

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4049838号
(P4049838)

(45) 発行日 平成20年2月20日(2008.2.20)

(24) 登録日 平成19年12月7日(2007.12.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 M 1/24 (2006.01)

C 1 2 M 1/24

請求項の数 8 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平8-238197	(73) 特許権者	595117091
(22) 出願日	平成8年9月9日(1996.9.9)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公開番号	特開平9-107950		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公開日	平成9年4月28日(1997.4.28)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7417-1880
審査請求日	平成15年5月23日(2003.5.23)		フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
(31) 優先権主張番号	08/525807		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(32) 優先日	平成7年9月8日(1995.9.8)	(74) 代理人	100077481
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 谷 義一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 培養容器アセンブリ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インキュベータ内において培養細胞を増殖させるために構成された培養容器アセンブリであって、

チャンバと、前記チャンバに接続され前記チャンバ内へ細胞および培養液を導入するための開口部を有するネックとを備える容器と、

上部と、底部と、前記上部から前記底部へ延在し内部表面と外部表面とを有する円環状のスカートと、前記円環状のスカートの前記内部表面に囲まれて前記上部から前記底部に向かって延出する内側の反転したスカート部分と、前記円環状のスカートの前記内部表面と前記反転したスカート部分との間の円環状の間隙と、前記反転スカート部分により形成される前記上部の区画領域と、前記区画領域により囲まれた前記反転スカート部分で前記上部に形成されたオリフィスとを備え、前記容器の内外へのガス拡散を許容する手段が前記オリフィスに取り付けられているキャップと、

前記容器内外へのガス拡散を遮断するために前記キャップに取り外し自在に取り付けられ、円筒状の基部に一体的に形成され突起を備える上部フランジを備え、該突起が末端部とクリートが配置された基端部を備え、ここで、前記末端部が前記上部フランジの下側に延出しているプラグとを備えることを特徴とする培養容器アセンブリ。

【請求項 2】

前記キャップを取り外し自在に取り付ける手段は、前記ネックへ前記キャップのねじ込み式の取り付けをもたらしべく、前記ネックのねじ切りしてある部分と前記キャップに適

10

20

合してねじ切りしてある部分とを含むことを特徴とする請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 3】

前記容器はフラスコまたはローラー・ボトルであることを特徴とする請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 4】

前記容器がフラスコであることを特徴とする請求項 3 に記載のアセンブリ。

【請求項 5】

前記容器がローラー・ボトルであることを特徴とする請求項 3 に記載のアセンブリ。

【請求項 6】

前記容器内外へのガス拡散を許容する前記手段はガス透過性膜であることを特徴とする請求項 1 に記載のアセンブリ。 10

【請求項 7】

前記プラグの前記円筒状の基部が前記キャップの前記区画領域へ取り外し自在に固定されることによって前記容器内外へのガス拡散が遮断されることを特徴とする請求項 6 に記載のアセンブリ。

【請求項 8】

前記プラグは、前記容器とプラグとを互いに対してどちらかの方向に回転させて前記区画領域から軸方向に前記プラグを引抜くことにより、前記キャップの前記区画領域から取り外されることを特徴とする請求項 7 に記載のアセンブリ。

【発明の詳細な説明】 20

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞培養生産用装置に関し、さらに詳しくは、容器の内外へのガス拡散率を変化させる手段を有する容器と閉鎖体とのアセンブリに関する。

【0002】

なお、本明細書の記述は本件出願の優先権の基礎たる米国特許出願第 08 / 525 , 807 号 (1995 年 9 月 8 日出願) の明細書の記載に基づくものであって、当該米国特許出願の番号を参照することによって当該米国特許出願の明細書の記載内容が本明細書の一部分を構成するものとする。

【0003】 30

【従来の技術】

典型的には、細胞は水素イオン濃度 (pH、水素イオン濃度の負の対数)、温度、湿度、浸透圧、およびある種のイオン濃度が比較的狭い範囲内に制御されている環境下で培養される。

【0004】

このような組織培養系で使用される容器は典型的にはプラスチックで製作され閉鎖体を含んでいる。このような容器および閉鎖体は、米国特許第 4 , 289 , 248 号、第 4 , 387 , 822 号、第 4 , 770 , 308 号、第 5 , 047 , 347 号に示されている。

【0005】

典型的な培養系においては、組織培養液の緩衝系と、インキュベータ環境で約 5 ないし 7 容量パーセント程度の濃度を維持するのに十分な率で二酸化炭素 (CO₂) が導入されるインキュベータとを組み合わせることにより、pH がほぼ生理的レベルに維持される。CO₂ は水と反応して弱酸と炭酸を形成し、これが緩衝系と反応して pH をほぼ生理的レベルに維持する。インキュベータから組織培養容器への CO₂ の導入は、一般に容器に閉鎖体、例えば、緩く嵌合させたキャップ、ストッパ、またはガス透過性膜のついたキャップ等を用いて実現している。容器内部とインキュベータ環境との間でガス交換が行なわれると同時に、滅菌状態を維持しかつ液洩れを防止して、容器内の平衡が維持されるようにしている。利用者または閉鎖体の設計で決まるおおよその範囲において、緩く嵌合させたキャップ、または、ストッパが部分的に開放されている。 40

【0006】 50

【発明が解決しようとする課題】

細胞の増殖および培養中にインキュベータの管理された環境から容器を取り出すことがしばしば必要となる。容器は通常では検査および/または細胞や培養液の処理のために取り出される。容器がインキュベータの外部にある時も細胞培養のpHが所望の生理的レベルに維持されるのが重要である。

【0007】

培養容器に対し、(1)容器内の雰囲気とインキュベータとの間に迅速かつ均一な平衡をもたらし、(2)細胞培養が培養系のpHの望ましくない変化を受けることなく合理的な長時間にわたり培養容器をインキュベータの管理された環境から取り出すことができ、かつ、(3)再使用可能な、改良された閉鎖体アセンブリへの特別な要求が存在する。

10

【0008】**【課題を解決するための手段】**

請求項1の発明は、インキュベータ内において培養細胞を増殖させるために構成された培養容器アセンブリであって、チャンバと、前記チャンバに接続され前記チャンバ内へ細胞および培養液を導入するための開口部を有するネックとを備える容器と、上部と、底部と、前記上部から前記底部へ延在し内部表面と外部表面とを有する円環状のスカートと、前記円環状のスカートの前記内部表面に囲まれて前記上部から前記底部に向かって延出する内側の反転したスカート部分と、前記円環状のスカートの前記内部表面と前記反転したスカート部分との間の円環状の間隙と、前記反転スカート部分により形成される前記上部の区画領域と、前記区画領域により囲まれた前記反転スカート部分で前記上部に形成されたオリフィスとを備え、前記容器の内外へのガス拡散を許容する手段が前記オリフィスに取り付けられているキャップと、前記容器内外へのガス拡散を遮断するために前記キャップに取り外し自在に取り付けられ、円筒状の基部に一体的に形成され突起を備える上部フランジを備え、該突起が末端部とクリートが配置された基端部を備え、ここで、前記末端部が前記上部フランジの下側に延出しているプラグとを備えることを特徴とする。

20

【0009】

ここで、前記キャップを取り外し自在に取り付ける手段は、前記ネックへ前記キャップのねじ込み式の取り付けをもたらすべく、前記ネックのねじ切りしてある部分と前記キャップの適合してねじ切りしてある部分とを含むことができる。

【0010】

また、前記容器はフラスコまたはローラー・ボトルであってもよい。

30

【0011】

さらに、前記キャップがストッパであってもよい。

【0012】

なお、前記容器内外へのガス拡散を許容する前記手段はガス透過性膜であってもよい。

【0013】

また、前記プラグの前記円筒状の基部が前記キャップの前記区画領域へ取り外し自在に固定されることによって前記容器内外へのガス拡散が遮断されてもよい。

【0014】

さらに、前記プラグは、前記容器とプラグとを互いに対してどちらかの方向に回転させて前記区画領域から軸方向に前記プラグを引抜くことにより、前記キャップの前記区画領域から取り外されてもよい。

40

【0015】

本発明はチャンバと、開口と、該開口と関連する閉鎖体またはその他の手段と、容器の内外へのガス拡散を許容する手段と、ガス拡散を遮断する手段とを含む容器である。該閉鎖体は該容器を密閉する。

【0016】

好ましくは、容器はフラスコ、ローラー・ボトル、チューブ、スピナーフラスコ (spinner flask)、攪拌式生物反応器またはガス交換を必要とする全ての容器である。さらに好ましくは、容器はフラスコまたはローラー・ボトルである。

50

【 0 0 1 7 】

望ましくは、閉鎖体はキャップ、プッシュ式キャップ、ねじ付キャップ、ねじ込み式キャップ、またはストッパである。最も好ましくは、閉鎖体はキャップである。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、閉鎖体は容器の内外へのガス拡散を許容する手段を備えた上端部を含む。好ましくは、ガス拡散を許容する手段はガス透過性膜である。

【 0 0 1 9 】

閉鎖体にさらに関連するものは、閉鎖体と容器との間の密閉を損なうことなくガス透過性膜を閉塞する手段である。好ましくは、膜を遮断する手段はプラグである。プラグは閉鎖体に取り付け自在に装着され得、膜を大気から制限するまたは利用できるようにすることができる。

10

【 0 0 2 0 】

さらに好ましくは、プラグはプラスチック製で利用者が容易に操作できるようにするための手段を含む。

【 0 0 2 1 】

ほぼ気密のシールはプラグを閉鎖体とともに使用した時に重ね合せられる。プラグをキャップの上部から除去して膜を環境に曝露することができる。容器をインキュベータに入れて特定の培養手順で膜全体をインキュベータの環境に曝露する必要がある時、プラグをキャップの最上部から除去して膜を環境に曝露することができる。容器をインキュベータの管理された環境から取り出す時にプラグを再装着して膜を被覆し、比較的長時間にわたりインキュベータ外部に容器を取り出しておくことができるようにする。つまり、プラグで膜を被覆することにより、容器からの実質的なガス漏洩を防止し、これによって培養 pH の望ましくない変動が起こらないようにする。

20

【 0 0 2 2 】

閉鎖体からプラグを除去することにより容器とインキュベータ内の環境の迅速かつ均一な平衡が得られる。しかし、プラグを閉鎖体へ着脱自在に取り付けて膜を遮断する場合、容器は閉鎖系であり微生物の容器内への侵入が防止される。

【 0 0 2 3 】

プラグに印刷を行なうか、または、プラグ表面が手書きでプラグに追加情報を書き込めるようにすることができる。

30

【 0 0 2 4 】

プラグは閉鎖体へ取外し自在に装着した場合に、容器の滅菌状態を汚染したり漏洩を誘起することはない。さらなる利点は、プラグを閉鎖体から取り外した場合に、容器のキャップを分解する必要がなく、膜を通してのみガス交換が行なわれることである。

【 0 0 2 5 】

プラグを使用するさらなる利点は、膜を用いていないキャップの必要性が除外されることである。

【 0 0 2 6 】

さらなる利点は、プラグにより細胞培養条件の一貫性が保証され、また大規模生産における複数の細胞培養の生産が容易になることである。このような大規模生産用途では、有意量の商用生物製剤、例えば、エリスロポイエチン (EPO) または組織型プラスミノゲン・アクチベータ (t-PA) を生成する目的で超高密度に増殖させた場合、CO₂ や乳酸を過生産する変換または部分変換細胞系列を使用することが多い。多数の容器を必要とするこのような大規模生産用途では、生産ライン内のそれぞれの容器のプラグを同時に取外すことができる (提供すべき換気量を推定する必要性を明白としている)。

40

【 0 0 2 7 】

その他の重要な利点はプラグを再利用することができ、経済的な製造が容易に行なえることである。

【 0 0 2 8 】

【 発明の実施の形態 】

50

本発明は多くの異なる態様の実施の形態で満たされるが、本発明の好適実施の形態を図面に図示した明細書で詳細に説明する。本開示は本発明の原理の例示と考えるべきで、図示した具体例に本発明を制限することを意図するものではないことが理解されるべきである。本発明の範囲と趣旨とを逸脱することなく、その他各種の変更が当業者には明らかで容易に成し得るであろう。本発明の範囲は請求項とその均等物によって定められるものである。

【 0 0 2 9 】

図 1 および図 2 は細胞培養容器 1 0、フラスコ 1 2、キャップ 2 0、およびプラグ 2 2 を図示している。フラスコは、好ましくは、ガス非透過性で光学的に透明、非毒性かつ培養しようとする細胞に対して不活性の耐衝撃性プラスチックまたはガラスから製作される。

10

【 0 0 3 0 】

フラスコ 1 2 は、物質を排出するまたは分注するまでの間に、その物質を保持するのに適したチャンバ 1 6 を形成する本体 1 4 を有している。本体 1 4 を、例えば、金属、プラスチック、またはガラス等の変形自在または変形自在ではない材料から作成するかは重要でない。

【 0 0 3 1 】

図 3 および図 4 に図示したように、フラスコ 1 2 はキャップ 2 0 を受け入れるようにねじを切ったネック 1 8 を含む。ネック 1 8 は容器と一体で、一端が容器と一体であり他端が開口を形成する円筒状の導管を形成し、該開口を通して細胞および培養液をフラスコ本体に導入できるようになっている。ネック 1 8 とキャップ 2 0 とは哺乳類細胞および培養液などの材料を本体 1 6 に導入する周知の多数の手段の 1 つを構成する。従来周知のように、キャップ 2 0 がネック 1 8 からねじ外されて開口をもたらし、ここを通して、細胞と培養液とをフラスコ内に導入することができる。この後、キャップをネックにねじ込みフラスコを再封止する。

20

【 0 0 3 2 】

図 3 および図 4 に図示してあるように、キャップ 2 0 は上部表面 3 7、底部の停止辺縁 3 8、上部表面 3 7 から底部の停止辺縁 3 8 まで延在する円環状の外側スカート 4 0 を有する。円環状の外側スカート 4 0 は外壁表面 4 2 と内壁表面 4 4 とを有する。キャップ 2 0 は上部表面 3 7 から底部表面 4 8 まで延在する内側の円環状の反転させた陥凹スカート部分 4 6 も有する。反転陥凹スカート部分 4 6 はキャップ 2 0 の上部表面 3 7 に区画領域 5 0 を形成する。円環状の外側スカート 4 0 の内壁と内側の円環状で反転陥凹したスカート 4 6 とは互いに間隔が開けてあり、円環状の間隙 5 2 を形成している。キャップ 2 0 はさらに反転陥凹スカート部分 4 6 の上部表面にオリフィス 5 4 を有する。ガス透過性膜 5 6 がオリフィス 5 4 に取り付けられている。

30

【 0 0 3 3 】

図 3、図 4、図 5 に図示してあるように、プラグ 2 2 は上部フランジ 2 6 と底部停止表面 2 8 とを有し、円筒状の基部 2 4 が上部フランジ 2 6 から底部停止表面 2 8 まで延在する。円筒状の基部 2 4 は外壁表面 3 0 と内壁表面 3 2 とを有する。上部フランジ 2 6 は上部表面 3 4 と底部表面 3 6 とを有し、これらは全て一体に形成される。上部フランジ 2 6 の下側で底部表面 3 6 から 4 個の突起 6 0 が延出しており、これらの各々は末端部 6 2 と基端部 6 4 とを有している。各々の突起はさらに、突起の基端部から延在するクリート (cleat) 6 6 を含んでいる。

40

【 0 0 3 4 】

プラグは熱可塑性モールド成形材料から作成できる。代表的な材料は、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニルを含む。

【 0 0 3 5 】

ガス透過性膜 5 6 は長期にわたり酸素および二酸化炭素等のガスの本体 1 4 への自由な通過をもたらしつつ、細菌や真菌が通過するのを防止するような何らかの好適なガス透過性材料から作成することができる。膜材料は適切な二酸化炭素および酸素透過率をもたらしつつ微生物の通過を防止する。酸素と二酸化炭素とが自由に通過するが細菌や真菌の通過

50

を防止するのに十分な適切な気孔寸法を有する幾つかのガス透過性材料が入手可能であり、これらの材料はポリエチレン、アクリル酸ポリカーボネート共重合体、およびポリテトラフルオロエチレンを含む。

【0036】

図3に図示したように、プラグ22をキャップ20に取り外し自在に固定した場合、キャップの区画領域50はプラグの円筒状の基部24を受け入れる。プラグは区画領域に押し込まれ、プラグのさらに内向きの移動はプラグの基部と突起のクリートとの間の摩擦接触により制限される。突起60のクリートはキャップの上部表面に圧縮力を発生させることによりキャップに圧入する。プラグをキャップから取り外すことを所望する場合、フラスコを一方の手で保持しておき、プラグの上部を他方の手の指2本で摘み、フラスコとプラグとを互いにどちらかの方向へ回転させながら区画領域から軸方向に引抜くようにすると、困難なく引き出せる。プラグをキャップにふたたび挿入して引抜くことが多数回できるので、長期間にわたりプラグを再使用できることが明らかである。

10

【0037】

使用に際して、フラスコがインキュベータの管理された環境外部に置かれる時、プラグ22がキャップ20へ取り外し自在に固定される。フラスコ12がインキュベータの管理された環境内に置かれる時は、プラグが取り外されインキュベータ環境と本体14とのガス間の連通を許容することによって、迅速かつ均一な平衡がもたらされるようにする。

【0038】

図6および図7に図示したように、本発明は図1～図5の部材と実質的に同一の多くの部材を含む。従って、類似の機能を実行する類似の部材は、図1～図5の部材と同一の参照番号を付与してあるが、添字「a」が図6および図7においてこれら類似の部材を識別するために使用されている点で異なる。

20

【0039】

図6および図7に図示したように、ローラー・ボトル70、キャップ20aおよびプラグ22aは、インキュベータの管理された環境内部で使用されインキュベータと容器とのガス間で迅速かつ均一な平衡をもたらしことのできる培養容器系の別の実施の形態である。

【0040】

本発明による容器は、容器のガス透過性が望まれるような細胞培養系でのその他の用途を有しているが、本発明は容器本体のガス交換を許容することが望ましいような一定の二酸化炭素環境インキュベータでの使用に特に好適である。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】キャップとプラグとを有するフラスコの斜視図である。

【図2】プラグをキャップの上部に取り外し自在に取り付けてある図1のフラスコとキャップとの斜視図である。

【図3】図2のキャップとプラグとをその線3～3に沿ってみた断面図である。

【図4】図1のキャップとプラグとをその線4～4に沿ってみた断面図である。

【図5】図4のキャップをその線5～5に沿ってみた底面図である。

【図6】本発明の別の実施の形態でキャップとプラグとを有するローラー・ボトルの斜視図を示す。

40

【図7】図5のキャップを備えたローラー・ボトルの斜視図でプラグがキャップの最上部に取り外し自在に取り付けてある。

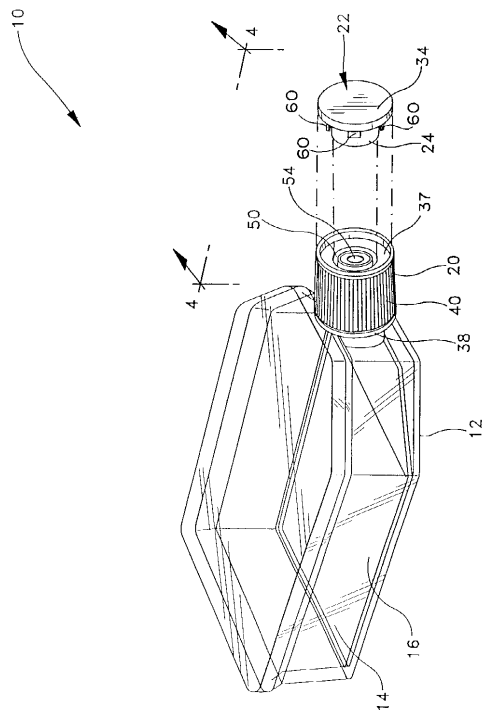
【符号の説明】

- 10 細胞培養容器
- 12 フラスコ
- 14 本体
- 16 チャンバ
- 18 ネック
- 20 キャップ
- 22 プラグ

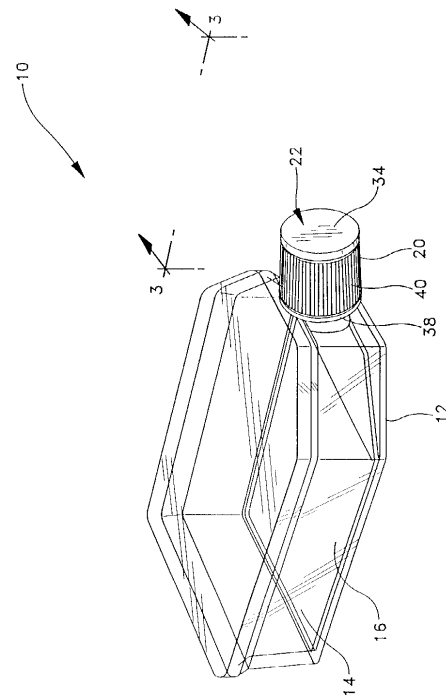
50

- 2 4 円筒状基部
- 2 6 上部フランジ
- 2 8 底部停止表面
- 3 0 外壁表面
- 3 2 内壁表面
- 3 4 上部表面
- 3 6 底部表面
- 3 7 上部表面
- 3 8 底部停止辺縁
- 4 0 外側スカート
- 4 2 外壁表面
- 4 4 内壁表面
- 4 6 内側環状反転陥凹スカート部
- 4 8 底部表面
- 5 0 区画領域
- 5 2 円環状間隙
- 5 4 オリフィス
- 5 6 ガス透過性膜
- 6 0 突起

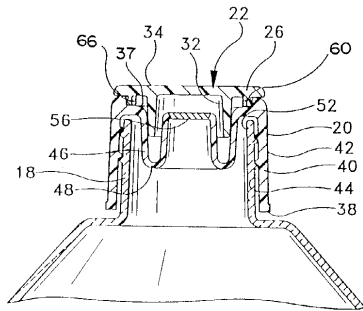
【図 1】



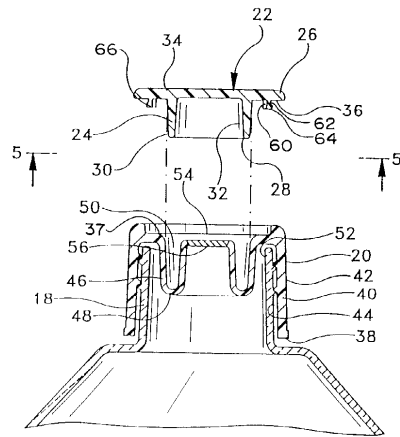
【図 2】



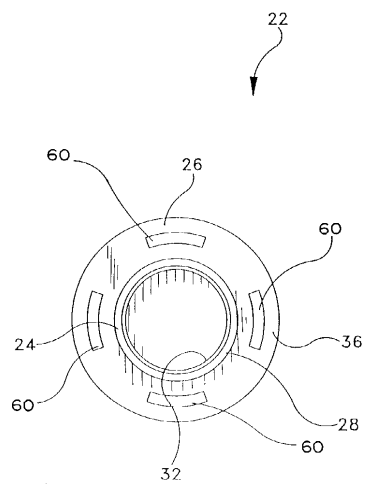
【図 3】



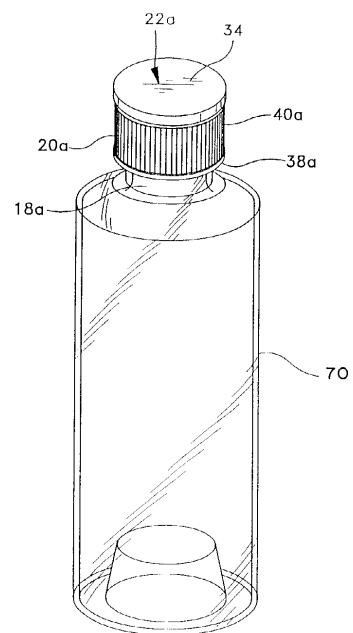
【図 4】



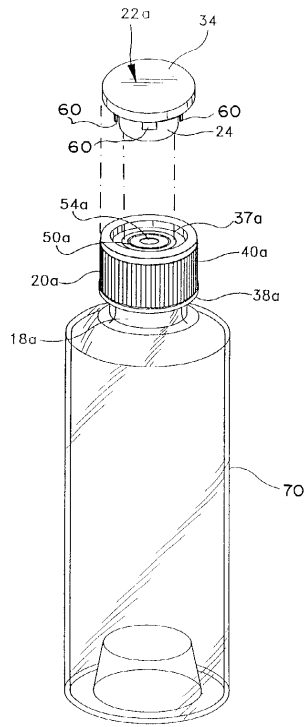
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 ジョン ジェイ . カヤル

アメリカ合衆国 07470 ニュージャージー州 ウェイン パインツリー ドライブ 28

(72)発明者 スーザン エル . バーカー

アメリカ合衆国 07670 ニュージャージー州 テナフライ ハイウッド アヴェニュー 15
2

(72)発明者 ジョン エム . ジャンソン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ピスカタウェイ シャーリー パークウェイ 408

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 実開平05 - 053458 (JP, U)

特開平03 - 030664 (JP, A)

特開平07 - 163333 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12M 1/00-3/10