

(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
2017年3月9日(09.03.2017)



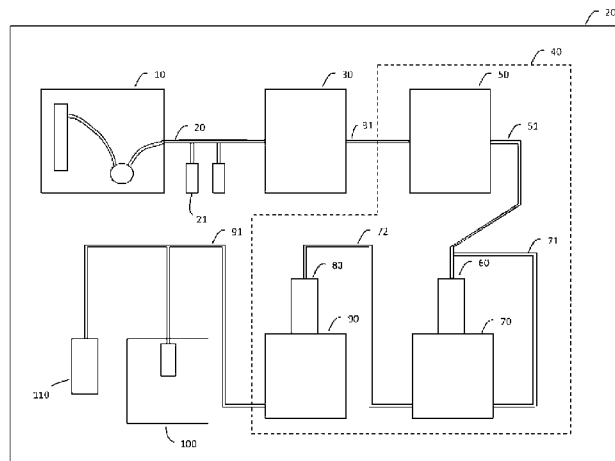
(10) 国際公開番号
WO 2017/038887 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/0789* (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
C12M 1/02 (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12M 1/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/075540
- (22) 国際出願日: 2016年8月31日(31.08.2016)
- (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 2015-170797 2015年8月31日(31.08.2015) JP
 62/356,199 2016年6月29日(29.06.2016) US
- (71) 出願人: アイ・ピース株式会社 (I PEACE, INC.)
 [US/US]: 94304 カリフォルニア州 2 6 2 7 ハ
 ノーバーストリート パロアルト California (US).
- (72) 発明者: および
- (71) 出願人: 田邊 剛士 (TANABE, Koji) [JP/US]; 94304
 カリフォルニア州 2 6 2 7 ハノーバースト
 リート パロアルト California (US).
- (72) 発明者: ケリー ブランダン (KELLY, Brendan);
 94304 カリフォルニア州 2 6 2 7 ハノーバ
 ーストリート パロアルト California (US). 須藤
 健太 (SUTO, Kenta); 94304 カリフォルニア州 2 6
 2 7 ハノーバーストリート パロアルト Cali-
 fornia (US). 下田 英範 (SHIMODA, Hidenori); 94304
 カリフォルニア州 2 6 2 7 ハノーバースト
 リート パロアルト California (US). 平出 亮二
 (HIRAIDE, Ryoji); 94304 カリフォルニア州 2 6 2
 7 ハノーバーストリート パロアルト Califor-
 nia (US).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.);
 〒1066123 東京都港区六本木 6 - 1 0 - 1 六
 本木ヒルズ森タワー 2 3 階 T M I 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,
 IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
 LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
 MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

[続葉有]

(54) Title: PLURIPOTENT STEM CELL PRODUCTION SYSTEM

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞製造システム



(57) Abstract: A stem cell production system provided with a preintroduction cell-feeding solution channel 20 through which a solution containing cells passes, an induction factor-feeding solution mechanism 21 for feeding a pluripotency induction factor to the preintroduction cell-feeding solution channel 20, a factor introduction device 30 connected to the preintroduction cell-feeding solution channel 20 for making cells with induction factor introduced by introducing the pluripotency induction factor into the cells, a cell mass-making device 40 for making multiple cell masses comprising stem cells by culturing the cells with induction factor introduced, and a packaging device 100 for sequentially packaging each of the multiple cell masses.

(57) 要約: 細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路 20 と、導入前細胞送液路 20 内に多能性誘導因子を送る誘導因子送液機構 21 と、導入前細胞送液路 20 に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置 30 と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置 40 と、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置 100 と、を備える幹細胞製造システム。



WO 2017/038887 A1



PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：多能性幹細胞製造システム

技術分野

[0001] 本発明は細胞保存技術に関し、特に多能性幹細胞製造システムに関する。

背景技術

[0002] 胚性幹細胞（ES細胞）は、ヒトやマウスの初期胚から樹立された幹細胞である。ES細胞は、生体に存在する全ての細胞へと分化できる多能性を有する。現在、ヒトES細胞は、パーキンソン病、若年性糖尿病、及び白血病等、多くの疾患に対する細胞移植療法に利用可能である。しかし、ES細胞の移植には障害もある。特に、ES細胞の移植は、不成功な臓器移植に続いて起こる拒絶反応と同様の免疫拒絶反応を惹起しうる。また、ヒト胚を破壊して樹立されるES細胞の利用に対しては、倫理的見地から批判や反対意見が多い。

[0003] このような背景の状況の下、京都大学の山中伸弥教授は、4種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、c-Myc、及びSox2を体細胞に導入することにより、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）を樹立することに成功した。これにより、山中教授は、2012年のノーベル生理学・医学賞を受賞した（例えば、特許文献1参照。）。iPS細胞は、拒絶反応や倫理的問題のない理想的な多能性細胞である。したがって、iPS細胞は、細胞移植療法への利用が期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第4183742号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] iPS細胞のような誘導幹細胞は、細胞に遺伝子等の誘導因子を導入することによって樹立され、拡大培養、凍結保存される。しかし、例えば臨床用

i P S細胞（例えば、G L P，G M Pグレード）を作製し産業化するには、以下のような問題点がある。

[0006] 1) コスト

臨床用 i P S細胞は非常に綺麗に保たれたクリーンルームで作製、保存される必要がある。しかし、要求されるレベルの清潔度を維持するコストは非常に高額である。そのため、i P S細胞を作るのにコストがかかり、産業化への大きな障害となっている。

[0007] 2) 品質

幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であり、手作業によるところが多い。また、幹細胞の作製は、個人の技量に負っているところがある。その為、作製者や実験バッチによって、i P S細胞の品質のばらつきが生じうる。

[0008] 3) 時間

クリーンルームの中で特定のドナー以外の他人の i P S細胞とのクロスコンタミネーションを防ぐために、一人の人間のみ由来する i P S細胞が所定の時間をかけてクリーンルーム内で作製される。また i P S細胞の樹立、品質評価には長時間を要する。しかし、i P S細胞は、クリーンルームで一度に一人の人間のためだけに作製されるので、多くの希望者の i P S細胞を作製するのに非常に長い時間を要する。

[0009] 4) 人材

上述したように、現状、i P S細胞の作製は手作業によるところが大きい。しかし、臨床用 i P S細胞を作製することができるのに必要な技術を有する技術者は少ない。

[0010] 幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であるという問題がある。これに対し、本発明は、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供することを目的の一つとする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明の態様によれば、細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路と、

導入前細胞送液路に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置と、導入前細胞送液路、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置を格納する筐体と、を備え、細胞塊作製装置が、因子導入装置で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置と、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置と、を備え、初期化培養装置が、誘導因子導入細胞に培地を補給する第1の培地補給装置を備え、拡大培養装置が、複数の細胞塊に培地を補給する第2の培地補給装置を備える、幹細胞製造システムが提供される。

- [0012] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1の培地補給装置が、誘導因子導入細胞に培地を連続的に補給してもよい。
- [0013] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1の培地補給装置が、誘導因子導入細胞に培地を所定のタイミングで補給してもよい。
- [0014] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第2の培地補給装置が、複数の細胞塊に培地を連続的に補給してもよい。
- [0015] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第2の培地補給装置が、複数の細胞塊に培地を所定のタイミングで補給してもよい。
- [0016] 上記の幹細胞製造システムにおいて、因子導入装置が、導入前細胞送液路に接続された因子導入部と、多能性誘導因子を保存する因子保存部と、因子保存部から因子導入部に多能性誘導因子を流すための因子送液路と、因子送液路内の液体を流すためのポンプと、を備えていてもよい。
- [0017] 上記の幹細胞製造システムにおいて、因子導入部において、RNAリポフエクションにより、細胞に多能性誘導因子が導入されてもよい。
- [0018] 上記の幹細胞製造システムにおいて、多能性誘導因子がDNA、RNA、又はタンパク質であってもよい。
- [0019] 上記の幹細胞製造システムにおいて、多能性誘導因子がベクターに組み込まれていてもよい。

- [0020] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ベクターがセンダイウイルスベクターであってもよい。
- [0021] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。
- [0022] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置が、誘導因子導入細胞とゲル培地が入られる透析チューブと、透析チューブが入られ、透析チューブの周囲にゲル培地が入られる容器と、を備える、浮遊培養器を備えていてもよい。
- [0023] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブの分画分子量が0.1 KDa以上であってもよい。
- [0024] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなってもよい。
- [0025] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1の培地補給装置が、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を補給してもよい。
- [0026] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1の培地補給装置が、透析チューブ内にゲル培地を補給してもよい。
- [0027] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備えていてもよい。
- [0028] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。
- [0029] 上記の幹細胞製造システムが、培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。
- [0030] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。
- [0031] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備えていてもよい。
- [0032] 上記の幹細胞製造システムが、容器に接続された廃液送液路であって、容

器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備えていてもよい。

- [0033] 上記の幹細胞製造システムが、因子導入装置から初期化培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。
- [0034] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。
- [0035] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。
- [0036] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。
- [0037] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養装置が、複数の細胞塊とゲル培地が入れられる透析チューブと、透析チューブが入れられ、透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、を備える、浮遊培養器を備えていてもよい。
- [0038] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブの分画分子量が0.1 KDa以上であってもよい。
- [0039] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなってもよい。
- [0040] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第2の培地補給装置が、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を補給してもよい。
- [0041] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第2の培地補給装置が、透析チューブ内にゲル培地を補給してもよい。
- [0042] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備えていてもよい。
- [0043] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。
- [0044] 上記の幹細胞製造システムが、培地送液路内の液体を流すためのポンプを

更に備えていてもよい。

- [0045] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。
- [0046] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備えていてもよい。
- [0047] 上記の幹細胞製造システムが、容器に接続された廃液送液路であって、容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備えていてもよい。
- [0048] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置から拡大培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。
- [0049] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、拡大培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、を接続する導入細胞送液路を更に備えていてもよい。
- [0050] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。
- [0051] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。
- [0052] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。
- [0053] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置及び拡大培養装置の少なくとも一方が、内部に培地が入られる二酸化炭素透過性バッグを備えていてもよい。
- [0054] 上記の幹細胞製造システムにおいて、細胞塊作製装置が、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第1の分割機構と、拡大培養装置で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第2の分割機構と、を更に備えていてもよい。
- [0055] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1の分割機構が、初期化培養装置から拡大培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路に設けら

れていてもよい。

- [0056] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、細胞塊をシングルセルに分割してもよい。
- [0057] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、内部に貫通孔を有する分割器を備え、貫通孔が、大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、を交互に有し、細胞塊を含む培地が、貫通孔を流れてもよい。
- [0058] 上記の幹細胞製造システムにおいて、大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。
- [0059] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、当該連結ブロックの第1の端部に凹部が、当該連結ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、当該連結ブロックが複数ある場合に、凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する第1の大孔径部と、第1の大孔径部と連通し、第1の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、小孔径部と連通し、小孔径部より孔径が大きく、凸部の先端に開口を有する第2の大孔径部と、を有し、細胞塊を含む培地が、貫通孔を流れてもよい。
- [0060] 上記の幹細胞製造システムにおいて、連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第2の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第1の大孔径部と平滑に連通してもよい。
- [0061] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。
- [0062] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、当該先端ブロックの第1の端部に凹部が、当該先端ブロックの第2の端部にノズルが設けられており、当該先端ブロックの凹部が、連結ブロックの凸部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さく、ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有していてもよい。

- [0063] 上記の幹細胞製造システムにおいて、連結ブロックと先端ブロックとを連結した際、連結ブロックの第2の大孔径部と、先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通してもよい。
- [0064] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、当該末端ブロックの第1の端部に凹部が、末端ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、当該末端ブロックの凸部が、連結ブロックの凹部と勘合してもよい。
- [0065] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第1及び第2の分割機構が、それぞれ、末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、挿入ノズルに連通する、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、を更に備えていてもよい。
- [0066] 上記の幹細胞製造システムにおいて、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置を更に備え、筐体がパッケージ装置を格納してもよい。
- [0067] 上記の幹細胞製造システムにおいて、細胞塊作製装置が、複数の細胞塊をパッケージ装置に順次送る細胞塊搬送機構を更に備えていてもよい。
- [0068] 上記の幹細胞製造システムにおいて、パッケージ装置が、ペルチェ素子又は液体窒素を用いて細胞塊を凍結してもよい。
- [0069] 上記の幹細胞製造システムにおいて、パッケージ装置が、気化圧縮又は気化吸収により細胞塊を凍結してもよい。
- [0070] 上記の幹細胞製造システムが、筒状部材と、筒状部材の内部に配置された液体透過フィルターと、を備える溶液置換器であって、筒状部材に、液体透過フィルター上に、複数の細胞塊を含む溶液を導入するための細胞塊導入孔と、液体透過フィルター上に、置換溶液を導入するための置換溶液導入孔と、液体透過フィルター上に、複数の細胞塊を含む置換溶液を流出するための細胞塊流出孔と、液体透過フィルターを透過した溶液が流出する廃液流出孔と、が設けられている溶液置換器を更に備えていてもよい。
- [0071] 上記の幹細胞製造システムが、廃液流出孔に接続された廃液送液路を更に

備え、複数の細胞塊を含む溶液の溶液を廃棄する際に廃液送液路における溶液の流動が許容され、置換溶液中に複数の細胞塊を分散させる際に廃液送液路における溶液の流動が許容されなくともよい。

[0072] 上記の幹細胞製造システムにおいて、置換溶液が培地、凍結保存液、又は細胞塊分割酵素溶液であってもよい。

[0073] 上記の幹細胞製造システムが、拡大培養装置から溶液置換器に複数の細胞塊を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0074] 上記の幹細胞製造システムが、拡大培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、溶液置換器の細胞塊導入孔と、を接続する導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0075] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0076] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0077] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0078] 上記の幹細胞製造システムが、血液から細胞を分離する分離装置を更に備え、分離装置で分離された細胞を含む溶液が導入前細胞送液路を通過してもよい。

[0079] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置が、磁気細胞分離方法又は赤血球凝固剤を用いる方法によって血液から単核球を分離してもよい。

[0080] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置が、単核球を精製する単核球精製フィルターを更に備えていてもよい。

[0081] 上記の幹細胞製造システムが、導入前細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0082] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0083] 上記の幹細胞製造システムが、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養

器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、筐体内に配置されるケースを更に備えていてもよい。

[0084] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、ケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0085] 上記の幹細胞製造システムが、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、筐体内に配置されるケースを更に備えていてもよい。

[0086] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、ケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0087] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内に配置される複数のケースを更に備え、複数のケースのそれぞれに、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかが格納されてもよい。

[0088] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、複数のケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0089] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内に配置される複数のケースを更に備え、複数のケースのそれぞれに、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、の少なくともいずれかが格納されてもよい。

[0090] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、複数のケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0091] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ケースと筐体が、互いに勘合する勘合部を備え、ケースが筐体内の所定の位置に配置されてもよい。

[0092] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケ

ース内の送液路と、ケース外のポンプと、が接続されてもよい。

[0093] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の因子導入部と、ケース外の因子保存部と、が接続されてもよい。

[0094] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の初期化培養装置の浮遊培養器及び拡大培養装置の浮遊培養器と、ケース外の培地を保存する培地保存部と、が接続されてもよい。

[0095] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の初期化培養装置の浮遊培養器及び拡大培養装置の浮遊培養器と、ケース外の廃液を保管する廃液保管部と、が接続されてもよい。

[0096] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の分離装置と、ケース外の血液を保存する血液保存部と、が接続されてもよい。

[0097] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の分離装置と、ケース外の血液分離剤を保存する分離剤保存部と、が接続されてもよい。

[0098] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の溶液置換器と、ケース外の凍結保存液を保存する凍結保存液保存部と、が接続されてもよい。

[0099] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置で培養される細胞を撮影する初期化培養撮影装置と、拡大培養装置で培養される細胞を撮影する拡大培養撮影装置と、を更に備えていてもよい。

[0100] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置は、それぞれ、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。

[0101] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部を更に備えていてもよい。

[0102] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、ハイパスフィルタを

適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、画像中の細胞塊を抽出してもよい。

[0103] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にDistance Transform法を適用してもよい。

[0104] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞塊の大きさを算出してもよい。

[0105] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養装置に移行されてもよい。

[0106] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養装置において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0107] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0108] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0109] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞塊の数を算出してもよい。

[0110] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0111] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

- [0112] 上記の幹細胞製造システムが、培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像に基づき、細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、算出された濁度の値と、関係と、に基づき、撮影された細胞塊の密度の値を算出する画像処理部を更に備えていてもよい。
- [0113] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養装置に移行されてもよい。
- [0114] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養撮影装置において、複数の細胞塊が継代されてもよい。
- [0115] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。
- [0116] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。
- [0117] 上記の幹細胞製造システムが、培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像における培地の色の値を算出し、算出された色の値と、関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部を更に備えていてもよい。
- [0118] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、初期化培養装置において培地が交換されてもよい。
- [0119] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、拡大培養装置に

において培地が交換されてもよい。

- [0120] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地の色が、培地の色相であってもよい。
- [0121] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、初期化培養装置において培地が交換されてもよい。
- [0122] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、拡大培養装置において培地が交換されてもよい。
- [0123] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路の内壁が、細胞非接着性であってもよい。
- [0124] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路と、誘導因子送液機構と、が、基板上に設けられていてもよい。
- [0125] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体を清浄にする空気清浄装置を更に備えていてもよい。
- [0126] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体の温度を管理する温度管理装置を更に備えていてもよい。
- [0127] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置及び拡大培養装置における培地の温度を管理する温度管理装置を更に備えていてもよい。
- [0128] 上記の幹細胞製造システムにおいて、温度管理装置が、培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地の温度を上昇させ、培地の温度が所定の範囲より高い場合は、培地の温度を低下させてもよい。
- [0129] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体の二酸化炭素濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を更に備えていてもよい。
- [0130] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内を乾熱滅菌又はガス滅菌する滅菌装置を更に備えていてもよい。
- [0131] 上記の幹細胞製造システムにおいて、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置が、サーバーによって作業手順に基づいて制御され、サ

ーバーが、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置が作業手順に基づいて稼働しているか否か監視し、稼働記録を作成してもよい。

[0132] また、本発明の態様によれば、内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、当該連結ブロックの第1の端部に凹部が、当該連結ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、当該連結ブロックが複数ある場合に、凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する第1の大孔径部と、第1の大孔径部と連通し、第1の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、小孔径部と連通し、小孔径部より孔径が大きく、凸部の先端に開口を有する第2の大孔径部と、を有する、細胞塊分割器が提供される。

[0133] 上記の細胞塊分割器において、連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第2の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第1の大孔径部と平滑に連通してもよい。

[0134] 上記の細胞塊分割器において、第1及び第2の大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0135] 上記の細胞塊分割器が、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、当該先端ブロックの第1の端部に凹部が、当該先端ブロックの第2の端部にノズルが設けられており、当該先端ブロックの凹部が、連結ブロックの凸部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さく、ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有していてもよい。

[0136] 上記の細胞塊分割器において、連結ブロックと先端ブロックとを連結した際、連結ブロックの第2の大孔径部と、先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通してもよい。

[0137] 上記の細胞塊分割器が、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、末端ブロックの第1の端部に凹部が、末端ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、当該末端ブロックの凸部が、連結ブロックの凹部と勘合していてもよい。

- [0138] 上記の細胞塊分割器が、末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、挿入ノズルに連通する、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、を更に備えていてもよい。
- [0139] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、撮影装置で得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。
- [0140] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置は、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。
- [0141] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、画像中の細胞塊を抽出してもよい。
- [0142] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にDistance Transform法を適用してもよい。
- [0143] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞塊の大きさを算出してもよい。
- [0144] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行されてもよい。
- [0145] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養において、複数の細胞塊が継代されてもよい。
- [0146] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、培養器における培地の供給速度が変化してもよい。
- [0147] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞塊の数を算出してもよい。
- [0148] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出

された細胞塊の数に応じて、培養器における培地の供給速度が変化してもよい。

[0149] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置と、撮影装置で得られた画像に基づき、細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、算出された濁度の値と、関係と、に基づき、撮影された細胞塊の密度の値を算出する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0150] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置は、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。

[0151] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行されてもよい。

[0152] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0153] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、培養器において培地の供給速度が変化してもよい。

[0154] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置と、撮影装置で得られた画像における培地の色の値を算出し、算出された色の値と、関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0155] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、培養器において培地が交換されてもよい。

[0156] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地の色が、培地の色相であってもよい。

発明の効果

[0157] 本発明によれば、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供可能である。

図面の簡単な説明

[0158] [図1]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの模式図である。

[図2]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

[図3]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

[図4]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムで用いられる培養バッグの模式図である。

[図5]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器の模式図である。

[図6]本発明の実施の形態に係る補給培地送液ポンプと浮遊培養器の模式図である。

[図7]本発明の実施の形態に係る補給培地送液ポンプと浮遊培養器の模式図である。

[図8]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図9]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図10]本発明の実施の形態に係る細胞の画像の一例である。

[図11]本発明の実施の形態に係る中央演算処理装置の模式図である。

[図12]本発明の実施の形態に係る細胞塊の画像の一例である。

[図13]本発明の実施の形態に係る二値化処理された細胞塊の画像の一例である。

[図14]本発明の実施の形態に係るハイパスフィルタを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図15]本発明の実施の形態に係る分水嶺アルゴリズムを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図16]本発明の実施の形態に係るDistance Transform法

を適用された細胞塊の画像の一例である。

[図17]本発明の実施の形態に係る分水嶺アルゴリズムを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図18]本発明の実施の形態に係る複数領域に分割された細胞塊の画像の一例である。

[図19]本発明の実施の形態に係る輪郭が抽出された細胞塊の画像の一例である。

[図20]本発明の実施の形態に係る輪郭が抽出された細胞塊の画像の一例である。

[図21]本発明の実施の形態に係る細胞のサイズのヒストグラムの一列である。

[図22]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図23]本発明の実施の形態に係る培地のpHと培地の色相との関係を示すグラフの一例である。

[図24]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図25]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図26]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図27]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図28]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図29]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図30]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図31]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図32]本発明の実施の形態に係る分割された細胞塊の画像の一例である。

[図33]本発明の実施の形態に係る溶液置換器の模式図である。

[図34]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの模式図である。

[図35]実施例1に係る蛍光顕微鏡写真である。

[図36]実施例1に係る蛍光活性化フローサイトメーターによる分析結果を示すグラフである。

[図37]実施例2に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

[図38]実施例2に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

[図39]実施例2に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

[図40]実施例2に係るiPS細胞のコロニーの分化の状態を示すグラフである。

[図41]実施例3に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

[図42]実施例4の結果を示すグラフである。

[図43]実施例5に係るiPS細胞塊の写真である。

[図44]実施例5の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0159] 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るべきものである。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。

[0160] 本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図1に示すように、血液から細胞を分離する分離装置10と、分離装置10で分離された細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路20と、導入前細胞送液路20内に多能性誘導因子を送る誘導因子送液機構21と、導入前細胞送液路20に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置30と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置40と、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置100と、を備える。

[0161] 幹細胞製造システムは、さらに、分離装置10、導入前細胞送液路20、誘導因子送液機構21、因子導入装置30、細胞塊作製装置40、及びパッケージ装置100を格納する小型の筐体200を備える。

[0162] 幹細胞製造システムは、さらに、筐体200内の気体を清浄にする空気清浄装置、筐体200内の気体の温度を管理する温度管理装置、及び筐体200

0内の気体の二酸化炭素（CO₂）濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を備えていてもよい。空気清浄装置は、筐体200内の気体の清浄度を監視する清浄度センサーを備えていてもよい。空気清浄装置は、例えば、HEPA（High Efficiency Particulate Air）フィルター等を用いて、筐体200内の空気を清浄化する。空気清浄装置は、例えば、筐体200内の空気の清浄度を、ISO基準 14644-1でISO1からISO6のクラスにする。温度管理装置は、筐体200内の気体の温度を監視する温度センサーを備えていてもよい。CO₂濃度管理装置は、筐体200内の気体のCO₂濃度を監視するCO₂濃度センサーを備えていてもよい。

[0163] 筐体200には、例えば扉等が設けられているが、扉が閉じられた状態では、内部が完全に閉鎖され、内部の空気の清浄度、温度、及びCO₂濃度を一定に保つことが可能である。筐体200は、外部から内部の装置の状態を観察できるよう、透明であることが好ましい。また、筐体200は、ゴム手袋等のグローブが一体化された、グローブボックスであってもよい。

[0164] 分離装置10は、例えばヒトの血液が入ったバイアルを受け取る。分離装置10は、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液A液（ACD-A液、テルモ株式会社）等の抗凝固剤を保存する抗凝固剤タンクを備えている。分離装置10は、ポンプ等を用いて、抗凝固剤タンクから、ヒトの血液に、抗凝固剤を添加する。

[0165] また、分離装置10は、例えば、Ficoll-Paque PREMIUM（登録商標、GEヘルスケア・ジャパン株式会社）等の単核細胞分離用試薬を保存する分離用試薬タンクを備えている。分離装置10は、ポンプ等を用いて、分離用試薬タンクから、例えば15mLチューブ2本に、単核細胞分離用試薬を5mLずつ分注する。なお、チューブの代わりに、樹脂バッグを用いてもよい。

[0166] さらに、分離装置10は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等の緩衝液を保存する緩衝液タンクを備えている。分離装置10は、ポンプ等を用いて、

緩衝液タンクから、例えばヒトの血液 5 mL に、緩衝液 5 mL を加えて希釈する。またさらに、分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、希釈されヒトの血液を、チューブ中の単核細胞分離用試薬上に、5 mL ずつ加える。

[0167] 分離装置 10 は、温度設定可能な遠心機をさらに備える。遠心機は、例えば 18°C に設定される。分離装置 10 は、移動装置等を用いて、単核細胞分離用試薬及びヒトの血液等が入られたチューブを、遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば 400×g で 30 分間遠心する。チューブの代わりに、樹脂バッグを遠心させてもよい。

[0168] 遠心後、分離装置 10 は、チューブ中の溶液の単核球で白く濁った中間層をポンプ等で回収する。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、回収した単核球の懸濁液を、導入前細胞送液路 20 に送り出す。あるいは、さらに、分離装置 10 は、回収した単核球溶液 2 mL に対し、例えば PBS 12 mL を加えて、チューブを遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば 200×g で 10 分間遠心する。

[0169] 遠心後、分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、チューブ中の溶液の上清を吸引して除去し、X-VIVO 10（登録商標、ロンザジャパン株式会社）等の単核球培地 3 mL をチューブ中の単核球溶液に加えて懸濁する。分離装置 10 は、ポンプ等を用いて、単核球懸濁液を、導入前細胞送液路 20 に送り出す。なお、分離装置 10 は、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、皮膚等から予め分離された繊維芽細胞等の体細胞を使用する場合は、分離装置 10 は無くともよい。

[0170] 分離装置 10 は、遠心分離以外の方法で、誘導に適した細胞を分離してもよい。例えば、分離すべき細胞が T 細胞であれば CD3, CD4, CD8 のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞が血管内皮前駆細胞であれば CD34 が陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞が B 細胞であれば、CD10, CD19, CD20 のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。また、パニングに限らず、磁気細胞分離方法 (MACS) やフローサイトメト

リー等により分離してもよい。また、誘導に適した細胞は、血液由来の細胞に限定されない。

[0171] 誘導因子送液機構 21 は、誘導因子導入試薬溶液等を保存する誘導因子導入試薬タンクを備える。遺伝子導入試薬溶液等の誘導因子導入試薬溶液は、例えば、Human T Cell Nucleofector (登録商標、ロンザジャパン株式会社) 溶液等の電圧ポレーション溶液、サプリメント溶液、及びプラスミドセットを含む。プラスミドセットは、例えば、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F を 0.83 μ g、pCXLE-hSK を 0.83 μ g、pCE-hUL を 0.83 μ g、及び pCXWB-EBNA1 を 0.5 μ g 含む。誘導因子送液機構 21 は、マイクロポンプ等を用いて、誘導因子導入試薬溶液中に単核球懸濁液が懸濁されるように、誘導因子導入試薬溶液を、導入前細胞送液路 20 に送り出す。

[0172] 導入前細胞送液路 20 の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMA (poly 2-hydroxyethyl methacrylate) をコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、導入前細胞送液路 20 の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入前細胞送液路 20 の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、導入前細胞送液路 20 内の条件が、筐体 200 内の管理された温度及び CO₂濃度と同等になる。さらに、導入前細胞送液路 20 には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0173] 導入前細胞送液路 20 に接続された因子導入装置 30 は、例えば電圧ポレーターであり、誘導因子導入試薬溶液と単核球懸濁液の混合液を受け取り、単核球に対してプラスミドの電圧ポレーションを実施する。因子導入装置 30 は、電圧ポレーションを実施後、プラスミドを電圧ポレーションされた単核球を含む溶液に、単核球培地を加える。因子導入装置 30 は、ポンプ等を用いて、プラスミドを電圧ポレーションされた単核球 (以下、「誘導因子導入細胞」という。) を含む溶液を、導入細胞送液路 31 に送り出す。

[0174] なお、因子導入装置30は、エレクトロポレーターに限定されない。因子導入装置30は、細胞に初期化因子をコードしているRNAをリポフェクション法により導入してもよい。リポフェクション法とは、陰性荷電物質である核酸と、陽性荷電脂質と、の複合体を、電気的な相互作用により形成し、複合体をエンドサイトーシスや膜融合により細胞内に取り込ませる方法である。リポフェクション法は、細胞へのダメージが少なく、導入効率に優れており、操作が簡便であり、時間がかからない等の利点を有する。また、リポフェクション法においては、細胞のゲノムに初期化因子が挿入される可能性がないため、得られた幹細胞を全ゲノムシーケンスして、外来遺伝子の挿入の有無を確認する必要がない。多能性誘導因子としての初期化因子RNAは、例えば、Oct3/4のmRNA、Sox2のmRNA、Klf4のmRNA、及びc-MycのmRNAを含む。

[0175] 初期化因子RNAのリポフェクションには、例えば、低分子干渉RNA (siRNA) 或いはリポフェクション試薬が用いられる。RNAのリポフェクション試薬としては、siRNAのリポフェクション試薬及びmRNAのリポフェクション試薬が使用可能である。より具体的には、RNAのリポフェクション試薬としては、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamin (登録商標) 2000、Lipofectamin (登録商標) 3000、NeonTransfection System (Thermo Fisher Scientific)、Stemfect RNA transfection reagent (Stemfect)、NextFect (登録商標) RNA Transfection Reagent (Bioo Scientific)、Amaxa (登録商品) Human T cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1002)、Amaxa (登録商品) Human CD34 cell

Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1003)、及びReproRNA (登録商標) トランスフェクション試薬 (STEMCELL Technologies) 等が使用可能である。

[0176] 因子導入装置30が、リポフェクション法により細胞に初期化因子を導入する場合は、初期化因子RNA及び試薬等が、誘導因子送液機構21により導入前細胞送液路20に送り出される。

[0177] 導入細胞送液路31の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMAをコーティングして、非接着性にしてもよい。あるいは、導入細胞送液路31の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入細胞送液路31の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、導入細胞送液路31内の条件が、筐体200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。さらに、導入細胞送液路31には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。また、エレクトロポレーションの後は、多くの細胞が死に、死んだ細胞の細胞塊ができることがある。そのため、導入細胞送液路31に、死細胞塊を除去するフィルターを設けてもよい。あるいは、図2に示すように、導入細胞送液路31内部に、内径を断続的に変化させる一又は複数の襞を設けてもよい。またあるいは、図3に示すように、導入細胞送液路31の内径を断続的に変化させてもよい。

[0178] 図1に示すように、導入細胞送液路31に接続された細胞塊作製装置40は、因子導入装置30で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置50と、初期化培養装置50で樹立された幹細胞からなる細胞塊(細胞コロニー)を複数の細胞塊に分割する第1の分割機構60と、第1の分割機構60で分割された複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置70と、拡大培養装置70で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第2の分割機構80と、複数の細胞塊をパッケージ装置100に順次送る細胞塊搬送機構90と、を備える。

[0179] 初期化培養装置50は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、

初期化培養装置50は、ピペティングマシンを備える。初期化培養装置50は、導入細胞送液路31から誘導因子導入細胞を含む溶液を受け取り、ピペティングマシンで、溶液をウェルに分配する。初期化培養装置50は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば3、5、7日目に、StemFit（登録商標、味の素株式会社）等の幹細胞培地を加える。培地にサプリメントとして塩基性の線維芽細胞成長因子（basic FGF）を添加してもよい。なお、StemBeads FGF2（フナコシ）のような、FGF-2（basic FGF, bFGF, FGF-b）を培地に供給し続ける徐放性ビーズを培地に添加してもよい。また、FGFは不安定な場合があるので、ヘパリン模倣ポリマーをFGFに共役させ、FGFを安定化させてもよい。さらに、培地に、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）や、アクチビン（Activin）等を添加してもよい。初期化培養装置50は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば9日目に、培地交換を行い、以降、iPS細胞の細胞塊（コロニー）が1mmを越える程度まで、2日おきに培地交換を行う。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補給することも含む。

[0180] 細胞塊が形成されると、初期化培養装置50は、ピペティングマシンで細胞塊を回収し、回収した細胞塊にTrypLE Select（登録商標、ライフテクノロジーズ社）等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、初期化培養装置50は、回収した細胞塊が入っている容器をインキュベーターに入れて、37℃、CO₂5%で10分間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。例えば、初期化培養装置50は、ピペティングマシンによるピペティングにより、細胞塊を砕く。またあるいは、初期化培養装置50は、フィルターが設けられたパイプや、図2又は図3に示した導入細胞送液路31と同様に、内径を断続的に変化させるパイプに細胞塊を通して、細胞塊を砕いてもよい。その後、初期化培養装置50は、砕かれた細胞塊が入れられた溶液に、StemFit（登録商

標、味の素株式会社)等の多能性幹細胞用培地を加える。

- [0181] なお、初期化培養装置50における培養は、ウェルプレートではなく、CO₂透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム (gel lan gum) ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養でありながら、攪拌する必要がなく、一細胞由来の単一細胞塊を作製する事が出来るさらに、初期化培養装置50における培養は、ハンギングドロップ培養であってもよい。
- [0182] 初期化培養装置50は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグに培養液を含む培地を補給する第1の培地補給装置を備えていてもよい。第1の培地補給装置は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。また、その際、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、初期化培養装置50は、培地の温度を管理する温度管理装置、及び培地近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。
- [0183] 初期化培養装置50において、例えば、細胞を、図4に示すような透析膜等の培養液透過性のバッグ301に入れ、培養液透過性のバッグ301を、培養液非透過性のCO₂透過性のバッグ302に入れて、バッグ301、302に培養液を入れてもよい。初期化培養装置50は、新鮮な培養液が入ったバッグ302を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ301を入れるバッグ302を、新鮮な培養液が入っているバッグ302に交換してもよい。
- [0184] また、初期化培養装置50における培養方法は、上記の方法に限定されず、図5に示すような浮遊培養器を用いてもよい。図5に示す浮遊培養器は、誘導因子導入細胞とゲル培地が入られる透析チューブ75と、透析チューブ75が入られ、透析チューブ75の周囲にゲル培地が入られる容器7

6と、を備える。また、浮遊培養器は、透析チューブ75の周囲にゲル培地の水素イオン指数（pH）を測定するpHセンサーを備えていてもよい。

[0185] 透析チューブ75は、半透膜からなり、例えば、ROCK阻害剤を透過させる。透析チューブ75の分画分子量は、0.1kDa以上、10kDa以上、あるいは50kDa以上である。透析チューブ75は、例えば、セルロースエステル、エチルセルロース、セルロースエステル類、再生セルロース、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリメチルメタクリレート、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエステル系ポリマーアロイ、ポリカーボネート、ポリアミド、セルロースアセテート、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、銅アンモニウムレーヨン、鹼化セルロース、ヘモファン膜、フォスファチジルコリン膜、及びビタミンEコーティング膜等からなる。

[0186] 容器76としては、遠心チューブのような円錐チューブが使用可能である。容器76は、例えば、ポリプロピレンからなる。容器76は、CO₂透過性であってもよい。CO₂透過性の容器76としては、G-Rex（登録商標、Wilson Wolf）が使用可能である。

[0187] 誘導因子導入細胞は、透析チューブ75内に入れられる。ゲル培地は、攪拌されない。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まない。透析チューブ75には、透析チューブ75内に細胞を含む培地を送液するための送液路が接続されていてもよい。また、透析チューブ75には、透析チューブ75内の細胞を含む培地を容器外部に送液するための送液路が接続されていてもよい。

[0188] ゲル培地は、例えば、血液細胞培地又は幹細胞用培地に脱アシル化ジェランガムを終濃度が0.5重量%から0.001重量%、0.1重量%から0.005重量%、あるいは0.05重量%から0.01重量%となるよう添加することにより調製される。例えば、初期化培養の当初は、血液細胞培地から作製したゲル培地を用い、その後は、幹細胞用培地から作製したゲル培地を用いる。

- [0189] 幹細胞用培地としては、例えば、Primate ES Cell Medium (ReproCELL)等のヒトES/iPS培地を使用可能である。
- [0190] ただし、幹細胞用培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばPrimate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF (Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR (STEMCELL Technologies)、PluriSTEM (登録商標) Human ES/iPS Medium (Merck)、NutriStem (登録商標) XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium (Stemgent)、PluriSTEM (登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03 (Ajinomoto)、ESC-Sure (登録商標) serum and feeder free medium for hESC/iPS (Applied StemCell)、及びL7 (登録商標) hPSC Culture System (LONZA)等を利用してよい。
- [0191] ゲル培地は、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサントガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。
- [0192] あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide ter

minated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及び N-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

[0193] 透析チューブ75内に入れられるゲル培地は、ROCK阻害剤を含んでいなくてもよい。容器76内の透析チューブ75の周囲に入れられるゲル培地には、例えば、ROCK阻害剤を終濃度が $1000\ \mu\text{mol/L}$ 以上 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 以下、 $100\ \mu\text{mol/L}$ 以上 $1\ \mu\text{mol/L}$ 以下、あるいは $5\ \mu\text{mol/L}$ 以上 $20\ \mu\text{mol/L}$ 以下となるよう、毎日添加する。ROCK阻害剤を透析チューブ75の周囲のゲル培地に添加することにより、ROCK阻害剤が透析チューブ75内に浸透し、細胞によるコロニー形成が促進される。

[0194] ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF) やTGF- β 等の成長因子を含んでいてもよいし、含んでいなくともよい。

[0195] 透析チューブ75内で細胞を浮遊培養する間、容器76内の透析チューブ75の周囲のゲル培地は交換される。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補充することも含む。この場合、透析チューブ75内にゲル培地を補充しなくともよい。あるいは、透析チューブ75内で細胞を浮遊培養する間、透析チューブ75内にゲル培地が補充される。この場合、容器76内の透析チューブ75の周囲にゲル培地を補充しなくともよい。

[0196] 実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図6に示すように、培地補給装置としての補給培地送液ポンプ77を用いて、容器76内の透析チューブ75の周囲のゲル培地を、交換、あるいは補充する。補給培地送液ポンプ77としては、点滴に用いられるポンプ等が使用可能である。補給培地送液ポン

プ77と、浮遊培養器の容器76と、は、送液チューブ78で接続される。補給培地送液ポンプ77は、送液チューブ78を介して、浮遊培養器の容器76内にゲル培地を送液する。浮遊培養器の容器76には、廃液チューブ79が接続されている。浮遊培養器の容器76内のゲル培地は、廃液チューブ79を介して排出される。浮遊培養器の容器76内のゲル培地は、例えば、補給培地送液ポンプ77によって補給される新鮮なゲル培地による圧力によって排出されてもよいし、重力を利用して排出してもよいし、排出ポンプによって排出してもよい。

[0197] 補給培地送液ポンプ77から培養器に送液されるゲル培地の温度は、例えば、培養器中のゲル培地の温度が急激に変化しないように設定される。例えば、培養器中のゲル培地の温度が37℃である場合は、培養器に送液されるゲル培地の温度も37℃に設定される。ただし、培養器に送液される前の培地は、冷蔵保存部で、例えば4℃等の低温で冷蔵保存されていてもよい。

[0198] 例えば、補給培地送液ポンプ77によって浮遊培養器の容器76内に送液されるゲル培地の量と、浮遊培養器の容器76から排出されるゲル培地の量と、が同じになるよう、補給培地送液ポンプ77は制御される。補給培地送液ポンプ77は、浮遊培養器の容器76内に、常時、ゲル培地を送液してもよいし、適宜間隔をおいて、ゲル培地を送液してもよい。

[0199] ゲル培地を常時送液する場合、送液されるゲル培地の流量は、一定であっても、一定でなくてもよい。例えば、後述するように、培地及び培地中の細胞塊を撮影装置で監視し、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、送液されるゲル培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0200] また、ゲル培地を常時送液せずに、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、ゲル培地の送液の開始及び終了をしてもよい。この場合も、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、送液されるゲル培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0201] なお、培養器に送液されるゲル培地の流量が大きすぎると、培養器内の細胞がゲル培地の圧力によりダメージを受ける場合がある。そのため、培養器

に送液されるゲル培地の流量は、細胞がダメージを受けないように設定される。

[0202] 培地を交換せずに細胞の培養を続けると、細胞が排出する乳酸等の老廃物の蓄積や、pHの変化が、細胞培養に悪影響を及ぼしうる。また、培地中に含まれるbFGFやリコンビナントタンパク質等の様々なタンパク質が分解され、細胞の培養に必要な成分が培地から損なわれうる。

[0203] これに対し、補給培地送液ポンプ77で新鮮な培地を培養器中に送液し、古い培地を培養器から排出することにより、培養器中から老廃物を除去し、培地中のpHを適切な範囲内に保ち、細胞の培養に必要な成分を補給することが可能になる。これにより、培地の状態を一定に近い状態に保つことが可能である。

[0204] なお、図6においては、補給培地送液ポンプ77と、浮遊培養器の容器76と、が、送液チューブ78で接続される例を示した。これに対し、図7に示すように、補給培地送液ポンプ77と、浮遊培養器の容器76内の透析チューブ75内と、を送液チューブ78で接続してもよい。透析チューブ75内に新鮮なゲル培地を送液することにより、透析チューブ75内の培地に含まれる老廃物が、透析チューブ75外に排出される。また、透析チューブ75内の培地のpHを適切な範囲内に保ち、透析チューブ75内の培地に細胞の培養に必要な成分を補給することが可能である。

[0205] 図1に示す幹細胞製造システムは、初期化培養装置50における培養を撮影する写真カメラやビデオカメラ等の初期化培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、初期化培養装置50で使用される培地に無色の培地を用いると、有色の培地を用いた場合に生じうる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。ただし、培地のpHを確認するために、フェノールレッド等のpH指示薬を含んでいてもよい。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、初期化培養装置50における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あ

るいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はRNA抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えていてもよい。

[0206] シャーレのような平らなディッシュ上で細胞を培養している場合は、細胞の存在範囲は、平面的に広がる。そのため、撮影装置のレンズの光軸がディッシュ面と直交するよう、撮影装置とシャーレを配置すれば、シャーレ上のほぼ全ての細胞に焦点を合わせることが可能である。

[0207] しかし、細胞を培地の中に浮遊させて浮遊培養を行う場合、細胞の存在範囲が3次的に広がるため、撮影装置から各細胞までの光軸方向の距離にはばらつきが生じる。そのため、レンズを用いずに全ての細胞に焦点を合わせることが困難になりうる。

[0208] これに対し、明るいレンズ（F値の小さいレンズ）を用いたり、明るい照明を被測定対象物に照射しつつ、レンズの絞りをできるだけ絞って撮像したりすることにより、被写界深度を深くすることが可能である。

[0209] あるいは、レンズの焦点位置を少しずつ変化させながら複数枚の画像を撮像し、撮像した複数枚の画像を合成して、擬似的に深く焦点の合った画像を得てもよい。また、複数枚の画像のそれぞれは、焦点の合った細胞のと、焦点が合っていないぼやけた細胞と、が交ざった画像になる。そのため、複数枚の画像から焦点の合った部分画像を集めて、1枚の合成画像を生成してもよい。

[0210] あるいは、図8に示すように、初期化培養撮影装置171と、浮遊培養器内の細胞等の被写体と、の間には、テレセントリックレンズ172を配置してもよい。テレセントリックレンズ172は、細胞等の被写体からレンズ絞りの中心を通る主光線をレンズ光軸と平行にするため、初期化培養撮影装置171から浮遊培養器内の複数の細胞のそれぞれまでの距離が一様でなくても、撮像される細胞の大きさが距離に応じて変化しない。

[0211] 図9は、図8に示した浮遊培養器等を上方から見た模式図である。なお、

図9においては、図8に示した容器76が省略されている。初期化培養撮影装置171で細胞を撮像する場合、初期化培養撮影装置171の光軸に対して垂直な方向、あるいは垂直な方向から撮影装置に近い方向に細胞観察用照明光源173を配置し、細胞観察用照明光源173から細胞に照明光を照射する散乱光照明法を用いるとよい。これにより、細胞に当たった照明光による散乱光は初期化培養撮影装置171に届くが、細胞に当たらなかった照明光は培地を透過して初期化培養撮影装置171には届かなくなる。そのため、画像において培地の部分が相対的に暗くなり、細胞の部分の相対的に明るくなる。ただし、画像において細胞を認識できれば、照明法はこれに限定されない。図10は、散乱光照明法で撮像された細胞の画像の一例である。培地の部分が相対的に暗くなり、細胞の部分の相対的に明るくなっている。

[0212] 実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図11に示すように、初期化培養撮影装置171が撮像した画像を画像処理する画像処理部501を備える中央演算処理装置(CPU)500を備えていてもよい。CPU500には、キーボード及びマウス等の入力装置401、並びにモニター等の出力装置402が接続されていてもよい。CPU500は、バス及び画像インターフェース等を介して、初期化培養撮影装置171から画像を受け取る。

[0213] 画像処理部501は、細胞の画像において、細胞又は細胞塊の輪郭を定義する輪郭定義部511を備えていてもよい。図12は、マクロズームレンズ等を介して拡大して撮像されたiPS細胞塊の画像の一例である。図12に示す画像において、白い塊に見える部分がiPS細胞塊であり、背景の暗い部分が培地である。

[0214] ここで、図12に示す画像が8ビットのグレースケール画像である場合、所定の閾値以上の輝度の値を有する画素の輝度の値を例えば255のような最高輝度の値にし、所定の閾値未満の輝度の値を有する画素の輝度の値を例えば0のような最低輝度の値に置き換える二値化処理を画像に加えると、図13に示すように、培地の部分のみならず、細胞塊の内部も最低輝度の黒となり、細胞塊の内部と、培地の部分と、が連結した部分が生じうる。そのた

め、二値化処理では、細胞又は細胞塊を抽出できない場合がある。

[0215] これに対し、図11に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部511は、細胞の画像に、空間周波数に含まれる所定の周波数以上の高周波成分を通過させ、所定の周波数未満の低周波成分をブロックし、輝度値を例えば0のような最低値にするハイパスフィルタを適用する。細胞の画像において、細胞又は細胞塊の部分においては、空間周波数に含まれる高周波成分が多く、培地の部分においては、空間周波数に含まれる高周波成分が少ない。そのため、図14に示すように、ハイパスフィルタを適用された細胞の画像においては、培地の部分の輝度の値が、例えば0のような最低値となり、細胞又は細胞塊の部分においては、輝度の値がそのままとなる。そのため、輝度が最低値とならなかった部分を、細胞又は細胞塊であるとみなすことが可能である。

[0216] ここで、図14に示す画像において、輝度が最低値とならなかった部分をブロブ (Blob) として、ブロブ解析により検出しても、例えば、互いに接している2つの細胞塊を、1つの細胞塊として認識してしまう場合がある。

[0217] これに対し、図11に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部511は、ハイパスフィルタを適用した画像に、分水嶺アルゴリズムを適用する。分水嶺アルゴリズムは、画像の輝度勾配を山の起伏と見なし、山の高い位置 (輝度値の大きい位置) から低い位置 (輝度値の小さい位置) へと流れ込む水の作る区域を1つの領域とするように、画像の分割を行う。

[0218] 例えば、実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部511は、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にDistance Transform法で変換する。Distance Transform法とは、画像の各画素の輝度の値を、直近の背景画素までの距離に応じて置換する画像変換の方法である。例えば、図15(a)に示すように、ハイパスフィルタを適用した画像において、培地の領域の輝度値を、一括して最高輝度値である255に変換し、図15(b)に示すように白の背景にする。さらに

、細胞領域内部の各画素の輝度の値を、直近の背景画素までの距離に応じて、0以上255未満に変換する。例えば、直近の背景画素から離れるほど、輝度の値を低くする。

[0219] 次に、実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部511は、Distance Transform法で変換された画像に、分水嶺アルゴリズムを適用する。図15(b)に示す画像において、輝度の低い暗い部分を山の嶺とみなし、画像に対して垂直方向上から水を落としたときに、図15(c)の矢印に示すように、水がどのように流れて行くかを推測し、図15(c)の破線に示すように、様々な方向から流れてきた水がぶつかる箇所を谷とみなし、当該谷の底において、細胞領域を分割する。

[0220] 図14に示す画像の細胞領域の画素を、Distance Transform法で変換すると、図16で示す画像が得られる。図16で示す画像に分水嶺アルゴリズムを適用すると、図17に示す画像が得られる。得られた分割線を図12に示す元の画像に重ねると、図18に示す画像が得られる。図18において、分割線で分割された各領域に存在する細胞塊は、複数の細胞塊が接した塊ではなく、1個の細胞塊であるとみなすことが可能である。そのため、各領域において、図19に示すように、細胞塊の輪郭を抽出することにより、1個の細胞塊を正確に抽出することが可能となる。

[0221] 図11に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部501は、細胞評価部512をさらに備えていてもよい。細胞評価部512は、輪郭定義部511が抽出した1個の細胞塊の大きさ等を評価する。例えば、細胞評価部512は、輪郭定義部511が抽出した1個の細胞塊の面積を算出する。さらに、例えば、1個の細胞塊の形状が円形とみなせる場合、細胞評価部512は、下記(1)式を用いて、面積から、1個の細胞塊の直径を算出する。

$$D = 2 (s / \pi)^{1/2} \quad (1)$$

ここで、Dは直径、Sは面積を表す。

[0222] 細胞塊が大きく成長しすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部

に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎる状態のままROCK阻害剤を用いない拡大培養に移行すると、細胞死や核型異常が生じる場合がある。したがって、細胞評価部512は、個々の細胞塊の大きさが適切な範囲外になった場合、警告を発してもよい。また、細胞評価部512は、個々の細胞塊の大きさが所定の閾値以上になった場合、拡大培養に移行するタイミングであることを出力してもよい。さらに、算出された細胞塊の大きさに応じて、初期化培養装置50における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の大きさが大きくなるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0223] 実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部501は、画像処理された画像から得られる情報を統計処理する統計処理部513をさらに備えていてもよい。図20は、図10で示した画像に画像処理をして、細胞塊の部分を抽出して輪郭を付した例である。図21は、図20に示した画像に基づいて作成された、細胞塊のサイズのヒストグラムの一例である。このように、細胞の情報を連続的、かつ定期的に取得することにより、細胞塊の成長度、数、及び密集度等を定量的に把握することが可能であり、培養結果を安定化させることが可能である。また、算出された細胞塊の数に応じて、初期化培養装置50における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の数が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0224] 図11に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部501は、培地の画像から培地の濁度を算出し、培地の濁度に基づき、培地中の細胞塊の密度を算出する密度算出部514をさらに備えていてもよい。

[0225] 例えば、CPU500には、揮発性メモリ、又は不揮発性メモリ等を備える関係記憶装置403が接続されている。関係記憶装置403は、例えば、予め取得された、培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を保存する。密度算出部514は、関係記憶装置403から、濁度と密度の関係を読み出す。さらに、密度算出部514は、培地の画像から算出した培地の濁度の値と、濁度と密度の関係と、に基づいて、培地中の細胞塊の値の密度を算

出する。これにより、培地から細胞塊を採取することなく、非破壊的に、細胞塊の密度を測定することが可能である。

[0226] また、密度算出部514は、細胞塊の密度が所定の閾値以上になった場合、拡大培養に移行するするタイミングであることを出力してもよい。さらに、密度算出部514は、培地中の細胞塊の密度を経時的に算出し、細胞塊の増殖速度を算出してもよい。異常な増殖速度は、細胞が異常であることを表す場合がある。例えば、密度算出部514は、異常な増殖速度が算出された場合は、警告を発する。この場合、細胞の培養を中止してもよい。

[0227] 培地中の細胞塊の密度が高くなり、細胞塊同士の距離が近くなりすぎると、複数の細胞塊同士が接着して一つの大きな細胞塊となる場合がある。大きな細胞塊においては、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、内部の細胞が分化してしまう場合がある。反面、培地中の細胞塊の密度が好適な範囲より低いと、細胞塊の成長速度、及び細胞塊の形成能が著しく減少する場合がある。

[0228] これに対し、密度算出部514によれば、細胞塊の密度を算出することが可能であるため、細胞塊の密度が好適な範囲内にあるか否かを容易に判断することが可能である。細胞塊の密度が好適な範囲より低くなった場合は、例えば培養を中止する判断をしてもよい。さらに、算出された細胞塊の密度に応じて、初期化培養装置50における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の密度が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0229] また、細胞の代謝等に伴う培地の色の変化を観察するために、図22に示すように、浮遊培養器を挟んで初期化培養撮影装置171と対向する位置に、培地観察用照明光源174を配置してもよい。培地観察用照明光源174としては、例えば面光源が使用可能であり、培地観察用照明光源174は、例えば、白色平行光を発する。培地観察用照明光源174で発せられた照明光は、培地を透過して初期化培養撮影装置171に入射するため、初期化培養撮影装置171で培地の色を撮像することが可能である。

[0230] 通常、細胞培養を行う場合、培地のpHは6.8から7.2付近の一定の値にされる。培地のpHを測定する際には、培地にはフェノールレッド等のpH試薬が添加される。フェノールレッドは、培地のpHによって変化する。培地と接する気体中の二酸化炭素濃度が十分でない場合、培地に含まれる重炭酸由来の二酸化炭素と、気体中の二酸化炭素が平衡化しないため、培地はアルカリ性になり、培地の色は赤紫色になる。また、細胞が排出した乳酸を主とする老廃物が蓄積すると、培地は酸性になり、培地の色は黄色になる。培地が酸性になることは、培地中の栄養分が枯渇していることも表している。

[0231] 図11に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部501は、培地観察用照明光源で照明された培地の画像に基づいて、培地の評価をする培地評価部515をさらに備えていてもよい。培地評価部515は、例えば、培地の画像を画像処理して、HSVによって、培地の色を、色相(Hue)、彩度(Saturation)、明度(Value)の3つパラメータで表現する。このうち、色相は、一般に「色合い」とか「色味」といわれる概念に対応するパラメータである。色相は、一般に、角度の単位で表現される。

[0232] 図23は、培地を交換せずに細胞を長期間培養した場合における培地の色相の変化と、培地のpHの変化と、の関係を示すグラフの一例である。培養開始直後、培地のpHは7.7近くであったが、時間の経過とともに、培地のpHは7.1近くまで低下した。これに伴い、培地の色相も、培養開始直後は40近くであったのが、時間の経過とともに、60近くまで上昇した。このように、培地の色相は、培養時間、及び培地のpHと相関する。したがって、図11に示す培地評価部515は、培地の色相を監視することにより、培地の状態を判断する。

[0233] 例えば、関係記憶装置403は、予め取得された、培地の色相と、培地のpHと、の関係を保存する。培地評価部515は、関係記憶装置403から、色相とpHの関係を読み出す。さらに培地評価部515は、培地の画像か

ら算出した培地の色相の値と、色相とpHの関係と、に基づいて、撮影された培地のpHの値を算出する。例えば、培地評価部515は、経時的に培地の画像を取得し、培地のpHの値を算出してもよい。

[0234] なお、図7に示すように、培地のpHはpHセンサー271により測定してもよい。また、培地の温度を温度計272で測定してもよい。この場合、培地評価部515は、pHセンサー271から培地のpHの値を受信し、温度計272から培地の温度の値を受信してもよい。

[0235] 培地評価部515は、培地の色相又は培地のpHが所定の範囲以外になった場合、培地の交換を促進すると判断したり、培地においてコンタミネーションが生じていると判断したりしてもよい。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補充することも含む。

[0236] 培地の成分を化学的に分析することは、コストがかかり、また、化学的に培地を分析するために培地をシステムの外部に取り出すと、培地の無菌状態が保たれないおそれがある。これに対し、培地の色相を監視することにより、培地の状態を監視することは、低コストであり、また、培地の無菌状態に影響を与えない。

[0237] 培地評価部515が培地の色相又は培地のpHが所定の範囲以外であると判断した場合、例えば図6に示す補給培地送液ポンプ77によって、浮遊培養器の透析チューブ75の周囲の培地が交換される。あるいは、培地の交換が常にされている場合は、補給培地送液ポンプ77による浮遊培養器の透析チューブ75の周囲の培地の交換速度が上昇され、交換される培地の流量が上昇する。これにより、培地のpHを細胞培養に適した範囲に維持し、培地に十分な栄養分を補給することが可能である。

[0238] さらに、培地評価部515は、培地の色相の変化速度から、細胞の増殖速度を算出してもよい。例えば、関係記憶装置403は、予め取得された、培地の色相の変化速度と、細胞の増殖速度と、の関係を保存する。培地評価部515は、関係記憶装置403から、色相の変化速度と増殖速度の関係を読み出す。さらに、培地評価部515は、算出された色相の変化速度の値と、

色相の変化速度と増殖速度の関係と、に基づいて、細胞の増殖速度の値を算出する。

[0239] また、培地評価部 515 は、培地の温度が所定の範囲以外であると判断した場合、培養器の周囲の温度、あるいは供給される培地の温度を変更するよう、温度管理装置を制御してもよい。例えば、培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地評価部 515 は、培地の温度が上がるよう、温度管理装置を制御する。また、培地の温度が所定の範囲より高い場合は、培地評価部 515 は、培地の温度が下がるよう、温度管理装置を制御する。

[0240] 図 1 に示す初期化培養装置 50 には、第 1 細胞塊送液路 51 が接続されている。初期化培養装置 50 は、トリプシン代替組み替え酵素と細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第 1 細胞塊送液路 51 に送り出す。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。また、第 1 細胞塊送液路 51 は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。上述したように、ゲル培地を用いる場合は、ゲル培地を吸い上げることにより、細胞塊を回収することが可能である。

[0241] 細胞塊を含む溶液を第 1 細胞塊送液路 51 に送り出すポンプは、例えば、図 11 に示した細胞評価部 512 が算出した細胞塊の大きさの値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。あるいは、細胞塊を含む溶液を図 1 に示す第 1 細胞塊送液路 51 に送り出すポンプは、例えば、図 11 に示した密度算出部 514 が算出した細胞塊の密度の値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。

[0242] 図 1 に示す第 1 細胞塊送液路 51 の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMA をコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、第 1 細胞塊送液路 51 の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第 1 細胞塊送液路 51 の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、第 1 細胞塊送液路 51 内の条件が、筐体 200 内の管理された温度及び CO₂濃度と同等になる。さらに、第 1 細胞塊送液路

51には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0243] 第1細胞塊送液路51は、第1の分割機構60に接続されている。第1の分割機構60は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第1の分割機構60は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。

[0244] またあるいは、第1の分割機構60は、図24に示すように、末端ブロック61、連結ブロック62、及び先端ブロック63を備える細胞塊分割器を備えていてもよい。末端ブロック61、連結ブロック62、及び先端ブロック63は、それぞれ、内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられている。図25及び図26に示すように、末端ブロック61、連結ブロック62、及び先端ブロック63は連結される。細胞塊分割器は、一つの連結ブロック62を備えていてもよいし、複数の連結ブロック62を備えていてもよい。

[0245] 図24に示すように、連結ブロック62の第1の端部には凹部62aが、連結ブロック62の第1の端部と対向する第2の端部には凸部62bが設けられている。凸部62bは、例えば円柱状である。図25及び図26に示すように、連結ブロック62が複数ある場合、凸部62bは、隣接する連結ブロック62の凹部62aと勘合する。図24に示す凸部62bの側壁は、平滑であってもよいし、雄ネジが設けられていてもよい。凹部62aの内壁は、平滑であってもよいし、雌ネジが設けられていてもよい。

[0246] 連結ブロック62に設けられた貫通孔は、凹部62aと連通する第1の大孔径部62cと、第1の大孔径部62cと連通し、第1の大孔径部62cより孔径が小さい小孔径部62dと、小孔径部62dと連通し、小孔径部62

dより孔径が大きく、凸部62bの先端に開口を有する第2の大孔径部62eと、を有する。

[0247] 第1の大孔径部62c、小孔径部62d、及び第2の大孔径部62eのそれぞれの断面形状は、例えば円である。第1の大孔径部62cの孔径と、第2の大孔径部62eの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図25及び図26に示すように連結ブロック62が複数あり、複数の連結ブロック62を連結した場合に、第2の大孔径部62eが、隣接する連結ブロック62の第1の大孔径部62cと平滑に連通する。

[0248] 図24に示す第1及び第2の大孔径部62c、62eの孔径は、例えば2.0mm以上4.0mm以下であるが、特に限定されない。小孔径部62dの孔径は、例えば0.4mm以上1.2mm以下であるが、特に限定されない。第1の大孔径部62cから小孔径部62dに連続する部分には、段が形成されている。また、小孔径部62dから第2の大孔径部62eに連続する部分にも、段が形成されている。段の側壁は、貫通孔の中心軸に対して垂直であってもよいし、90°未満に傾斜していてもよい。

[0249] 連結ブロック62の第1及び第2の大孔径部62c、62eの中心軸と、小孔径部62dの中心軸と、は、一致していてもよい。あるいは、図27に示すように、連結ブロック62の第1及び第2の大孔径部62c、62eの中心軸と、小孔径部62dの中心軸と、は、オフセットしていてもよい。

[0250] 図24に示す先端ブロック63の第1の端部には凹部63aが、先端ブロック63の第1の端部と対向する第2の端部にはノズル部63bが設けられている。先端ブロック63と、連結ブロック62と、を連結する際、先端ブロック63の凹部63aは、連結ブロック62の凸部62bと勘合する。凹部63aの内壁は、平滑であってもよいし、雌ネジが設けられていてもよい。

[0251] 先端ブロック63に設けられた貫通孔は、凹部63aと連通する大孔径部63cと、大孔径部63cと連通し、大孔径部63cより孔径が小さく、ノズル部63bの先端に開口を有する小孔径部63dと、を有する。

- [0252] 大孔径部63c及び小孔径部63dのそれぞれの断面形状は、例えば円である。先端ブロック63の大孔径部63cの孔径と、連結ブロック62の第2の大孔径部62eの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図25及び図26に示すように、連結ブロック62と、先端ブロック63と、を連結した場合に、連結ブロック62の第2の大孔径部62eが、隣接する先端ブロック63の大孔径部63cと平滑に連通する。
- [0253] 図24に示す大孔径部63cの孔径は、例えば2.0mm以上4.0mm以下であるが、特に限定されない。小孔径部63dの孔径は、例えば0.4mm以上1.2mm以下であるが、特に限定されない。大孔径部63cから小孔径部63dに連続する部分には、段が形成されている。段の側壁は、貫通孔の中心軸に対して垂直であってもよいし、90°未満に傾斜していてもよい。
- [0254] 末端ブロック61の第1の端部には凹部61aが、末端ブロック61の第1の端部と対向する第2の端部には凸部61bが設けられている。末端ブロック61と、連結ブロック62と、を連結する際、末端ブロックの凸部61bは、連結ブロック62の凹部62aと吻合する。末端ブロックの凸部61bの側壁は、平滑であってもよいし、雄ネジが設けられていてもよい。
- [0255] 末端ブロック61に設けられた貫通孔は、凹部61aと連通し、凸部61bの先端に開口を有する大孔径部61cを少なくとも有する。
- [0256] 凹部61a及び大孔径部61cのそれぞれの断面形状は、例えば円である。末端ブロック61の大孔径部61cの孔径と、連結ブロック62の第2の大孔径部62eの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図25及び図26に示すように、末端ブロック61と、連結ブロック62と、を連結した場合に、末端ブロック61の大孔径部61cが、隣接する連結ブロック62の大孔径部62cと平滑に連通する。
- [0257] 図24に示す大孔径部61cの孔径は、例えば2.0mm以上4.0mm以下であるが、特に限定されない。
- [0258] 末端ブロック61、連結ブロック62、及び先端ブロック63のそれぞれ

の材料としては、ポリプロピレン等の樹脂が挙げられるが、これに限定されない。

[0259] 図25、図26、及び図27に示すように、末端ブロック61の凹部61aには、例えば、挿入ノズル64が挿入される。挿入ノズル64には、直接、又はチューブ等を介して、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器が接続される。末端ブロック61、連結ブロック62、及び先端ブロック63を連結し、先端ブロック63のノズル部63bを、細胞塊を含む培地に刺し、吸引排出器で培地の吸引排出を1回するか、あるいは培地の吸引排出を繰り返すと、細胞塊を含む培地は、連結ブロック62、及び先端ブロック63内の貫通孔内を往復する。連結ブロック62、及び先端ブロック63内の貫通孔には、段が設けられているため、培地中の細胞塊は効率的に小さな細胞塊に分割される。

[0260] 従来、細胞塊の分割は、テクニシャンがピペットマン等を用いて行っていた。しかし、図32(a)に示すように、従来の方法では、分割された細胞塊の大きさが不均一であった。また、テクニシャンによって、得られる細胞塊の大きさがまちまちであった。分割後の細胞塊が大きすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎると、ROCK阻害剤を用いない場合、細胞死や核型異常が生じる場合がある。これに対し、図25、図26、及び図27に示したような細胞塊分割器を用いると、図32(b)に示すように、細胞塊を、均一な大きさの細胞塊に分割することが可能である。なお、細胞塊分割器を用いて細胞塊を分割する際に、培地が、トリプシン、あるいはTrypLE Express (登録商標、ThermoFisher Scientific)、TrypLE Select (登録商標、ThermoFisher Scientific)、又はTrypLE Select (登録商標、ThermoFisher Scientific)等の酵素を含んでいてもよい。また、連結ブロック62を増やしたり、培地を吸引排出する際の圧力を上昇させたりすることにより、細胞塊をシングルセルにま

で分解することも可能である。

[0261] なお、大孔径部と小孔径部の適当な繰り返し数、長さ等が決定された場合は、細胞塊分割器は、複数のブロックから構成されなくともよい。例えば、細胞塊分割器は、図28に示すような、内部に貫通孔を有する一体型の柱状形状を有し、細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が、大孔径部65a、65c、65e、65gと、大孔径部65a、65c、65e、65gと連通し、大孔径部65a、65c、65e、65gより孔径が小さい小孔径部65b、65d、65fと、を交互に有していてもよい。この場合も、図29に示すように、大孔径部65a、65c、65e、65gの中心軸と、小孔径部65b、65d、65fの少なくとも一部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0262] また、細胞塊分割器に1回のみ培地を通して、培地中の細胞塊を小さな細胞塊に分割してもよい。その場合、図30に示すように、細胞塊分割器の両端にチューブ等を挿入可能な挿入部66a、66bを設けてもよい。培地は、挿入部66aから貫通孔を経て挿入部66bから排出され、その間に、培地に含まれる細胞塊が分割される。この場合も、図31に示すように、大孔径部65a、65c、65e、65gの中心軸と、小孔径部65b、65d、65fの少なくとも一部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0263] 図1に示す第1の分割機構60には、拡大培養装置70が接続されている。第1の分割機構60で分割された細胞塊を含む溶液は、拡大培養装置70に送られる。

[0264] 拡大培養装置70は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、拡大培養装置70は、ピペッティングマシンを備える。拡大培養装置70は、第1の分割機構60から複数の細胞塊を含む溶液を受け取り、ピペッティングマシンで、溶液をウェルに分配する。拡大培養装置70は、ウェルに細胞塊を分配後、37℃、CO₂5%で細胞塊を例えば8日前後培養する。また、拡大培養装置70は、適宜培地交換を行う。

[0265] その後、拡大培養装置70は、細胞塊にTrypLE Select (登

録商標、ライフテクノロジーズ社)等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、拡大培養装置70は、細胞塊が入っている容器をインキュベーターに入れて、37℃、CO₂5%で1分間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。例えば、拡大培養装置70は、ピペティングマシンによるピペティングにより、細胞塊を砕く。またあるいは、拡大培養装置70は、フィルターが設けられたパイプや、図2又は図3に示した導入細胞送液路31と同様に、内径を断続的に変化させるパイプに細胞塊を通して、細胞塊を砕いてもよい。その後、拡大培養装置70は、細胞塊が入れられた溶液に、維持培養培地等の培地を加える。さらに、拡大培養装置70は、接着培養である場合は、自動セルスクレーパー等で容器から細胞塊を剥がし、細胞塊を含む溶液を、拡大培養送液路71を介して、第1の分割機構60に送る。

[0266] なお、拡大培養装置70における培養は、ウェルプレートではなく、CO₂透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよいし、ハンギングドロップ培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム (gellan gum) ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養でありながら、攪拌する必要がない。

[0267] 拡大培養装置70は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグに培養液を補給する第2の培地補給装置を備えていてもよい。第2の培地補給装置は、ウェルプレートやCO₂透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。また、その際、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、拡大培養装置70は、培地の温度を管理する温度管理装置、及び培地近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。

[0268] 拡大培養装置70においても、例えば、細胞を、図4に示すような透析膜

等の培養液透過性のバッグ301に入れ、培養液透過性のバッグ301を、培養液非透過性のCO₂透過性のバッグ302に入れて、バッグ301、302に培養液を入れてもよい。初期化培養装置50は、新鮮な培養液が入ったバッグ302を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ301を入れるバッグ302を、新鮮な培養液が入っているバッグ302に交換してもよい。

[0269] また、拡大培養装置70における培養方法は、上記の方法に限定されず、初期化培養装置50における培養方法と同様に、図5に示すような浮遊培養器を用いてもよい。拡大培養装置70においては、図5に示す浮遊培養器の透析チューブ75に、複数の細胞塊が入れられる。浮遊培養器の詳細は、上述したとおりである。また、拡大培養装置70においても、図6に示すように、補給培地送液ポンプ77を用いて、容器76内の透析チューブ75の周囲のゲル培地を、交換、あるいは補給する。あるいは、図7に示すように、補給培地送液ポンプ77と、浮遊培養器の容器76内の透析チューブ75内と、を送液チューブ78で接続して、透析チューブ75内の培地に細胞の培養に必要な成分を補給してもよい。

[0270] 図1に示す幹細胞製造システムは、拡大培養装置70における培養を撮影する拡大培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、拡大培養装置70で使用される培地に無色の培地を用いると、有色の培地を用いた場合に生じる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。ただし、培地のpHを確認するために、フェノールレッド等のpH指示薬を含んでいてもよい。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、拡大培養装置70における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あるいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はRNA抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えて

いてもよい。

[0271] 拡大培養撮影装置は、図8に示した初期化培養撮影装置171と同様であり、テレセントリックレンズ172を介して拡大培養装置70における培養を撮影してもよい。拡大培養撮影装置が撮影する際の照明の方法等も、初期化培養撮影装置171が撮影する際の照明の方法等と同様であり、上述したとおりである。

[0272] 拡大培養撮影装置も、図11に示す画像処理部501を備えるCPU500と接続されている。輪郭定義部511、細胞評価部512、統計処理部513、密度算出部514、及び培地評価部515を備える画像処理部501は、初期化培養撮影装置171が撮像した画像と同様に、拡大培養撮影装置が撮像した画像を画像処理する。画像処理部501の詳細は、上述したとおりである。

[0273] 例えば、拡大培養において、細胞塊が大きく成長しすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎる状態のまま継代すると、ROCK阻害剤を用いない場合、細胞死や核型異常が生じる場合がある。したがって、細胞評価部512は、個々の細胞塊の大きさが適切な範囲外になった場合、警告を発してもよい。また、細胞評価部512は、個々の細胞塊の大きさが所定の閾値以上になった場合、継代するタイミングであることを出力してもよい。この場合、細胞塊を粉砕して個々の細胞塊を小さくし、再度培養器中で培養を再開する継代をしてもよい。さらに、継代において細胞塊を破砕した後に個々の細胞塊の大きさを算出することにより、破砕が適切になされたか否かを判断することも可能である。またさらに、算出された細胞塊の大きさに応じて、拡大培養装置70における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の大きさが大きくなるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0274] また、統計処理部513で算出された細胞塊の数に応じて、拡大培養装置70における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の数が増

えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0275] 密度算出部 514 は、細胞塊の密度が所定の閾値以上になった場合、継代するタイミングであることを出力してもよい。細胞塊の密度が好適な範囲より高くなった場合は、例えば継代することにより、細胞塊の密度を好適な範囲内に調整することが可能である。さらに、継代において細胞塊を破碎した後に細胞塊の密度を算出することにより、破碎が適切になされたか否かを判断することも可能である。さらに、算出された細胞塊の密度に応じて、拡大培養装置 70 における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の密度が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0276] 培地評価部 515 が培地の色相又は培地の pH が所定の範囲以外であると判断した場合、拡大培養装置 70 においても、例えば図 6 に示す補給培地送液ポンプ 77 によって、浮遊培養器の透析チューブ 75 の周囲の培地が交換される。あるいは、培地の交換が常にされている場合は、補給培地送液ポンプ 77 による浮遊培養器の透析チューブ 75 の周囲の培地の交換速度が上昇され、交換される培地の流量が上昇する。これにより、培地の pH を細胞培養に適した範囲に維持し、培地に十分な栄養分を補給することが可能である。

[0277] 図 1 に示す第 1 の分割機構 60 で分割された細胞塊は、再び拡大培養装置 70 内で培養される。必要な細胞の量が得られるまで、第 1 の分割機構 60 における細胞塊の分割と、拡大培養装置 70 内での細胞塊の培養が繰り返される。

[0278] 拡大培養装置 70 中の細胞塊を含む溶液を、拡大培養送液路 71 を介して、第 1 の分割機構 60 に送り出すポンプは、例えば、図 11 に示した細胞評価部 512 が算出した細胞塊の大きさの値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。あるいは、細胞塊を含む溶液を図 1 に示す第 1 細胞塊送液路 51 に送り出すポンプは、例えば、図 11 に示した密度算出部 514 が算出した細胞塊の密度の値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。

- [0279] 拡大培養装置 70 には、第 2 細胞塊送液路 72 が接続されている。拡大培養装置 70 は、拡大培養され、容器から剥離された細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第 2 細胞塊送液路 72 に送り出す。ただし、浮遊培養の場合は、剥離は不要である。第 2 細胞塊送液路 72 は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。
- [0280] 第 2 細胞塊送液路 72 の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMA をコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、第 2 細胞塊送液路 72 の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第 2 細胞塊送液路 72 の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、第 2 細胞塊送液路 72 内の条件が、筐体 200 内の管理された温度及び CO₂濃度と同等になる。さらに、第 2 細胞塊送液路 72 には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。
- [0281] 第 2 細胞塊送液路 72 は、第 2 の分割機構 80 に接続されている。第 2 の分割機構 80 は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第 2 の分割機構 80 は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。
- [0282] あるいは、第 2 の分割機構 80 は、第 1 の分割機構 60 と同様に、図 24 から図 27 に示す末端ブロック 61、連結ブロック 62、及び先端ブロック 63 を備える細胞塊分割器、あるいは図 28 から図 31 に示す一体型の細胞分割器を備えていてもよい。細胞塊分割器の詳細は、上述したとおりである。
- [0283] 図 1 に示す第 2 の分割機構 80 に、複数の細胞塊をパッケージ装置 100 に順次送る細胞塊搬送機構 90 が接続されている。細胞塊搬送機構 90 と、

パッケージ装置100と、の間には、パッケージ前細胞流路91が接続されている。細胞塊搬送機構90は、ポンプ等を用いて、第2の分割機構80で分割された細胞塊のそれぞれを、パッケージ前細胞流路91を介して、パッケージ装置100に順次送る。

[0284] パッケージ前細胞流路91には、細胞が接着しないよう、poly-HEMAをコーティングしてもよい。あるいは、パッケージ前細胞流路91の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、パッケージ前細胞流路91の材料に、温度伝導率が良く、CO₂透過性の材料を用いることにより、パッケージ前細胞流路91内の条件が、筐体200内の管理された温度及びCO₂濃度と同等になる。パッケージ前細胞流路91には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0285] パッケージ前細胞流路91には、凍結保存液送液機構110が接続されている。凍結保存液送液機構110は、細胞凍結保存液をパッケージ前細胞流路91に送り込む。これにより、パッケージ前細胞流路91内で、細胞塊が細胞凍結保存液で懸濁される。

[0286] パッケージ装置100は、パッケージ前細胞流路91を介して送られてきた複数の細胞塊のそれぞれを順次凍結する。例えば、パッケージ装置100は、細胞塊を受け取るたびに細胞塊をクライオチューブ等の凍結保存容器に入れ、細胞塊溶液を例えば-80℃以下で瞬間的に凍結する。体積あたりの表面積が小さい凍結保存容器を用いると、凍結に時間がかかる傾向にあるため、体積あたりの表面積が大きい凍結保存容器を用いることが好ましい。体積あたりの表面積が大きい凍結保存容器を用いることにより、解凍後の細胞の生存率を高くすることが可能となる。凍結保存容器の形状としては、キャピラリー状及び球状が挙げられるが、これらに限定されない。また、必要とされる解凍後の細胞の生存率によっては、必ずしも瞬間凍結をしなくともよい。

[0287] 凍結には、例えば、ガラス化(Vitrification)法を用いる。この場合、細胞凍結保存液としては、DAP213(コスモバイオ株式会

社)及びFreezing Medium (リプロセル株式会社)が使用可能である。凍結は、ガラス化法以外の通常の方法で行ってもよい。この場合、細胞凍結保存液としては、CryoDefend- Stem Cell (R&Dシステム社)や、STEM-CELL BANKER (登録商標、日本全薬工業株式会社)等が使用可能である。凍結は、液体窒素によって行ってもよいし、ペルチェ素子によっておこなってもよい。ペルチェ素子を用いると、温度変化を制御したり、温度のムラを抑制したりすることが可能となる。パッケージ装置100は、凍結保存容器を、筐体200の外に搬出する。凍結細胞が臨床用途である場合は、凍結保存容器は完全閉鎖系であることが好ましい。ただし、パッケージ装置100は、幹細胞を凍結することなく、保存容器内にパッケージしてもよい。

[0288] あるいは、パッケージ装置100においては、図33に示すような溶液置換器101を用いて、細胞塊の溶液を培地から凍結保存液に置換してもよい。溶液置換器101の内部には、底面上に、細胞塊が透過しない細孔が設けられたフィルター102が設けられている。また、溶液置換器101には、内部のフィルター102上に細胞塊を含む培地を送液する第1の送液流路103が接続された細胞塊導入孔、内部のフィルター102上に細胞塊を含まない凍結液を送液する第2の送液流路104が接続された置換溶液導入孔、内部のフィルター102上から細胞塊を含む凍結液を排出する第1の排出流路105が接続された細胞塊流出孔が設けられている。さらに、溶液置換器101には、フィルター102を透過した溶液を排出する第2の排出流路106が接続された廃液流出孔が設けられている。第1の送液流路103、第2の送液流路104、第1の排出流路105、及び第2の排出流路106のそれぞれには、チューブ等が使用可能である。

[0289] まず、図33(a)及び図33(b)に示すように、第2の排出流路106における溶液の流動を停止させた状態で、第1の送液流路103から溶液置換器101内部に、細胞塊を含む培地を入れる。次に、図33(c)に示すように、第2の排出流路106における溶液の流動を許容する状態にし、

培地を溶液置換器 101 から排出する。この際、図 33 (d) に示すように、細胞塊は、フィルター 102 上に残る。さらに、図 33 (e) 及び図 33 (f) に示すように、第 2 の排出流路 106 における溶液の流動を停止させた状態で、第 2 の送液流路 104 から溶液置換器 101 内部に、凍結保存液を入れ、凍結保存液中に細胞塊を分散させる。その後、図 33 (g) に示すように、第 1 の排出流路 105 から、細胞塊を含む凍結保存液を排出する。細胞塊を含む凍結保存液は、第 1 の排出流路 105 を経由して、凍結保存容器等に送られる。

[0290] なお、図 33 に示す溶液置換器 101 は、培地から凍結保存液への置換だけでなく、古い培地から新しい培地への置換にも使用可能である。この場合、第 2 の送液流路 104 は、新しい培地を送液する。あるいは、溶液置換器 101 は、細胞塊を分割する際に、培地を、細胞塊分割酵素を含む溶液に置換するためにも使用することができる。細胞塊分割酵素の例としては、例えば、トリプシンや、TrypLE Select (登録商標、ライフテクノロジー社) 等のトリプシン代替組み替え酵素が挙げられる。この場合、第 2 の送液流路 104 は、細胞塊分割酵素を含む溶液を送液する。

[0291] 図 1 に示す幹細胞製造システムは、パッケージ装置 100 におけるパッケージ工程を撮影するパッケージ工程撮影装置をさらに備えていてもよい。

[0292] 幹細胞製造システムは、筐体 200 内を滅菌する滅菌装置をさらに備えていてもよい。滅菌装置は、乾熱滅菌装置であってもよい。この場合、分離装置 10、導入前細胞送液路 20、誘導因子送液機構 21、因子導入装置 30、細胞塊作製装置 40、及びパッケージ装置 100 等の電気を使用する装置の配線は、耐熱性を有する配線であることが好ましい。あるいは、滅菌装置は、オゾンガス、過酸化水素ガス、又はホルマリンガス等の滅菌ガスを筐体 200 内に放出して、筐体 200 内を滅菌してもよい。

[0293] 幹細胞製造システムは、分離装置 10、導入前細胞送液路 20、誘導因子送液機構 21、因子導入装置 30、細胞塊作製装置 40、及びパッケージ装置 100 等の動作記録、並びに撮影装置が撮影した画像を、有線又は無線に

より、外部のサーバーに送信してもよい。また、外部のサーバーにおいて、ニューラルネットワークにより、例えば、誘導因子導入条件、培養条件、及び凍結条件等の条件と、幹細胞の不完全な初期化、幹細胞の分化及び増殖の失敗、及び染色体異常等の結果と、の関連を分析し、結果を導く条件を抽出したり、結果を予測したりしてもよい。さらに、外部サーバーは、標準作業手順（SOP）に基づいて、幹細胞製造システムの分離装置10、誘導因子送液機構21、因子導入装置30、細胞塊作製装置40、及びパッケージ装置100等を制御し、SOPに基づいて各装置が稼働しているか否かを監視し、各装置の稼働記録を自動的に生成してもよい。

[0294] 以上説明した幹細胞製造システムによれば、全自動で、iPS細胞等の幹細胞の誘導、樹立、拡大培養、及び凍結保存を一括して行うことが可能となる。

[0295] なお、実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図1に示す構成に限定されない。例えば、図34に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムにおいては、血液保存部201から単核球分離部203に、血液送液路202を経由して血液が送液される。血液保存部201及び単核球分離部203としては、例えばチューブが使用可能である。血液送液路202は、例えば、樹脂チューブやシリコンチューブ等である。後述する他の送液路も同様である。血液保存部201には、バーコード等の識別子を付けて、血液の情報を管理してもよい。送液には、ポンプ204が使用される。ポンプ204としては、容積式ポンプが使用可能である。容積式ポンプの例としては、ピストンポンプ、プランジャーポンプ、及びダイヤフラムポンプを含む往復ポンプ、あるいは、ギアポンプ、ベーンポンプ、及びネジポンプを含む回転ポンプが挙げられる。ダイヤフラムポンプの例としては、チュービングポンプ及び圧電（ピエゾ）ポンプが挙げられる。チュービングポンプの例としては、ペリスタポンプ（登録商標、アトー株式会社）、並びにRP-Q1及びRP-TX（高砂電気工業株式会社）が挙げられる。圧電ポンプの例としては、SDMP304、SDP306、SDM320、及びAPP-20KG（高砂電気

工業株式会社)が挙げられる。また、様々な種類のポンプを組み合わせたマイクロ流体チップモジュール(高砂電気工業株式会社)を用いてもよい。ペリスタポンプ(登録商標)、チュービングポンプ、及びダイヤフラムポンプ等の密閉型ポンプを用いると、血液送液路202内部の血液にポンプが直接接触することなく、送液することが可能である。後述する他のポンプにおいても同様である。あるいは、ポンプ204、並びに後述するポンプ207、ポンプ216、ポンプ222、ポンプ225、ポンプ234、ポンプ242、及びポンプ252としては、シリンジポンプを使用してもよい。密閉型ポンプ以外のポンプであっても、加熱滅菌処理等により再利用が可能である。

[0296] 単核球分離部203には、分離剤保存部205から、送液路206及びポンプ207を介して、赤血球凝固剤が送られる。分離剤保存部205としては、例えばチューブが使用可能である。分離剤保存部205には、バーコード等の識別子を付けて、分離剤の情報を管理してもよい。赤血球凝固剤としては、例えば、HetaSep(登録商標、STEMCELL Technologies)や赤血球凝固剤(ニプロ)等が使用可能である。単核球分離部203内において、赤血球凝固剤によって赤血球が沈降し、単核球が分離される。単核球分離部203内の単核球を含む上澄みは、単核球送液路208及びポンプ209を介して、単核球精製フィルター210に送られる。単核球精製フィルター210において、単核球以外の成分が除去され、単核球を含む溶液が得られる。単核球精製フィルター210としては、Purecell(登録商標、PALL)、セルソーバE(旭化成株式会社)、セパセルPL(旭化成株式会社)、アダカラム(登録商標、JIMRO)、及び分離バック(ニプロ株式会社)等が使用可能である。

[0297] 図34においては、単核球分離部203、分離剤保存部205、単核球精製フィルター210、及びポンプ204、207、209等が、分離装置を構成している。

[0298] 単核球を含む溶液は、導入前細胞送液路211及びポンプ212を介して、因子導入部213に送られる。因子導入部213としては、例えばチュー

ブが使用可能である。因子導入部 213 には、多能性誘導因子を含む因子保存部 214 から、因子送液路 215 及びポンプ 216 を介して、多能性誘導因子が送られる。因子保存部 214 としては、例えばチューブが使用可能である。因子保存部 214 には、バーコード等の識別子を付けて、多能性誘導因子の情報を管理してもよい。因子保存部 214 及びポンプ 216 等が、誘導因子送液機構を構成している。因子導入装置としての因子導入部 213 において、多能性誘導因子が、例えば RNA リポフェクション法によって細胞に導入され、誘導因子導入細胞が作製される。ただし、誘導因子のトランスフェクションの方法は、RNA リポフェクション法に限定されない。例えば、多能性誘導因子を含むセンダイウイルスベクターを用いてもよい。あるいは、多能性誘導因子がタンパク質であってもよい。

[0299] 誘導因子導入細胞は、導入細胞送液路 217 及びポンプ 218 を介して、細胞塊作製装置の一部としての初期化培養器 219 に送られる。導入細胞送液路 217 は、例えば、温度透過性かつ CO₂ 透過性である。初期化培養器 219 としては、図 5 に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、誘導因子導入細胞は、透析チューブ内に入れられる。図 34 に示す初期化培養器 219 には、細胞に多能性誘導因子が導入されてから最初の数日間、血液細胞培地を含む血液細胞培地保存部 220 から、培地送液路 221 及びポンプ 222 を介して、血液細胞培地が補給される。培地送液路 221 は、例えば、温度透過性かつ CO₂ 透過性である。血液細胞培地保存部 220 には、バーコード等の識別子を付けて、血液細胞培地の情報を管理してもよい。血液細胞培地保存部 220、培地送液路 221、及びポンプ 222 は、培地補給装置を構成している。ポンプ 222 は、図 11 に示した CPU 500 の指示に従って、血液細胞培地を連続的に補給してもよいし、血液細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0300] その後、図 34 に示す初期化培養器 219 には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部 223 から、培地送液路 224 及びポンプ 225 を介して、幹細胞培地が補給される。幹細胞培地保存部 223 には、バーコード等の識別子

を付けて、幹細胞培地の情報を管理してもよい。培地送液路 224 は、例えば、温度透過性かつ CO₂ 透過性である。幹細胞培地保存部 223、培地送液路 224、及びポンプ 225 は、培地補給装置を構成している。ポンプ 225 は、図 11 に示した CPU 500 の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0301] 血液細胞培地保存部 220 及び幹細胞培地保存部 223 は、例えば、冷蔵保存部 259 で 4℃等の低温で冷蔵保存されていてもよい。血液細胞培地保存部 220 及び幹細胞培地保存部 223 から送られる培地は、例えば、冷蔵保存部 259 の外の加熱器で 37℃に昇温されてから培養器に送れてもよい。あるいは、低温保存されていた培地は、送液路を進む間に 37℃に昇温するよう、送液路の周囲の温度を設定してもよい。初期化培養器 219 内の古くなった培地は、廃液送液路 226 及びポンプ 227 を介して、廃液保管部 228 に送られる。廃液保管部 228 には、バーコード等の識別子を付けて、廃液の情報を管理してもよい。

[0302] 初期化培養器 219 で培養された細胞塊は、導入細胞送液路 229、ポンプ 230、及び細胞塊分割器 231 を介して、細胞塊作製装置の一部としての第 1 の拡大培養器 232 へ送られる。細胞塊分割器 231 は、例えば、図 30 又は図 31 に示す構成を備えていてもよい。細胞塊分割器 231 を通過することにより、細胞塊は、より小さな細胞塊に分割される。図 34 に示す第 1 の拡大培養器 232 としては、図 5 に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、細胞塊は、透析チューブ内に入れられる。図 34 に示す第 1 の拡大培養器 232 には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部 223 から、培地送液路 233 及びポンプ 234 を介して、幹細胞培地が補給される。導入細胞送液路 229 及び培地送液路 233 は、例えば、温度透過性かつ CO₂ 透過性である。幹細胞培地保存部 223、培地送液路 233、及びポンプ 234 は、培地補給装置を構成している。ポンプ 234 は、図 11 に示した CPU 500 の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

- [0303] 図34に示す第1の拡大培養器232内の古くなった培地は、廃液送液路235及びポンプ236を介して、廃液保管部228に送られる。
- [0304] 第1の拡大培養器232で培養された細胞塊は、導入細胞送液路237、ポンプ238、細胞塊分割器239を経て、細胞塊作製装置の一部としての第2の拡大培養器240へ送られる。細胞塊分割器239は、例えば、図30又は図31に示す構成を備えていてもよい。細胞塊分割器239を通過することにより、細胞塊は、より小さな細胞塊に分割される。図34に示す第2の拡大培養器240としては、図5に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、細胞塊は、透析チューブ内に入れられる。図34に示す第2の拡大培養器240には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部223から、培地送液路241及びポンプ242を介して、幹細胞培地が補給される。導入細胞送液路237及び培地送液路241は、例えば、温度透過性かつCO₂透過性である。幹細胞培地保存部223、培地送液路241、及びポンプ242は、培地補給装置を構成している。ポンプ242は、図11に示したCPU500の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。
- [0305] 図34に示す第2の拡大培養器240内の古くなった培地は、廃液送液路243及びポンプ244を介して、廃液保管部228に送られる。
- [0306] 第2の拡大培養器240で培養された細胞塊は、導入細胞送液路245及びポンプ246を経て、溶液置換器247へ送られる。溶液置換器247は、例えば図33に示す構成を備えていてもよい。図34に示す溶液置換器247内において、細胞塊はフィルターで保持され、培地は、廃液送液路248及びポンプ249を介して、廃液保管部228に送られる。
- [0307] ポンプ249の駆動停止により廃液送液路248内の溶液の流動を停止した後、あるいは弁等で廃液送液路248を閉じた後、溶液置換器247には、凍結保存液を含む凍結保存液保存部250から、送液路251及びポンプ252を介して、凍結保存液が入られる。これにより、凍結保存液中に細胞塊が分散する。

- [0308] 細胞塊を分散させた凍結保存液は、パッケージ装置の一部としての送液路 253 及びポンプ 254 を介して、凍結保存容器 255 内に送られる。凍結保存容器 255 は、低温保管庫 256 に入れられている。低温保管庫 256 には、液体窒素保管庫 257 から送液路 258 を介して、例えば -80°C の液体窒素が送られる。これにより、凍結保存容器 255 内の細胞塊が凍結させられる。ただし、細胞塊の凍結は、液体窒素に依らなくともよい。例えば、低温保管庫 256 が、圧縮式冷凍庫、吸収式冷凍庫、あるいはペルチェ式冷凍庫等の冷凍庫であってもよい。
- [0309] 上述した送液路には、適宜、逆流防止弁を設けてもよい。上述した送液路、単核球分離部 203、単核球精製フィルター 210、因子導入部 213、初期化培養器 219、第 1 の拡大培養器 232、第 2 の拡大培養器 240、及び溶液置換器 247 等は、樹脂等からなる例えばカセット状のケース 259 に格納されている。ケース 259 は、例えば、滅菌処理可能な耐熱性材料からなる。ケース 259 内は、例えば、 37°C 、 CO_2 濃度 5% のように、細胞培養に適した環境にされる。培地が流れる送液路は、例えば、 CO_2 透過性材料からなる。ただし、ケース 259 はカセット状に限られない。例えば、可撓性のバックであってもよい。また、上述した送液路、単核球分離部 203、単核球精製フィルター 210、因子導入部 213、初期化培養器 219、第 1 の拡大培養器 232、第 2 の拡大培養器 240、及び溶液置換器 247 等は、複数のケースに分割されて格納されてもよい。
- [0310] ケース 259 は、筐体 200 内に配置される。ポンプ、血液保存部 201、分離剤保存部 205、因子保存部 214、血液細胞培地保存部 220、幹細胞培地保存部 223、廃液保管部 228、凍結保存容器 255、低温保管庫 256、及び液体窒素保管庫 257 は、筐体 200 の内部かつケース 259 の外部に配置される。
- [0311] ケース 259 と、筐体 200 は、例えば、互いに勘合する勘合部を備える。そのため、ケース 259 は、筐体 200 内の所定の位置に配置される。また、筐体 200 内において、ポンプ、血液保存部 201、分離剤保存部 20

5、因子保存部214、血液細胞培地保存部220、幹細胞培地保存部223、廃液保管部228、凍結保存容器255、低温保管庫256、及び液体窒素保管庫257は、所定の位置に配置される。ケース259が筐体200内の所定の位置に配置されると、ケース259内の送液路は、ポンプ、血液保存部201、分離剤保存部205、因子保存部214、血液細胞培地保存部220、幹細胞培地保存部223、廃液保管部228、凍結保存容器255、低温保管庫256、及び液体窒素保管庫257と接する。

[0312] 例えば、ケース259及びその内包物は使い捨て可能であり、細胞塊の凍結が完了した後は、廃棄して、新しいものと交換してもよい。あるいは、ケース259及びその内包物を再利用する場合は、ケース259にバーコード等の識別子を付け、使用回数等を管理してもよい。

[0313] 以上説明した実施の形態に係る幹細胞製造システムによれば、人を介さずに、血液から自動的にiPS細胞等の幹細胞の冷凍保存物を製造することが可能である。

[0314] (その他の実施の形態)

上記のように、本発明を実施の形態によって記載したが、この開示の一部をなす記述及び図面はこの発明を限定するものであると理解すべきではない。この開示から当業者には様々な代替実施の形態、実施の形態及び運用技術が明らかになるはずである。例えば、因子導入装置30は、エレクトロポレーションやRNAリポフェクションではなく、レトロウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルス等のウイルスベクターや、プラスミドを用いるトランスフェクション、あるいはタンパク質トランスフェクションにより、細胞を誘導してもよい。また、導入前細胞送液路20、導入細胞送液路31、細胞塊送液路51、拡大培養送液路71、細胞塊送液路72、及びパッケージ前細胞流路91はマイクロフルイディクス技術により基板上に設けられていてもよい。この様に、本発明はここでは記載していない様々な実施の形態等を包含するということを理解すべきである。

[0315] (実施例1)

(準備)

ヒト血液細胞は健康な成人男性から入手した。また、修飾化mRNA (T r i L i n k社)、非接着ディッシュ、15 mLチューブ、50 mLチューブ、フィコール、サイトフローメータ (BD)、CD34に対する抗体 (M i l t e n y i B i o t e c)、CD3に対する抗体 (M i l t e n y i B i o t e c)、MACS (登録商標) バッファ (M i l t e n y i B i o t e c)、T細胞培地、低血清培地 (O p t i - M E M (登録商標)、G i b c o)、siRNA導入試薬 (L i p o f e c t a m i n e (登録商標) R N A i M A X、T h e r m o F i s h e r S c i e n c e)、及びT R A - 1 - 6 0に対する抗体 (BD) を用意した。

[0316] T細胞 (CD3陽性細胞) 培地は、以下A培地とB培地の混合液であった。A培地は、15 mLのX v i v o - 1 0 (L o n z a社、04-743 Q) 及びIL-2 (10 μ g/mL) の混合液であった。B培地は1.5 mLチューブにX v i v o - 1 0及びD y n a b e a d s C D 3 / C D 2 8 (L i f e T e c h n o l o g i e s社、111-31D) 50 μ Lを混合し、5秒間ボルテックス後、スピンドウンし、D y n a M a g - 2 (T h e r m o f i s h e r S c i e n c e) に静置し、一分静置後、上清を取り除いたものであった。

[0317] また、10 mLの無血清培地 (S t e m S p a n H 3 0 0 0、S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) に、10 μ LのIL-6 (100 μ g/mL)、10 μ LのSCF (300 μ g/mL)、10 μ LのTPO (300 μ g/mL)、10 μ LのF l t 3リガンド (300 μ g/mL)、及び10 μ LのIL-3 (10 μ g/mL) を加えて血球培地 (血液幹・前駆細胞培地) を調製した。

[0318] また、それぞれ濃度が100 ng/ μ LのOCT3/4のmRNA含有液、SOX2のmRNA含有液、KLF4のmRNA含有液、c-MYCのmRNA含有液、LIN28AのmRNA含有液、及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) のmRNA含有液を用意した。次に、385 μ LのOCT3/4の

mRNA含有液、119 μ LのSOX2のmRNA含有液、156 μ LのKLF4のmRNA含有液、148 μ Lのc-MYCのmRNA含有液、83 μ LのLIN28AのmRNA含有液、及び110 μ LのGFPのmRNA含有液を混合し、初期化因子混合液を得た。得られた初期化因子混合液を50 μ Lずつ容量1.5 mLのRNase-Freeのチューブ（エッペンドルフチューブ（登録商標）、エッペンドルフ）に分注し、 -80°C の冷凍庫に保存した。

[0319] （単核球の調製）

遠心機を 18°C に設定した。5 mLから50 mLの血液を採血し、血液にEDTAを加えて優しく混ぜた。また、ヒトリンパ球分離用の媒体（Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケア・ジャパン）を5 mLずつ2本の15 mLチューブに分注した。5 mLのPBSを血液に加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に5 mLずつ重層した。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上加えた。

[0320] チューブ中の溶液を、 $400\times g$ 、 18°C で30分間遠心した。この際、加速、減速ともゆっくり行った。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れた。この白く濁った中間層は、単核球を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい15 mLチューブに移した。この際、下層は吸い取らないようにした。白く濁った中間層は、1本のチューブより1 mL程度回収できた。2本分の中間層をまとめて1本のチューブに移した。

[0321] 回収した単核球に対し、12 mLのPBSを加えて、溶液をさらに $200\times g$ 、 18°C で10分間遠心した。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、3 mLの既知組成無血清造血細胞培地（X-VIVO（登録商標）10、ロンザ）を加えて懸濁し、単核球懸濁液を得た。そのうち10 μ Lの単核球懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントした。

[0322] (CD34又はCD3陽性細胞の分離)

1 × 10⁷個の単核球と、CD34抗体又はCD3抗体と、を、4℃の溶液100 μL中で15分反応させた。反応後、溶液に5 mLのMACS (登録商標) バッファ (Miltenyi Biotec) を加え、270 gで遠心した。遠心後、上清を除去し、1 mLのMACSバッファを添加した。その後、自動磁気細胞分離装置 (autoMACS、Miltenyi Biotec) の分離プログラムを利用して、単核球のうち、CD34陽性細胞又はCD3陽性細胞を分離した。

[0323] (分離した細胞の培養)

分離した5 × 10⁶個の単核球を1 mLのT細胞培地、又は血液幹・前駆細胞培地に懸濁し、12ウェルプレートに播種し、培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37℃であった。

[0324] (初期化因子のリポフェクション)

100 μLの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco) と25 μLの初期化因子混合液を混合し、第1の混合液とした。また、112.5 μLの低血清培地 (Opti-MEM (登録商標)、Gibco) と12.5 μLのsiRNA導入試薬 (Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX、ThermoFisherScience) を混合し、第2の混合液とした。その後、第1の混合液と、第2の混合液と、を混合し、15分室温で静置してリポフェクション反応液とした。

[0325] 得られたリポフェクション反応液のうち60 μLを、単核球を培養している12ウェルプレートに穏やかに添加し、引き続き、37℃で18時間、単核球をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37℃であった。リポフェクション反応液を添加した時の単核球の密度は3 × 10⁶であった。18時間後、単核球を15 mLチューブに回収し、300 gで遠心し、上清を除去した。その後、1.25 mLのCD34用血球培地を15 mLチューブに添加して、単核球懸濁液を同じ12ウェルプレートに戻し、一晩37度で単核球をフィーダーフリーで培

養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、及び酸素濃度が19%であった。上記工程を2日に1回、7日間繰り返した。

[0326] (GFPの発現の確認)

リポフェクションを開始してから7日目に、リポフェクションを合計4回した細胞の密度は、 3×10^6 であった。細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、蛍光顕微鏡でGFPの発現を確認したところ、図35に示すように、GFPの発現が確認された。これにより、単核球にmRNAがトランスフェクションし、トランスフェクトされたmRNAからタンパク質が合成されていることが確認された。

[0327] (TRA-1-60の発現の確認)

リポフェクションを開始してから7日目に、細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、取り出した細胞を、初期化され始めたiPS細胞で特異的に発現する表面抗原であるTRA-1-60に対する抗体であって、Allophycocyanin (APC) 蛍光色素で標識された抗体で染色した。その後、蛍光活性化セルソータ (FACS (登録商標)、BD) で、TRA-1-60陽性細胞の割合を確認することによって、細胞においてリプログラミングが開始され、iPS細胞遺伝子が発現し、iPS細胞ができる事を確認した。

[0328] 図36に示すように、自家蛍光の強度をx軸に、蛍光標識抗TRA-1-60抗体の蛍光強度をy軸にとったドットプロットを作成した。遺伝子を導入しなかったネガティブコントロールでは、TRA-1-60陽性細胞は検出されなかった。これに対し、実験1、2及び3において、TRA-1-60陽性細胞が検出された。なお、実験1では、マーカーによる分離をしていない単核球全体から誘導した結果であり、実験2は、CD3陽性で分離した細胞から誘導した結果であり、実験3は、CD34陽性で分離した細胞から誘導した結果である。したがって、初期化因子RNAのリポフェクションを用いて、血液由来の細胞に初期化因子を導入し、iPS細胞を誘導できることが示された。

[0329] (実施例2)

500mLのPrimate ES Cell Medium(Repro CELL)、及び0.2mLの濃度が10 μ g/mLのbFGF(Gibco PHG0266)を混合し、bFGF含有ヒトiPS培地を調製した。

[0330] また、bFGF含有ヒトiPS培地に脱アシル化ジェランガム(日産化学)を濃度が0.02重量%となるよう添加し、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を調製した。さらに、5mLの濃度が2.5重量%のトリプシン、5mLの濃度が1mg/mLのコラゲネースIV、0.5mLの濃度が0.1mol/LのCaCl₂、10mLのKnockOut血清代替(登録商標、Invitrogen 10828-028)、及び30mLの精製水を混合して、一般にCTK溶液と呼ばれる剥離液を調製した。

[0331] フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュ(Thermo scientific 12-556-004)にCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベーター中で3分インキュベートした。3分後、インキュベーターからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、6ウェルディッシュにPBS(Santa Cruz Biotech sc-362183)を500 μ L添加し、iPS細胞を洗浄後、6ウェルディッシュからPBSを取り除き、0.3mLの剥離液(Accutase、登録商標)を6ウェルディッシュに添加し、CO₂インキュベーターに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF含有iPS培地を6ウェルディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

[0332] iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mLの遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、5 \times 10⁵個ずつiPS細胞を15mLファルコンチューブ(登録

商標、Corning 352096) 又は非接着ディッシュに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

[0333] 15 mL チューブにおいては、bFGF 含有ヒト iPS ゲル培地を 2 mL 用いた。非接着ディッシュにおいては、ゲル化していない bFGF 含有ヒト iPS 培地を 2 mL 用いた。各培地には ROCK 阻害剤 (Selleck S1049) が $10 \mu\text{mol/L}$ となるよう添加した。その後、15 mL チューブ及び非接着ディッシュに、毎日 $500 \mu\text{L}$ の bFGF 含有ヒト iPS ゲル培地 を添加し、非接着ディッシュに、毎日 $500 \mu\text{L}$ の bFGF 含有ヒト iPS 培地を添加した。また、15 mL チューブ及び非接着ディッシュに、毎日、終濃度が $10 \mu\text{mol/L}$ となるよう ROCK 阻害剤を添加し、7 日間、浮遊培養を続けた。

[0334] その結果を図 37 に示す。図 37 (b) に示すように、非接着ディッシュでゲル化していない bFGF 含有ヒト iPS 培地を用いて iPS 細胞を培養した場合、iPS 細胞のコロニー同士の凝集が顕著に認められた。これに対し、図 37 (a) に示すように、15 mL チューブ中で bFGF 含有ヒト iPS ゲル培地を用いて iPS 細胞を培養した場合、目立った凝集は認められなかった。図 38 (a) は、15 mL チューブにおいて、bFGF 含有ヒト iPS ゲル培地を用いて iPS 細胞を培養したときの 1 日目の写真であり、図 38 (b) は、15 mL チューブにおいて、bFGF 含有ヒト iPS ゲル培地を用いて iPS 細胞を培養したときの 9 日目の写真である。図 38 (a) 及び図 38 (b) の写真から、異なる株の iPS 細胞同士が凝集せずに、コロニーを形成したことが確認された。

[0335] 図 39 (a) は、ゲル培地中で 7 日間浮遊培養した iPS 細胞のコロニーをフィーダー細胞上に再播種する直前時の写真である。図 39 (b) は、その 3 日後にコロニーの形態を確認した時の写真である。その結果、図 40 に示すように、95% 以上のコロニーが未分化であることが確認された。よって、iPS 細胞をゲル培地中で、未分化の状態を維持したまま培養することができることが示された。

[0336] (実施例3)

実施例2と同じbFGF含有ヒトiPS培地、及びbFGF含有ヒトiPSゲル培地を調製した。フィーダー細胞上でiPS細胞を培養している6ウェルディッシュにCTK溶液を300 μ L添加し、CO₂インキュベーター中で3分間インキュベートした。3分後、インキュベーターからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみがはがれていることを確認し、アスピレータを用いてCTK溶液を取り除いた。CTK溶液を取り除いた後、ディッシュにPBSを500 μ L添加し、iPS細胞を洗浄後、ディッシュからPBSを取り除き、0.3mLのAccumaxをディッシュに添加し、ディッシュをCO₂インキュベーターに入れ、5分間インキュベートした。その後、0.7mLのbFGF含有iPS培地をディッシュに添加し、iPS細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

[0337] iPS細胞を懸濁後、4mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mL遠心チューブに添加し、遠心機を用いてiPS細胞懸濁液を270gで遠心した。遠心後、上清を取り除き、1mLのbFGF含有ヒトiPS培地を15mL遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、 5×10^5 個ずつiPS細胞を、15mLチューブに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

[0338] 15mLチューブにおいては、bFGF含有ヒトiPSゲル培地を2mL用いた。各培地にはROCK阻害剤が10 μ mol/Lとなるよう添加した。その後、15mLチューブに、毎日500 μ LのbFGF含有ヒトiPSゲル培地を添加した。なお、500 μ Lのゲル培地は、0.5 μ LのROCK阻害剤を含んでいた。また、コントロールとして、ROCK阻害剤を添加していない以外は同じ条件で、iPS細胞を、7日間、浮遊培養した。

[0339] 図41(a)に示すように、bFGF含有ヒトiPS培地にROCK阻害剤を添加しなかった場合、iPS細胞はコロニーを形成しなかった。これに対し、図41(b)に示すように、bFGF含有ヒトiPS培地にROCK阻害剤を添加した場合、iPS細胞はコロニーを形成した。この結果から、

シングルセルから i P S 細胞を浮遊培養する場合、R O C K 阻害剤が有効であることが示された。

[0340] (実施例 4)

透析チューブを格納する容器として、C O₂透過性ではない容器である F a l c o n コニカルチューブ 50 mL (登録商標) と、C O₂透過性の容器である G - R e x (登録商標、W i l s o n W o l f) を用いて、容器以外は同条件で細胞を浮遊培養した。その結果、図 4 2 に示すように、C O₂透過性の容器を用いて培養したほうが、細胞の生存率は高かった。

[0341] (実施例 5)

i P S 細胞を含有するゲル培地を分画分子量が 1 0 0 k D a の透析チューブを備える 2 つの透析モジュール (S p e c t r u m G 2 3 5 0 3 5) のそれぞれに入れた。さらに、透析モジュールを 5 0 m L 遠心チューブにそれぞれ入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れた。また、i P S 細胞を含有するゲル培地を別の 5 0 m L 遠心チューブに直接入れた。

[0342] その後、数日間、内部に透析チューブを入れた 2 つの遠心チューブのうちの 1 つの遠心チューブに、図 6 に示すようにポンプを接続して、遠心チューブ内のゲル培地を連続的に交換した。ゲル培地は 4 °C で保管し、遠心チューブに達するときには 3 7 °C になるよう設定した。内部に透析チューブを入れた 2 つの遠心チューブのうちの他方の遠心チューブには、ポンプを接続せず、遠心チューブ内のゲル培地を交換しなかった。また、内部に透析チューブを入れていない遠心チューブ内のゲル培地も交換しなかった。

[0343] 同じ期間培養した後、それぞれの容器内で培養された細胞を観察したところ、図 4 3 及び図 4 4 に示すように、細胞塊を透析チューブ内で培養し、透析チューブの周囲のゲル培地をポンプで連続的に交換した場合は、多数の細胞塊が形成された。また、分化した細胞は極めて少なかった。しかし、細胞塊を透析チューブ内で培養し、透析チューブの周囲のゲル培地をポンプで連続的に交換しなかった場合は、細胞塊は少なくなり、分化した細胞が増えた

。また、透析チューブを用いずに細胞塊を培養し、ゲル培地をポンプで連続的に交換しなかった場合は、細胞塊はほとんど形成されなかった。

符号の説明

- [0344] 1 0 分離装置
- 2 0 導入前細胞送液路
- 2 1 誘導因子送液機構
- 3 0 因子導入装置
- 3 1 導入細胞送液路
- 4 0 細胞塊作製装置
- 5 0 初期化培養装置
- 5 1 細胞塊送液路
- 6 0 分割機構
- 6 1 末端ブロック
- 6 1 a 凹部
- 6 1 b 凸部
- 6 1 c 大孔径部
- 6 2 連結ブロック
- 6 2 a 凹部
- 6 2 b 凸部
- 6 2 c 大孔径部
- 6 2 d 小孔径部
- 6 2 e 大孔径部
- 6 3 先端ブロック
- 6 3 a 凹部
- 6 3 b ノズル部
- 6 3 c 大孔径部
- 6 3 d 小孔径部
- 6 4 挿入ノズル

- 6 5 a 大孔径部
- 6 5 b 小孔径部
- 6 6 a 挿入部
- 6 6 b 挿入部
- 7 0 拡大培養装置
- 7 1 拡大培養送液路
- 7 2 細胞塊送液路
- 7 5 透析チューブ
- 7 6 容器
- 7 7 補給培地送液ポンプ
- 7 8 送液チューブ
- 7 9 廃液チューブ
- 8 0 分割機構
- 9 0 細胞塊搬送機構
- 9 1 パッケージ前細胞流路
- 1 0 0 パッケージ装置
- 1 0 1 溶液置換器
- 1 0 2 フィルター
- 1 0 3 送液流路
- 1 0 4 送液流路
- 1 0 5 排出流路
- 1 0 6 排出流路
- 1 1 0 凍結保存液送液機構
- 1 7 1 初期化培養撮影装置
- 1 7 2 テレセントリックレンズ
- 1 7 3 細胞観察用照明光源
- 1 7 4 培地観察用照明光源
- 2 0 0 筐体

- 201 血液保存部
- 202 血液送液路
- 203 単核球分離部
- 204 ポンプ
- 205 分離剤保存部
- 206 送液路
- 207 ポンプ
- 208 単核球送液路
- 209 ポンプ
- 210 単核球精製フィルター
- 212 ポンプ
- 213 因子導入部
- 214 因子保存部
- 215 因子送液路
- 216 ポンプ
- 217 導入細胞送液路
- 218 ポンプ
- 219 初期化培養器
- 220 血液細胞培地保存部
- 221 培地送液路
- 222 ポンプ
- 223 幹細胞培地保存部
- 224 培地送液路
- 224 ポンプ
- 225 ポンプ
- 226 廃液送液路
- 227 ポンプ
- 228 廃液保管部

- 2 2 9 導入細胞送液路
- 2 3 0 ポンプ
- 2 3 1 細胞塊分割器
- 2 3 2 拡大培養器
- 2 3 3 培地送液路
- 2 3 4 ポンプ
- 2 3 5 廃液送液路
- 2 3 6 ポンプ
- 2 3 7 導入細胞送液路
- 2 3 8 ポンプ
- 2 3 9 細胞塊分割器
- 2 4 0 拡大培養器
- 2 4 1 培地送液路
- 2 4 2 ポンプ
- 2 4 3 廃液送液路
- 2 4 4 ポンプ
- 2 4 5 導入細胞送液路
- 2 4 6 ポンプ
- 2 4 7 溶液置換器
- 2 4 8 廃液送液路
- 2 4 9 ポンプ
- 2 5 0 凍結保存液保存部
- 2 5 1 送液路
- 2 5 2 ポンプ
- 2 5 3 送液路
- 2 5 4 ポンプ
- 2 5 5 凍結保存容器
- 2 5 6 低温保管庫

- 2 5 7 液体窒素保管庫
- 2 5 8 送液路
- 2 5 9 冷蔵保存部
- 2 5 9 ケース
- 2 7 1 センサー
- 2 7 2 温度計
- 3 0 1 バッグ
- 3 0 2 バッグ
- 4 0 1 入力装置
- 4 0 2 出力装置
- 4 0 3 関係記憶装置
- 5 0 0 C P U
- 5 0 1 画像処理部
- 5 1 1 輪郭定義部
- 5 1 2 細胞評価部
- 5 1 3 統計処理部
- 5 1 4 密度算出部
- 5 1 5 培地評価部

請求の範囲

- [請求項1] 細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路と、
前記導入前細胞送液路に接続され、前記細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置と、
前記誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞塊を作製する細胞塊作製装置と、
前記導入前細胞送液路、前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置を格納する筐体と、
を備え、
前記細胞塊作製装置が、
前記因子導入装置で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置と、
前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置と、
を備え、
前記初期化培養装置が、前記誘導因子導入細胞に培地を補給する第1の培地補給装置を備え、
前記拡大培養装置が、前記複数の細胞塊に培地を補給する第2の培地補給装置を備える、
幹細胞製造システム。
- [請求項2] 前記第1の培地補給装置が、前記誘導因子導入細胞に前記培地を連続的に補給する、請求項1に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項3] 前記第1の培地補給装置が、前記誘導因子導入細胞に前記培地を所定のタイミングで補給する、請求項1に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項4] 前記第2の培地補給装置が、前記複数の細胞塊に前記培地を連続的に補給する、請求項1に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項5] 前記第2の培地補給装置が、前記複数の細胞塊に前記培地を所定のタイミングで補給する、請求項1に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項6] 前記因子導入装置が、
前記導入前細胞送液路に接続された因子導入部と、
前記多能性誘導因子を保存する因子保存部と、
前記因子保存部から前記因子導入部に前記多能性誘導因子を流すための因子送液路と、
前記因子送液路内の液体を流すためのポンプと、
を備える、請求項1に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項7] 前記因子導入部において、RNAリポフェクションにより、前記細胞に前記多能性誘導因子が導入される、請求項6に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項8] 前記多能性誘導因子がDNA、RNA、又はタンパク質である、請求項6に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項9] 前記多能性誘導因子がベクターに組み込まれている、請求項6に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項10] 前記ベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項9に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項11] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項6に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項12] 前記初期化培養装置が、
前記誘導因子導入細胞とゲル培地が入れられる透析チューブと、
前記透析チューブが入れられ、前記透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、
を備える、浮遊培養器
を備える、
請求項1又は6に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項13] 前記透析チューブの分画分子量が0.1kDa以上である、請求項12に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項14] 前記透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなる、請求項12又は13に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項15] 前記第1の培地補給装置が、前記容器内の前記透析チューブの周囲に前記ゲル培地を補給する、請求項12から14のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項16] 前記第1の培地補給装置が、前記透析チューブ内に前記ゲル培地を補給する、請求項12から14のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項17] 前記補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備える、請求項15又は16に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項18] 前記培地送液路が二酸化炭素透過性である、請求項17に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項19] 前記培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項17又は18に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項20] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項19に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項21] 前記補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備える、請求項17から20のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項22] 前記容器に接続された廃液送液路であって、前記容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備える、請求項12から21のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項23] 前記因子導入装置から前記初期化培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項1に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項24] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項23に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項25] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項23又は24に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項26] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項25に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項27] 前記拡大培養装置が、
前記複数の細胞塊とゲル培地が入れられる透析チューブと、
前記透析チューブが入れられ、前記透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、
を備える、浮遊培養器
を備える、
請求項1又は12に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項28] 前記透析チューブの分画分子量が0.1kDa以上である、請求項27に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項29] 前記透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなる、請求項27又は28に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項30] 前記第2の培地補給装置が、前記容器内の前記透析チューブの周囲に前記ゲル培地を補給する、請求項27から29のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項31] 前記第2の培地補給装置が、前記透析チューブ内に前記ゲル培地を補給する、請求項27から29のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項32] 前記補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備える、請求項30又は31に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項33] 前記培地送液路が二酸化炭素透過性である、請求項32に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項34] 前記培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項

3 2 又は 3 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項35] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項 3 4 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項36] 前記補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備える、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項37] 前記容器に接続された廃液送液路であって、前記容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備える、請求項 2 7 から 3 6 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項38] 前記初期化培養装置から前記拡大培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項 1 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項39] 前記初期化培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、前記拡大培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、を接続する導入細胞送液路を更に備える、請求項 2 7 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項40] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項 3 8 又は 3 9 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項41] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項 3 8 から 4 0 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項42] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項 4 1 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項43] 前記初期化培養装置及び前記拡大培養装置の少なくとも一方が、内部に培地が入られる二酸化炭素透過性バッグを備える、請求項 1 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項44] 前記細胞塊作製装置が、
前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細

胞塊に分割する第1の分割機構と、

前記拡大培養装置で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第2の分割機構と、

を更に備える、請求項1に記載の幹細胞製造システム。

[請求項45] 前記第1の分割機構が、前記初期化培養装置から前記拡大培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路に設けられている、請求項44に記載の幹細胞培養システム。

[請求項46] 前記第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、前記細胞塊をシングルセルに分割する、請求項44又は45に記載の幹細胞培養システム。

[請求項47] 前記第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、内部に貫通孔を有する分割器を備え、前記貫通孔が、大孔径部と、前記大孔径部と連通し、前記大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、を交互に有し、前記細胞塊を含む培地が、前記貫通孔を流れる、請求項44又は45に記載の幹細胞製造システム。

[請求項48] 前記大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項47に記載の幹細胞製造システム。

[請求項49] 前記第1及び第2の分割機構の少なくとも一方が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、

当該連結ブロックの第1の端部に凹部が、当該連結ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、

当該連結ブロックが複数ある場合に、前記凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、

前記貫通孔が、前記凹部と連通する第1の大孔径部と、前記第1の大孔径部と連通し、前記第1の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、前記小孔径部と連通し、前記小孔径部より孔径が大きく、前記凸部の先端に開口を有する第2の大孔径部と、を有し、

前記細胞塊を含む培地が、前記貫通孔を流れる、

請求項44に記載の幹細胞製造システム。

[請求項50] 前記連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第2の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第1の大孔径部と平滑に連通する、請求項49に記載の幹細胞製造システム。

[請求項51] 前記第1及び第2の大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項49又は50に記載の幹細胞製造システム。

[請求項52] 前記第1及び第2の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、

当該先端ブロックの第1の端部に凹部が、当該先端ブロックの第2の端部にノズルが設けられており、

当該先端ブロックの凹部が、前記連結ブロックの凸部と吻合し、前記貫通孔が、前記凹部と連通する大孔径部と、前記大孔径部と連通し、前記大孔径部より孔径が小さく、前記ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有する、

請求項49から51のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項53] 前記連結ブロックと前記先端ブロックとを連結した際、前記連結ブロックの第2の大孔径部と、前記先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通する、請求項52に記載の幹細胞製造システム。

[請求項54] 前記第1及び第2の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、

当該末端ブロックの第1の端部に凹部が、前記末端ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、

当該末端ブロックの凸部が、前記連結ブロックの凹部と吻合する、請求項49から53のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項55] 前記第1及び第2の分割機構が、それぞれ、前記末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、

前記挿入ノズルに連通する、前記細胞塊を含む培地を吸引排出する

吸引排出器と、

を更に備える、請求項54に記載の幹細胞製造システム。

[請求項56] 前記複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置を更に備え、

前記筐体が前記パッケージ装置を格納する、

請求項1に記載の幹細胞製造システム。

[請求項57] 前記細胞塊作製装置が、前記複数の細胞塊を前記パッケージ装置に順次送る細胞塊搬送機構を更に備える、請求項56に記載の幹細胞製造システム。

[請求項58] 前記パッケージ装置が、ペルチェ素子又は液体窒素を用いて前記細胞塊を凍結する、請求項56又は57に記載の幹細胞製造システム。

[請求項59] 前記パッケージ装置が、気化圧縮又は気化吸収により前記細胞塊を凍結する、請求項56又は57に記載の幹細胞製造システム。

[請求項60] 筒状部材と、

前記筒状部材の内部に配置された液体透過フィルターと、

を備える溶液置換器であって、

前記筒状部材に、

前記液体透過フィルター上に、前記複数の細胞塊を含む溶液を導入するための細胞塊導入孔と、

前記液体透過フィルター上に、置換溶液を導入するための置換溶液導入孔と、

前記液体透過フィルター上に、前記複数の細胞塊を含む置換溶液を流出するための細胞塊流出孔と、

前記液体透過フィルターを透過した溶液が流出する廃液流出孔と、

が設けられている溶液置換器を更に備える、請求項1又は27に記載の幹細胞製造システム。

[請求項61] 前記廃液流出孔に接続された廃液送液路を更に備え、

前記複数の細胞塊を含む溶液の溶液を廃棄する際に前記廃液送液路

における溶液の流動が許容され、

前記置換溶液中に前記複数の細胞塊を分散させる際に前記廃液送液路における溶液の流動が許容されない、

請求項 60 に記載の溶液置換器。

[請求項62] 前記置換溶液が培地、凍結保存液、又は細胞塊分割酵素溶液である、請求項 60 又は 61 に記載の溶液置換器。

[請求項63] 前記拡大培養装置から前記溶液置換器に前記複数の細胞塊を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項 60 から 62 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項64] 前記拡大培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、前記溶液置換器の前記細胞塊導入孔と、を接続する導入細胞送液路を更に備える、請求項 60 から 62 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項65] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項 63 又は 64 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項66] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項 63 から 65 のいずれか 1 項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項67] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項 66 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項68] 血液から細胞を分離する分離装置を更に備え、
前記分離装置で分離された細胞を含む溶液が前記導入前細胞送液路を通過する、
請求項 1 又は 60 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項69] 前記分離装置が、磁気細胞分離方法又は赤血球凝固剤を用いる方法によって前記血液から単核球を分離する、請求項 68 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項70] 前記分離装置が、前記単核球を精製する単核球精製フィルターを更

に備える、請求項69に記載の幹細胞製造システム。

[請求項71] 前記導入前細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項68から70のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項72] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項71に記載の幹細胞製造システム。

[請求項73] 前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、前記筐体内に配置されるケースを更に備える、請求項27に記載の幹細胞製造システム。

[請求項74] 前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケースと、が使い捨て可能である、請求項73に記載の幹細胞製造システム。

[請求項75] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、前記筐体内に配置されるケースを更に備える、請求項68に記載の幹細胞製造システム。

[請求項76] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、前記ケースと、が使い捨て可能である、請求項75に記載の幹細胞製造システム。

[請求項77] 前記筐体内に配置される複数のケースを更に備え、
前記複数のケースのそれぞれに、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかが格納される、請求項27に記載の幹細胞製造システム。

[請求項78] 前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記複数のケースと、が使い捨て可能である、請求項77に記

載の幹細胞製造システム。

- [請求項79] 前記筐体内に配置される複数のケースを更に備え、
前記複数のケースのそれぞれに、前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、の少なくともいずれかが格納される、請求項27に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項80] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、前記複数のケースと、が使い捨て可能である、請求項79に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項81] 前記ケースと前記筐体が、互いに吻合する吻合部を備え、前記ケースが前記筐体内の所定の位置に配置される、請求項73から80のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項82] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の送液路と、前記ケース外のポンプと、が接続される、請求項73から81のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項83] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記因子導入部と、前記ケース外の前記因子保存部と、が接続される、請求項73から82のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項84] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記初期化培養装置の浮遊培養器及び前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケース外の培地を保存する培地保存部と、が接続される、請求項73から83のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項85] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記初期化培養装置の浮遊培養器及び前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケース外の廃液を保管する廃液保管部と、が接続される、請求項73から84のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項86] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記分離

装置と、前記ケース外の血液を保存する血液保存部と、が接続される、請求項75又は80に記載の幹細胞製造システム。

[請求項87] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記分離装置と、前記ケース外の血液分離剤を保存する分離剤保存部と、が接続される、請求項75、76、及び86のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項88] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記溶液置換器と、前記ケース外の凍結保存液を保存する凍結保存液保存部と、が接続される、請求項75又は76に記載の幹細胞製造システム。

[請求項89] 前記初期化培養装置で培養される細胞を撮影する初期化培養撮影装置と、
前記拡大培養装置で培養される細胞を撮影する拡大培養撮影装置と、
を更に備える、請求項1から88のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項90] 前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置は、それぞれ、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項89に記載の幹細胞製造システム。

[請求項91] 前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部を更に備える、請求項89又は90に記載の幹細胞製造システム。

[請求項92] 前記画像処理部が、前記ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、前記画像中の細胞塊を抽出する、請求項91に記載の幹細胞製造システム。

[請求項93] 前記画像処理部が、前記画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、前記画像にDistance Transform法を適用する、請求項92に記載の幹細胞製造システム。

[請求項94] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞塊の大きさを算出する、請求

項 9 2 又は 9 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項95] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が前記拡大培養装置に移行される、請求項 9 4 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項96] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、前記拡大培養装置において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項 9 4 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項97] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 9 4 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項98] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 9 4 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項99] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞塊の数を算出する、請求項 9 2 又は 9 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項100] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 9 9 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項101] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 9 9 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項102] 培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、

前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像に基づき、前記細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、前記算出された濁度の値と、前記関係と、に基づき、撮影された細胞塊の密度の値を算出する画像処理部を更に備える、

請求項 89 又は 90 に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項103] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が前記拡大培養装置に移行される、請求項 102 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項104] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、前記拡大培養撮影装置において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項 102 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項105] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 102 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項106] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項 102 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項107] 培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、
前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像における培地の色の値を算出し、前記算出された色の値と、前記関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部を更に備える、請求項 89 又は 90 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項108] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記初期化培養装置において培地が交換される、請求項 107 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項109] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記拡大培養装置において培地が交換される、請求項 107 に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項110] 前記培地の色が、前記培地の色相である、請求項 107 から 109

のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項111] 前記初期化培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記初期化培養装置において培地が交換される、請求項1から110のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項112] 前記拡大培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記拡大培養装置において培地が交換される、請求項1から110のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項113] 前記導入前細胞送液路の内壁が、細胞非接着性である、請求項1から112のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項114] 前記導入前細胞送液路と、前記誘導因子送液機構と、が、基板上に設けられている、請求項1から113のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項115] 前記筐体内の気体を清浄にする空気清浄装置を更に備える、請求項1から114のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項116] 前記筐体内の気体の温度を管理する温度管理装置を更に備える、請求項1から115のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項117] 前記初期化培養装置及び前記拡大培養装置における培地の温度を管理する温度管理装置を更に備える、請求項1から115のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項118] 前記温度管理装置が、前記培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地の温度を上昇させ、前記培地の温度が所定の範囲より高い場合は、前記培地の温度を低下させる、請求項117に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項119] 前記筐体内の気体の二酸化炭素濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を更に備える、請求項1から118のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項120] 前記筐体内を乾熱滅菌又はガス滅菌する滅菌装置を更に備える、請求項1から119のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。

- [請求項121] 前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置が、サーバーによって作業手順に基づいて制御され、前記サーバーが、前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置が前記作業手順に基づいて稼働しているか否か監視し、稼働記録を作成する、請求項1から120のいずれか1項に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項122] 内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、
当該連結ブロックの第1の端部に凹部が、当該連結ブロックの第2の端部に凸部が設けられており、
当該連結ブロックが複数ある場合に、前記凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、
前記貫通孔が、前記凹部と連通する第1の大孔径部と、前記第1の大孔径部と連通し、前記第1の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、前記小孔径部と連通し、前記小孔径部より孔径が大きく、前記凸部の先端に開口を有する第2の大孔径部と、を有する、
細胞塊分割器。
- [請求項123] 前記連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第2の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第1の大孔径部と平滑に連通する、請求項122に記載の細胞塊分割器。
- [請求項124] 前記第1及び第2の大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項122又は123に記載の細胞塊分割器。
- [請求項125] 内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、
当該先端ブロックの第1の端部に凹部が、当該先端ブロックの第2の端部にノズルが設けられており、
当該先端ブロックの凹部が、前記連結ブロックの凸部と勘合し、
前記貫通孔が、前記凹部と連通する大孔径部と、前記大孔径部と連

通し、前記大孔径部より孔径が小さく、前記ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有する、

請求項 1 2 2 から 1 2 4 のいずれか 1 項に記載の細胞塊分割器。

[請求項126] 前記連結ブロックと前記先端ブロックとを連結した際、前記連結ブロックの第 2 の大孔径部と、前記先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通する、請求項 1 2 5 に記載の細胞塊分割器。

[請求項127] 内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、前記末端ブロックの第 1 の端部に凹部が、前記末端ブロックの第 2 の端部に凸部が設けられており、

当該末端ブロックの凸部が、前記連結ブロックの凹部と吻合する、請求項 1 2 2 から 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の細胞塊分割器。

[請求項128] 前記末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、前記挿入ノズルに連通する、前記細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、

を更に備える、請求項 1 2 7 に記載の細胞塊分割器。

[請求項129] 培養細胞を撮影する撮影装置と、前記撮影装置で得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部と、

を備える、幹細胞製造システム。

[請求項130] 前記撮影装置は、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項 1 2 9 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項131] 前記画像処理部が、前記ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、前記画像中の細胞塊を抽出する、請求項 1 2 9 又は 1 3 0 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項132] 前記画像処理部が、前記画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、前記画像に Distance Transform 法を適用する、請求項 1 3 1 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項133] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞塊の大きさを算出する、請求

項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項134] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行される、請求項 1 3 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項135] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項 1 3 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項136] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、培養器における培地の供給速度が変化する、請求項 1 3 3 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項137] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞塊の数を算出する、請求項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項138] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、培養器における培地の供給速度が変化する、請求項 1 3 7 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項139] 培養細胞を撮影する撮影装置と、
培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置と、
前記撮影装置で得られた画像に基づき、前記細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、前記算出された濁度の値と、前記関係と、に基づき、撮影された細胞塊の密度の値を算出する画像処理部と、
を備える、幹細胞製造システム。

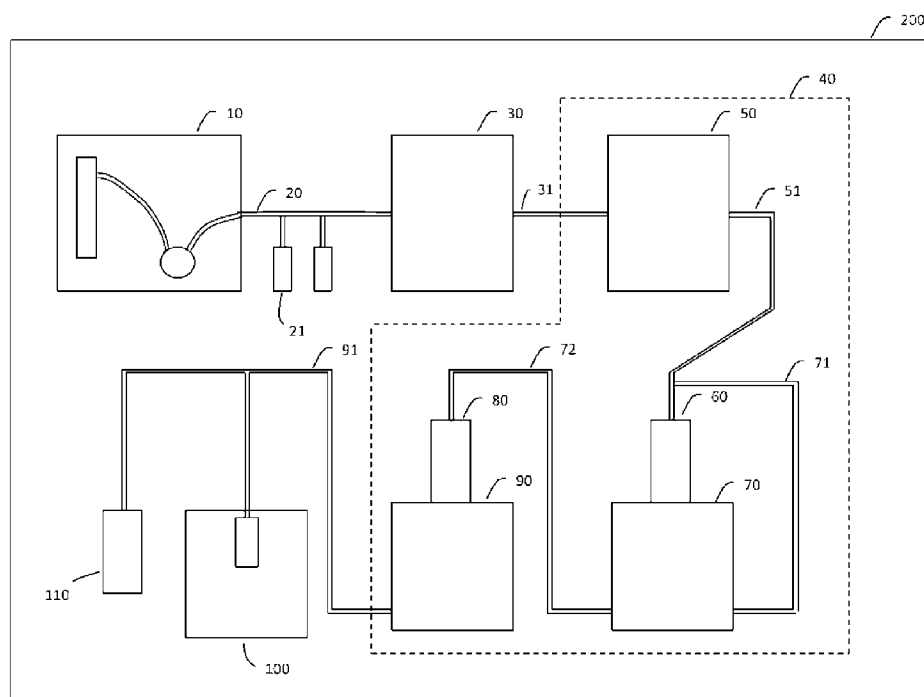
[請求項140] 前記撮影装置は、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項 1 3 9 に記載の幹細胞製造システム。

[請求項141] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行される、請求項 1 3 9 又は 1 4 0 に記載の幹細胞

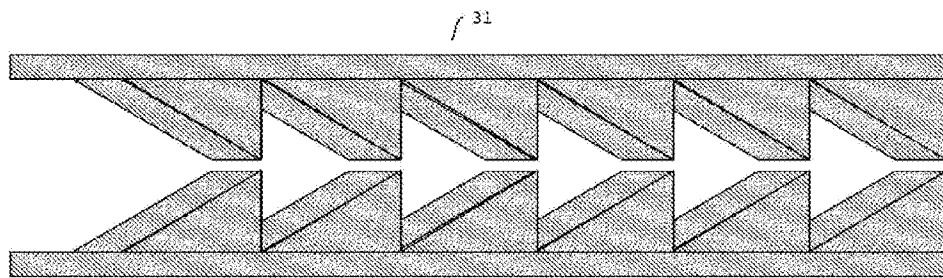
製造システム。

- [請求項142] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項139又は140に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項143] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、培養器において培地の供給速度が変化する、請求項139に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項144] 培養細胞を撮影する撮影装置と、
培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置と、
前記撮影装置で得られた画像における培地の色の値を算出し、前記算出された色の値と、前記関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部と、
を備える、幹細胞製造システム。
- [請求項145] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、培養器において培地が交換される、請求項144に記載の幹細胞製造システム。
- [請求項146] 前記培地の色が、前記培地の色相である、請求項144又は145に記載の幹細胞製造システム。

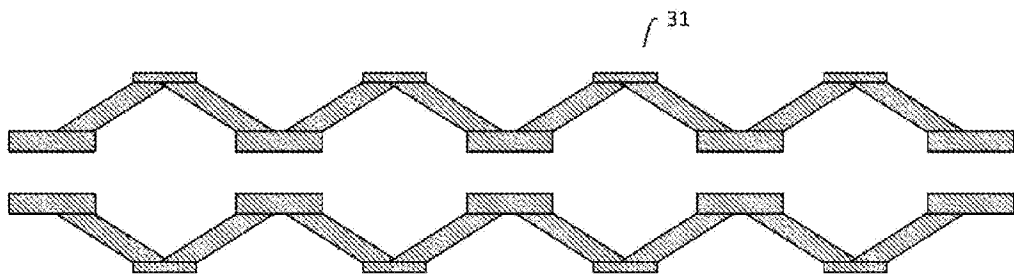
[図1]



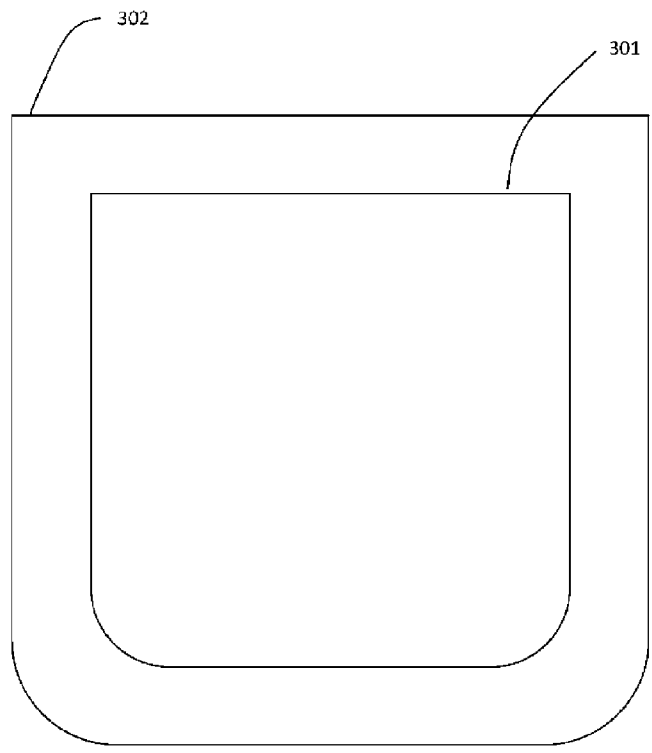
[図2]



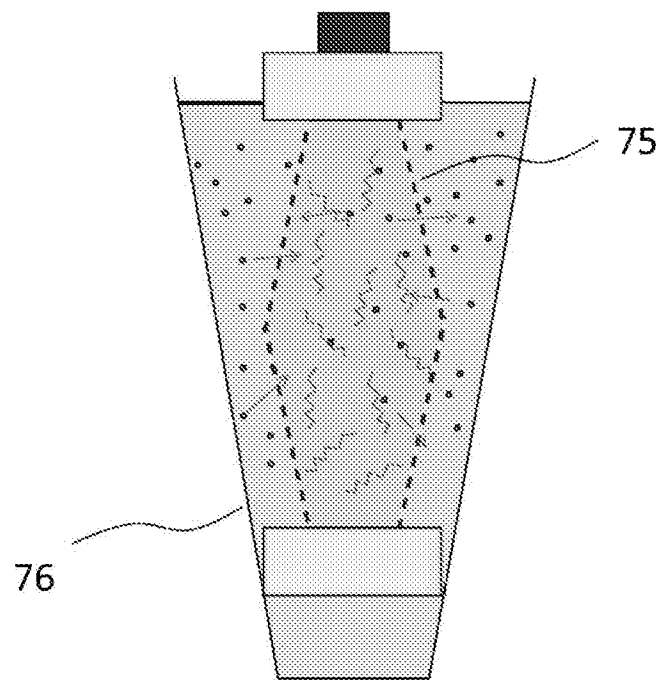
[図3]



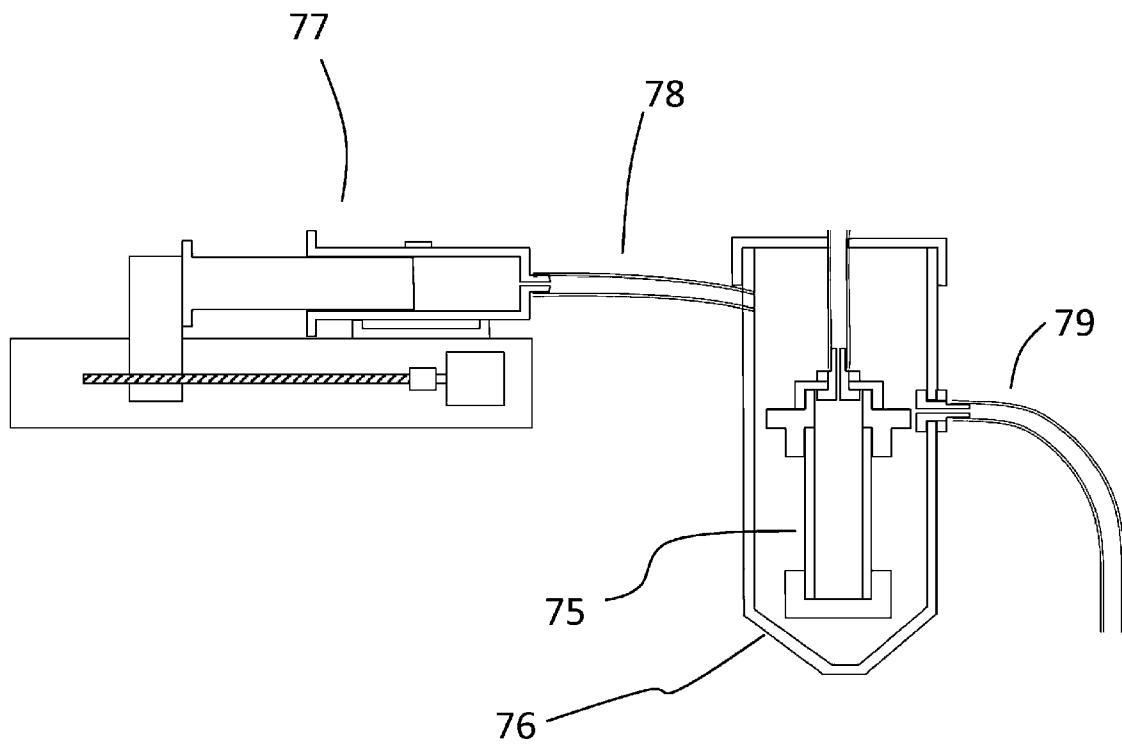
[図4]



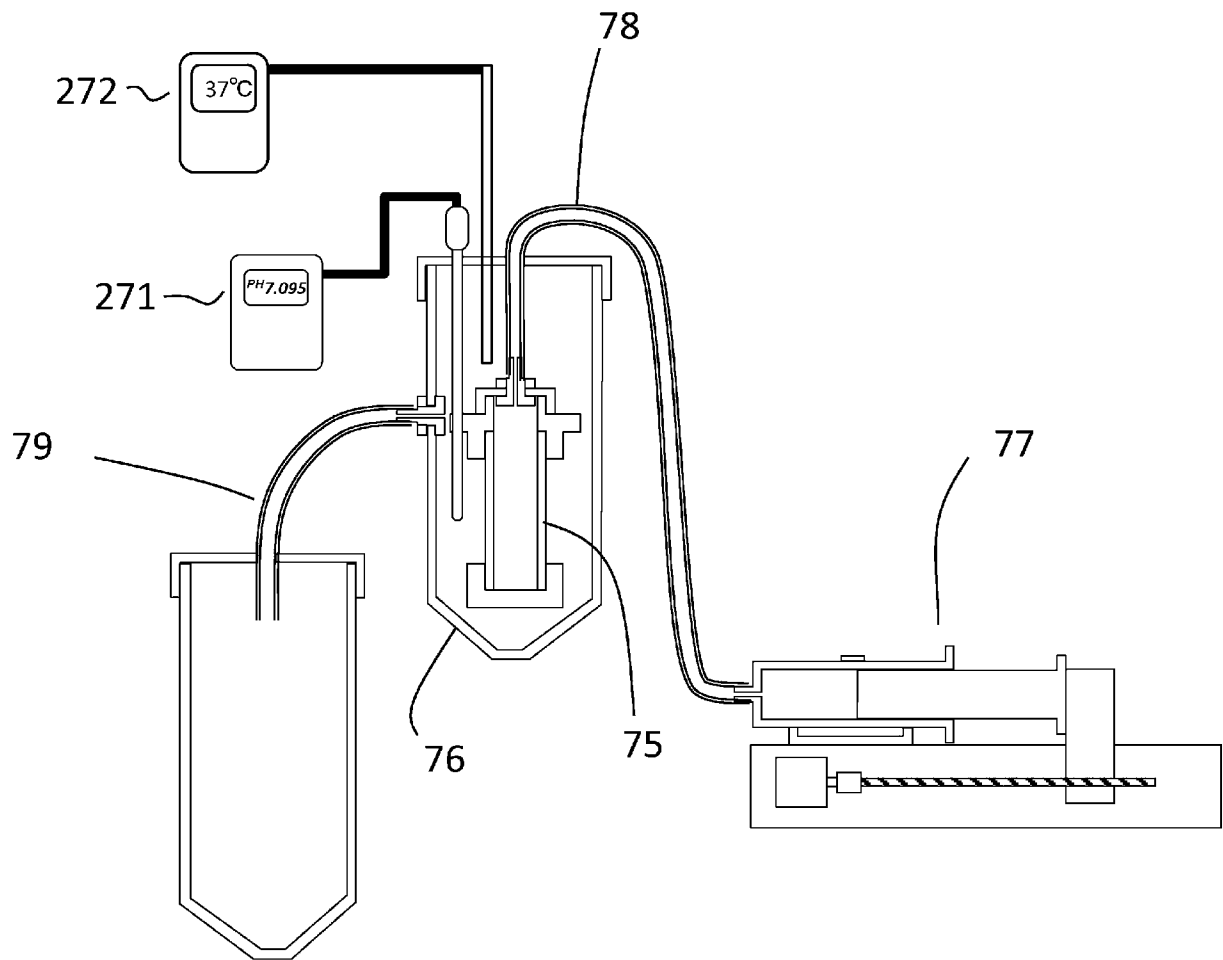
[図5]



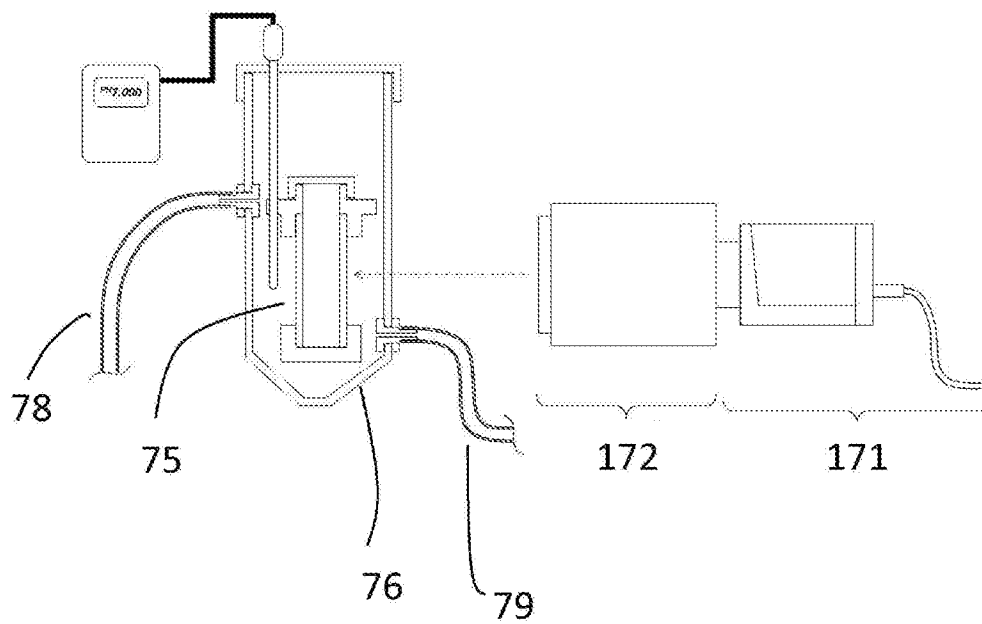
[図6]



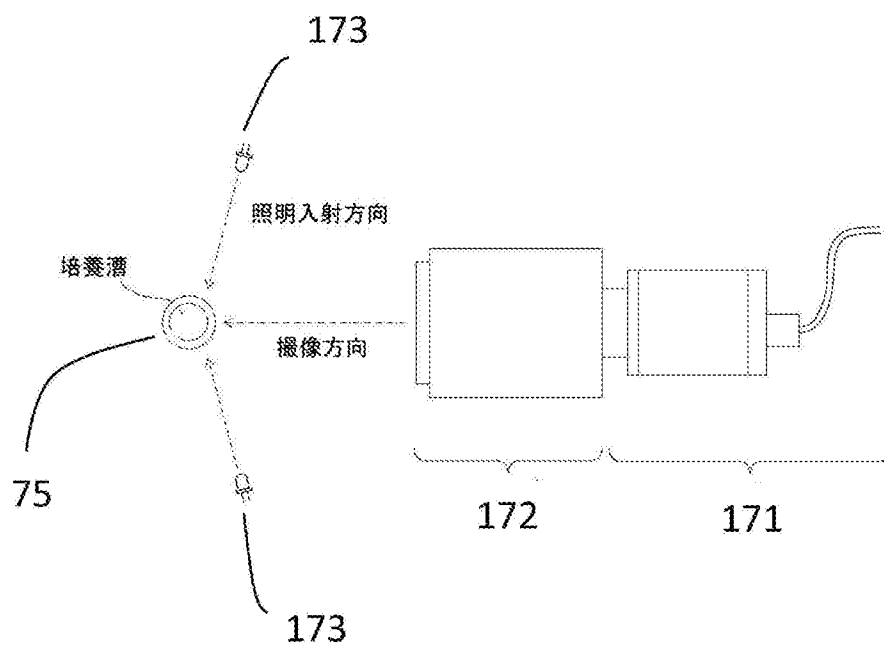
[図7]



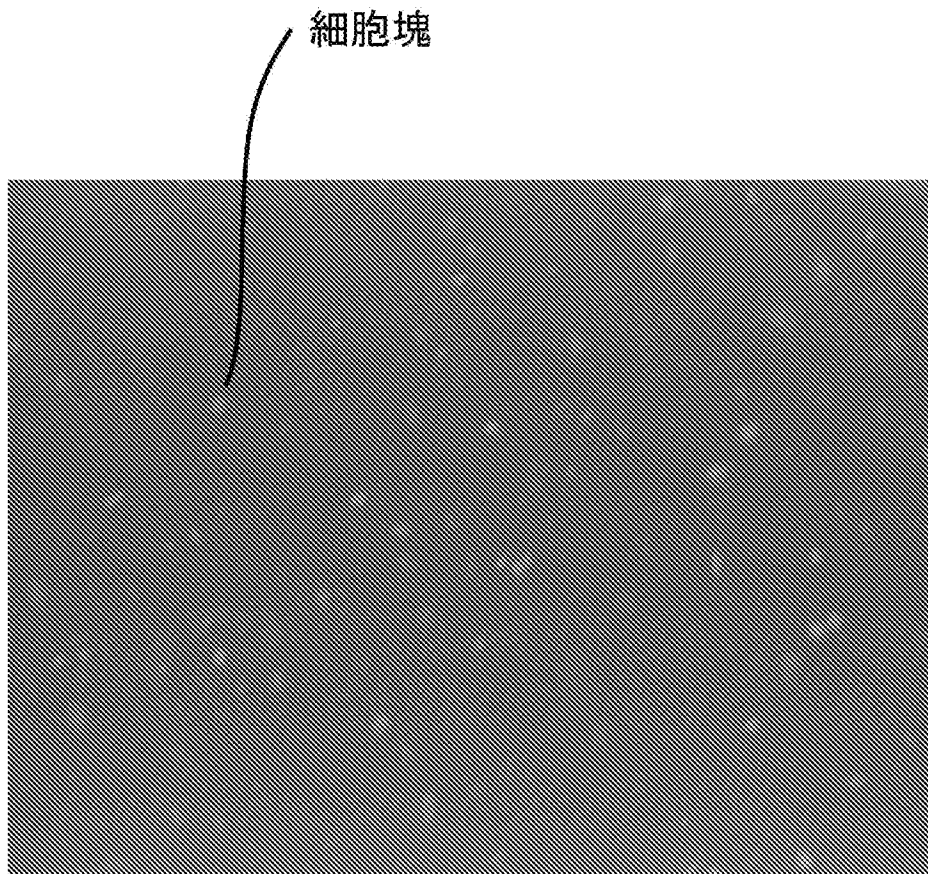
[図8]



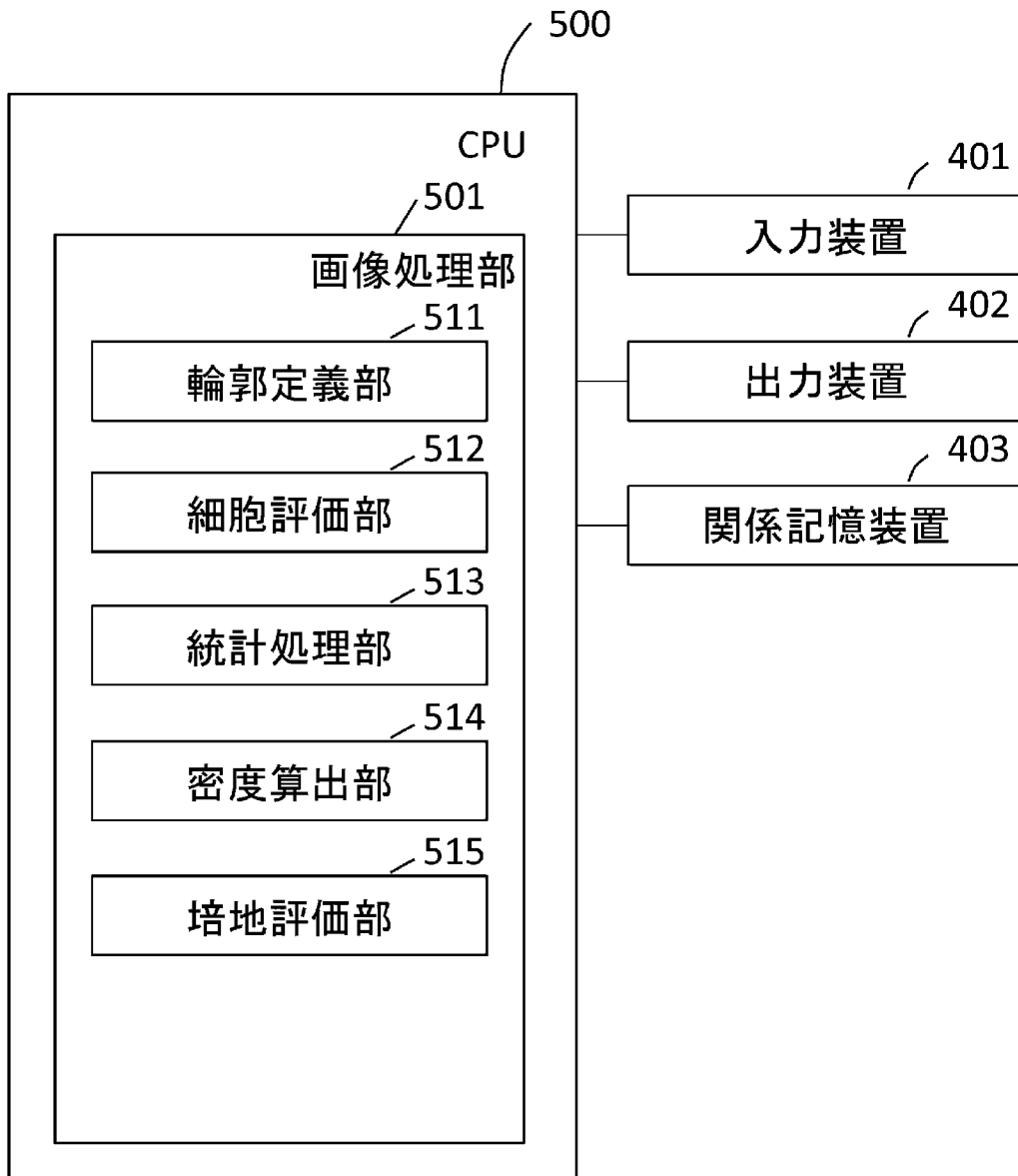
[図9]



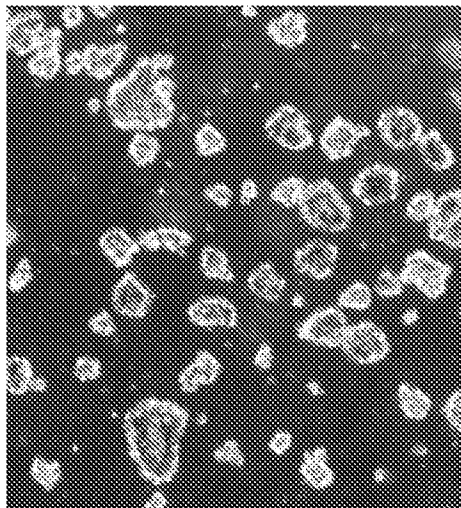
[図10]



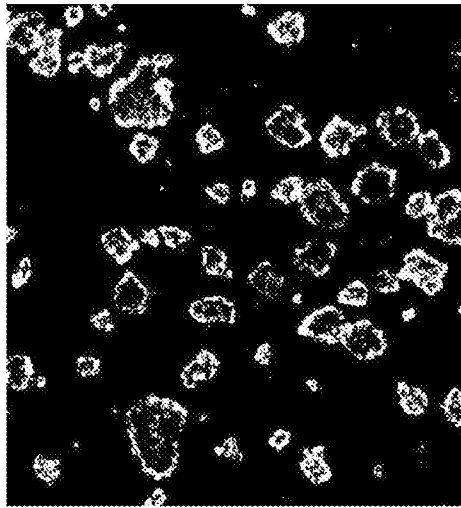
[図11]



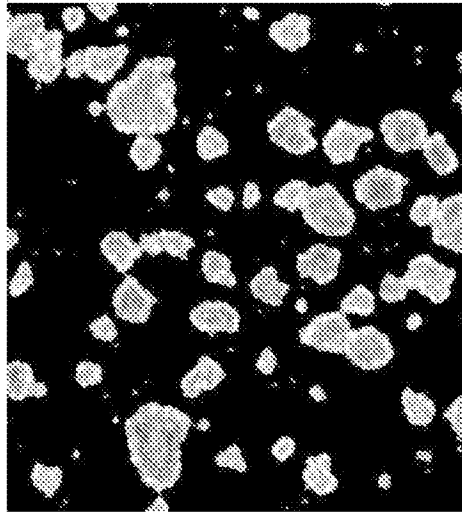
[図12]



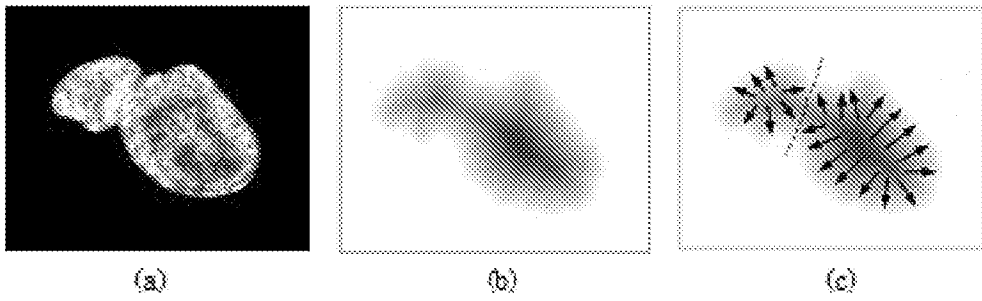
[図13]



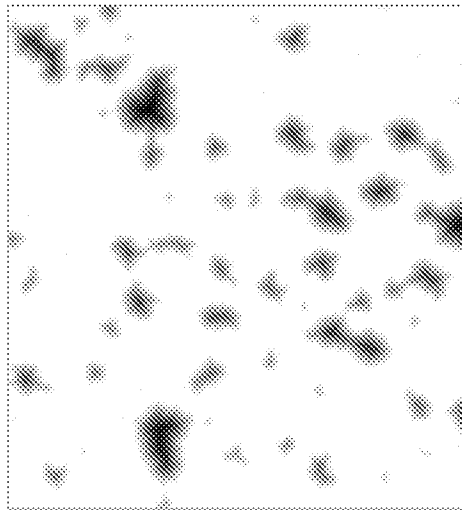
[図14]



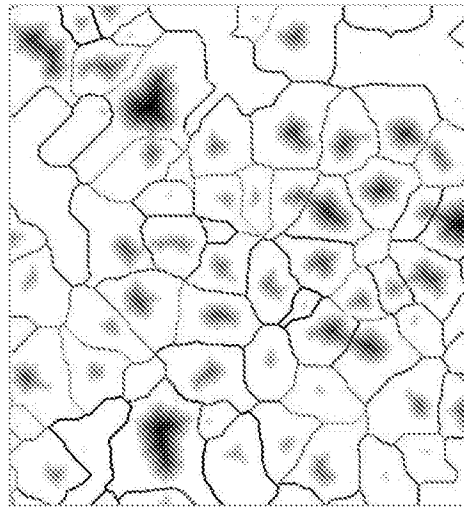
[図15]



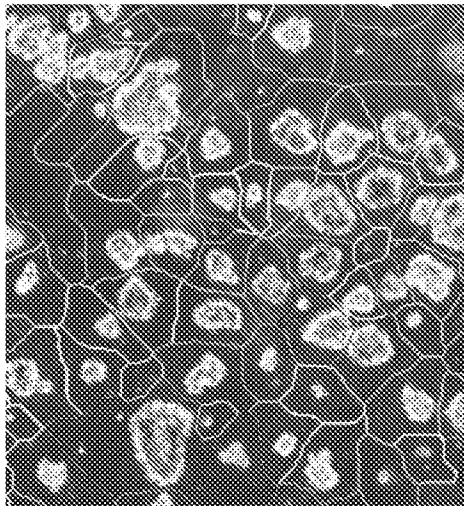
[図16]



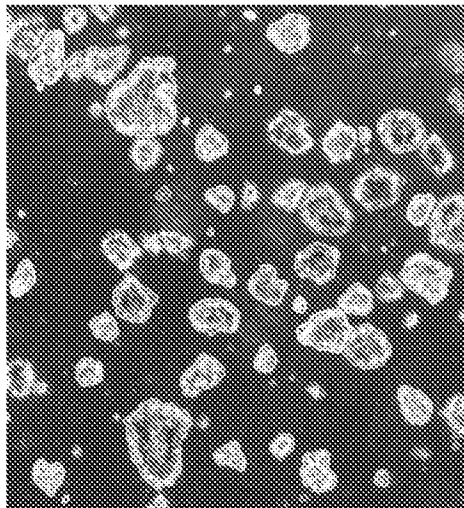
[図17]



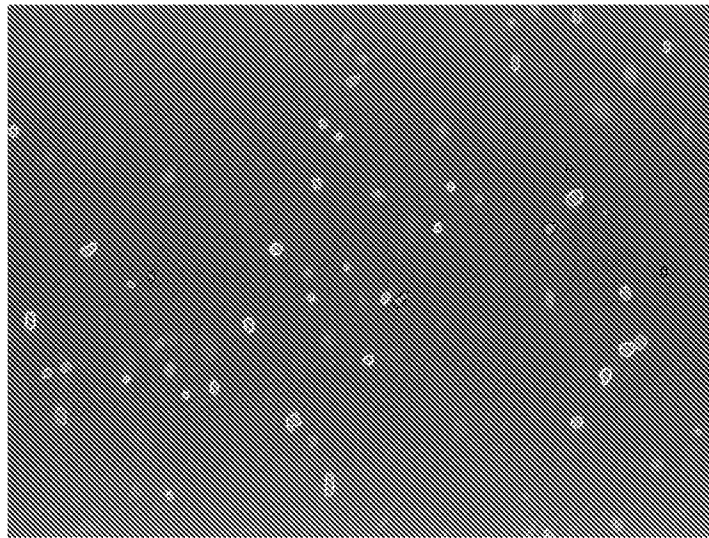
[図18]



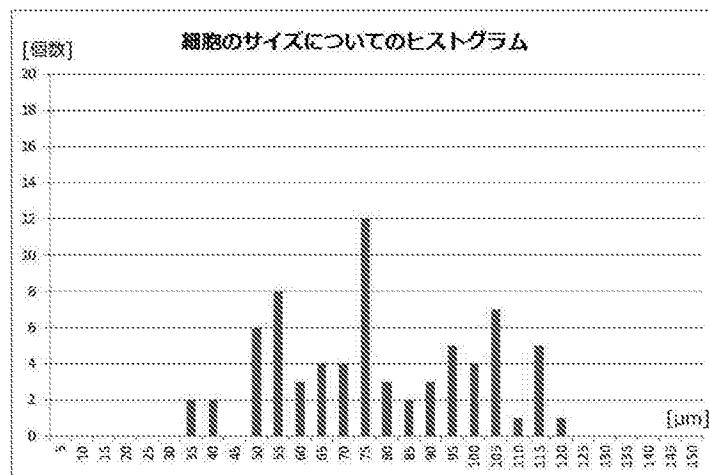
[19]



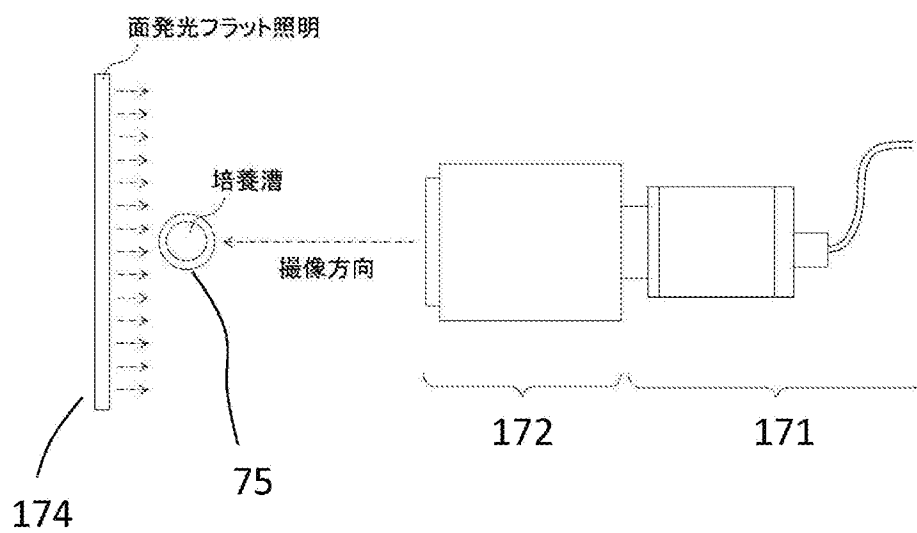
[図20]



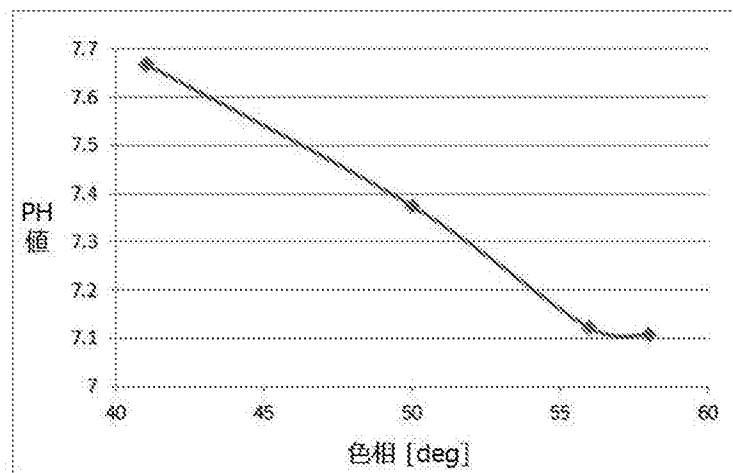
[図21]



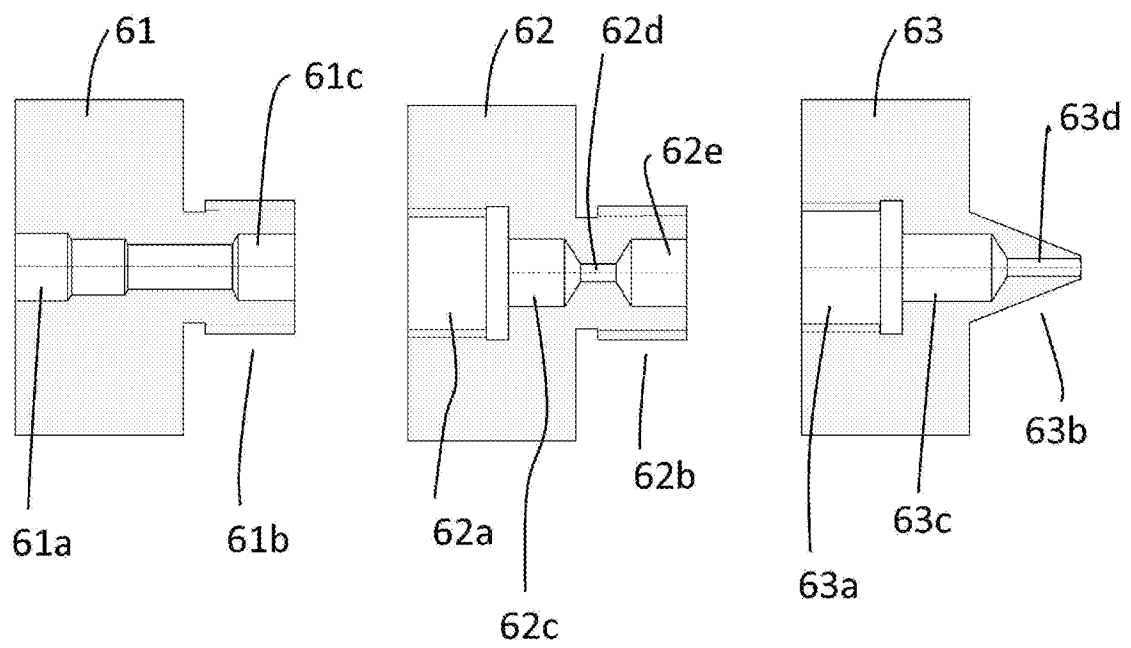
[図22]



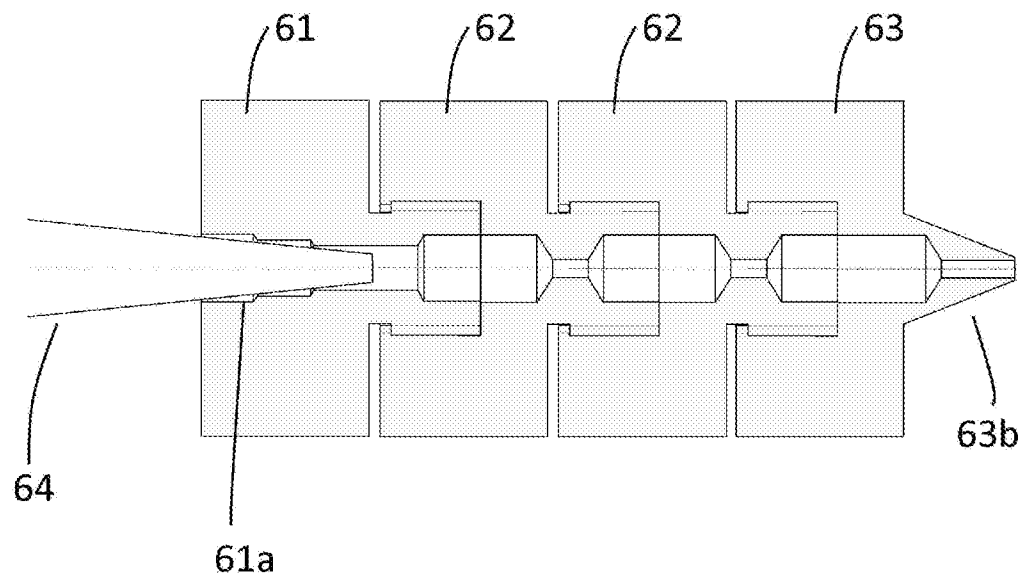
[図23]



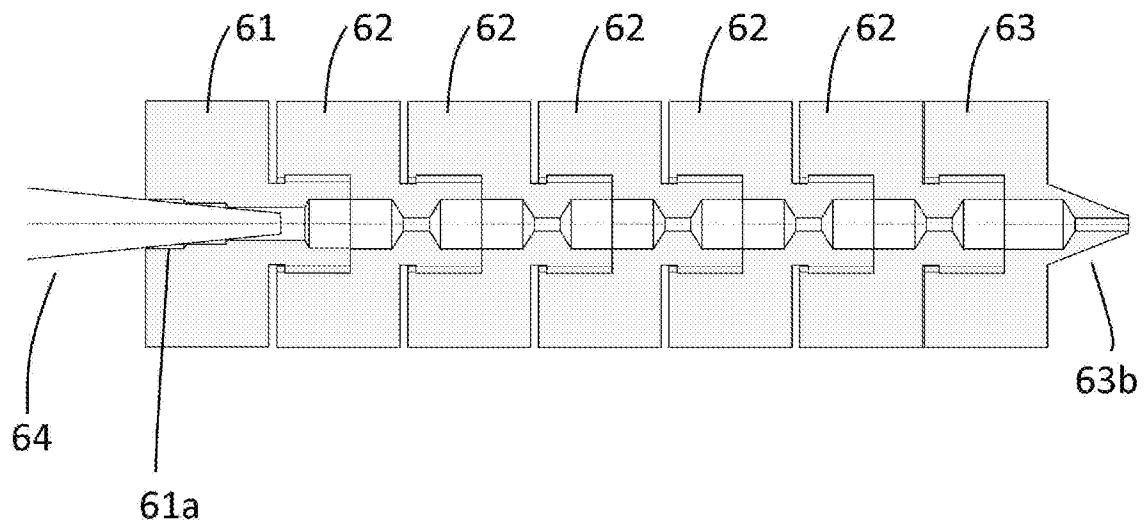
[図24]



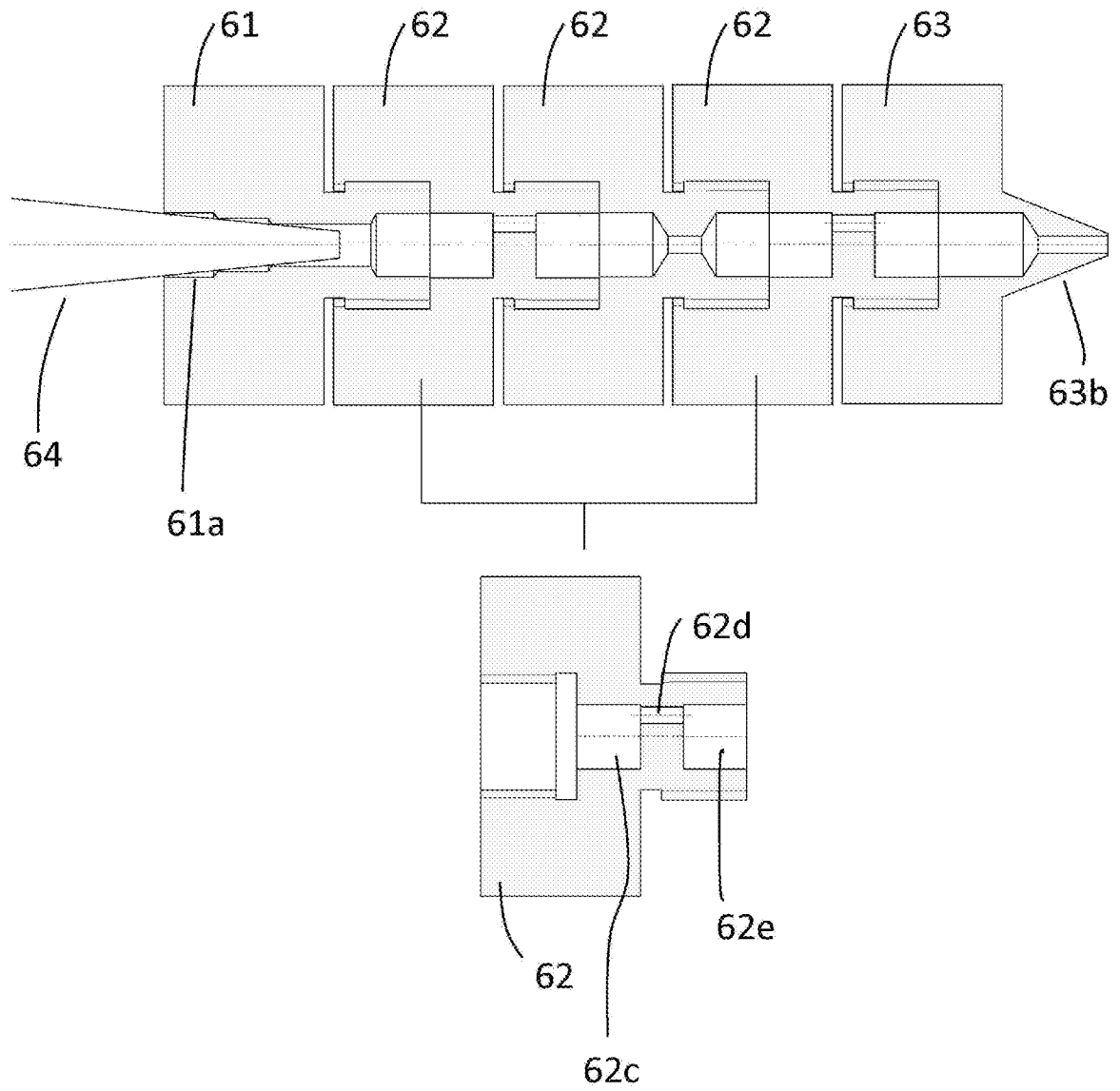
[図25]



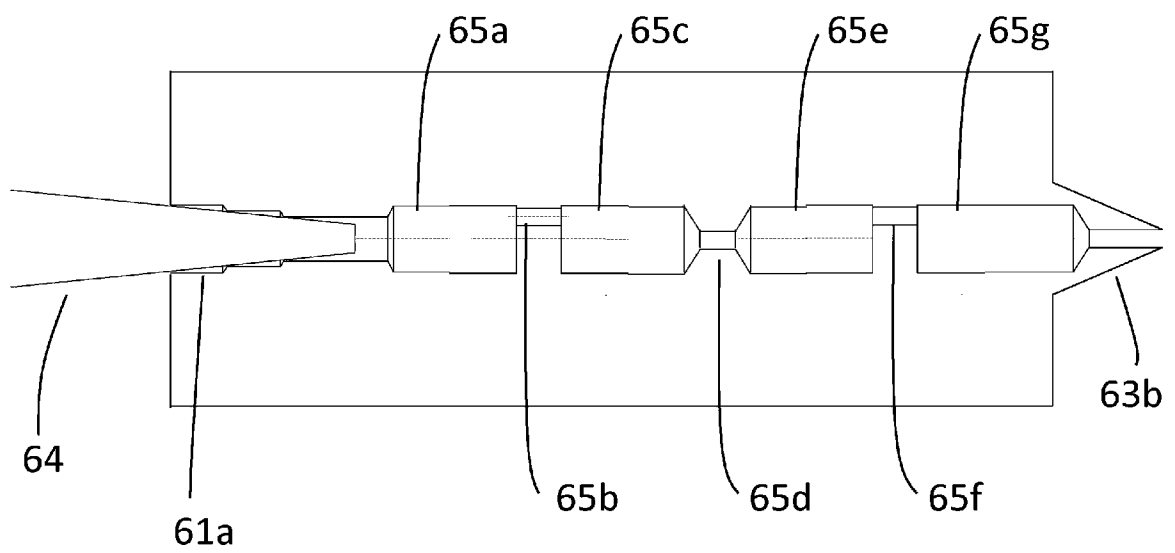
[図26]



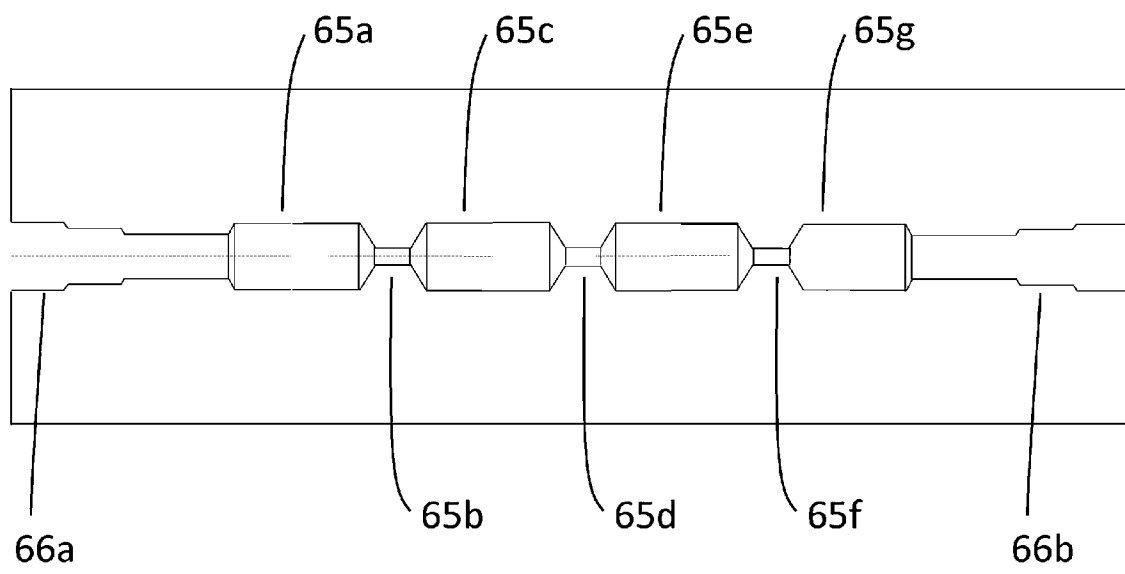
[図27]



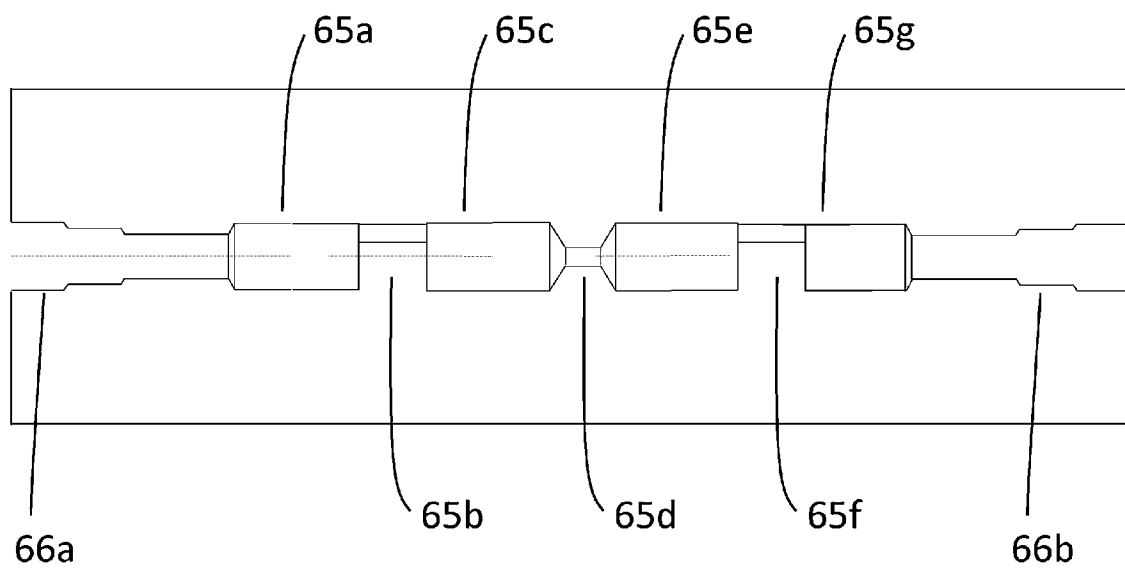
[図29]



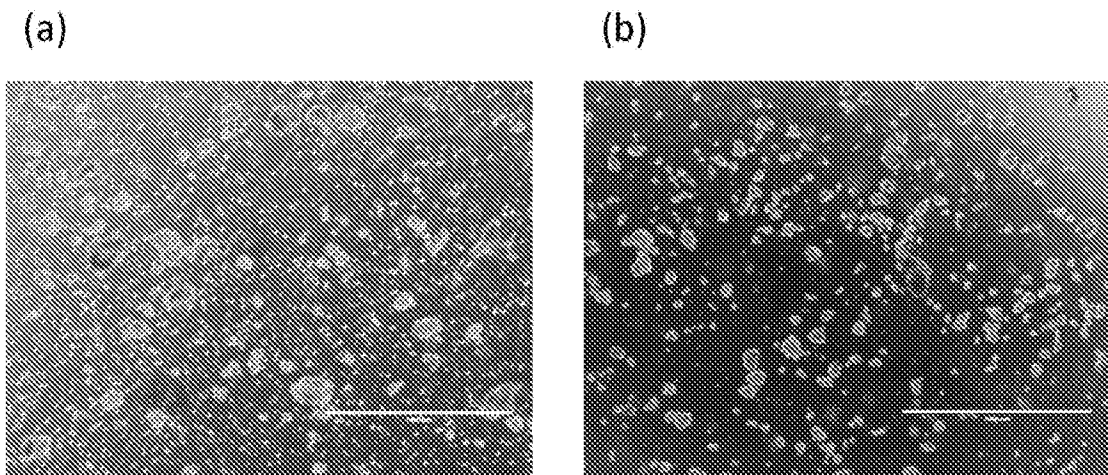
[図30]



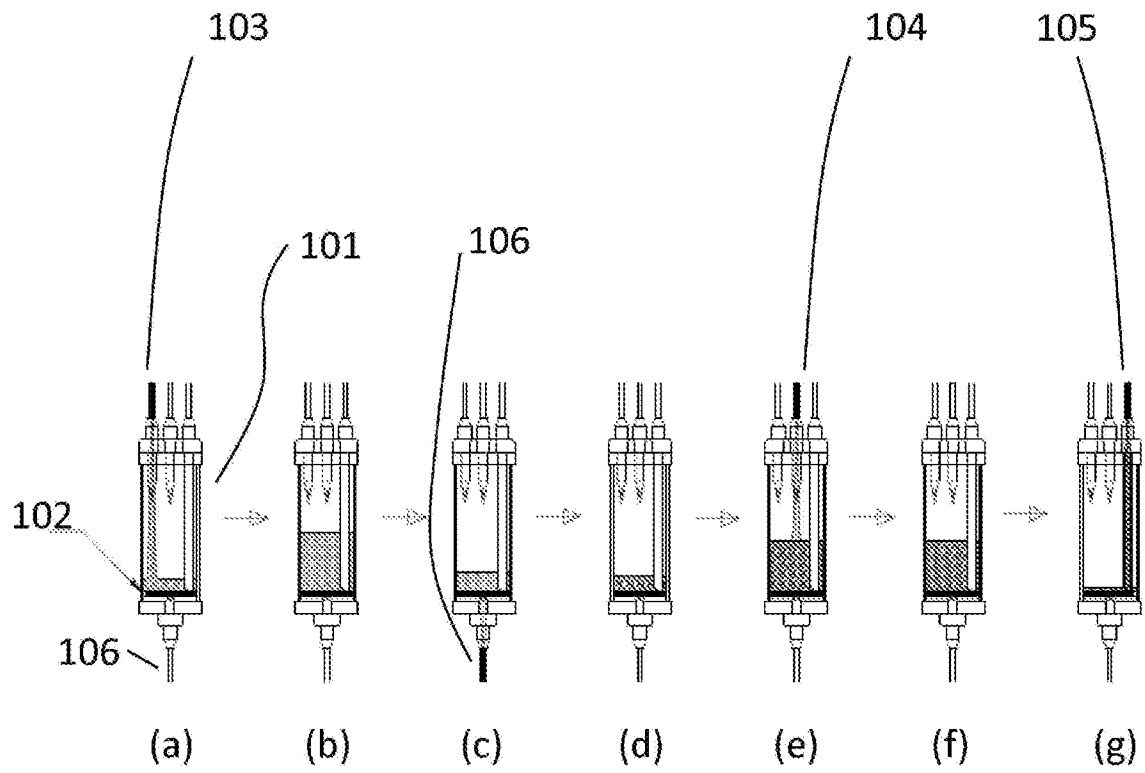
[図31]



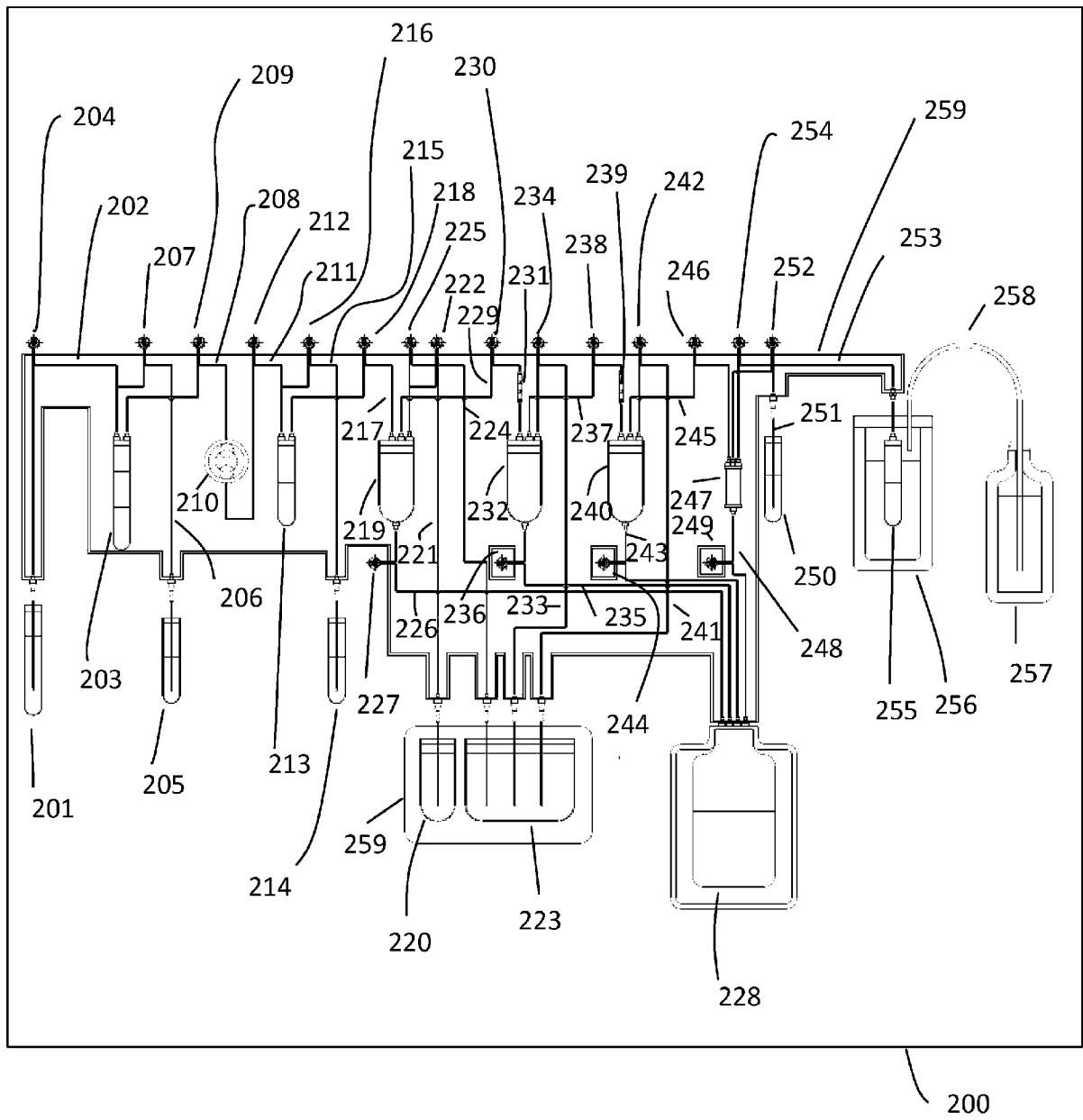
[図32]



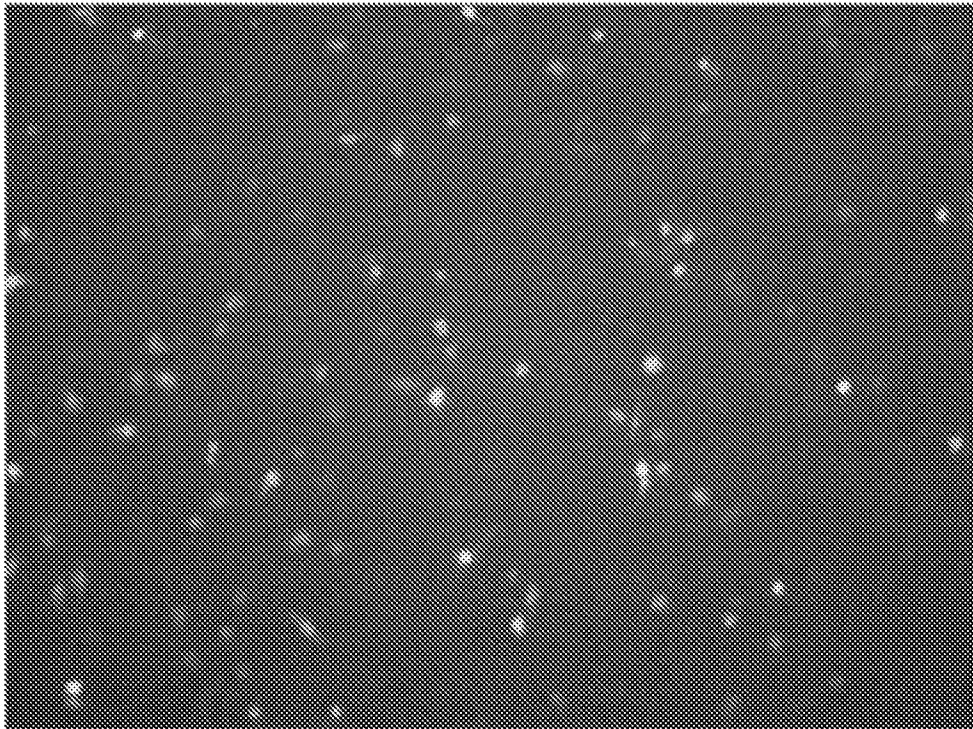
[図33]



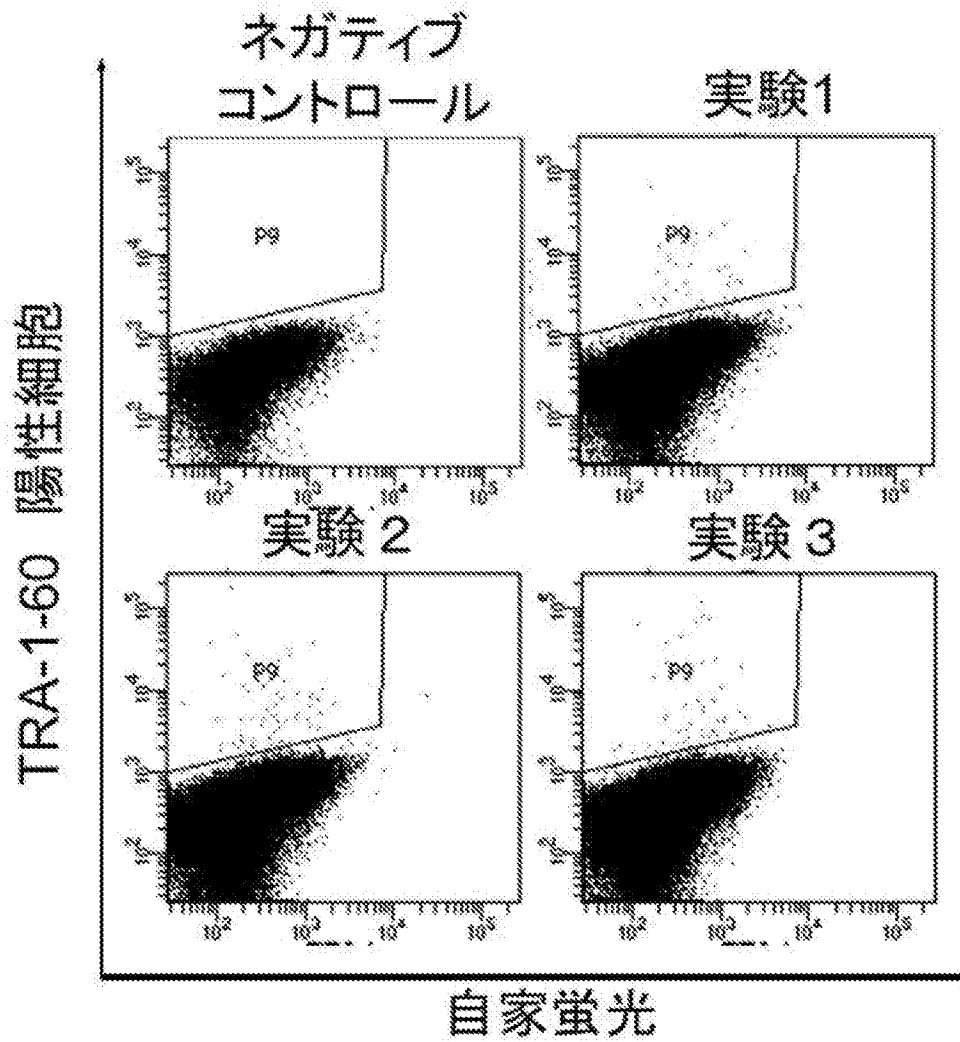
[図34]



[図35]

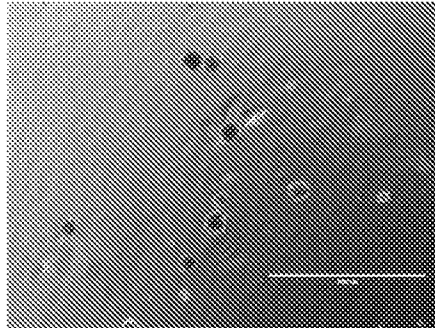


[図36]

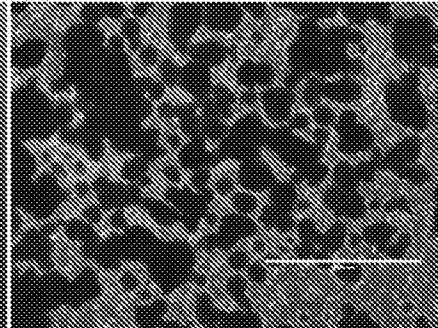


[図37]

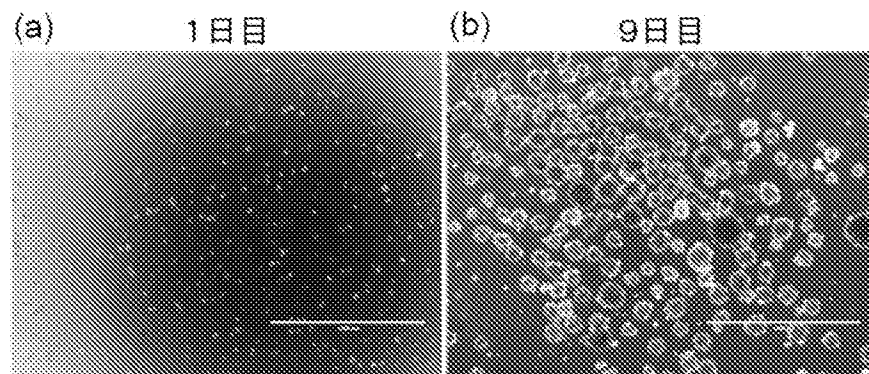
(a) ゲル化培地での浮遊培養



(b) 非ゲル化培地での浮遊培養

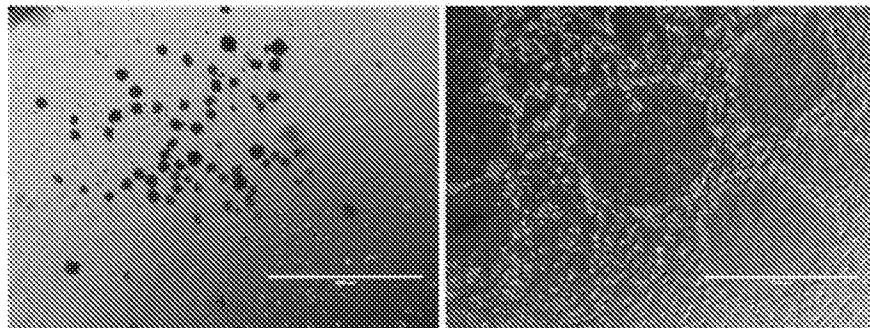


[図38]

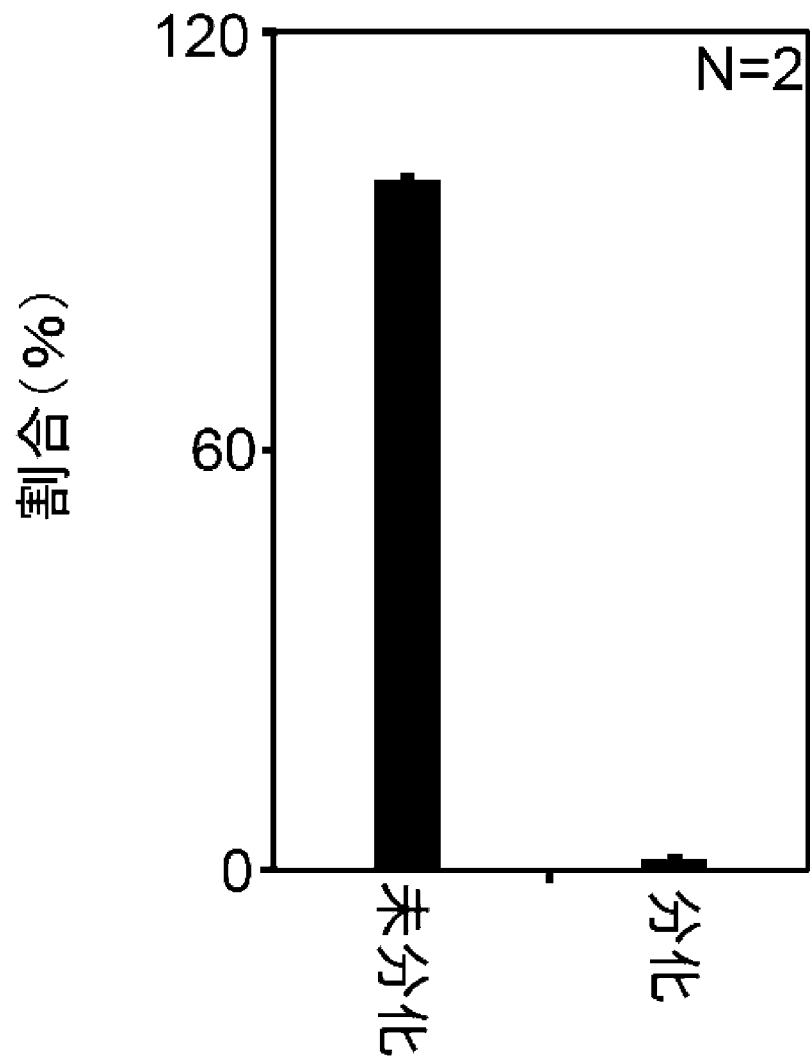


[図39]

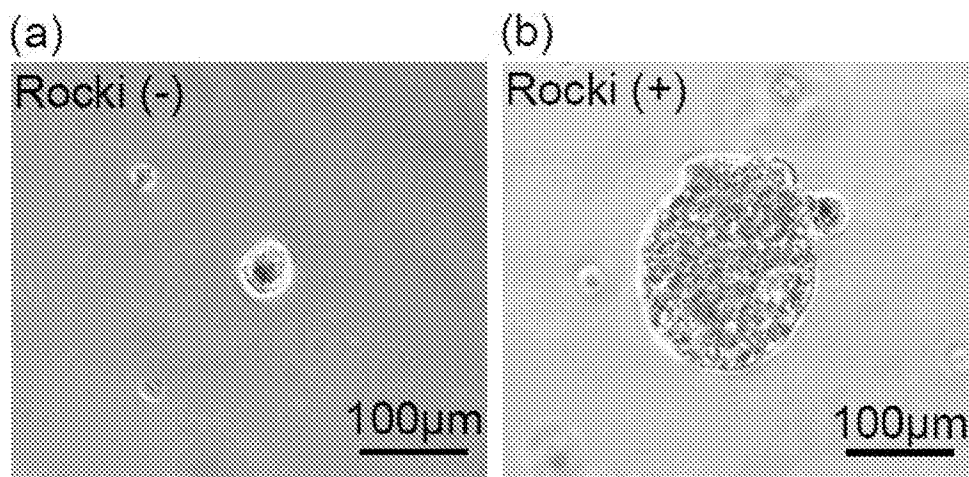
(a) フィーダー細胞上に再播種する前のコロニー (b) フィーダー細胞上に再播種してから3日後のコロニー



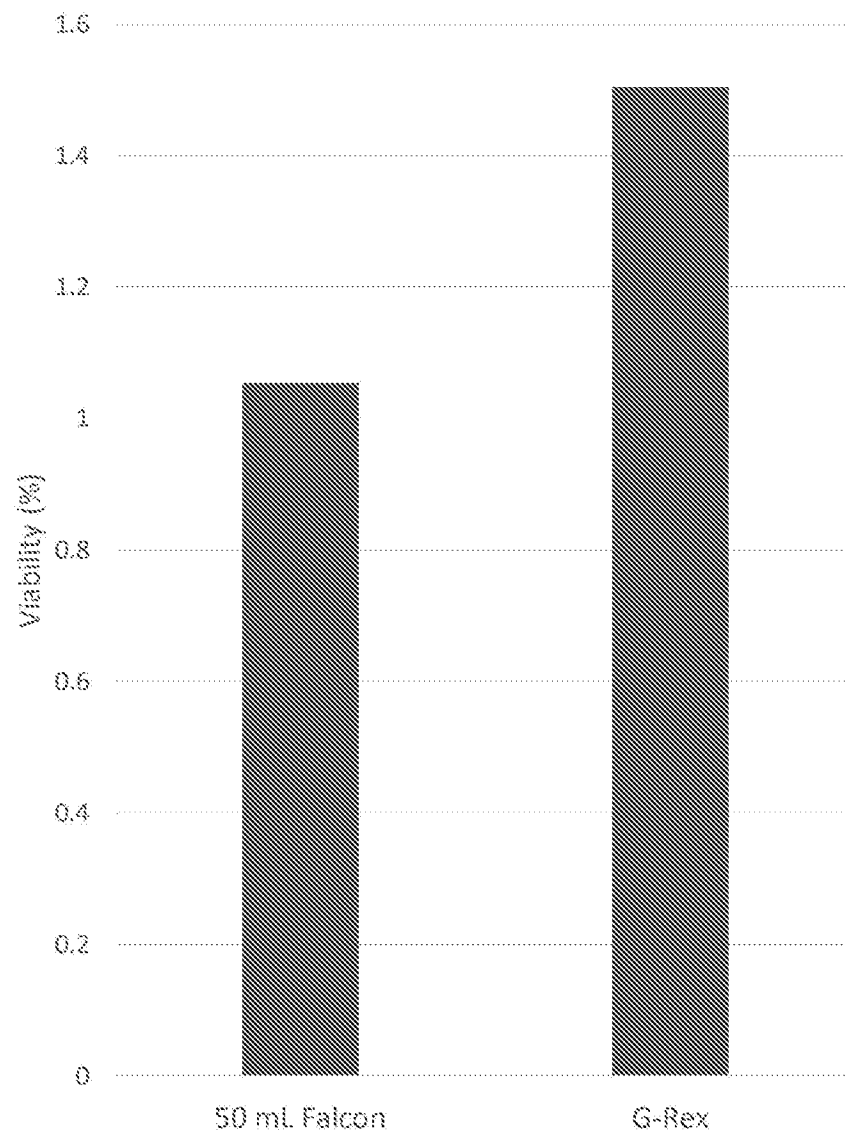
[図40]



[図41]

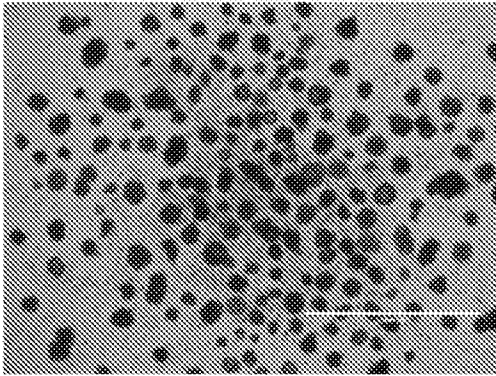


[図42]

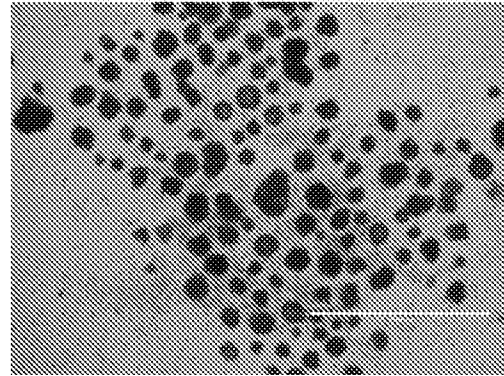


[図43]

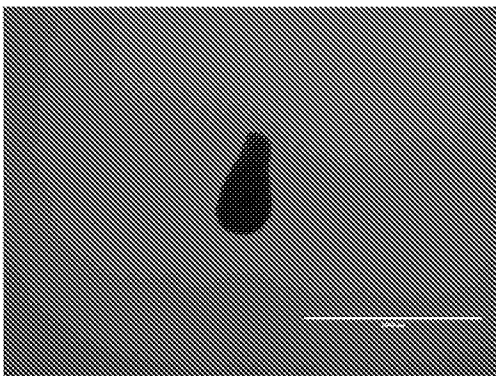
(a) 透析チューブあり
培地交換あり



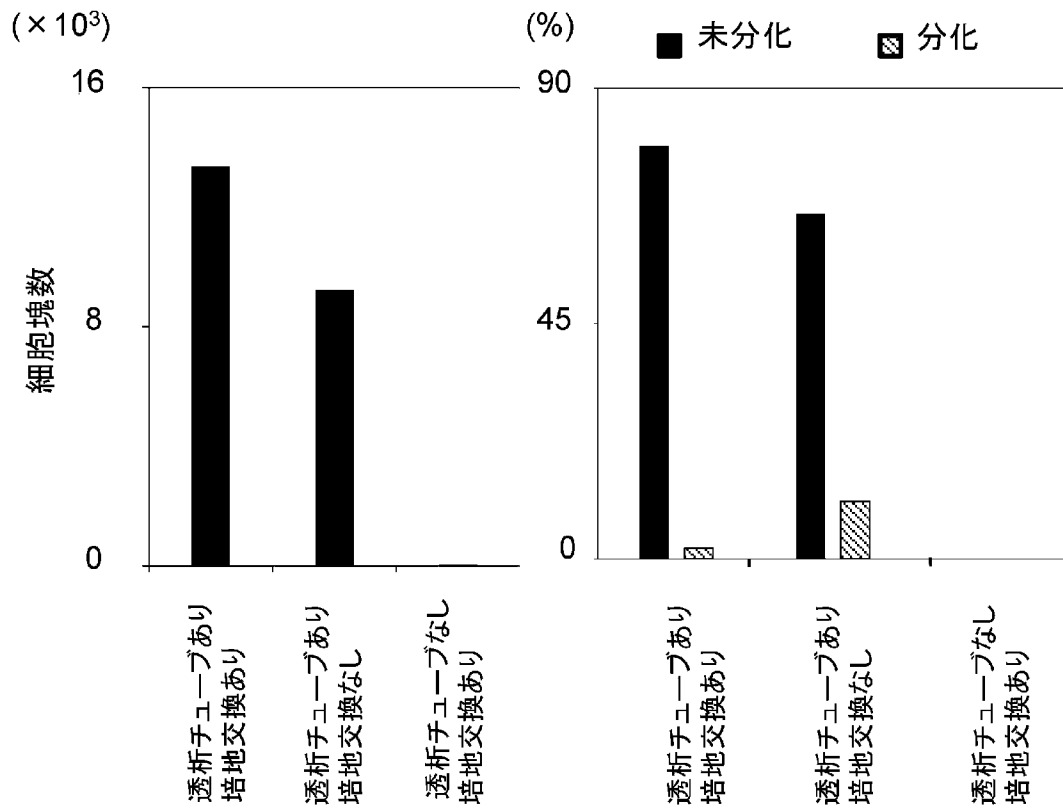
(b) 透析チューブあり
培地交換なし



(c) 透析チューブなし
培地交換なし



[図44]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/02(2006.01)i, C12M1/12(2006.01)i, C12N5/0789(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)n, C12N5/074(2010.01)n
 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)
 C12M3/00, C12M1/00, C12M1/02, C12M1/12, C12N5/0789, C12N5/0735, C12N5/074

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 1996-2016
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/136372 A1 (Hitachi, Ltd.), 19 September 2013 (19.09.2013), claims 5, 8 (Family: none)	1-146
A	JP 2010-532173 A (Cellular Dynamics International, Inc.), 07 October 2010 (07.10.2010), claims & US 2009/0029462 A1 claims & WO 2009/006422 A1 & EP 2173863 A1 & CA 2691793 A & KR 10-2010-0059789 A	1-121

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 22 November 2016 (22.11.16)	Date of mailing of the international search report 06 December 2016 (06.12.16)
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/136581 A1 (Kyoto University), 12 September 2014 (12.09.2014), claims; fig. 1 & US 2016/0060588 A1 claims; fig. 1 & EP 2966163 A1	1-128
A	JP 2015-092849 A (Tokyo Electron Ltd.), 18 May 2015 (18.05.2015), claims; fig. 1 & US 2010/0085764 A1 claims; fig. 1 & EP 2172695 A2 & CA 2681649 A1	1-121
P,A	WO 2016/117615 A1 (Fujifilm Corp.), 28 July 2016 (28.07.2016), claims; fig. 1 & JP 2016-131538 A	1-128
A	WO 2013/077423 A1 (Kyoto University), 30 May 2013 (30.05.2013), claims & US 2014/0329317 A1 claims & EP 2784153 A1	122-128
Y	Kosuke ISHII et al., "Tanosei Kansaibo Tairyo Fuyu Baiyo no Tameno Shinki Baiyo Gijutsu Kaihatsu", Bio Clinica, 10 May 2015 (10.05. 2015), vol.30, no.5, pages 82 to 86	129-146
Y	JP 2006-014693 A (Hitachi, Ltd.), 19 January 2006 (19.01.2006), claims (Family: none)	129-146
Y	WO 2013/094365 A1 (Sanyo Electric Co., Ltd.), 27 June 2013 (27.06.2013), claims & US 2013/0309710 A1 claims	129-146
Y	JP 2008-526203 A (Biogen Idec MA Inc.), 24 July 2008 (24.07.2008), claims & US 2009/0104594 A1 claims & WO 2006/071716 A2 & EP 1844138 A1 & CN 101443444 A	129-146
Y	JP 2007-000038 A (Toray Industries, Inc.), 11 January 2007 (11.01.2007), claims (Family: none)	129-146

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6498690 B2 (IMAGING RESEARCH, INC.), 24 December 2002 (24.12.2002), abstract; field of the invention & JP 2001-505654 A & WO 1998/007022 A1 & EP 1019705 A1 & CN 1410744 A	129-146
A	WO 2012/115153 A1 (Nikon Corp.), 30 August 2012 (30.08.2012), claims; fig. 1 (Family: none)	129-146

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

Box No. II 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: WO 2013/136372 A1 (Hitachi, Ltd.), 19 September 2013
(19.09.2013), claims 5, 8 (Family: none)
(Invention 1) claims 1-121
(Continued to 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claim 1 and claims 2-121 which depend on claim 1 have a special technical feature "a stem cell culture system equipped with an un-introduced cell supply passage, a factor introduction device, a cell mass production device and a housing, wherein the cell mass production device is provided with a reprogramming culture device and an expansion culture device, the reprogramming culture device is provided with a first culture medium resupply device, and the expansion culture device is provided with a second culture medium resupply device", and are classified into Invention 1.

(Invention 2) claims 122-138

Claim 122 relates to a cell mass divider comprising a combination of connecting blocks each having a through-hole formed therein. However, the cell mass divider is not described in Invention 1. Therefore, the invention described in claim 122 shares no common technical feature with Invention 1.

Further, claim 122 is not dependent on claim 1.

Consequently, claim 122 cannot be classified into Invention 1.

Claims 122 and claims 123-138 dependent on claim 122 have the afore-said special technical feature, and are therefore classified into Invention 2.

(Invention 3) claims 139-143

Claim 139 relates to a stem cell production system provided with an imaging device for imaging cultured cells, a storage device for storing the relation between the turbidity of a culture medium and the density of cell masses in the culture medium, and an image processing unit, and shares a common technical feature "a stem cell production system" with claim 1 which is classified into Invention 1.

However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the contents disclosed in document 1, i.e., a stem cell culture device provided with an imaging device (claims 5, 8). Therefore, this technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding technical feature between claim 139 and claim 1.

Further, claim 139 is not dependent on claim 1.

Consequently, claim 139 cannot be classified into Invention 1.

Claim 139 and claims 140-143 dependent on claim 139 have the afore-said special technical feature, and are therefore classified into Invention 3.

(Invention 4) claims 144-146

Claim 144 relates to a stem cell production system provided with an imaging device for imaging cultured cells, a storage device for storing the relation between the color of a culture medium and the hydrogen ion exponent of the culture medium, and an image processing unit, and shares a common technical feature "a stem cell production system" with claim 1 which is classified into Invention 1.

However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the contents disclosed in document 1, i.e., a stem cell culture device provided with an imaging device (claims 5, 8). Therefore, this technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding technical feature between claim 144 and claim 1.

In addition, claim 144 is not dependent on claim 1.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075540

Consequently, claim 144 cannot be classified into Invention 1.

Claim 144 and claims 145-146 dependent on claim 144 have the afore-said special technical feature, and are therefore classified into Invention 4.

Meanwhile, although there is no indication in the payment order for an additional fee to be paid and Opposition fee (if it is applicable), the above-said (Invention 2) further includes other inventions (Invention 5) with respect to the inventions of claims 129-138.

(Invention 5) claims 129-138

Claim 129 relates to a stem cell production system provided with an imaging device for imaging cultured cells and an image processing unit for applying a high-pass filter to an image obtained by the imaging device, and shares a common technical feature "a stem cell production system" with claim 1 which is classified into Invention 1.

However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the contents disclosed in document 1, i.e., a stem cell culture device provided with an imaging device (claims 5, 8). Therefore, this technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding technical feature between claim 129 and claim 1.

Further, claim 129 is not dependent on claim 1.

Consequently, claim 139 cannot be classified into Invention 1.

Claim 129 and claims 130-138 dependent on claim 129 have the afore-said special technical feature, and are therefore classified into Invention 5.

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/02(2006.01)i, C12M1/12(2006.01)i, C12N5/0789(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)n, C12N5/074(2010.01)n</p>			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12M3/00, C12M1/00, C12M1/02, C12M1/12, C12N5/0789, C12N5/0735, C12N5/074</p>			
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年</p>			
<p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/ MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>			
<p>C. 関連すると認められる文献</p>			
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	
A	WO 2013/136372 A1（株式会社日立製作所）2013.09.19, 請求項5, 8（ファミリーなし）	1-146	
A	JP 2010-532173 A（セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド）2010.10.07, 特許請求の範囲 & US 2009/0029462 A1(Claims) & WO 2009/006422 A1 & EP 2173863 A1 & CA 2691793 A & KR 10-2010-0059789 A	1-121	
<p>☑ 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。</p>			
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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）</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>22.11.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.12.2016</p>	
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁（ISA/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</p>		<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p>松岡 徹</p>	<p>4 B</p> <p>3 3 4 7</p>
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線</p>	<p>3 4 4 8</p>

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 請求項の番号
A	WO 2014/136581 A1 (国立大学法人京都大学) 2014.09.12, 特許請求の範囲、図1 & US 2016/0060588 A1(Claims, Fig.1) & EP 2966163 A1	1-128
A	JP 2015-092849 A (東京エレクトロン株式会社) 2015.05.18, 特許請求の範囲、図1 & US 2010/0085764 A1(Claims, Fig.1) & EP 2172695 A2 & CA 2681649 A1	1-121
P, A	WO 2016/117615 A1 (富士フイルム株式会社) 2016.07.28, 特許請求の範囲、図1 & JP 2016-131538 A	1-128
A	WO 2013/077423 A1 (国立大学法人京都大学) 2013.05.30, 特許請求の範囲 & US 2014/0329317 A1(Claims) & EP 2784153 A1	122-128
Y	石井浩介 他, 多能性幹細胞大量浮遊培養のための新規培養技術開発, Bio Clinica, 2015.05.10, 第30巻 第5号, 第82~86頁	129-146
Y	JP 2006-014693 A (株式会社日立製作所) 2006.01.19, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	129-146
Y	WO 2013/094365 A1 (三洋電機株式会社) 2013.06.27, 特許請求の範囲 & US 2013/0309710 A1(Claims)	129-146
Y	JP 2008-526203 A (バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド) 2008.07.24, 特許請求の範囲 & US 2009/0104594 A1(Claims) & WO 2006/071716 A2 & EP 1844138 A1 & CN 101443444 A	129-146
Y	JP 2007-000038 A (東レ株式会社) 2007.01.11, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	129-146
Y	US 6498690 B2 (IMAGING RESEARCH, INC.) 2002.12.24, Abstract, Field of The Invention & JP 2001-505654 A & WO 1998/007022 A1 & EP 1019705 A1 & CN 1410744 A	129-146
A	WO 2012/115153 A1 (株式会社ニコン) 2012.08.30, 特許請求の範囲、図1 (ファミリーなし)	129-146

第II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. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ 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III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

文献1 : WO 2013/136372 A1 (株式会社日立製作所) 2013.09.19, 請求項5, 8 (ファミリーなし)

(発明1) 請求項1-121

請求項1及びその従属項である請求項2-121は、導入前細胞送液路と、因子導入装置と、細胞塊作製装置と、筐体とを備え、細胞塊作製装置が、初期化培養装置と、拡大培養装置とを備え、初期化培養装置が第1の培地補給装置を備え、拡大培養装置が第2の培地補給装置を備える幹細胞培養システムという特別な技術的特徴を有しているもので、発明1に区分する。

(特別ページに続く)

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項について作成した。
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項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
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ため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

(発明2) 請求項122-138

請求項122は、貫通孔が設けられた連結ブロックを組み合わせた細胞塊分割器についてであるが、発明1には細胞塊分割器は記載されておらず、請求項122に係る発明は、発明1と共通の技術的特徴を有していない。また、請求項122は請求項1の従属請求項ではない。したがって、請求項122は発明1に区分できない。

そして、請求項122及びその従属項である請求項123-138は、前記の特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

(発明3) 請求項139-143

請求項139は、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度との関係を記憶する記憶装置と、画像処理部とを備える幹細胞製造システムについてであり、発明1に区分された請求項1と「幹細胞製造システム」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容である撮影装置を備える幹細胞培養装置(請求項5, 8)に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項139と請求項1の間に、他に同一又は対応する技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項139は請求項1の従属請求項ではない。したがって、請求項139は発明1に区分できない。

そして、請求項139及びその従属項である請求項140-143は、前記の特別な技術的特徴を有しているので、発明3に区分する。

(発明4) 請求項144-146

請求項144は、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の色と、培地の水素イオン指数との関係を記憶する記憶装置と、画像処理部とを備える幹細胞製造システムについてであり、発明1に区分された請求項1と「幹細胞製造システム」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容である撮影装置を備える幹細胞培養装置(請求項5, 8)に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項144と請求項1の間に、他に同一又は対応する技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項144は請求項1の従属請求項ではない。したがって、請求項144は発明1に区分できない。

そして、請求項144及びその従属項である請求項145-146は、前記の特別な技術的特徴を有しているので、発明4に区分する。

なお、追加して納付すべき手数料及び異議申立手数料(該当する場合)の納付命令書では指摘していないが、上記(発明2)はさらに、請求項129-138に係る発明について、別の発明(発明5)を含んでいる。

(発明5) 請求項129-138

請求項129は、培養細胞を撮影する撮影装置と、前記撮影装置で得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部とを備える幹細胞製造システムについてであり、発明1に区分された請求項1と「幹細胞製造システム」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容である撮影装置を備える幹細胞培養装置(請求項5, 8)に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項129と請求項1の間に、他に同一又は対応する技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項129は請求項1の従属請求項ではない。したがって、請求項129は発明1に区分できない。

そして、請求項129及びその従属項である請求項130-138は、前記の特別な技術的特徴を有しているので、発明5に区分する。