

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-136868

(P2016-136868A)

(43) 公開日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(51) Int.Cl.
C12M 3/00 (2006.01)

F1
C12M 3/00 Z

テーマコード(参考)
4B029

審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2015-12832(P2015-12832)
(22) 出願日 平成27年1月26日(2015.1.26)

(71) 出願人 397059836
株式会社積進
京都府中郡峰山町字長岡1750番地の1
(71) 出願人 507182807
クアーズテック株式会社
東京都品川区大崎二丁目11番1号
(74) 代理人 100111349
弁理士 久留 徹
(72) 発明者 小長谷 節
京都府京丹後市峰山町長岡1750番地の1
株式会社積進内
(72) 発明者 今泉 幸文
神奈川県秦野市首屋30番地 コバレント
マテリアル株式会社
Fターム(参考) 4B029 AA02 AA12 BB11 DA01 DG06
GB01 GB02 GB03

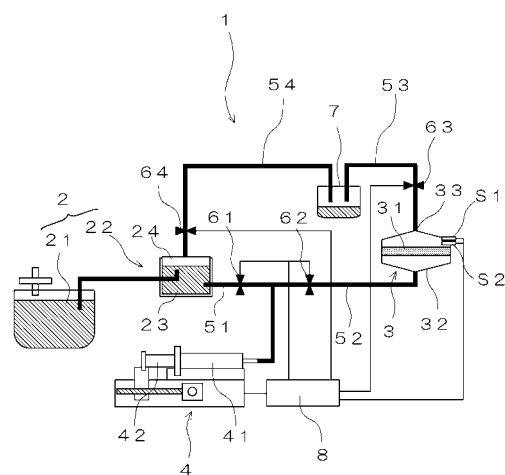
(54) 【発明の名称】 細胞培養装置

(57) 【要約】

【課題】 圧力や流量をきめ細かく変化させることができるとともに、低コストで細胞を培養できるようにする。

【解決手段】 培養液を貯留する第一タンク21及び第二タンク22と、この第二タンク22からシリンジポンプ4に培養液を供給させる第一導通路51と、当該第一導通路51を開閉させる第一バルブ61と、前記シリンジポンプ4から細胞を培養する培養室3に培養液を供給させる第二導通路52と、当該第二導通路52を開閉させる第二バルブ62と、当該シリンジポンプ4および第一バルブ61、第二バルブ62を制御する制御部8とを備える。そして、当該制御部8によって、前記シリンジポンプ4に培養液を供給する際、第一バルブ61を開状態に制御するとともに第二バルブ62を閉状態に制御し、当該シリンジポンプ4から培養室3側に培養液を供給する際は、第一バルブ61を閉状態に制御するとともに第二バルブ62を開状態に制御させる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

培養液を貯留するタンクと、
細胞を培養する培養室と、
前記タンクから供給された培養液を前記培養室に供給する供給部とを備えてなる細胞培養装置において、
当該供給部を、プランジャーを往復動させるシリンジポンプで構成したことを特徴とする細胞培養装置。

【請求項 2】

培養液を貯留するタンクと、
当該タンクからシリンジポンプに培養液を供給させる第一導通路と、
当該第一導通路を開閉させる第一バルブと、
前記シリンジポンプから細胞を培養する培養室に培養液を供給させる第二導通路と、
当該第二導通路を開閉させる第二バルブと、
当該シリンジポンプおよび第一バルブ、第二バルブを制御する制御部と、
を備え、
当該制御部によって、前記シリンジポンプに培養液を供給する際、第一バルブを開状態に制御するとともに第二バルブを閉状態に制御し、当該シリンジポンプから培養室側に培養液を供給する際は、第一バルブを閉状態に制御するとともに第二バルブを開状態に制御するようにしたことを特徴とする細胞培養装置。

10

20

【請求項 3】

前記培養室から培養液を排出させる第三導通路と、
当該第三導通路の流路幅を可変にする第三バルブと、
を備え、前記制御部で当該第三バルブの流路幅を変えるようにした請求項 2 に記載の細胞培養装置。

【請求項 4】

前記タンクが、培養液を貯留する第一タンクと、当該第一タンクから供給された培養液を保温する第二タンクとを備えて構成されるものであり、
当該第二タンクから前記シリンジポンプに培養液を供給するようにした請求項 1 または 2 に記載の細胞培養装置。

30

【請求項 5】

当該第二タンクが、保温によって生じた気泡を除去する気泡除去部を有してなる請求項 4 に記載の細胞培養装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、細胞や組織など（以下「細胞」と略する）を培養できる細胞培養装置に関するものであり、より詳しくは、培養液を脈動させながら細胞に供給することで、効率的に細胞を培養できるようにした細胞培養装置に関するものである。

【背景技術】

40

【0002】

従来、細胞を培養する装置として、下記の特許文献 1 に記載される装置などが提案されている。

【0003】

この細胞培養装置は、図 4 に示すように、培養液を貯留するタンク 91 と、このタンク 91 から供給されてガス交換された培養液を一定の温度に保温する保温部 92 と、この保温部 92 で保温された培養液を培養槽 93 に供給するファンクションジェネレータ 94 で制御される遠心ポンプ 95 などを備えて構成されている。そして、培養液を培養槽 93 に供給する際には、ファンクションジェネレータ 94 で遠心ポンプ 95 を制御させながら培養液を一定の圧力や流量で培養槽 93 に供給し、その培養槽 93 内で人体を模した環境下

50

で酸素などを供給して細胞を培養させるようにしている。

【0004】

ところで、このような細胞培養装置で細胞を培養させる場合、培養液の圧力や流速などを試行錯誤的に変えることで、細胞にとって最適な環境で培養させるようにすることが望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2006-109707号公報

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、このような細胞培養装置で細胞を培養させる場合、次のような問題がある。

【0007】

すなわち、上述のようなファンクションジェネレータを用いて遠心ポンプを制御するようにしているため、培養液の流量や圧力を大きくするために遠心ポンプの回転速度を上げなければならない。しかるに、このようなポンプは、急速に回転速度を上げることができないために、どうしても脈動させる際の圧力の立ち上がりで遅延を生じてしまう。また、遠心ポンプでは、培養液をポンプ内の回転羽根や回転軸などに接触させてしまうことになるため、培養液のクリーン性を保つことが難しくなってしまう。さらには、このようなファンクションジェネレータや遠心ポンプを用いると、装置が大掛かりなものになってしまい、コストが高くなってしまえばかりでなく、回転羽根を常時回転させることによって騒音が大きくなってしまふといった問題も生ずる。

20

【0008】

そこで、本発明は、上記課題を解決するために、圧力や流量をきめ細かく変化させることができるとともに、低コストで細胞を培養できるようにした細胞培養装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

30

すなわち、本発明は上記課題を解決するために、培養液を貯留するタンクと、細胞を培養する培養室と、前記タンクから供給された培養液を前記培養室に供給する供給部とを備えてなる細胞培養装置において、当該供給部を、プランジャーを往復動させるシリンジポンプで構成したものである。

【0010】

このように構成すれば、安価なシリンジポンプのプランジャーの押圧力や速度を変えることによって、簡単に圧力や流量や周期などを変化させることができ、細胞にとって最適な培養環境を作り出すことができるようになる。

【0011】

40

また、このような発明において、培養液を貯留するタンクと、当該タンクからシリンジポンプに培養液を供給させる第一導通路と、当該第一導通路を開閉させる第一バルブと、前記シリンジポンプから細胞を培養する培養室に培養液を供給させる第二導通路と、当該第二導通路を開閉させる第二バルブと、当該シリンジポンプおよび第一バルブ、第二バルブを制御する制御部とを備え、当該制御部によって、前記シリンジポンプに培養液を供給する際、第一バルブを開状態に制御するとともに第二バルブを閉状態に制御し、当該シリンジポンプから培養室側に培養液を供給する際は、第一バルブを閉状態に制御するとともに第二バルブを開状態に制御させるようにする。

【0012】

このように構成すれば、プランジャーの往復動と第一バルブおよび第二バルブの開閉制御によって、常に新鮮な培養液を供給することができるようになる。

50

【0013】

さらには、前記培養室から培養液を排出させる第三導通路と、当該第三導通路の流路幅を可変にする第三バルブとを備え、前記制御部で当該第三バルブの流路幅を変えるようにする。

【0014】

このように構成すれば、排出側の第三バルブの流路幅とプランジャーの押圧力を変えることによって培養液の圧力や、脈動の立ち上がり、立ち下がりなどを変化させることができるようになる。

【0015】

加えて、前記タンクを、培養液を貯留する第一タンクと、当該第一タンクから供給された培養液を保温する第二タンクとを備えて構成し、当該第二タンクから前記シリンジポンプに培養液を供給できるようにする。

10

【0016】

このように構成すれば、タンクを分けることによって、新たに培養液を補給する際に、シリンジポンプ側に供給される培養液の温度が急激に変わってしまうようなことがなくなる。

【0017】

また、このような第二タンクに、保温によって生じた気泡を除去する気泡除去部を設けるようにする。

【0018】

このように構成すれば、保温によって生じた気泡をその場で除去することができるため、気泡のない培養液をシリンジポンプを介して培養室に供給することができるようになる。

20

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、培養液を貯留するタンクと、細胞を培養する培養室と、前記タンクから供給された培養液を前記培養室に供給する供給部とを備えてなる細胞培養装置において、当該供給部を、プランジャーを往復動させるシリンジポンプで構成するようにしたので、安価なシリンジポンプのプランジャーの押圧力や速度を変えることで、簡単に圧力や流量や周期などを変化させることができ、細胞にとって最適な培養環境を作り出すことができるようになる。

30

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の一実施の形態における細胞培養装置の全体概略図

【図2】同形態における培養室に配置される培養基材を示す図

【図3】同形態における培養液の供給状態を示す図

【図4】従来例における細胞培養装置を示す図

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本実施の形態における細胞培養装置1について図面を参照して説明する。

40

【0022】

この実施の形態における細胞培養装置1は、図1に示すように、培養液を貯留するタンク2と、細胞を培養する培養室3と、タンク2から供給された培養液を導通路を介して培養室3に供給する供給部(シリンジポンプ4)と、この供給部やバルブ(61~64)などを制御する制御部8を備えて構成するようにしたものである。そして、特徴的に、その供給部4をシリンジポンプ4で構成するとともに、制御部8を用いてタンク2から新たな培養液をシリンジポンプ4内に供給し、弁を切り替えて最適な流速や圧力によって培養室3側に培養液を供給できるようにしたものである。以下、本実施の形態における細胞培養装置1について詳細に説明する。

【0023】

50

まず、タンク 2 は細胞を培養するための培養液を貯留するものであって、ここでは新たな培養液を貯留する第一タンク 2 1 と、この第一タンク 2 1 から供給された培養液を貯留する第二タンク 2 2 とを分離して構成されている。このうち第一タンク 2 1 には、貯留されている培養液が少なくなった場合に、別途新たに培養液が供給されるようになっている。一方、第二タンク 2 2 には、この第一タンク 2 1 との間に連結されたチューブなどが設けられ、第一タンク 2 1 から必要な分だけの培養液が徐々に供給されるようになっている。この供給を行う際には、第二タンク 2 2 を密閉状態にしておき、第二タンク 2 2 の培養液が培養室 3 側に供給されて内部圧力を低下されることによって、第一タンク 2 1 から新たな培養液を供給できるようになっている。

【0024】

また、この第二タンク 2 2 には、保温部 2 3 が設けられており、貯留された培養液を一定温度（例えば、体温程度）に保つようにしたものである。この保温の方法としては種々の方法が考えられるが、第二タンク 2 2 の外側から熱を供給する方法や、第二タンク 2 2 内にヒーターなどを設ける方法などが考えられる。なお、この場合、培養液のクリーン性を保つためには、第二タンク 2 2 の外側から熱を供給する方法が好ましい。また、このように培養液を低温から体温程度に保温する過程で培養液の内部から気泡が発生してしまうため、この第二タンク 2 2 内には気泡除去部 2 4 を設けて、その気泡を除去できるようにしている。ここでは、第二タンク 2 2 内の培養液の上側部分を気泡除去部 2 4 として空間を形成しておき、ある程度気体の領域が大きくなった場合に気泡を外部に放出させるようにしている。この気泡を外部に放出させる場合、第二タンク 2 2 から後述する排液槽 7 までの第四導通路 5 4 を介して気体を排液槽 7 側まで排出させるようにする。このとき、第二タンク 2 2 の気密性を保つために、第四導通路 5 4 に第四バルブ 6 4 を設けておき、制御部 8 を介して気体を排出させるときのみ、第四バルブ 6 4 を開けて気体を排液槽 7 側まで排出させるようにする。

【0025】

一方、培養室 3 には、三次元細胞塊を個別に収容する培養基材 3 1 が設けられる。この培養基材 3 1 は、図 2 に示すように、細胞塊形状を保持できると同時に圧力を加えても変形しない強度を持ち、かつ、培養液を透過させることができる多孔性のマイクロウエルによって構成されている。このマイクロウエルによる有底孔の大きさは、200 μm 程度となっており、その間に存在する多孔質壁から培養液を三次元細胞に供給して細胞の最寄りの毛細血管から栄養源や酸素などを供給できるようになっている。この培養基材 3 1 の外形は円盤形状をなしており、培養室 3 の下方のテーパ形状をなす入口部 3 2 から培養液を均一に各細胞側に供給できるようにしている。なお、ここでは培養基材 3 1 を円盤状とし、入口部 3 2 をテーパ形状をなすようにしているが、各細胞に均等に流速や圧力を加えられるような状態であれば、どのような形状であってもよい。そして、このように供給された培養液を上側の排出部 3 3 から排出させるようにしている。また、この培養室 3（もしくは、これに接続される第三導通路 5 3 や第四導通路 5 4）には、酸素濃度センサー S 1 や圧力センサー S 2 が設けられ、これらのセンサー S 1、S 2 の値によって、培養液の供給を制御できるようにしている。

【0026】

この培養室 3 には、供給部やバルブを制御することによって培養液が供給される。この供給部は、この実施の形態ではシリンジポンプ 4 で構成されており、図 1 に示すように、シリンジ 4 1 内にプランジャー 4 2 を進退させることで、シリンジ 4 1 内の培養液を培養室 3 側に供給できるようにしている。具体的には、プランジャー 4 2 をウォームギアなどを介して後退させることで、第二タンク 2 2 から第一導通路 5 1 を介して培養液をシリンジ 4 1 内に吸い込み、逆に、プランジャー 4 2 を押し込むことで、シリンジ 4 1 内の培養液を先端開口部から排出し、第二導通路 5 2 を介して培養室 3 に供給するようにしている。このとき、第二タンク 2 2 から第一導通路 5 1 を介して培養液を吸い込む際には、制御部 8 を用いて、第一導通路 5 1 に設けられた第一バルブ 6 1 を開の状態にしておくとともに、排出側の第二導通路 5 2 に設けられた第二バルブ 6 2 を閉の状態にしておく。そして

10

20

30

40

50

、このように第一バルブ 6 1 や第二バルブ 6 2 を制御した状態で、プランジャー 4 2 を後退させて、第二タンク 2 2 から新たな培養液を吸い込む。一方、シリンジ 4 1 内の培養液を培養室 3 側に排出する際には、逆に、制御部 8 を用いて、第一導通路 5 1 の第一バルブ 6 1 を閉の状態にし、第二導通路 5 2 の第二バルブ 6 2 を開の状態にしてプランジャー 4 2 を押し込む。すると、シリンジ 4 1 内の培養液が第二導通路 5 2 を介して培養室 3 内に供給されるようになる。この制御部 8 によってシリンジポンプ 4 のプランジャー 4 2 を進退させる場合、プランジャー 4 2 の進退速度を制御できるようにしており、プランジャー 4 2 の速度や流量、もしくは、圧力などを制御できるようにしている。

【 0 0 2 7 】

一方、この制御部 8 によって、培養室 3 の下流側に設けられる第三導通路 5 3 の第三バルブ 6 3 も制御される。この第三バルブ 6 3 も第三導通路 5 3 の開閉もしくは流路幅を変更できるようにしたものであって、可撓性チューブで構成された第三導通路 5 3 を外側から挟み込むことで、流路幅を調整できるようにしている。そして、この流路幅を調整するとともに、シリンジポンプ 4 のプランジャー 4 2 の押し込み力を変えることで、培養室 3 に供給される培養液の圧力を調整できるようにしている。

10

【 0 0 2 8 】

このように培養室 3 に供給された培養液は、第三導通路 5 3 を介して排液槽 7 に供給される。ここでは、排液槽 7 に培養液を貯留しておく構成としているが、この培養液を第二タンク 2 2 に循環供給できるようにしてもよい。

【 0 0 2 9 】

次に、このように構成された細胞培養装置 1 における培養液の供給方法について説明する。

20

【 0 0 3 0 】

まず、細胞を培養する場合、第二タンク 2 2 から細胞培養室 3 までを培養液で満たしておき、その状態で、マイクロウェルの各孔に三次元細胞をそれぞれ投入する。このとき、満たされる培養液は所定の温度（例えば、37 程度）となるように予め温めておくようにし、その状態で三次元細胞を投入する。

【 0 0 3 1 】

そして、このようにした状態で培養室 3 に培養液を供給していく。この培養液を供給する場合は、第二タンク 2 2 で予め温められて気泡の除去された培養液をシリンジポンプ 4 内に吸い込む。この吸い込みの際には、制御部 8 を用いて第一バルブ 6 1 を開の状態にするとともに第二バルブ 6 2 を閉の状態にし、この状態でシリンジポンプ 4 のプランジャー 4 2 を後退させる。するとシリンジ 4 1 内の圧力が下がって第二タンク 2 2 から培養液がシリンジポンプ 4 内に取り込まれる。

30

【 0 0 3 2 】

そして、今度は、第一バルブ 6 1 を閉の状態にするとともに第二バルブ 6 2 を開の状態にし、この状態でシリンジポンプ 4 のプランジャー 4 2 を押し込むようにする。すると、シリンジポンプ 4 内の培養液が第二導通路 5 2 を介して培養室 3 内に供給されるようになる。

【 0 0 3 3 】

このとき、プランジャー 4 2 の進退を一定周期で行うようにすれば、図 3 (a) に示すように、脈動させるように培養液を細胞に供給させることができる。また、このとき、第三バルブ 6 3 を開いた状態にしておくと、図 3 (b) に示すように、培養液の圧力を低くした状態で培養液を供給することができ、プランジャー 4 2 の押し込むスピードを速くすれば、脈動させる際の立ち上がり供給速度を高めることができるようになる。また、このときのプランジャー 4 2 の押し込み速度を小さくすれば、脈動させる際の立ち上がり供給速度をゆっくりにすることができる。一方、第三バルブ 6 3 によって第三導通路 5 3 の通路幅を狭くした場合は、図 3 (c) に示すように、培養液の圧力を高めながら培養液を脈動させるように供給することができるようになる。このときも、プランジャー 4 2 の押し込み速度を変化させることで、立ち上がりを変化させることができるようになる。さらに

40

50

、第三バルブ63を完全に閉めた状態でシリンジポンプ4から培養液を供給すると、圧力の立ち上がりを急激に高めることができ、その後、第三バルブ63を徐々に開けることによって培養液を供給していくことができるようになる(図3(d))。

【0034】

また、このように供給された培養液は、酸素濃度センサーや圧力センサーによって酸素濃度や圧力が検出され、その値を時系列で記録したり、あるいは、その値によってシリンジポンプ4の動作を制御したりすることで、設定された酸素濃度や圧力で培養液を供給できるようにする。

【0035】

このように供給された培養液は、第三導通路53を介して排液槽7まで導かれる。

10

【0036】

以下、同様にして第二タンク22から順次新たな培養液を供給して排液槽7に貯めていくが、このように培養液を供給していくと、密閉された第二タンク22の圧力が低くなっていく。このように第二タンク22の圧力が低くなると、今度は、その第二タンク22の圧力減に応じて第一タンク21から新たな培養液が取り込まれ、第二タンク22に供給される。そして、その第二タンク22で保温して気泡を除去した後、順次シリンジポンプ4を介して培養室3に供給していく。

【0037】

このように上記実施の形態によれば、培養液を貯留するタンク2と、細胞を培養する培養室3と、前記タンク2から供給された培養液を前記培養室3に供給する供給部とを備えてなる細胞培養装置1において、当該供給部を、プランジャーを往復動させるシリンジポンプ4で構成したので、安価なシリンジポンプ4のプランジャーの押圧力や速度を変えることで、簡単に圧力や流量や周期などを変化させることができ、細胞にとって最適な培養環境を作り出すことができるようになる。

20

【0038】

また、培養液を貯留するタンク2と、当該タンク2からシリンジポンプ4に培養液を供給させる第一導通路51と、当該第一導通路51を開閉させる第一バルブ61と、前記シリンジポンプ4から細胞を培養する培養室3に培養液を供給させる第二導通路52と、当該第二導通路52を開閉させる第二バルブ62と、当該シリンジポンプ4および第一バルブ61、第二バルブ62を制御する制御部8とを備え、当該制御部8によって、前記シリンジポンプ4に培養液を供給する際、第一バルブ61を開状態に制御するとともに第二バルブ62を閉状態に制御し、当該シリンジポンプ4から培養室3側に培養液を供給する際は、第一バルブ61を閉状態に制御するとともに第二バルブ62を開状態に制御させるようにしたので、プランジャーの往復動と第一バルブ61および第二バルブ62の開閉制御によって、常に新鮮な培養液を供給することができるようになる。

30

【0039】

さらには、前記培養室3から培養液を排出させる第三導通路53と、当該第三導通路53の流路幅を可変にする第三バルブ63とを備え、前記制御部8で当該第三バルブ63の流路幅を変えるようにしたので、排出側の第三バルブ63の流路幅とプランジャー42の押圧力を変えることによって培養液の圧力や、脈動の立ち上がり、立ち下がりなどを変化させることができるようになる。

40

【0040】

加えて、前記タンク2を、培養液を貯留する第一タンク21と、当該第一タンク21から供給された培養液を保温する第二タンク22とを備えて構成し、当該第二タンク22から前記シリンジポンプ4に培養液を供給できるようにしたので、新たに培養液を補給する際に、シリンジポンプ4側に供給される培養液の温度が急激に変わってしまうようなことがなくなる。

【0041】

また、このような第二タンク22に、保温によって生じた気泡を除去する気泡除去部24を設けるようにしたので、保温によって生じた気泡をその場で除去することができるた

50

め、気泡のない培養液をシリンジポンプ 4 を介して培養室 3 に供給することができるようになる。

【 0 0 4 2 】

なお、本発明は上記実施の形態に限定されることなく、種々の態様で実施することができる。

【 0 0 4 3 】

例えば、上記実施の形態では、タンク 2 を第一タンク 2 1 と第二タンク 2 2 に分けて構成するようにしたが、これを一つのタンク 2 としておき、そのタンク 2 で保温と気泡除去を行うようにしてもよい。

【 0 0 4 4 】

また、上記実施の形態では、排液槽 7 に培養液を貯留するようにしたが、これをタンク 2 に戻して循環再利用するようにしてもよい。

【 0 0 4 5 】

さらに、上記実施の形態では、シリンジポンプ 4 への供給と排出を第一バルブ 6 1 および第二バルブ 6 2 で切り替えるようにしたが、第一導通路 5 1 と第二導通路 5 2 との合流部分に切替弁を設けて供給と排出を切り替えるようにしてもよい。

【 0 0 4 6 】

加えて、上記実施の形態では、第二タンク 2 2 で保温して培養室 3 へ培養液を供給するようにしたが、途中で培養液の温度が低下してしまう可能性がある場合は、第一導通路 5 1 や第二導通路 5 2、シリンジポンプ 4 にも保温部 2 3 を設けて、温度を一定に保てるようにしておくことも可能である。もしくは、この第二タンク 2 2 から培養室 3 までを一つの筐体内に収納しておき、その筐体内を一定の温度に保つようにして、培養液の温度低下を防ぐようにしてもよい。

【 符号の説明 】

【 0 0 4 7 】

1 . . . 細胞培養装置

2 . . . タンク

2 1 . . . 第一タンク

2 2 . . . 第二タンク

2 3 . . . 保温部

2 4 . . . 気泡除去部

3 . . . 培養室

3 1 . . . 基材

3 2 . . . 入口部

3 3 . . . 排出部

4 . . . 供給部 (シリンジポンプ)

4 1 . . . シリンジ

4 2 . . . プランジャー

5 1 . . . 第一導通路

5 2 . . . 第二導通路

5 3 . . . 第三導通路

5 4 . . . 第四導通路

6 1 . . . 第一バルブ

6 2 . . . 第二バルブ

6 3 . . . 第三バルブ

6 4 . . . 第四バルブ

7 . . . 排液槽

8 . . . 制御部

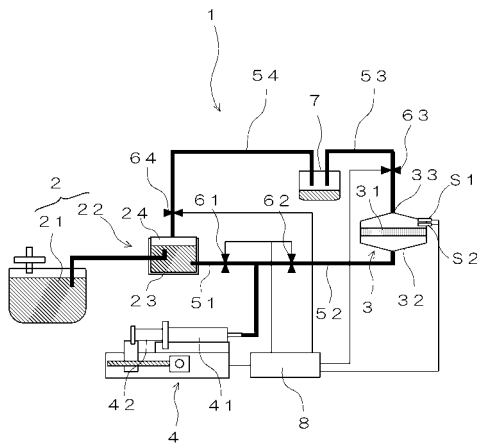
10

20

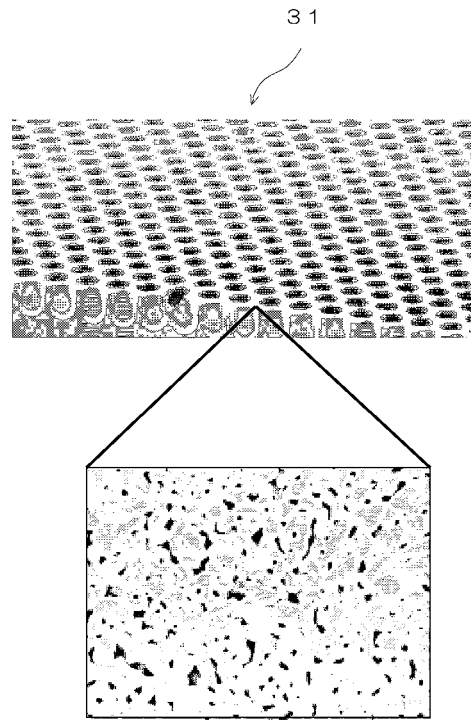
30

40

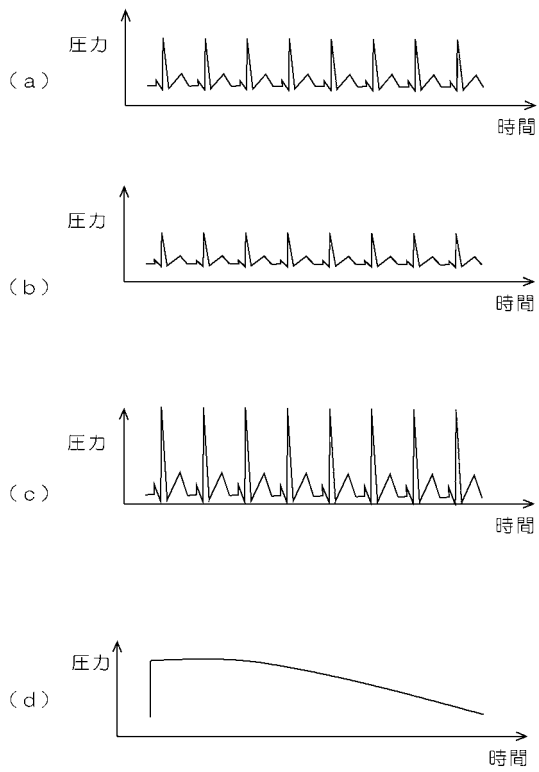
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

