



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I576433 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：102115157

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 26 日

(51)Int. Cl. : C12N5/095 (2010.01) C12M1/36 (2006.01)

(30)優先權：2012/04/27 日本 2012-104078

(71)申請人：旭化成股份有限公司 (日本) ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (JP)

日本

學校法人東京女子醫科大學 (日本) TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY

(JP)

日本

(72)發明人：岩元潮 IWAMOTO, USHIO (JP)；佐藤美智 SATO, MICHI (JP)；小西佳奈子
KONISHI, KANAKO (JP)；松浦勝久 MATSUURA, KATSUHISA (JP)；清水達也
SHIMIZU, TATSUYA (JP)；岡野光夫 OKANO, TERUO (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

JP 201136146A

US 7879601B2

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：9 共 39 頁

(54)名稱

細胞培養系統及細胞培養方法

(57)摘要

本發明提供一種細胞培養系統，其係具備細胞培養槽、成分調整液貯存槽、具有細胞培養液之入口與出口之培養液成分調整機構、自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之入口的入口連接送液線路、自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之出口的出口連接送液線路、自入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向出口連接送液線路灌注細胞培養液之機構、調整細胞培養槽之液量之機構者，並且可經由培養液成分調整機構而連續地調整細胞培養槽內之細胞培養液之成分與成分調整液貯存槽內之成分調整液之成分，同時可實質上將細胞培養槽內之細胞培養液之量調整為固定量。

指定代表圖：

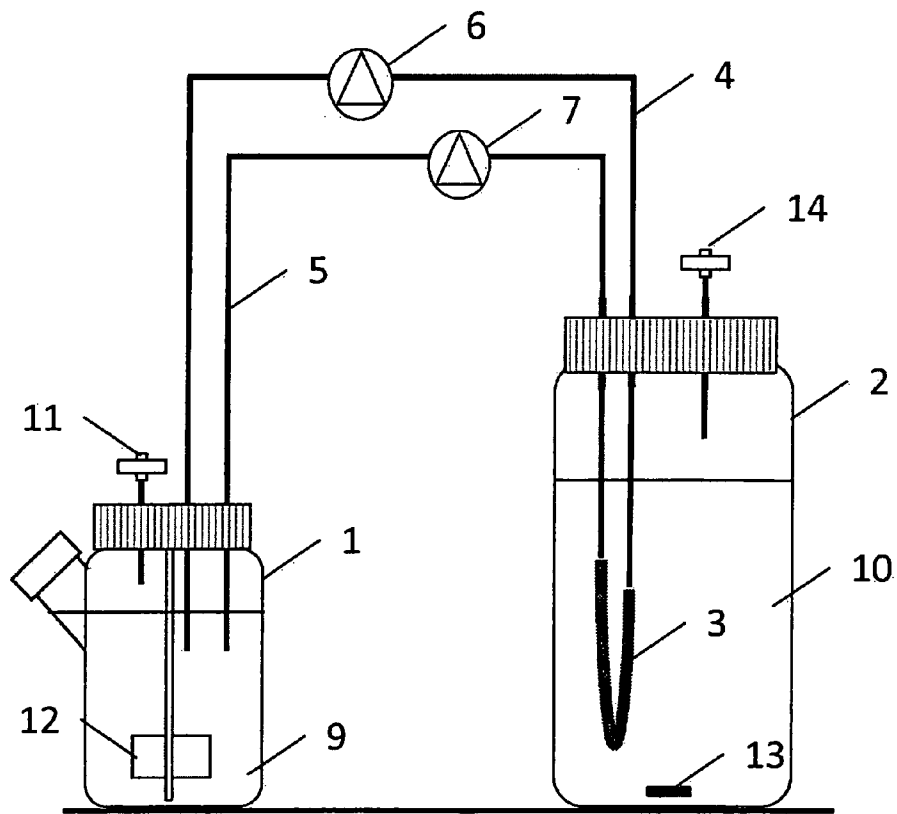


圖1

符號簡單說明：

- 1 . . . 細胞培養槽
- 2 . . . 成分調整液貯存槽
- 3 . . . 培養液成分調整機構
- 4 . . . 送液線路
- 5 . . . 送液線路
- 6 . . . 送液機構
- 7 . . . 送液機構
- 9 . . . 細胞培養液
- 10 . . . 成分調整液
- 11 . . . 通氣過濾器
- 12 . . . 攪拌翼
- 13 . . . 攪拌轉子
- 14 . . . 通氣過濾器

公告奉

發明摘要

※ 申請案號：102115157

※ 申請日：

102. 4. 26

※IPC 分類：C12N 5/095 (2010.01)

C12M 1/36 (2006.01)

【發明名稱】

細胞培養系統及細胞培養方法

【中文】

本發明提供一種細胞培養系統，其係具備細胞培養槽、成分調整液貯存槽、具有細胞培養液之入口與出口之培養液成分調整機構、自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之入口的入口連接送液線路、自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之出口的出口連接送液線路、自入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向出口連接送液線路灌注細胞培養液之機構、調整細胞培養槽之液量之機構者，並且可經由培養液成分調整機構而連續地調整細胞培養槽內之細胞培養液之成分與成分調整液貯存槽內之成分調整液之成分，同時可實質上將細胞培養槽內之細胞培養液之量調整為固定量。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第 (1) 圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- | | |
|----|-----------|
| 1 | 細胞培養槽 |
| 2 | 成分調整液貯存槽 |
| 3 | 培養液成分調整機構 |
| 4 | 送液線路 |
| 5 | 送液線路 |
| 6 | 送液機構 |
| 7 | 送液機構 |
| 9 | 細胞培養液 |
| 10 | 成分調整液 |
| 11 | 通氣過濾器 |
| 12 | 攪拌翼 |
| 13 | 攪拌轉子 |
| 14 | 通氣過濾器 |

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

細胞培養系統及細胞培養方法

【技術領域】

本發明係關於一種細胞培養系統及細胞培養方法。

【先前技術】

近年來，除先前之以合成化學物質為主成分之醫藥品以外，作為以使用生物技術所生產之生物材料為起源之醫藥品的生物製劑被廣泛應用。於生物製劑中，抗體等細胞產生物尤為出色。該等生物製劑之效果非常高，但價格昂貴成為課題。又，由於其係來自生物之產生物，故而於製造步驟中亦存在品質不均等變得大於先前醫藥品之可能性。因此，業界謀求開發出一種一次性大量培養細胞而廉價地製造產生物之系統，並且謀求一種藉由可穩定地保持培養環境而維持細胞之品質而可提高產生物之品質的培養系統。

進而，近來將細胞用於治療之再生醫療開始實用化。目前在日本，關於皮膚或軟骨組織，亦存在經醫藥批准而市售之製品。目前之治療方法為採集患者之一部分細胞，使其增殖後製作組織並進行移植，但預測將來由成體幹細胞或多潛能幹細胞誘導目標細胞併用於治療之情況會實用化。於實現上述治療之情形時，為了製作可對患者移植之大小之組織，需要非常大量之細胞。以心臟之左心室為例，估算需要 10^9 個數量級之細胞數。為了準備上述大量之培養細胞，就目前之技術手段而言，需要大量之勞力時間及成本。

進而，現狀為細胞培養步驟多為人以手動操作實施，因此操作失誤及細菌等混入培養系統之風險亦無法完全否定。

根據以上情況，而要求實現一種可以更高密度培養細胞，而且成本低，可自動實施的有效之培養系統。作為滿足上述要求事項之培養系統，業界提出有一面利用使用半透膜之透析之原理而連續地淨化培養液，一面進行培養之各種系統(例如參照專利文獻1、2)。

但是，若於該等系統中進行細胞培養，則會因藉由灌注培養液而產生之半透膜外側與內側之壓力差或成分之濃度梯度，而發生培養液溶劑之跨膜移動，若實施長時間之培養，則槽內之液量會減少或增加，而難以控制培養槽內之液量，因此存在難以實現穩定之培養的課題。進而，通常於利用該等系統之培養中，為了使培養液之組成變化變得較小，而要求儘量提高灌注之速度，但亦存在越提高灌注速度，上述控制變得越困難之課題。又，擴大培養規模亦會使灌注速度提高，但依然會產生相同之課題。

又，作為其他方法，非專利文獻1中揭示有一種將透析機構連接於轉子型細胞培養槽之方法。但是，存在如下課題：上述培養槽需要採用與通常廣泛使用之細胞培養裝置不同之特殊細胞培養槽，且難以擴大規模。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]日本專利特開昭63-226279號公報

[專利文獻2]日本專利特公平7-40928號公報

[非專利文獻]

[非專利文獻1]Biotechnology and Bioengineering, 2005; 92 (7): 920

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明之課題在於提供一種用以解決如上所述之課題之細胞培

養系統。即，提供一種可對應各種細胞之培養形態，且可同時達成低成本、省力化、高密度培養的系統。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人爲了解決上述課題進行努力研究，結果發現：利用如下之細胞培養系統，可提供可對應各種細胞之培養形態，可同時達成低成本、省力化、高密度培養，且可容易地擴大規模的系統，從而完成本發明，上述細胞培養系統之特徵在於：經由培養液成分調整機構，細胞培養槽內之細胞培養液與成分調整液貯存槽內之成分調整液可連續地調整成分，同時可實質上將細胞培養槽內之培養液量調整爲固定量。

即，本發明之態樣係一種細胞培養系統，其係具備用以培養細胞之細胞培養槽、成分調整液貯存槽、具有細胞培養液及/或成分調整液之入口與出口且具備半透膜之培養液成分調整機構、自細胞培養槽及/或成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之入口的入口連接送液線路、自細胞培養槽及/或成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之出口的出口連接送液線路、自入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向出口連接送液線路灌注細胞培養液及/或成分調整液之機構、及調整細胞培養槽之液量之機構者，並且可經過培養液成分調整機構而連續地調整細胞培養槽內之細胞培養液的成分與成分調整液貯存槽內之成分調整液的成分，同時可實質上將細胞培養槽內之細胞培養液之量調整爲固定量。

例如，關於細胞培養系統，亦可將培養液成分調整機構配置於成分調整液貯存槽內，培養液成分調整機構具有細胞培養液之入口與出口，入口連接送液線路係自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之入口，出口連接送液線路係自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之出口，灌注之機構係自入口連接送液線路經過培養液成分調整機

構向出口連接送液線路灌注細胞培養液。

或者，關於細胞培養系統，亦可將培養液成分調整機構配置於細胞培養槽內，培養液成分調整機構具有成分調整液之入口與出口，入口連接送液線路係自成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之入口，出口連接送液線路係自成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之出口，灌注之機構係自入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向出口連接送液線路灌注成分調整液。

亦或，關於細胞培養系統，亦可將培養液成分調整機構設置於成分調整液貯存槽及細胞培養槽之外部，入口連接送液線路包含自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之第1入口之第1入口連接送液線路、及自成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之第2入口之第2入口連接送液線路，出口連接送液線路包含自細胞培養槽連接於培養液成分調整機構之第1出口之第1出口連接送液線路、及自成分調整液貯存槽連接於培養液成分調整機構之第2出口之第2出口連接送液線路，半透膜構成連結第1入口與第1出口之空間及連結第2入口與第2出口之空間，灌注之機構包含自第1入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向第1出口連接送液線路灌注細胞培養液之機構、及自第2入口連接送液線路經過培養液成分調整機構向第2出口連接送液線路灌注成分調整液之機構。

灌注之機構亦可具備：送液機構，其將細胞培養槽之細胞培養液及/或成分調整液貯存槽之成分調整液輸送至培養液成分調整機構；及回液機構，其將輸送至培養液成分調整機構而使細胞培養液中之不需要物質與成分調整液中之有用物質接觸之細胞培養液及/或成分調整液進行回液；並且送液機構每小時之送液量 $V1$ 與回液機構每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，含有細胞之細胞培養液之總量之變動為10%以內。



細胞培養系統亦可進而具備過濾器，該過濾器係設置於入口連接送液線路或第1入口連接送液線路上，且不使細胞或細胞凝聚塊通過，使細胞培養液實質上通過而到達細胞培養槽內側端部。

又，本發明之態樣係一種細胞培養方法，其包含如下步驟：a)設置上述之細胞培養系統；b)向細胞培養槽供給細胞及細胞培養液，向成分調整液貯存槽供給培養液成分調整液；c)連續地灌注細胞培養液及/或成分調整液，以成為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ 之方式控制送液機構每小時之送液量 $V1$ 與回液機構每小時之回液量 $V2$ ，且以含有細胞之細胞培養液之總量之變動成為10%以內的方式進行控制。

又，本發明之另一態樣係一種細胞培養系統，其具備：至少放入細胞及細胞培養液而培養細胞之細胞培養槽、放入含有有用物質之成分調整液之成分調整液貯存槽、使細胞培養液與成分調整液接觸而進行物質交換之培養液成分調整機構、將細胞培養槽之細胞培養液及/或成分調整液貯存槽之成分調整液輸送至培養液成分調整機構之送液機構、及將經接觸之細胞培養液及/或成分調整液進行回液之回液機構；並且送液機構每小時之送液量 $V1$ 與回液機構每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，含有細胞培養液之細胞之細胞培養液之總量的變動為10%以內。

或者，本發明之態樣進而係一種細胞培養方法，其包含如下步驟：至少將細胞及細胞培養液放入細胞培養槽中並培養細胞；輸送細胞培養槽之細胞培養液及/或成分調整液貯存槽之成分調整液；使細胞培養液與成分調整液經由膜而接觸；將經由膜而接觸之細胞培養液及/或成分調整液進行回液；並且送液步驟中每小時之送液量 $V1$ 與回液步驟中每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，含有細胞培養液之細胞之細胞培養液之總量的變動為10%以內。

於上述細胞培養系統及細胞培養方法中，例如細胞為哺乳動物

細胞，哺乳動物細胞為胚胎幹細胞(ES細胞，Embryonic stem cells)、人工多潛能幹細胞(iPS細胞，Induced pluripotent stem cells)、間葉系幹細胞、造血幹細胞、及/或由該等分化誘導而成之細胞。

又，於上述細胞培養系統及細胞培養方法中，例如細胞為可懸浮培養之細胞、附著型細胞、形成細胞凝集體之細胞、及/或可附著於粒子狀載體上之細胞，可附著於粒子狀載體上之細胞係向細胞培養槽中放入細胞及粒子狀載體並培養而獲得。

[發明之效果]

本發明之細胞培養系統可提供一種可對應各種細胞之培養形態，且可同時達成低成本、省力化、高密度培養之系統。

【圖式簡單說明】

圖1係表示細胞培養系統之一例的模式圖，且係表示將培養液成分調整機構設置於成分調整液槽內之例的模式圖。

圖2係表示細胞培養系統之一例的模式圖，且係表示將培養液成分調整機構設置於成分調整液槽內，且於細胞培養槽內設置有不使細胞通過之過濾器之例的模式圖。

圖3係表示細胞培養系統之一例的模式圖，且係表示將培養液成分調整機構設置於細胞培養槽內之例的模式圖。

圖4係表示細胞培養系統之一例的模式圖，且係表示將培養液成分調整機構獨立地設置於細胞培養槽、及成分調整液貯存槽之外部之例的模式圖。

圖5係表示細胞培養系統之一例的模式圖，且係表示將培養液成分調整機構獨立地設置於細胞培養槽、及成分調整液貯存槽之外部，且於細胞培養槽內設置有不使細胞通過之過濾器之例的模式圖。

圖6係表示細胞培養槽內細胞培養液之pH值變化的圖表。

圖7係表示細胞培養槽內細胞培養液之乳酸濃度變化的圖表。



圖8係表示胚狀體(培養第10天)之相當於圓之直徑分佈的圖表。

圖9係表示胚狀體(培養第10天)內凋亡細胞之染色圖的圖表。

【實施方式】

以下，對本發明之實施形態進行說明。於以下之圖式之記載中，對於相同或類似之部分，以相同或類似之符號表示。但是，圖式係模式性地表示者。因此，具體之尺寸等應對照以下之說明而進行判斷。又，當然包含圖式相互間之相互之尺寸之關係或比率亦不同之部分。

本實施形態之細胞培養系統係一種細胞培養系統，其如圖1所示具備：用以培養細胞之細胞培養槽1；成分調整液貯存槽2；具有細胞培養液9及/或成分調整液10之入口與出口且具備半透膜之培養液成分調整機構3；自細胞培養槽1及/或成分調整液貯存槽2連接於培養液成分調整機構3之入口的入口連接送液線路5；自細胞培養槽1及/或成分調整液貯存槽2連接於培養液成分調整機構3之出口的出口連接送液線路4；自入口連接送液線路5經過培養液成分調整機構3向出口連接送液線路4灌注細胞培養液9及/或成分調整液10之機構7、6；及調整細胞培養槽1之液量之機構者；並且可經由培養液成分調整機構3而連續地調整細胞培養槽1內之細胞培養液9之成分與成分調整液貯存槽2內之成分調整液10的成分，同時可實質上將細胞培養槽1內之細胞培養液9之量調整為固定量。

如圖2所示，於細胞培養槽1內，亦可將作為用以防止細胞或細胞凝聚塊會與細胞培養液9一併流至細胞培養槽1之外側之機構的過濾器8設置於入口連接送液線路5之端部。作為過濾器8，只要為細胞或細胞凝聚塊難以堵塞過濾器表面之結構即可，素材或形狀並無限定，例如若以細胞為對象，則可使用平均孔徑5~10 μm 之不鏽鋼或尼龍製之網、不織布等，又若以細胞凝聚塊為對象，則可使用包含聚乙烯之

燒結體、不織布之平均孔徑30 μm 之平板型膜等。材質具有容易吸附細胞或細胞凝聚塊之性質之情形時，亦可藉由利用其他材料塗敷細胞或細胞凝聚塊，或使用表面改質劑，而抑制吸附。

所謂本實施形態之細胞培養液係指至少具有各種細胞與該等細胞可生長之溶液成分及環境之溶液。其成分及濃度係根據細胞之性質進行設計。又，可爲了容易維持生理性pH值而以具有緩衝能力之方式進行設計，或亦可爲了容易利用顏色辨別pH值之變化而混合pH值指示色素。可直接使用通常市售之各種細胞培養液，或亦可根據目標細胞之性質於該等中添加追加成分而使用。

本實施形態之細胞之培養系統所培養之細胞係哺乳動物細胞等細胞。若培養後係利用細胞之產生物，則亦可選擇容易產生該物質之細胞、或爲了容易產生目標物質而導入有特定基因之細胞。又，若細胞培養後係利用特定之細胞，則亦可使用以使該細胞容易增殖之方式改變基因而成之細胞等。

又，關於細胞之成熟度，亦不受任何限制，可同時使用成熟細胞、未分化細胞。因此，可例示自活體組織進行酵素處理而採集之細胞、源自血液之細胞、間葉系幹細胞、ES細胞、iPS細胞等。又，亦不限定於附著型細胞、懸浮細胞。進而，細胞亦不限定於單一種類之細胞。亦可混合會產生使目標細胞容易生長之物質之其他細胞而用於共同培養。

所謂本實施形態之培養液成分調整機構係指培養液成分之膜透過性取決於其分子量之半透性的膜。成分調整液經由培養液成分調整機構而與細胞培養液接觸。培養液成分調整機構之孔徑係根據細胞培養槽中所欲保持之成分之分子量而設計。即，以細胞培養槽內所欲保持之成分中最小分子量物質不透過膜之方式進行選擇。培養液成分調整機構之形狀可使用平膜形狀、中空纖維形狀，但就灌注培養液或成

分調整液之目的而言，較佳為中空纖維形狀。

培養液成分調整機構之材質並無特別限定，可較佳地使用不使細胞培養槽內所欲保持之成分吸附、分解等之材質。又，材質具有容易吸附細胞培養槽內所欲保持之成分之性質的情形時，亦可藉由利用其他材料塗敷該等，或使用表面改質劑而抑制吸附。培養液成分調整機構3可如圖3所示設置於細胞培養槽1內，或可如圖1及圖2所示設置於成分調整液貯存槽2中，或可如圖4所示獨立地設置於細胞培養槽1或成分調整液貯存槽2之外部。

如上所述，本實施形態之細胞培養系統可採用如下至少3種形態：1)將培養液成分調整機構設置於成分調整液槽內；2)將培養液成分調整機構設置於細胞培養槽內；3)將培養液成分調整機構獨立地設置於細胞培養槽、及成分調整液貯存槽之外部，但該等形態亦可根據細胞之性質而選擇。例如，若培養之細胞為附著型細胞，則為了防止細胞附著於設置於細胞培養槽內之培養液成分調整機構之半透膜上，可較佳地使用1)或3)之形態。又，若培養細胞為懸浮細胞，且為以單細胞之狀態增殖之細胞，則可較佳地使用2)之形態。

於圖4所示之構成中，利用送液機構7自細胞培養槽1抽出之細胞培養液9經過第1入口連接送液線路5，而自中空纖維模組之第1入口進入中空纖維模組之內部，通過中空纖維3之內側，進而自中空纖維模組之第1出口經過第1出口連接送液線路4而回到細胞培養槽1中。又，利用送液機構15自成分調整液貯存槽2抽出之成分調整液10經過第2入口連接送液線路17，而自中空纖維模組之第2入口進入中空纖維模組之內部，通過中空纖維3之外側，進而自中空纖維模組之第2出口經過第2出口連接送液線路16而回到成分調整液貯存槽2中。

所謂本實施形態之成分調整液係指具有細胞培養液之成分實質上可透過培養液成分調整機構之成分中之至少1種成分的溶液。培養

液與成分調整液各自所含有之成分可根據其分子量與兩液間之濃度差，經由膜而進行調整。

分子量小於膜之孔徑，實質上無法透過膜之成分不會於兩液間移動。相對於此，分子量小於膜之孔徑，實質上可透過膜之成分係以其濃度差變少之方式於兩液間調整濃度。由細胞產生且蓄積於細胞培養液中之代謝物向成分調整液側移動，藉此使培養液中之濃度下降。同時，關於細胞生長所必需且於培養期間濃度下降之成分，係自成分調整液向培養液移動而得以補充。根據以上之原理，適當地設定成分調整液之內容與濃度，藉此維持培養液中之環境，而維持細胞之良好之生長環境。當然亦可直接使用細胞培養液。因此，較理想為成分調整液具有於細胞培養期間自培養液中失去之全部成分，進而理想為以該等成分之濃度於培養期間不枯竭之方式設定濃度。

又，就防止細胞代謝物之蓄積之觀點而言，成分調整液之量較理想為儘量多地設定。較理想為將成分調整液之量設定為培養液之5倍以上，更理想為設定為10倍以上。但是，成分調整液之量由於會影響培養成本，故而亦可根據培養期間與必需細胞數而決定成分調整液之量。又，成分調整液亦可與細胞培養液同樣地，為了容易維持生理性pH值而以具有緩衝能力之方式進行設計，或為了容易利用顏色辨別pH值之變化而混合pH值指示色素等。

所謂本實施形態之細胞培養槽只要為以下述方式進行設計者即可，即於保持具有各種細胞與該等細胞可生長之溶液成分之培養液之狀態下可進行無菌培養，其形狀、大小、材質並無限制。通常該等參數係根據細胞之特性與必需細胞數而設計。若細胞為附著型細胞，則設計為細胞因重力而沈澱而容易接著於表面之具有較廣平面結構的槽，若細胞為懸浮細胞，則設計為存在深度，且如圖1至圖4所示般藉由旋轉翼(攪拌翼)12之攪拌，而培養液之成分或氧濃度容易均勻化之



結構。

又，對於附著型細胞，亦可於設計為懸浮細胞用之細胞培養槽中混合附著型細胞與粒子載體並進行培養，藉此使附著型細胞附著於粒子載體上，一面使其懸浮一面進行培養。進而，如藉由懸浮培養使細胞彼此容易聚集而形成細胞塊之附著型細胞亦可藉由設計為懸浮細胞用之槽而進行培養。

如圖1至圖4所示，於細胞培養槽1中亦可設置通氣過濾器11。

於細胞培養槽中分別設置自槽取出細胞培養液及/或成分調整液之口、及用以於調整成分後返回槽內之口。

所謂本實施形態之成分調整液貯存槽只要為藉由下述方式進行設計者即可，即於培養期間可無菌地保持成分調整液，其形狀、大小、材質並無限制。通常該等參數係根據成分調整液之量或於槽內是否設置培養液成分調整機構而適當設計。於成分調整液貯存槽中分別設置自槽取出細胞培養液及/或成分調整液之口、及用以於調整成分後返回槽內之口。

又，如圖1至圖4所示，亦可將攪拌轉子13置於成分調整液貯存槽2之底面。進而，亦可於成分調整液貯存槽2中設置通氣過濾器14。

所謂本實施形態之送液線路係指設置於細胞培養槽、成分調整液貯存槽、培養液成分調整機構之間，且具有可無菌地灌注培養液或成分調整液之管腔結構的管道。材質係使用矽、胺基甲酸酯、氟樹脂、聚氯乙烯等。

所謂本實施形態之灌注細胞培養液及/或成分調整液之機構係指以連接上述送液線路之方式進行設置，且使用動力而可連續地輸送線路內之液體的機構。只要為一般之泵便可使用，可例示蠕動泵、隔膜泵等。

本實施形態之調整細胞培養槽之液量之機構係指於培養中實質

上將細胞培養槽之液容量調整為固定量的機構。亦可使圖1至圖4所示之送液機構7、6兼具上述功能。於培養裝置中設置中空纖維上之半透膜，若經由該半透膜而於培養液與成分調整液之間進行成分之交換，或對膜施加過濾壓，則結果兩液間發生移動。因此，若不採取特別措施，則有最初設定之培養液與成分調整液各自之液量發生變化之情形。但是，若培養液之液量發生變化，則有由於培養液中之成分濃度或細胞密度發生變化，而未達成穩定之培養之傾向。因此，例如可藉由半透膜之入口及出口分別獨立地設置泵等送液機構7、6以獨立地控制該等，而可達成使液容量保持為固定量。關於此種機構，亦有控制培養槽或成分調整液貯存槽內之空氣層之壓力的方法等方法，但如上述般藉由獨立之至少2台泵進行控制之方法可最簡便且有效地實施。

於圖1及圖2所示之本實施形態中，例如送液機構7係將細胞培養槽1之細胞培養液9輸送至培養液成分調整機構3。送液機構6係作為回液機構而發揮功能，該回液機構係將輸送至培養液成分調整機構3，並經由膜而調整細胞培養液9中之不需要物質與成分調整液10中之有用物質之濃度後的細胞培養液9進行回液。

於圖3所示之本實施形態中，例如送液機構6係將成分調整液貯存槽2之成分調整液10輸送至培養液成分調整機構3。送液機構7係作為回液機構而發揮功能，該回液機構係將輸送至培養液成分調整機構3，並使細胞培養液9中之不需要物質與成分調整液10中之有用物質接觸之成分調整液進行回液。

此處，送液機構每小時之送液量 $V1$ 與回液機構每小時之回液量 $V2$ 較理想為 $V1 = V2$ ，但難以實現完全相等之送液量之情形較多。又，可使 $V1$ 與 $V2$ 之差變得非常小，但亦有需要價格非常昂貴之高精度之泵之情形。但是，若將送液量 $V1$ 與 $V2$ 設為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$



之範圍內，則不會導致急劇之液量變化，且藉由個別地調整V1與V2，變得易於將上述細胞培養液之總量之變動控制在10%以內，故而較佳。又，使液量V1與V2為上述範圍內可利用廉價之泵而容易地實現。

如上述般使用至少2台獨立之泵之情形時，亦可設為如下系統：如圖5所示進而使用檢測細胞培養槽1之液量之機構18，經由資訊傳遞線路19而隨時取得液面高於或低於所期望之高度之資訊，根據該資訊，利用電腦等送液機構調整器20，使連接於入口連接送液線路5與出口連接送液線路4之各泵7、6具有流速差，藉此控制液面。例如即便於各泵之實際流速與設定值產生若干誤差之情形時，亦可藉由設為上述調整系統，而防止於長時間之培養中積累誤差而使細胞培養槽之液面產生較大變化。

[實施例1]

以下，藉由實施例對本發明更詳細地進行說明，但本發明並不限定於該等。

(細胞培養系統)

培養裝置係使用8連動動物培養裝置Bio Jr. 8(BJR-25NA1S-8C，Able股份有限公司)。本裝置可利用1台控制器控制8台容量100 mL之細胞培養槽，測定-控制項目為攪拌速度、溫度、pH值、及溶氧濃度(DO，dissolved oxygen)，且各培養槽可獨立地進行控制。

(ES細胞之準備)

培養細胞係選擇小鼠ES細胞(EMG7株)。

(胚狀體培養)

(自培養第0天至培養第3天)

使用玻璃製之專用槽(Able股份有限公司)作為細胞培養槽，將培養液設為100 mL。

將小鼠ES細胞之密度設為 1×10^5 cells/mL，開始培養。將該時間點設為培養第0天。

作為培養液，於Glasgow極限必需培養基(GMEM，Invitrogen公司)中添加以下成分而使用。

即，以成為10%胎牛血清(FBS，NICHIREI股份有限公司)、0.1 mM非必需胺基酸(NEAA，Invitrogen公司)、1 mM丙酮酸鈉(Na-pyruvate，SIGMA公司)、0.1 mM之2-巰基乙醇(2-ME，Invitrogen公司)之方式製備培養液。

以上述狀態進行培養直至第3天，使作為ES細胞之聚集體之胚狀體(EB：Embryoid body)形成。

於細胞培養槽中設置攪拌旋轉翼，將轉數設為85 rpm。

於細胞培養槽中設置可分別測量溫度、pH值、溶氧濃度之感測器。

又，溶氧濃度係採用控制為40%之設定，因此以對細胞培養槽內之培養液之上方通入氧氣、氮氣、空氣之混合氣體之方式設置氣體導入管線。進而，設置將氣體自槽排出之導出管線。

(自培養第3日天至第10天)

算出培養第3天所獲得之全部細胞數，如下述般分為實施例1與比較例之培養方法再開始培養。每個培養槽之細胞密度設為 1.8×10^5 cells/mL。

於實施例1中，製作如圖2所示之細胞培養系統。即，細胞培養槽係於上述培養槽之蓋部分上設置有可取出與返還培養液之口。

進而，於細胞培養槽內，設置包含聚乙烯之燒結體的直徑15 mm、平均孔徑30 μ m之平板型膜作為用以防止細胞塊會與培養液一併到達培養槽外側之機構。

成分調整液槽係使用容量1 L之玻璃製殺菌瓶。



於槽之蓋部分上設置通氣管線、培養液之入口、出口管線。

培養液成分調整機構係使用將Asahi聚砒透析膜APS(Asahi Kasei Kuraray Medical股份有限公司)之中空纖維400根紮成束，以成為有效長度20 cm之方式解開中空纖維兩端部之管腔結構，並利用胺基甲酸酯接著劑進行固定而成者。

培養液成分調整機構係設置於成分調整液儲留機構之內部，且利用線路將中空纖維束之兩端部與培養液之入口、出口管線連接。

成分調整液係使用於細胞培養液中未添加FBS之培養液1 L。

送液線路係使用矽製管道(內徑1 mm ϕ 、外徑4 mm ϕ)。

培養液之送液機構係使用2台蠕動泵IPC-N4(ISMATEC公司)。2台泵分別設置為連接於將細胞培養槽與成分調整液貯存槽連接之送液線路且可送液之狀態。

藉由以上所說明之方法，製作如圖2所示之細胞培養系統。

泵之運作速度於第3天至第4天設為100 mL/day，於第4天至第5天設為400 mL/day，於第5天至第10天設為1,000 mL/day。

一面使細胞培養槽之液容量可實質上維持相同水準，一面對2台泵之流速進行微調整，並且一面連續地灌注培養液一面實施培養直至第10天。

於第10天結束細胞培養，進行細胞數之測定。

(細胞數之測定)

於培養第10天自細胞培養槽回收胚狀體，利用0.25%胰蛋白酶/EDTA(Invitrogen公司)進行處理而成為單細胞之狀態後，利用錐蟲藍色素對凋亡細胞進行染色，使用計數板僅計數活細胞。

(乳酸濃度之測定)

培養液中之乳酸濃度之變化係自細胞培養槽採集少量之培養液後，使用多功能生物感測器BF-7(王子計測機器股份有限公司)而測

定。

(測定EB之相當於圓之直徑)

EB之相當於圓之直徑係使用光學顯微鏡ECLIPSE Ti-U(Nikon股份有限公司)對EB之圖像進行拍攝後，使用圖像解析軟體(Nikon ElementsD，Nikon股份有限公司)對EB之外周長進行測定，根據該值算出正圓之情形之相當於圓之直徑。自各樣本測定100個EB之相當於圓之直徑，製作相當於圓之直徑之頻率分佈。

(EB內部細胞之TUNEL染色)

爲了判定EB內部之細胞產生何種程度之細胞凋亡，而進行TUNEL染色。

由各樣本製作EB之冷凍切片，使用細胞凋亡檢測試劑盒(TAKARA BIO股份有限公司)對死亡細胞進行染色。

(比較例1)

使用培養至第3天之裝置，繼續培養直至第10天。

於第4及第5天更換1次培養液，於第6至第9天更換2次培養液。

培養液之更換係設爲如下方法：停止細胞培養槽之攪拌，使胚狀體沈澱後，自裝置分離細胞培養槽，於無菌無塵工作台內抽出培養液上清液後，添加新鮮之培養液。

培養液更換合計實施10次，使用合計1 L之培養液。

(比較例2)

使用自實施例1所使用之裝置卸除了設置於自成分調整液貯存槽連接於細胞培養槽之送液線路之泵的裝置而繼續培養。隨著繼續培養，細胞培養槽內之培養液量開始減少，變得難以繼續培養，而中止培養。

(結果)

將培養第10天之實施例1及比較例1之藉由培養而獲得之總細胞



數示於以下。

實施例1之總細胞數 4.6×10^8 個

比較例1之總細胞數 3.4×10^8 個

將培養10天期間之實施例1及比較例1之培養中各細胞培養槽之pH值變化示於圖6。

將培養10天期間之實施例1及比較例1之細胞培養槽內細胞培養液之乳酸濃度變化示於圖7。

將培養第10天之實施例1及比較例1之培養結果、及所獲得之EB之各自相當於圓之直徑示於圖8。

將培養第10天之實施例1及比較例1之培養結果、及所獲得之EB之冷凍切片之染色結果示於圖9。將凋亡細胞染色為茶色。

根據以上結果，顯示由於實施例之細胞培養系統係無需更換培養液，且可將價格昂貴之血清之使用量降低至1/10，同時最終回收之細胞數可見約為1.4倍之顯著差異，故而為有效之培養方法。又，得知實施例之培養方法與比較例相比，乳酸之蓄積較少，且相對於此，pH值未下降。進而，確認存在培養結束時之EB之直徑與比較例相比為小直徑且內部之凋亡細胞較少之傾向。因此，認為實施例之細胞培養系統可維持良好之培養環境，而達成EB內細胞之細胞凋亡表現抑制。

[實施例2]

(ES細胞之準備)

作為培養細胞，與實施例1同樣地選擇小鼠ES細胞(EMG7株)。

(胚狀體培養)

(自培養第0天至培養第3天)

藉由與實施例1之自培養第0天至培養第3天相同之方法，使用4個細胞培養槽而培養ES細胞。

(自培養第3天至第10天)

於實施例2中，製作如圖5所示之細胞培養系統。即，算出培養第3天自上述4個細胞培養槽獲得之全部細胞數，於一個玻璃製之大型培養槽(Able股份有限公司)中以細胞密度 1.7×10^5 cells/mL收集細胞。將培養液容量設為1 L。將上述培養槽設置於動物細胞培養裝置BCP(BCP-03NP3S，Able股份有限公司)中並開始培養。

培養液係使用與實施例1相同者。

於細胞培養槽中設置攪拌旋轉翼，將轉數設為60 rpm。

於細胞培養槽中設置可分別測量溫度、pH值、溶氧濃度之感測器。

又，溶氧濃度係採用控制為40%之設定，因此以對細胞培養槽內之培養液之上方通入氧氣、氮氣、空氣之混合氣體之方式設置氣體導入管線。進而設置將氣體自槽排出之導出管線。

細胞培養槽中，於上述培養槽之蓋部分上設置有可取出與返還培養液之口。

進而，於細胞培養槽內，將包含聚乙烯之燒結體之直徑47 mm、平均孔徑30 μ m之平板型膜設置於液上表面作為用以防止細胞塊會與培養液一併流至培養槽之外側之機構。

成分調整液槽係使用容量10 L之聚丙烯製儲罐。

於槽之蓋部分上設置通氣管線、培養液之入口、出口管線。

培養液成分調整機構係使用持續緩慢式血液過濾器EXCELFLO AEF-03(Asahi Kasei Kuraray Medical股份有限公司)。

培養液成分調整機構係獨立地設置於細胞培養槽、成分調整液貯存槽之外部。

以自細胞培養槽通過上述平板型膜而抽出之培養液流過中空纖維內側之方式，以線路連接培養液之入口管線。繼而，以使通過中空



纖維內側之培養液回到培養槽之方式，利用線路連接出口管線。

繼而，以將成分調整液自成分調整液貯存槽抽出，通過培養液成分調整機構之中空纖維外側，而回到成分調整液貯存槽之方式連接入口管線、出口管線。

成分調整液係使用未加入血清之細胞培養液10 L。

送液線路係使用氟氯化碳管(內徑2 mm ϕ ，外徑4 mm ϕ)。

培養液之送液機構係使用3台蠕動泵IPC-N4(ISMATEC公司)。3台泵分別設置為連接於將細胞培養槽與培養液成分調整機構、培養液成分調整機構與成分調整液貯存槽連接之送液線路且可送液之狀態。

進而，於細胞培養槽中，安裝作為液面檢測機構之雷射式檢測器(KEYENCE股份有限公司)，液面上升發生時，於出口管線1與送液泵之間設置以停止蠕動泵流速之方式設計之調整器。

藉由以上所說明之方法，製作如圖5所示之細胞培養系統。

關於泵之運作速度，於第3天至第4天，入口管線1之泵設為1 L/day，出口管線泵1之泵設為1.1 L/day，於第4天至第5天，入口管線1之泵設為4 L/day，出口管線泵1設為4.4 L/day，於第5天至第10天，入口管線1之泵設為10 L/day，出口管線1之泵設為11 L/day。輸送成分調整液之泵之運作速度設為入口管線1之泵之速度的4倍。

藉由本系統，以使細胞培養槽之液容量實質上可維持相同量之方式對泵流速進行微調整，一面連續地灌注培養液，一面實施培養直至第10天。

於第10天結束細胞培養，進行細胞數之測定。

(結果)

將培養第10天之實施例及比較例之藉由培養而獲得之總細胞數示於以下。

實施例2之總細胞數 5.7×10^9 個

根據以上之結果，可確認根據實施例之細胞培養系統而容易擴大規模。

[實施例3]

(細胞之準備)

培養細胞係選擇市售之作爲懸浮細胞之CHO(Chinese hamster ovary, 中國倉鼠卵巢)細胞(源自中國倉鼠卵巢, Life Technologies公司)。

(自培養第0天至培養第7天)

於實施例3中，製作如圖3所示之細胞培養系統。即，使用CULSTIR燒瓶(雙臂型，附帶攪拌組件，柴田科學)作爲細胞培養槽，將培養液設爲300 mL。

將CHO細胞之播種密度設爲 2×10^5 cells/mL，開始培養。將該時間點設爲培養第0天。

培養液係使用CD-CHO培養基(Life Technologies公司)。

於細胞培養槽中設置攪拌旋轉翼，將轉數設爲80 rpm。

細胞培養槽係於上述培養槽之蓋部分上設置可取出與返還培養液之口。

成分調整液槽係使用容量500 mL之玻璃製殺菌瓶。

於細胞培養槽之蓋部分上設置通氣管線、成分調整液之入口、出口管線。

培養液成分調整機構係使用將Asahi聚砜透析膜APS(Asahi Kasei Kuraray Medical股份有限公司)之中空纖維100根紮成束，以成爲有效長度25 cm之方式解開中空纖維兩端部之管腔結構，並利用胺基甲酸酯接著劑進行固定而成者。

培養液成分調整機構係設置於細胞培養槽之內部，且利用線路將中空纖維束之兩端部與成分調整液之入口、出口管線連接。

成分調整液係使用CD-CHO培養基300 mL。

送液線路係使用矽製管道(內徑1 mm ϕ 、外徑4 mm ϕ)。

將上述2個槽設置於37°C、5%CO₂環境下之培養箱(IP400，大和科學)內。

成分調整液之送液機構係使用2台蠕動泵(SJ-121H，ATTO公司)。2台泵分別設置為連接於將細胞培養槽與成分調整液貯存槽連接之送液線路且可送液之狀態。

藉由以上所說明之方法，製作如圖3所示之細胞培養系統。

泵之初期運作速度於第0天至第4天設為0.22 mL/min，於第4天至第7天設為0.62 mL/min。

一面使細胞培養槽之液容量可實質上維持相同量，一面對2台泵之流速進行微調整，並且一面連續地灌注培養液一面實施培養直至第7天。

(比較例3)

使用僅有實施例之細胞培養槽之裝置(亦無培養液成分調整機構)，以與實施例相同之方式繼續培養至第7天。

(結果)

將培養第7天之實施例3及比較例3之藉由培養而獲得之活細胞之密度示於以下。

實施例3之細胞密度	66.8×10^5 cells/mL
-----------	-----------------------------

比較例3之細胞密度	28.9×10^5 cells/mL
-----------	-----------------------------

由以上可確認：實施例之細胞培養系統對於以單細胞形態增殖之懸浮細胞亦有效。

[產業上之可利用性]

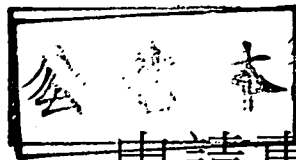
本實施形態之細胞培養系統及細胞培養方法可提供一種可對應各種哺乳動物細胞之培養形態，且可同時達成低成本、省力化、高密

度培養之系統，因此可應用於使蛋白質等產生物於細胞中大量產生之領域、或大量培養細胞本身並利用之領域。

【符號說明】

1	細胞培養槽
2	成分調整液貯存槽
3	培養液成分調整機構
4	送液線路
5	送液線路
6	送液機構
7	送液機構
8	過濾器
9	細胞培養液
10	成分調整液
11	通氣過濾器
12	攪拌翼
13	攪拌轉子
14	通氣過濾器
15	送液機構
16	送液線路
17	送液線路
18	液面檢測機構
19	訊息傳遞線路
20	送液機構調整器





申請專利範圍

(本)

1. 一種細胞培養系統，其係具備

放入細胞培養液並用以培養細胞之細胞培養槽、

放入成分調整液之成分調整液貯存槽、

具有上述細胞培養液及/或上述成分調整液之入口與出口且具備半透膜之培養液成分調整機構、

自上述細胞培養槽及/或上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之入口的入口連接送液線路、

自上述細胞培養槽及/或上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之出口的出口連接送液線路、

自上述入口連接送液線路經過上述培養液成分調整機構向上述出口連接送液線路灌注上述細胞培養液及/或上述成分調整液之機構、及

調整上述細胞培養槽之液量之機構者，並且

可經由上述培養液成分調整機構而連續地調整上述細胞培養槽內之上述細胞培養液的成分與上述成分調整液貯存槽內之上述成分調整液的成分，由細胞產生且蓄積於上述細胞培養液中之代謝物向上述成分調整液移動，且於培養期間中上述細胞培養液之成分之濃度下降時，該成分係自上述成分調整液向上述細胞培養液移動，同時

可實質上將上述細胞培養槽內之上述細胞培養液之量調整為固定量。

2. 如請求項1之細胞培養系統，其中培養液成分調整機構為中空纖維狀。

3. 如請求項1之細胞培養系統，其中

上述培養液成分調整機構係配置於上述成分調整液貯存槽內，

上述培養液成分調整機構具有上述細胞培養液之入口與出口，

上述入口連接送液線路係自上述細胞培養槽連接於上述培養液成分調整機構之入口，

上述出口連接送液線路係自上述細胞培養槽連接於上述培養液成分調整機構之出口，

上述灌注之機構係自上述入口連接送液線路經過上述培養液成分調整機構向上述出口連接送液線路灌注上述細胞培養液。

4. 如請求項1之細胞培養系統，其中

上述培養液成分調整機構係配置於上述細胞培養槽內，

上述培養液成分調整機構具有上述成分調整液之入口與出口，

上述入口連接送液線路係自上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之入口，

上述出口連接送液線路係自上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之出口，

上述灌注之機構係自上述入口連接送液線路經過上述培養液成分調整機構向上述出口連接送液線路灌注上述成分調整液。

5. 如請求項1之細胞培養系統，其中

上述培養液成分調整機構係設置於上述成分調整液貯存槽及上述細胞培養槽之外部，

上述入口連接送液線路包含自上述細胞培養槽連接於上述培養液成分調整機構之第1入口之第1入口連接送液線路、及自上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之第2入口

之第2入口連接送液線路，

上述出口連接送液線路包含自上述細胞培養槽連接於上述培養液成分調整機構之第1出口之第1出口連接送液線路、及自上述成分調整液貯存槽連接於上述培養液成分調整機構之第2出口之第2出口連接送液線路，

上述半透膜構成連結上述第1入口與上述第1出口之空間及連結上述第2入口與上述第2出口之空間，

上述灌注之機構包含自上述第1入口連接送液線路經過上述培養液成分調整機構向上述第1出口連接送液線路灌注上述細胞培養液之機構、及自上述第2入口連接送液線路經過上述培養液成分調整機構向上述第2出口連接送液線路灌注上述成分調整液之機構。

6. 如請求項1之細胞培養系統，其中上述灌注之機構具備：

送液機構，其將上述細胞培養槽之上述細胞培養液及/或上述成分調整液貯存槽之上述成分調整液輸送至上述培養液成分調整機構；

回液機構，其將輸送至上述培養液成分調整機構而使上述細胞培養液中之不需要物質與上述成分調整液中之有用物質接觸之上述細胞培養液及/又上述成分調整液進行回液，並且

上述送液機構每小時之送液量 $V1$ 與上述回液機構每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，含有上述細胞之上述細胞培養液之總量之變動為10%以內。

7. 如請求項3之細胞培養系統，其進而具備過濾器，該過濾器係設置於上述入口連接送液線路上，且不使細胞或細胞凝聚塊通過，使上述細胞培養液實質上通過而到達上述細胞培養槽內側端部。

8. 如請求項5之細胞培養系統，其進而具備過濾器，該過濾器係設置於上述第1入口連接送液線路上，且不使細胞或細胞凝聚塊通過，使上述細胞培養液實質上通過而到達上述細胞培養槽內側端部。
9. 一種細胞培養方法，其包含如下步驟：
- a)設置如請求項1之細胞培養系統；
 - b)向上述細胞培養槽供給細胞及上述細胞培養液，向上述成分調整液貯存槽供給上述培養液成分調整液；及
 - c)連續地灌注上述細胞培養液及/或上述成分調整液；並且以成為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ 之方式控制上述送液機構每小時之送液量 $V1$ 與上述回液機構每小時之回液量 $V2$ ，且以含有上述細胞之上述細胞培養液之總量之變動成為10%以內的方式進行控制。
10. 一種細胞培養系統，其具備：
- 至少放入細胞及細胞培養液並培養上述細胞之細胞培養槽、
 - 放入含有有用物質之成分調整液之成分調整液貯存槽、
 - 使上述細胞培養液與上述成分調整液經由半透膜接觸而進行物質交換，由細胞產生且蓄積於上述細胞培養液中之代謝物向上述成分調整液移動，且於培養期間中上述細胞培養液之成分之濃度下降時，使該成分自上述成分調整液向上述細胞培養液移動之培養液成分調整機構、
 - 將上述細胞培養槽之上述細胞培養液及/或上述成分調整液貯存槽之上述成分調整液輸送至上述培養液成分調整機構之送液機構、及
 - 將經接觸之上述細胞培養液及/或上述成分調整液回液之回液機構，並且

上述送液機構每小時之送液量 $V1$ 與上述回液機構每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，

含有細胞培養液之上述細胞之上述細胞培養液之總量的變動為10%以內。

11. 一種細胞培養方法，其具備如下步驟：

至少將細胞及細胞培養液放入細胞培養槽並培養上述細胞；

輸送上述細胞培養槽之上述細胞培養液及/或放入成分調整液貯存槽之成分調整液；

使上述細胞培養液與上述成分調整液經由膜進行接觸，由細胞產生且蓄積於上述細胞培養液中之代謝物向上述成分調整液移動，且於培養期間中上述細胞培養液之成分之濃度下降時，使該成分自上述成分調整液向上述細胞培養液移動；及

將經由上述膜而接觸之細胞培養液及/或成分調整液進行回液；並且

上述送液步驟中每小時之送液量 $V1$ 與上述回液步驟中每小時之回液量 $V2$ 為 $0.9 \times V1 \leq V2 \leq 1.1 \times V1$ ，

含有細胞培養液之細胞之細胞培養液之總量之變動為10%以內。

12. 如請求項1之細胞培養系統，其中上述細胞為哺乳動物細胞。

13. 如請求項12之細胞培養系統，其中上述哺乳動物細胞為胚胎幹細胞(ES細胞)、人工多潛能幹細胞(iPS細胞)、間葉系幹細胞、造血幹細胞、及/或由該等分化誘導而成之細胞。

14. 如請求項10之細胞培養系統，其中上述細胞為哺乳動物細胞。

15. 如請求項14之細胞培養系統，其中上述哺乳動物細胞為胚胎幹細胞(ES細胞)、人工多潛能幹細胞(iPS細胞)、間葉系幹細胞、造血幹細胞、及/或由該等分化誘導而成之細胞。

16. 如請求項1之細胞培養系統，其中上述細胞為可懸浮培養之細胞、附著型細胞、形成細胞凝集體之細胞、及/或可附著於粒子狀載體上之細胞。
17. 如請求項16之細胞培養系統，其中上述可附著於粒子狀載體上之細胞係於細胞培養槽中放入細胞及粒子狀載體並培養而獲得。
18. 如請求項10之細胞培養系統，其中上述細胞為可懸浮培養之細胞、附著型細胞、形成細胞凝集體之細胞、及/或可附著於粒子狀載體上之細胞。
19. 如請求項18之細胞培養系統，其中上述可附著於粒子狀載體上之細胞係於細胞培養槽中放入細胞及粒子狀載體並培養而獲得。