

(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
2013 年 10 月 31 日(31.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/161885 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/062090
- (22) 国際出願日: 2013 年 4 月 24 日(24.04.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-104078 2012 年 4 月 27 日(27.04.2012) JP
- (71) 出願人: 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒5308205 大阪府大阪市北区中之島三丁目 3 番 2 3 号 Osaka (JP). 学校法人東京女子医科大学 (Tokyo Women's Medical University) [JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岩元 潮 (IWAMOTO, Ushio); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 1 0 5 番地 Tokyo (JP). 佐藤 美智 (SATO, Michi); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 1 0 5 番地 Tokyo (JP). 小西 佳奈子 (KONISHI, Kanako); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 1 0 5 番地 Tokyo (JP). 松浦 勝久 (MATSUURA, Katsuhisa); 〒1628666 東京都新宿区河田町 8 番 1 号

Tokyo (JP). 清水 達也 (SHIMIZU, Tatsuya); 〒1628666 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 Tokyo (JP). 岡野 光夫 (OKANO, Teruo); 〒1628666 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

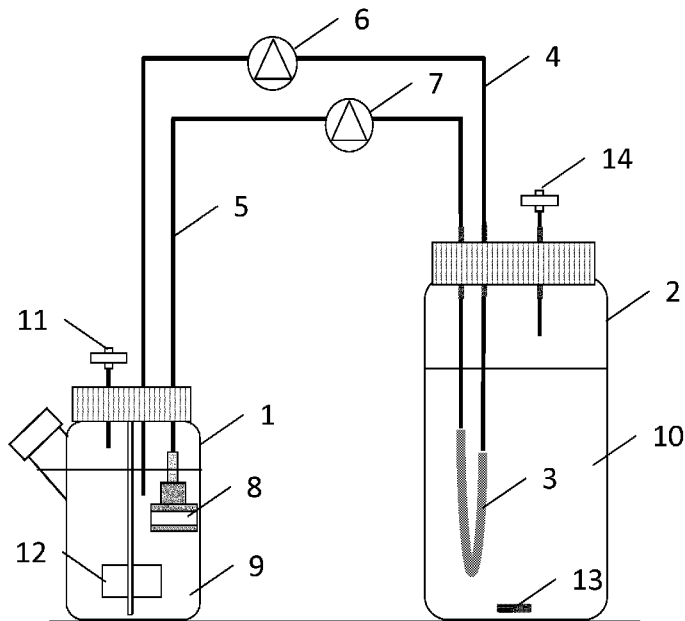
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: CELL CULTURE SYSTEM AND CELL CULTURE METHOD

(54) 発明の名称: 細胞培養システム及び細胞培養方法



(57) Abstract: A cell culture system equipped with a cell culture vessel, a composition-adjusted solution storage vessel, a culture solution composition adjustment means which has an inlet port and an outlet port for a cell culture solution, an inlet-connected liquid feeding circuit which is connected from the cell culture vessel to the inlet port of the culture solution composition adjustment means, an outlet-connected liquid feeding circuit which is connected from the cell culture vessel to the outlet port of the culture solution composition adjustment means, a means for perfusing the cell culture solution from the inlet-connected liquid feeding circuit to the outlet-connected liquid feeding circuit via the culture solution composition adjustment means, and a means for adjusting the amount of a liquid in the cell culture vessel, wherein both components for the cell culture solution in the cell culture vessel and components for the composition-adjusted solution in the composition-adjusted solution storage vessel can be controlled continuously through the culture solution composition adjustment means and the amount of the cell culture solution in the cell culture vessel can

be adjusted substantially at a constant level.

(57) 要約:

[続葉有]



NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
NE, SN, TD, TG).

細胞培養槽と、成分調整液貯留槽と、細胞培養液の入口と出口とを有する培養液成分調整手段と、細胞培養槽から培養液成分調整手段の入口に接続された入口接続送液回路と、細胞培養槽から培養液成分調整手段の出口に接続された出口接続送液回路と、入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て出口接続送液回路に細胞培養液を灌流する手段と、細胞培養槽の液量を調整する手段と、を備える細胞培養システムであって、培養液成分調整手段を介して細胞培養槽内の細胞培養液の成分と成分調整液貯留槽内の成分調整液の成分とを連続的に調整可能であると同時に、細胞培養槽内の細胞培養液の量を実質的に一定に調整可能である、細胞培養システム。

明 細 書

発明の名称：細胞培養システム及び細胞培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養システム及び細胞培養方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、従来の合成化学物質を主成分とした医薬品に加えてバイオテクノロジー技術を用いて生産された生物材料を起源とする医薬品である生物製剤の利用が広まっている。生物製剤の中でも特にめざましいものが抗体等の細胞産生物である。これらの生物製剤はその効果が非常に高いが、高価であることが課題となっている。また生物からの産生物であることから製造工程中に品質のばらつき等が従来の医薬品に比べて大きくなる可能性もある。よって、一度により大量に細胞を培養し、産生物を安価に製造するシステムの開発や、培養環境を安定に保持でき細胞の品質を維持することで産生物の品質を向上させることが可能な培養システムが求められている。

[0003] さらに、最近では細胞を治療に用いる再生医療が実用化され始めている。現在日本でも皮膚や軟骨組織では、薬事承認を受け市販されている製品がある。現在では患者の細胞を一部採取し、これを増殖させた後組織をつくり移植するという治療方法となっているが、将来的には体性幹細胞や多能性幹細胞から目的の細胞を誘導して治療に用いることが実用化されると予想される。このような治療を実現する場合、患者に移植可能な大きさの組織を作製するためには、非常に多量の細胞が必要となる。心臓の左心室を例に挙げるならば 10^9 個オーダーの細胞数が必要であると試算される。このような大量の培養細胞を準備するには、現在の技術手段では大変な手間とコストが必要である。

[0004] さらに現状の細胞培養工程の多くは人が手動操作で実施していることから、操作ミスや培養系への菌等の混入のリスクも完全には否定できない。

[0005] 以上から細胞をより高密度で培養でき、なおかつ低コストで、自動で実施

可能な有効な培養システムの実現が求められている。このような要求事項を満たす培養システムとして半透膜を用いた透析の原理を用いて培養液を連続的に浄化しながら培養する各種のシステムが提案されている（例えば、特許文献 1、2 参照。）。

[0006] しかし、これらのシステムで細胞培養を行うと、培養液を灌流することで生じる半透膜の外側と内側の圧力差や成分の濃度勾配により膜を介した培養液溶媒の移動が生じ、長時間の培養を実施すると槽内の液量が減少又は増加して培養槽内の液量をコントロールすることが難しいために安定した培養が難しいという課題がある。さらに、通常これらのシステムによる培養では培養液の組成変化を少なくするために灌流の速度をできるだけ高くする要求があるが、灌流速度を上げるほど上記のコントロールも困難になるという課題もある。また、培養スケールを大きくすることも灌流速度を大きくすることになり、やはり同様の課題が生じる。

[0007] またその他の方法として非特許文献 1 にはローター型の細胞培養槽に透析手段を接続する方法が開示されている。しかし、このような培養槽は一般的に広く使用されている細胞培養装置とは異なる特殊な細胞培養槽が必要であり、かつスケールアップが困難であるという課題がある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開昭 6 3－2 2 6 2 7 9 号公報

特許文献2：特公平 7－4 0 9 2 8 号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Biotechnology and Bioengineering, 2005; 92 (7) : 920

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は以上に述べた課題を解決するための細胞培養システムを提供する

。すなわち、さまざまな細胞の培養形態に対応可能で、低コスト、省力化、高密度培養を同時に達成できるシステムを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、培養液成分調整手段を介して細胞培養槽内の細胞培養液と成分調整液貯留槽内の成分調整液とが連続的に成分を調整可能であると同時に、細胞培養槽内の培養液量を実質的に一定に調整可能であることを特徴とする細胞培養システムにより、さまざまな細胞の培養形態に対応可能で、低コスト、省力化、高密度培養を同時に達成できかつスケールアップが容易に達成し得るシステムを提供しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明の態様は、細胞を培養するための細胞培養槽と、成分調整液貯留槽と、細胞培養液及び／又は成分調整液の入口と出口とを有し、半透膜を備える培養液成分調整手段と、細胞培養槽及び／又は成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の入口に接続された入口接続送液回路と、細胞培養槽及び／又は成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の出口に接続された出口接続送液回路と、入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て出口接続送液回路に細胞培養液及び／又は成分調整液を灌流する手段と、細胞培養槽の液量を調整する手段と、を備える細胞培養システムであって、培養液成分調整手段を介して細胞培養槽内の細胞培養液の成分と成分調整液貯留槽内の成分調整液の成分とを連続的に調整可能であると同時に、細胞培養槽内の細胞培養液の量を実質的に一定に調整可能である、細胞培養システムである。

[0013] 例えば、細胞培養システムは、培養液成分調整手段が成分調整液貯留槽内に配置されており、培養液成分調整手段が細胞培養液の入口と出口とを有し、入口接続送液回路が細胞培養槽から培養液成分調整手段の入口に接続されており、出口接続送液回路が細胞培養槽から培養液成分調整手段の出口に接続されており、灌流する手段が、入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て出口接続送液回路に細胞培養液を灌流してもよい。

[0014] あるいは、細胞培養システムは、培養液成分調整手段が細胞培養槽内に配置されており、培養液成分調整手段が成分調整液の入口と出口とを有し、入口接続送液回路が成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の入口に接続されており、出口接続送液回路が成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の出口に接続されており、灌流する手段が入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て出口接続送液回路に成分調整液を灌流してもよい。

[0015] またあるいは、細胞培養システムは、培養液成分調整手段が成分調整液貯留槽及び細胞培養槽の外部に設置されており、入口接続送液回路が、細胞培養槽から培養液成分調整手段の第1の入口に接続された第1の入口接続送液回路と、成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の第2の入口に接続された第2の入口接続送液回路と、を含み、出口接続送液回路が、細胞培養槽から培養液成分調整手段の第1の出口に接続された第1の出口接続送液回路と、成分調整液貯留槽から培養液成分調整手段の第2の出口に接続された第2の出口接続送液回路と、を含み、第1の入口と第1の出口を結ぶ空間と、第2の入口と第2の出口を結ぶ空間とを、半透膜が構成し、灌流する手段が、第1の入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て第1の出口接続送液回路に細胞培養液を灌流する手段と、第2の入口接続送液回路から培養液成分調整手段を経て第2の出口接続送液回路に成分調整液を灌流する手段と、を含んでいてもよい。

[0016] 灌流する手段は、細胞培養槽の細胞培養液及び／又は成分調整液貯留槽の成分調整液を培養液成分調整手段に送液する送液手段と、培養液成分調整手段に送液され、細胞培養液中の不要物質と成分調整液中の有用物質を接触させた細胞培養液及び／又は成分調整液を返液する返液手段とを備え、送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、細胞を含んだ細胞培養液の総量の変動が10%以内であってもよい。

[0017] 細胞培養システムは、入口接続送液回路あるいは第1の入口接続送液回路に設置された、細胞培養槽内側端部に細胞又は細胞凝集塊を通過させず、細

胞培養液を実質的に通過させるフィルターを更に備えていてもよい。

[0018] また、本発明の態様は、a) 上記の細胞培養システムを設置することと、
b) 細胞培養槽に、細胞及び細胞培養液を供給し、成分調整液貯留槽に培養液成分調整液を供給することと、c) 細胞培養液及び／又は成分調整液を連続的に灌流することと、を含み、送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とを、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ となるように制御し、かつ細胞を含んだ細胞培養液の総量の変動が10%以内になるように制御する、細胞培養方法である。

[0019] また、本発明の別の態様は、少なくとも、細胞及び細胞培養液が入れられ、細胞を培養する細胞培養槽と、有用物質を含有する成分調整液が入れられる成分調整液貯留槽と、細胞培養液と成分調整液を接触させ物質交換を行う培養液成分調整手段と、細胞培養槽の細胞培養液及び／又は成分調整液貯留槽の成分調整液を培養液成分調整手段に送液する送液手段と、接触させた細胞培養液及び／又は成分調整液を返液する返液手段と、を備え、送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、細胞培養液の細胞を含んだ細胞培養液の総量の変動が10%以内である、細胞培養システムである。

[0020] さらにあるいは、本発明の態様は、少なくとも、細胞及び細胞培養液を細胞培養槽に入れて、細胞を培養する工程と、細胞培養槽の細胞培養液及び／又は成分調整液貯留槽の成分調整液を送液する工程と、細胞培養液と成分調整液を、膜を介して接触させる工程と、膜を介して接触した細胞培養液及び／又は成分調整液を返液する工程と、を含み、送液する工程での1時間あたりの送液量 V_1 と、返液する工程の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、細胞培養液の細胞を含んだ細胞培養液の総量の変動が、10%以内である、細胞培養方法である。

[0021] 上記の細胞培養システム及び細胞培養方法において、例えば、細胞は哺乳動物細胞であり、哺乳動物細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹

細胞（iPS細胞）、間葉系幹細胞、造血幹細胞、及び／又はこれらから分化誘導された細胞である。

[0022] また、上記の細胞培養システム及び細胞培養方法において、例えば、細胞は、浮遊培養可能な細胞、接着細胞、細胞凝集体を形成する細胞、及び／又は粒子状担体に接着可能な細胞であり、粒子状担体に接着可能な細胞は、細胞培養槽に細胞及び粒子状担体を入れて培養される。

発明の効果

[0023] 本発明に係る細胞培養システムは、さまざまな細胞の培養形態に対応可能で、低コスト、省力化、高密度培養を同時に達成できるシステムを提供できる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]細胞培養システムの一例を示す模式図であり、培養液成分調整手段を成分調整液槽内に設置した例を示す模式図である。

[図2]細胞培養システムの一例を示す模式図であり、培養液成分調整手段を成分調整液槽内に設置し、かつ細胞培養槽内に細胞が通過しないフィルターを設置した例を示す模式図である。

[図3]細胞培養システムの一例を示す模式図であり、培養液成分調整手段を細胞培養槽内に設置した例を示す模式図である。

[図4]細胞培養システムの一例を示す模式図であり、培養液成分調整手段を細胞培養槽、及び成分調整液貯留槽の外部に独立して設置した例を示す模式図である。

[図5]細胞培養システムの一例を示す模式図であり、培養液成分調整手段を細胞培養槽、及び成分調整液貯留槽の外部に独立して設置し、かつ細胞培養槽内に細胞が通過しないフィルターを設置した例を示す模式図である。

[図6]細胞培養槽内細胞培養液のpH変化を示すグラフである。

[図7]細胞培養槽内細胞培養液の乳酸濃度変化を示すグラフである。

[図8]胚様体（培養10日目）の円相当直径分布を示すグラフである。

[図9]胚様体（培養10日目）内アポトーシス細胞の染色図を示すグラフであ

る。

発明を実施するための形態

[0025] 以下に本発明の実施の形態を説明する。以下の図面の記載において、同一又は類似の部分には同一又は類似の符号で表している。但し、図面は模式的なものである。したがって、具体的な寸法等は以下の説明を照らし合わせて判断すべきものである。また、図面相互間においても互いの寸法の関係や比率が異なる部分が含まれていることは勿論である。

[0026] 本実施形態に係る細胞培養システムは、図1に示すように、細胞を培養するための細胞培養槽1と、成分調整液貯留槽2と、細胞培養液9及び／又は成分調整液10の入口と出口とを有し、半透膜を備える培養液成分調整手段3と、細胞培養槽1及び／又は成分調整液貯留槽2から培養液成分調整手段3の入口に接続された入口接続送液回路5と、細胞培養槽1及び／又は成分調整液貯留槽2から培養液成分調整手段3の出口に接続された出口接続送液回路4と、入口接続送液回路5から培養液成分調整手段3を経て出口接続送液回路4に細胞培養液9及び／又は成分調整液10を灌流する手段7、6と、細胞培養槽1の液量を調整する手段と、を備える細胞培養システムであって、培養液成分調整手段3を介して細胞培養槽1内の細胞培養液9の成分と成分調整液貯留槽2内の成分調整液10の成分とを連続的に調整可能であると同時に、細胞培養槽1内の細胞培養液9の量を実質的に一定に調整可能である、細胞培養システムである。

[0027] 図2に示すように、細胞培養槽1内には、細胞又は細胞凝集塊が細胞培養液9とともに細胞培養槽1の外側に出てしまうことを防止するための手段として、フィルター8を入口接続送液回路5の端部に設けてもよい。フィルター8としては、細胞又は細胞凝集塊がフィルター表面に目詰まりし難い構造であればよく、素材や形は限定されないが、例えば細胞を対象とするならば平均孔径5～10 μ mのステンレスやナイロン製のメッシュ、不織布等、また細胞凝集塊を対象とするならばポリエチレンの焼結体、不織布からなる平均孔径30 μ mの平板型膜等が使用可能である。材質がそれらを吸着しやす

い性質を有している場合には、それらを別の材料でコートしたり、表面改質剤を用いたりすることで吸着を抑制することも可能である。

[0028] 本実施形態に係る細胞培養液とは、各種細胞とその細胞の生育可能な溶液成分と環境を少なくとも有する溶液をいう。その成分及び濃度は細胞の性質により設計される。また生理的なpHを維持しやすいように緩衝能を有するように設計されることや、pHの変化を色で判別しやすいようにpH指示色素を混合することもできる。一般的に市販されている各種細胞培養液をそのまま使用することやこれらに目的細胞の性質に応じて追加の成分を添加して用いることも可能である。

[0029] 本実施形態に係る細胞の培養システムで培養される細胞は、哺乳動物細胞等の細胞である。培養の結果、細胞の産生物を利用するのであれば、その物質を産生しやすい細胞や目的の物質を産生しやすいよう、特定の遺伝子を導入した細胞も選択できる。また、細胞培養の結果、特定の細胞を利用するのであれば、その細胞を増殖しやくなるように遺伝子改変した細胞なども用いることができる。

[0030] また、細胞の成熟度に関してもいかなる制約もなく、成熟細胞、未分化細胞ともに用いることが可能である。よって、生体組織から酵素処理をして採取した細胞、血液に由来する細胞、間葉系幹細胞、ES細胞、iPS細胞等が例示される。また、接着細胞、浮遊細胞であることにも限定されない。さらに、細胞は単一種類の細胞に限定もされない。目的の細胞が生育しやすい物質を産生する他の細胞を混合させて共培養するということにも用いられうる。

[0031] 本実施形態に係る培養液成分調整手段とは、培養液成分の膜透過性がその分子量に依存する半透性の膜をいう。成分調整液は培養液成分調整手段を介して細胞培養液と接する。培養液成分調整手段の孔径は細胞培養槽に保持したい成分の分子量により設計される。すなわち、細胞培養槽内に保持したい成分のうち最小分子量物質が膜を透過しないように選択される。培養液成分調整手段の形状は、平膜形状、中空糸形状が用いられうるが、培養液や成分

調整液を灌流する目的では中空糸形状が好ましい。

[0032] 培養液成分調整手段の材質は特に限定されないが、細胞培養槽内に保持したい成分が吸着、分解等されない材質が好ましく用いられる。また、材質がそれらを吸着しやすい性質を有している場合には、それらを別の材料でコートしたり、表面改質剤を用いたりすることで吸着を抑制することも可能である。培養液成分調整手段 3 は、図 3 に示すように細胞培養槽 1 内に設置、または図 1 及び図 2 に示すように成分調整液貯留槽 2 に設置、または、図 4 に示すように細胞培養槽 1 や成分調整液貯留槽 2 の外部に独立して設置される。

[0033] このように、本実施形態に係る細胞培養システムは、1) 培養液成分調整手段を成分調整液槽内に設置する、2) 培養液成分調整手段を細胞培養槽内に設置する、3) 培養液成分調整手段を細胞培養槽、及び成分調整液貯留槽の外部に独立して設置する、の少なくとも3種類をとりうるが、この形態は細胞の性質によっても選択される。例えば、培養する細胞が接着細胞であれば、細胞培養槽内に設置した培養液成分調整手段の半透膜に細胞が付着することを防ぐために1) や3) の形態が好ましく用いられる。また、培養細胞が浮遊細胞であり単一細胞のまま増殖する細胞であれば2) の形態が好ましく用いられる。

[0034] 図 4 に示す構成においては、送液手段 7 によって細胞培養槽 1 から吸引された細胞培養液 9 は、第 1 の入口接続送液回路 5 を経て、中空糸モジュールの第 1 の入り口から中空糸モジュールの内部に入り、中空糸 3 の内側を通過し、さらに中空糸モジュールの第 1 の出口から第 1 の出口接続送液回路 4 を経て細胞培養槽 1 に戻る。また、送液手段 15 によって成分調整液貯留槽 2 から吸引された成分調整液 10 は、第 2 の入口接続送液回路 17 を経て、中空糸モジュールの第 2 の入口から中空糸モジュールの内部に入り、中空糸 3 の外側を通過し、さらに中空糸モジュールの第 2 の出口から第 2 の出口接続送液回路 16 を経て成分調整液貯留槽 2 に戻る。

[0035] 本実施形態に係る成分調整液とは、細胞培養液の成分の培養液成分調整手

段を実質的に透過可能な成分のうち少なくとも一つの成分を有する溶液をいう。培養液と成分調整液にそれぞれ含有する成分は、その分子量と両液間の濃度差により膜を介して調整される。

[0036] 分子量が膜の孔径よりも大きく実質的に膜を透過できない成分は両液間を移動しない。対して、分子量が膜の孔径よりよりも小さく実質的に膜を透過しうる成分はその濃度差が少なくなるように両液間で濃度調整される。細胞により産生され細胞培養液中に蓄積した代謝物は成分調整液側に移動することにより培養液中の濃度を低下させる。同時に、細胞生育に必要であり培養期間中に濃度が低下した成分については成分調整液から培養液へ移動し補充される。以上の原理から、成分調整液の内容と濃度を適切に設定することによって、培養液中の環境が維持され細胞の良好な生育環境が維持される。もちろん細胞培養液をそのまま使用することもできる。よって、成分調整液は細胞培養期間中に培養液中から失われていく成分をすべて有することが望ましい、さらに望ましくはそれらの成分の濃度が培養期間中に枯渇しないように濃度設定される。

[0037] また、成分調整液の量は細胞代謝物の蓄積防止という観点からなるべく多く設定することが望ましい。望ましくは、培養液の5倍以上、より望ましくは10倍以上に設定される。しかし、成分調整液の量は培養コストに影響するため、培養期間と必要細胞数により決定されてもよい。また、成分調整液は細胞培養液と同様に生理的なpHを維持しやすいように緩衝能を有するように設計されることや、pHの変化を色で判別しやすいようにpH指示色素を混合することなども可能である。

[0038] 本実施形態に係る細胞培養槽とは、各種細胞とその細胞の生育可能な溶液成分を有する培養液とを保持したまま無菌的に培養が可能なように設計されたものであればよく、その形、大きさ、材質は問わない。一般にそれらのパラメータは細胞の特性と必要な細胞数により設計される。細胞が接着細胞であれば、細胞が重力により沈降し表面に接着しやすい広い平面構造を有する槽が設計されるし、浮遊細胞であれば深さがあり、図1ないし図4に示すよ

うな回転翼（攪拌翼）１２による攪拌により培養液の成分や酸素濃度が均一化しやすい構造が設計される。

[0039] また、接着細胞でも浮遊細胞用に設計された細胞培養槽に接着細胞と粒子担体を混合して培養することで、粒子担体に接着細胞を接着させこれを浮遊させながら培養することも可能である。さらに浮遊培養により細胞同士が会合しやすく細胞塊を形成するような接着細胞も浮遊細胞用に設計された槽により培養可能である。

[0040] 図１ないし図４に示すように、細胞培養槽１には、通気フィルター１１が設けられていてもよい。

[0041] 細胞培養槽には細胞培養液及び／又は成分調整液を槽から取り出す口と、成分調整された後槽内に戻るための口がそれぞれ設置される。

[0042] 本実施形態に係る成分調整液貯留槽とは、成分調整液を培養期間中に無菌的に保持できるように設計されるものであればよく、その形、大きさ、材質は問わない。一般にそれらのパラメータは成分調整液の量や槽内に培養液成分調整手段を設置するか否かにより適宜設計される。成分調整液貯留槽には細胞培養液及び／又は成分調整液を槽から取り出す口と、成分調整された後槽内に戻るための口がそれぞれ設置される。

[0043] また、図１ないし図４に示すように、攪拌回転子１３を成分調整液貯留槽２の底面においてもよい。さらに、成分調整液貯留槽２には、通気フィルター１４を設けてもよい。

[0044] 本実施形態に係る送液回路とは、細胞培養槽、成分調整液貯留槽、培養液成分調整手段の間に設置され培養液又は成分調整液を無菌的に灌流することが可能な管腔構造を有するチューブをいう。材質としては、シリコン、ウレタン、フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル等が用いられる。

[0045] 本実施形態に係る細胞培養液及び／又は成分調整液を灌流する手段とは、上記送液回路に接するように設置され、動力を用いて連続的に回路内の液を送液可能な手段をいう。一般的なポンプであれば使用可能であり、ペリスタポンプ、ダイヤフラムポンプ等が例示できる。

[0046] 本実施形態に係る細胞培養槽の液量を調整する手段は、培養中に細胞培養槽の液容量を実質的に一定に調整する手段をいう。このような機能を図1ないし図4に示す送液手段7、6に併せ持たせることも可能である。培養装置に中空糸上の半透膜が設置され、これを介して培養液と成分調整液との間で成分の交換が行われたり、膜にろ過圧がかかったりすると、結果として両液間の移動が起こる。そのため、特段の措置をとらないと、最初に設定した培養液と成分調整液のそれぞれの液量に変化する場合がある。しかし、培養液の液量に変化すると、培養液中の成分濃度や、細胞密度が変化することから安定な培養が達成されない傾向にある。そこで例えば半透膜の入口及び出口にそれぞれ独立にポンプ等の送液手段7、6を設置し、これらを独立に制御することで液容量を一定に保持することを達成できる。このような手段には培養槽や成分調整液貯留槽内の空気層の圧力を制御する方法などの方法もあるが、上記のように独立した少なくとも2台のポンプにより制御する方法がもっとも簡便に効果的に実施できる。

[0047] 図1及び図2に示す本実施形態において、例えば、送液手段7は、細胞培養槽1の細胞培養液9を培養液成分調整手段3に送液する。送液手段6は、培養液成分調整手段3に送液され、細胞培養液9中の不要物質と成分調整液10中の有用物質の濃度を膜を介して調整したのち細胞培養液9を返液する返液手段として機能する。

[0048] 図3に示す本実施形態において、例えば、送液手段6は、成分調整液貯留槽2の成分調整液10を培養液成分調整手段3に送液する。送液手段7は、培養液成分調整手段3に送液され、細胞培養液9中の不要物質と成分調整液10中の有用物質を接触させた成分調整液を返液する返液手段として機能する。

[0049] ここで、送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とは理想的には $V_1 = V_2$ が望ましいが、まったく等しい送液量を実現するのは困難な場合が多い。また、 V_1 と V_2 の差を非常に小さくすることは可能であるが、非常に高価な精度の高いポンプが必要となる場

合もある。しかし、送液量 V_1 と V_2 とを、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ の範囲内にすれば、急激な液量変化をまねくことなく、 V_1 と V_2 を個別に調整することで前記細胞培養液の総量の変動を 10% 以内にコントロールすることが容易となるので好適である。また、送液量 V_1 と V_2 とを上記の範囲内にすることは、安価なポンプにより容易に実現可能である。

[0050] 上記のように少なくとも 2 台の独立したポンプを使用した場合、図 5 に示すように、さらに細胞培養槽 1 の液量を検知する手段 18 を用いて液面が所望の高さより上又は下にある情報を情報伝達回路 19 を介して随時取得し、その情報から、コンピュータ等の送液手段調整器 20 によって、入口接続送液回路 5 と出口接続送液回路 4 に接続された各ポンプ 7、6 の流速に差をもたせることにより液面を制御するシステムとすることもできる。例えば各ポンプの実流速が設定値と若干誤差を生じた場合にでも、このような調整システムとすることで長時間の培養中に誤差が蓄積されて細胞培養槽の液面に大きな変化が生じてしまうことを防止できる。

実施例 1

[0051] 以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(細胞培養システム)

培養装置としては、8 連動物培養装置 Bio Jr. 8 (BJR-25NA1S-8C、エイブル株式会社) を使用した。本装置は、1 台のコントローラーで 8 台の 100 mL 容量の細胞培養槽を制御可能で、測定・制御項目は攪拌速度、温度、pH、及び溶存酸素濃度 (DO) で各培養槽は独立に制御できる。

[0052] (ES 細胞の準備)

培養細胞としてはマウス ES 細胞 (EMG7 株) を選択した。

[0053] (胚様体培養)

(培養 0 日目から培養 3 日目)

細胞培養槽としてガラス製の専用槽（エイブル株式会社）使用し、培養液を100mLとした。

マウスES細胞を密度 1×10^5 cells/mLとし、培養を開始した。この時点を経営0日目とした。

培養液としては、Glasgow最少必須培地（GMEM、インビトロジェン社）に以下の成分を添加して使用した。

すなわち、10%ウシ胎児血清（FBS、株式会社ニチレイ）、0.1mM非必須アミノ酸（NEAA、インビトロジェン社）、1mMピルビン酸ナトリウム（Na-pyruvate、シグマ社）、0.1mM 2-メルカプトエタノール（2-ME、インビトロジェン社）となるように培養液を調製した。

3日目までこのまま培養し、ES細胞の会合体である胚様体（EB：Embryoid body）を形成させた。

細胞培養槽には攪拌回転翼を設置し、回転数は85rpmとした。

細胞培養槽には、温度、pH、溶存酸素濃度をそれぞれ計測可能なセンサーを設置した。

また、溶存酸素濃度は40%に制御される設定とし、そのために酸素、窒素、空気の混合ガスが細胞培養槽内の培養液に対して上面通気となるようにガス導入ラインを設置した。さらにガスを槽から排出する導出ラインを設置した。

[0054] （培養3日目から10日目）

培養3日目に得られた全細胞数を算出し、以下のように実施例1と比較例の培養方法に分割し培養を再開した。一つの培養槽あたりの細胞密度は 1.8×10^5 cells/mLとした。

[0055] 実施例1においては、図2に示したような細胞培養システムを作製した。すなわち、細胞培養槽は上記の培養槽の蓋部分に培養液の取り出しと返却が可能な口を設置した。

さらに、細胞培養槽内には細胞塊が培養液とともに培養槽の外側に出てし

まうことを防止するための手段としてポリエチレンの焼結体からなる直径 15 mm、平均孔径 30 μ m の平板型膜を設置した。

成分調整液槽は容量 1 L のガラス製滅菌ビンを使用した。

槽の蓋の部分に通気ライン、培養液の入口、出口ラインを設置した。

培養液成分調整手段は、旭ポリスルホンダイアライザー A P S（旭化成クラレメディカル株式会社）の中空糸を 400 本束ねて有効長 20 cm となるように中空糸両端部の管腔構造が解放されるようにウレタン接着剤にて固定したものを使用した。

培養液成分調整手段は、成分調整液貯留手段の内部に設置し、中空糸束の両端部と培養液の入口、出口ラインを回路にて接続した。

成分調整液としては、細胞培養液に F B S を添加していない培養液を 1 L 使用した。

送液回路としては、シリコン製チューブ（内径 1 mm ϕ 、外径 4 mm ϕ ）を用いた。

培養液の送液手段としては、ペリスタポンプ I P C - N 4（I S M A T E C 社）を 2 台使用した。2 台のポンプはそれぞれ細胞培養槽と成分調整液貯留槽を接続する送液回路に接し送液可能な状態に設置した。

以上説明した方法により、図 2 に示したような細胞培養システムを作製した。

ポンプの作動速度は、3 日目から 4 日目は 100 mL / 日、4 日目から 5 日目までは 400 mL / 日、5 日目から 10 日目までは 1,000 mL / 日とした。

細胞培養槽の液容量が実質的に同じレベルを維持できるようにしながら 2 台のポンプ流速を微調整し、10 日目まで連続的に培養液を灌流しながら培養を実施した。

10 日目に細胞培養を終了し、細胞数の測定をおこなった。

（細胞数の測定）

培養 10 日目に胚様体を細胞培養槽から回収し、0.25%トリプシン／

EDTA（インビトロジェン社）にて処理し単細胞の状態とした後、トリパンブルー色素にて死細胞を染色し、生細胞のみを計算盤を用いてカウントした。

[0056] （乳酸濃度の測定）

培養液中の乳酸濃度の変化は、細胞培養槽から少量の培養液を採取したのち、多機能バイオセンサBF-7（王子計測機器株式会社）を用いて測定した。

（EBの円相当径測定）

EBの円相当直径は、光学顕微鏡ECLIPSE Ti-U（株式会社ニコン）を用いてEBの画像を撮影したのち、画像解析ソフト（Nikon Element s D、株式会社ニコン）を用いてEBの外周長を測定し、その値から真円の場合の円相当直径算出した。各サンプルから100個のEBの円相当直径を測定し、円相当直径の頻度分布を作成した。

（EB内部細胞のTUNEL染色）

EB内部の細胞がどの程度アポトーシスを生じているかについて判定するためにTUNEL染色を行った。

各サンプルから、EBの凍結切片を作製し、アポトーシス検出キット（タカラバイオ株式会社）をもちいて死細胞を染色した。

[0057] （比較例1）

培養3日目までの装置を用いて、10日目まで培養を継続した。

4及び5日目に1回、6から9日目に2回の培養液の交換を実施した。

培養液の交換は、細胞培養槽の攪拌を止めて胚様体を沈降させた後、装置から細胞培養槽を切り離し、クリーンベンチ内で培養液上清を抜きとったのち、新鮮な培養液を添加する方法とした。

培養液交換は合計10回実施し、合計1Lの培養液を使用した。

[0058] （比較例2）

実施例1で用いた装置から、成分調整液貯留槽から細胞培養槽に向かってつながる送液回路に設置されたポンプを取り外した装置を用いて培養を継続

した。培養継続とともに細胞培養槽内の培養液量が減少し始め、培養継続が困難となり培養を中止した。

[0059] (結果)

培養 10 日目の実施例 1 及び比較例 1 の培養により得られた総細胞数を以下に示す。

実施例 1 の総細胞数	4.6×10^8 個
-------------	---------------------

比較例 1 の総細胞数	3.4×10^8 個
-------------	---------------------

[0060] 培養 10 日間の実施例 1 及び比較例 1 の培養中のそれぞれの細胞培養槽の pH 変化を図 6 に示した。

培養 10 日間の実施例 1 及び比較例 1 の細胞培養槽内細胞培養液の乳酸濃度変化を図 7 に示した。

培養 10 日目の実施例 1 及び比較例 1 の培養結果、得られた EB のそれぞれの円相当直径を図 8 に示した。

培養 10 日目の実施例 1 及び比較例 1 の培養の結果、得られた EB の凍結切片の染色結果を図 9 に示した。アポトーシス細胞が茶色に染色された。

[0061] 以上の結果から、実施例に係る細胞培養システムでは、培養液交換が不要で、高価な血清の使用量を 1/10 にまで低減できると同時に、最終的に回収される細胞数は約 1.4 倍と顕著な差がみられたことから有効な培養方法であることが示された。また、実施例の培養方法では比較例に比べて乳酸の蓄積が少ないこと、これに対応して pH の低下がないことが分かった。さらに、培養終了時の EB の直径は比較例に比べて小径で内部のアポトーシス細胞が少ない傾向が確認された。よって、実施例に係る細胞培養システムでは良好な培養環境の維持が可能であり、EB 内細胞のアポトーシス発現抑制が達成されたものと考えられる。

実施例 2

[0062] (ES 細胞の準備)

培養細胞としては実施例 1 と同様にマウス ES 細胞 (EMG 7 株) を選択した。

(胚様体培養)

(培養0日目から培養3日目)

実施例1の培養0日目から培養3日目と同様の方法で細胞培養槽4個を使用しES細胞を培養した。

[0063] (培養3日目から10日目)

実施例2においては、図5に示したような細胞培養システムを作製した。すなわち、培養3日目に上記4個の細胞培養槽から得られた全細胞数を算出し、ひとつのガラス製の大型培養槽（エイブル株式会社）に細胞密度 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ とし集めた。培養液容量を1Lとした。上記培養槽を動物細胞培養装置BCP（BCP-03NP3S、エイブル株式会社）に設置して培養を開始した。

培養液としては、実施例1と同じものを用いた。

細胞培養槽には攪拌回転翼を設置し、回転数は60rpmとした。

細胞培養槽には、温度、pH、溶存酸素濃度をそれぞれ計測可能なセンサーを設置した。

また、溶存酸素濃度は40%に制御される設定とし、そのために酸素、窒素、空気の混合ガスが細胞培養槽内の培養液に対して上面通気となるようにガス導入ラインを設置した。さらにガスを槽から排出する導出ラインを設置した。

[0064] 細胞培養槽には上記の培養槽の蓋部分に培養液の取り出しと返却が可能な口を設置した。

さらに、細胞培養槽内には細胞塊が培養液とともに培養槽の外側に出てしまうことを防止するための手段としてポリエチレンの焼結体からなる直径47mm、平均孔径30 μ mの平板型膜を液上面に設置した。

成分調整液槽には容量10Lのポリプロピレン製タンクを使用した。

槽の蓋の部分に通気ライン、培養液の入口、出口ラインを設置した。

培養液成分調整手段は、持続緩徐式血液濾過器エクセルフローAEF-03（旭化成クラレメディカル株式会社）を使用した。

培養液成分調整手段は、細胞培養槽、成分調整液貯留槽の外部に独立して設置した。

細胞培養槽から上記平板型膜を通過して取り出された培養液が中空系内側を流れるように培養液の入口ラインを回路にて接続した。次に中空系内側を通過してきた培養液が培養槽に戻るように入ラインを回路にて接続した。

続いて、成分調整液が成分調整液貯留槽から取り出されて培養液成分調整手段の中空系外側を通過して、成分調整液貯留槽に戻るように入ライン、出ラインを接続した。

成分調整液としては、血清を加えていない細胞培養液を 10 L 使用した。

送液回路としては、フロンチューブ（内径 2 mm ϕ 、外径 4 mm ϕ ）を用いた。

培養液の送液手段としては、ペリスタポンプ IPC-N4（ISMATEC 社）を 3 台使用した。3 台のポンプはそれぞれ細胞培養槽と培養液成分調整手段、培養液成分調整手段と成分調整液貯留槽を接続する送液回路に接し送液可能な状態に設置した。

さらに、細胞培養槽には液面検知手段としてレーザー式検知器（株式会社キーエンス）を取り付け、液面上昇が起こったときには、ペリスタポンプの流速を止めるようにプログラムした調整器を出ライン 1 の送液ポンプとの間に設置した。

以上説明した方法により、図 5 に示したような細胞培養システムを作製した。

[0065] ポンプの作動速度は、3 日目から 4 日目は入ライン 1 のポンプは 1 L / 日、出ラインポンプ 1 のポンプは 1. 1 L / 日、4 日目から 5 日目までは入ライン 1 のポンプは 4 L / 日、出ラインポンプ 1 は 4. 4 L / 日、5 日目から 10 日目までは入ライン 1 のポンプは 10 L / 日、出ライン 1 のポンプは 11 L / 日とした。成分調整液を送液するポンプの作動速度は、入ライン 1 のポンプの速度の 4 倍とした。

[0066] 本システムにより細胞培養槽の液容量が実質的に同じレベルを維持できる

ようにポンプ流速を微調整し、10日目まで連続的に培養液を灌流しながら培養を実施した。

[0067] 10日目に細胞培養を終了し、細胞数の測定をおこなった。

[0068] (結果)

培養10日目の実施例及び比較例の培養により得られた総細胞数を以下に示す。

実施例2の総細胞数

5.7×10^9 個

以上の結果から実施例に係る細胞培養システムによればスケールアップが容易であることが確認できた。

実施例 3

[0069] (細胞の準備)

培養細胞としては市販の浮遊細胞であるCHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来、ライフテクノロジーズ社）を選択した。

[0070] (培養0日目から培養7日目)

実施例3においては、図3に示したような細胞培養システムを作製した。すなわち、細胞培養槽としてカルスターフラスコ(ダブルアーム型、攪拌セット付、柴田科学)を使用し、培養液を300mLとした。

CHO細胞を播種密度 2×10^5 cells/mLとし、培養を開始した。この時点を経営0日目とした。

培養液としては、CD-CHO培地（ライフテクノロジーズ社）を使用した。

細胞培養槽には攪拌回転翼を設置し、回転数は80rpmとした。

細胞培養槽は上記の培養槽の蓋部分に培養液の取り出しと返却が可能な口を設置した。

成分調整液槽は容量500mLのガラス製滅菌ビンを使用した。

細胞培養槽の蓋の部分に通気ライン、成分調整液の入口、出口ラインを設置した。

培養液成分調整手段は、旭ポリスルホンダイアライザーAPS（旭化成ク

ラメディカル株式会社)の中空糸を100本束ねて有効長25cmとなるように中空糸両端部の管腔構造が解放されるようにウレタン接着剤にて固定したものを使用した。

培養液成分調整手段は、細胞培養槽の内部に設置し、中空糸束の両端部と成分調整液の入口、出口ラインを回路にて接続した。

成分調整液としては、CD-CHO培地を300mL使用した。

送液回路としては、シリコン製チューブ(内径1mmφ、外径4mmφ)を用いた。

上記の2槽を37℃、5%CO₂雰囲気下のインキュベータ(IP400、ヤマト科学)内に設置した。

成分調整液の送液手段としては、ペリスタポンプ(SJ-121H、ATT社)を2台使用した。2台のポンプはそれぞれ細胞培養槽と成分調整液貯留槽を接続する送液回路に接し送液可能な状態に設置した。

以上説明した方法により、図3に示したような細胞培養システムを作製した。

ポンプの初期作動速度は、0日目から4日目は0.22mL/分、4日目から7日目までは0.62mL/分とした。

細胞培養槽の液容量が実質的に同じレベルを維持できるようにしながら2台のポンプ流速を微調整し、7日目まで連続的に培養液を灌流しながら培養を実施した。

(比較例3)

実施例の細胞培養槽のみとした装置(培養液成分調整手段もなし)を用いて、実施例と同様に7日目まで培養を継続した。

(結果)

培養7日目の実施例3及び比較例3の培養により得られた生細胞の密度を以下に示す。

実施例3の細胞密度 $66.8 \times 10^5 \text{ cells/mL}$

比較例3の細胞密度 $28.9 \times 10^5 \text{ cells/mL}$

以上のとおり単一細胞の形態で増殖する浮遊細胞においても実施例に係る細胞培養システムが有効であることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0071] 本実施の形態に係る細胞培養システム及び細胞培養方法は、さまざまな哺乳動物細胞の培養形態に対応可能で、低コスト、省力化、高密度培養を同時に達成できるシステムを提供することから、細胞にタンパク質等の産生物を大量に生産させる分野や、細胞そのものを大量培養し利用する分野に利用可能である。

符号の説明

- [0072]
- | | |
|----|-----------|
| 1 | 細胞培養槽 |
| 2 | 成分調整液貯留槽 |
| 3 | 培養液成分調整手段 |
| 4 | 送液回路 |
| 5 | 送液回路 |
| 6 | 送液手段 |
| 7 | 送液手段 |
| 8 | フィルター |
| 9 | 細胞培養液 |
| 10 | 成分調整液 |
| 11 | 通気フィルター |
| 12 | 攪拌翼 |
| 13 | 攪拌回転子 |
| 14 | 通気フィルター |
| 15 | 送液手段 |
| 16 | 送液回路 |
| 17 | 送液回路 |
| 18 | 液面検知手段 |
| 19 | 情報伝達回路 |

2 0 送液手段調整器

請求の範囲

[請求項1]

細胞を培養するための細胞培養槽と、
成分調整液貯留槽と、
細胞培養液及び／又は成分調整液の入口と出口とを有し、半透膜を備える培養液成分調整手段と、
前記細胞培養槽及び／又は前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の入口に接続された入口接続送液回路と、
前記細胞培養槽及び／又は前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の出口に接続された出口接続送液回路と、
前記入口接続送液回路から前記培養液成分調整手段を経て前記出口接続送液回路に前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液を灌流する手段と、
前記細胞培養槽の液量を調整する手段と、
を備える細胞培養システムであって、
前記培養液成分調整手段を介して前記細胞培養槽内の前記細胞培養液の成分と前記成分調整液貯留槽内の前記成分調整液の成分とを連続的に調整可能であると同時に、
前記細胞培養槽内の前記細胞培養液の量を実質的に一定に調整可能である、
細胞培養システム。

[請求項2]

培養液成分調整手段が、中空糸状である
請求項1に記載の細胞培養システム。

[請求項3]

前記培養液成分調整手段が前記成分調整液貯留槽内に配置されており、
前記培養液成分調整手段が前記細胞培養液の入口と出口とを有し、
前記入口接続送液回路が前記細胞培養槽から前記培養液成分調整手段の入口に接続されており、
前記出口接続送液回路が前記細胞培養槽から前記培養液成分調整手

段の出口に接続されており、

前記灌流する手段が、前記入口接続送液回路から前記培養液成分調整手段を経て前記出口接続送液回路に前記細胞培養液を灌流する、

請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養システム。

[請求項4]

前記培養液成分調整手段が前記細胞培養槽内に配置されており、

前記培養液成分調整手段が前記成分調整液の入口と出口とを有し、

前記入口接続送液回路が前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の入口に接続されており、

前記出口接続送液回路が前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の出口に接続されており、

前記灌流する手段が前記入口接続送液回路から前記培養液成分調整手段を経て前記出口接続送液回路に前記成分調整液を灌流する、

請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養システム。

[請求項5]

前記培養液成分調整手段が前記成分調整液貯留槽及び前記細胞培養槽の外部に設置されており、

前記入口接続送液回路が、前記細胞培養槽から前記培養液成分調整手段の第 1 の入口に接続された第 1 の入口接続送液回路と、前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の第 2 の入口に接続された第 2 の入口接続送液回路と、を含み、

前記出口接続送液回路が、前記細胞培養槽から前記培養液成分調整手段の第 1 の出口に接続された第 1 の出口接続送液回路と、前記成分調整液貯留槽から前記培養液成分調整手段の第 2 の出口に接続された第 2 の出口接続送液回路と、を含み、

前記第 1 の入口と前記第 1 の出口を結ぶ空間と、前記第 2 の入口と前記第 2 の出口を結ぶ空間とを、前記半透膜が構成し、

前記灌流する手段が、前記第 1 の入口接続送液回路から前記培養液成分調整手段を経て前記第 1 の出口接続送液回路に前記細胞培養液を灌流する手段と、前記第 2 の入口接続送液回路から前記培養液成分調

整手段を経て前記第2の出口接続送液回路に前記成分調整液を灌流する手段と、を含む、

請求項1又は2に記載の細胞培養システム。

[請求項6] 前記灌流する手段は、前記細胞培養槽の前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液貯留槽の前記成分調整液を前記培養液成分調整手段に送液する送液手段と、

前記培養液成分調整手段に送液され、前記細胞培養液中の不要物質と前記成分調整液中の有用物質を接触させた前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液を返液する返液手段とを備え、

前記送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、前記返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、前記細胞を含んだ前記細胞培養液の総量の変動が10%以内である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞培養システム。

[請求項7] 前記入口接続送液回路に設置された、前記細胞培養槽内側端部に細胞又は細胞凝集塊を通過させず、前記細胞培養液を実質的に通過させるフィルターを更に備える、請求項3に記載の細胞培養システム。

[請求項8] 前記第1の入口接続送液回路に設置された、前記細胞培養槽内側端部に細胞又は細胞凝集塊を通過させず、前記細胞培養液を実質的に通過させるフィルターを更に備える、請求項5に記載の細胞培養システム。

[請求項9] a) 請求項1～8のいずれか1項に記載の細胞培養システムを設置することと、

b) 前記細胞培養槽に、細胞及び前記細胞培養液を供給し、前記成分調整液貯留槽に前記培養液成分調整液を供給することと、

c) 前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液を連続的に灌流することにことと、

を含み、

前記送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、前記返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とを、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ となるように制御し、かつ前記細胞を含んだ前記細胞培養液の総量の変動が10%以内になるように制御する、細胞培養方法。

[請求項10]

少なくとも、細胞及び細胞培養液が入れられ、前記細胞を培養する細胞培養槽と、

有用物質を含有する成分調整液が入れられる成分調整液貯留槽と、
前記細胞培養液と前記成分調整液を接触させ物質交換を行う培養液成分調整手段と、

前記細胞培養槽の前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液貯留槽の前記成分調整液を前記培養液成分調整手段に送液する送液手段と、

接触させた前記細胞培養液及び／又は前記成分調整液を返液する返液手段と、

を備え、

前記送液手段の1時間あたりの送液量 V_1 と、前記返液手段の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、

細胞培養液の前記細胞を含んだ前記細胞培養液の総量の変動が10%以内である、細胞培養システム。

[請求項11]

少なくとも、細胞及び細胞培養液を細胞培養槽に入れて、前記細胞を培養する工程と、

前記細胞培養槽の前記細胞培養液及び／又は成分調整液貯留槽の前記成分調整液を送液する工程と、

前記細胞培養液と前記成分調整液を、膜を介して接触させる工程と、

前記膜を介して接触した細胞培養液及び／又は成分調整液を返液する工程と、

を含み、

前記送液する工程での1時間あたりの送液量 V_1 と、前記返液する工程の1時間あたりの返液量 V_2 とが、 $0.9 \times V_1 \leq V_2 \leq 1.1 \times V_1$ であり、

細胞培養液の細胞を含んだ細胞培養液の総量の変動が、10%以内である、細胞培養方法。

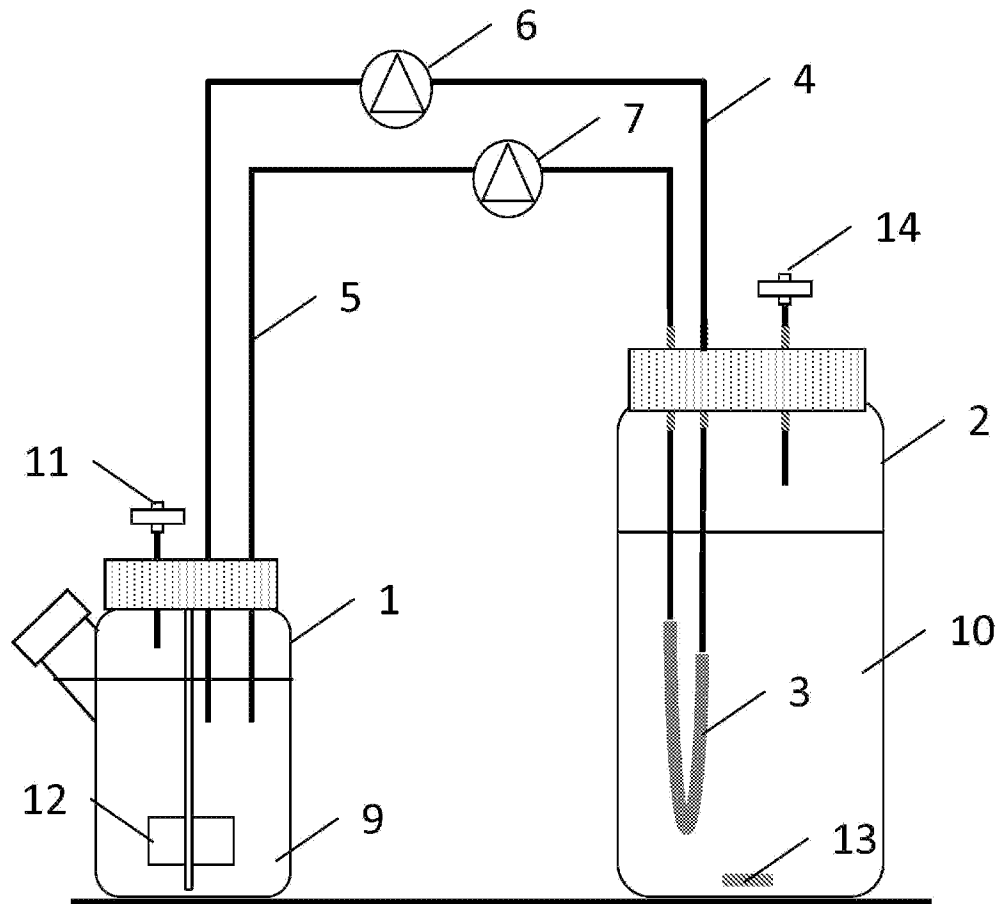
[請求項12] 前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項1～8、及び10のいずれか1項に記載の細胞培養システム。

[請求項13] 前記哺乳動物細胞が、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、間葉系幹細胞、造血幹細胞、及び／又はこれらから分化誘導された細胞である、請求項12に記載の細胞培養システム。

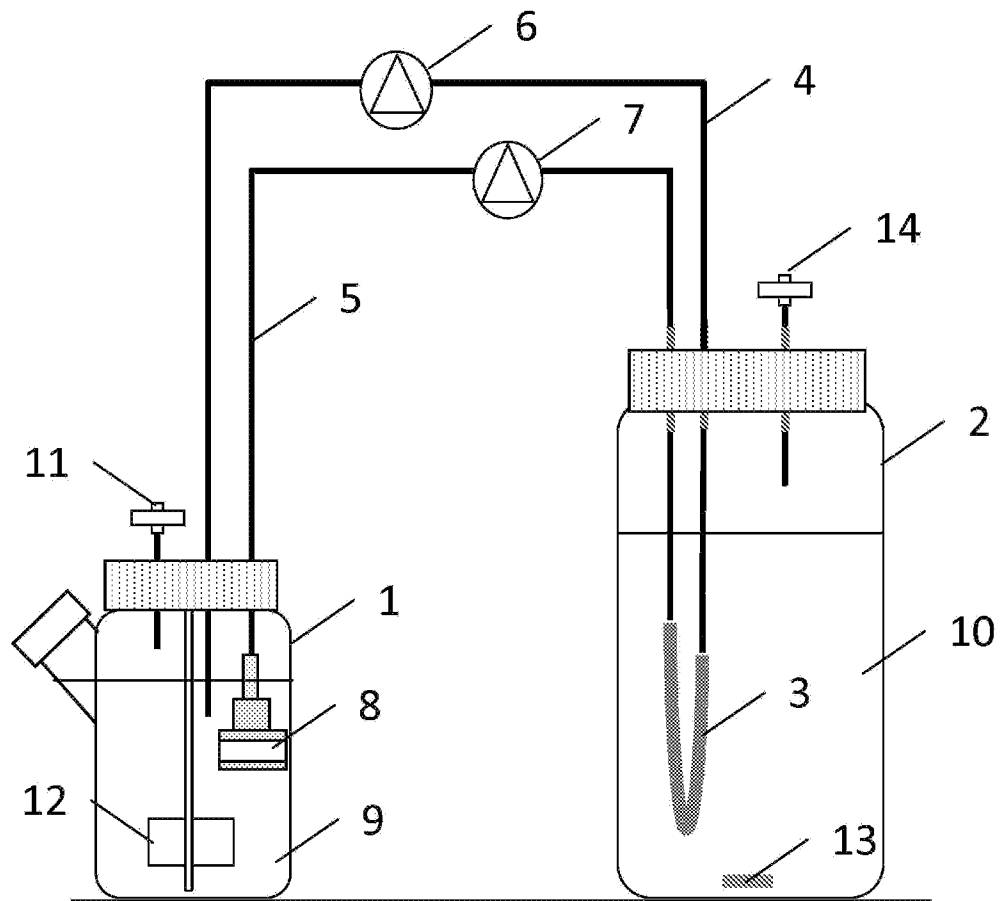
[請求項14] 前記細胞が浮遊培養可能な細胞、接着細胞、細胞凝集体を形成する細胞、及び／又は粒子状担体に接着可能な細胞である、請求項1～8、及び10のいずれか1項に記載の細胞培養システム。

[請求項15] 前記粒子状担体に接着可能な細胞は、細胞培養槽に細胞及び粒子状担体を入れて培養される、請求項14に記載の細胞培養方法。

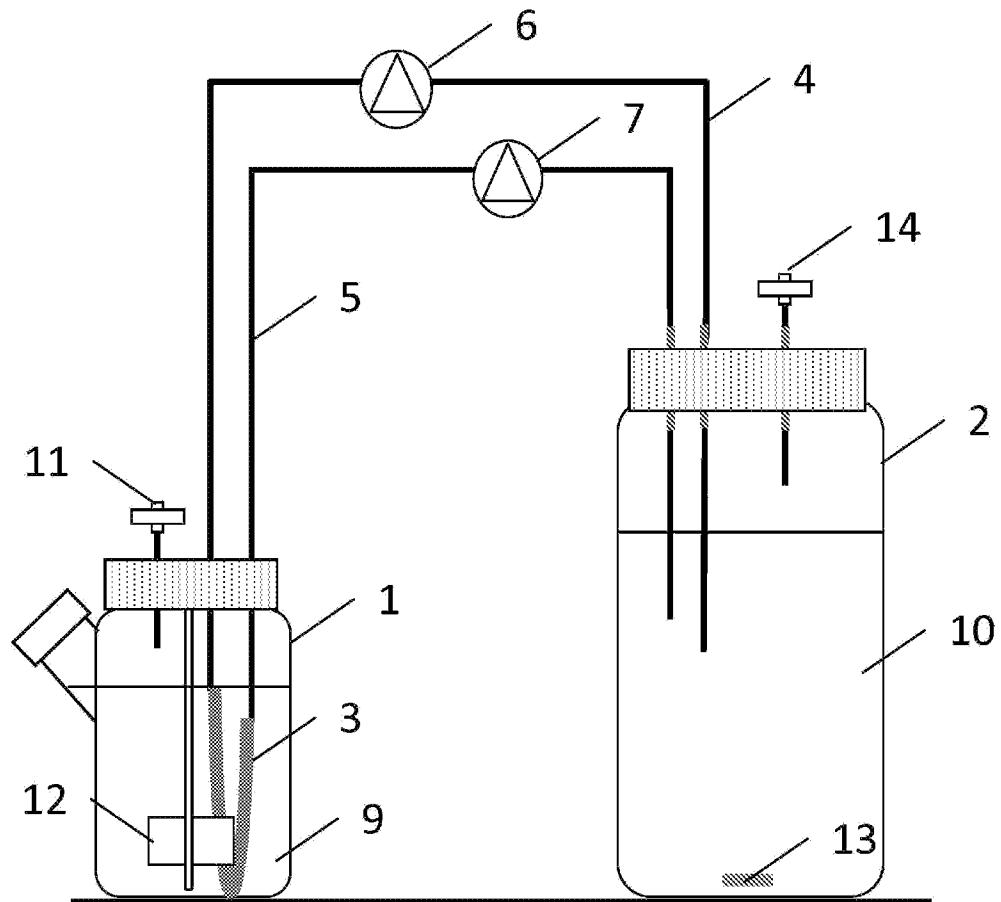
[図1]



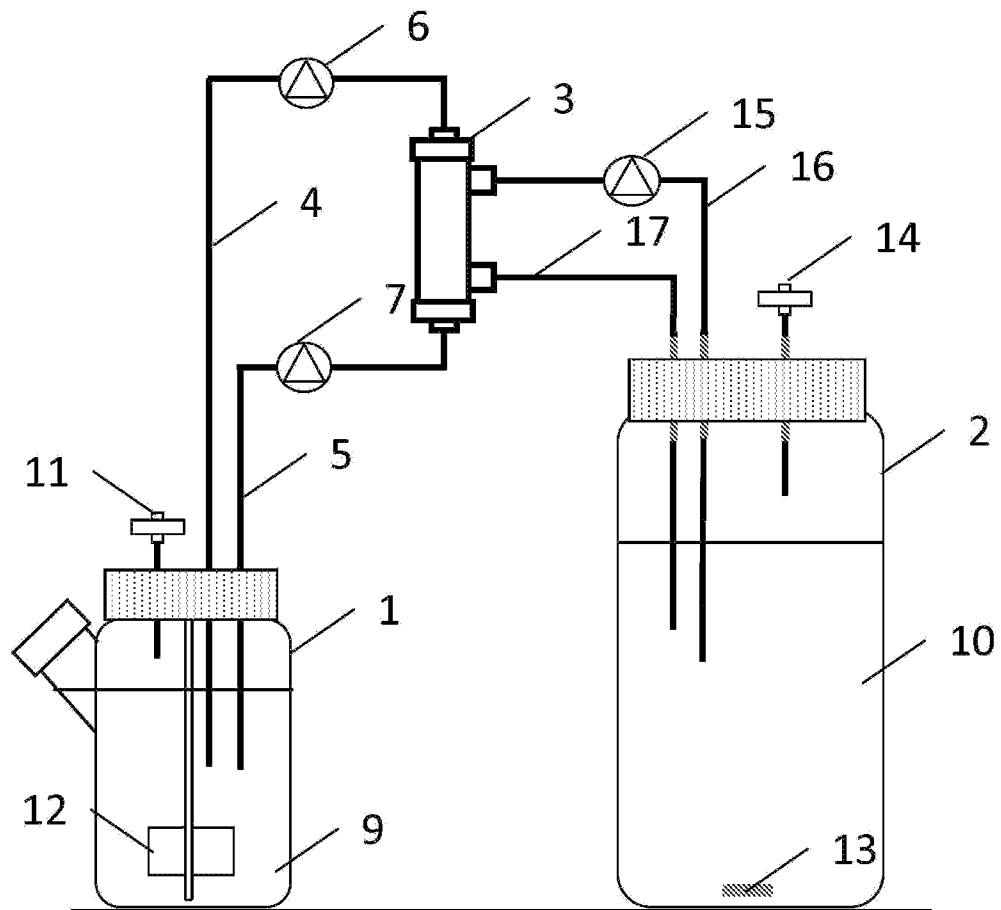
[図2]



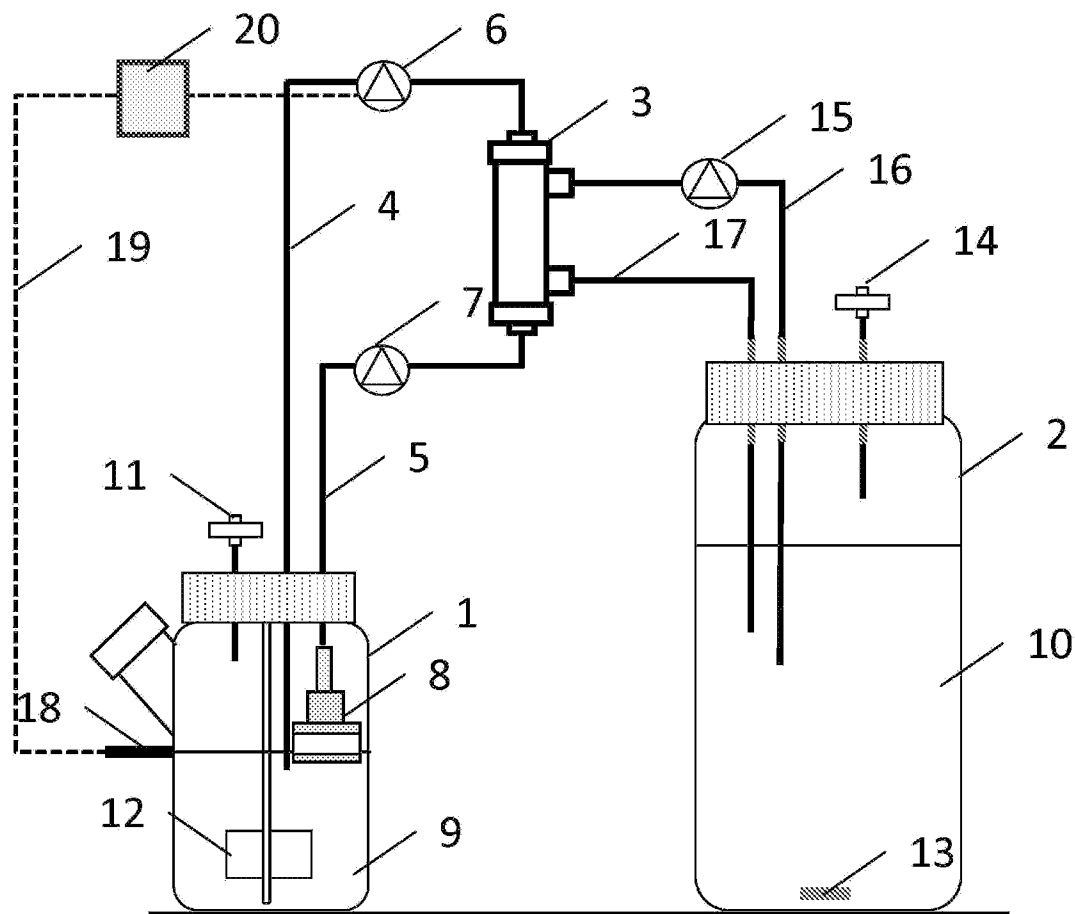
[図3]



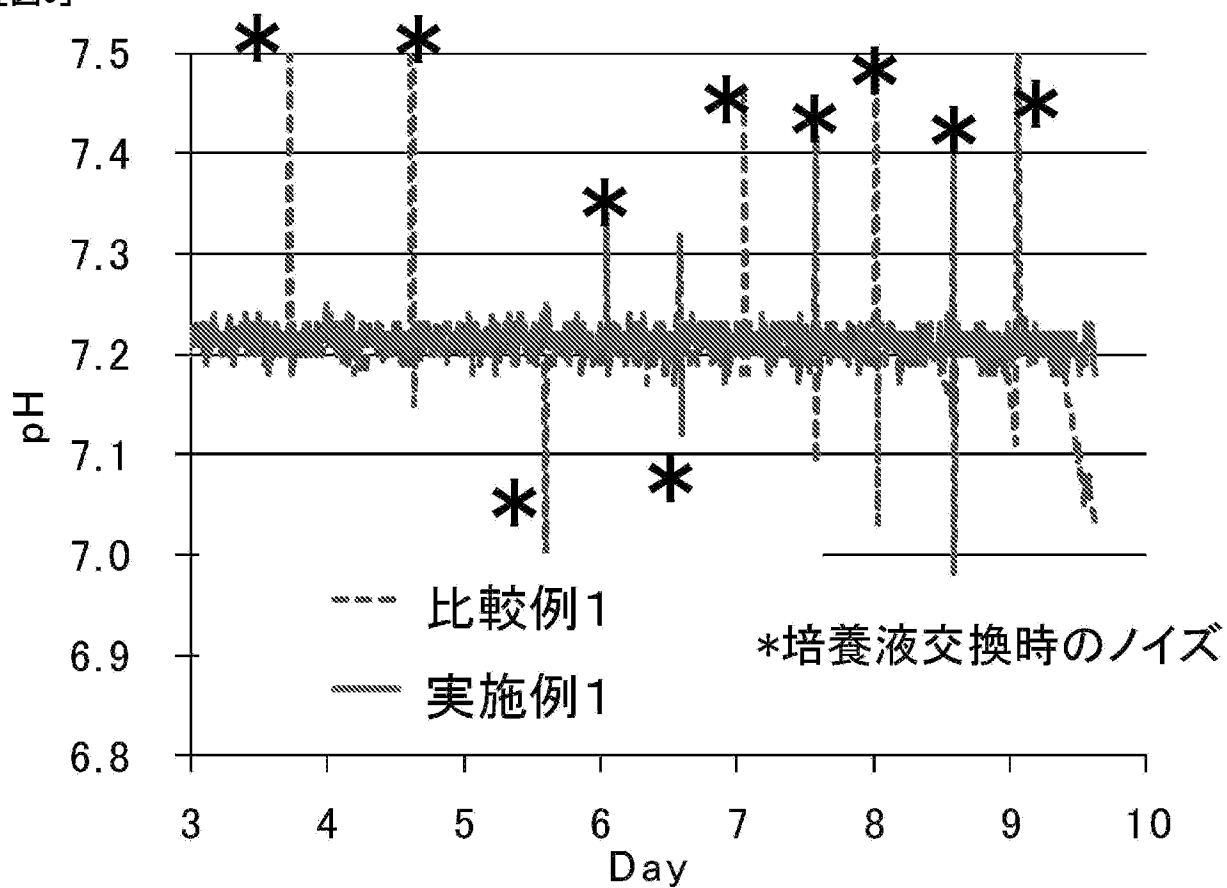
[図4]



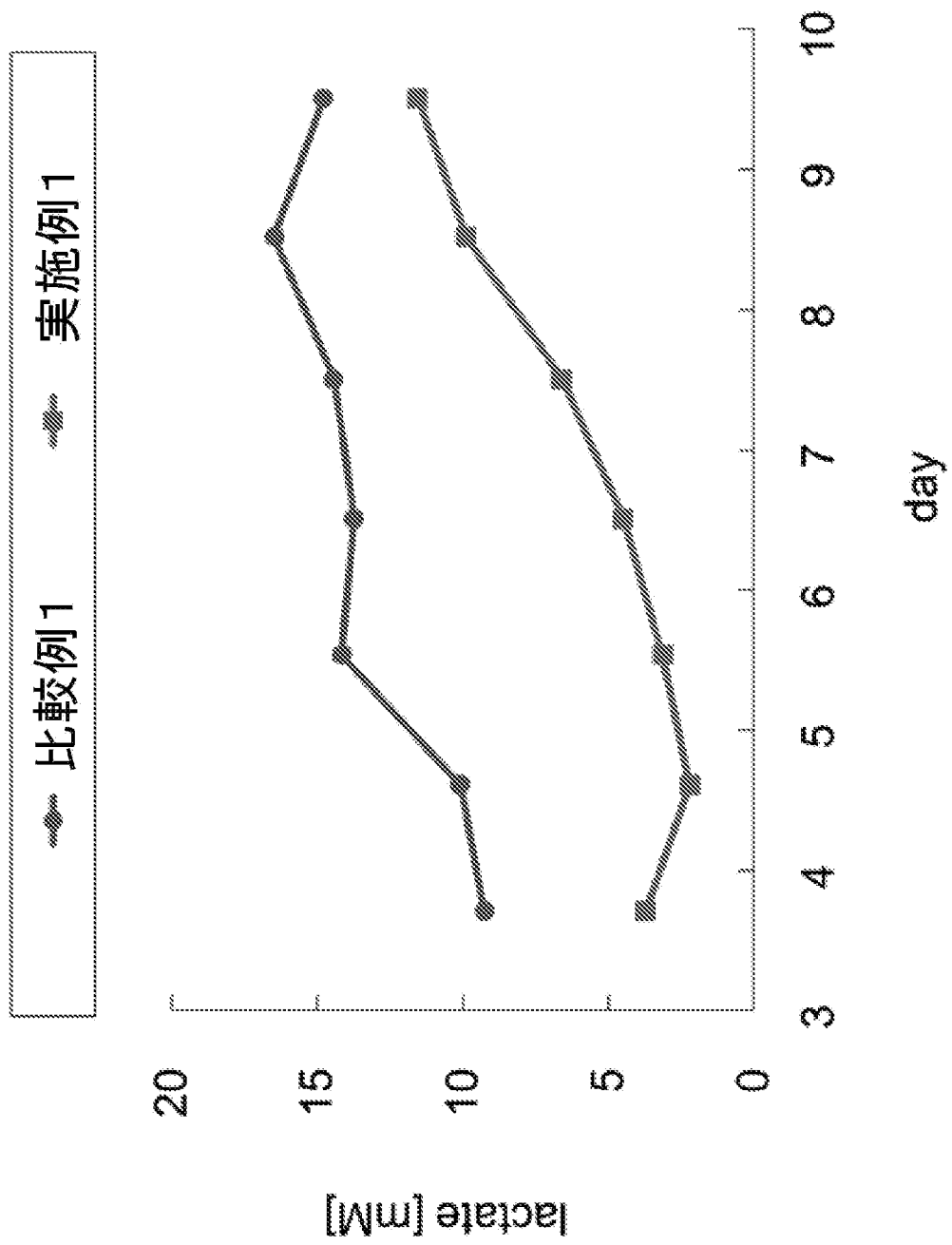
[図5]



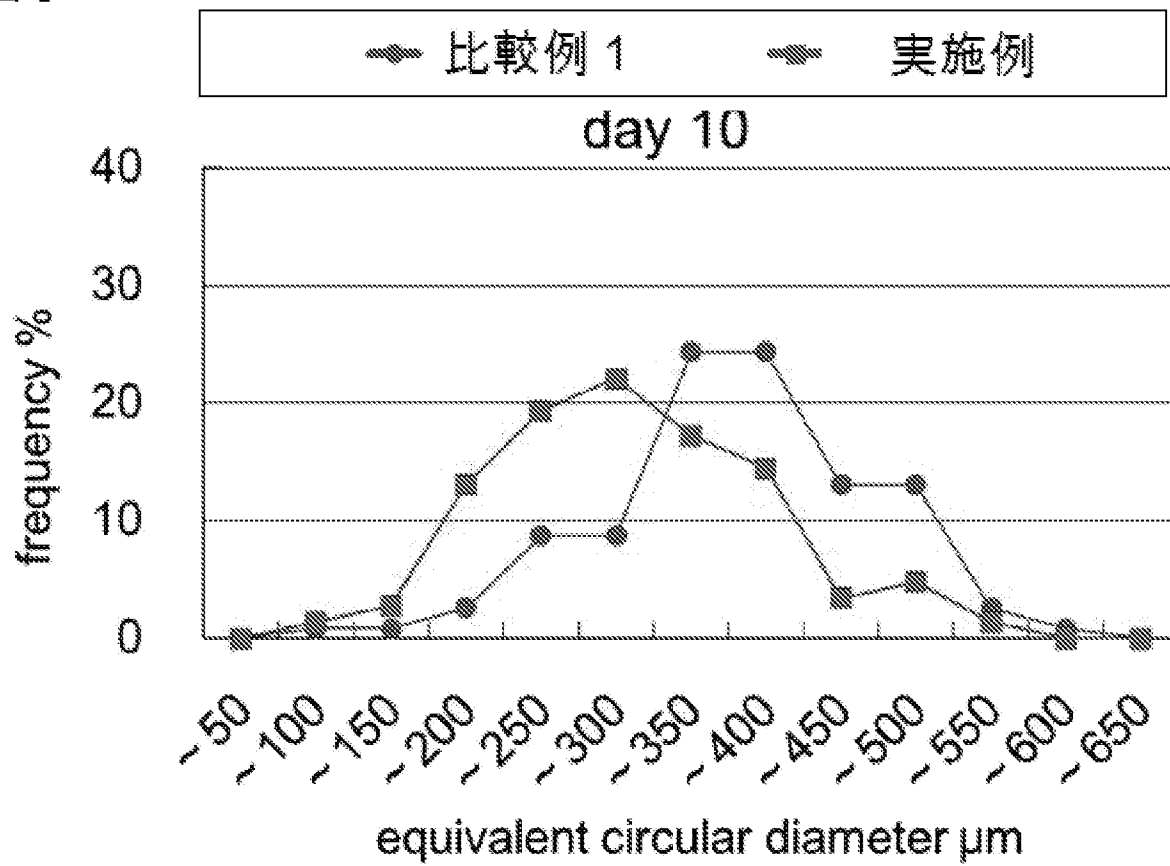
[図6]



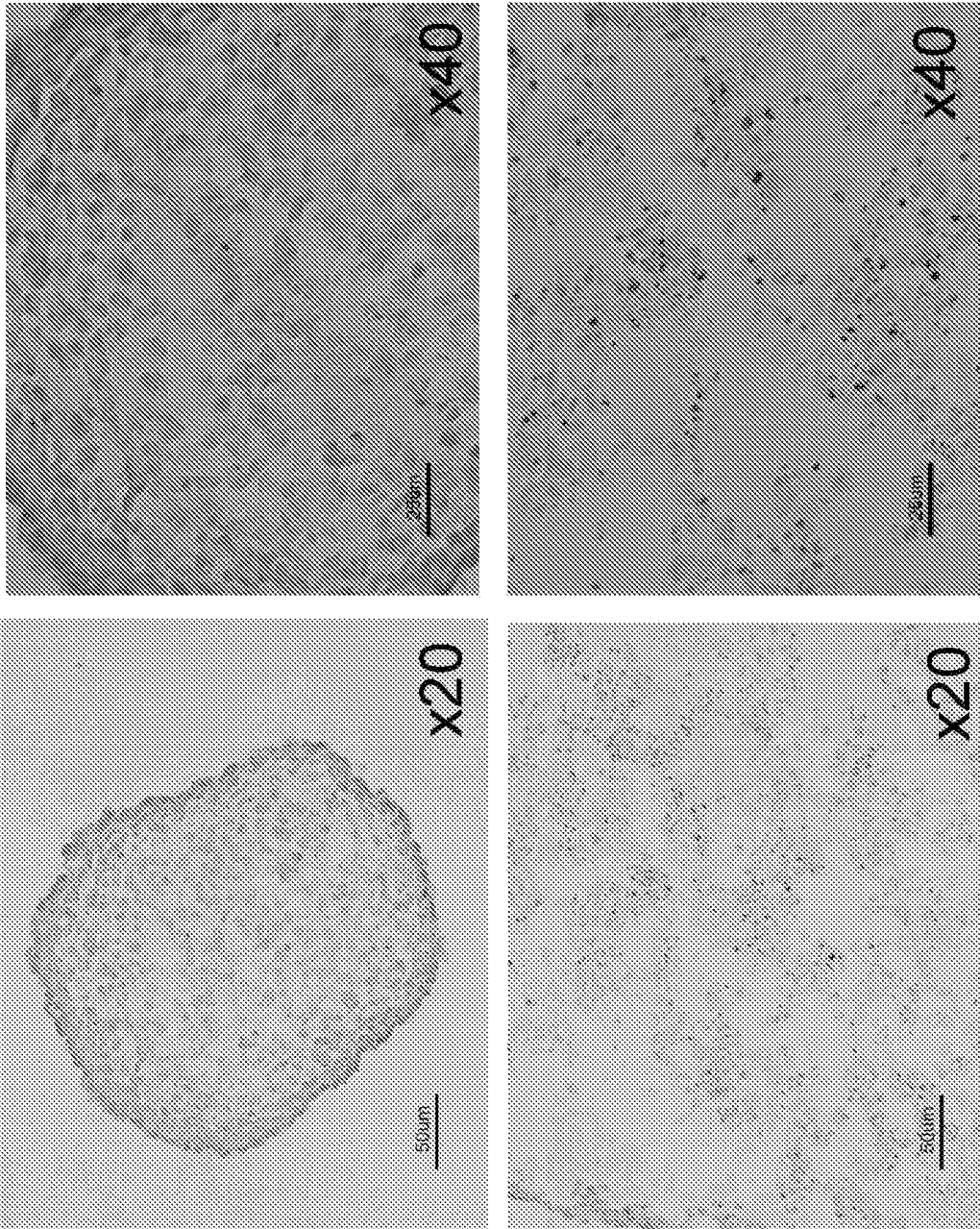
[図7]



[図8]



[図9]



実施例 1

比較例 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-36146 A (Toray Industries, Inc.), 24 February 2011 (24.02.2011), fig. 1; claim 5; paragraphs [0026], [0042], [0160], [0168] (Family: none)	1-15
Y	WO 2011/058983 A1 (Toray Industries, Inc.), 19 May 2011 (19.05.2011), a whole article; claim 1; fig. 1, 2, 4 & US 2012/0270286 A1 & EP 2500083 A1 & CA 2778765 A & CN 102596375 A & AU 2010319104 A & TW 201125973 A & KR 10-2012-0095959 A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 July, 2013 (24.07.13)

Date of mailing of the international search report
06 August, 2013 (06.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
Y	JP 2011-36146 A（東レ株式会社）2011.02.24, 図1、請求項5、【0026】、【0042】、【0160】、【0168】段落（ファミリーなし）	1-15
Y	WO 2011/058983 A1（東レ株式会社）2011.05.19, 全体、請求項1、図1、図2、図4 & US 2012/0270286 A1 & EP 2500083 A1 & CA 2778765 A & CN 102596375 A & AU 2010319104 A & TW 201125973 A & KR 10-2012-0095959 A	1-15

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 7 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

濱田 光浩

4 B

3 7 6 3

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