活性の変動割合」が高い結果を示した。つまり言い換えると、凍結後の細胞生存率を高く維持できていると言える。この中でも、実施例4、12、および27～29は、凍結時間が相対的に長い実施例30と比べて、「凍結前後の細胞活性の変動割合」が高いことが分かった。また、いずれの実施例の解凍物は、解凍後の移植も良好に行うことができた。

[0114] 上述の実施例1～30において、ヒト線維芽細胞に代えて、マウス繊維芽細胞を使用しても、同様の結果を示すことが確認できた。

[0115] この出願は、2023年7月14日に提出された日本出願特願2023-115623号および2023年12月27日に提出された日本出願特願2023-220506を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

符号の説明

- [0116] 10 培養キャリア基材
 12 培養面（表面）
 14 非培養面（裏面）
 20 培養容器

- 30 培養液
- 40 細胞シート
- 50 細胞シート付き培養キャリア基材
- 60 凍結保存液
- 70 被移植部位

請求の範囲

- [請求項1] 培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、前記培養キャリア基材の前記培養面に形成された前記細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、前記細胞シートから前記培養キャリア基材を剥離する、移植工程と、を含む、移植方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の移植方法であって、前記培養キャリア基材の基材厚みが $5\mu\text{m}$ 以上 $250\mu\text{m}$ 以下であり、前記培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムであり、前記培養キャリア基材の前記培養面は親水化処理がなされている、移植方法。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の移植方法であって、前記培養キャリア基材の基材厚みが $10\mu\text{m}$ 超であり、前記培養工程において、前記培養キャリア基材が培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、移植方法。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載の移植方法であって、前記移植工程において、貼り付けた後から剥離するまでの時間が、 10 分以下である、移植方法。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載の移植方法であって、前記培養工程により得られた前記細胞シートの面積が、 0.3cm^2 以上である、移植方法。
- [請求項6] 培養面に培養された細胞シートを搬送するために用いられる、培養キャリア基材であって、当該培養キャリア基材の基材厚みが $5\mu\text{m}$ 以上 $250\mu\text{m}$ 以下である、培養キャリア基材。
- [請求項7] 請求項6に記載の培養キャリア基材であって、前記培養キャリア基材の基材厚みが $10\mu\text{m}$ 超であり、前記細胞シ

ートの培養中に培養容器の内部に固着されずに自立膜として機能する、培養キャリア基材。

[請求項8] 請求項6または7に記載の培養キャリア基材であって、前記培養面が、親水化処理がなされている、培養キャリア基材。

[請求項9] 請求項8に記載の培養キャリア基材であって、前記親水化処理は、プラズマ処理された、培養キャリア基材。

[請求項10] 請求項6～9のいずれか一項に記載の培養キャリア基材であって、当該培養キャリア基材がポリエーテルエーテルケトンフィルムまたはポリエチレンテレフタレートフィルムである、培養キャリア基材。

[請求項11] 請求項6～10のいずれか一項に記載の培養キャリア基材であって、
、
前記培養面が、温度応答性ポリマーを含まない、培養キャリア基材。

[請求項12] 請求項6～11のいずれか一項に記載の培養キャリア基材を包装材料で包装した包装体。

[請求項13] 請求項6～11のいずれか一項に記載の培養キャリア基材と、細胞シートとの積層体を有しており、
前記細胞シートが、前記培養キャリア基材の前記培養面側における表面の少なくとも50%を被覆した状態である、細胞シート付き培養キャリア基材。

[請求項14] 請求項13に記載の細胞シート付き培養キャリア基材であって、前記細胞シートの面積が、 0.3 cm^2 以上である、細胞シート付き培養キャリア基材。

[請求項15] 培養容器の内部に、複数の細胞、培地、および請求項6～11のいずれか一項に記載の培養キャリア基材を導入して、前記培養キャリア基材の培養面に細胞シートを培養する、培養工程と、

前記培養容器から、前記細胞シート付きの前記培養キャリア基材を取り出す、取出工程と、を含む、細胞シート付き培養キャリア基材の

製造方法。

[請求項16] 請求項15に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法であって、

前記培養工程において、前記培養キャリア基材を培養容器の内部に固着せずに、前記細胞シートを培養する、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

[請求項17] 請求項15または16に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法であって、

前記取出工程において、前記培養容器から前記培養キャリア基材を物理的手段により分離する操作が不要である、細胞シート付き培養キャリア基材の製造方法。

[請求項18] 培養キャリア基材と前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シートとを含む細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保存液中で冷却する冷却工程を含む、凍結保存方法。

[請求項19] 請求項18に記載の凍結保存方法であって、

前記冷却工程において、前記細胞シート付き培養キャリア基材を、凍結保存液中で非貫流式の冷却装置を用いて冷却する、凍結保存方法。

[請求項20] 請求項18または19に記載の凍結保存方法であって、

前記冷却工程において、 $0 \sim -5^{\circ}\text{C}$ における冷却速度が、 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上 $15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下である、凍結保存方法。

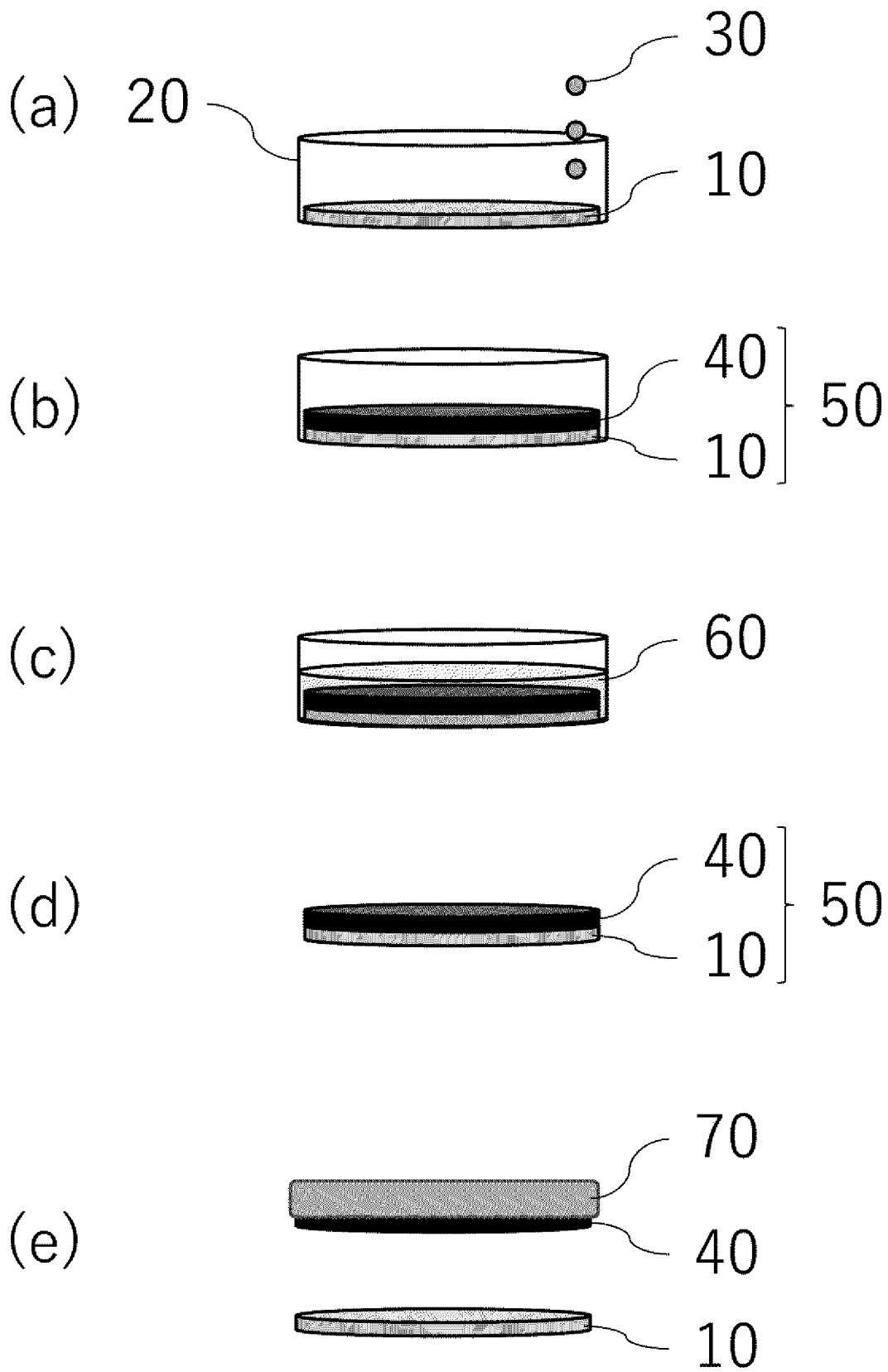
[請求項21] 請求項18～20のいずれか一項に記載の凍結保存方法であって、前記冷却工程の後、 $-196 \sim -60^{\circ}\text{C}$ にて前記細胞シート付き培養キャリア基材を保存する、凍結保存工程を含む、凍結保存方法。

[請求項22] 培養キャリア基材と、

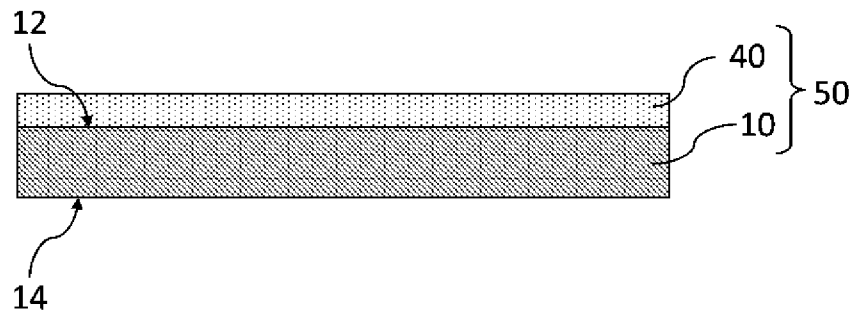
前記培養キャリア基材の表面に形成された細胞シート、を含み前記培養キャリア基材および前記細胞シートが凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。

- [請求項23] 請求項22に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、
-196℃～-60℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。
- [請求項24] 請求項22に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、
-196℃～-135℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。
- [請求項25] 請求項22に記載の細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物であって、
-134℃～-60℃で凍結保存状態である、細胞シート付き培養キャリア基材の凍結物。
- [請求項26] 請求項22～25のいずれか一項に記載の凍結物を包装材料で包装した包装体。

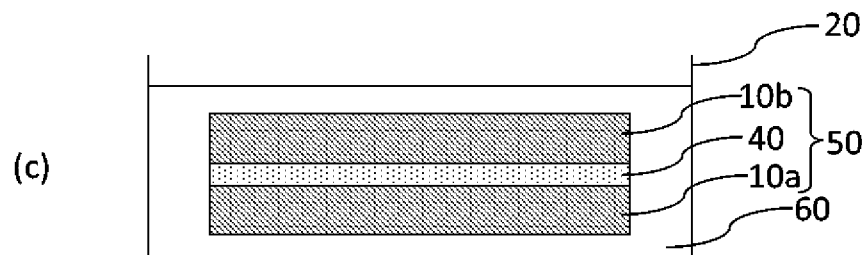
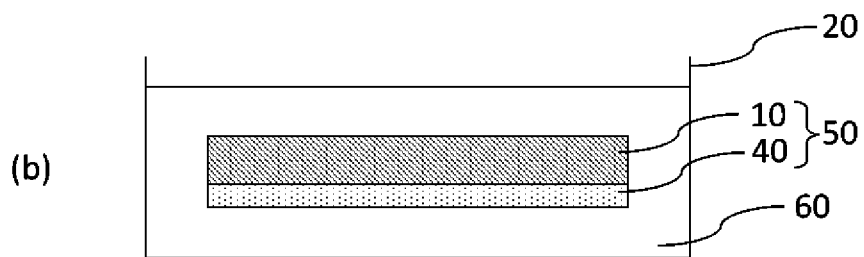
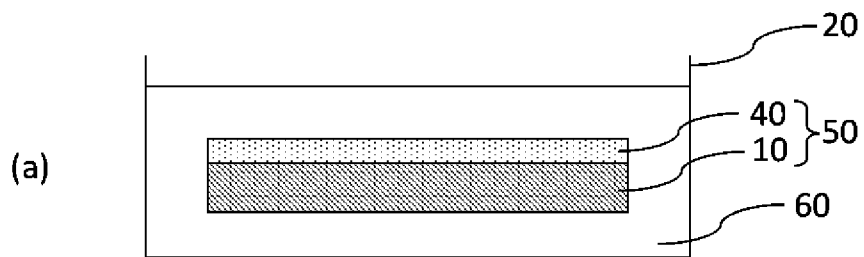
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/024961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12M 3/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 11/08</i> (2020.01)i FI: C12N5/00; C12M1/00 A; C12M1/00 C; C12M3/00 A; C12N5/071; C12N11/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/00; C12M1/00; C12M3/00; C12N5/071; C12N11/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-247909 A (JAPAN TISSUE ENGINEERING KK) 12 December 2013 (2013-12-12) claims, paragraphs [0022], [0025], [0026], [0033]	6-17
Y	claims, paragraphs [0022], [0025], [0026], [0033]	1-5, 18-26
Y	WO 2006/093151 A1 (CELLSEED INC.) 08 September 2006 (2006-09-08) paragraph [0048]	1-5, 18-26
X	JP 2011-115058 A (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) 16 June 2011 (2011-06-16) claims, paragraphs [0023], [0024]	6-26
Y	claims	1-5, 18-26
Y	JP 2022-8269 A (UNIV YAMAGUCHI) 13 January 2022 (2022-01-13) claims	1-5, 18-26
X	JP 2016-13111 A (DAI NIPPON PRINTING CO., LTD.) 28 January 2016 (2016-01-28) claim 6, paragraphs [0021], [0022], [0026]	6-17
Y	claim 6, paragraphs [0021], [0022], [0026]	1-5, 18-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 11 September 2024		Date of mailing of the international search report 24 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

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:

(Invention 1) Claims 1-5

Claims 1-5 have a special technical feature of “including a transplantation process of attaching the cell sheet formed on the culture surface of the culture carrier substrate to a transplant site, and then peeling the culture carrier substrate from the cell sheet,” and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 6-17

Claims 6-17 share, with claim 1 classified as invention 1, the common technical feature of a “culture carrier substrate on which a cell sheet is cultured on a culture surface.” However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be said to be a special technical feature. Also, there are no other the same as or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 6-17 are not dependent on claim 1. Furthermore, claims 6-17 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 6-17 cannot be classified as invention 1.

Also, claims 6-17 have the special technical feature of a “substrate thickness is 5 μm to 250 μm ,” and are thus classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 18-26

Claims 18-26 share, with claim 1 classified as invention 1 and claim 6 classified as invention 2, the common technical feature of a “culture carrier substrate on which a cell sheet is cultured on a culture surface.” However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be said to be a special technical feature. Also, there are no other the same as or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 18-26 are not dependent on claim 1 or 6. Furthermore, claims 18-26 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Thus, claims 18-26 cannot be classified as either invention 1 or 2.

Also, claims 18-26 have the special technical feature of “freezing of culture carrier substrates with attached cell sheets,” and are thus classified as invention 3.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/024961

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-247909	A	12 December 2013	WO 2013/179913 A1 CN 104334713 A	
WO	2006/093151	A1	08 September 2006	US 2008/0226692 A1 paragraph [0063] JP 2011-224398 A JP 2014-155494 A EP 1857126 A1	
JP	2011-115058	A	16 June 2011	(Family: none)	
JP	2022-8269	A	13 January 2022	(Family: none)	
JP	2016-13111	A	28 January 2016	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/00(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 11/08(2020.01)i FI: C12N5/00; C12M1/00 A; C12M1/00 C; C12M3/00 A; C12N5/071; C12N11/08		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/00; C12M1/00; C12M3/00; C12N5/071; C12N11/08 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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-247909 A (株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) 12.12.2013 (2013-12-12) 特許請求の範囲、[0022]、[0025]、[0026]、[0033]	6-17
Y	特許請求の範囲、[0022]、[0025]、[0026]、[0033]	1-5, 18-26
Y	WO 2006/093151 A1 (株式会社セルシード) 08.09.2006 (2006-09-08) [0048]	1-5, 18-26
X	JP 2011-115058 A (テルモ株式会社) 16.06.2011 (2011-06-16) 特許請求の範囲、[0023]、[0024]	6-26
Y	特許請求の範囲	1-5, 18-26
Y	JP 2022-8269 A (国立大学法人山口大学) 13.01.2022 (2022-01-13) 特許請求の範囲	1-5, 18-26
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵触するものではなく、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 11.09.2024	国際調査報告の発送日 24.09.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 手島 理 4N 5083 電話番号 03-3581-1101 内線 3461	

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 2016-13111 A (大日本印刷株式会社) 28.01.2016 (2016 - 01 - 28) 請求項6、 [0021]、 [0022]、 [0026]	6-17
Y	請求項6、 [0021]、 [0022]、 [0026]	1-5, 18-26

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の国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1-5

請求項1-5は、「培養キャリア基材の前記培養面に形成された前記細胞シートを被移植部位に貼り付けた後、前記細胞シートから前記培養キャリア基材を剥離する、移植工程を含む」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項6-17

請求項6-17は、発明1に区分された請求項1と、「培養面に細胞シートが培養された培養キャリア基材」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項6-17は、請求項1の従属請求項ではない。また、請求項6-17は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項6-17は発明1に区分できない。

そして、請求項6-17は、「基材厚みが5 μ m以上250 μ m以下である」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

（発明3）請求項18-26

請求項18-26は、発明1に区分された請求項1及び発明2に区分された請求項6と、「培養面に細胞シートが培養された培養キャリア基材」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項18-26は、請求項1及び6の従属請求項ではない。また、請求項18-26は、発明1又は2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項18-26は発明1又は2のいずれにも区分できない。

そして、請求項18-26は、「細胞シート付き培養キャリア基材を凍結する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明3に区分する。

- 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。
- 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。
- 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。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

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

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2024/024961

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2013-247909	A	12.12.2013	WO	2013/179913	A1	
				CN	104334713	A	

WO	2006/093151	A1	08.09.2006	US	2008/0226692	A1	
				[0 0 6 3]			
				JP	2011-224398	A	
				JP	2014-155494	A	
				EP	1857126	A1	

JP	2011-115058	A	16.06.2011	(ファミリーなし)			

JP	2022-8269	A	13.01.2022	(ファミリーなし)			

JP	2016-13111	A	28.01.2016	(ファミリーなし)			
