

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

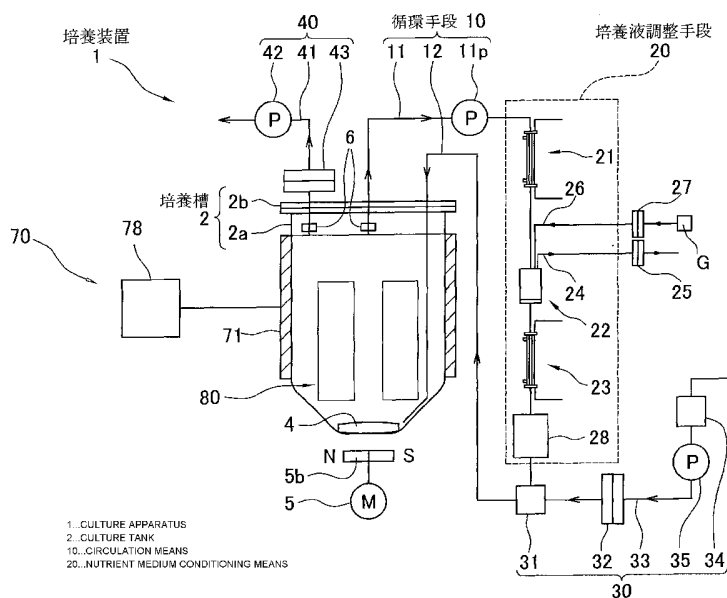
(10) 国際公開番号
WO 03/104386 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12M 3/00 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/06332 (72) 発明者: 山下 菊治 (YAMASHITA, Kikuji) [JP/JP]; 〒
779-3215 徳島県 名西郡 石井町 藍畑字 竜王 51-69
Tokushima (JP).
(22) 国際出願日: 2003 年 5 月 21 日 (21.05.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 山内 康伸 (YAMAUCHI, Yasunobu); 〒760-
0023 香川県 高松市 寿町1丁目1番8号 日本生命高松
(26) 国際公開の言語: 日本語 駅前ビル3階 山内特許事務所 Kagawa (JP).
(30) 優先権データ: 特願2002-148152 2002 年 5 月 22 日 (22.05.2002) JP (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

[続葉有]

(54) Title: CULTURE APPARATUS, ARTIFICIAL TISSUE AND BLOOD PREPARATION

(54) 発明の名称: 培養装置、人工組織および血液製剤



(57) Abstract: An apparatus for culturing living cells, comprising culture tank (2) for accommodating a nutrient medium, circulation means (10) for effecting external circulation of the nutrient medium of the culture tank (2) and nutrient medium conditioning means (20) for conditioning the state of nutrient medium while the nutrient medium is being externally circulated. The nutrient medium of the culture tank (2) is externally circulated, and during the circulation outside the culture tank (2), the state of nutrient medium can be conditioned. Therefore, the state of nutrient medium in the culture tank (2) can be maintained at condition optimum for the cells accommodated in the culture tank (2) and thus the cells can be stably cultured continuously for a prolonged period of time.

(57) 要約: 生体の細胞を培養するための装置であって、培養液を収容するための培養槽2と、培養槽2内の培養液を外部循環させる循環手段10と、培養液を外部循環させている間に、培養液の状態を調整する培養液調整手段20とからなる。培養槽2内の培養液を外部循環させ、培養槽2外を循環している間に、培養

[続葉有]



SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

培養装置、人工組織および血液製剤

5 技術分野

本発明は、培養装置、人工組織および血液製剤に関する。

浮遊細胞や細菌等の生体は、細胞に必要な栄養分や酸素を含んだ培養液中に浸漬された状態で培養される。ところで、培養液に含まれる酸素は時間とともに消費されるから、細胞を長時間培養する場合、ガス供給手段によって培養液に酸素を補給し、培養液中の酸素濃度が一定に保たれる。本発明は、培養液中の酸素濃度が一定に保つことができるガス供給手段を備えた培養装置に関する。

また、近年、人体の損傷したり欠損したりした組織や臓器を回復させるために、組織や臓器を移植する再生医療が行われているが、通常、人体等の細胞から採取されたものが使用されている。同様に、輸血に使用される血液や血液中の成分なども献血によってまかなわれており、慢性的に不足している。かかる組織や臓器、血液等を人工的に培養し製造することができれば、需要を満たすことができるものの、組織や臓器、血液等を、移植や輸血が可能な細胞数まで培養するには、大量の細胞を長時間連続して培養しなければならないため、人工的に培養された組織や臓器、血液等は実用化されていない。本発明は、上記培養装置によって人工的に培養された再生医療に使用可能な人工組織、および、上記培養装置によって人工的に培養された血液細胞から製造される血液製剤に関する。

背景技術

ガス供給手段を備えた培養装置として、従来例 1、2（特許文献 1、2）に開示された培養装置がある。

従来例 1 の培養ユニットは、細胞を培養する培養容器と、この培養容器内の培養液を外部循環させる循環経路とを備えたものであり、この循環経路に、培養液のガス交換を行なうガス交換部を設けたものである。このガス交換部では、循環される培養液にテフロンチューブが浸漬されており、このテフロンチューブ内を流れるガスと培養

液との間でガス交換が行なわれている。

このため、ガスの流量を調整すれば培養液に供給する酸素や栄養分の量、培養液から排出される二酸化炭素や窒素化合物の量を調整することができる。よって、培養液中の酸素濃度等を一定に保つことができるから、細胞を、長期間連続で培養することができる。

5 従来例2の培養ユニットは、培養槽が、中空な筒状体と、この筒状体内に収容された中空糸とから構成されており、中空糸と筒状体の間に細胞を培養するための増殖培地が収容されたものである。そして、筒状体内に収容されている中空糸は、培養槽外に設けられた培地交換装置およびガス供給装置と連通されており、中空糸内には、培
10 地交換装置およびガス供給装置との間を循環する循環培地が流されている。そして、循環培地は、ガス供給装置および培地交換装置に通すことによって、循環培地に含まれる細胞の培養に必要な成分の濃度や酸素濃度を、増殖培地よりも高濃度に保っている。

このため、循環培地が培養槽の中空糸内を通るときに、培養に必要な成分や酸素が
15 循環培地から増殖培地に供給され、細胞が排出した老廃物や二酸化炭素が増殖培地から循環培地に排出される。よって、循環培地の流量を調整すれば培養液中の酸素濃度や二酸化炭素の濃度等を一定に保つことができるから、細胞を、長期間連続で培養することができる。

特許文献1

20 特開平07-8260号公報

特許文献2

特開平09-98769号公報

しかるに、従来例1の培養ユニットは、培養液中の気体成分の濃度は調整することはできるが、細胞の栄養分となるアミノ酸、ホルモン、ビタミンはガスから培養液に
25 供給することができないので、これらの栄養分が消費されてしまえば、細胞はそれ以上増殖することができない。そして、細胞が排出するアンモニア、尿素などの窒素化合物等を培養液から除去することはできないから、これらの成分濃度が一定の量以上になると、細胞は増殖を阻害する。したがって、従来例1の培養ユニットでは、ある程度の期間、つまり培養液中の窒素化合物等の濃度が細胞の培養に適した条件にある

間は細胞を培養することができるが、それ以上の期間は細胞を培養できない。そして、細胞を培養することができる期間は、培養ユニットを循環する培養液の量によって制限されてしまい、長期間培養する場合には、装置が大型化してしまう。

また、従来例2の培養ユニットでは、循環されているのは循環培地であって、細胞
5 が浸漬されている増殖培地自体は培養槽内に保持されたままである。すると、増殖培地のうち、中空糸と接触している部分はガス交換等が有効に行なわれるものの、中空糸と隔離している部分はほとんどガス交換等が行なわれないため、培養槽内の増殖培地が不均一な状態となる。そして、中空糸近傍の増殖培地と循環培地との濃度差が小さくなればガス交換効率が低くなるから、中空糸近傍が循環培地と同等の条件になれば、増殖培地全体で見れば培養に適していない条件になっていてもガス交換等が行な
10 われなくなってしまう。すると、従来例2の培養ユニットでは、長期間培養する内に、中空糸近傍では細胞が増殖していても、他の部分では細胞が死滅してしまう可能性がある。そして、死滅した細胞が増加すれば、これらの細胞によって中空糸が目詰まりしてしまう可能性があり、もし目詰まりが発生すれば、ガス交換等の効率がさらに低下するため、中空糸近傍であっても培養液の状態が悪化し、細胞が増殖できなくなっ
15 てしまう可能性がある。

発明の開示

第1発明の培養装置は、生体の細胞を培養するための装置であって、培養液を収容
20 するための培養槽と、該培養槽内の培養液を外部循環させる循環手段と、前記培養液を外部循環させている間に、該培養液の状態を調整する培養液調整手段とからなることを特徴とする。

第1発明によれば、培養槽内の培養液を外部循環させ、培養槽外を循環している間に、培養液の状態を調整することができる。よって、培養槽内の培養液の状態を、培
25 養槽内の細胞に最適な条件に保つことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

第2発明の培養装置は、第1発明において、前記培養液調整手段が、前記培養液のガス濃度を調整するガス濃度調整手段を備えていることを特徴とする。

第2発明によれば、培養槽外を循環している間に、ガス濃度調整手段によって培養

液を所望のガス濃度に飽和させることができるから、培養液のガス濃度を均一かつ細胞の培養に適した状態に保つことができる。よって、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。しかも、培養槽外でガス濃度に飽和させるから、培養槽の大きさに係わらず、所望の能力を有するガス濃度調整手段を採用することができる。そして、培養槽内には気泡が発生しないので、気泡によって培養細胞を損傷することを防ぐことができるし、培養細胞に与えるストレスを軽減することができる。さらに、培養槽の外部においてガスを飽和させているから、ガス濃度調整手段においてはガスを直接培養液に供給しても細胞の培養に悪影響を与える心配がない。よって、培養液にガスを飽和させるときに、空気透過性のチューブを用いる必要がないから、装置の製造コストを低く抑えることができる。

第3発明の培養装置は、第1または2発明において、前記培養液調整手段が、前記培養液を浄化する浄化手段を備えていることを特徴とする。

第3発明によれば、培養槽外を循環している間に、細胞が排出した老廃物や細胞に有害な物質を除去することができるから、培養液の劣化を防ぐことができ、常に、細胞の培養に適した状態に保つことができる。よって、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

第4発明の培養装置は、第1、2または3発明において、前記培養液調整手段が、前記培養液のガス濃度を調整するガス濃度調整手段と、前記培養液を浄化する浄化手段とを備えており、該浄化手段と前記ガス濃度調整手段が直列に配置されていることを特徴とする。

第4発明によれば、ガス濃度調整手段と浄化手段とを直列に配置している、つまり外部循環する培養液を、ガス濃度調整手段と浄化手段の両方を通過させてから培養槽に戻すので、培養槽内の培養液の状態を、細胞の培養に適した状態に確実に保つことができる。しかも、コンパクトで一括操作できるので、使い捨てのセットとして製造することが可能である。そして、使い捨てのセットという構成を採用すれば、ガス濃度調整手段と浄化手段とを直列に配置したときに生じる接続部でのコンタミネーションが起りやすいという問題が生じることも防ぐことができる。

第5発明の培養装置は、第3または4発明において、前記浄化手段が、前記培養液を透析する透析部であることを特徴とする。

第5発明によれば、透析によって培養液を浄化するから、循環する培養液中に細胞が含まれていても、透析部を通過するときの細胞の損傷を少なくすることができる。しかも、培養槽外で透析しているから、培養槽の大きさに係わらず、所望の透析能力を有する透析部を採用することができる。また、中空糸間空間を広くとる構成にすれば、培養する細胞等が詰まって透析能力が低下することも防ぐことができる。

第6発明の培養装置は、第5発明において、前記透析部が、中空な本体ケースと、該本体ケース内に配置された中空糸とから構成されており、前記本体ケースの内面と前記中空糸の外面との間に、前記培養液が通される培養液循環通路が形成されており、前記中空糸の内部に、前記培養液を透析するための透析液が通されることを特徴とする。

第6発明によれば、中空糸の内部に透析液を流し、本体ケースと中空糸との間に透析する培養液を流すから、培養液が透析部を流れるときの流動抵抗を少なくすることができる。よって、培養液を、スムーズに外部循環させることができる。しかも、循環する培養液中に細胞が含まれていても、透析部を通過するときに透析部から細胞が受ける抵抗をさらに小さくすることができるから、透析部を通過するときの細胞の損傷を少なくすることができる。また、細胞もスムーズに通過することができる。

第7発明の培養装置は、第1、2、3または4発明において、前記培養液調整手段が、前記培養液に細胞の培養に必要な栄養分を供給する栄養分補給部を備えていることを特徴とする。

第7発明によれば、培養槽外を循環している間に、栄養分補給部によって、細胞によって消費された栄養分を培養液に補給することができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

第8発明の培養装置は、第7発明において、前記栄養分補給部が、前記培養液が通される培養液通過部と、細胞の培養に必要な栄養分を含む栄養剤が通される栄養剤通路を備えており、該栄養剤通路と前記培養液通過部との間が、透析部材によって分離されていることを特徴とする。

第8発明によれば、培養液通過部と栄養剤通過部が透析部材によって分離されているから、栄養剤に含まれる栄養分のうち、培養液中の濃度が低下した成分だけを培養液に供給することができる。よって、必要以上の栄養分が培養液に供給されることに

よって生じる細胞障害という問題が生じることを防ぐことができる。

第9発明の培養装置は、第1、2、3、4または7発明において、前記培養槽から培養液を抽出する抽出手段を備えており、該抽出手段が、一端が前記培養槽内の培養液に浸漬され、他端が該培養槽外に配置された抽出経路と、該抽出経路に設けられた
5、前記培養液を搬送するための搬送手段と、前記抽出経路内に、無菌気体を供給する気体供給手段を備えており、該気体供給手段が、前記抽出経路において、その他端と前記搬送手段との間に無菌気体を供給することを特徴とする。

第9発明によれば、搬送手段によって培養液を他端部に向けて搬送すれば、培養槽内の培養液を抽出することができるから、培養槽内の細胞の培養状況を確認することが
10ができる。しかも、搬送手段と抽出経路の他端部との間には、無菌気体が供給されているから、常に無菌気体を供給しておけば、抽出経路の他端から抽出経路内に雑菌が侵入することを防ぐことができる。すると、抽出経路を通過する培養液が雑菌に汚染されることを防ぐことができる。そして、抽出経路内に残っている培養液も雑菌に汚染されていないから、この培養液を培養槽に戻すことができ、培養液を有効活用する
15ことができる。

第10発明の培養装置は、第1、2、3、4、7または9発明において、前記培養槽が、その培養液の温度を制御する温度制御手段を備えていることを特徴とする。

第10発明によれば、温度制御手段によって、培養槽内の培養液の温度を、細胞の培養に適した温度に保持しておくことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定
20した状態で培養することができる。

第11発明の培養装置は、第10発明において、前記温度制御手段が、遠赤外線を放射する遠赤外線放射部を備えていることを特徴とする。

第11発明によれば、培養液だけでなく、培養液中の細胞も遠赤外線によって加温することができる。そして、細胞が直接加温されるから、培養液の温度変化が細胞の
25温度に与える影響を少なくすることができる。そして、細胞の温度を、遠赤外線放射部とほぼ同等の温度に保持することができるから、細胞の温度調整を容易かつ確実に
行なうことができる。

第12発明のインキュベータは、第11発明において、前記遠赤外線放射部が、7～12 μm の波長帯に、放射する遠赤外線のエネルギー密度のピークを有するように

調整されていることを特徴とする。

第12発明によれば、遠赤外線による細胞の増殖や分化を促進させることができる。よって、細胞の培養効率を向上させることができる。

第13発明の培養装置は、第11または12発明において、前記遠赤外線放射部が
5、面状発熱体であることを特徴とする。

第13発明によれば、遠赤外線放射部が面状発熱体であるから、装置をよりコンパクトに構成することができる。

第14発明の培養装置は、第13発明において、前記面状発熱体が、上下一対の基材と、該上下一対の基材の間に設けられた、通電されると遠赤外線を放射する放射部
10と、該放射部に電力を供給する電力供給手段とから構成されており、前記放射部が、前記上下一対の基材の内面に、放射体を印刷することによって形成されていることを特徴とする。

第14発明によれば、電力供給手段によって放射部に電力を供給すれば、放射部から遠赤外線を放射させることができる。しかも、放射部が上下一対の基材の内面に放射
15体を印刷することによって放射部を形成しているので、面状発熱体の製造が容易になるし、安価に製造することができる。

第15発明の培養装置は、第14発明において、前記放射体が、正の温度係数を有する素材であることを特徴とする。

第15発明によれば、放射体が、正の温度係数を有する素材である、つまり、自己
20温度調整機能を有しているから、細胞に放射される遠赤外線の状態を一定に保つことができる。よって、遠赤外線放射部の温度変化によって、細胞に照射される遠赤外線の状態が変化することを防ぐことができるから、細胞の温度変化を防ぐことができ、安定した状態で細胞を培養することができる。

第16発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9または10発明において、前
25記培養槽、前記循環手段および前記培養液調整手段を連結した状態において、オートクレーブ装置内に収容しうる大きさに形成されていることを特徴とする。

第16発明によれば、装置を分解することなくオートクレーブ装置内に入れることができるから、オートクレーブ装置によって殺菌された状態のまま使用することができ、培養液や細胞が雑菌に汚染される確率を非常に低くすることができる。

第17発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10または16発明において、前記循環手段が、前記培養槽から細胞が流出することを防ぐための流出防止手段を備えていることを特徴とする。

5 第17発明によれば、浮遊細胞や細菌を培養した場合、浮遊細胞等が培養槽から流出することを防ぐことができるから、培養液を外部循環させながら培養槽内の浮遊細胞等を確実に培養させることができ、長時間連続して細胞を培養することができる。また、死亡した細胞が流出して循環手段内で閉塞することを防ぐことができる。

第18発明の培養装置は、請求項17記載の発明において、前記流出防止手段が、電磁石であることを特徴とする。

10 第18発明によれば、培養液の循環する経路の内部に設置する必要がない、つまり電磁石は培養液と接触しないので、培養液がコンタミネーションされることを防ぐことができ、しかも、培養液の流れを阻害しないので、培養液をスムーズに外部循環させることができる。また、電磁石は培養する細胞と物理的な接触によって流出を防ぐものではない。つまり培養している細胞と接触しないから、細胞膜の非常に弱い細胞
15 であっても、培養槽からの流出を防ぎ、かつ損傷することなく培養することができる。

第19発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16または17発明において、前記培養槽内の培養液を外部に排出する培養液排出部と、前記循環手段に外部から新しい培養液を供給する培養液供給部とからなる培養液交換手段を備えて
20 いることを特徴とする。

第19発明によれば、培養液排出部によって使用中の培養液を培養槽から排出させながら、培養液供給部によって培養槽に新しい培養液を供給することができる。このため、培養を継続したままで培養液を交換できるから、長期間の培養が必要である接着細胞や造血細胞であっても培養することができる。しかも、培養液排出部と培養液
25 供給部を同期して作動させるだけで、使用中の培養液と新しい培養液の交換を自動的に行うことができる。よって、培養液の交換に人手が不要となり、培養液や培養中の細胞がコンタミネーションされる危険性を減らすことができる。

第20発明の培養装置は、第19発明において、前記培養液排出部が、前記培養槽から細胞が流出することを防ぐための流出防止手段を備えていることを特徴とする。

第20発明によれば、培養槽内の培養液を排出するときに、浮遊細胞等が培養槽から流出することを防ぐことができるから、細胞の培養を中止することなく、培養液を交換することができる。よって、細胞をより長期間連続で培養することができる。

5 第21発明の培養装置は、第20発明において、前記流出防止手段が、電磁石であることを特徴とする。

第21発明によれば、培養液の循環する経路の内部に設置する必要がない、つまり電磁石は培養液と接触しないので、培養液がコンタミネーションされることを防ぐことができる。また、電磁石は培養する細胞と物理的接触して流出を防ぐものではない。つまり培養している細胞と接触しないから、細胞膜の非常に弱い細胞であっても、
10 培養槽からの流出を防ぐことができる。

第22発明の培養装置は、第19、20または21発明において、前記培養液供給部が、培養液を前記循環手段に供給する前に、培養液を滅菌する滅菌部を備えていることを特徴とする。

第22発明によれば、新しい培養液は滅菌部によって滅菌されてから培養槽に供給
15 されるので、培養液を交換するときに、雑菌が混入することを防ぐことができ、培養中の培養液がコンタミネーションされることを防ぐことができる。

第23発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17または19発明において、前記培養槽、前記循環手段および前記培養液調整手段において、前記培養液が流れる経路によって閉ループ回路が形成されており、該閉ループ回路内に
20 加圧蒸気を供給し、該閉ループ回路内部を滅菌する加圧蒸気滅菌手段を備えていることを特徴とする。

第23発明によれば、加圧蒸気滅菌手段によって閉ループ回路内に加圧蒸気を供給すれば、各手段を分解することなく、閉ループ回路内を滅菌することができる。よって、培養装置を容易かつ迅速に装置全体を滅菌することができる。そして、各手段を
25 分解しない、つまり培養装置の滅菌作業において、人手で行う作業をなくすことができるので、培養槽等がコンタミネーションされる危険性を低くすることができる。また、加圧蒸気滅菌手段を作動させるだけで培養装置を滅菌することができるので、培養装置の滅菌も自動化でき、培養装置の運転を完全に自動化することも可能である。

第24発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19ま

たは23発明において、前記循環手段が、培養中の前記培養液を中の所望の成分を回収するための回収手段を備えていることを特徴とする。

第24発明によれば、培養液が循環経路を循環されている間に、培養液中の有効成分である蛋白質や培養される細胞が産生する成分を回収することができるので、有効成分等、所望の成分を高効率かつ確実に回収することができる。

第25発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23または24発明において、前記培養する細胞を供給する細胞供給手段を備えており、該細胞供給手段が、培養する細胞を含有する播種液を前記培養槽に搬送する細胞搬送手段と、該細胞供給手段によって搬送された前記播種液を、前記培養槽内に排出する排出部とからなることを特徴とする。

第25発明によれば、細胞搬送手段によって播種液を培養槽に搬送し、排出部によって培養槽内に排出すれば、播種液に含まれる細胞を培養液に供給することができる。

第26発明の培養装置は、第25発明において、前記細胞搬送手段が、前記播種液が収容された貯蔵部と、前記排出部との間を連通させる播種液搬送経路と、該播種液を前記貯蔵部から前記排出部に向けて送るポンプと、該ポンプと前記排出部との間に設けられ、両者の間を連通遮断するバルブとからなることを特徴とする。

第26発明によれば、バルブを閉めた状態でポンプを作動させれば播種液搬送経路内の播種液の圧力が高くなる。その状態でバルブを開けば、播種液を培養槽内に射出させることができる。すると、培養槽内に細胞を培養する足場となる細胞培養器具などを設けておけば、細胞培養器具の表面に播種液、つまり細胞を播種させることができる。よって、浮遊細胞だけでなく、接着細胞であっても自動的に、言い換えれば培養槽を開閉することなく播種することができるから、細胞を播種するときに細胞や培養液等が汚染されることを防ぐことができる。

第27発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24または25発明において、前記培養槽内に、培養する細胞が付着される培養器具を備えていることを特徴とする。

第27発明によれば、組織や臓器を構成している細胞であっても、培養器具に付着させれば、培養槽内で培養することができる。このため、従来の培養装置では不可能

であった組織や臓器を構成している接着細胞であっても大量に培養をすることができる。

第28発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、3次元構造を有することを特徴とする。

- 5 第28発明によれば、培養器具の表面に細胞を培養させれば、種々の細胞から3次元組織を構築することができるので、再生医療に必要な3次元の組織や臓器を大量に供給することが可能となる。また、培養器具の形状に沿って細胞を培養させることができるから、培養器具を所望の形状に成形しておけば、所望の形状の組織や臓器を形成することができる。

- 10 第29発明の培養装置は、第28発明において、前記培養器具が、複数本の円管を連結して形成されたことを特徴とする。

- 第29発明によれば、培養器具が円管であるから、培養器具の表面積を大きくすることができるので、大量の細胞を培養することができる。しかも、円管内を培養液が流れるので、全ての細胞に新鮮な培養液を供給することができる。このため、培養される細胞の全ての細胞に栄養分や酸素を効率よく供給することができるので、培養液の循環効率が上がり、培養条件を飛躍的に亢進することが可能となる。
- 15

- 第30発明の培養装置は、第29発明において、前記培養器具が、その軸方向が前記培養槽の軸方向と平行となるように、前記培養槽内に配設されており、前記培養器具の表面に、培養する細胞の細胞を播種する播種手段を備えており、該播種手段が、前記培養槽を傾転させる傾転部と、前記培養器具に、細胞を含む液体を供給する細胞供給部と、前記培養槽内に設けられた前記培養器具に対して前記細胞供給部を挿入離脱させる移動部とからなることを特徴とする。
- 20

- 第30発明によれば、傾転部によって培養槽を傾けた状態で、移動部によって細胞供給部を培養器具内に挿入し、細胞供給部から培養器具内に培養する細胞の細胞を含む液体を垂らせば、培養器具内面に液体を流すことができるので、培養器具内面に細胞を播種することができる。また、傾転部や移動部、細胞供給部の作動を自動化することが可能となるので、培養装置による細胞の培養を自動化することができる。しかも、自動化すれば、人手による作業をなくすことができるので、培養された細胞や、培養液などがコンタミネーションされるのを防ぐことができる。
- 25

第31発明の培養装置は、第30発明において、前記培養槽を、その中心軸まわりに回転させる回転部を備えたことを特徴とする。

第31発明によれば、細胞の播種しているときに、培養槽を傾転させた状態で回転させれば、培養器具の内面全体に液体を流すことができるので、培養器具の内面全体
5 に細胞を播種することができる。

第32発明の培養装置は、第30または31発明において、前記培養器具の表面に培養された細胞の細胞を回収する細胞回収手段を備えており、該細胞回収手段が、前記培養器具に、細胞を培養器具から剥離させる液体を供給する剥離液供給部と、該剥離液供給部から供給された液体を回収する回収部とからなることを特徴とする。

第32発明によれば、剥離液供給部を培養器具内に挿入して、その状態で剥離液を供給し、回収部によって剥離液とともに回収すれば、剥離液とともに培養器具から剥離した細胞を回収することができる。また、剥離液供給部や回収部の作動を自動化することが可能となるので、培養装置による細胞の回収を自動化することができる。しかも、自動化すれば、人手による作業をなくすことができるので、培養された細胞が
15 コンタミネーションされるのを防ぐことができる。

第33発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具の素材が、チタンまたはチタン合金であることを特徴とする。

第33発明によれば、培養器具の素材が、生体親和性の高いチタンまたはチタン合金であるから、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具と細胞の間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具に付着させておくことができるから、細胞を安定した状態で培養することができる。また、長期間使用しても、培養器具が変質したり腐食したりしないので、培養器具を長期間利用す
25 ることができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

第34発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面にチタンを含有するチタン層を有することを特徴とする。

第34発明によれば、培養器具の基材の表面に、生体親和性の高いチタンやチタン合金を含有する層を形成しているので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播

種しても培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具はチタンやチタン合金を含有する層に完全に覆われており、しかも、このチタン等の層は、細胞の培養の経過とともに、細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしない。よって、培養器具を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

第35発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具の素材が、細胞由来高分子材料であることを特徴とする。

第35発明によれば、培養器具の素材が、細胞由来高分子材料であるから、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具と細胞の間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具に付着させておくことができるから、細胞を安定した状態で培養することができる。また、培養器具全体が細胞由来高分子材料で形成されており、この細胞由来高分子材料は生体に吸収されるから、培養器具のまま移植することができるので、移植を確実かつ簡単に行うことができる。

第36発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面に細胞由来高分子材料の層を有することを特徴とする。

第36発明によれば、培養器具の基材の表面に、細胞由来高分子材料の層が形成されているので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具は細胞由来高分子材料の層に完全に覆われており、しかも、この細胞由来高分子材料の層は細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしないから、培養器具を、長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

第37発明の培養装置は、第35または36発明において、前記細胞由来高分子材料が、コラーゲンまたは細胞吸収性ポリマーであることを特徴とする。

第37発明によれば、コラーゲンや細胞吸収性ポリマーは、細胞との細胞親和性が非常に高いので、接着細胞の培養環境をさらに改善することができる。そして、培養器具と細胞の親和性がさらに高まるので、大量の細胞を効率よく、低コストで培養することが可能となる。

第38発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具の素材が、カルシウム化合物であることを特徴とする。

第38発明によれば、培養器具の素材が、カルシウム化合物であるから、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具全体がカルシウム化合物で形成されており、このカルシウム化合物は生体に吸収されるから、培養器具のまま移植することができるので、移植を確実かつ簡単に行うことができる。

第39発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面にカルシウム化合物の層を有することを特徴とする。

第39発明によれば、培養器具の基材の表面に、カルシウム化合物の層が形成されているので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具はカルシウム化合物の層に完全に覆われており、しかも、このカルシウム化合物の層は細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしない。よって、培養器具を、長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

第40発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具の素材が、合成生分解性ポリマーであることを特徴とする。

第40発明によれば、培養器具の素材が、合成生分解性ポリマーであるから、培養

器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具全体が合成生分解性ポリマーで形成されており、この合成生分解性ポリマーは生体に吸収されるから、培養器具のまま移植することができるので、移植を確実かつ簡単に行うことができる。

第41発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面に合成生分解性ポリマーの層を有することを特徴とする。

第41発明によれば、培養器具の基材の表面に、合成生分解性ポリマーの層が形成されているので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具は合成生分解性ポリマーの層に完全に覆われており、しかも、この合成生分解性ポリマーの層は細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしない。よって、培養器具を、長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

第42発明の培養装置は、第40または41発明において、前記合成生分解性ポリマーが、ポリL乳酸またはポリグリコール酸であることを特徴とする。

第42発明によれば、ポリL乳酸やポリグリコール酸は、細胞との細胞親和性が非常に高いので、接着細胞の培養環境をさらに改善することができる。そして、培養器具と細胞の親和性がさらに高まるので、大量の細胞を効率よく、低コストで培養することが可能となる。

第43発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面に組織誘導能を有する組織誘導材料の層を有することを特徴とする。

第43発明によれば、培養器具の表面に組織誘導材料の層を有しているので、培養器具と細胞との細胞親和性が高く、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても、培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、接着細胞の培養環境を改善するとともに、再生医療のために、生体に直接利用することができ、細胞を培養するコス

トを低下させることができる。しかも、組織誘導材料の影響により細胞の増殖が促進されるだけでなく、未分化間葉系細胞の種々の組織への分化誘導が可能となる。

第44発明の培養装置は、第43発明において、前記組織誘導材料が、細胞外マトリックスであることを特徴とする。

- 5 第44発明によれば、組織液等材料が細胞外マトリックスであり、培養器具と細胞との細胞親和性が非常に高いので、接着細胞の培養環境をさらに改善することができる。そして、培養器具と細胞の親和性をさらに高まるので、大量の細胞を効率よく、低コストで培養することが可能となる。しかも、細胞外マトリックスの影響により細胞の増殖が促進されるだけでなく、未分化間葉系細胞の種々の組織への分化誘導が可能となる。よって、細胞の分化状態を維持したまま培養が可能だけでなく、再生医療に必要な細胞を容易に供給することができる。

第45発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具の素材が、珪素含有素材であることを特徴とする。

- 15 第45発明によれば、珪素は石灰化能を有しており細胞との細胞親和性が非常に高いので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具と細胞の間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具に付着させておくことができるから、細胞を安定した状態で培養することができる。また、長期間使用しても、培養器具が変質したり腐食したりしないので、培養器具を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。さらに、珪素含有素材は珪素を含んでいるため、温度が高くなると遠赤外線を放出するから、細胞の分化や増殖を促進効果も得られる。

- 25 第46発明の培養装置は、第27発明において、前記培養器具が、その表面に珪素含有素材の層を有することを特徴とする。

第46発明によれば、珪素は石灰化能を有しており細胞との細胞親和性が非常に高いので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具は珪素含有素材の層に完全に覆われており、しかも、こ

の珪素含有素材の層は、細胞の培養の経過とともに、細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしない。よって、培養器具を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。さらに、珪素含有素材は珪素を含んでいるため、温度が高くなると遠赤外線を放出するから、細胞の分化や増殖を促進効果も得られる。

第４７発明の培養装置は、第４５または４６発明において、前記珪素含有素材が、ゼオライトであることを特徴とする。

第４７発明によれば、ゼオライトは細胞との細胞親和性が非常に高いので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。そして、ゼオライトは珪素を含んでいるため、温度が高くなると遠赤外線を放出するから、細胞の分化や増殖を促進効果も得られる。

第４８発明の培養装置は、第２７発明において、前記培養器具の素材が、人工セラミックスであることを特徴とする。

第４８発明によれば、人工セラミックスは細胞との細胞親和性が非常に高いので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具と細胞の間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具に付着させておくことができるから、細胞を安定した状態で培養することができる。また、長期間使用しても、培養器具が変質したり腐食したりしないので、培養器具を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。さらに、人工セラミックスは温度が高くなると遠赤外線を放出するから、細胞の分化や増殖を促進効果も得られる。

第４９発明の培養装置は、第２７発明において、前記培養器具が、その表面に人工セラミックスの層を有することを特徴とする。

第４９発明によれば、人工セラミックスは細胞との細胞親和性が非常に高いので、培養器具の表面に、直接、培養する細胞を播種しても培養器具によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができ

る。また、培養器具は人工セラミックスの層に完全に覆われており、しかも、この人工セラミックスの層は、細胞の培養の経過とともに、細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので、細胞を安定した状態で培養することができる。さらに、長期間使用しても培養器具が変質したり腐食したりしない。よって、培養器具を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。さらに、人工セラミックスは温度が高くなると遠赤外線を放出するから、細胞の分化や増殖を促進効果も得られる。

第50発明の培養装置は、第27、33、34、35、36、38、39、40、41、43、45、46、48または49発明において、前記培養器具が、多孔質体であることを特徴とする。

第50発明によれば、培養器具が多孔質であるから、培養器具の表面に付着している細胞において、その表面の部分の細胞だけでなく、培養器具に付着している部分の細胞にも新鮮な培養液を供給することができる。このため、培養される細胞の全ての細胞に栄養分や酸素を効率よく供給することができるので、培養液の循環効率が上がり、培養条件を飛躍的に亢進することが可能となる。

第51発明の培養装置は、第27、33、34、35、36、38、39、40、41、43、45、46、48または49発明において、前記培養器具が、網目構造を有することを特徴とする。

第51発明によれば、培養器具が網目構造を有しているので、培養器具の表面に付着している細胞において、その表面の部分の細胞だけでなく、培養器具に付着している部分の細胞にも新鮮な培養液を供給することができる。このため、培養される細胞の全ての細胞に栄養分や酸素を効率よく供給することができるので、培養液の循環効率が上がり、培養条件を飛躍的に亢進することが可能となる。

第52発明の培養装置は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25または27発明において、前記培養液に浮遊細胞を浸漬させて培養することを特徴とする。

第52発明によれば、浮遊細胞を大量に培養することができるから、浮遊細胞の培養過程で産生される様々な有効成分を回収することができる。よって、この回収した成分から、医薬品や抗体、ワクチン等を製造することができる。

第53発明の培養装置は、第52発明において、前記浮遊細胞が、造血幹細胞を含むことを特徴とする。

第53発明によれば、造血幹細胞を含んでいれば、赤芽球、骨髓芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球に分化した後血液細胞である赤血球、有核白血球である好中球、
5 好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球を産生することができる。したがって、輸血用製剤として使用することができる混合液を製造することができる。

第54発明の培養装置は、第52または53発明において、前記浮遊細胞が、血液細胞の芽細胞を含むことを特徴とする。

第54発明によれば、赤芽球、骨髓芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球等を含ん
10 でいれば、直接血液細胞である赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球を産生することができる。したがって、輸血用製剤として使用することができる混合液を製造することができる。

第55発明の培養装置は、第27、52、53または54発明において、前記培養器具に付着された細胞と、培養液中に浮遊する浮遊細胞を混合培養することを特徴
15 とする。

第55発明によれば、培養槽内に設けられた培養器具で接着細胞を培養しながら、培養液中では浮遊する細胞を培養する、いわゆる混合培養を行うことができる。このため、接着細胞から、浮遊細胞を活性化したり分化を促進したりする因子が産生、分泌されるので、浮遊細胞の培養を促進することができる。また、浮遊細胞が生理活性
20 因子を産生するので、この生理活性因子の働きで接着細胞の活性や分化を促進することができる。したがって、浮遊細胞や接着細胞のみを培養した場合に比べて、各細胞の培養を促進することができるので、各細胞を効率よく培養することができる。

第56発明の培養装置は、第55発明において、前記培養器具に付着された細胞が、骨髓間質細胞であり、培養液中に浮遊する細胞が、造血幹細胞を含むことを特徴
25 とする。

第56発明によれば、培養器具によって骨髓間質幹細胞を培養しながら、培養液中で造血幹細胞を混合培養すれば、骨髓間質幹細胞から造血幹細胞を活性化したり、分化を促進する因子が産生、分泌されるため、造血幹細胞から赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球の産生が促進される。また、

造血幹細胞が産生する生理活性因子の働きで骨髄間質幹細胞から骨芽細胞、軟骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞やその他の細胞への分化が促進される。このため、造血幹細胞や骨髄間質幹細胞を単独で培養するよりも、より早く効率的にしかも活性の高い血液細胞である赤血球等を産生することができ、効率的良く骨芽細胞等を分化誘導することができる。

第57発明の培養装置は、第55または56発明において、前記培養器具に付着された細胞が、骨髄間質細胞であり、前記浮遊細胞が、血液細胞の芽細胞を含むことを特徴とする。

第57発明によれば、培養器具によって骨髄間質幹細胞を培養しながら、培養液中で、赤芽球や骨髄芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球等の血液芽細胞を含んだ骨髄組織を混合培養すれば、骨髄間質幹細胞から赤芽球等を活性化したり、分化を促進する因子が産生、分泌されるため、骨髄組織から赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球の産生が促進される。また、赤芽球等が産生する生理活性因子の働きで間質幹細胞から骨芽細胞、軟骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞やその他の細胞の分化が促進される。このため、骨髄組織や骨髄間質幹細胞を単独で培養するよりも、より早く効率的にしかも活性の高い血液細胞である赤血球等を産生することができ、効率的良く骨芽細胞等を分化誘導することができる。

第58発明の血液製剤は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25または27発明の培養装置によって造血幹細胞を培養したときに、前記培養液中に生成される血液成分を含むことを特徴とする。

第58発明によれば、少量の造血幹細胞から大量の血液成分を製造することができるから、所望の成分を含む血液製剤を、大量かつ容易に製造することができる。しかも、輸血や血液製剤が必要とされる人から造血幹細胞を摂取し、その造血幹細胞を培養して輸血用血液や血液製剤を製造することができるから、安全な輸血用血液等を製造することができる。

第59発明の人工組織は、第1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25または27発明の培養装置において、前記培養器具に播種した細胞を培養して形成されたことを特徴とする。

第59発明によれば、少量の細胞から所望の組織を製造することができるから、再

生医療などに必要とされる臓器などを、安価かつ大量に製造することができる。しかも、移植が必要とされる人から所望の組織の細胞を摂取し、その細胞を培養して臓器を製造することができるから、生体との適合性を高くすることができ、拒絶反応が起こることも防ぐことができる。

- 5 第60発明の人工組織は、第59発明において、前記細胞が、未分化な細胞であることを特徴とする。

第60発明によれば、培養条件を調整すれば、所望の細胞に分化させることができるから、再生医療などに必要とされる臓器などを、安価かつ大量に製造することができる。しかも、移植が必要とされる人から摂取した細胞を使用すれば、生体との適合性を高くすることができ、拒絶反応が起こることも防ぐことができる。

10

図面の簡単な説明

図1は、本実施形態の培養装置1の概略ブロック図である。

図2は、本実施形態の培養装置1に設置した培養槽2の概略説明図である。

- 15 図3は、培養液調整手段20の詳細説明図である。

図4は、他の実施形態のガス濃度調整手段22の概略説明図である。

図5は、抽出手段80を備えた培養装置1の概略ブロック図である。

図6は、細胞供給手段90を備えた培養装置1の概略ブロック図である。

図7は、面状発熱体71の概略説明図である。

- 20 図8は、細胞播種手段60の概略正面縦断面図である。

図9は、細胞播種手段60の概略側面縦断面図である。

図10は、細胞播種手段60が傾転した状態の概略説明図である。

図11は、他の実施形態の細胞播種手段60の概略正面縦断面図である。

図12は、他の実施形態の細胞播種手段60の概略側面縦断面図である。

- 25 図13は、他の実施形態の細胞播種手段60が傾転した状態の概略説明図である。

図14は、(A)黒体粉末の各成分重量割合を示したグラフであり、(B)黒体粉末をFT-IR分析した結果を示すグラフである。

図15は、(A)黒体粉末の各成分重量割合を示したグラフであり、(B)黒体粉末をFT-IR分析した結果を示すグラフである。

図16は、(A)天然セラミックスの各成分重量割合を示したグラフであり、(B)天然セラミックスをFT-IR分析した結果を示すグラフである。

図17は、ゼオライトをFT-IR分析した結果を示すグラフである。

- 図18は、(A)人工特殊セラミックスの各成分重量割合を示したグラフであり、(B)人工特殊セラミックスをFT-IR分析した結果を示すグラフである。

図19は、(A)本発明の培養装置およびフラスコを使用して大腸菌を培養したときにおいて、培養液の濁度を比較した図であり、(B)本発明の培養装置およびディッシュを使用して酵母を培養したときにおいて、培養液中の総酵母量を比較した図である。

- 図20は、本発明の培養装置およびディッシュを使用してハイブリドーマ細胞を培養したときにおいて、(A)培養液中の細胞数を比較した図であり、(B)抗体産生量を比較した図である。

- 図21は、本発明の培養装置およびディッシュを使用して造血幹細胞を培養したときにおいて、(A)培養液トータル量あたりの血小板数を比較した図であり、(B)造血幹細胞数あたりの血小板数を比較した図である。

発明を実施するための最良の形態

つぎに、本発明の実施形態を図面に基づき説明する。

- 本発明の培養装置は、細胞を培養するための装置であって、培養液を収容するための培養槽と、培養液を外部循環させる循環手段と、培養液が外部循環する経路に設けられた培養液調整手段を備えたものであり、培養液を外部循環させることおよび外部循環している間に培養液調整手段によって培養液の状態を調整するようにしたことが特徴である。

- 図1は本実施形態の培養装置1の概略説明図である。同図において、符号2は、本実施形態の培養装置1の培養槽を示している。この培養槽2は、例えばガラスやステンレス製の容器であり、培養液を収容するための本体部2aと、本体部2aの内部を密閉することができる蓋部2bとから構成されており、蓋部2bを本体部2aに取り付けると培養槽2内を外部から気密に密封することができるように構成されている。

なお、培養槽2の素材は上記のものに限られず、長期間使用しても腐食せず、また

、培養液を変質させない素材であれば特に限定はない。

図1および図2に示すように、前記培養槽2の蓋2bには、この蓋2bを貫通する循環手段10の配管11の一端部が気密に取り付けられており、この配管11の他端はポンプ11pの吸入口に接続されている。一方、ポンプ11pの吐出口には、配管12の一端が取り付けられており、この配管12の他端部は、蓋2bに気密に取り付けられている。そして、配管11の一端、および配管12の他端はいずれも培養槽2内の培養液に浸漬されている。このため、ポンプ11pを作動させれば、培養槽2内の培養液を、配管11、12を通して培養槽2の外部を循環させることができる。

また、図1に示すように、配管12には、配管12内を流れる培養液の状態を調整する培養液調整手段20が介装されている。この培養液調整手段20は、培養液に含まれる老廃物等を除去する透析部21と、培養液のガス濃度を調整するガス濃度調整手段22と、培養液に細胞の培養に必要な栄養分を供給する栄養分補給部23を備えている。

このため、ポンプ11pを作動させて培養槽2内の培養液を外部循環させて、培養液を培養液調整手段20に供給することができる。すると、培養槽2内において細胞を培養しながら培養液を外部循環させれば、培養液が培養液調整手段20を通過するときに、細胞が排出した老廃物は透析部21によって培養液から除去され、培養液中の酸素濃度や窒素、二酸化炭素等の濃度はガス濃度調整手段22によって調整され、細胞が消費した栄養分は栄養分補給部23によって培養液に補給されるから、培養液を外部循環させることによって、培養液を、細胞の培養を開始する前の状態、言い換えれば細胞の培養に適した状態に調整して培養槽2内に戻すことができる。

よって、本実施形態の培養装置1によれば、培養槽2内の培養液の状態を、細胞の培養に最適な条件に保つことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。そして、長期間連続して培養することができるから、細胞を大量に培養することが可能である。

そして、図1に示すように、配管11の一端を培養槽2の上部に配置し、配管12の他端を培養槽2の下部に配置すれば、培養液を外部循環させるだけで、培養槽2内には、底部から上部に向かう流れを生じさせることができる。また、培養槽2の本体部2aの底部に、軸方向の両端部に金属が取り付けられた回転子4を配置し、培養槽

2の外部における回転子4の直下に主軸に磁石5bが取り付けられたモータ5を設けておけば、モータ5を駆動すれば、磁石5bが回転し、その磁石5bの磁力によって培養槽2内の回転子4を回転させることができるので、培養槽2内の培養液に水平面内で旋回する流れを発生させることができる。すると、培養液を外部循環させながら回転子4を回転させれば、2つの流れの作用によって、外部循環して培養槽2内に戻された培養液と、培養槽2内に保持されている培養液との混合を促進することができるから、培養槽2内の培養液の状態を均一に近づけることができる。しかも、培養槽2内に保持されたまま外部循環されない培養液をなくすることができるから、培養液の状態、つまり細胞の培養条件を良好に保つことができる。そして、培養液の混合に培養液を外部循環させたことによって生じる流れを利用するから、回転子4の回転数を低くしても培養液の混合を促進することができる。すると、回転子4の回転だけで培養槽2内に対流を発生させて混合する場合に比べて、培養槽2内の培養液の流速を低くできるから、非常に外圧に弱い細胞であっても、培養槽2内の培養液の状態を均一に保ったまま培養することができる。

15 なお、回転子4は設けなくてもよいが、回転子4を設けておけば、培養液の均一化を迅速かつ効率よく行なうことができる。

また、図1および図2に示すように、浮遊細胞や細菌等のように、培養液とともに流動する細胞を培養する場合には、配管11における培養槽2内の一端に、流出防止手段として電磁石6を設けると好適である。通常、浮遊細胞や細菌は帯電しているため、電磁石6と反発するので、浮遊細胞等が電磁石を設けた位置を通過することを防ぐことができる。

すると、培養液を外部循環させながら浮遊細胞や細菌等を培養した場合であっても、浮遊細胞等を培養槽2内に滞留させておくことができ、死亡した細胞が流出して配管11, 12内で閉塞することも防ぐことができる。

25 しかも、電磁石6は配管11の外周面に取り付ければよいので、培養液の流れが阻害されることもない。そして、電磁石6はフィルタのように物理的接触によって流出を防ぐものではない。つまり培養している細胞と接触しないから、細胞膜の非常に弱い、赤血球やマクロファージ、血しょう板等の細胞でも培養槽2からの流出を防ぎ、かつ損傷することなく培養することができる。

なお、培養する浮遊細胞が外圧に強いものであれば、流出防止手段としてフィルタや膜等のように、物理的な接触によって浮遊細胞等の流出を防ぐものを使用してもよい。

つぎに、培養液調整手段 20 について詳細に説明する。

- 5 図 1 および図 3 に示すように、前記配管 12 には、培養液調整手段 20 の透析部 21 が介装されている。この透析部 21 は、中空な本体ケース 21a と、この本体ケース 21a 内に配置された中空糸 21b とから構成されている。

本体ケース 21a は、その内部が配管 12 と連通されており、その内面と前記中空糸 21b との間の培養液循環通路 21h を培養液が流れるように構成されている。

- 10 中空糸 21b は、例えば、ポリプロピレンやセルロースジアステート、シリコンゴム等の半透性という機能を有する素材によって形成されたものであり、その内部には、重炭酸緩衝液、磷酸緩衝液等の透析液が通されている。

- このため、培養液が培養液循環通路 21h を通過するときに、培養液が中空糸 21b を介して透析され、培養液に含まれるアンモニア、窒素化合物等の老廃物が透析液に
15 移動するから、培養液を浄化することができる。よって、培養液の劣化を防ぐことができ、常に、細胞の培養に適した状態に保つことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

- しかも、透析部 21 が培養槽 2 の外に設けられている、つまり、培養槽 2 外で培養液を透析しているから、透析部 21 の大きさや透析部 21 に使用する素材などを、
20 培養槽 2 の大きさや培養液の性質等に係わらず、自由に選択することができる。よって、所望の透析能力を有する透析部 21 を採用することができるから、確実に培養液を所望の条件まで透析して浄化することができる。そして、透析部 21 として、その透析能力が培養槽 2 の大きさに比べて十分に高いものを使用すれば、細胞数の増加量に合わせて透析能力を高くすることができるから、大量の細胞を連続して培養すること
25 も十分に可能である。

また、中空糸 21b の内部に透析液を流し、培養液を培養液循環通路 21h に通しているから、培養液が透析部 21 を流れるときの流動抵抗を少なくすることができ、培養液をスムーズに外部循環させることができる。そして、透析部 21 を流れるときの流動抵抗が小さいから、循環する培養液中に細胞が含まれていても、透析部 21 を通過

するときに細胞が受ける抵抗を小さくすることができ、透析部 2 1 を通過するとき、損傷を受ける細胞を少なくすることができる。

さらに、透析部 2 1 が広い中空糸間空間を備えていれば、培養する細胞等が中空糸 21b に詰まって透析能力が低下することも防ぐことができる。

- 5 なお、培養液を中空糸 21b 内に通し、透析液を培養液循環通路 21h に通してもよいが、本願のごとき構成とすれば、中空糸 21b 内に通す場合に比べて、培養液の流動抵抗が少なくなるので、透析効率を高くすることができ、また、循環する培養液に細胞が含まれている場合に、細胞の損傷を少なくすることができる。そして、中空糸 21b の内径を大きくしておけば、培養する細胞等が中空糸 21b に詰まって透析能力が低下することも防ぐことができる。
- 10

さらになお、中空糸 21b に代えて、透析膜等によって、本体ケース 21a 内を、培養液が通される経路と透析液が通される経路を分離する構成としてもよい。

- さらになお、培養液を浄化する方法は、上記のごとき透析によって消化する方法に限られず、アンモニア吸着カラムやアフィニティカラム、分子ふるい等の方法を用いてもよい。
- 15

- 図 1 および図 3 に示すように、前記配管 1 2 において、前記透析部 2 1 の下流側には、ガス濃度調整手段 2 2 が介装されている。このガス濃度調整手段 2 0 は、中空なケース 22a を備えており、このケース 22a の内部が配管 1 2 と連通されている。そして、ケース 22a の上部から供給された培養液が、ケース 22a の下部から排出されるように構成されている。そして、ケース 22a の上部には、他端がガス供給手段 G に接続された配管 2 6 の一端が配置されている。このガス調整手段 G は、所望のガス濃度、例えば CO_2 が 5 %、空気が 9 5 % となるように調整された飽和ガスをケース 22a 内に供給するものである。
- 20

- なお、飽和ガスのガス濃度は、上記の濃度に限られず、酸素濃度を高くしてもよく、培養する細胞の状態に最適なガス濃度とすればよい。例えば、酸素濃度を 3 0 % としたり、窒素を 6 5 % としてもよい。
- 25

ガス供給手段 G からガス濃度調整手段 2 0 のケース 22a 内に飽和ガスを送れば、ケース 22a 内の培養液に飽和ガスを接触させることができるから、培養液中のガス濃度が飽和ガスと同等のガス濃度となるように調整することができる。よって、培養液を

所望のガス濃度に飽和させることができ、培養液のガス濃度を均一かつ細胞の培養に適した状態に保つことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

しかも、ガス濃度調整手段 2 2 が培養槽 2 の外に設けられている、つまり、培養槽
5 2 外で培養液のガス濃度を調整することができるから、ガス濃度調整手段 2 2 の大きさを、培養槽 2 の大きさに係わらず、自由に選択することができる。よって、所望のガス交換能力を有するガス濃度調整手段 2 2 を採用することができるから、確実に培養液を所望のガス濃度に調整することができる。そして、ガス濃度調整手段 2 2 として、そのガス交換能力が培養槽 2 の大きさに比べて十分に高いものを使用すれば、細胞数の増加量に合わせてガス交換能力を高くすることができるから、大量の細胞を連続して培養することも十分に可能である。

さらに、循環する培養液に細胞が含まれていない場合には、配管 2 6 の一端に多数の細孔が形成された曝気部 22b が設け、この曝気部 2 2 をケース 22a 内の培養液に浸漬させ、この曝気部 22b の多数の細孔から培養液中にガスを排出させるような構成としてもよい（図 4（A）参照）。この場合、ガス供給手段 G から曝気部 22b に飽和ガスを送れば、ケース 22a 内の培養液を曝気することができるので、培養液と飽和ガスの接触面積が大きくなるので、培養液に酸素等を溶解させる効率を高くすることができ、ガス交換効率を高くすることができる。そして、培養液には細胞が含まれていないので、曝気したときに発生する気泡が細胞を傷つけたりストレスを与えたりすることがない。

なお、ケース 22a とガス供給手段 G との間の配管 2 6 には、飽和ガスを滅菌する滅菌フィルタ 2 7 を設けておけば、飽和ガスに雑菌等が含まれていても培養液が汚染されることを防ぐことができる。

さらになお、図 4（B）に示すように、ケース 22a 内に空気透過性のチューブ 22d
25 （例えば、テフロン（デュポン社の登録商標）を素材とするチューブ）設け、このチューブ内に培養液を通し、ケース 22a 内に飽和ガスを供給するような構成とした場合には、培養液と飽和ガスが直接接触することを防ぐことができるから、培養液が汚染されることをより確実に防ぐことができる

そして、配管 1 2 に、透析部 2 1 とガス濃度調整手段 2 2 を直列に配置している、

つまり外部循環する培養液を、透析部 2 1 とガス濃度調整手段 2 2 の両方に通過させてから培養槽 2 に戻すので、培養槽 2 内の培養液の状態を、細胞の培養に適した状態に確実に保つことができる。しかも、コンパクトで一括製造できるので使い捨てのセットとして製造することが可能である。とくに、使い捨てのセットという構成を採用すれば、透析部 2 1 とガス濃度調整手段 2 2 とを直列に配置したときに生じる接続部からのコンタミネーションという問題が生じることも防ぐことができる。

図 1 および図 3 に示すように、前記配管 1 2 において、ガス濃度調整手段 2 2 の下流側には、栄養剤補給部 2 3 が介装されている。この栄養剤補給部 2 3 は、培養液が流れる培養液通過部 23a と、細胞の培養に必要なサイトカインやホルモン、ビタミン等の栄養分を含む栄養剤が流れる栄養剤通路 23b を備えており、両通路の間が、例えば例えば、ポリプロピレンやセルロースジアステート、シリコンゴム等の半透性という機能を有する素材によって形成された透析部材によって分離されている。

このため、培養液が培養液通過部 23a を通過するときに、細胞が消費して濃度が減少した栄養分が、透析部材 23c を介して栄養剤から培養液に移動するから、培養液に細胞の培養に必要な栄養分を補給することができる。よって、培養液の栄養分の枯渇を防ぐことができ、常に、細胞の培養に適した状態に保つことができるから、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができる。

しかも、栄養剤補給部 2 3 が培養槽 2 の外に設けられている、つまり、培養槽 2 外で培養液に栄養分を補給しているから、栄養剤補給部 2 3 の大きさやその能力を、培養槽 2 の大きさ等に係わらず、自由に選択することができる。よって、所望の能力を有する栄養剤補給部 2 3 を採用することができるから、培養液に含まれる栄養分の濃度を、確実に所望の濃度まで補給することができる。そして、栄養剤補給部 2 3 として、その能力が培養槽 2 の大きさに比べて十分に高いものを使用すれば、細胞数の増加量に合わせて培養液に供給する栄養分の量を調整することができるから、大量の細胞を連続して培養することも十分に可能である。

また、培養液通過部 23a と栄養剤通過部 23b が透析部材 23c によって分離されているから、栄養剤に含まれる栄養分のうち、培養液中の濃度が低下した成分だけを培養液に供給することができる。よって、必要以上の栄養分が培養液に供給されることによって生じる細胞障害を防ぐことができる。

なお、栄養剤補給部 23 の構成を、透析部 21 と実質同様の構成とし、中空糸の内部に栄養剤を流してもよい。

5 なお、培養液調整手段 20 に、培養液中の所望の成分を回収する、例えば透析器やアフィニティカラム、分子ふるい等の回収手段 28 を設けておけば、培養液が外部循環している間に、培養液中の有効成分である蛋白質や培養される細胞が産生する成分を回収することができるので、有効成分等、所望の成分を高効率かつ確実に回収することができるし、培養を停止することなく、所望の成分のみを回収することができる。

10 また、長期間培養すると、たとえ透析部 21 によって浄化したり、栄養剤補給部 23 によって栄養分の補給しても、培養液は劣化してしまうが、以下のごとき構成を有する培養液供給部 30 と培養液排出部 40 とを備えた培養液交換手段を設けておけば、細胞の培養を継続しながら培養液を、新鮮な培養液に交換することができる。

15 図 1 に示すように、配管 12 には、連通弁 31 を介して、培養液供給部 30 の配管 33 の一端が取り付けられている。この配管 33 の他端には、図示しない培養液貯蔵部に連通されている。この配管 31 には、培養液貯蔵部と連通弁 31 の間には、培養液貯蔵部から供給された培養液を 35℃ 近傍まで温める加熱器 34、ポンプ 35、滅菌フィルター 32 が介装されており、培養液貯蔵部からその順で取り付けられている。

20 一方、培養槽 2 の蓋 2b には、培養液排出部 40 の配管 41 が気密に取り付けられており、その一端が培養槽 2 内の培養液に浸漬されている。この配管 41 の他端部にはポンプ 42 が介装されており、このポンプ 42 と培養槽 2 との間には、滅菌フィルター 43 が介装されている。

25 このため、連通弁 31 によって培養液供給手段 30 と配管 12 を連通させて、ポンプ 35 によって培養液貯蔵部から加熱器 34、滅菌フィルタ 32 を通して、新鮮な培養液を配管 12 に供給し、同時に培養液排出器 40 によって使用中の培養液を培養槽 2 から排出させれば、培養槽 2 内における培養を中断しなくても、培養液の交換を行うことができる。よって、培養を継続したままで培養液を交換できるから、長期間の培養が必要である接着細胞や造血細胞であっても培養することができる。しかも、培養液排出部 40 と培養液供給部 30 を同期して作動させるだけで、使用中の培養液と新しい培養液の交換を自動的に行うことができる。よって、培養液の交換に人手が不

要となり、培養液や培養中の細胞がコンタミネーションされる危険性を減らすことができる。

しかも、各配管 3 3, 4 1 には、いずれも滅菌フィルター 3 2, 4 3 が設けられているから、交換作業中に培養液が雑菌に汚染されることをより確実に防ぐことができる。

そして、浮遊細胞を培養する場合には、電磁石 6 を配管 4 1 の一端部に設けておけば、培養槽 2 内の培養液を排出するときに、その培養液とともに浮遊細胞等が培養槽 2 から流出することを防ぐことができるから、浮遊細胞であっても培養を中止することなく、培養液を交換することができる。

10 なお、培養液供給部 3 0 だけ、または培養液排出部 4 0 だけを作動させれば、培養槽 2 内の培養液の量を調整することも可能である。

細胞を長期間培養する場合には、定期的に培養液を抽出して、細胞や培養液の状態を調べる必要があるが、以下の構成を有する抽出手段 5 0 を設ければ、培養液が汚染されることなく、また、培養液を無駄にすることなく抽出することができる。

15 図 5 に示すように、培養槽 2 の蓋 2 b には、抽出経路 8 1 の一端部が気密に取り付けられており、その一端は培養槽 2 内の培養液に浸漬されている。この抽出経路 8 1 の他端部は、培養槽 2 の外部に配置されており、その他端部はシリンダ等の滅菌処理された抽出液受け容器 8 2 内に配置されている。

この抽出経路 8 1 には、ポンプ 8 3 が介装されており、このポンプ 8 3 と抽出経路 20 8 1 の他端部との間には、図示しないガス供給部から滅菌フィルター 5 4 を介して無菌気体が供給されるように構成されている。そして、この無菌気体は、常に、抽出経路 8 1 に供給されている。介装されている。

このため、ポンプ 8 3 を作動させれば、培養槽 2 内の培養液を抽出経路 8 1 を通して抽出液受け容器 8 2 内に排出させることができるから、この培養液を調べれば、細胞 25 の培養状態を確認することができる。

しかも、抽出経路 8 1 には、常に無菌気体が供給されており、その無菌気体は抽出経路 8 1 の他端から抽出液受け容器 8 2 内に供給され、常に、抽出液受け容器 8 2 内を満たしている。すると、外気が抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内に侵入することができないので、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内への雑菌の侵入を防ぐこと

ができる。よって、抽出された培養液が抽出経路 8 1 を通過するとき、および抽出液受け容器 8 2 内に入ったときに雑菌等に汚染されることを防ぐことができる。

さらに、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 が確実に無菌状態に保たれているら、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内に排出された培養液も雑菌に汚染されること
5 はない。すると、必要以上の培養液が抽出された場合に、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内に残った培養液を培養槽 2 内に戻すことができ、培養液を有効活用することができる。そして、培養液を戻すときに、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内の気体も培養槽 2 内に入る可能性があるが、抽出経路 8 1 や抽出液受け容器 8 2 内は無菌気体によって満たされているから、雑菌が気体とともに侵入することもない。

10 とくに、連続して培養しながら培養液を回収する場合には、回収された培養液が汚染される心配がないので、その培養液を、安全に利用することができる。

また、図 6 に示すように、培養槽 2 内の培養液に培養する細胞を供給することができる細胞供給手段 9 0 を設ければ、細胞の培養を完全に自動化できるので、好適である。

15 図 1 において、符号 9 1 は培養する細胞を含有する播種液が収容された貯蔵部を示している。この貯蔵部 9 1 には、細胞搬送経路 9 2 の一端が取り付けられており、その一端は貯蔵部 9 1 内の播種液に浸漬されている。この細胞搬送経路 9 2 の他端部は、前記培養槽 2 の蓋 2 b に気密に取り付けられており、その一端は培養槽 2 内に配置されている。この細胞搬送経路 9 2 の他端には、公知のノズルなどの排出部 9 3 が設
20 けられている。そして、細胞搬送経路 9 2 には、貯蔵部 9 1 内の播種液を排出部 9 3 に向けて搬送するポンプ 9 4 が介装されている。

このため、ポンプ 9 4 を作動させれば、播種液を培養槽 2 に搬送することができ、排出部 9 3 から培養槽 2 内に排出させて、播種液に含まれる細胞を培養液 2 に供給することができる。よって、細胞の供給を自動化することができるから、細胞の培養を
25 完全に自動化することが可能となる。

そして、ポンプ 9 4 と排出部 9 3 との間の細胞搬送経路 9 2 に、両者の間を連通遮断する、例えばピンチバルブ等のバルブ 9 5 を設けておけば、バルブ 9 5 を閉めた状態でポンプ 9 4 を作動させれば播種液搬送経路 2 内の播種液の圧力が高くなることができる。そして、播種液の圧力が高くなった状態でバルブ 9 5 を開けば、播種液を

- 培養槽 2 内に勢いよく射出させることができる。すると、培養槽 2 内に細胞を培養する足場となる細胞培養器具などを設けておけば、細胞培養器具の表面に播種液、つまり細胞を播種させることができる。よって、浮遊細胞だけでなく、接着細胞であっても自動的、言い換えれば培養槽 2 を開閉することなく播種することができるから、細胞を播種するときに細胞や培養液等が汚染されることを防ぐことができる。

さらに、本実施形態の培養装置 1 は、インキュベータや保温器などのような培養装置 1 の周囲の環境を一定に保つことができる設備の内部で使用することもできるが、培養槽 2 に、以下のごとき温度制御手段 7 0 を設ければ、培養装置 1 を所望の場所で使用することができる。

- 図 1 に示すように、前記培養槽 2 の外面には、温度制御手段 7 0 の面状発熱体 7 1 が設けられている。この面状発熱体 7 1 は、面状発熱体 7 1 に供給する電力を調整する制御部 7 8 に接続されている。この制御部 7 8 は、培養槽 2 内の培養液の温度に応じて、面状発熱体 7 1 に供給する電力を調整し面状発熱体 7 1 の温度を調整するものである。

- 図 7 に示すように、面状発熱体 7 1 は、通電されると発熱し、かつ培養槽 2 の内部に向けて遠赤外線を放出する放射部 7 3 を備えている。つまり、面状発熱体 7 1 は、放射部 7 3 が発生した熱だけでなく、発熱したときに放出する遠赤外線によって培養液を加熱することができるのである。

- しかも、面状発熱体 7 1 から放射された遠赤外線は、培養槽 2 内の培養液中を伝播し、この遠赤外線の有するエネルギーの一部は細胞に直接供給されることとなる。

このため、培養する細胞を、培養液からの熱伝達だけでなく、遠赤外線によっても加温することができるから、遠赤外線が培養に照射されてさえいれば、たとえ培養する細胞の周囲の培養液の温度が変化したとしても、細胞自体の温度変化を抑えることができる。

- また、培養槽 2 内の培養液が所定の温度まで上昇すれば、面状発熱体 7 1 から遠赤外線の形態で放出されるエネルギーのうち、培養液に吸収されるエネルギーが減少する。すると、面状発熱体 7 1 から遠赤外線として放出されるエネルギーは、その大部分が培養する細胞に供給され、細胞自体の加温に使用されることとなる。そして、遠赤外線の有するエネルギーは面状発熱体 7 1 の温度に依存するから、遠赤外線によって加温さ

れる細胞の温度を、面状発熱体 7 1 とほぼ同じ温度まで加温することができる。

また、面状発熱体 7 1 の表面から放射される遠赤外線のエネ

ルギー密度のピークが、7～12 μm の波長帯に形成されるように調整されている。この 7～12 μm の波長は、生育光線と呼ばれる波長帯であり、植物などの成長に有効であるが、動物、特にヒトの細胞、例えば肝細胞や皮膚細胞、骨芽細胞、免疫細胞等の増殖する能力を有する細胞や、造血幹細胞や間質幹細胞等、自己増殖しかつ複数の高度な細胞に分化することができる幹細胞の培養において、培養する細胞に生育光線を照射すれば、遠赤外線

を照射しない場合に比べて、細胞の増殖や分化を促進される。この細胞の増殖や分化が促進する原因としては、増殖や分化に影響する遺伝子や増殖因子や分化誘導因子を活性化させることや、逆に、増殖や分化を抑制する遺伝子や抑制因子の働きを抑えること、遠赤外線が直接増殖因子や分化誘導因子として機能することが考えられる。細胞が未分化で、各種組織の細胞に分化可能な細胞、例えば、骨髓、末梢血、臍帯血、組織由来の幹細胞や胚性幹細胞等の未分化な細胞を遠赤外線を照射した状態で培養すれば、非常に感受性が高く未分化な細胞自体の増殖を促進できる

ことはもちろん、その未分化な細胞から所望の細胞への分化も促進させることができるから、少しの未分化な細胞から、所望の分化した細胞を容易かつ大量に培養することができる。また、肝細胞や骨芽細胞等、既に各組織に分化しているが増殖可能な細胞を、遠赤外線を照射した状態で培養すれば、長期間作用させると増殖を活性化させることができる。

つまり、本実施形態の培養装置 1 の培養槽 2 に、上記のごとき温度制御手段 7 0 を設けておけば、温度制御手段 7 0 を設けない場合に比べて細胞の増殖及び分化促進効率を向上させることができるのである。

なお、配管 1 1 , 1 2 や培養液調整手段 2 0 を断熱材によって覆っておけば、培養液が外部循環している間にその温度が変化することを防ぐことができる。

さらになお、透析部 2 1 やガス濃度調整手段 2 2 、栄養剤補給部 2 3 にも温度制御手段 7 0 を設けておけば、培養液の温度変化をより確実に防ぐことができる。

また、面状発熱体 7 1 に使用する放射体 7 5 として、カーボンブラックやカーボングラファイト、セラミックスパウダー、アルミナ、ジルコン等の金属粉等遠赤外線を放射する素材と、ポリエチレングリコール等を基材とした半導体等の有する正温度係

数 (P.T.C:PositiveTemperature Coefficient) 機能、いわゆる自己温度制御機能を有する素材を含むものを使用すれば、特別な制御機構やセンサを採用しなくても、P T C素材や放射素材の温度が所定の温度近傍に確実に維持することができる。この場合、放射体 7 5 から放射される遠赤外線波長の分布を所定の状態に保つことができる。よって、面状発熱体 7 1 の温度変化による遠赤外線の状態が変化、つまり細胞に放射される遠赤外線の状態を一定に保つことができるから、細胞の温度変化を防ぐことができ、安定した状態で細胞を培養することができる。

なお、遠赤外線放射部は、上記のごとき面状発熱体 7 1 でなくてもよく、所定の波長の遠赤外線を細胞に照射できるものであれば、特に限定はない。

10 培養開始前、および培養が終了したのち、培養装置 1 内に雑菌が繁殖することを防ぐために、培養液の流れる経路や、その他の部分を滅菌する必要があるが、培養槽の容積が 10 L よりも小さい場合には、培養装置 1 を、培養槽 2、循環手段、培養液調整手段 20 を全て連結した状態においてオートクレーブ装置内に収容できる大きさに構成すれば、装置を分解することなくオートクレーブ装置内に入れて滅菌すること
15 ができるので、培養装置 1 の滅菌作業が容易になる。

しかも、連結した装置を分解しなくてもよいから、培養作業を開始する前にオートクレーブ装置によって殺菌し、そのままの状態で使用すれば、培養液や細胞が雑菌に汚染される確率を非常に低くすることができる。

そして、培養槽 2 が 20 L 以上の場合には、配管 11 と加圧蒸気を発生することができる図示しない加圧蒸気供給手段を連通させることができるように設けておけば、加圧蒸気滅菌手段によって閉ループ回路内に加圧蒸気を供給すれば、各手段を分解することなく、各手段を滅菌することができる。すると、培養装置 1 が大型化しても、容易かつ迅速に装置全体を滅菌することができるから、培養槽 2 等がコンタミネーションされる危険性を低くすることができる。また、加圧蒸気滅菌手段を作動させるだけで培養装置を滅菌することができるので、培養装置 1 の滅菌を自動化でき、培養装置 1 の運転を完全に自動化することができる。

また、図 8 および図 9 に示すように、本実施形態の培養装置 1 において、細胞を付着させることができ、かつ増殖するための足場となる培養器具 50 を備えた培養槽 2 を使用すれば、細菌や浮遊細胞等のように短期間かつ培養液に浮遊させた状態で培養

できる細胞だけでなく、骨芽細胞や皮膚繊維芽細胞等のように、培養に数週間から1ヶ月程度の期間を必要とし、かつ増殖するための足場が必要な接着細胞の培養に好適である。

図8および図9において、符号50が、培養槽2内に設けられた培養器具を示している。この培養器具50は、純チタンまたはチタン合金を素材とする複数本の円管を、互いに連結して形成されたものであり、支持部材51によって培養槽2内に保持されている。

このため、培養する細胞を培養器具50の表面に付着させた状態で培養槽2内に配置して培養液に浸漬させれば、組織や臓器を構成している接着細胞であっても培養することができる。しかも、本実施形態の培養装置1であれば、長期間連続して培養することが可能であるから、従来の培養装置では不可能であった組織や臓器を構成している接着細胞を、大量かつ所望の大きさになるまで培養することができる。

また、培養器具50が円管を連結して形成されおり、培養器具50の表面積、つまり細胞が足場とすることができる部分を広くすることができるから、大量の細胞を培養することができる。しかも、円管内に培養液を流すことができるから、全ての細胞に新鮮な培養液を供給することができる。このため、培養される細胞の全ての細胞に栄養分や酸素を効率よく供給することができるので、培養液の循環効率が上がり、培養条件を飛躍的に充進することが可能となる。

なお、培養器具50は上記の構造に限られず、様々な形状のものを使用することができる。例えば、上下方向を貫通する貫通孔を有するハニカム構造や多孔質構造の培養器具50を使用すれば、上下方向の培養液の流れがスムーズになり、培養される細胞の全ての細胞に栄養分や酸素を効率よく供給することができる。また、所望の3次元的な構造、例えば各種臓器の形状に形成された培養器具50を使用すれば、培養器具50の形状に沿って細胞が増殖し、所望の形状の3次元組織を構築することができるので、再生医療に必要な3次元の組織や臓器を大量に供給することが可能となる。

さらになお、培養器具50の形状として、膜状の部材を使用してもよく、その場合には膜状の組織を形成することも可能である。とくに、網目構造を有する膜状の部材、いわゆるメッシュを使用すれば、培養器具50を通して細胞に新鮮な培養液を供給できるから、培養器具50の表面に付着している細胞において、その表面の部分の細

胞だけでなく、培養器具 50 に付着している部分の細胞にも新鮮な培養液を供給することができる。

また、培養器具 50 の円管の素材として、純チタンやチタン合金を使用している。純チタンやチタン合金は細胞親和性が高いので、培養器具 50 の表面に、直接、培養
5 する細胞を播種しても、細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具 50 と細胞との間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具 50 に付着させておくことができるから、長期間、細胞を安定した状態で培養することができる。また、純チタンやチタン合金は化学的
10 な安定性が非常に高く長期間使用しても変質したり腐食したりしないので、培養器具 50 の腐食変質等によって細胞が損傷することを防ぐことができる。そして、何回でも同じ培養器具 50 を利用することができるから、細胞を培養するコストを低下させることも可能である。

なお、培養器具 50 の全体がチタンやチタン合金で形成されていなくてもよく、基
15 材の表面にチタンやチタン合金を含有する層を形成したものを使用しても良い。この場合も、培養器具 50 によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。また、培養器具 50 はチタンやチタン合金を含有する層に完全に覆われており、しかも、このチタン等の層は細胞外マトリックスによって完全に覆われる。このため、基材が全く細胞と接触しないので
20 、長期間使用しても、培養器具 50 が変質したり腐食したりしないので、培養器具 50 を長期間利用することができ、細胞を培養するコストを低下させることができる。

さらになお、培養器具 50 の素材は、コラーゲンや細胞吸収性ポリマー、キチン等の細胞由来高分子材料や、ハイドロキシアパタイトなどのリン酸カルシウム系化合物、ポリ L 乳酸やポリグリコール酸等の合成生分解性ポリマー等、細胞親和性の高い素
25 材であれば、どのような素材を使用しても良い。

そして、培養器具 50 の基材が、珪素化合物、ガラス、磁性体、セラミックス、その他細胞親和性を有しない素材であっても、その表面に、細胞由来高分子材料やリン酸カルシウム系化合物、合成生分解性ポリマー、細胞外マトリックスなどの組織誘導能を有する組織誘導材料の層を形成すれば、培養器具 50 の細胞親和性を高くするこ

とができる。

そして、培養器具 50 として、その器具自体の素材が細胞由来高分子材料であったり、器具の表面に細胞由来高分子材料の層を有するものを使用した場合には、培養器具 50 と細胞との細胞親和性がさらに高くなり、培養器具 50 によって細胞が汚染されたり、損傷したりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具 50 と細胞の間には細胞外マトリックスが形成され、さらに石灰化層が形成される。このため、培養する細胞を確実に培養器具 50 に付着させておくことができるから、細胞を安定した状態で培養することができる。

しかも、培養器具 50 全体が細胞由来高分子材料で形成されていれば、この細胞由来高分子材料は生体に吸収されるから、再生医療のために、生体に培養器具 50 をそのまましようにできる、つまり培養器具 50 のまま移植することができるので、移植を確実にかつ簡単に行うことができる。

とくに、細胞由来高分子材料がコラーゲンであれば、細胞との細胞親和性が非常に高いので、接着細胞の培養環境をさらに改善することができる。そして、培養器具 50 と細胞の親和性がさらに高まるので、大量の細胞を効率よく、低コストで培養することが可能となる。

また、培養器具 50 として、その器具自体の素材がリン酸カルシウム系化合物であったり、器具の表面にリン酸カルシウム系化合物の層を有するものを使用した場合には、リン酸カルシウム系化合物は細胞との細胞親和性が高いので、培養器具 50 の表面に、直接、細胞外マトリックスを形成させることができる。よって、培養器具 50 によって培養する細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具 50 全体がリン酸カルシウム系化合物で形成されていれば、このリン酸カルシウム系化合物は生体に吸収されるから、培養器具 50 のまま移植することができるので、移植を確実にかつ簡単に行うことができる。

そして、培養器具 50 として、その器具自体の素材が合成生分解性ポリマーであったり、器具の表面に合成生分解性ポリマーの層を有するものを使用した場合には、合成生分解性ポリマーは細胞親和性が高いので、培養器具 50 の表面には、直接、細胞外マトリックスを形成させることができる。よって、培養器具 50 によって培養する

細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがないので、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。しかも、培養器具 50 全体がリン酸カルシウム系化合物で形成されていれば、この合成生分解性ポリマーは生体に吸収されるから、再生医療のために、生体に培養器具 50 をそのまま使用できる、つまり培養器具 50 のまま移植することができるので、移植を確実かつ簡単に行うことができる。

とくに、合成生分解性ポリマーがポリ L 乳酸またはポリグリコール酸であれば、培養器具 50 と細胞との細胞親和性が非常に高いので、接着細胞の培養環境をさらに改善することができる。そして、培養器具 50 と細胞の親和性がさらに高まるので、大量の細胞を効率よく、低コストで培養することが可能となる。

さらに、培養器具 50 として、珪素を含有する素材、例えば、ガラスやゼオライト、図 14～図 16 に示すような組成を有する黒体粉末や天然セラミックス等によって形成されたものを使用してもよい。この場合、黒体粉末や天然セラミックス等に含まれる珪素が石灰化能を有しているため、培養器具 50 の表面には、リン酸カルシウム系化合物等によって石灰化層が形成される。すると、培養器具 50 と細胞との親和性が高くなるから、培養器具 50 によって培養する細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがない。よって、臓器等の接着細胞を長期間培養することができるし、培養する細胞を確実に培養器具 50 に付着させておくことができるから、長期間、細胞を安定した状態で培養することができる。

しかも、図 14～図 17 に示すように、黒体粉末、天然セラミックス、ゼオライト等は、約 $833 \sim 1429 \text{ cm}^{-1}$ の領域、つまり約 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ 近傍の遠赤外線領域の波長を特異的に吸収する特性を有している。言い換えれば、黒体粉末、天然セラミックス、ゼオライト等は、約 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ の遠赤外線を強く放出する性質を有しているから、培養器具 50 は温度が高くなると遠赤外線を放出する。すると、培養器具 50 の表面に付着している細胞に、培養器具 50 から遠赤外線が供給されることになるから、細胞の分化や増殖を促進する効果を得ることができる。

そして、培養器具 50 の表面に、上記のごときガラスや天然セラミックス、ゼオライトなどの粉末や黒体粉末等とシリカゲル等の接着剤とを混合したものをコーティングし、ガラスやゼオライト、黒体粉末、天然セラミックス等を含有する層、つまり珪素を含有する素材の層を形成しても、同様の効果を得ることができる。

また、培養器具 50 として、人工セラミックス、例えば、図 18 に示すような組成を有する人工セラミックス等によって形成されたものを使用してもよい。この場合も、培養器具 50 の表面には、リン酸カルシウム系化合物等によって石灰化層が形成されるから、培養器具 50 と細胞との親和性が高くなる。よって、培養器具 50 によって培養する細胞が汚染されたり、傷害を与えられたりすることがなく、臓器等の接着細胞を長期間培養することができる。そして、培養する細胞を確実に培養器具 50 に付着させておくことができるから、長期間、細胞を安定した状態で培養することができる。

しかも、図 18 に示すように、人工セラミックスは、約 $833 \sim 1429 \text{ cm}^{-1}$ の領域、つまり約 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ の遠赤外線領域の波長を特異的に吸収する特性を有している。言い換えれば、人工セラミックスは、約 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ 近傍の遠赤外線を強く放出する性質を有しているから、培養器具 50 は温度が高くなると遠赤外線を放出する。すると、培養器具 50 の表面に付着している細胞に、培養器具 50 から遠赤外線が供給されることになるから、細胞の分化や増殖を促進する効果を得ることができる。

そして、培養器具 50 の表面に、上記のごとき人工セラミックスの粉末とシリカゲル等の接着剤とを混合したものをコーティングし、人工セラミックスの層を形成しても、同様の効果を得ることができる。

さらに、培養器具 50 として、その器具の表面に組織誘導材料の層を有する場合には、細胞外マトリックス等の組織誘導材料と細胞との細胞親和性が高いから、接着細胞の培養環境を改善するとともに、再生医療のために、生体に直接利用することができる。細胞を培養するコストを低下させることができる。しかも、組織誘導材料の影響により細胞の増殖が促進されるだけでなく、未分化間葉系細胞の種々の組織への分化誘導が可能となる。よって、細胞の分化状態を維持したまま培養が可能だけでなく、再生医療に必要な細胞を容易に供給することができる。

そして、本実施形態の培養装置 1 の培養器具 50 に、所望の接着細胞を播種して培養すれば、培養槽 2 内に気泡や速度の速い対流を生じさせることがなく、培養液の状態をほぼ均一かつ細胞の培養に適した状態に保つことができ、しかも細胞を培養しながら培養液の交換が可能であるから、様々な接着細胞を非常に長期間（数週間～数ヶ月）でも培養することができる。すると、少量の接着細胞から再生医療に使

用しうる大きさの組織を製造することができるから、再生医療などに必要とされる人工臓器や人工組織を、安価かつ大量に製造することができる。しかも、移植が必要とされる人から所望の組織の細胞を摂取し、その細胞を培養して臓器を製造することができるから、生体との適合性を高くすることができ、拒絶反応が起こることも防ぐことができる。

また、培養する細胞として間質幹細胞等の未分化な細胞を使用すれば、培養条件を調整することによって所望の細胞に分化させることができるから、入手が困難な細胞から構成されている組織などを、容易に入手できる細胞から製造することができる。そして、未分化な細胞を、未分化なままで増殖させれば、どのような組織にでも適用可能な人工組織も製造することが可能である。

以下のような細胞播種手段60に培養槽2を設置しておけば、培養器具50への細胞の播種も自動化することができるため好適である。

なお、培養器具50への細胞の播種は、上述した細胞供給手段90によっても可能であるが、培養器具50として、複数本の円管をその軸方向が一致するようにかつ横断面視で各円管が放射状に並ぶように形成したものを使用する場合には、以下のような細胞播種手段60を使用すると、培養器具50に対して細胞をより確実に播種することができる。

図8および図9に示すように、培養槽2内には、培養器具50が、その中心軸が培養槽2の中心軸と一致するように取り付けられている。

同図において符号61は、細胞播種手段60のベースである。このベース61の上面には、ベース61の上面において回転可能なターンテーブル62が設けられている。このターンテーブル62は、前記培養槽2を支持するスタンドSが載せられるものである。このため、ターンテーブル62上に培養槽2を支持するスタンドSを載せておけば、培養槽2をその軸まわりに回転させることができる。

図8および図9に示すように、前記ベース61には、支持枠63が立設されており、この支持枠63には、上下方向、つまり培養槽2内に設けられた培養器具50の軸方向に移動可能に、培養槽2の半径方向に伸ばした横軸64が設けられている。この支持枠63と横軸64が特許請求の範囲にいう移動部である。

そして、この横軸64には、細胞供給部65が取り付けられている。この細胞供給

部65は、中空な部材であり、上部に培養する細胞が含まれた液体が供給される注入部65aが設けられている。一方、細胞供給部65の下部には、前記培養器具50の軸方向に沿って延びた、複数本の円筒状の播種部65bが設けられている。

この複数本の播種部65bは、全て培養器具50の中心軸と同一平面内に並んで設けられている。しかも、培養槽2の中心軸から各播種部65bまでの距離は、培養器具50の複数の円管のうち、同一面内に位置する複数の円管と培養槽2の中心軸との距離と同じ長さになるように配設されている。

また、前記ベース61には、前記培養槽2の中心軸に対して偏心した位置に、ベース61の下面から出沒可能に、傾転軸66が設けられている。

10 つぎに、細胞播種手段60によって、細胞を播種する作業を説明する。

図10は細胞播種手段60が傾転した状態の概略説明図である。まず、培養槽2内の培養液を全て排出し、その後培養槽2の蓋2aを取り外す。

ついで、横軸64を支持枠63に沿って下降させると、細胞供給部65の播種部65bが培養器具50の各円管内に挿入される。その状態で、傾転軸66をベース61の下面から突出させると、傾転軸66が設けられた部分のベース61が浮き上がり、ベース61とともに培養槽2が傾く(図10)。

そして、細胞供給部65の注入部65aから培養する細胞が含まれた液体を流し込むと、細胞供給部65内を通して播種部65bから前記液体が培養器具50内に流入する。

20 このとき、培養槽2が傾いているので、液体は培養器具50内面をつたって流れるので、培養器具50内面に細胞を播種することができる。

ついで、横軸64を支持枠63に沿って上昇させると、細胞供給部65が培養器具50から離脱する。その後、ターンテーブル62を回転させて、円管の列が播種部65bと同じ面内に位置させる。そして、再び横軸64を支持枠63に沿って下降させると、細胞供給部65の播種部65bが培養器具50の各円管内に挿入される。そして、細胞供給部65の注入部65aから培養する細胞が含まれた液体を流し込むと、播種部65bから前記液体が培養器具50内に流入し、培養器具50内面をつたって流れる。

上記作業を繰り返すと、全ての円管内面に細胞を播種することができるし、円管内

面を液体がながれているときにターンテーブル62を回転させれば、培養器具50の円管の内面全体に細胞を播種することができる。

また、培養する細胞の細胞を含む液体に代えて、細胞供給部65の注入部65bに、培養器具50から剥離させる剥離液（トリプシンEDTA）を注入し、播種部65bから培養器具50内に垂らせば、細胞を培養器具50から剥離させることができる。

そして、培養槽2の底部などに、剥離液を回収する回収部67を設けておけば、剥離液とともに培養器具50から剥離した細胞を回収することができる。

つまり、細胞播種手段60は、細胞回収手段として使用することができ、この場合、細胞供給部65が特許請求の範囲にいう剥離液供給部となるのである。

10 なお、細胞播種手段60は、図11～図13に示すような構造でもよく、培養槽2の底部に、培養器具50の下端に接近離間して、培養器具50の下端を気密に密閉したり開放したりすることができる底蓋68を設けておけば、培養器具50の内部に剥離液をためることができるので、細胞の剥離を確実にすることができるし、また、剥離液の消費量を少なくすることができる。

15 さらになお、培養槽2は、播種回収を行っている間だけでなく、細胞の培養を行っているときも、細胞播種手段60のターンテーブル62に上に設置していてもよいし、細胞の播種回収を行うときのみ細胞播種手段60上に設置するようにしてもよい。

上述したように、本実施形態の培養装置1を用いた場合、培養槽2内に気泡や速度の速い対流を生じさせることがなく、培養液の状態をほぼ均一かつ細胞の培養に適した状態に保つことができ、しかも細胞を培養しながら培養液の交換が可能であるため、様々な浮遊細胞を非常に長期間（数週間～数ヶ月）でも培養することができる。すると、浮遊細胞自体を大量に製造することができるだけでなく、浮遊細胞が増殖する過程で産生される様々な有効成分を回収することができるから、この回収した成分から、抗体やワクチン、医薬品等を製造することができる。

25 とくに、浮遊細胞が造血幹細胞を含んでいる場合、造血幹細胞は、自己増殖するだけでなく様々な血液細胞に分化して、培養液内には、血液に含まれるほとんど全ての細胞、例えば赤芽球、骨髓芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球に分化した後血液細胞である赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球等が産生される。そして、長期間培養を連続して行なえば、培養液には、大量

の血液成分が産生される。

すると、培養液を処理すれば、所望の成分を抽出することができるので、所望の成分を含む血液製剤を容易に製造することができる。しかも、本実施形態の培養装置 1
5 培養液に含まれる血液細胞等を回収しながら、連続して細胞を培養することも可能である。

そして、輸血や血液製剤が必要とされる人から造血幹細胞を摂取し、その造血幹細胞を培養して輸血用血液や血液製剤を製造することができるから、拒絶反応を起こす心配のない安全な輸血用血液等を製造することができる。

10 また、浮遊細胞が赤芽球、骨髓芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球等を含んでいれば、血液細胞である赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球を産生することができるから、輸血用製剤として使用することができる混合液を製造することができる。

また、培養 2 槽内に設けられた培養器具 50 で接着細胞を培養しながら、培養液中
15 では浮遊細胞を培養する、いわゆる混合培養を行うことも可能である。この場合、接着細胞から、浮遊細胞を活性化したり分化を促進したりする因子が産生、分泌されるので、浮遊細胞の培養を促進することができる。また、浮遊細胞が生理活性因子を産生するので、この生理活性因子の働きで接着細胞の活性や分化を促進することができる。したがって、浮遊細胞や接着細胞のみを培養した場合に比べて、各細胞の培養を
20 促進することができるので、各細胞を効率よく培養することができる。

例えば、培養器具 50 によって骨髓間質幹細胞を培養しながら、培養液中で造血幹細胞を混合培養すれば、骨髓間質幹細胞から造血幹細胞を活性化したり、分化を促進する因子が産生、分泌されるため、造血幹細胞から赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球の産生が促進される。また、造血幹細胞が産生する生理活性因子の働きで骨髓間質幹細胞から骨芽細胞、軟骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞やその他の細胞への分化が促進される。このため、造血幹細胞や骨髓間質幹細胞を単独で培養するよりも、より早く効率的にしかも活性の高い血液細胞である赤血球等を産生することができ、効率的良く骨芽細胞等を分化誘導することができる。

- また、培養器具 50 によって骨髓間質幹細胞を培養しながら、培養液中で、赤芽球や骨髓芽球、巨核芽球、単芽球、リンパ芽球等の血液芽細胞を含んだ骨髓組織を混合培養すれば、骨髓間質幹細胞から赤芽球等を活性化したり、分化を促進する因子が産生、分泌されるため、骨髓組織から赤血球、有核白血球である好中球、好酸球、好塩基球、血小板、単球やリンパ球の産生が促進される。また、赤芽球等が産生する生理活性因子の働きで間質幹細胞から骨芽細胞、軟骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞やその他の細胞の分化が促進される。このため、骨髓組織や骨髓間質幹細胞を単独で培養するよりも、より早く効率的にしかも活性の高い血液細胞である赤血球等を産生することができ、効率的良く骨芽細胞等を分化誘導することができる。
- そして、本実施形態の培養装置1は、上記のごとき構成を有しているから、混合培養したときの問題である培養液の劣化等を生じることを防ぐことができる。

【実施例】

以下に、本発明の培養装置によって細胞を培養する実施例を説明する。

- 以下の実施例において、培養槽の容積が10L以下の場合には、上述したの各手段や装置（例えば、循環手段やガス濃度調整手段等）を連結した状態でオートクレーブ内に収容しうるように構成した培養装置を使用し、121度、20分間滅菌してから培養を行なった。

- なお、オートクレーブ内に収容するときには、培養装置の上部構造であるpHメーターや溶存酸素計の電気系統部分は、非耐熱性で非耐湿性のゆえ取り外される。そして、培養液交換装置やサンプリング装置における各培養液やガスの注入あるいは排出チューブは、コンタミネーションを防ぐために、アルミ箔で覆った状態でオートクレーブ内に収容される。

- また、以下の実施例における培養液循環装置、ガス飽和装置、温度制御装置、漏出防止装置、培養液交換装置、細胞回収装置、は、それぞれ上述した循環手段10、培養液調整手段20、温度制御手段70、電磁石6、培養液供給手段、細胞回収手段に該当する。

（実施例1）

本発明の培養装置を使用して、形質転換された大腸菌を培養しサイトカインを製造する実施例を説明する。なお、この実施例では、培養槽として、その容積が1Lのも

のを使用している。

また、比較例として、フラスコ内で形質転換された大腸菌を培養しサイトカインを製造した場合と比較した。

5 なお、サイトカインの製造量の比較は、培養液の濁度を比較して行なった。濁度の比較は、バックマン吸光光度計（DUシリーズ500、Beckman, Fullerton, CA）によって行なった。

（1）まず、培養装置をオートクレイブにて滅菌したのち、培養液（乾燥ブイヨン「ニッスイ」05511、日水製薬株式会社、東京）を培養装置に供給し、その後、形質転換により特定のサイトカインを発現する大腸菌800 μ lを培養槽に注入した。（
10 濃度OD₅₅₀ = 0.032）

（2）この状態で、3時間連続で培養し、OD₅₅₀ = 0.535 まで増殖させた。

（3）図19（A）に示すように、本発明の培養装置に使用された培養液の濁度は、培養フラスコ内の培養液に比べて、培養開始後2時間で約3倍になり、培養開始後2時間では4倍以上となった。つまり、本発明の培養装置では、同じ時間であっても
15 、フラスコ培養に比べて大量かつ効率よく大腸菌が培養されていることが確認できる。

（4）そして、OD₅₅₀ = 0.535 まで増殖させたのち、IPTG終濃度0.5 mMで蛋白質発現の誘導を行い、4時間発現誘導した後、回収装置にて細菌を回収すれば、サイトカインを精製することができる。

20 （5）上記のごとく、本発明の培養装置によれば、大量かつ効率よく大腸菌が培養することができ、サイトカインを大量かつ効率よく製造することができるから、サイトカインのリコンビナント淡白質を製剤化することができ、種々のサイトカインのリコンビナント医薬品として臨床応用できる。

（実施例2）

25 本発明の培養装置を使用して、遺伝子導入した酵母を培養しサイトカインを製造する実施例を説明する。なお、この実施例では、培養槽として、その容積が1Lのものを使用している。

また、比較例として、ディッシュ内で形質転換された酵母を培養しサイトカインを製造した場合と比較した。

なお、酵母の量の比較は、培養液の濁度を比較して行なった。濁度の比較は、ベックマン吸光光度計 (DUシリーズ 500、Beckman, Fullerton, CA) によって行なった。

(1) まず、培養装置をオートクレイブにて滅菌したのち、培養液 (YPD BROTH SIGMA-ALDRICH) を培養装置に供給し、その後、形質転換により特定のサイトカインを発現する酵母 $200\ \mu\text{l}$ (濃度 $\text{OD}_{550} = 2.130$) を培養槽に注入した。

(濃度 $\text{OD}_{550} = 0.078$) (2) この状態で、2日間連続で培養し、 $\text{OD}_{550} = 1.784$ まで増殖させた。

(3) 培養開始後 24 時間経過すると、本発明の培養装置に使用された培養液の濁度は、ディッシュ培養に使用された培養液に比べて、約 22 倍となった。そして、図 19 (B) に示すように、濁度と培養容量を掛けた総酵母量を比較すると、本発明の培養装置に使用された培養液中の総酵母量は 178.383 となり、ディッシュ培養に使用された培養液中の総酵母量の約 95.5 倍となった。つまり、本発明の培養装置では、dish 培養に比べて大量かつ効率よく酵母が培養されていることが確認できる。

(4) $\text{OD}_{550} = 1.784$ まで増殖させたのち、回収装置にて細菌を回収すれば、サイトカインを精製することができる。

(5) 上記のごとく、本発明の培養装置によれば、大量かつ効率よく酵母が培養することができ、サイトカインを大量かつ効率よく製造することができるから、サイトカインのリコンビナントタンパク質を製剤化することができ、種々のサイトカインのリコンビナント医薬品として臨床応用できる。

(実施例 3)

本発明の培養装置を使用して、ハイブリドーマ細胞を培養し医薬品として利用可能な抗体を製造する実施例を説明する。なお、この実施例では、培養槽として、その容積が 100 L のものを使用している。

(1) まず、培養槽に純チタン製チューブが組み合わされた細胞担体を挿入して、加圧蒸気滅菌装置にて、培養装置の培養槽、循環装置、ガス飽和装置を滅菌した。

(2) そして、医薬品として利用可能な抗体を産生するハイブリドーマ細胞を $50,000$ 個/ml に懸濁し、細胞担体のチューブ内に細胞播種装置を用いて各 $100\ \mu\text{l}$ 注入した。

(3) 図20 (A) に示すように、ハイブリドーマ細胞を連続して培養すると、経時的に細胞数は増加していくことが確認できる。そして、図20 (B) に示すように、ハイブリドーマ細胞の増加に伴って、抗体産生量も飛躍的に増加していくことが確認できる。

- 5 (4) 培養後1週間で培養液を排出口から取り出し、限外ろ過装置に連結して濾過すれば、抗体を得ることができる。

- (5) 上記のごとく、本発明の培養装置によれば、大量かつ効率よくハイブリドーマ細胞が培養することができ、医薬品として利用可能な抗体を大量かつ効率よく製造することができるから、医薬品として利用可能な抗体を製剤化することができ、種々の抗体医薬品として臨床応用できる。

(実施例4)

本発明の培養装置を使用して、造血幹細胞を培養し、血小板を製造する実施例を説明する。なお、この実施例では、培養槽として、その容積が1Lのものを使用している。

- 15 また、比較例として、ディッシュ内で造血幹細胞を培養し血小板を製造した場合と比較した。

 なお、血小板の製造量の比較は、培養液の総量に対する血小板の数を比較した。

- (1) 培養装置をオートクレイブにて滅菌し、ウサギ大腿骨および血液を摘出し、その大腿骨から注射筒を用いて骨髓を吸い出しMEM培地に懸濁後、コラーゲンゲルと
20 混合し細胞担体のチタンメッシュにのせて滅菌した培養槽の中央に内蔵した。

 (2) 培養槽内に、満タンになるまで培養液を自動で注入し、循環装置によって環流しながら培養を行い、1週間後に細胞を含んだ培養液を回収し、フィコールを用いた密度勾配遠心法にて血小板分画をして得た。

- (3) 図21に示すように、本発明の培養装置では、ディッシュで培養する場合に比
25 べて、遙かに大量の血小板を生成することができることが確認できる。

 (4) 本発明の培養装置によれば、少量の造血幹細胞から大量の血小板を効率よく製造することができるから、本実施例により作成された血小板を製剤化することにより、外科手術や血小板減少症などの治療としての他家および自家の血小板移植を可能とすることができる。

産業上の利用可能性

本発明の培養装置によれば、細菌や浮遊細胞だけでなく、組織や臓器を形成する接
着細胞であっても長期間効率よく培養することができるため、再生医療に使用可能な
5 組織や臓器等を大量かつ効率よく製造することができる。とくに、少量の造血幹細胞
から大量の血液細胞を培養することができるから、輸血用血液製剤の製造も可能であ
る。また、細胞を大量に培養することができるから、細胞が産生する医薬品として利
用可能な抗体を大量かつ効率よく製造することができる。

10

15

20

25

請求の範囲

- 1 生体の細胞を培養するための装置であって、培養液を収容するための培養槽と、
該培養槽内の培養液を外部循環させる循環手段と、前記培養液を外部循環させている
5 間に、該培養液の状態を調整する培養液調整手段とからなることを特徴とする培養装
置。
- 2 前記培養液調整手段が、前記培養液のガス濃度を調整するガス濃度調整手段を備
えていることを特徴とする請求項1記載の培養装置。
- 3 前記培養液調整手段が、前記培養液を浄化する浄化手段を備えていることを特徴
10 とする請求項1または2記載の培養装置。
- 4 前記培養液調整手段が、前記培養液のガス濃度を調整するガス濃度調整手段と、
前記培養液を浄化する浄化手段とを備えており、該浄化手段と前記ガス濃度調整手段
が直列に配置されていることを特徴とする請求項1、2または3記載の培養装置。
- 5 前記浄化手段が、前記培養液を透析する透析部であることを特徴とする請求項3
15 または4記載の培養装置。
- 6 前記透析部が、中空な本体ケースと、該本体ケース内に配置された中空糸とから
構成されており、前記本体ケースの内面と前記中空糸の外表面との間に、前記培養液が
通される培養液循環通路が形成されており、前記中空糸の内部に、前記培養液を透析
するための透析液が通されることを特徴とする請求項5記載の培養装置。
- 20 7 前記培養液調整手段が、前記培養液に細胞の培養に必要な栄養分を供給する栄養
分補給部を備えていることを特徴とする請求項1、2、3または4記載の培養装置。
- 8 前記栄養分補給部が、前記培養液が通される培養液通過部と、細胞の培養に必要
な栄養分を含む栄養剤が通される栄養剤通路を備えており、該栄養剤通路と前記培養
液通過部との間が、透析部材によって分離されていることを特徴とする請求項7記載
25 の培養装置。
- 9 前記培養槽から培養液を抽出する抽出手段を備えており、該抽出手段が、一端が
前記培養槽内の培養液に浸漬され、他端が該培養槽外に配置された抽出経路と、該抽
出経路に設けられた、前記培養液を搬送するための搬送手段と、前記抽出経路内に、
無菌気体を供給する気体供給手段を備えており、該気体供給手段が、前記抽出経路に

において、その他端と前記搬送手段との間に無菌気体を供給することを特徴とする請求項 1、2、3、4 または 7 記載の培養装置。

10 前記培養槽が、その培養液の温度を制御する温度制御手段を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7 または 9 記載の培養装置。

5 11 前記温度制御手段が、遠赤外線を放射する遠赤外線放射部を備えていることを特徴とする請求項 10 記載の培養装置。

12 前記遠赤外線放射部が、7～12 μm の波長帯に、放射する遠赤外線のエネルギー密度のピークを有するように調整されていることを特徴とする請求項 11 記載のインキュベータ。

10 13 前記遠赤外線放射部が、面状発熱体であることを特徴とする請求項 11 または 12 記載の培養装置。

14 前記面状発熱体が、上下一対の基材と、該上下一対の基材の間に設けられた、通電されると遠赤外線を放射する放射部と、該放射部に電力を供給する電力供給手段とから構成されており、前記放射部が、前記上下一対の基材の内面に、放射体を印刷することによって形成されていることを特徴とする請求項 13 記載の培養装置。

15 15 前記放射体が、正の温度係数を有する素材であることを特徴とする請求項 14 記載の培養装置。

16 前記培養槽、前記循環手段および前記培養液調整手段を連結した状態において、オートクレーブ装置内に収容しうる大きさに形成されていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9 または 10 記載の培養装置。

20 17 前記循環手段が、前記培養槽から細胞が流出することを防ぐための流出防止手段を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10 または 16 記載の培養装置。

18 前記流出防止手段が、電磁石であることを特徴とする請求項 17 記載の培養装置。

25 19 前記培養槽内の培養液を外部に排出する培養液排出部と、前記循環手段に外部から新しい培養液を供給する培養液供給部とからなる培養液交換手段を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10、16 または 17 記載の培養装置。

- 20 前記培養液排出部が、前記培養槽から細胞が流出することを防ぐための流出防止手段を備えていることを特徴とする請求項 19 記載の培養装置。
- 21 前記流出防止手段が、電磁石であることを特徴とする請求項 20 記載の培養装置。
- 5 22 前記培養液供給部が、培養液を前記循環手段に供給する前に、培養液を滅菌する滅菌部を備えていることを特徴とする請求項 19、20 または 21 記載の培養装置。
- 23 前記培養槽、前記循環手段および前記培養液調整手段において、前記培養液が流れる経路によって閉ループ回路が形成されており、該閉ループ回路内に加圧蒸気を供給し、該閉ループ回路内部を滅菌する加圧蒸気滅菌手段を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17 または 19 記載の培養装置。
- 10 24 前記循環手段が、培養中の前記培養液を中の所望の成分を回収するための回収手段を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17、19 または 23 記載の培養装置。
- 25 前記培養する細胞を供給する細胞供給手段を備えており、該細胞供給手段が、培養する細胞を含有する播種液を前記培養槽に搬送する細胞搬送手段と、該細胞供給手段によって搬送された前記播種液を、前記培養槽内に排出する排出部とからなることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23 または 24 記載の培養装置。
- 15 26 前記細胞搬送手段が、前記播種液が収容された貯蔵部と、前記排出部との間を連通させる播種液搬送経路と、該播種液を前記貯蔵部から前記排出部に向けて送るポンプと、該ポンプと前記排出部との間に設けられ、両者の間を連通遮断するバルブとからなることを特徴とする請求項 25 記載の培養装置。
- 20 27 前記培養槽内に、培養する細胞が付着される培養器具を備えていることを特徴とする請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24 または 25 記載の培養装置。
- 25 28 前記培養器具が、3 次元構造を有することを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 29 前記培養器具が、複数本の円管を連結して形成されたことを特徴とする請求項 28 記載の培養装置。

- 30 前記培養器具が、その軸方向が前記培養槽の軸方向と平行となるように、前記培養槽内に配設されており、前記培養器具の表面に、培養する細胞の細胞を播種する播種手段を備えており、該播種手段が、前記培養槽を傾転させる傾転部と、前記培養器具に、細胞を含む液体を供給する細胞供給部と、前記培養槽内に設けられた前記
- 5 培養器具に対して前記細胞供給部を挿入離脱させる移動部とからなることを特徴とする請求項 29 記載の培養装置。
- 31 前記培養槽を、その中心軸まわりに回転させる回転部を備えたことを特徴とする請求項 30 記載の培養装置。
- 32 前記培養器具の表面に培養された細胞の細胞を回収する細胞回収手段を備えて
- 10 おり、該細胞回収手段が、前記培養器具に、細胞を培養器具から剥離させる液体を供給する剥離液供給部と、該剥離液供給部から供給された液体を回収する回収部とからなることを特徴とする請求項 30 または 31 記載の培養装置。
- 33 前記培養器具の素材が、チタンまたはチタン合金であることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 15 34 前記培養器具が、その表面にチタンを含有するチタン層を有することを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 35 前記培養器具の素材が、細胞由来高分子材料であることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 36 前記培養器具が、その表面に細胞由来高分子材料の層を有することを特徴とする
- 20 請求項 27 記載の培養装置。
- 37 前記細胞由来高分子材料が、コラーゲンまたは細胞吸収性ポリマーであることを特徴とする請求項 35 または 36 記載の培養装置。
- 38 前記培養器具の素材が、カルシウム化合物であることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 25 39 前記培養器具が、その表面にカルシウム化合物の層を有することを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 40 前記培養器具の素材が、合成生分解性ポリマーであることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 41 前記培養器具が、その表面に合成生分解性ポリマーの層を有することを特徴とす

- る請求項 27 記載の培養装置。
- 42 前記合成生分解性ポリマーが、ポリ L 乳酸またはポリグリコール酸であることを特徴とする請求項 40 または 41 記載の培養装置。
- 43 前記培養器具が、その表面に組織誘導能を有する組織誘導材料の層を有すること
- 5 を特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 44 前記組織誘導材料が、細胞外マトリックスであることを特徴とする請求項 43 記載の培養装置。
- 45 前記培養器具の素材が、珪素含有素材であることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 10 46 前記培養器具が、その表面に珪素含有素材の層を有することを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 47 前記珪素含有素材が、ゼオライトであることを特徴とする請求項 45 または 46 記載の培養装置。
- 48 前記培養器具の素材が、人工セラミックスであることを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 15 49 前記培養器具が、その表面に人工セラミックスの層を有することを特徴とする請求項 27 記載の培養装置。
- 50 前記培養器具が、多孔質体であることを特徴とする請求項 27、33、34、35、36、38、39、40、41、43、45、46、48 または 49 記載の培養
- 20 装置。
- 51 前記培養器具が、網目構造を有することを特徴とする請求項 27、33、34、35、36、38、39、40、41、43、45、46、48 または 49 記載の培養装置。
- 52 前記培養液に浮遊細胞を浸漬させて培養することを特徴とする請求項 1、2、
- 25 3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25 または 27 記載の培養装置。
- 53 前記浮遊細胞が、造血幹細胞を含むことを特徴とする請求項 52 記載の培養装置。
- 54 前記浮遊細胞が、血液細胞の芽細胞を含むことを特徴とする請求項 52 または

5 3 記載の培養装置。

55 前記培養器具に付着された細胞と、培養液中に浮遊する浮遊細胞を混合培養することを特徴とする請求項 2 7、5 2、5 3 または 5 4 記載の培養装置。

56 前記培養器具に付着された細胞が、骨髓間質細胞であり、培養液中に浮遊する
5 細胞が、造血幹細胞を含むことを特徴とする請求項 5 5 記載の培養装置。

57 前記培養器具に付着された細胞が、骨髓間質細胞であり、前記浮遊細胞が、血液細胞の芽細胞を含むことを特徴とする請求項 5 5 または 5 6 記載の培養装置。

58 請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25
10 または 2 7 記載の培養装置によって造血幹細胞を培養したときに、前記培養液中に生成される血液成分を含むことを特徴とする血液製剤。

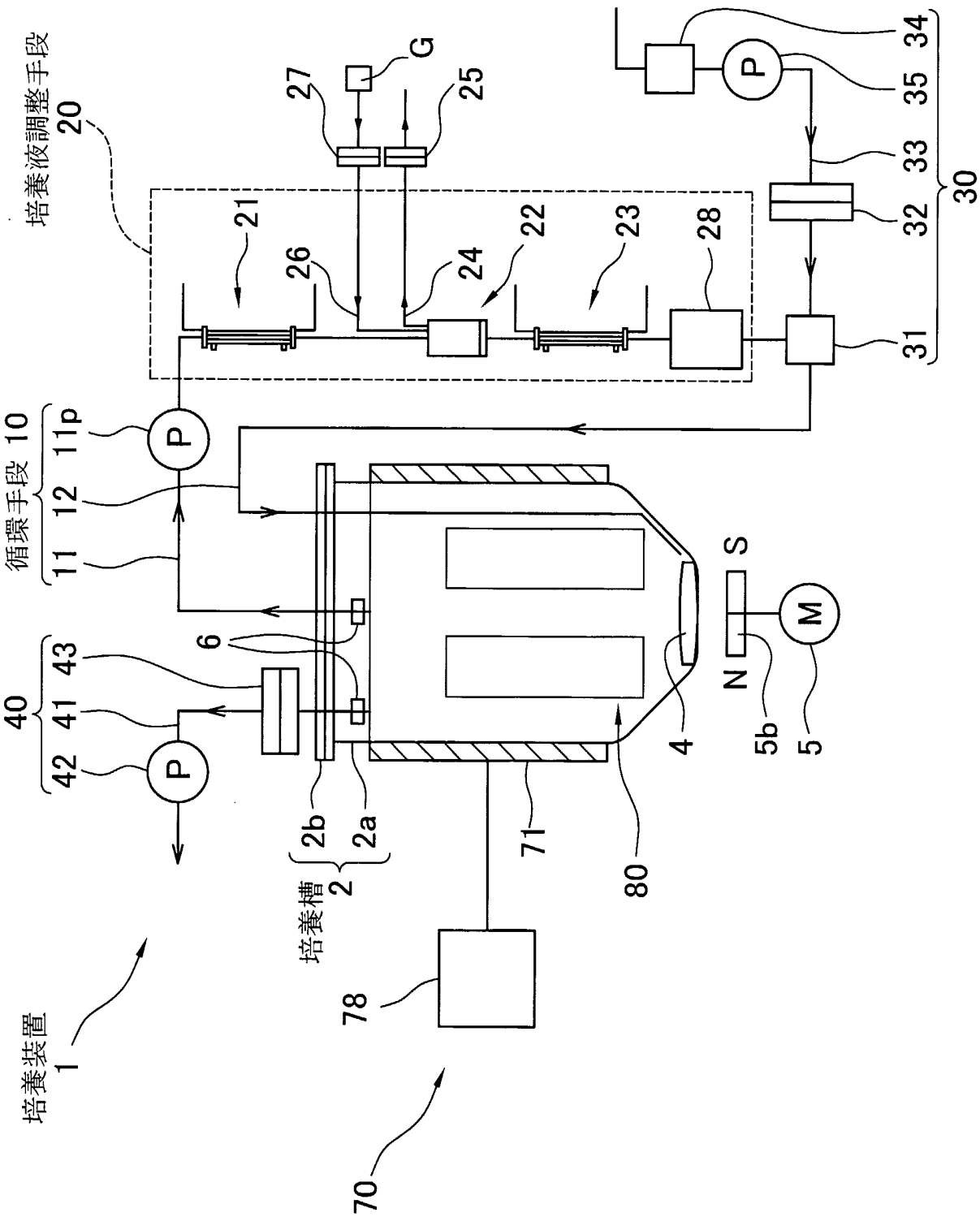
59 請求項 1、2、3、4、7、9、10、16、17、19、23、24、25
または 2 7 記載の培養装置において、前記培養器具に播種した細胞を培養して形成されたことを特徴とする人工組織。

60 前記細胞が、未分化な細胞であることを特徴とする請求項 5 9 記載の人工組織
15 。

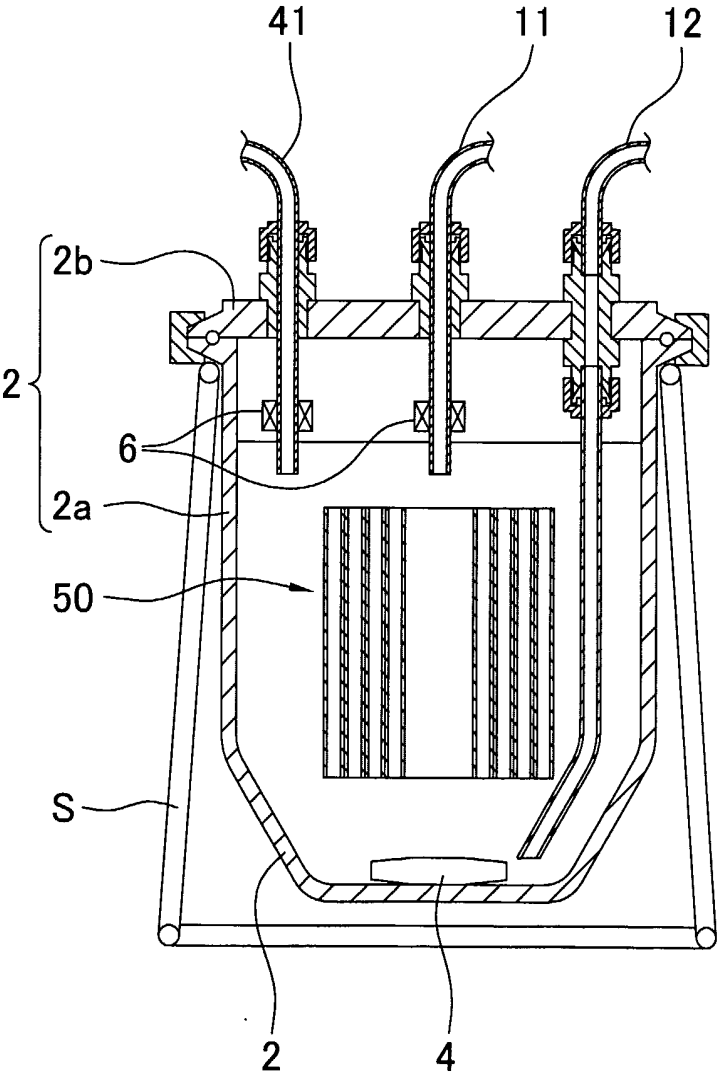
20

25

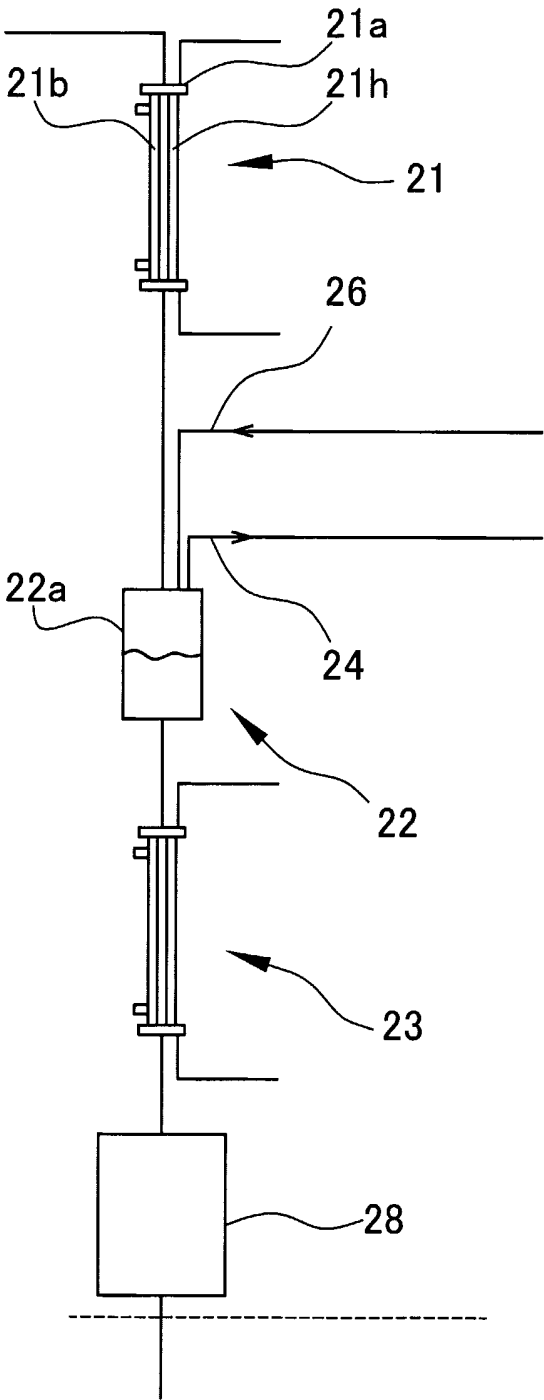
1/21
F I G . 1



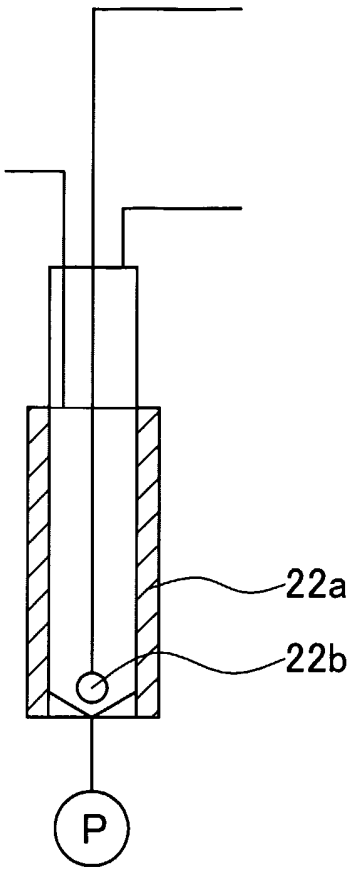
2/21
F I G . 2



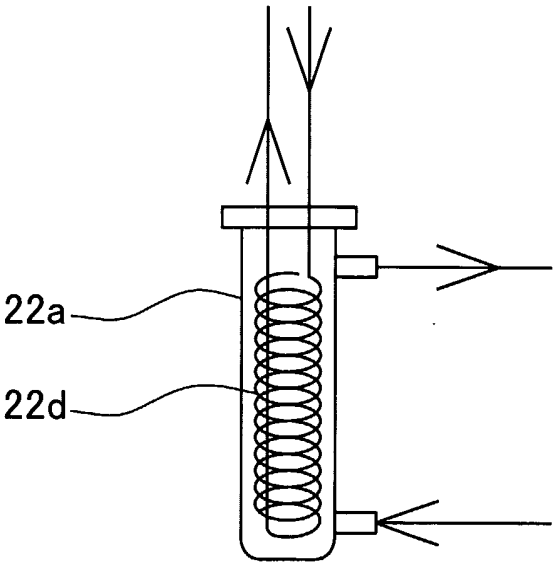
3/21
F I G . 3



4/21
F I G . 4

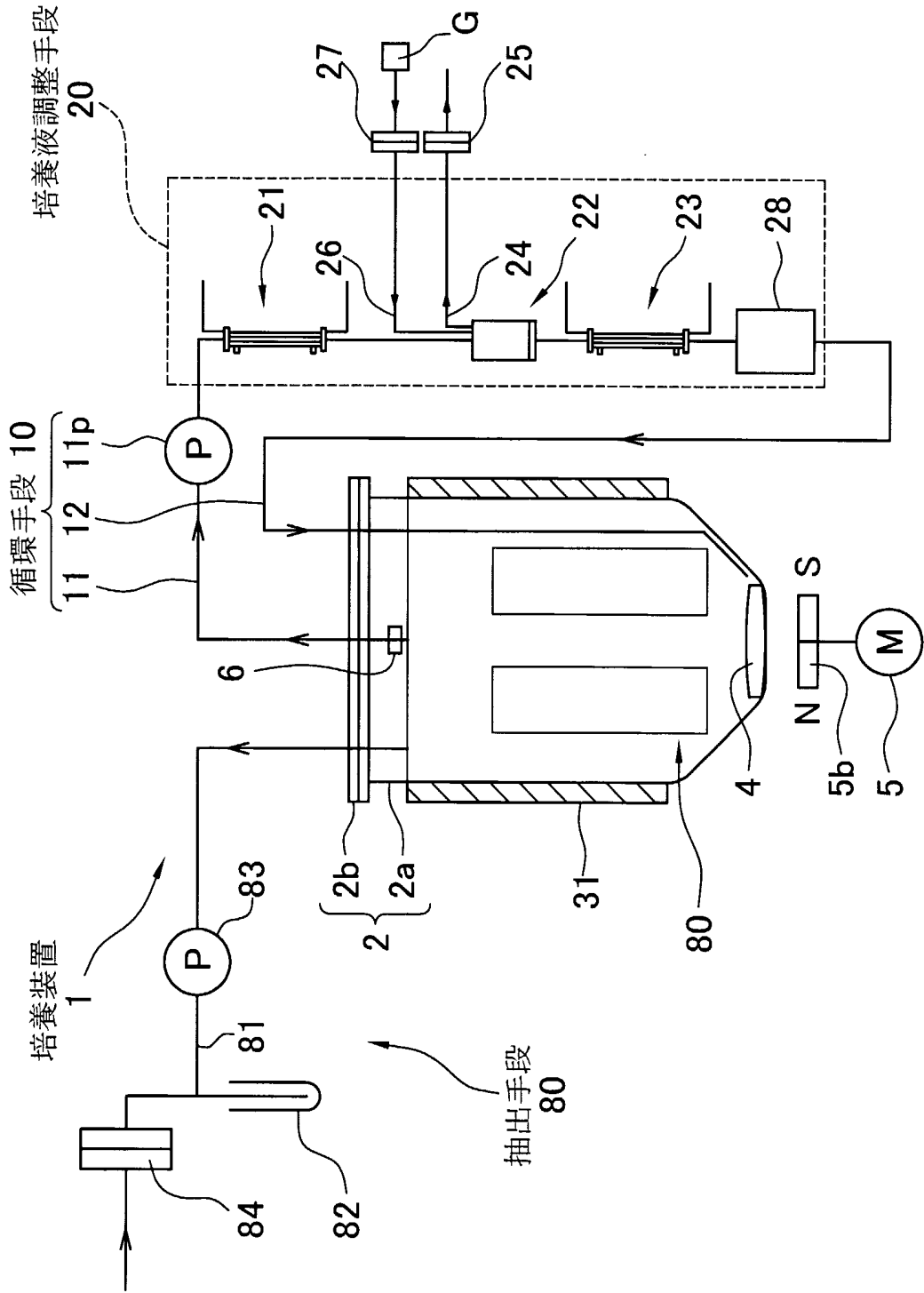


(A)

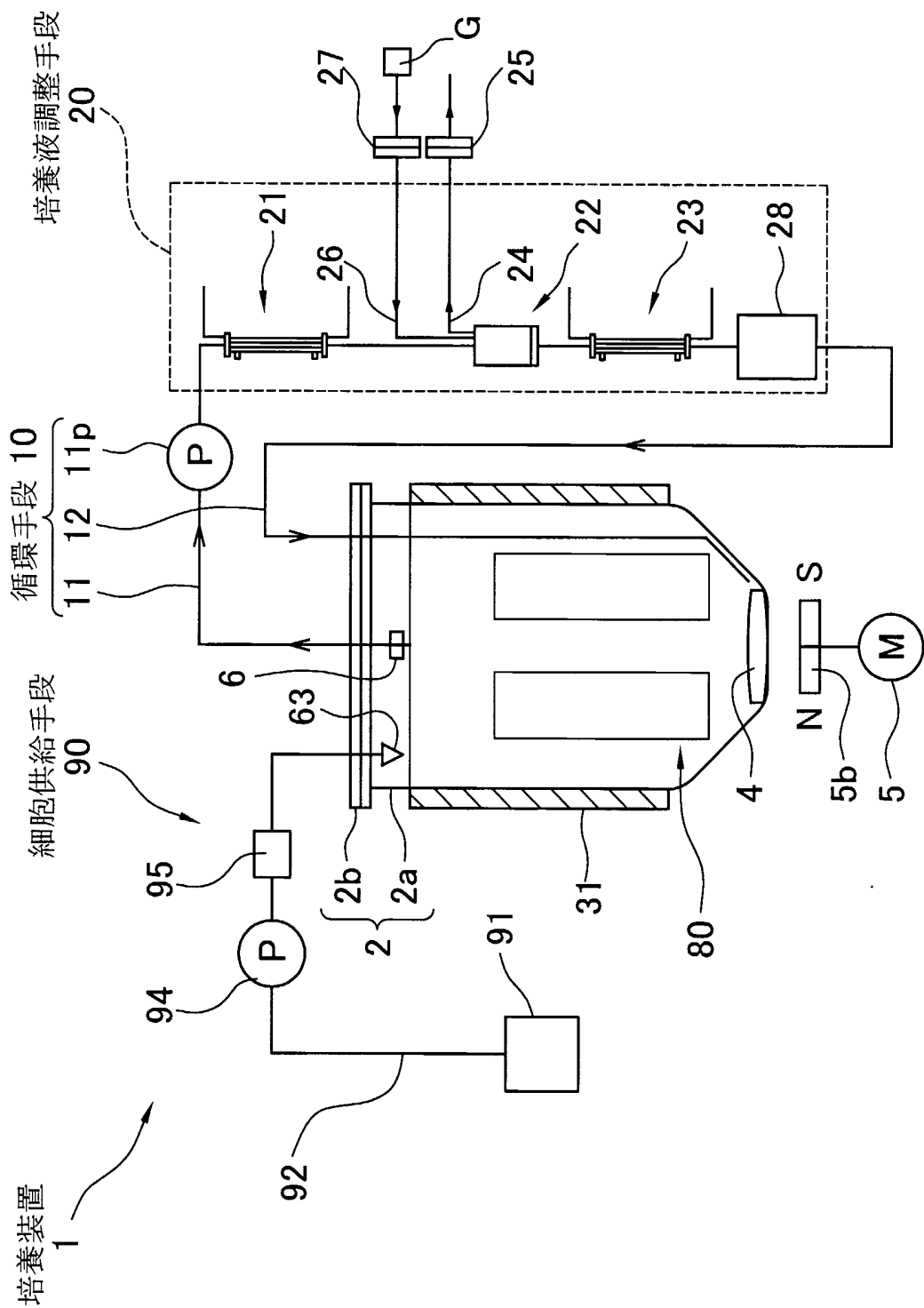


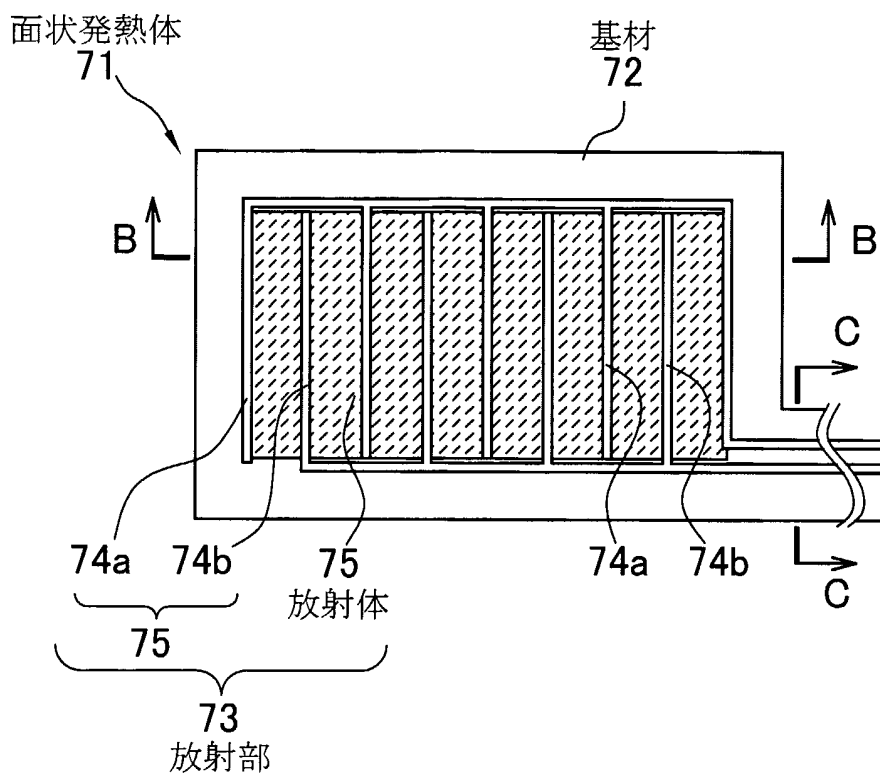
(B)

5/21
F I G . 5

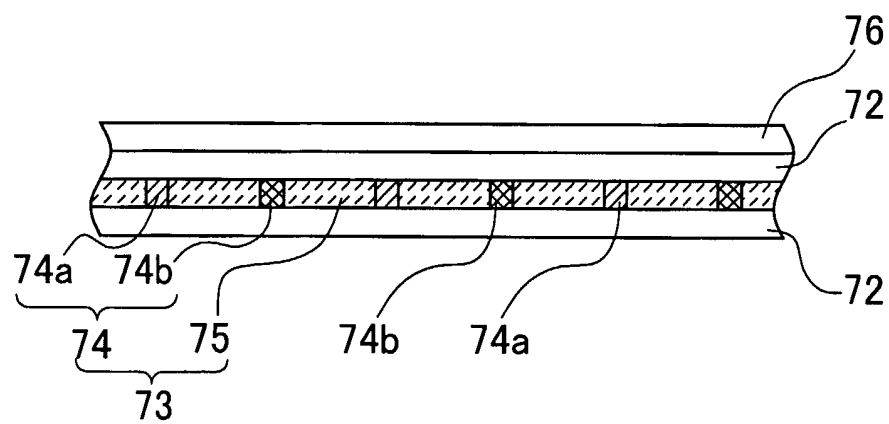


6/21
F I G . 6



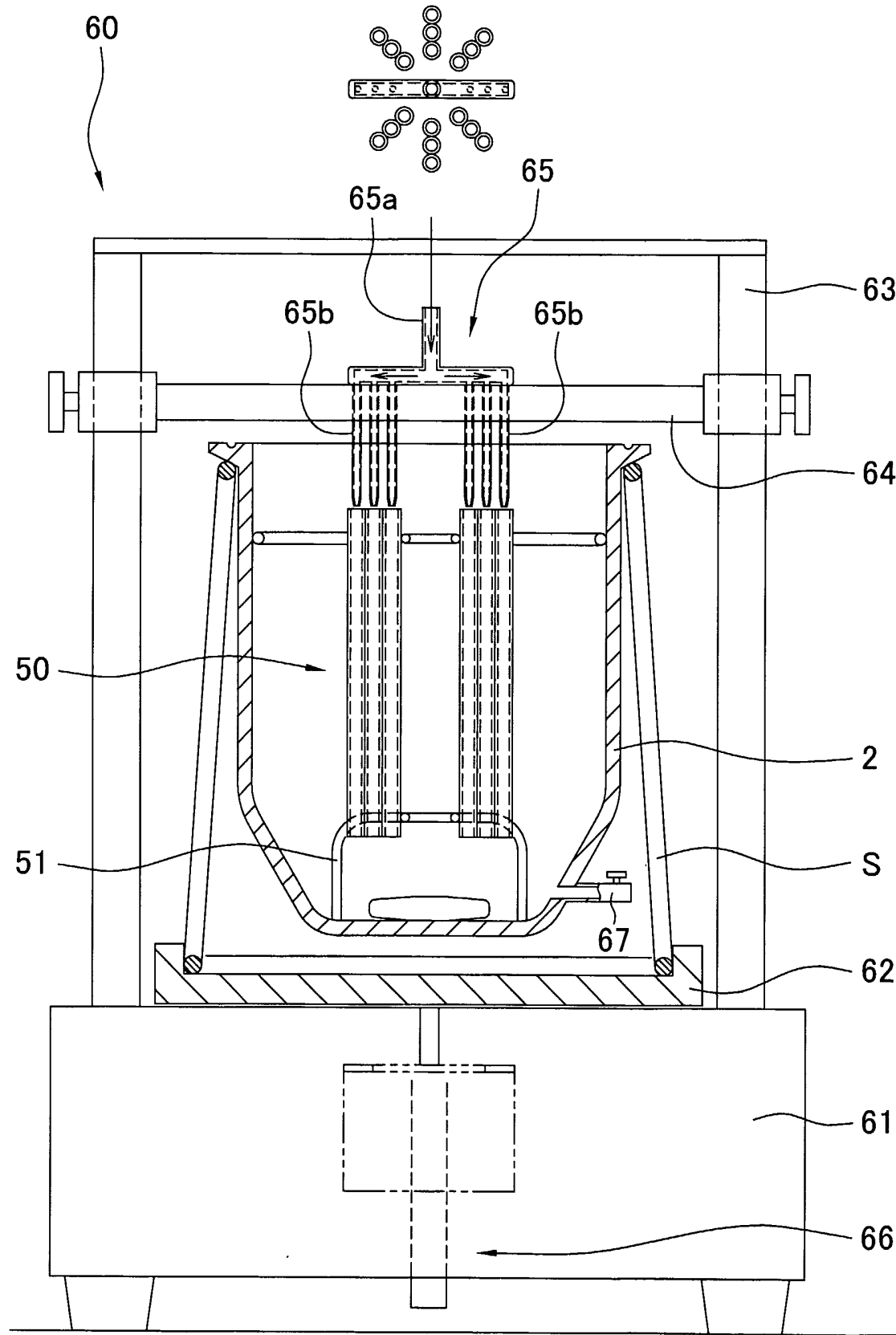
7/21
F I G . 7

(A)

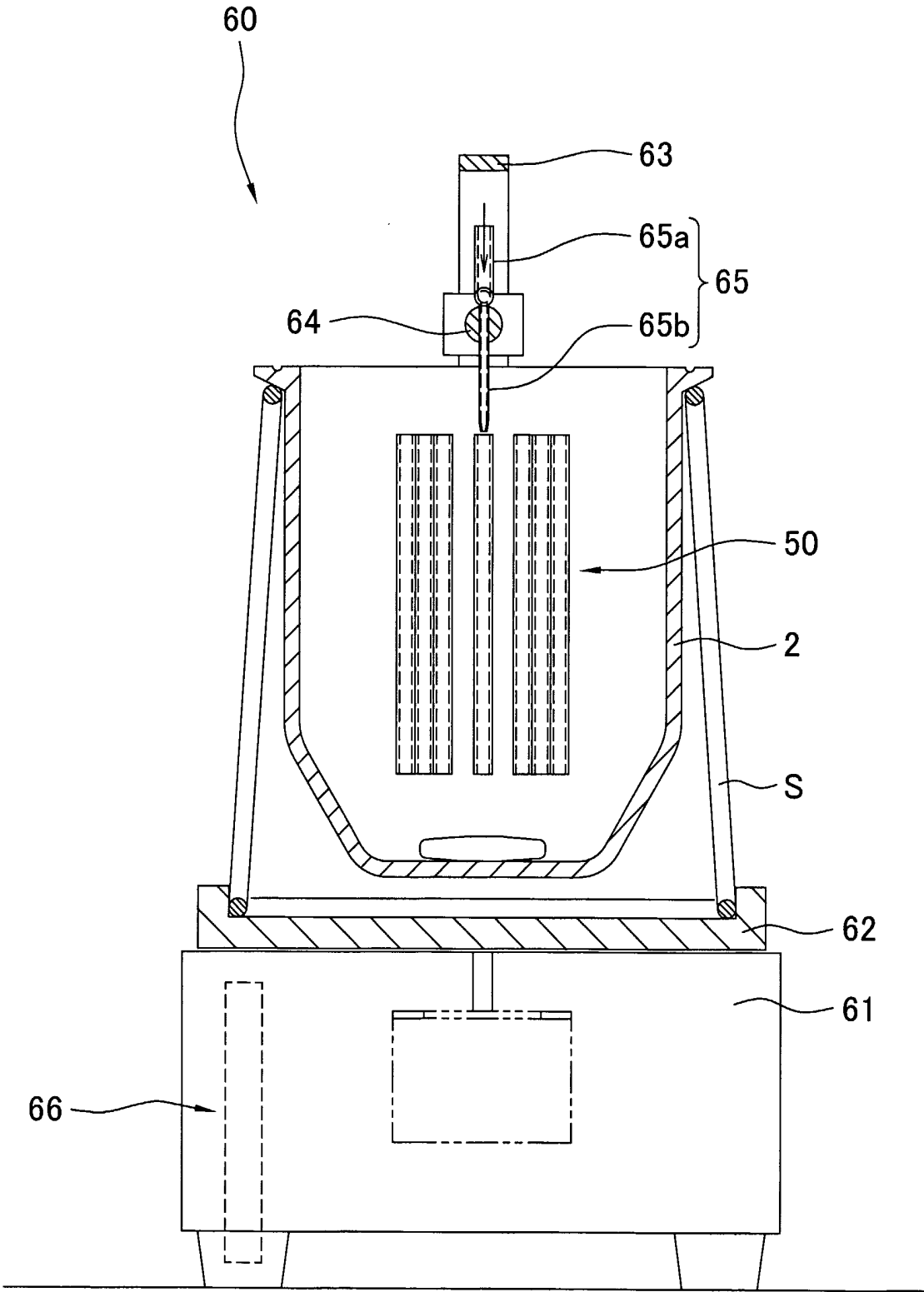


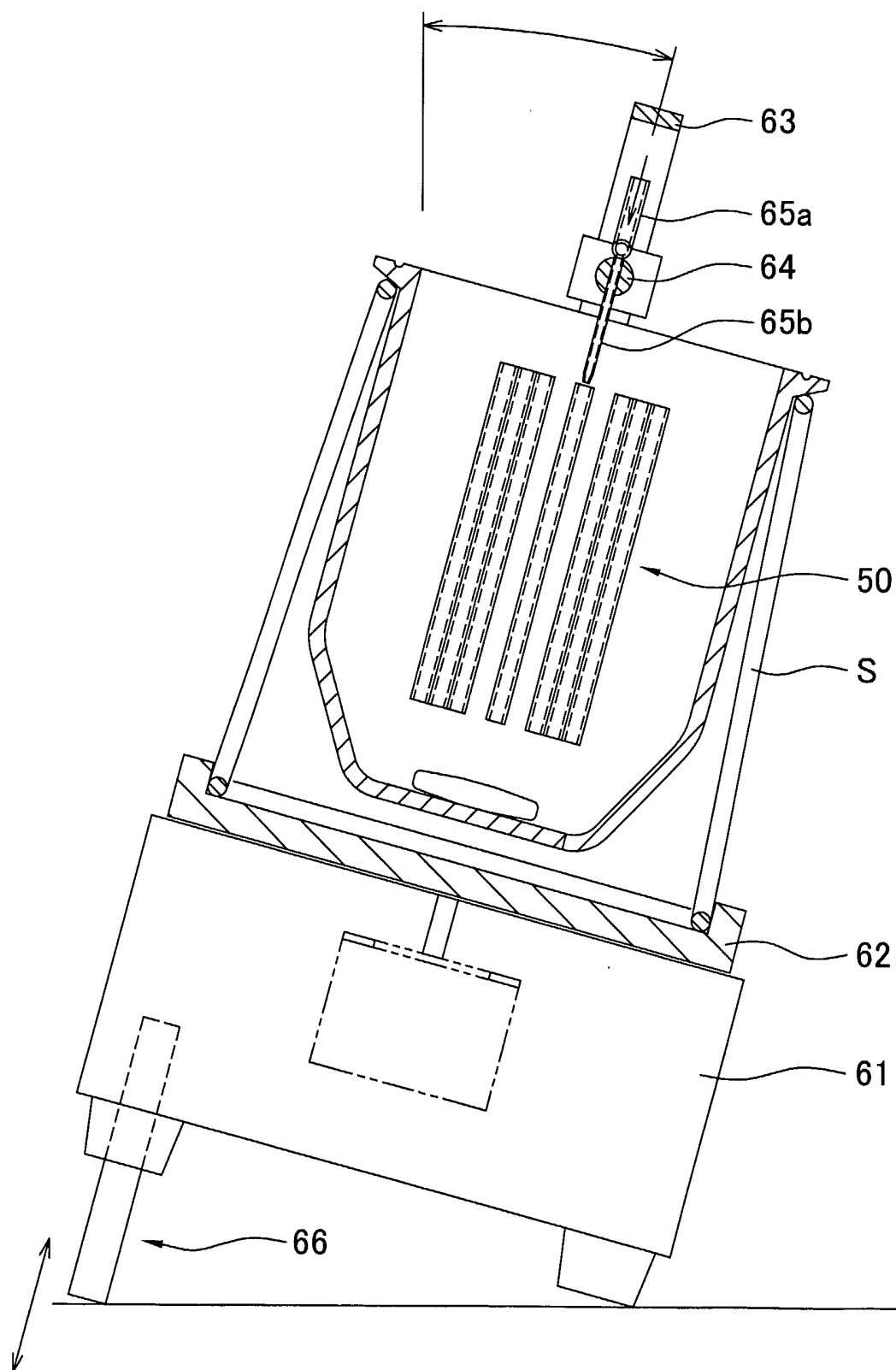
(B)

8/21
F I G . 8

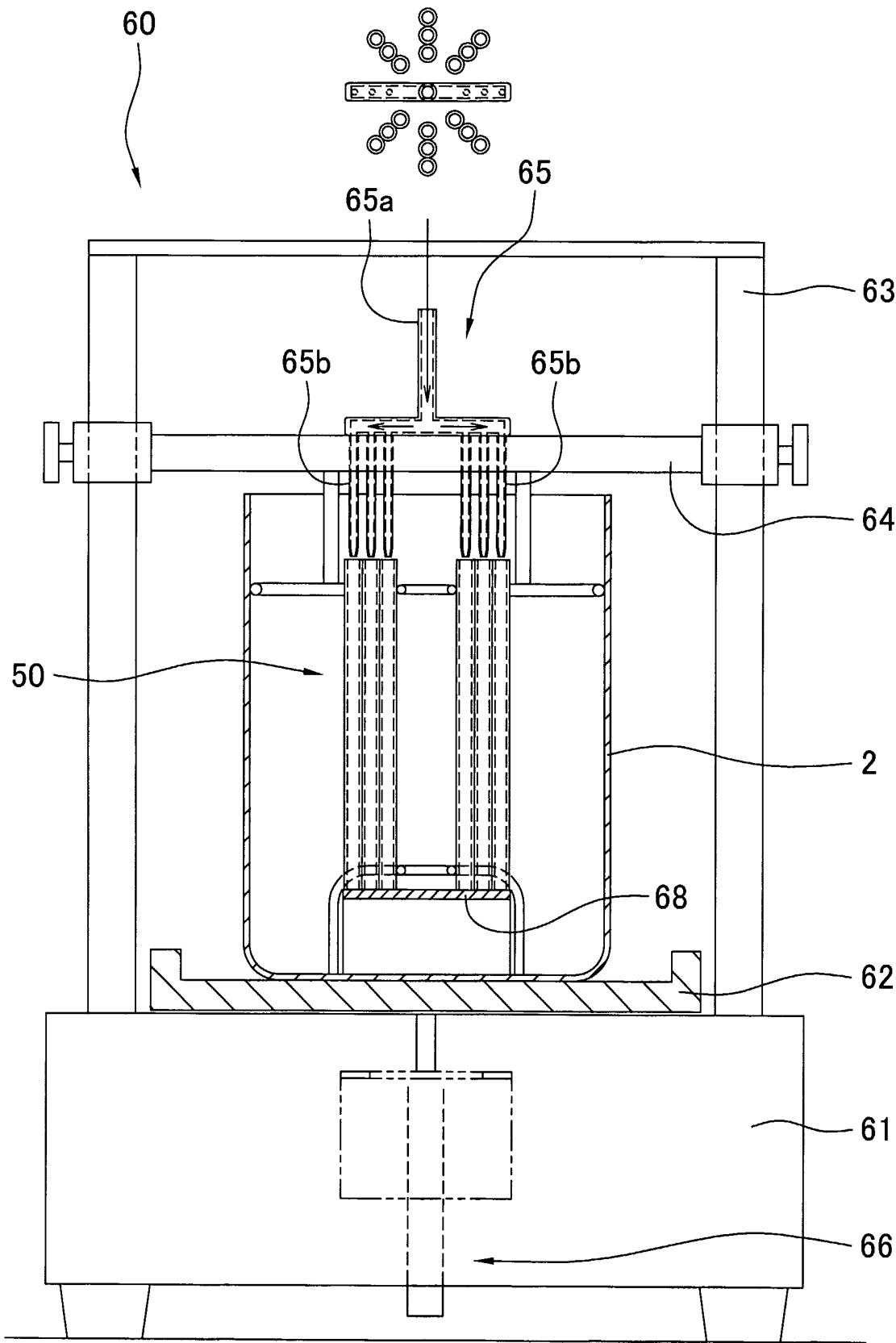


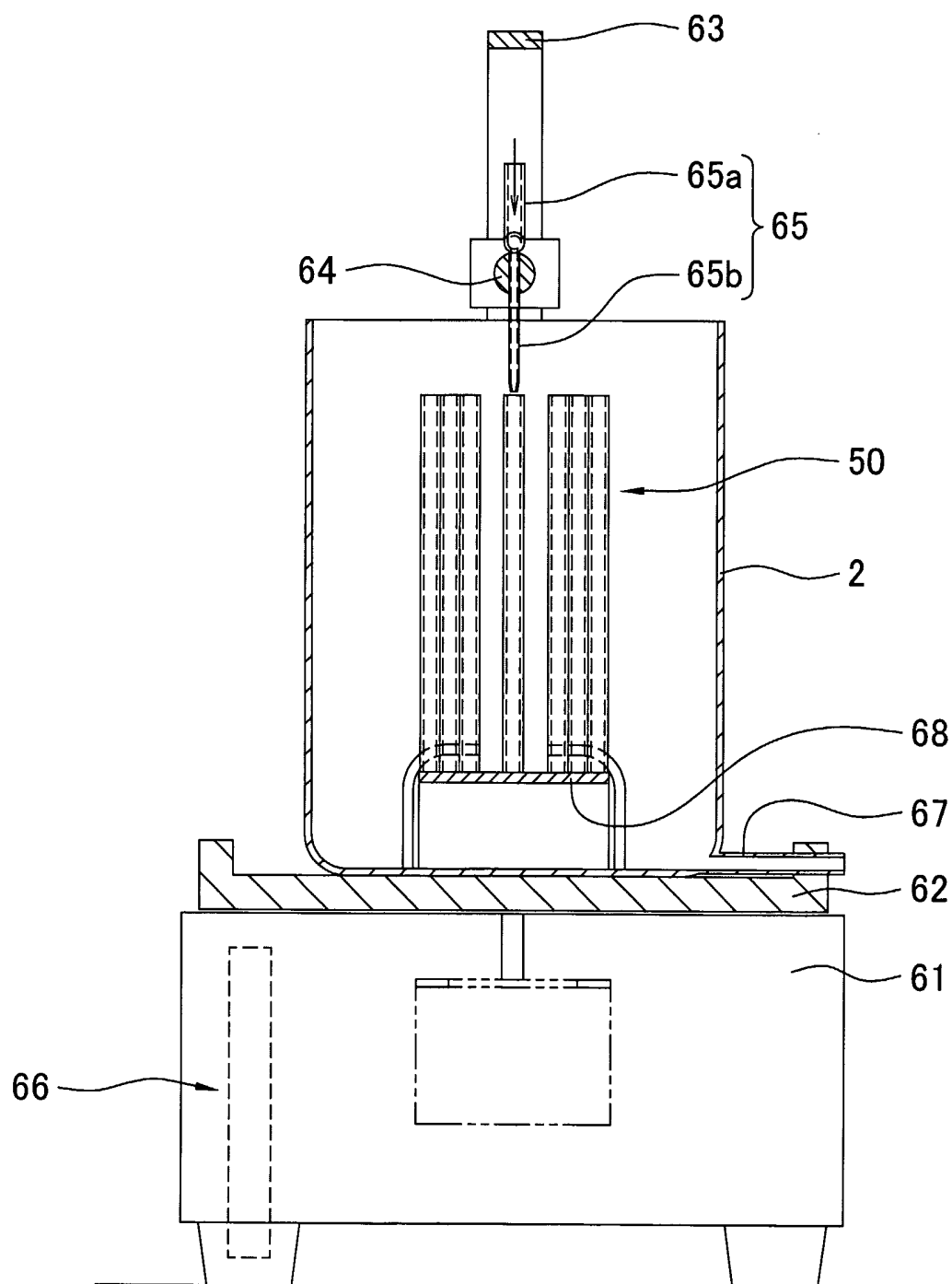
9/21
F I G . 9

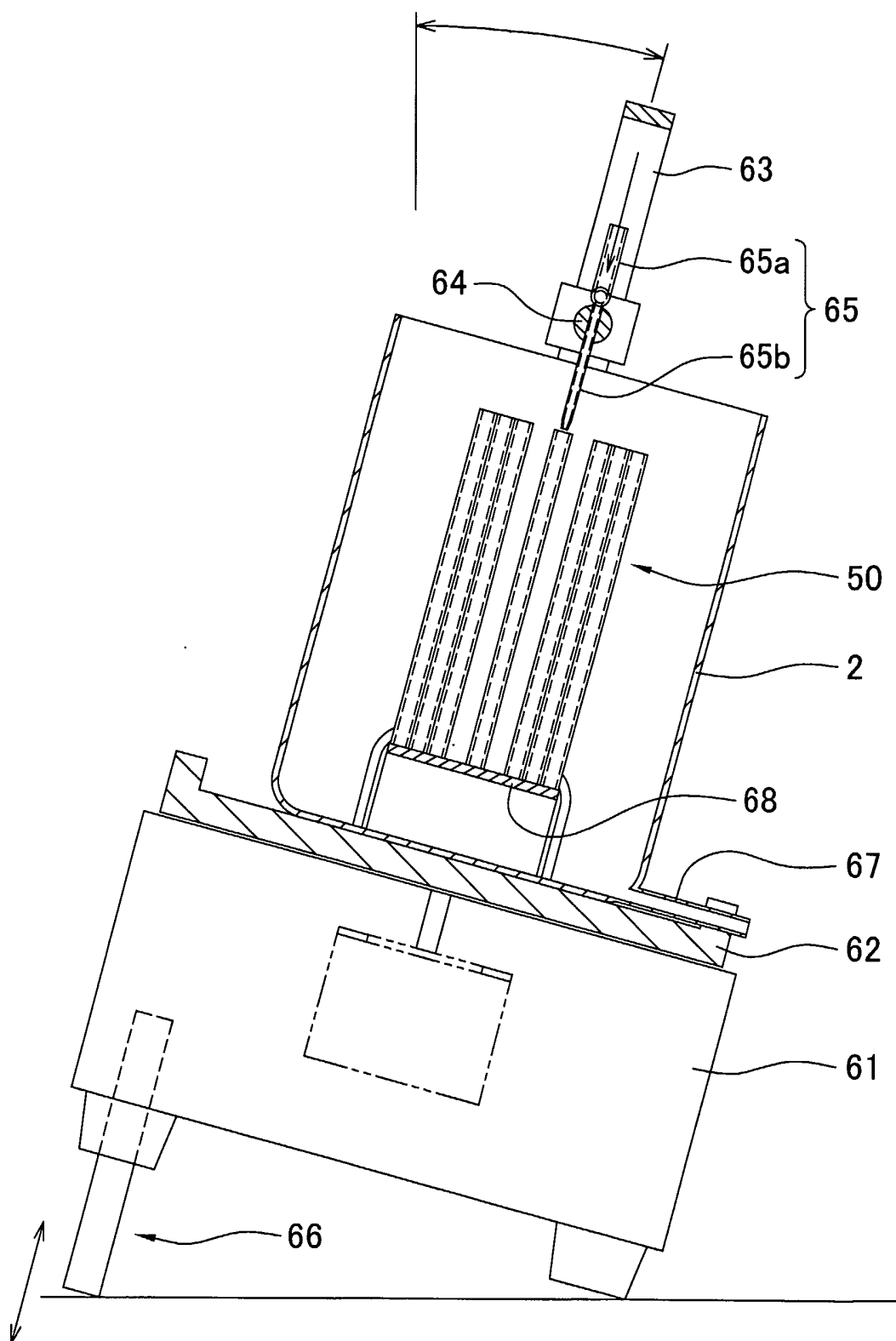


10/21
F I G . 1 0

11/21
F I G . 1 1

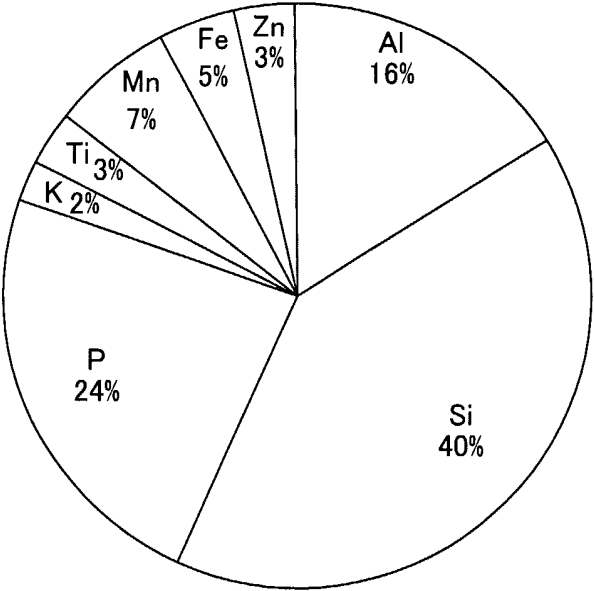


12/21
FIG. 12

13/21
FIG. 13

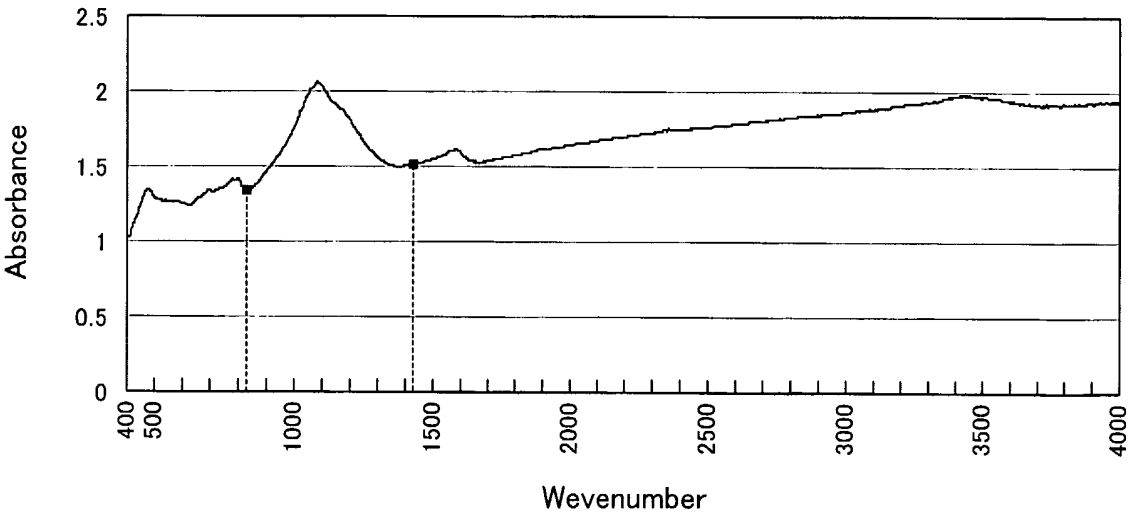
14/21
FIG.14

黒体粉末(A)



(A)

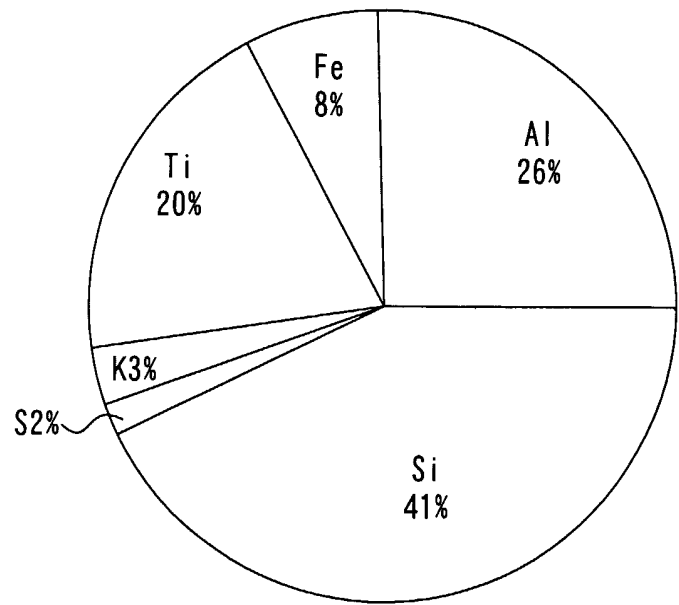
ceramic black A



(B)

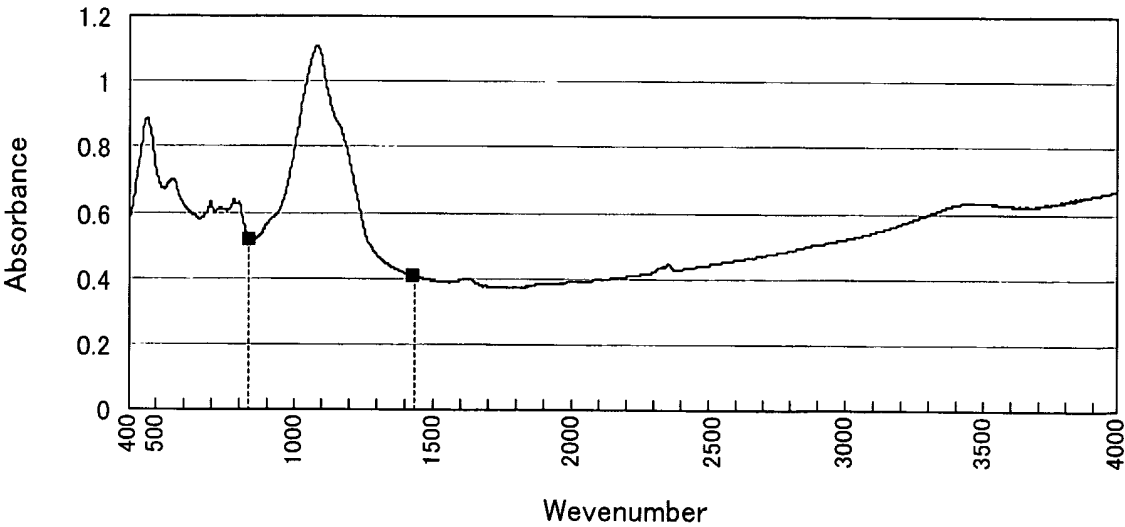
15/21
FIG.15

黒体粉末 (B)



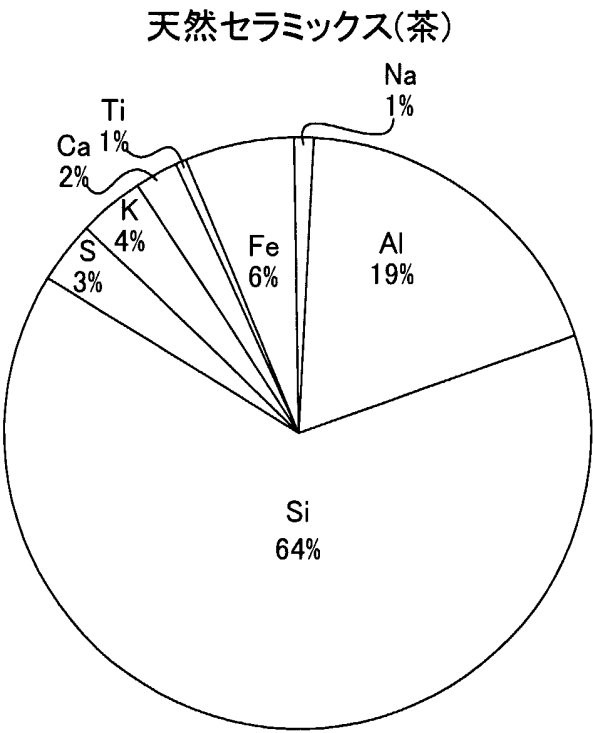
(A)

ceramic black B



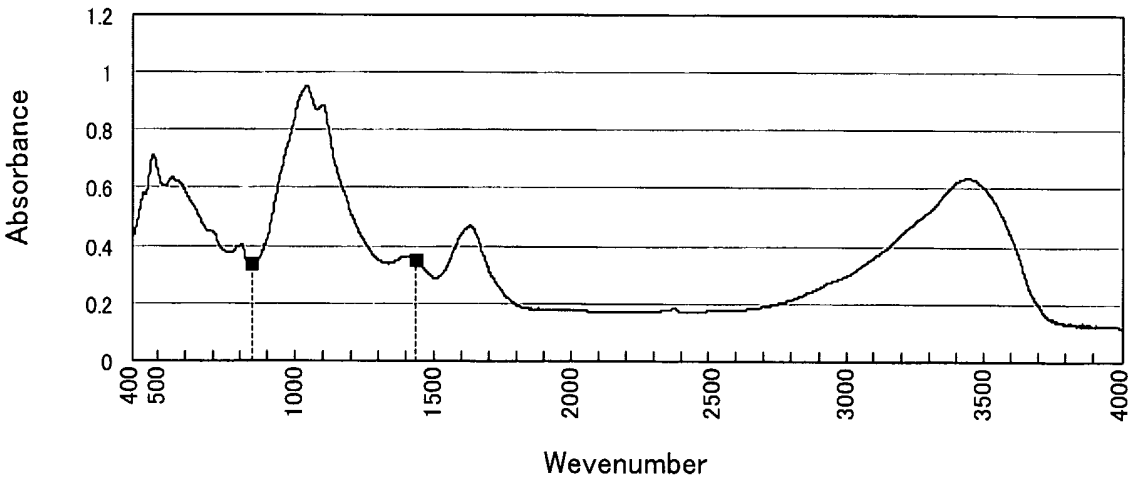
(B)

16/21
FIG.16

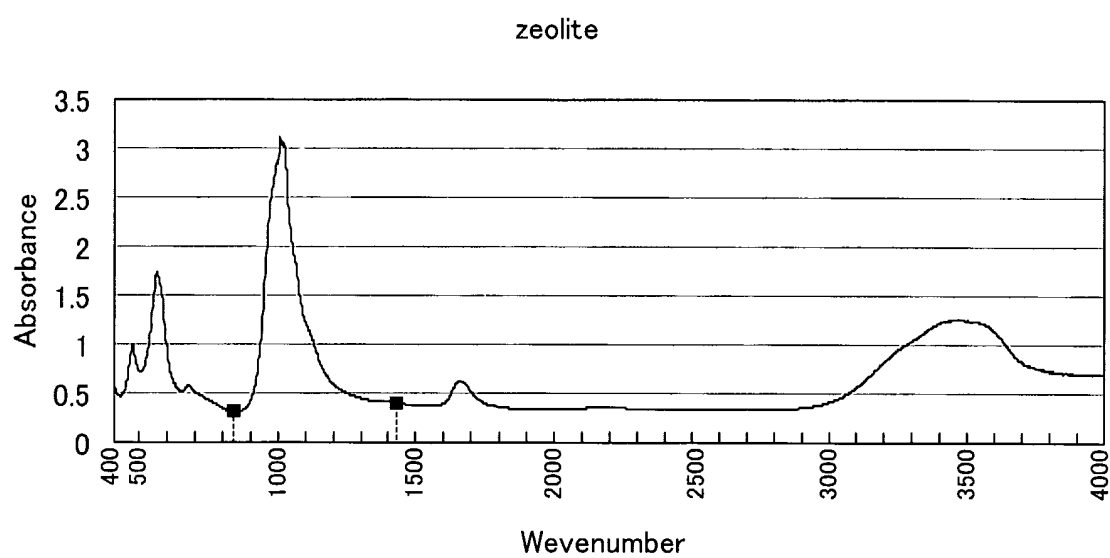


(A)

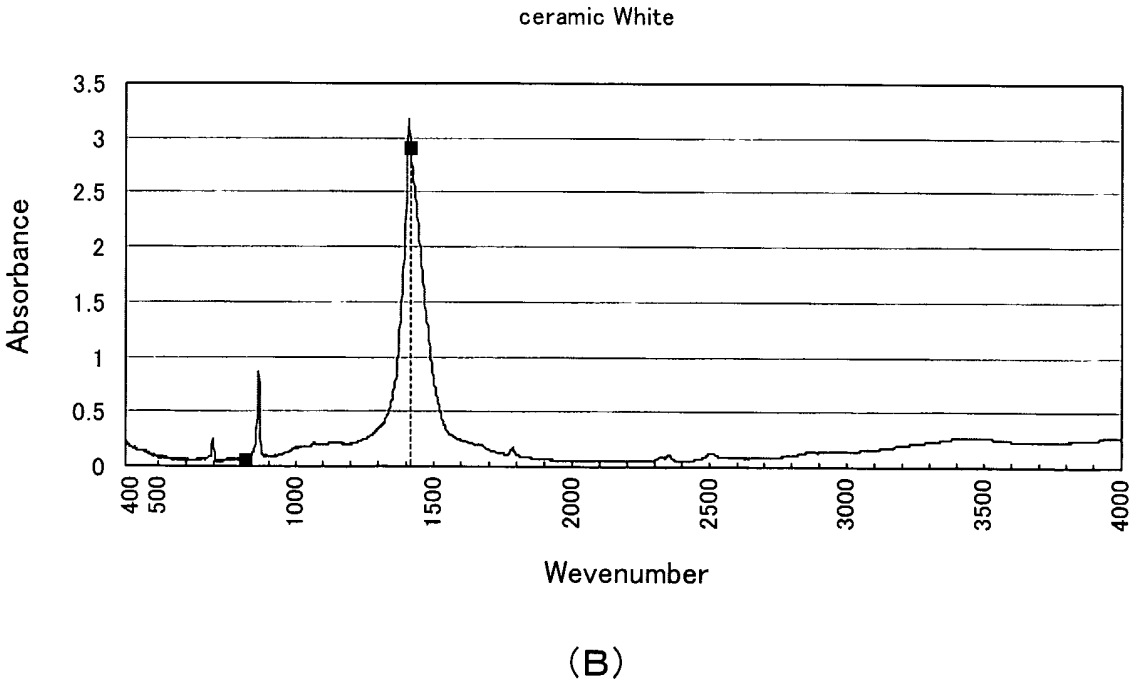
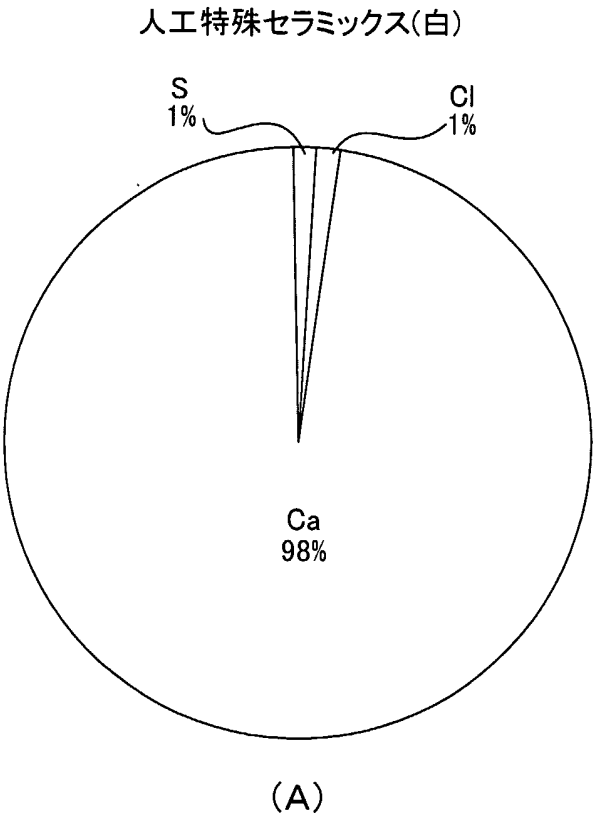
ceramic Brown



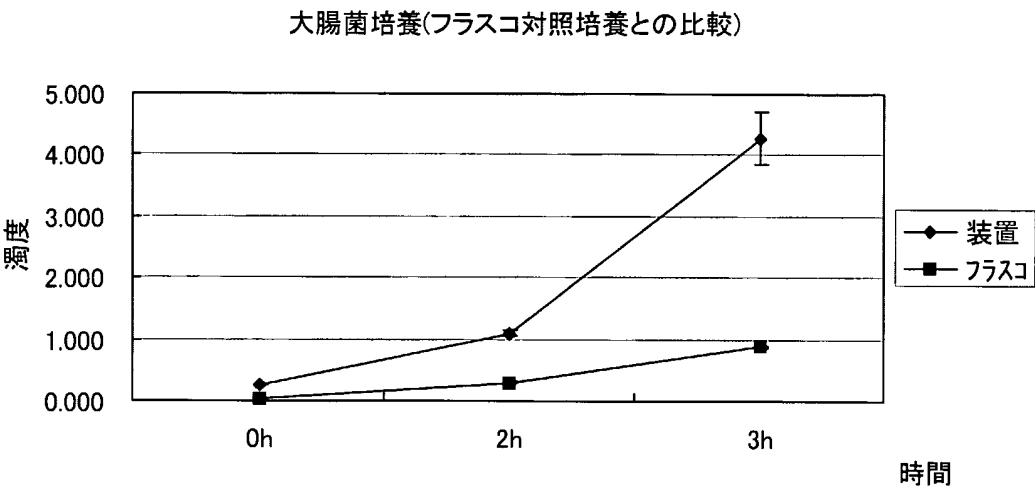
(B)

17/21
FIG.17

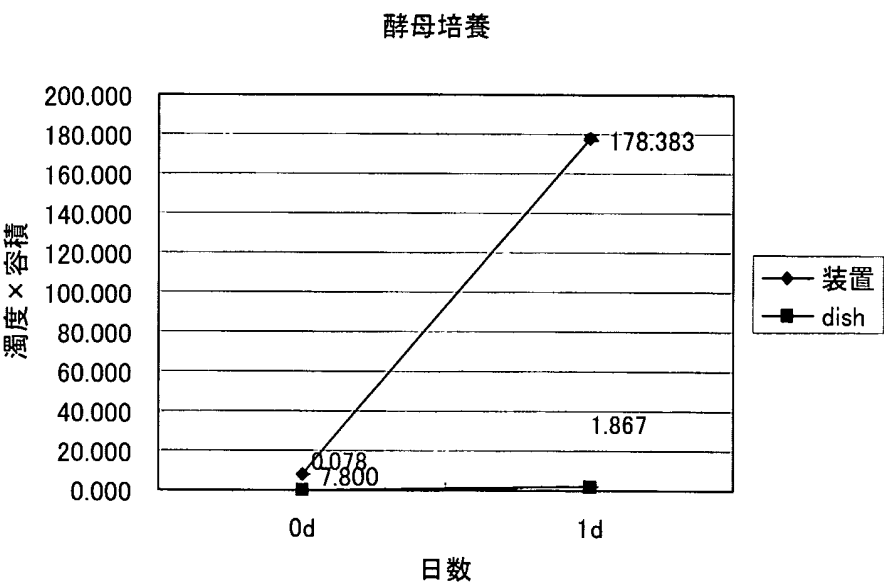
18/21
FIG.18



19/21
FIG.19



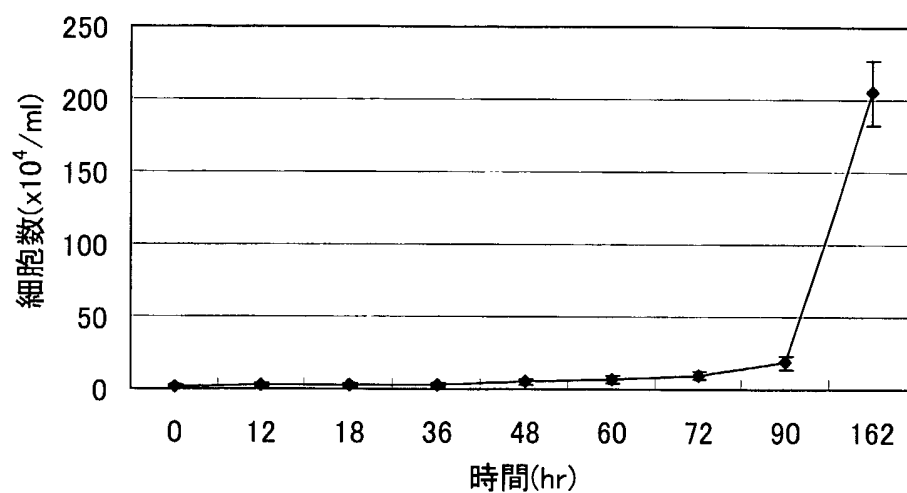
(A)



(B)

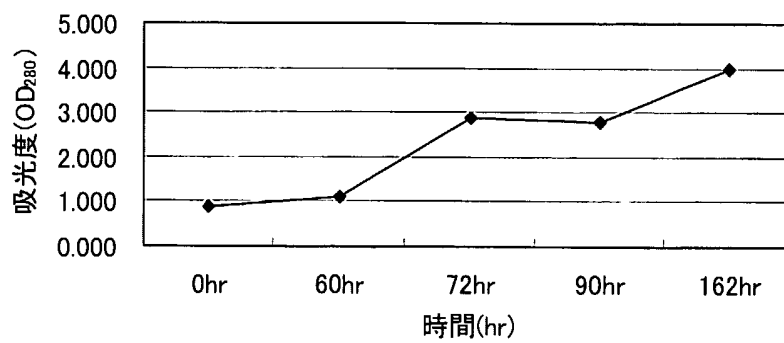
20/21
FIG. 20

ハイブリドーマ細胞の細胞濃度変化



(A)

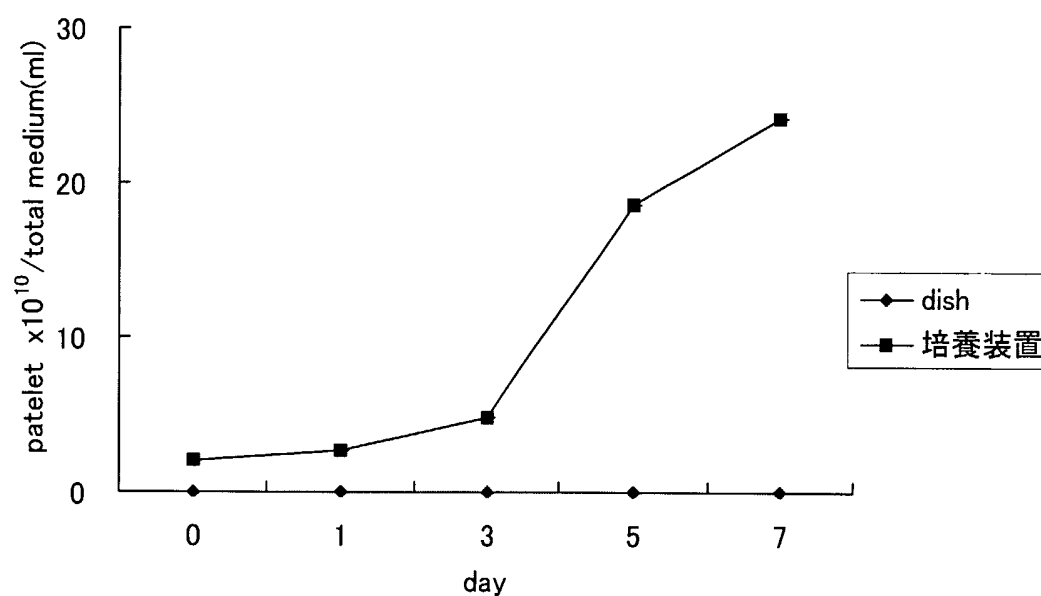
ハイブリドーマ細胞の抗体産生能



(B)

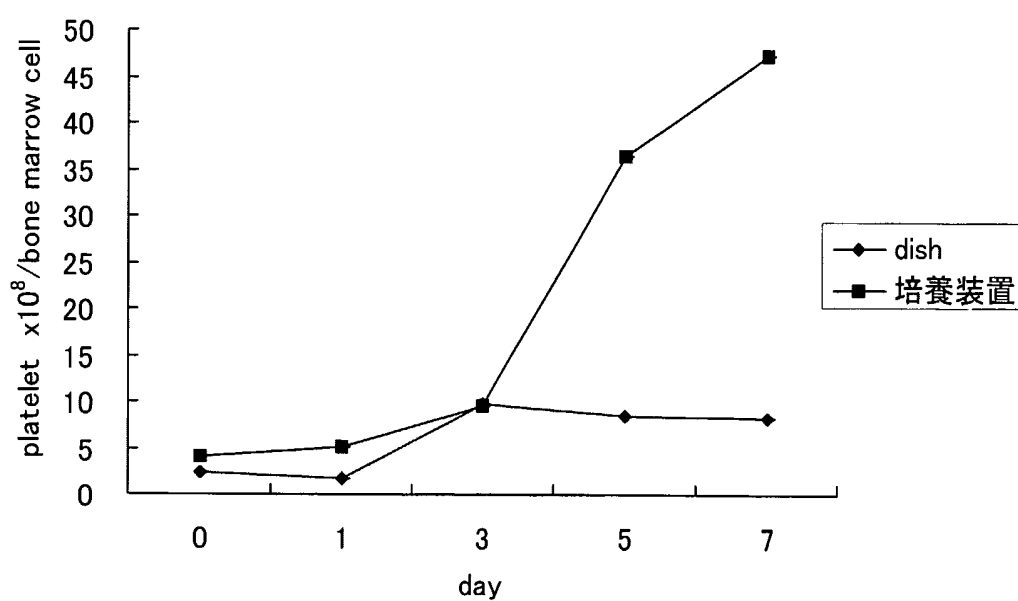
21/21
FIG.21

培養液トータル量あたりの血小板数



(A)

骨髓細胞数あたりの血小板数



(B)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年05月21日（21. 05. 2003）水曜日 13時12分47秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4. 17 (v) 及び51の2. 1 (a) (v)）	本国際出願に関し、 山下 菊治は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2003年03月08日 (08. 03. 2003)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	徳島新聞
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2003年03月08日 (08. 03. 2003)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	日本経済新聞
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M3/00

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)

Int.Cl⁷ C12M1/00, C12M3/00, C12N11/00

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

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 Y	JP 2-291253 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 03 December, 1990 (03.12.90), (Family: none)	1, 3, 5-8 2, 4, 9-57
Y	JP 3-127981 A (Kubota Corp.), 31 May, 1991 (31.05.91), (Family: none)	2-57
Y	JP 5-176752 A (Toyo Engineering Corp.), 20 July, 1993 (20.07.93), (Family: none)	9-57
Y	JP 3062812 U (Tsutomu YAMAMURA), 28 July, 1999 (28.07.99), (Family: none)	10-57

☒ 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 document 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
07 October, 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06332

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-228975 A (Research Institute of Innovative Technology for the Earth), 22 August, 2000 (22.08.00), (Family: none)	22-57
Y	EP 437393 A1 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE), 17 July, 1991 (17.07.91), & US 5179012 A1 & JP 4-211366 A	24-57
Y	JP 63-283571 A (Masuko Miso Kabushiki Kaisha), 21 November, 1988 (21.11.88), (Family: none)	25-57
Y	JP 11-239474 A (Japan Science and Technology Corp.), 07 September, 1999 (07.09.99), (Family: none)	30-51
Y	WO 01/75070 A1 (Kabushiki Kaisha Japan Tissue Engineering), 11 October, 2001 (11.10.01), & EP 1270718 A1 & JP 2001-275659 A	32-51
Y	EP 1160317 A1 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.), 12 May, 2001 (12.05.01), & US 2002/0005381 A1 & JP 2001-340075 A	33,34,50,51
Y	JP 2002-65247 A (Taki Chemical Co., Ltd.), 05 March, 2002 (05.03.02), (Family: none)	35-37,40-44, 50,51
Y	US 2002/0022885 A1 (Takahiro OCHI), 21 February, 2002 (21.02.02), & JP 2002-17846 A	38,39,50,51
Y	JP 2000-262271 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 26 September, 2000 (26.09.00), (Family: none)	45-47,50,51
Y	JP 2001-190270 A (Eiburu Kabushiki Kaisha), 17 July, 2001 (17.07.01), (Family: none)	28-32,50
Y	JP 2001-300574 A (Toyobo Co., Ltd.), 30 October, 2001 (30.10.01), (Family: none)	51
Y	WO 00/46349 A1 (Technion Research & Development Foundation Ltd.), 10 August, 2000 (10.08.00), & JP 2002-535981 A	55-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06332

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II 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:

(See extra sheet)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.: 1 - 57 .

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06332

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Upon review of the description of this application, it appears that the invention claimed in claims 1-57 is directed to a culture apparatus wherein cells can be stably cultured continuously for a prolonged period of time by maintaining the state inside a culture tank at condition optimum for the cells to thereby enable efficient mass production of tissues, organs, blood preparations, etc.

On the other hand, the invention claimed in claim 58 relates to blood preparations prepared by the use of the culture apparatus according to claim 1-4, 7, 9, 10, 16, 17, 19, 23-25 or 27. However, it does not appear that there is a difference of substance between the blood preparations thus prepared and blood preparations prepared through publicly known techniques. It cannot be contended that the blood preparations per se have properties enabling "stable culturing continuously for a prolonged period of time and efficient mass production ". Therefore, it cannot be recognized that there is a technical relationship involving identical "special technical features" between the invention of claim 58 relating to the blood preparations prepared by the above means and the invention of claims 1-57.

Similarly, the invention claimed in claims 59 and 60 relates to an artificial tissue prepared by the use of the culture apparatus according to claim 1-4, 7, 9, 10, 16, 17, 19, 23-25 or 27. However, it does not appear that there is a difference of substance between the artificial tissue thus prepared and artificial tissue prepared through publicly known techniques. It cannot be contended that the artificial tissue per se has properties enabling "stable culturing continuously for a prolonged period of time and efficient mass production ". Therefore, it cannot be recognized that there is a technical relationship involving identical "special technical features" between the invention of claim 58 relating to the artificial tissue prepared by the above means and the invention of claims 1-57.

In summing up, this application involves a total of three inventions, namely, the invention of claims 1-57, the invention of claim 58 and the invention of claims 59 and 60.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M3/00

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))

Int. Cl⁷ C12M1/00、C12M3/00、C12N11/00

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

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 請求の範囲の番号
X	J P 2-291253 A (旭メデイカル株式会社)	1, 3,
Y	1990. 12. 03 (ファミリーなし)	5-8
Y	J P 3-127981 A (株式会社クボタ)	2, 4,
Y	1991. 05. 31 (ファミリーなし)	9-57
Y	J P 5-176752 A (東洋エンジニアリング株式会社)	2-57
Y	1993. 07. 20 (ファミリーなし)	9-57

☒ 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

07. 10. 03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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)

小暮 道明



4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 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 請求の範囲の番号
Y	J P 3062812 U (山村勲) 1999. 07. 28 (ファミリーなし)	10-57
Y	J P 2000-228975 A (財団法人地球環境産業技術研 究機構) 2000. 08. 22 (ファミリーなし)	22-57
Y	EP 437393 A1 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 1991. 07. 17 & US 5179012 A1 & J P 4-211366 A	24-57
Y	J P 63-283571 A (益子味噌株式会社) 1988. 11. 21 (ファミリーなし)	25-57
Y	J P 11-239474 A (科学技術振興事業団) 1999. 09. 07 (ファミリーなし)	30-51
Y	WO 01/75070 A1 (株式会社ジャパン・ティッシュ・ エンジニアリング) 2001. 10. 11 & EP 1270718 A1 & J P 2001-275659 A	32-51
Y	EP 1160317 A1 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.) 2001. 05. 12 & US 2002/0005381 A1 & J P 2001-340075 A	33, 34, 50, 51
Y	J P 2002-65247 A (多木化学株式会社) 2002. 03. 05 (ファミリーなし)	35-37, 40-44, 50, 51
Y	US 2002/0022885 A1 (Takahiro Ochi) 2002. 02. 21 & J P 2002-17846 A	38, 39, 50, 51
Y	J P 2000-262271 A (松下電器産業株式会社) 2000. 09. 26 (ファミリーなし)	45-47, 50, 51
Y	J P 2001-190270 A (エイブル株式会社) 2001. 07. 17 (ファミリーなし)	28-32, 50
Y	J P 2001-300574 A (東洋紡績株式会社) 2001. 10. 30 (ファミリーなし)	51
Y	WO 00/46349 A1 (Technion Research & Development Foundation Ltd.) 2000. 08. 10 & J P 2002-535981 A	55-57

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ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。

（特別ページ）参照。

1. ☐ 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の範囲について作成した。
2. ☐ 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の範囲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。
3. ☐ 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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 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ので、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の範囲について作成した。

請求の範囲 1 - 57

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なかった。

本願明細書の記載を参酌すると、請求の範囲1-57に記載された発明は、培養槽内の状態を細胞に最適な条件に保つことにより、細胞を長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができ、組織、臓器、血液製剤等を大量かつ効率よく製造することができる培養装置であると認められる。

一方、請求の範囲58に記載された発明は、請求の範囲1-4、7、9、10、16、17、19、23-25又は27に記載の培養装置を用いて生成した血液製剤に係るものであるが、該方法で生成された血液製剤と、周知技術を用いて生成した血液製剤との間に、物として差異があるとは認められず、その物自体に、「長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができ、大量かつ効率よく製造することができる」性質が備わっているものではない。したがって、上記方法で生成された血液製剤に係る発明である請求項58に記載の発明と、請求の範囲1-57に記載された発明とは、同じ「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があるとは認められない。

同様に、請求の範囲59及び60に記載された発明は、請求の範囲1-4、7、9、10、16、17、19、23-25又は27に記載の培養装置を用いて形成した人工組織に係るものであるが、該方法により形成された人工組織と、従来技術を用いて作成された人工組織との間に、物としての差異があるとは認められず、その物自体に、「長期間連続で、かつ安定した状態で培養することができ、大量かつ効率よく製造することができる」性質が備わっているものではない。したがって、上記方法で生成された血液製剤に係る発明である請求項59及び60に記載の発明と、請求の範囲1-57に記載された発明とは、同じ「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があるとは認められない。

よって、この出願には、請求の範囲1-57に記載された発明と、請求の範囲58に記載された発明と、請求の範囲59及び60に記載された発明の、計3の発明が包含されているといえる。