



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107208024 A

(43)申请公布日 2017. 09. 26

(21)申请号 201680006205.8

(22)申请日 2016.01.20

(30)优先权数据

2015-008718 2015.01.20 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/051602 2016.01.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/117615 JA 2016.07.28

(71)申请人 富士胶片株式会社

地址 日本国东京都

(72)发明人 香川英章 后藤俊 小桥创一

山崎英数

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 雒运朴

(51)Int.Cl.

C12M 3/00(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/02(2006.01)

C12N 1/00(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

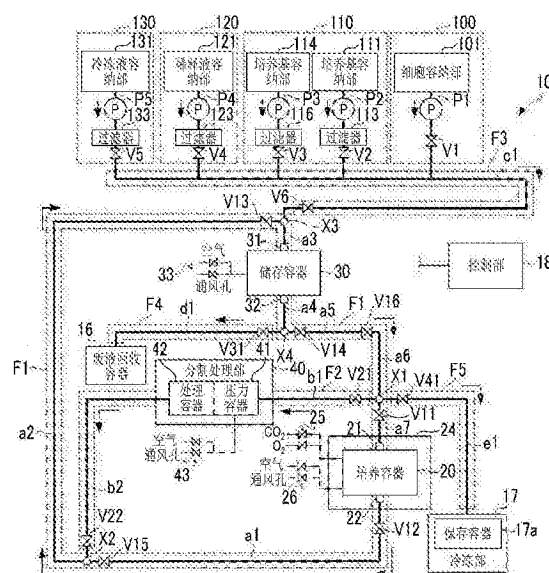
权利要求书2页 说明书23页 附图23页

(54)发明名称

细胞培养装置以及细胞培养方法

(57)摘要

培养容器具有第1流入口以及第1流出口。第1流路连接第1流出口和第1流入口。储存容器设置在第1流路内,且具有与第1流出口连接的第2流入口以及与第1流入口连接的第2流出口。第2流路连接位于第2流出口与第1流入口之间的第1流路内的第1部位和位于第2流入口与第1流出口之间的第1流路内的第2部位。分割处理部设置在第2流路内,且进行分割经由第1部位从第1流路流入的细胞团块的分割处理,并使已进行分割处理的细胞经由第2部位向第1流路内流出。培养基供给部向第1流路内供给培养基。



1. 一种细胞培养装置,其包含:

培养容器,具有第1流入口以及第1流出口,且用于培养细胞;

第1流路,连接所述第1流出口和所述第1流入口;

第1储存容器,是设置在所述第1流路内且用于储存在所述培养容器内培养的细胞的储存容器,其具有与所述第1流出口连接的第2流入口以及与所述第1流入口连接的第2流出口;

第2流路,连接位于所述第2流出口与所述第1流入口之间的所述第1流路内的第1部位和位于所述第2流入口与所述第1流出口之间的所述第1流路内的第2部位;

分割处理部,设置在所述第2流路内,且进行分割细胞团块的分割处理,并使已实施所述分割处理的细胞经由所述第2部位向所述第1流路内流出,所述细胞团块为经由所述第1部位从所述第1流路流入的、在所述培养容器内培养出的细胞的团块;以及

培养基供给部,向所述第1流路内供给培养基。

2. 根据权利要求1所述的细胞培养装置,其中,

还包含第1搅拌部,所述第1搅拌部设置在所述第1流路内的所述第2流出口与所述第1流入口之间,并对所流入的流体进行搅拌。

3. 根据权利要求2所述的细胞培养装置,其中,

所述第1搅拌部包含静态混合器。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的细胞培养装置,其中,

还包含第1过滤器部,所述第1过滤器部设置在连接所述第2流入口和所述第2流出口的所述第3流路内,并进行自包含从所述第2流出口流出的细胞和伴随细胞的液体在内的混合物中去除液体的浓缩处理。

5. 根据权利要求4所述的细胞培养装置,其中,

所述第1过滤器部包含切向流过滤器。

6. 根据权利要求4或5所述的细胞培养装置,其中,

还包含:

第2储存容器,包含第3流出口以及与所述第2流入口连接的第3流入口;以及

第2过滤器部,设置在连接所述第3流入口和所述第3流出口的第4流路内,并进行自包含从所述第3流出口流出的细胞和伴随细胞的液体在内的混合物中去除液体的浓缩处理。

7. 根据权利要求6所述的细胞培养装置,其中,

所述第2过滤器部包含切向流过滤器。

8. 根据权利要求6或7所述的细胞培养装置,其中,

交替进行由所述第1过滤器部进行的浓缩处理和由所述第2过滤器部进行的浓缩处理。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的细胞培养装置,其中,

还包含:

第1压力调整机构,调整所述第1储存容器的内部压力;以及

第2压力调整机构,调整所述第2储存容器的内部压力。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的细胞培养装置,其中,

所述分割处理部具有用于进行所述分割处理的处理容器以及调整所述处理容器的内部压力的压力调整机构。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的细胞培养装置, 其中,
还包含第2搅拌部, 所述第2搅拌部设置在连接所述培养基供给部和所述第1流路的第5流路内, 并对所流入的流体进行搅拌。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的细胞培养装置, 其中,
还包含细胞供给部, 所述细胞供给部将在所述培养容器内培养的细胞供给至所述第1流路。

13. 根据权利要求11所述的细胞培养装置, 其中,
还包含:
细胞供给部, 与所述第5流路内的所述第2搅拌部的下游侧连接, 并将在所述培养容器内培养的细胞经由所述第5流路供给至所述第1流路; 以及

第3搅拌部, 设置在所述第5流路内的连接有所述细胞供给部的部位的下游侧, 并对所流入的流体进行搅拌。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的细胞培养装置, 其中,
还包含冷冻部, 所述冷冻部与位于所述第2流出口与所述第1流入口之间的所述第1流路内的第3部位连接, 用于冷冻细胞。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的细胞培养装置, 其中,
还包含调整所述培养容器的内部压力的压力调整机构。

16. 一种细胞培养方法, 其使用了权利要求1至15中任一项所述的细胞培养装置, 所述细胞培养方法包括:

培养基更换处理, 将在所述培养容器内用于细胞培养的已使用的培养基更换为新培养基; 以及

分割处理, 分割通过在所述培养容器内培养细胞而形成的细胞团块,
所述培养基更换处理包括如下步骤:

将在所述培养容器内培养出的细胞与已使用的培养基一同储存在所述第1储存容器的步骤;

从包含储存在所述第1储存容器的细胞和已使用的培养基在内的混合物中去除已使用的培养基的步骤;

从所述培养基供给部向储存在所述第1储存容器的细胞供给新培养基的步骤; 以及

将包含细胞和新培养基的混合物容纳于所述培养容器的步骤,

所述分割处理包括如下步骤:

在所述分割处理部分割在所述培养容器内形成的细胞团块的步骤;

在所述分割处理部分割细胞团块之前或之后, 将在所述培养容器内用于细胞培养的已使用的培养基更换为新培养基的步骤; 以及

将包含已分割的细胞和新培养基的混合物容纳于所述培养容器的步骤。

细胞培养装置以及细胞培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞培养装置以及细胞培养方法。

背景技术

[0002] 关于细胞培养装置或细胞培养系统,已知有例如以下技术。例如,日本特开平2-150272号公报中记载有利用插入有液体输送泵和阀的液体输送管道连结了膜过滤分离装置与培养装置、培养基贮槽、滤液贮槽之间的生物细胞的培养系统。

[0003] 日本特开平4-99483号公报中记载有取出细胞悬浮的一部分培养液,经由滤膜分离培养液和细胞,并通过使细胞与新鲜培养基一同返回培养槽而能够连续地更换培养基的培养装置。

发明内容

[0004] 发明要解决的技术课题

[0005] 例如,为了通过细胞移植治疗肝病或心脏疾病等,认为对于一名患者需要移植 1×10^9 个以上的分化细胞,而为了实现这种移植,必须开发出大量培养多能干细胞的技术。

[0006] 例如,在培养多能干细胞时,若通过培养细胞而产生的细胞团块(球体)的尺寸过大,则细胞团块彼此粘接融合,可能会产生细胞开始分化或细胞团块中心部的细胞坏死等问题。因此,为了防止细胞团块的尺寸过大,必须在细胞的培养期间中的适当的时期进行分割细胞团块的分割处理。

[0007] 迄今为止并未提出关于通过在密封系统中连续地实施包括上述分割处理在内的细胞培养所需的一系列处理而能够生产大量的细胞的细胞培养装置的例子,认为很难增大动物细胞或干细胞等增殖率比较低的细胞的培养规模。为了应对培养规模的增大,也可以考虑并列设置手动干预且培养规模为小规模 of 细胞培养装置的应对,但该情况下,装置成本变高,工艺也变得复杂。而且,由于装置间的培养环境中会产生差异,因此培养出的细胞在装置间的均质性降低。

[0008] 本发明是鉴于上述点而完成的,其目的在于提供一种能够在密封系统中连续地实施包括分割处理在内的细胞培养所需的一系列处理的细胞培养装置以及使用了这种细胞培养装置的细胞培养方法。

[0009] 用于解决技术课题的手段

[0010] 本发明所涉及的细胞培养装置,其包含:培养容器,具有第1流入口以及第1流出口,且用于培养细胞;第1流路,连接第1流出口和第1流入口;第1储存容器,是设置在第1流路内且用于储存在培养容器内培养的细胞的储存容器,其具有与第1流出口连接的第2流入口以及与第1流入口连接的第2流出口;第2流路,连接位于第2流出口与第1流入口之间的第1流路内的第1部位和位于第2流入口与第1流出口之间的第1流路内的第2部位;分割处理部,设置在第2流路内,且进行分割细胞团块的分割处理,并使已实施分割处理的细胞经由第2部位向第1流路内流出,所述细胞团块为经由第1部位从第1流路流入的、在培养容器内

培养出的细胞的团块;以及培养基供给部,向第1流路内供给培养基。

[0011] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含第1搅拌部,所述第1搅拌部设置在第1流路内的第2流出口与第1流入口之间,并对所流入的流体进行搅拌。在本发明所涉及的细胞培养装置中,第1搅拌部可包含静态混合器而构成。

[0012] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含第1过滤器部,所述第1过滤器部设置在连接第2流入口和第2流出口的第3流路内,并进行自包含从第2流出口流出的细胞和伴随细胞的液体在内的混合物中去除液体的浓缩处理。在本发明所涉及的细胞培养装置中,第1过滤器部可包含切向流过滤器。

[0013] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含:第2储存容器,包含第3流出口以及与第2流入口连接的第3流入口;以及第2过滤器部,设置在连接第3流入口和第3流出口的第4流路内,并进行自包含从第3流出口流出的细胞和伴随细胞的液体在内的混合物中去除液体的浓缩处理。在本发明所涉及的细胞培养装置中,第2过滤器部可包含切向流过滤器。本发明所涉及的细胞培养装置可交替进行由第1过滤器部进行的浓缩处理和由第2过滤器部进行的浓缩处理。

[0014] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含调整第1储存容器的内部压力的第1压力调整机构以及调整第2储存容器的内部压力的第2压力调整机构。

[0015] 本发明所涉及的细胞培养装置中,分割处理部可具有用于进行分割处理的处理容器以及调整处理容器的内部压力的压力调整机构。

[0016] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含第2搅拌部,所述第2搅拌部设置在连接培养基供给部和第1流路的第5流路内,并对所流入的流体进行搅拌。

[0017] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含细胞供给部,所述细胞供给部将在培养容器内培养的细胞供给至第1流路。

[0018] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含:细胞供给部,与第5流路内的第2搅拌部的下游侧连接,并将在培养容器内培养的细胞经由第5流路供给至第1流路;以及第3搅拌部,设置在第5流路内的连接有细胞供给部的部位的下游侧,并对所流入的流体进行搅拌。

[0019] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含冷冻部,所述冷冻部与位于第2流出口与第1流入口之间的第1流路内的第3部位连接,用于冷冻细胞。

[0020] 本发明所涉及的细胞培养装置还可包含调整培养容器的内部压力的压力调整机构。

[0021] 本发明所涉及的细胞培养方法,其使用了上述细胞培养装置,所述细胞培养方法包括:培养基更换处理,将在培养容器内用于细胞培养的已使用的培养基更换为新培养基;以及分割处理,分割通过在培养容器内培养细胞而形成的细胞团块。培养基更换处理包括如下步骤:将在培养容器内培养出的细胞与已使用的培养基一同储存在第1储存容器的步骤;从包含储存在第1储存容器的细胞和已使用的培养基在内的混合物中去除已使用的培养基的步骤;从培养基供给部向储存在第1储存容器的细胞供给新培养基的步骤;以及将包含细胞和新培养基的混合物容纳于培养容器的步骤。分割处理包括如下步骤:在分割处理部分割在培养容器内形成的细胞团块的步骤;在分割处理部分割细胞团块之前或之后,将在培养容器内用于细胞培养的已使用的培养基更换为新培养基的步骤;以及将包含已分割的细胞和新培养基的混合物容纳于培养容器的步骤。

[0022] 发明效果

[0023] 根据本发明,提供一种能够在密封系统中连续地实施包括分割处理在内的细胞培养所需的一系列处理的细胞培养装置以及使用了这种细胞培养装置的细胞培养方法。

附图说明

[0024] 图1是表示本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0025] 图2是表示在本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置中实施传代处理时的细胞等的流动的图。

[0026] 图3是表示在本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置中实施培养基更换处理时的细胞等的流动的图。

[0027] 图4是表示在本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置中实施分割处理时的细胞等流动的图。

[0028] 图5是表示在本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置中实施分割处理时的细胞等流动的图。

[0029] 图6是表示在本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置中实施冷冻处理时的细胞等的流动的图。

[0030] 图7是表示使用了本发明的实施方式所涉及的细胞培养装置的细胞培养方法的一例的流程图。

[0031] 图8是表示本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0032] 图9是表示在本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置中实施传代处理时的细胞等的流动的图。

[0033] 图10是表示在本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置中实施培养基更换处理时的细胞等的流动的图。

[0034] 图11是表示在本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置中实施分割处理时的细胞等流动的图。

[0035] 图12是表示在本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置中实施冷冻处理时的细胞等的流动的图。

[0036] 图13是表示本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0037] 图14是表示本发明的实施方式所涉及的过滤器部的过滤方式的一例的图。

[0038] 图15是表示在本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置中实施传代处理时的细胞等的流动的图。

[0039] 图16是表示在本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置中实施培养基更换处理时的细胞等的流动的图。

[0040] 图17是表示在本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置中实施分割处理时的细胞等流动的图。

[0041] 图18是表示在本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置中实施冷冻处理时的细胞等的流动的图。

[0042] 图19是表示本发明的第4实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0043] 图20是表示在本发明的第4实施方式所涉及的细胞培养装置中实施浓缩处理时的

细胞等的流动的图。

[0044] 图21是表示本发明的其他实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0045] 图22是表示本发明的其他实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

[0046] 图23是表示本发明的其他实施方式所涉及的细胞培养装置的结构图。

具体实施方式

[0047] 以下,参照附图对本发明的实施方式的一例进行说明。另外,各附图中,对于相同或等效的构成要件和部分赋予相同的参照符号。

[0048] [第1实施方式]

[0049] 图1是表示本发明的第1实施方式所涉及的细胞培养装置10的结构图。细胞培养装置具备细胞供给部100、培养基供给部110、稀释液供给部120以及冷冻液供给部130。并且,细胞培养装置10具备培养容器20、储存容器30、分割处理部40、废液回收容器16以及冷冻部17。

[0050] 细胞培养装置10将从细胞供给部100供给的细胞与从培养基供给部110供给的培养基(培养液)一同容纳于培养容器20内,并在培养容器20内,例如以悬浮状态将细胞培养于培养基中。

[0051] <细胞供给部>

[0052] 细胞供给部100具有:细胞容纳部101,以冷冻的状态容纳成为由细胞培养装置10进行的培养的对象细胞;以及泵P1,将容纳于细胞容纳部101的细胞送出至包含管道c1而构成的流路F3。并且,细胞供给部110具有设置在连接细胞容纳部101和管道c1的管道的、泵P1的下游侧的开闭阀V1。通过泵P1被驱动,且开闭阀V1设为打开状态,容纳于细胞容纳部101的细胞被送出至流路F3。

[0053] 成为由本实施方式所涉及的细胞培养装置10进行的培养的对象细胞并没有特别限制,动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、原生质体、已构建的细胞株、人工实施了转基因的细胞等任何细胞都能够成为对象。

[0054] 成为培养对象的细胞的一例为干细胞。干细胞只要是具有自我复制能力和分化能力的细胞,则并没有特别限制,可以是多能干细胞,也可以是成体干细胞。

[0055] 多能干细胞为具有自我复制能力和能够向外胚层、中胚层以及内胚层中的任意一个分化的多分化能力的细胞。作为多能干细胞,可举出胚胎干细胞(Embryonic Stem cell;ES细胞)、诱导多能干细胞(induced Pluripotent Stem cell;iPS细胞)、胚胎生殖细胞(Embryonic Germ cell;EG细胞)、胚胎癌细胞(Embryonal Carcinoma cell;EC细胞)、多能成体祖细胞(Multipotent Adult Progenitor cell;MAP细胞)、成体多能干细胞(Adult Pluripotent Stem cell;APS细胞)、多系分化持续应激细胞(Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell)等。

[0056] 作为成体干细胞,例如可举出间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞等。

[0057] 成为培养对象的细胞的其他例子为构成生物体的体细胞及其前体细胞。具体而言,可举出淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、基底细胞、角化细胞、上皮前体细胞、周细胞、内皮细胞、前脂肪细胞、成肌细胞、成骨细胞、软骨细胞、肝实质细胞、胰腺β细胞、神经胶质细胞等。

[0058] 成为培养对象的细胞的其他例子为CHO(中国仓鼠卵巢(chinese hamster ovary))、COS、HeLa、HepG2、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes黑素瘤细胞等动物细胞;果蝇S2、夜蛾Sf9等昆虫细胞;酵母、曲霉(Aspergillus)等真菌细胞;大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等细菌细胞;植物细胞、愈伤组织等。这些细胞也可以是以蛋白质的大量表达为目的而导入了蛋白质表达载体的细胞。

[0059] 另外,如在以培养容器20内预先容纳有细胞和培养基的状态开始进行细胞培养的情况下,在细胞培养装置10中可省略细胞供给部100。

[0060] <培养基供给部>

[0061] 培养基供给部110具有:培养基容纳部111和培养基容纳部114,容纳用于细胞培养的培养基(培养液);泵P2和泵P3,将分别容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基送出至流路F3;以及过滤器113和过滤器116,用于对分别从泵P2和泵P3送出的培养基进行除菌。并且,培养基供给部110具有:开闭阀V2,设置在连接培养基容纳部111和管道c1的管道的、过滤器113的下游侧;以及开闭阀V3,设置在连接培养基容纳部114和管道c1的管道的、过滤器116的下游侧。这样,本实施方式所涉及的培养基供给部110具备由第1系统和第2系统组成的两个系统的培养基供给功能,且能够供给彼此不同的2种培养基,所述第1系统包含培养基容纳部111、泵P2、过滤器113以及开闭阀V2,所述第2系统包含培养基容纳部114、泵P3、过滤器116以及开闭阀V3。另外,培养基供给部110中的系统的数量可根据细胞的培养方案等而适当增减。即,可将培养基供给部110设为能够供给3种以上培养基的结构,也可以设为能够供给1种培养基的结构。通过泵P2被驱动,且开闭阀V2设为打开状态,容纳于培养基容纳部111的培养基被送出至流路F3。通过泵P3被驱动,且开闭阀V3设为打开状态,容纳于培养基容纳部114的培养基被送出至流路F3。

[0062] 能够适用于由本实施方式所涉及的细胞培养装置10进行的细胞培养的培养基并没有特别限制,能够适用任何培养基。具体而言,哺乳动物细胞用基本培养基(例如DMEM(杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium))、DMEM/F-12(杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium):营养混合物(Nutrient Mixture)F-12)、EMEM(伊格尔极限必需培养基(Eagle's minimal essential medium))、BME(伊格尔基础培养基(Basal Medium Eagle))、RPMI 1640培养基(Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium)、E8基础培养基(E8 base medium)、SkBM(骨骼肌细胞基础培养基(Skeletal Muscle Cell Basal Medium))、MCDB104、MCDB153、199、L15)、作为市售品的干细胞维持用培养液、昆虫细胞用基本培养基、酵母用培养基、细菌用培养基等液体培养基。

[0063] 以使细胞持续悬浮为目的,和/或以防止细胞彼此的过度紧贴为目的,能够适用于由本实施方式所涉及的细胞培养装置10进行的细胞培养的培养基中可添加有不具有细胞毒性的高分子化合物。以上述目的添加于培养基的高分子化合物例如为调整培养基的比重的高分子化合物、调整培养基的粘度的高分子化合物、在培养基中形成三维网络结构的高分子化合物。作为这种高分子化合物,可举出纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、结冷胶、脱乙酰冷胶、透明质酸、海藻酸、卡拉胶、黄原胶、迪优坦(diutan)胶、淀粉、果胶等多糖类;胶原、明胶等蛋白质;聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮等合成高分子等。

[0064] 能够适用于由本实施方式所涉及的细胞培养装置10进行的细胞培养的培养基中

可添加有通常能够添加的各种成分,例如,青霉素、链霉素等抗生素;抗坏血酸、视黄酸等维生素或维生素衍生物;葡萄糖等糖源;氨基酸;无机盐;血清、血清替代物;转铁蛋白等蛋白质;胰岛素等激素;生长因子;分化抑制因子;2-巯基乙醇、二硫苏糖醇等抗氧化剂;钙离子、镁离子、锌离子、铁离子、铜离子等金属离子等。

[0065] <稀释液供给部>

[0066] 稀释液供给部120具有:稀释液容纳部121,容纳在细胞的培养过程中适当实施的稀释处理中使用的稀释液;泵P4,将容纳于稀释液容纳部121的稀释液送出至流路F3;以及过滤器123,用于对从泵P4送出的稀释液进行除菌。并且,稀释液供给部120具有设置在连接稀释液容纳部121和管道c1的管道的、过滤器123的下游侧的开闭阀V4。通过泵P4被驱动,且开闭阀V4设为打开状态,容纳于稀释液容纳部121的稀释液被送出至流路F3。

[0067] 能够适用于由本实施方式所涉及的细胞培养装置10进行的细胞培养的稀释液并没有特别限制,例如能够将哺乳动物细胞用基本培养基(例如,DMEM、DMEM/F-12、MEM、DME、RPMI1640、MCDB104、199、MCDB153、L15、SkBM、基础培养基(Basal Medium)、E8基础培养基(E8 base medium))作为稀释液而使用。另外,在细胞培养过程中不需要进行稀释处理时,可省略稀释液供给部120。

[0068] <冷冻液供给部>

[0069] 冷冻液供给部130具有:冷冻液容纳部131,容纳在冷冻部17中冷冻保存培养出的细胞时使用的冷冻液;泵P5,将容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液送出至流路F3;以及过滤器133,用于对从泵P5送出的冷冻液进行除菌。并且,冷冻液供给部130包含:连接冷冻液容纳部131;泵P5;以及设置在过滤器133的管道的、过滤器133的下游侧的开闭阀V5。通过泵P5被驱动,且开闭阀V5设为打开状态,容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液被送出至流路F3。另外,在不需要冷冻保存培养出的细胞时,可在细胞培养装置10中省略冷冻液供给部130。

[0070] <培养容器>

[0071] 培养容器20是用于将从细胞供给部100供给的细胞与从培养基供给部110供给的培养基一同容纳,并对所容纳的细胞进行培养的容器。培养容器20的形态并没有特别限定,例如能够使用玻璃制或不锈钢制容器、具有塑料制的袋形态的容器。培养容器20具有:流入口21,用于使细胞和培养基流入培养容器20内;以及流出口22,用于使容纳于培养容器20的细胞和培养基向培养容器20的外部流出。

[0072] 培养容器20能够容纳于培养箱24内,所述培养箱24被控制成例如温度为30℃~40℃(优选37℃)且CO₂浓度为2%~10%(优选5%),并且是密闭的。培养箱24具备用于向与培养基一同容纳于培养容器20内的细胞供给氧气(O₂)和二氧化碳(CO₂)的气体供给机构25。并且,培养箱24具备调整培养容器20内的压力的压力调整机构26。压力调整机构26通过将空气导入培养容器20内而对培养容器20内的气氛进行加压,或者通过将培养容器20内的气氛排出到外部而向大气中释放培养容器20内的气氛。压力调整机构26通过使培养容器20内的压力高于后述的循环流路F1内的压力,从而使容纳于培养容器20内的细胞和培养基流出至循环流路F1内。

[0073] <循环流路>

[0074] 细胞培养装置10具有循环流路F1,所述循环流路F1包含连接培养容器20的流出口22和流入口21的管道a1~a7而构成。容纳于培养容器20的细胞和培养基在培养过程中,在

循环流路F1内进行循环。流经循环流路F1内的细胞和培养基经由流入口21流入培养容器20内,容纳于培养容器20的内部的细胞和培养基经由流出口22流出至循环流路F1内。

[0075] 构成与培养容器20的流入口21连接的循环流路F1的管道a7上设有开闭阀V11,构成与培养容器20的流出口22连接的循环流路F1的管道a1上设有开闭阀V12。在使细胞和培养基从循环流路F1流入培养容器20内的情况下,开闭阀V11设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V11设为闭合状态。在使细胞和培养基从培养容器20内流出至循环流路F1内的情况下,开闭阀V12设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V12设为闭合状态。

[0076] 由与细胞供给部100、培养基供给部110、稀释液供给部120以及冷冻液供给部130连接的管道c1构成的流路F3在连接部位X3与循环流路F1连接。即,容纳于细胞容纳部101的细胞、分别容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基、容纳于稀释液容纳部121的稀释液以及容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液经由流路F3以及连接部位X3被供给至循环流路F1内。

[0077] 在构成流路F3的管道c1上,在连接部位X3的附近设有开闭阀V6。在从细胞供给部100、培养基供给部110、稀释液供给部120以及冷冻液供给部130分别向循环流路F1内供给细胞、培养基、稀释液以及冷冻液的情况下,开闭阀V6设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V6设为闭合状态。

[0078] <储存容器>

[0079] 储存容器30设置在循环流路F1内即循环流路F1的中途。储存容器30是用于临时储存流经循环流路F1内的细胞、培养基、稀释液以及冷冻液的容器,其在培养期间中实施的后述的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理中被使用。储存容器30的形态并没有特别限定,例如能够使用玻璃制或不锈钢制容器、具有塑料制的袋形态的容器。

[0080] 储存容器30具有:流入口31,用于使流经循环流路F1内的细胞、培养基、稀释液以及冷冻液流入储存容器30内;以及流出口32,用于使容纳于储存容器30的细胞、培养基、稀释液以及冷冻液流出至循环流路F1内。储存容器30的流入口31通过构成循环流路F1的管道a1、a2以及a3与培养容器20的流出口22连接。储存容器30的流出口32通过构成循环流路F1的管道a4、a5、a6以及a7与培养容器20的流入口21连接。并且,在本实施方式中,连接循环流路F1和流路F3的连接部位X3配置在储存容器30的流入口31的附近,但循环流路F1和流路F3的连接位置能够配置在循环流路F1内的任何位置。

[0081] 在构成循环流路F1的管道a2上,在储存容器30的流入口31的附近设有开闭阀V13。在使细胞和培养基等从循环流路F1流入储存容器30内的情况下,开闭阀V13设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V13设为闭合状态。并且,在构成循环流路F1的管道a5上,在储存容器30的流出口32的附近设有开闭阀V14。在使细胞和培养基等从储存容器30内向循环流路F1内输送至培养容器20、分割处理部40以及冷冻部17的情况下,开闭阀V14设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V14设为闭合状态。

[0082] 储存容器30具备调整储存容器30内的压力的压力调整机构33。压力调整机构33通过将空气导入储存容器30内而对储存容器30内的气氛进行加压,或者通过将储存容器30内的气氛排出到外部而向大气中释放储存容器30内的气氛。压力调整机构33使储存容器30内的压力高于循环流路F1内的压力,从而使储存在储存容器30内的细胞、培养基、稀释液以及冷冻液从流出口32流出至循环流路F1内。

[0083] 细胞培养装置10具有包含连接部位X1和连接部位X2的管道b1以及管道b2而构成的流路F2,所述连接部位X1位于循环流路F1内的储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间,所述连接部位X2位于循环流路F1内的储存容器30的流入口31与培养容器20的流出口22之间。流经循环流路F1内的细胞和培养基等能够经由连接部位X1流入流路F2内。并且,流经流路F2内的细胞和培养基等能够经由连接部位X2流入循环流路F1内。

[0084] <分割处理部>

[0085] 分割处理部40设置在流路F2内即流路F2的中途。分割处理部40具备处理容器42,所述处理容器42用于进行分割通过在培养容器20内培养细胞而产生的细胞团块的分割处理。在处理容器42内进行的分割处理可以是机械分割处理,也可以是使用了细胞解离酶的酶处理。在适用机械分割处理的情况下,处理容器42内能够配置有网状过滤器(未图示)。使细胞团块通过网状过滤器,由此,细胞团块被分割成与网状过滤器的网格尺寸相应的尺寸。另一方面,在适用基于酶处理的分割处理的情况下,处理容器42内能够容纳有胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid))等细胞解离酶。通过将细胞团块经一定时间浸渍于细胞解离酶中,从而分割细胞团块。

[0086] 分割处理部40在处理容器42内分割从循环流路F1经由连接部位X1流入流路F2内的细胞团块。已实施分割处理的细胞经由连接部位X2流出至循环流路F1内。

[0087] 分割处理部40具备:压力容器41,与处理容器42连通;以及压力调整机构43,调整压力容器41和处理容器42内的压力。压力调整机构43通过将空气导入压力容器41内而对压力容器41和处理容器42内的气氛进行加压,或者通过将压力容器41内的气氛排出到外部而向大气中释放压力容器41和处理容器42内的气氛。压力调整机构43使压力容器41和处理容器42内的压力高于循环流路F1内的压力,从而能够使已实施分割处理的细胞流出至循环流路F1内。

[0088] 在构成流路F2且配置在分割处理部40的上游侧的管道b1上,在连接部位X1的附近设有开闭阀V21。在从储存容器30向分割处理部40输送细胞等的情况下,开闭阀V21设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V21设为闭合状态。另一方面,在构成流路F2且配置在分割处理部40的下游侧的管道b2上的连接部位X2的附近设有开闭阀V22。在通过分割处理部40使已实施分割处理的细胞流出至循环流路F1内的情况下,开闭阀V22设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V22设为闭合状态。

[0089] 在构成循环流路F1的管道a1上,在连接部位X2的附近且连接部位X2的上游侧设有开闭阀V15。在从培养容器20向储存容器30输送细胞和培养基等的情况下,开闭阀V15设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V15设为闭合状态。

[0090] <废液回收容器>

[0091] 细胞培养装置10具有在连接部位X4包含与循环流路F1连接的管道d1而构成的流路F4,所述连接部位X4位于循环流路F1内的储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间,且位于比连接部位X1更靠上游侧(偏靠储存容器30)。流路F4的端部设有废液回收容器16。废液回收容器16是用于回收从循环流路F1经由连接部位X4流入流路F4内的废液的容器。回收到的废液回收容器16内的废液中含有已使用的培养基、已使用的稀释液、伴随从细胞供给部100以冷冻状态供给的细胞的冷冻液等。废液回收容器16的形态并没有特别限定,例如能够使用玻璃制或不锈钢制的容器、具有塑料制的袋形态的容器。

[0092] 在构成流路F4的管道d1上,在连接部位X4的附近设有开闭阀V31。在将从储存容器30流出的废液回收到废液回收容器16内的情况下,开闭阀V31设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V31设为闭合状态。

[0093] <冷冻部>

[0094] 细胞培养装置10具有包含在连接部位X1与循环流路F1连接的管道e1而构成的流路F5。流路F5的端部设有冷冻部17。冷冻部17具有将从循环流路F1经由连接部位X1流入流路F5内的细胞与从冷冻液供给部130供给的冷冻液一同容纳的保存容器17a。保存容器17a例如可以是小瓶、冻存管(Cryotube)或具有袋形态的容器。冷冻部17能够包含对容纳于保存容器17a的细胞和冷冻液进行冷冻的冷冻箱(Freezer)而构成。并且,冷冻部17可以具备填充有液氮的容器,也可以构成为能够在容器内容纳保存容器17a。并且,冷冻部17例如电可以包含TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION制的Cryo Library(注册商标)系统而构成。在构成流路F5的管道e1上,在连接部位X1的附近设有开闭阀V41。在从储存容器30向冷冻部17输送细胞和冷冻液的情况下,开闭阀V41设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V41设为闭合状态。另外,流路F5与循环流路F1的连接位置只要在储存容器30的流出口132与培养容器20的流入口21之间,则可以是任何位置。并且,在不需要冷冻保存细胞时,可省略冷冻部17。

[0095] <控制部>

[0096] 控制部18综合控制泵P1~P5、开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31以及V41、气体供给机构25、压力调整机构26、33以及43的工作。由此,按照规定的细胞培养方案进行的细胞的培养无需手动干预而自动实施。另外,从避免附图的复杂性的观点考虑,在图1中省略控制部18与被控制部18控制的上述各构成要件之间的电连接布线的图示。

[0097] 另外,培养容器20为本发明中的培养容器的一例。培养容器20的流入口21为本发明中的第1流入口的一例。培养容器20的流出口22为本发明中的第1流出口的一例。储存容器30为本发明中的储存容器的一例。储存容器30的流入口31为本发明中的第2流入口的一例。储存容器30的流出口32为本发明中的第2流出口的一例。循环流路F1为本发明中的第1流路的一例。流路F2为本发明中的第2流路的一例。连接部位X1为本发明中的第1部位的一例。连接部位X2为本发明中的第2部位的一例。分割处理部40为本发明中的分割处理部的一例。处理容器42为本发明中的处理容器的一例。压力调整机构43为本发明中的分割处理部所具有的压力调整机构的一例。细胞供给部100为本发明中的细胞供给部的一例。培养基供给部110为本发明中的培养基供给部的一例。流路F3为本发明中的第5流路的一例。冷冻部17为本发明中的冷冻部的一例。

[0098] 以下示出能够在本实施方式所涉及的细胞培养装置10中实施的处理的一例。细胞培养装置10例如实施以下例示的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理。另外,以下说明的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理通过由控制部18控制开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31以及V41、泵P1~P5、压力调整机构26、33以及43的工作来实现。

[0099] <传代处理>

[0100] 细胞培养装置10如下实施传代处理,所述传代处理通过将容纳于细胞容纳部101的细胞与容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基一同容纳于培养容器20内

而开始进行细胞培养。另外,以下说明中例示分割处理部40中的分割处理为机械分割处理的情况。图2是表示细胞培养装置10实施传代处理时的细胞和培养基等的流动的图。另外,在图2中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0101] 在步骤S1中,开闭阀V1、V4以及V6设为打开状态,泵P1以及P4被驱动。由此,在细胞容纳部101中以冷冻状态被容纳的细胞和容纳于稀释液容纳部121的稀释液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。

[0102] 在步骤S2中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞、伴随细胞的冷冻液以及稀释液的混合物中去除冷冻液和稀释液的浓缩处理。例如通过使与稀释液一同容纳在储存容器30内的细胞在储存容器30内沉降(自然沉降),并去除包含稀释液和冷冻液的上清液来进行上述浓缩处理。具体而言,使细胞在储存容器30内沉降之后,将开闭阀V14设为短期打开状态。由此,使上清液残留在储存容器30内,并且使细胞从储存容器30流出而滞留在管道a5内。之后,将开闭阀V14设为闭合状态,将开闭阀V31设为打开状态。由此,包含残留在储存容器30内的稀释液和冷冻液的废液从储存容器30的流出口32流出,并经由流路F4而回收到废液回收容器16内。另外,通过压力调整机构33对储存容器30内的气氛进行加压,由此从储存容器30向管道a5输送细胞,且从储存容器30向废液回收容器16输送稀释液和冷冻液。

[0103] 在步骤S3中,开闭阀V2、V3以及V6设为打开状态,泵P2和泵P3被驱动。由此,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基A和培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。之后,开闭阀V14设为打开状态,由培养基A和培养基B组成的混合培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0104] 在步骤S4中,开闭阀V14、V16以及V21设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的细胞和培养基经由连接部位X1流入流路F2内,从而流入分割处理部40内。流入到分割处理部40内的细胞在处理容器42内被实施分割处理。另外,以破碎成为冷冻状态的细胞为目的而进行此处的分割处理。

[0105] 在步骤S5中,开闭阀V22以及V13设为打开状态。并且,压力容器41和处理容器42内的气氛通过压力调整机构43被加压。由此,已实施分割处理的细胞与培养基一同经由连接部位X2流出至循环流路F1内,从而被输送至储存容器30内。

[0106] 在步骤S6中,开闭阀V14、V16以及V11设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由循环流路F1流入培养容器20内。通过以上步骤S1~S6的处理,完成传代处理。

[0107] 另外,上述例子中,在分割处理之前实施了浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施浓缩处理和新培养基的供给。

[0108] <培养基更换处理>

[0109] 在细胞培养中,培养基因从细胞分泌的代谢物等而变质。因此,需要在培养期间内的适当的时期进行将培养容器20内的已使用的培养基更换为新培养基的培养基更换处理。本实施方式所涉及的细胞培养装置10如下实施上述培养基更换处理。图3是表示细胞培养装置10实施培养基更换处理时的细胞和培养基等的流动的图。另外,在图3中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0110] 在步骤S11中,开闭阀V12、V15以及V13设为打开状态。并且,培养容器20内的气氛通过压力调整机构26被加压。由此,容纳于培养容器20内的细胞和已使用的培养基流出至

循环流路F1内,从而被输送至储存容器30内。

[0111] 在步骤S12中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。以与上述传代处理的步骤S2中的处理相同的顺序进行浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。另外,为了促进细胞的沉降,也可以将稀释液导入储存容器30内。

[0112] 在步骤S13中,开闭阀V2、V3以及V6设为打开状态,泵P2和泵P3被驱动。由此,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的新培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0113] 在步骤S14中,开闭阀V14、V16以及V11设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的细胞和新培养基流入培养容器20内。通过新培养基培养容纳于培养容器20内的细胞。通过以上步骤S11~S14的处理,完成培养基更换处理。

[0114] <分割处理(机械分割处理)>

[0115] 例如,在培养多能干细胞时,若通过培养细胞而产生的细胞团块(球体)的尺寸过大,则细胞团块彼此粘接融合,可能会产生细胞开始分化或细胞团块中心部的细胞坏死等问题。因此,为了防止细胞团块的尺寸过大,有时需要在培养期间的适当的时期进行分割细胞团块的分割处理。本实施方式所涉及的细胞培养装置10如下实施上述分割处理。另外,以下说明中,例示分割处理部40中的分割处理为机械分割处理的情况。图4是表示细胞培养装置10实施分割处理时的细胞和培养基等的流动的图。另外,在图4中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0116] 在步骤S21中,开闭阀V12、V15以及V13设为打开状态。并且,培养容器20内的气氛通过压力调整机构26被加压,在培养容器20内产生的细胞团块和已使用的培养基向循环流路F1内流出,从而被输送至储存容器30内。

[0117] 在步骤S22中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞团块和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。以与上述传代处理的步骤S2中的处理相同的顺序进行浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞团块滞留在管道a5内。另外,为了促进细胞的沉降,也可以将稀释液导入储存容器30内。

[0118] 在步骤S23中,开闭阀V2、V3以及V6设为打开状态,泵P2和泵P3被驱动。由此,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的新培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞团块汇合。

[0119] 在步骤S24中,开闭阀V14、V16以及V21设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的细胞团块以及培养基经由连接部位X1流入流路F2内,从而流入分割处理部40内。流入到分割处理部40内的细胞在处理容器42内被实施分割处理。

[0120] 在步骤S25中,开闭阀V22以及V13设为打开状态。并且,压力容器41内和处理容器42内的气氛通过压力调整机构43被加压。由此,已实施分割处理的细胞与培养基一同经由连接部位X2向循环流路F1内流出,从而被输送至储存容器30内。

[0121] 在步骤S26中,开闭阀V14、V16以及V11设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,储存在储存容器30内的已实施分割处理的细胞和新培养基流入培养容器20内。在培养容器20内继续进行已实施分割处理的细胞的培养。通过以上步骤S21~S26的处理,完成分割处理。

[0122] 另外,上述例子中,在进行分割处理之前实施了浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施浓缩处理和新培养基的供给。

[0123] <分割处理(酶处理)>

[0124] 图5是表示分割处理部40中的分割处理包含上述使用了细胞解离酶的酶处理时的、细胞培养装置10实施分割处理时的细胞和培养基等的流动的图。另外,在图5中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0125] 图5中的步骤S31~S33的处理与上述步骤S21~S23的处理相同,因此省略重复说明。

[0126] 在步骤S34中,开闭阀V14、V16以及V21设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的细胞团块以及培养基经由连接部位X1流入流路F2内,从而流入分割处理部40内。流入到分割处理部40内的细胞在处理容器42内被实施使用了细胞解离酶的分割处理。

[0127] 在步骤S35中,开闭阀V22以及V13设为打开状态。并且,压力容器41和处理容器42内的气氛通过压力调整机构43被加压。由此,已实施分割处理的细胞与包含细胞解离酶的培养基一同经由连接部位X2向循环流路F1内流出,从而被输送至储存容器30内。

[0128] 在步骤S36中,开闭阀V4以及V6设为打开状态,泵P4被驱动。由此,容纳于稀释液容纳部121的稀释液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。通过向容纳于储存容器30的细胞和包含细胞解离酶的培养基中添加稀释液,基于细胞解离酶的细胞解离作用停止。

[0129] 在步骤S37中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞、包含细胞解离酶的培养基以及稀释液的混合物中去除包含细胞解离酶的培养基和稀释液的浓缩处理。以与上述传代处理的步骤S2中的处理相同的顺序进行浓缩处理。通过浓缩处理,包含细胞解离酶的培养基和稀释液被回收到废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。

[0130] 在步骤S38中,开闭阀V2、V3以及V6设为打开状态,泵P2和泵P3被驱动。由此,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的新培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0131] 在步骤S39中,开闭阀V14、V16以及V11设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的已实施分割处理的细胞和新培养基流入培养容器20内。在培养容器20内继续进行已实施分割处理的细胞的培养。通过以上步骤S31~S39的处理,完成分割处理。

[0132] 另外,上述例子中,在进行分割处理之前实施了浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施浓缩处理和新培养基的供给。

[0133] <冷冻处理>

[0134] 当回收并保存培养出的细胞时,通常将细胞回收到保存容器内而进行冷冻保存。本实施方式所涉及的细胞培养装置10如下实施回收培养出的细胞而使其冷冻的冷冻处理。

图6是表示细胞培养装置10实施冷冻处理时的细胞和培养基等的流动的图。另外,在图6中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0135] 在步骤S41中,开闭阀V12、V15以及V13设为打开状态。并且,培养容器20内的气氛通过压力调整机构26被加压。由此,容纳于培养容器20内的细胞和已使用的培养基向循环流路F1内流出,从而被输送至储存容器30内。

[0136] 在步骤S42中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。以与上述传代处理的步骤S2中的处理相同的顺序进行浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。另外,为了促进细胞的沉降,也可以将稀释液导入储存容器30内。

[0137] 在步骤S43中,开闭阀V5以及V6设为打开状态,泵P5被驱动。由此,容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。之后,开闭阀V14设为打开状态,冷冻液从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0138] 在步骤S44中,开闭阀V14、V16以及V41设为打开状态。并且,储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。由此,滞留在管道a5内的细胞和冷冻液经由流路F5容纳于冷冻部17的保存容器17a内。冷冻部17将容纳于保存容器17a内的细胞与冷冻液一同冷冻。通过以上步骤S41~S44的处理,完成分割处理。

[0139] 另外,作为冷冻保存细胞的方法,例如可适用日本专利第4705473号中记载的方法。该方法中包括在包含规定量的二甲基亚砜(DMSO)、丙二醇、乙酰胺以及培养基的介质中急速冷冻细胞的工序。并且,也可以适用日本专利第4223961号中记载的方法。该方法为利用了将选自包含规定浓度的二甲基亚砜、丙三醇、乙二醇、丙二醇以及聚乙烯吡咯烷酮的组中的至少一种作为冷冻保护剂而含有的冷冻保存液的细胞的冷冻保存方法,其包括:使细胞悬浮于冷冻保存液的工序;冷却工序,以规定的冷却速度将冷冻保存液冷却至-80℃以下而进行冷冻;以及保存工序,在-80℃以下保存冷冻保存液。

[0140] 另外,在上述传代处理、培养基更换处理以及分割处理中例示了从培养基供给部110供给2种培养基A和培养基B的情况,但所使用的培养基的种类能够根据细胞的培养方案而适当变更。即,根据培养方案,所使用的培养基可以是1种,也可以是3种以上。

[0141] <细胞培养处理>

[0142] 细胞培养装置10通过由控制部18执行以下例示的细胞培养处理程序,无需手动干预便能够自动进行细胞培养。图7是表示控制部18执行的细胞培养程序中的处理的流程的流程图。

[0143] 在步骤S101中,控制部18通过执行上述传代处理,将从细胞供给部100供给的细胞和从培养基供给部110供给的培养基容纳于培养容器20内而开始进行细胞培养。

[0144] 在步骤S102中,控制部18通过在开始进行细胞培养起经过规定期间之后实施上述培养基更换处理(第1次),将培养容器20内的已使用的培养基更换为容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基,从而继续进行细胞培养。

[0145] 在步骤S103中,控制部18通过在实施第1次培养基更换处理起经过规定期间之后实施上述培养基更换处理(第2次),将培养容器20内的已使用的培养基更换为容纳于培养基容纳部111内和培养基容纳部114内的新培养基,从而继续进行细胞培养。

[0146] 在步骤S104中,控制部18通过在实施第2次培养基更换处理起经过规定期间之后

实施上述分割处理,分割细胞团块而继续进行细胞培养。

[0147] 在步骤S105中,控制部18判定将上述步骤S102~S104中的处理设为1周期的培养周期的周期数是否达到规定数。当控制部18判定为培养周期的周期数未达到规定数时,使处理返回步骤S102。另一方面,当控制部18判定为培养周期的周期数达到规定的周期数时,处理前进至步骤S106。随着培养周期的进展,细胞的培养规模增大。

[0148] 在步骤S106中,控制部18通过实施上述冷冻处理,将培养出的细胞容纳并冷冻保存于冷冻部17的保存容器17a内。

[0149] 另外,上述例子中,在培养周期的1个周期内实施了两次培养基更换处理,但培养周期的1个周期内的培养基更换处理的实施次数能够适当变更。

[0150] 根据以上说明可知,本实施方式所涉及的细胞培养装置10具有连接培养容器20的流入口21和流出口22的循环流路F1。并且,细胞培养装置10具有设置在循环流路F1内的储存容器30。储存容器30具有与培养容器20的流出口22连接的流入口31以及与培养容器20的流入口21连接的流出口32。储存容器30供在上述传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理中实施的浓缩处理等使用。并且,细胞培养装置10具有连接循环流路F1内的连接部位X1和循环流路F1内的连接部位X2的流路F2,所述连接部位X1位于储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间,所述连接部位X2位于储存容器30的流入口31与培养容器20的流出口22之间。细胞培养装置10具有分割处理部40,所述分割处理部40设置在流路F2内,分割经由连接部位X1从循环流路F1流入的细胞团块,并将已分割的细胞团块经由连接部位X2流出至循环流路F1内。并且,细胞培养装置10具有向循环流路F1内供给培养基的培养基供给部110。

[0151] 通过如上述那样构成细胞培养装置10,能够在密封系统中连续地实施在培养基更换处理或分割处理等细胞培养中所需的一系列处理。由此,能够大量生产均质的细胞。根据本实施方式所涉及的细胞培养装置10,无需手动干预便能够进行从传代处理到冷冻处理的细胞培养所需的一系列处理。

[0152] 并且,根据本实施方式所涉及的细胞培养装置10,从培养容器20向储存容器30输送细胞、从储存容器30向分割处理部40和培养容器20输送细胞、从分割处理部40向储存容器30输送细胞,均通过基于压力调整机构26、33以及43的压力输送来进行。由此,与使用隔膜泵、管泵、蠕动泵以及莫诺泵(Mono pump)等液体接触泵而进行细胞输送时相比,能够减轻对细胞的损坏,能够抑制细胞存活率的降低。另外,本实施方式所涉及的细胞培养装置10例示了通过由控制部18控制开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31以及V41、泵P1~P5、压力调整机构26、33以及43的工作,使从传代处理到冷冻处理自动化的情况,但并不限于该方式。也可以由用户手动操作开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31以及V41、泵P1~P5、压力调整机构26、33以及43。

[0153] [第2实施方式]

[0154] 图8是表示本发明的第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A的结构图。细胞培养装置10A具有在上述第1实施方式所涉及的细胞培养装置10的基础上附加搅拌部50、51以及52的结构。搅拌部50、51以及52分别具有对所流入的流体进行搅拌的功能。优选搅拌部50、51以及52具有作为不具有驱动部的所谓静态混合器的结构,例如可包含管状体和搅拌元件而构成,所述搅拌元件固定设置在管状体的内部,且在管状体的内部形成螺旋状流路。

另外,构成静态混合器的管状体的内部流路并不一定要求是螺旋状。静态混合器也可以具有在管状体的内部形成流路的板状部件以能够搅拌通过管状体的内部的流体的方式适当配置于管状体的内部的结构或使管状体的内径局部变化的结构。

[0155] 搅拌部50设置在循环流路F1内的储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间。更具体而言,搅拌部50设置在循环流路F1内的储存容器30的流出口32与连接部位X1之间。另外,搅拌部50也可以设置在循环流路F1内的连接部位X1与培养容器20的流入口21之间。搅拌部51设置在流路F3内的培养基供给部110与细胞供给部100之间。另一方面,搅拌部52设置在流路F3内的来自细胞供给部100的管道所连接的部位的下游侧。

[0156] 另外,搅拌部50为本发明中的第1搅拌部的一例。搅拌部51为本发明中的第2搅拌部的一例。搅拌部52为本发明中的第3搅拌部的一例。

[0157] 以下,对能够在第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A中实施的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理进行说明。另外,以下说明的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理通过由控制部18控制开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31以及V41、泵P1~P5、压力调整机构26、33以及43的工作来实现。

[0158] <传代处理>

[0159] 以下,对由第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的传代处理进行说明。以下说明中例示分割处理部40中的分割处理为上述机械分割处理的情况。并且,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的传代处理重复的事项。图9是表示细胞培养装置10A实施传代处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图2。另外,在图9中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0160] 在步骤S1中,在细胞容纳部101内以冷冻状态被容纳的细胞和容纳于稀释液容纳部121的稀释液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。细胞和稀释液在流路F3内通过搅拌部52,从而被搅拌而混合。

[0161] 在步骤S2中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞、伴随细胞的冷冻液以及稀释液的混合物中去除冷冻液和稀释液的浓缩处理。通过浓缩处理,冷冻液和稀释液被回收 to 废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。

[0162] 在步骤S3中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基A和培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。培养基A和培养基B在流路F3内通过搅拌部51和搅拌部52。培养基A和培养基B通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。在悬浮培养中,设想培养基A和培养基B彼此具有粘度差的情况。利用搅拌部51和搅拌部52对培养基A和培养基B进行搅拌,由此能够在与细胞混合之前得到粘度均匀的混合培养基。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的混合培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0163] 在步骤S4中,滞留在管道a5内的细胞和培养基被输送至分割处理部40内。流入到分割处理部40内的细胞在处理容器42内被实施分割处理。由此,分割冷冻状态的细胞。在步骤S5中,已实施分割处理的细胞与培养基一同被输送至储存容器30内。

[0164] 在步骤S6中,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由搅拌部50流入培养容器20内。细胞和培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,悬浮在培养基内的细胞之间的距离被均匀化。

[0165] 这样,根据由本实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的传代处理,从细胞供给部100供给的细胞在培养基内以细胞之间的距离被均匀化的状态容纳于培养容器20内。另外,上述例子中,在进行分割处理之前实施了浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施浓缩处理和新培养基的供给。

[0166] <培养基更换处理>

[0167] 以下,对由第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的培养基更换处理进行说明。另外,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的培养基更换处理重复的事项。图10是表示细胞培养装置10A实施培养基更换处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图3。另外,在图10中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0168] 在步骤S11中,从培养容器20向储存容器30内输送细胞和已使用的培养基。在步骤S12中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。

[0169] 在步骤S13中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。培养基A和培养基B在流路F3内通过搅拌部51和搅拌部52。培养基A和培养基B通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的新培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0170] 在步骤S14中,滞留在管道a5内的细胞和新培养基经由搅拌部50流入培养容器20内。细胞和新培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,悬浮在培养基内的细胞之间的距离被均匀化。这样,根据由本实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的培养基更换处理,从培养容器20取出的细胞在新培养基内以细胞之间的距离被均匀化的状态返回到培养容器20内。

[0171] <分割处理>

[0172] 以下,对由第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的分割处理进行说明。另外,以下说明中例示分割处理部40中的分割处理为上述机械分割处理的情况。并且,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的分割处理重复的事项。图11是表示细胞培养装置10A实施分割处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图4。另外,在图11中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0173] 在步骤S21中,从培养容器20向储存容器30内输送细胞和已使用的培养基。在步骤S22中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。

[0174] 在步骤S23中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1从流入口31流入储存容器30内。培养基A和培养基B在流路F3内通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。之后,开闭阀V14设为打开状态,包含培养基A和培养基B的新培养基从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0175] 在步骤S24中,滞留在管道a5内的细胞和培养基被输送至分割处理部40内,并在分

割处理部40内对细胞团块实施分割处理。在步骤S25中,已实施分割处理的细胞与培养基一同被输送至储存容器30内。

[0176] 在步骤S26中,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由搅拌部50从流入口21流入培养容器20内。细胞和培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,悬浮在培养基内的细胞之间的距离被均匀化。

[0177] 这样,根据由本实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的分割处理,从培养容器20取出的细胞被分割处理,在新培养基内以细胞之间的距离被均匀化的状态返回到培养容器20。另外,上述例子中,在进行分割处理之前实施了浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施浓缩处理和新培养基的供给。

[0178] <冷冻处理>

[0179] 以下,对由第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A进行的冷冻处理进行说明。另外,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的冷冻处理重复的事项。图12是表示细胞培养装置10A实施冷冻处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图6。另外,在图12中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0180] 在步骤S41中,从培养容器20向储存容器30内输送细胞和已使用的培养基。在步骤S42中,实施从包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。通过浓缩处理,已使用的培养基被回收至废液回收容器16内,细胞滞留在管道a5内。

[0181] 在步骤S43中,容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。冷冻液在流路F3内通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌。之后,开闭阀V14设为打开状态,冷冻液从储存容器30流出,从而与滞留在管道a5内的细胞汇合。

[0182] 在步骤S44中,滞留在管道a5内的细胞和冷冻液经由搅拌部50和流路F5容纳于冷冻部17的保存容器17a内。细胞和冷冻液通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。冷冻部17使容纳于保存容器17a内的细胞与冷冻液一同冷冻。

[0183] 如上所述,在第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A中,搅拌部50设置在储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间。由此,在传代处理、培养基更换处理以及分割处理中,细胞和培养基在即将容纳于培养容器20内之前被搅拌部50被搅拌而混合。由此,能够在新培养基内以使细胞之间的距离均匀化的状态,将细胞容纳于培养容器20。通过将细胞之间的距离均匀化,能够抑制成为细胞死亡或细胞分化的原因的细胞团块彼此的融合,并且能够将细胞团块的尺寸和生成速度均匀化。并且,通过在新培养基内以使细胞之间的距离均匀化的状态将细胞容纳于培养容器20,在培养容器20内不需要成为对细胞的损坏原因的搅拌,或者能够以基于最小功率的搅拌整顿培养环境。因此,本实施方式所涉及的细胞培养装置10A能够尤其优选使用于以悬浮在培养基内的状态静置细胞而进行静置培养的情况。

[0184] [第3实施方式]

[0185] 图13是表示本发明的第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B的结构图。细胞培养装置10B具有在上述第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A的基础上附加流路F6、过滤器部60以及泵P10的结构。另外,废液回收容器16与过滤器部60连接。

[0186] 流路F6为连接储存容器30的流入口31和流出口32的流路,且包含在连接部位X5与循环流路F1连接的管道f1和在连接部位X6与循环流路F1连接的管道f2而构成。

[0187] 过滤器部60设置在流路F6内(即,流路F6的中途)。过滤器部60具有进行浓缩处理的功能,所述浓缩处理中,自包含从储存容器30供给的细胞和培养基、稀释液以及冷冻液等液体的混合物中去除上述液体。

[0188] 过滤器部60例如可具有所谓切向流过滤器的结构,构成为在过滤器部60内,包含细胞和培养基等液体的混合物沿滤膜的表面流动。图14是表示由过滤器部60进行的过滤方式的一例的图。过滤器部60例如具有由中空纤维构成的滤膜M。滤膜M可以是多孔膜,滤膜M的材质可以是金属、聚合物或陶瓷烧结体等。例如通过由聚合物构成滤膜M,能够进行伽马射线灭菌,并且能够单次使用,因此优选。若包含细胞C和培养基等液体L的混合物流入滤膜M的内侧,则液体L向滤膜M的外侧排出而容纳于废液回收容器16内。另一方面,细胞C通过滤膜M的内侧而回收到储存容器30内。通过进行基于切向流的过滤,能够将对细胞的损坏限制到最小。另外,过滤器部60也可以具有包含细胞和培养基等的混合物的流向成为与滤膜的膜面交叉的方向的死端过滤器(dead-end flow filter)的结构。

[0189] 在将包含细胞和培养基等的混合物从储存容器30输送至过滤器部60时以及从过滤器部60输送至储存容器30时,驱动配置在构成流路F6的管道f2内的泵P10。

[0190] 在构成流路F6的管道f1内,在连接部位X5的附近设有开闭阀V51。并且,在构成流路F6的管道f2内,在连接部位X6的附近设有开闭阀V52。在过滤器部60中实施浓缩处理而将细胞回收到储存容器30内为止的期间,开闭阀V51和开闭阀V52设为打开状态,在除此以外的情况下,开闭阀V51和开闭阀V52设为闭合状态。

[0191] 另外,流路F6为本发明中的第3流路的一例。过滤器部60为本发明中的第1过滤器部的一例。

[0192] 以下,对能够在第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B中实施的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理进行说明。另外,以下说明的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理通过由控制部18控制开闭阀V1~V5、V11~V16、V21、V22、V31、V41、V51以及V52、泵P1~P5以及P10、压力调整机构26以及43的工作来实现。

[0193] <传代处理>

[0194] 以下,对由第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B进行的传代处理进行说明。以下说明中例示分割处理部40中的分割处理为上述机械分割处理的情况。并且,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的传代处理重复的事项。图15是表示细胞培养装置10B实施传代处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图2。另外,在图15中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0195] 在步骤S1中,在细胞容纳部101内以冷冻状态被容纳的细胞和容纳于稀释液容纳部121的稀释液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内。细胞和稀释液在流路F3内通过搅拌部52,从而被搅拌而混合。

[0196] 在步骤S2中,开闭阀51和开闭阀52设为打开状态,泵P10被驱动。由此,包含储存在储存容器30内的细胞、附随细胞的冷冻液以及稀释液的混合物流入过滤器部60内。过滤器部60进行从包含细胞、冷冻液以及稀释液的混合物中去除冷冻液和稀释液的浓缩处理。冷冻液和稀释液被回收到废液回收容器16内,已实施浓缩处理的细胞被回收到储存容器30

内。

[0197] 在步骤S3中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的培养基A和培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内,从而与储存在储存容器30内的细胞汇合。培养基A和培养基B通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。

[0198] 在步骤S4中,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由搅拌部50被输送至分割处理部40内。流入到分割处理部40内的细胞在处理容器42内实施分割处理。由此,分割冷冻状态的细胞。在步骤S5中,已实施分割处理的细胞与培养基一同被输送至储存容器30内。

[0199] 在步骤S6中,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由搅拌部50流入培养容器20内。细胞和培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,从细胞供给部100供给的细胞在培养基内以细胞之间的距离被均匀化的状态容纳于培养容器20。

[0200] 另外,上述例子中,将过滤器部60中的浓缩处理仅设为一次,但也可以根据需要,通过使包含细胞和已使用的培养基的混合物在储存容器30与过滤器部60之间反复循环,从而将浓缩处理的实施次数设为两次以上。并且,上述例子中,在分割处理之前实施了过滤器部中的浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施过滤器部中的浓缩处理和新培养基的供给。

[0201] <培养基更换处理>

[0202] 以下,对由第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B进行的培养基更换处理进行说明。另外,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的培养基更换处理重复的事项。图16是表示细胞培养装置10B实施培养基更换处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图3。另外,在图16中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0203] 在步骤S11中,细胞和已使用的培养基从培养容器20被输送至储存容器30内。在步骤S12中,开闭阀51和开闭阀52设为打开状态,泵P10被驱动。由此,包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物流入过滤器部60内。过滤器部60进行从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。已使用的培养基被回收到废液回收容器16内,已实施浓缩处理的细胞被回收到储存容器30内。

[0204] 在步骤S13中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内,从而与储存在储存容器30内的细胞汇合。培养基A和培养基B通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。

[0205] 在步骤S14中,储存在储存容器30的细胞和新培养基经由搅拌部50流入培养容器20内。细胞和新培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,细胞以悬浮在培养基内的细胞之间的距离被均匀化的状态容纳于培养容器20内。

[0206] 另外,上述例子中,将过滤器部60中的浓缩处理仅设为一次,但也可以根据需要,通过使包含细胞和已使用的培养基的混合物在储存容器30与过滤器部60之间反复循环,将浓缩处理的实施次数设为两次以上。

[0207] <分割处理>

[0208] 以下,对由第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B进行的分割处理进行说明。以下说明中例示分割处理部40中的分割处理为上述机械分割处理的情况。并且,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的分割处理重复的事项。图17是表示细胞培养装置10B实

施分割处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图4。另外,在图17中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0209] 在步骤S21中,细胞和已使用的培养基从培养容器20被输送至储存容器30内。在步骤S22中,开闭阀51和开闭阀52设为打开状态,泵P10被驱动。由此,包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物流入过滤器部60内。过滤器部60进行从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。已使用的培养基被回收到废液回收容器16内,已实施浓缩处理的细胞被回收到储存容器30内。

[0210] 在步骤S23中,容纳于培养基容纳部111和培养基容纳部114的新培养基A和新培养基B经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内,从而与储存在储存容器30内的细胞汇合。培养基A和培养基B通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌而混合。

[0211] 在步骤S24中,储存在储存容器30内的细胞和新培养基被输送至分割处理部40内,并在分割处理部40内对细胞团块实施分割处理。在步骤S25中,已实施分割处理的细胞与培养基一同被输送至储存容器30内。

[0212] 在步骤S26中,储存在储存容器30内的细胞和培养基经由搅拌部50流入培养容器20内。细胞和培养基通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。由此,细胞以悬浮在培养基内的细胞之间的距离被均匀化的状态容纳于培养容器20内。

[0213] 另外,上述例子中,将过滤器部60中的浓缩处理仅设为一次,但也可以根据需要,通过使包含细胞和已使用的培养基的混合物在储存容器30与过滤器部60之间反复循环,将浓缩处理的实施次数设为两次以上。并且,上述例子中,在分割处理之前实施了过滤器部中的浓缩处理和新培养基的供给,但也可以在分割处理之后实施过滤器部中的浓缩处理和新培养基的供给。

[0214] <冷冻处理>

[0215] 以下,对由第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B进行的冷冻处理进行说明。另外,在以下说明中适当省略与第1实施方式所涉及的冷冻处理重复的事项。图18是表示细胞培养装置10B实施冷冻处理时的细胞和培养基等的流动的图,对应于第1实施方式所涉及的图6。另外,在图18中示出细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0216] 在步骤S41中,细胞和已使用的培养基从培养容器20被输送至储存容器30内。在步骤S42中,开闭阀51和开闭阀52设为打开状态,泵P10被驱动。由此,包含储存在储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物流入过滤器部60内。过滤器部60进行从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基的浓缩处理。已使用的培养基被回收到废液回收容器16内,已实施浓缩处理的细胞被回收到储存容器30内。

[0217] 在步骤S43中,容纳于冷冻液容纳部131的冷冻液经由流路F3和循环流路F1流入储存容器30内,从而与储存在储存容器30内的细胞汇合。冷冻液通过搅拌部51和搅拌部52,从而被搅拌。

[0218] 在步骤S44中,储存在储存容器30的细胞和冷冻液经由搅拌部50和流路F5容纳于冷冻部17的保存容器17a内。细胞和冷冻液通过搅拌部50,从而被搅拌而混合。冷冻部17使容纳于保存容器17a内的细胞与冷冻液一同冷冻。

[0219] 另外,上述例子中,将过滤器部60中的浓缩处理仅设为一次,但也可以根据需要,

通过使包含细胞和已使用的培养基的混合物在储存容器30与过滤器部60之间反复循环,将浓缩处理的实施次数设为两次以上。

[0220] 如上所述,在第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B中,使包含细胞和培养基等的混合物通过过滤器部60,从而进行浓缩处理。因此,将不需要使细胞在储存容器30内沉降的沉降处理。因此,与第1实施方式所涉及的细胞培养装置10和第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A相比,能够提高浓缩处理的效率。

[0221] [第4实施方式]

[0222] 图19是表示本发明的第4实施方式所涉及的细胞培养装置10C的结构图。细胞培养装置10C具有在第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B的基础上附加第2储存容器35以及第2过滤器部61的结构。并且,第2过滤器部61上连接有废液回收容器19。另外,细胞培养装置10C中的第1储存容器和第1过滤器部60相当于第3实施方式所涉及的储存容器30和过滤器部60。

[0223] 第2储存容器35具有与第1储存容器30相同的结构,且具有流入口36以及流出口37。第2储存容器35的流入口36经由在连接部位X7与循环流路F1连接的管道g1而与第1储存容器30的流入口31连接。流路F7为连接第2储存容器35的流入口36和流出口37的流路,其包含管道h1和管道h2而构成。

[0224] 第2过滤器部61设置在流路F7内(即,流路F7的中途)。第2过滤器部61与第1过滤器部60相同地具有进行浓缩处理的功能,所述浓缩处理中,自包含从第2储存容器35供给的细胞和伴随细胞的培养基等液体的混合物中去除上述液体。第2过滤器部61也可以与第1过滤器部60相同地具有切向流过滤器的结构。从第2过滤器部61排出的培养基等废液被回收至废液回收容器19。

[0225] 在构成流路F7的管道h1上,在连接部位X7的附近设有开闭阀V61。并且,在构成流路F7的管道h2上,在第2储存容器35的流出口37的附近设有开闭阀V62。

[0226] 并且,本实施方式所涉及的细胞培养装置10C中,作为从第1储存容器30和第1过滤器部60输送包含细胞和培养基等的混合物的构件,不使用泵而使用第1储存容器30所具备的压力调整机构33。同样地,作为从第2储存容器35和第2过滤器部61输送包含细胞和培养基等的混合物的构件,不使用泵而使用第2储存容器35所具备的压力调整机构38。

[0227] 另外,第1储存容器30为本发明中的第1储存容器的一例。第2储存容器35为本发明中的第2储存容器的一例。第2储存容器35的流入口36为本发明中的第3流入口的一例。第2储存容器35的流出口37为本发明中的第3流出口的一例。第2过滤器部61为本发明中的第2过滤器部的一例。流路F7为本发明中的第4流路的一例。压力调整机构33为本发明中的第1储存容器所具有的第1压力调整机构的一例。压力调整机构38为本发明中的第2储存容器所具有的第2压力调整机构的一例。

[0228] 本实施方式所涉及的细胞培养装置10C通过交替使用包含第1储存容器30和第1过滤器部60而构成的第1浓缩处理单元与包含第2储存容器35和第2过滤器部61而构成的第2浓缩处理单元,从而能够连续地进行浓缩处理。

[0229] 以下,对由第4实施方式所涉及的细胞培养装置10C进行的浓缩处理进行说明。以下说明中,作为一例,例示在培养基更换处理中进行的浓缩处理。图20是表示本实施方式所涉及的细胞培养装置10C实施浓缩处理时的细胞和培养基的流动的图。另外,在图20中示出

细胞和培养基等的流动与以下所示的各处理步骤之间的对应关系。

[0230] 在步骤S51中,细胞和已使用的培养基从培养容器20被输送至第1储存容器30内。在步骤S52中,开闭阀51和开闭阀52设为打开状态。并且,第1储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被加压。另一方面,第2储存容器35内的气氛通过压力调整机构38被释放到大气中。由此,第1储存容器30内的气压上升,包含储存在第1储存容器30内的细胞和已使用的培养基的混合物流入第1过滤器部60内。通过由第1过滤器部60进行的浓缩处理,从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除一部分已使用的培养基,从而回收到废液回收容器16内。之后,包含细胞和残留的已使用的培养基的混合物经由管道g1流入第2储存容器35内。

[0231] 在步骤S53中,开闭阀V61和开闭阀V62设为打开状态。并且,第2储存容器35内的气氛通过压力调整机构38被加压。另一方面,第1储存容器30内的气氛通过压力调整机构33被开放到大气压中。由此,第2储存容器35内的气压上升,包含储存在第2储存容器35内的细胞和已使用的培养基的混合物流入第2过滤器部61内。通过由第2过滤器部61进行的浓缩处理,从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除一部分已使用的培养基,从而回收到废液回收容器19内。之后,包含细胞和残留的已使用的培养基的混合物经由管道g1流入第1储存容器30内。

[0232] 之后,根据需要反复实施步骤S52和步骤S53的处理。由此,从包含细胞和已使用的培养基的混合物中去除已使用的培养基。已实施浓缩处理的细胞在步骤S54中被存储在第1储存容器30内。

[0233] 以上说明中例示了在培养基更换处理中进行的浓缩处理,但上述浓缩处理也能够适用于在传代处理、分割处理以及冷冻处理中进行的浓缩处理。

[0234] 根据第4实施方式所涉及的细胞培养装置10C,浓缩处理在第1过滤器部60和第2过滤器部61中进行,因此将不需要使细胞在储存容器内沉降的沉降处理。并且,根据细胞培养装置10C,通过交替使用第1浓缩处理单元与第2浓缩处理单元来进行浓缩处理,因此,能够通过基于压力调整机构33和压力调整机构38的压力输送来在第1浓缩处理单元与第2处理单元之间输送细胞和培养基等。因此,无需使用润湿泵便能够进行浓缩处理,与使用润湿泵的情况相比,能够减少对细胞的损坏。另外,本实施方式中例示了交替使用第1浓缩处理单元与第2浓缩处理单元的情况,但也可以同时使用第1浓缩处理单元与第2浓缩处理单元。即,该情况下,在第1浓缩处理单元与第2浓缩处理单元中并行进行浓缩处理。

[0235] [第1变形例]

[0236] 能够对上述第1~第4实施方式所涉及的细胞培养装置的结构进行各种变形。

[0237] 图21是表示第1变形例所涉及的细胞培养装置10D的结构的图。细胞培养装置10D具有泵P20作为从培养容器20向储存容器30输送细胞和培养基的构件。

[0238] 例如,当培养容器20具有塑料制的袋形态的情况下,由于容器主体的耐压性能,可能难以通过压力调整机构26对培养容器20的内部气氛进行加压。泵P20能够适用于这种难以对培养容器20的内部气氛进行加压的情况。

[0239] 如图21所示,泵P20优选配置在循环流路F1内的培养容器20的流出口22与连接部位X2之间。认为细胞因分割处理部40中的分割处理而受到损坏。并且,若在紧接分割处理之后给细胞带来进一步的损坏,则细胞的存活率可能会降低。即,分割处理后的细胞经由泵而其损坏被累积,细胞的存活率可能会降低。根据本变形例所涉及的细胞培养装置10D,泵P20

配置在培养容器20的流出口22与连接部位X2之间,因此在分割处理部40内已实施分割处理的细胞无需经由泵而容纳于培养容器20内。

[0240] 另外,在图21中示出将泵P20适用于第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A的情况,但也能够适用于第1、第3以及第4实施方式所涉及的细胞培养装置10、10B以及10D中。

[0241] [第2变形例]

[0242] 图22是表示第2变形例所涉及的细胞培养装置10E的结构的图。细胞培养装置10E具有将第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B中的过滤器部60替换为离心沉降部70的结构。

[0243] 离心沉降部70与过滤器部60相同地具有进行浓缩处理的功能,所述浓缩处理中,从包含细胞和已使用的培养基等液体的混合物中去除液体。离心沉降部70利用细胞与培养基等液体之间的比重差而使细胞与培养基等液体离心分离,并将培养基等液体排出至废液回收容器16。

[0244] 另外,也可以设为一并设置离心沉降部70和过滤器部60,并能够选择性地使用它们的结构。并且,也可以将第4实施方式所涉及的细胞培养装置10C中的第1过滤器部60和第2过滤器部61分别替换为离心沉降部70。

[0245] [第3变形例]

[0246] 图23是表示第3变形例所涉及的细胞培养装置10F的结构的图。细胞培养装置10F中,构成循环流路F1和流路F2的各管道的结构与上述第1~第4实施方式所涉及的细胞培养装置10、10A~10C不同。

[0247] 在细胞培养装置10F中,连接培养容器20的流入口21和流出口22的循环流路F1包含管道a1~a7以及管道b5而构成。培养容器20、储存容器30以及搅拌部50设置在循环流路F1内。

[0248] 流路F2包含连接连接部位X11和连接部位X12的管道b3~b6而构成,所述连接部位X11位于循环流路F1内的储存容器30的流出口32与培养容器20的流入口21之间,所述连接部位X12位于循环流路F1内的储存容器30的流入口31与培养容器20的流出口22之间。流经循环流路F1内的细胞和培养基等能够经由连接部位X11流入流路F2内。并且,流经流路F2内的细胞和培养基等能够经由连接部位X12流入循环流路F1内。分割处理部40设置在流路F2内。

[0249] 另外,循环流路F1为本发明中的第1流路的一例。流路F2为本发明中的第2流路的一例。连接部位X11为本发明中的第1部位的一例。连接部位X12为本发明中的第2部位的一例。

[0250] 根据细胞培养装置10F,能够进行与上述第1实施方式所涉及的细胞培养装置10和第2实施方式所涉及的细胞培养装置10A相同的传代处理、培养基更换处理、分割处理以及冷冻处理。也能够将细胞培养装置10F中的管道结构适用于第3实施方式所涉及的细胞培养装置10B和第4实施方式所涉及的细胞培养装置10C中。

[0251] 另外,于2015年1月20日申请的日本专利申请2015-008718的公开,其全部内容通过参照并入本说明书中。并且,本说明书中所记载的所有文献、专利申请以及技术标准,以与具体且个别记载有通过参照并入个别的文献、专利申请以及技术标准的情况相同程度地,通过参照并入本说明书中。

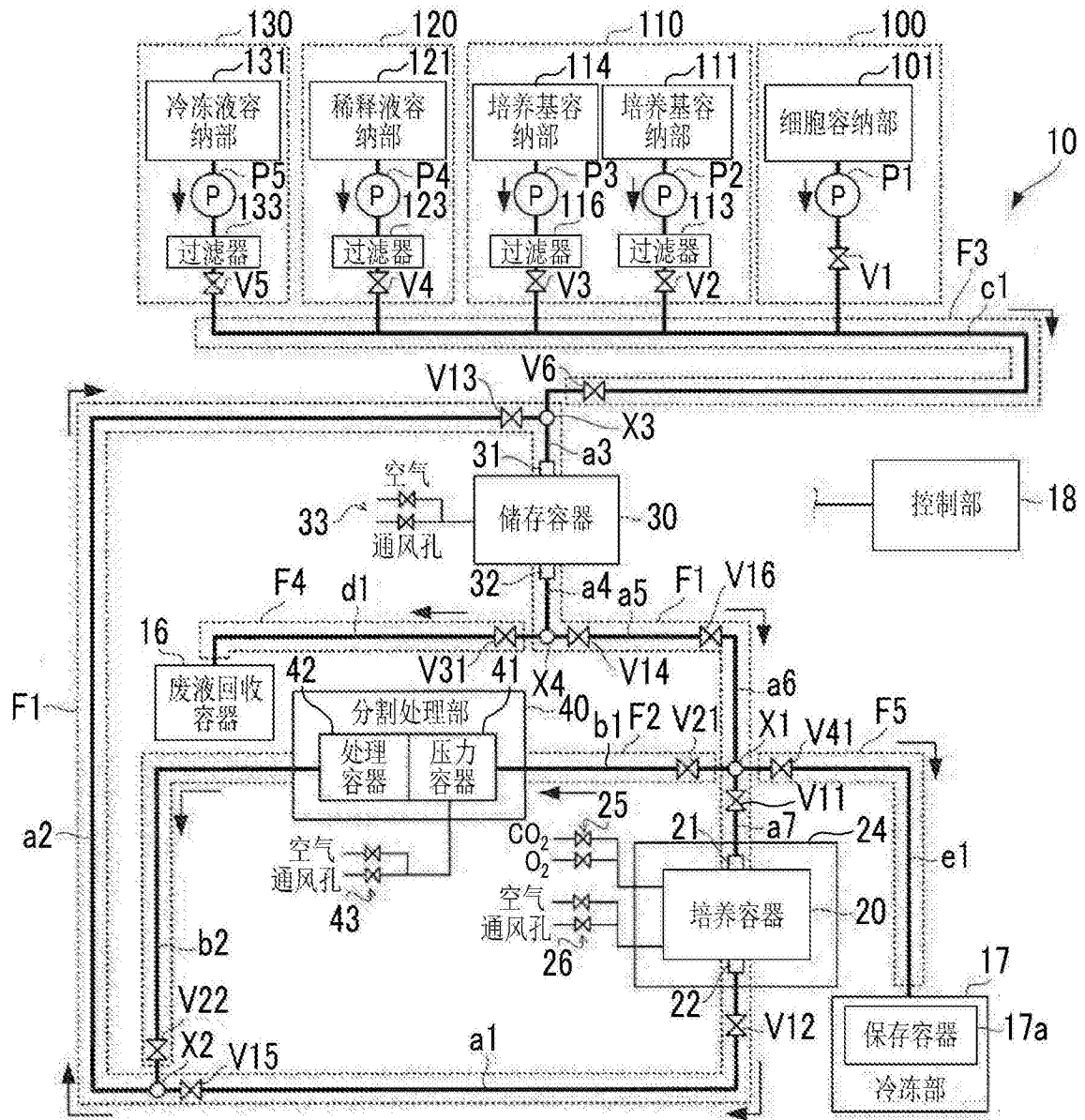


图1

传代处理

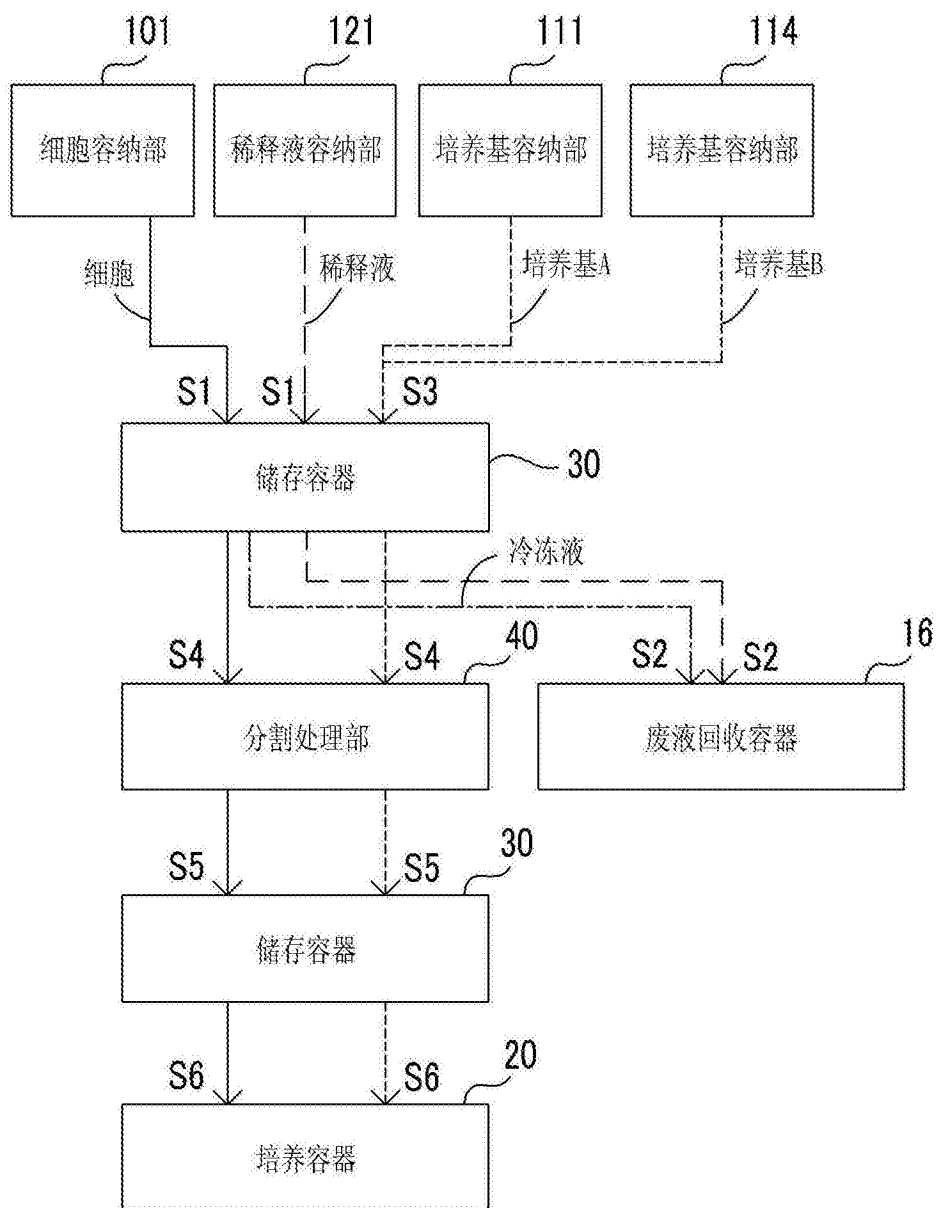


图2

培养基更换处理

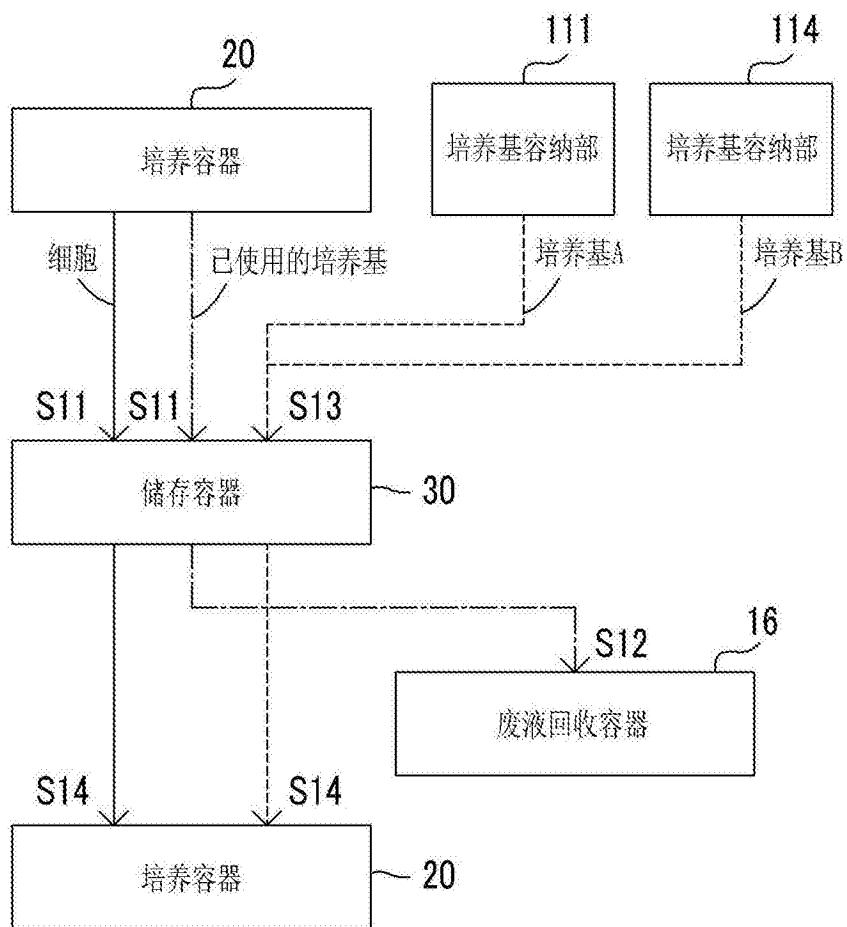


图3

分割处理

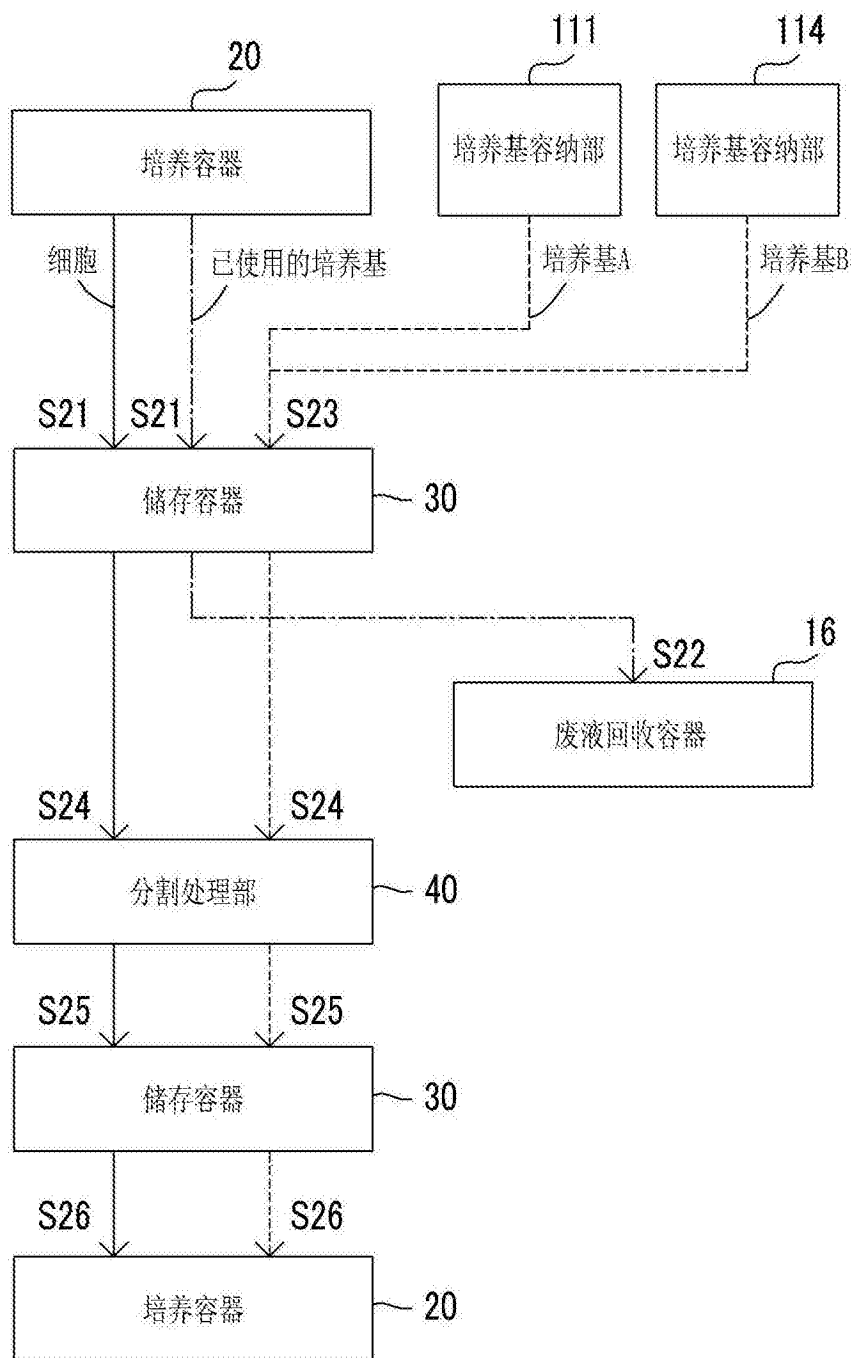


图4

分割处理

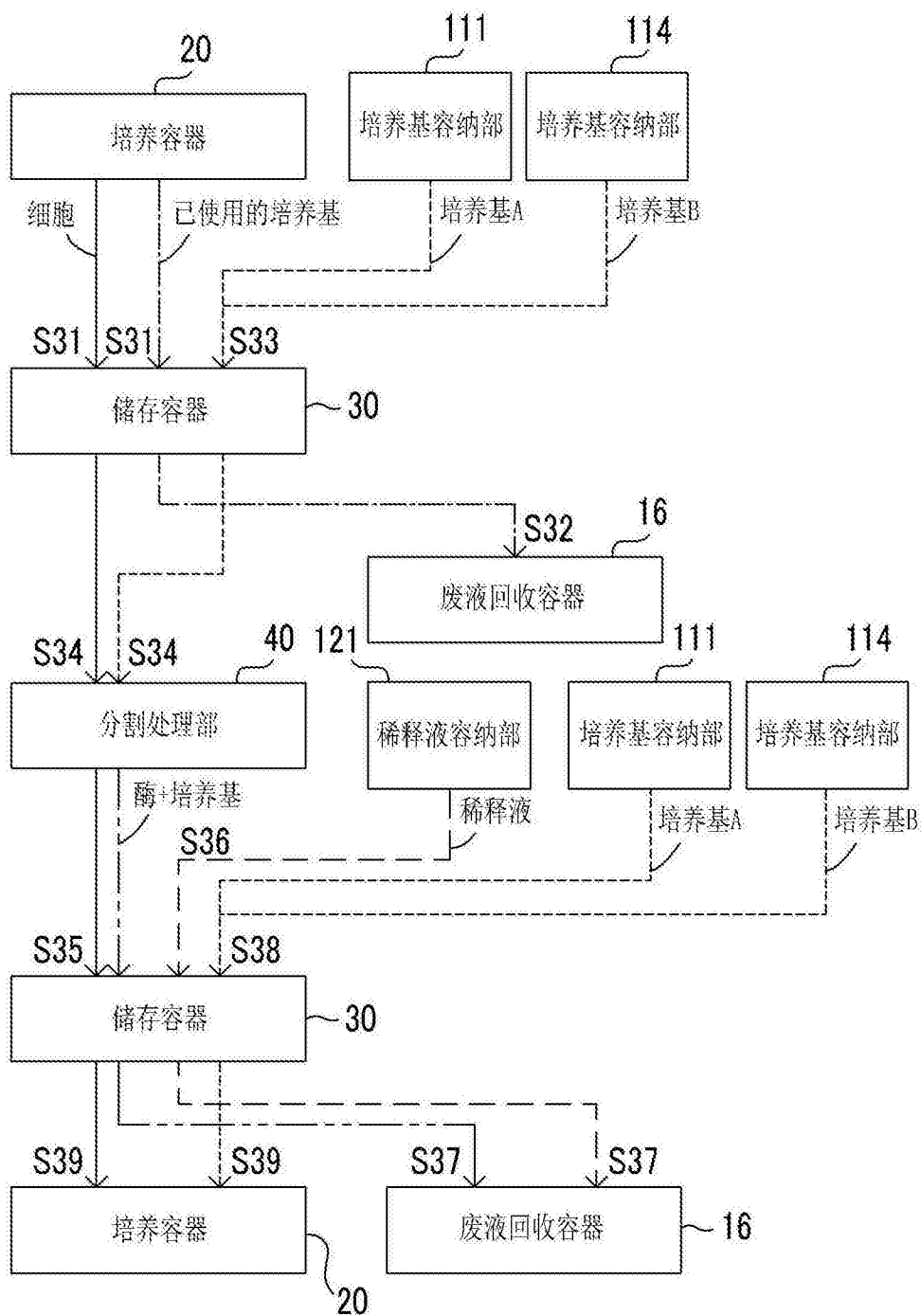


图5

冷冻处理

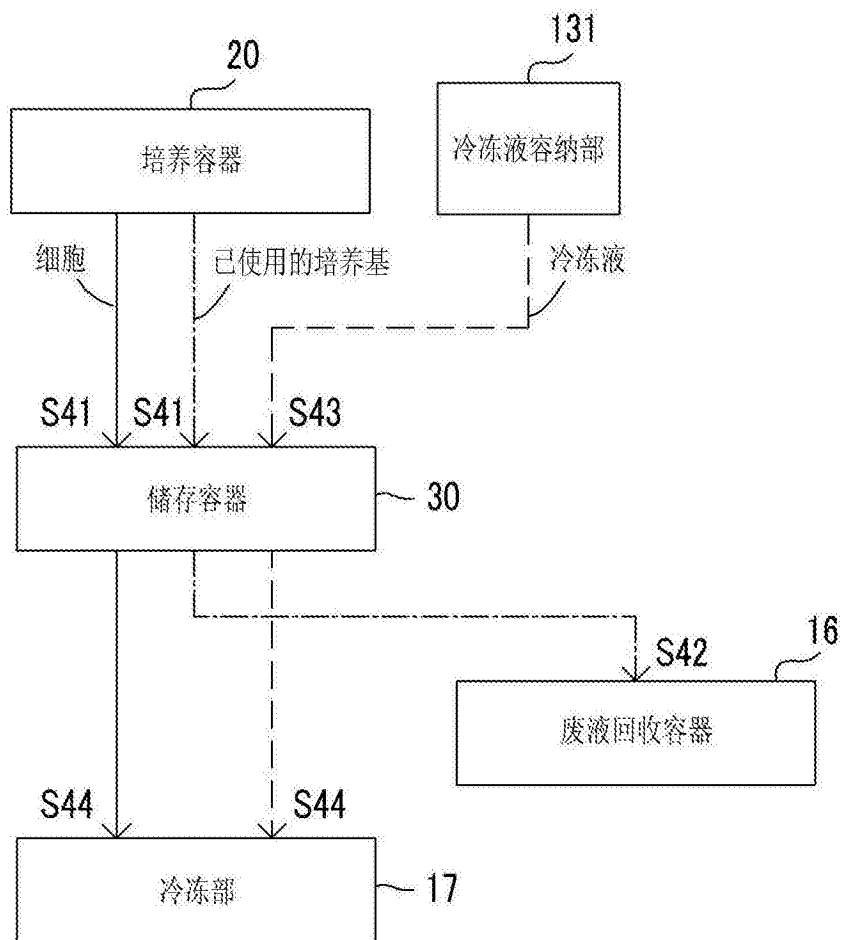


图6

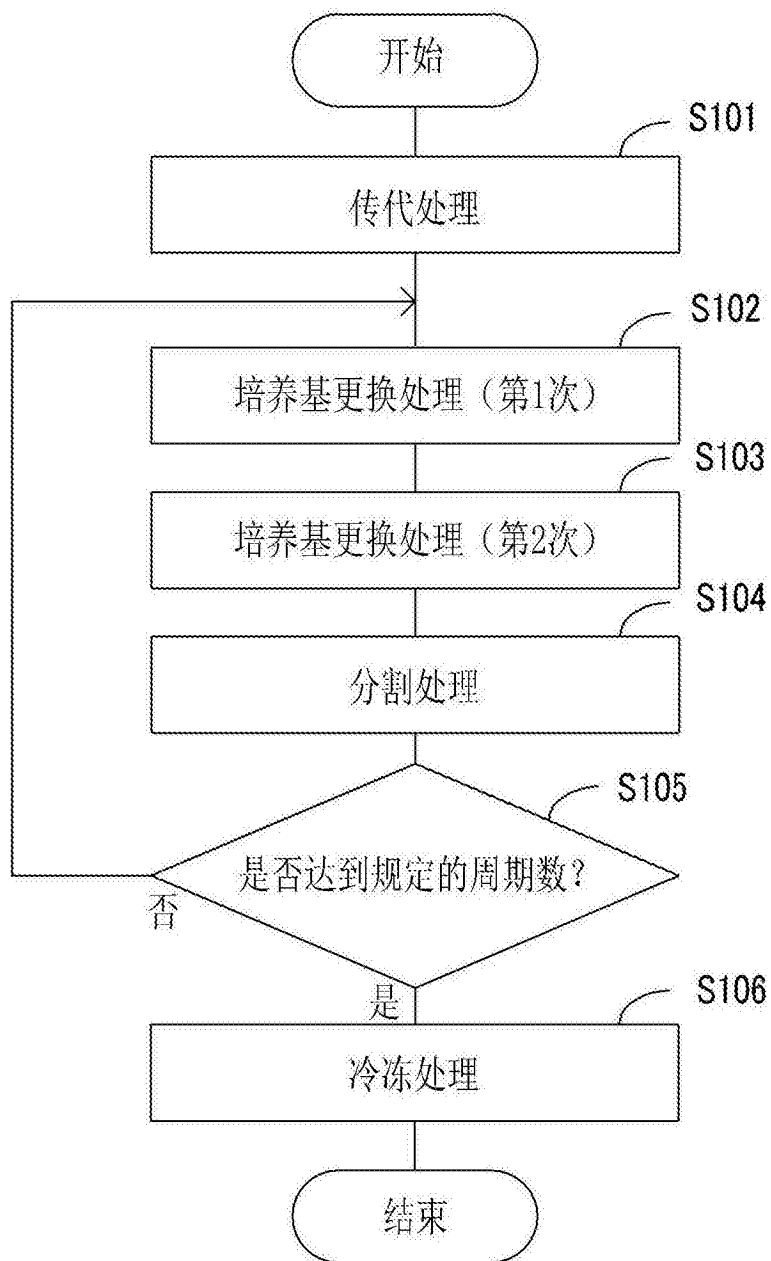


图7

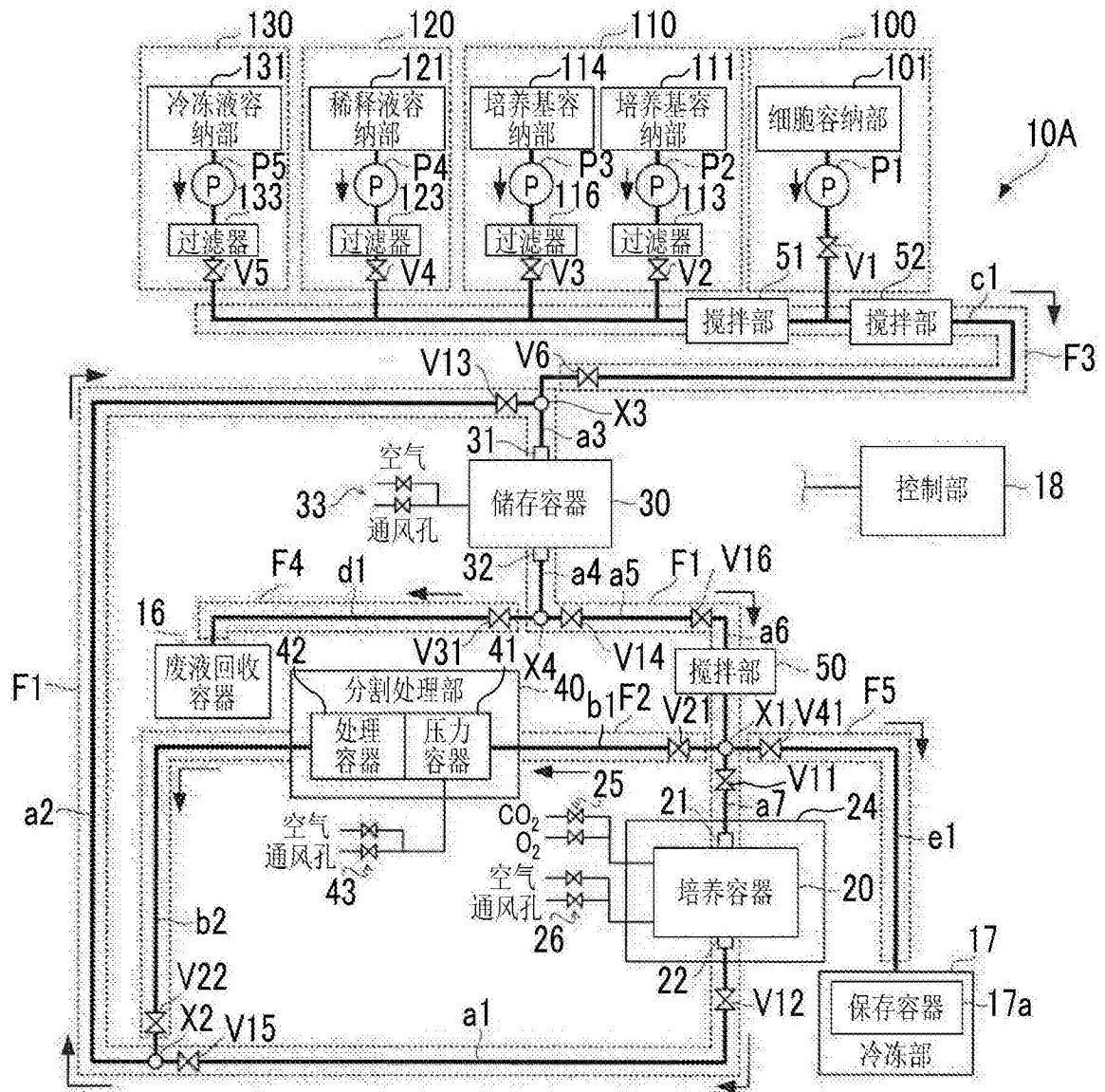


图8

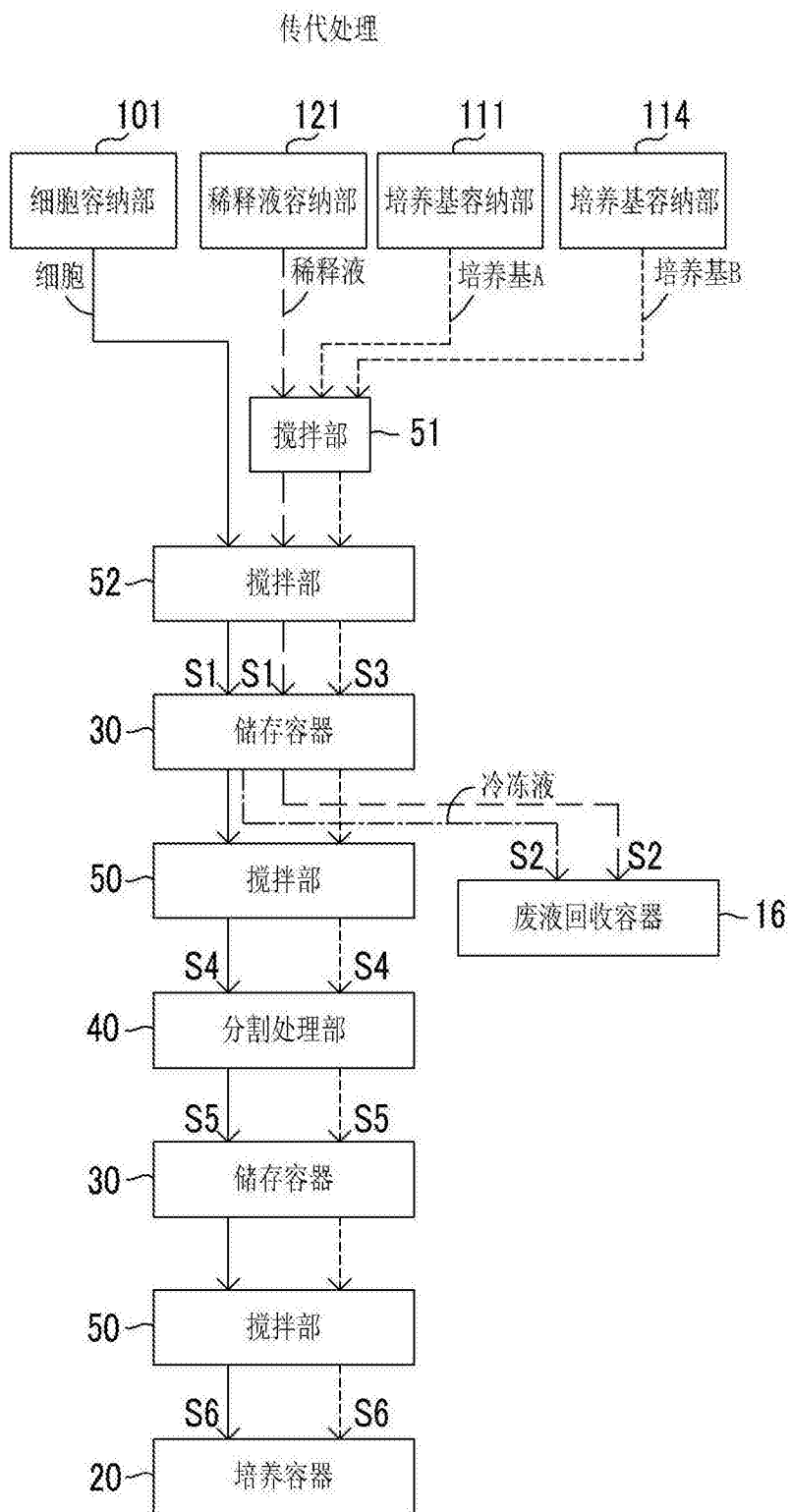


图9

培养基更换处理

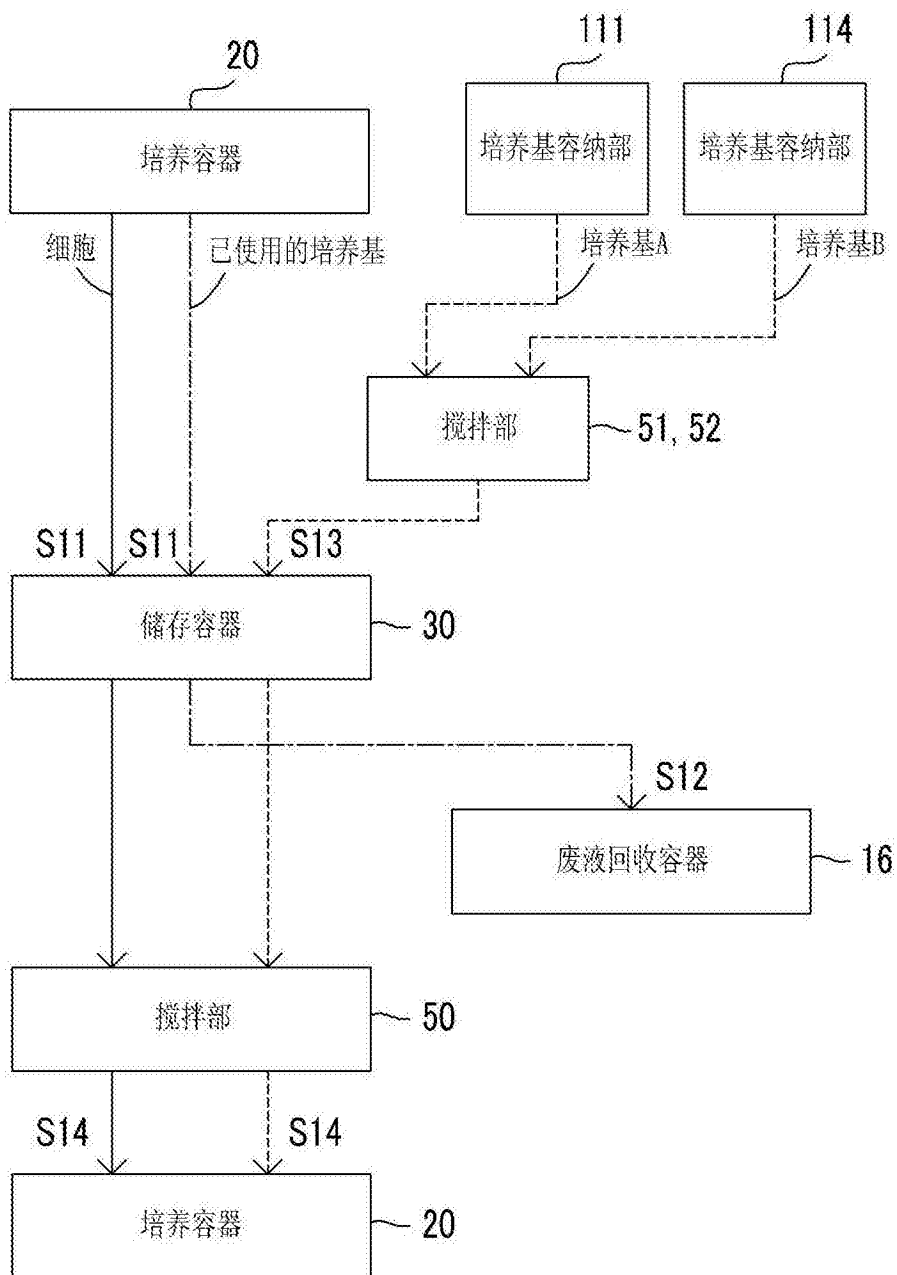


图10

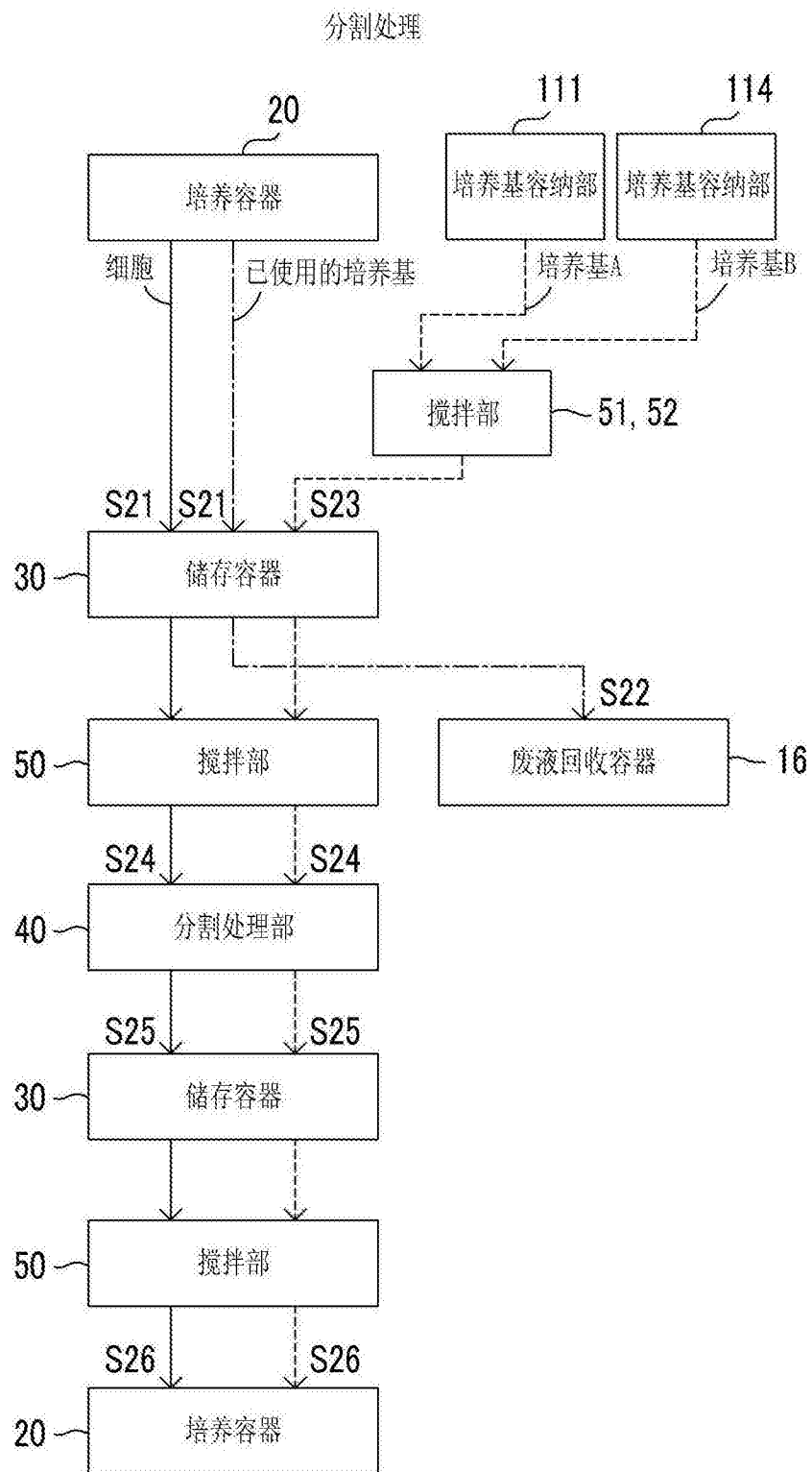


图11

冷冻处理

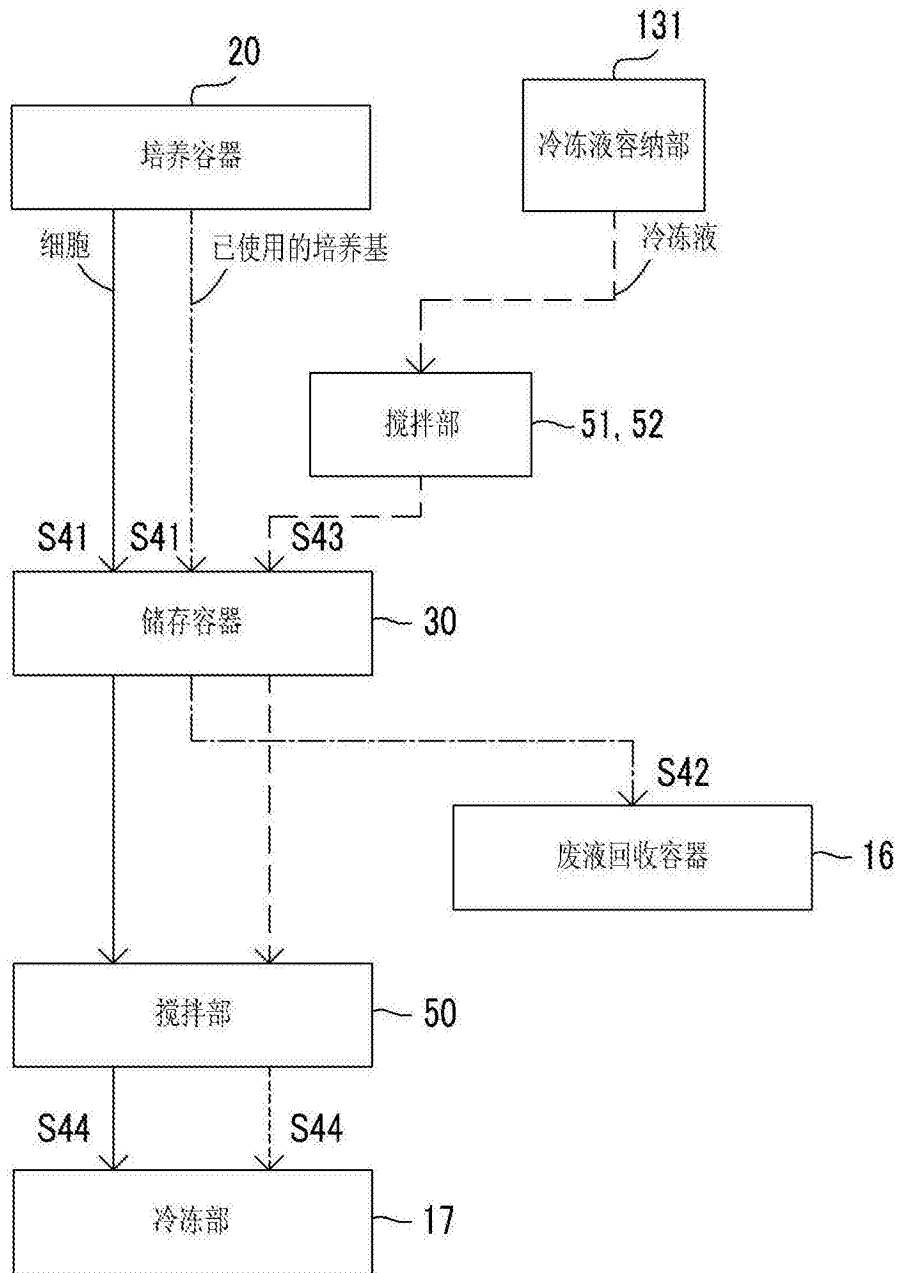


图12

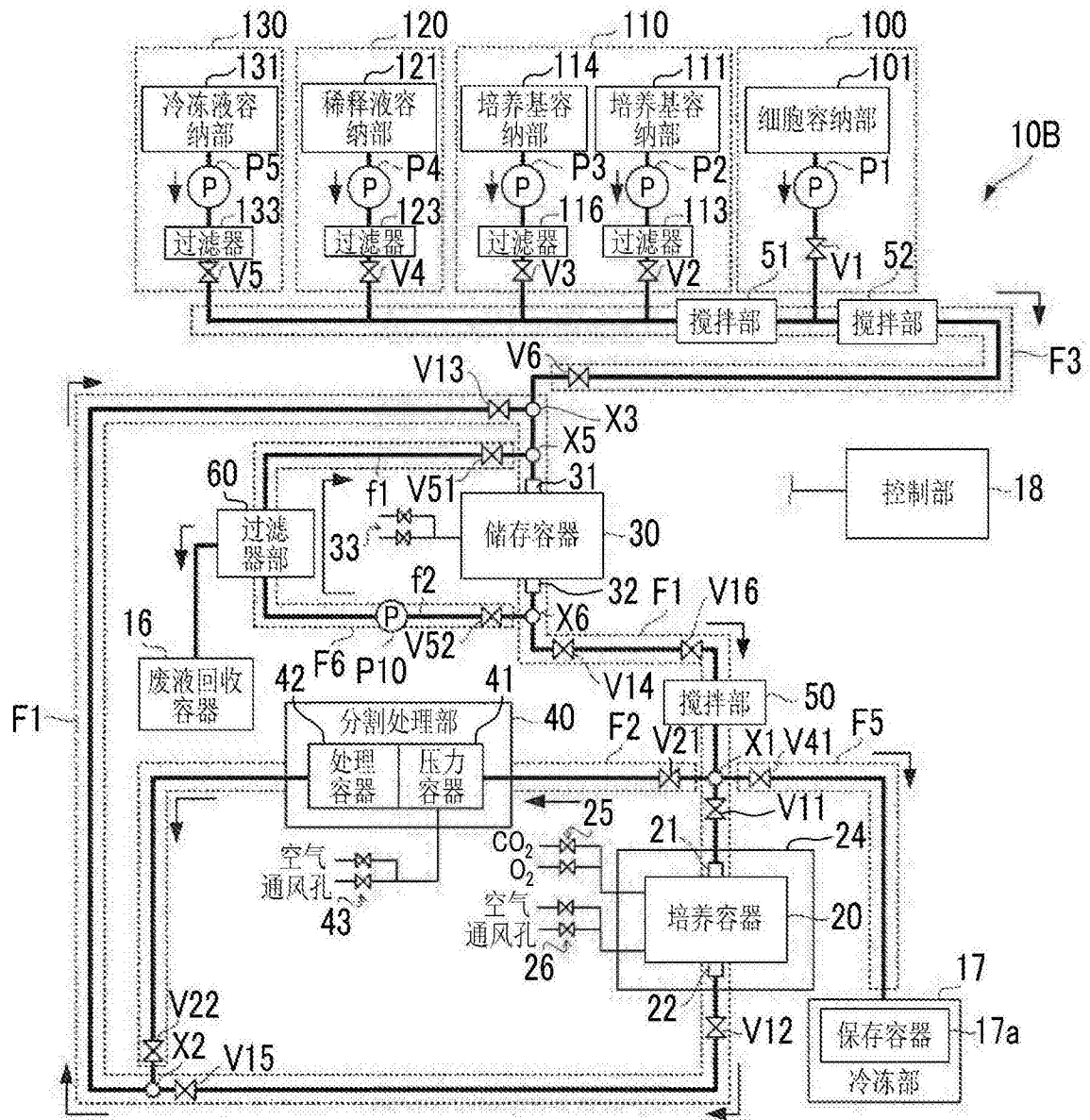


图13

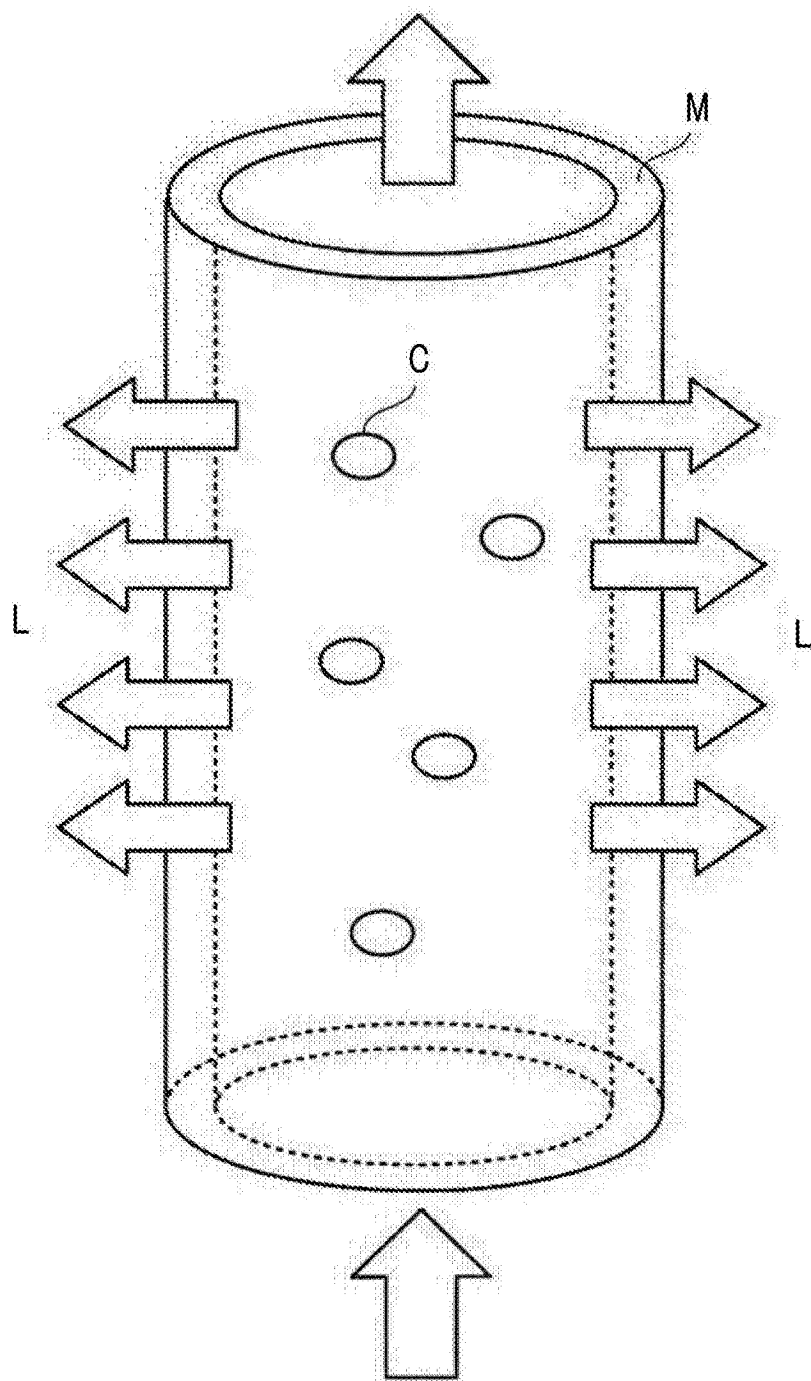


图14

传代处理

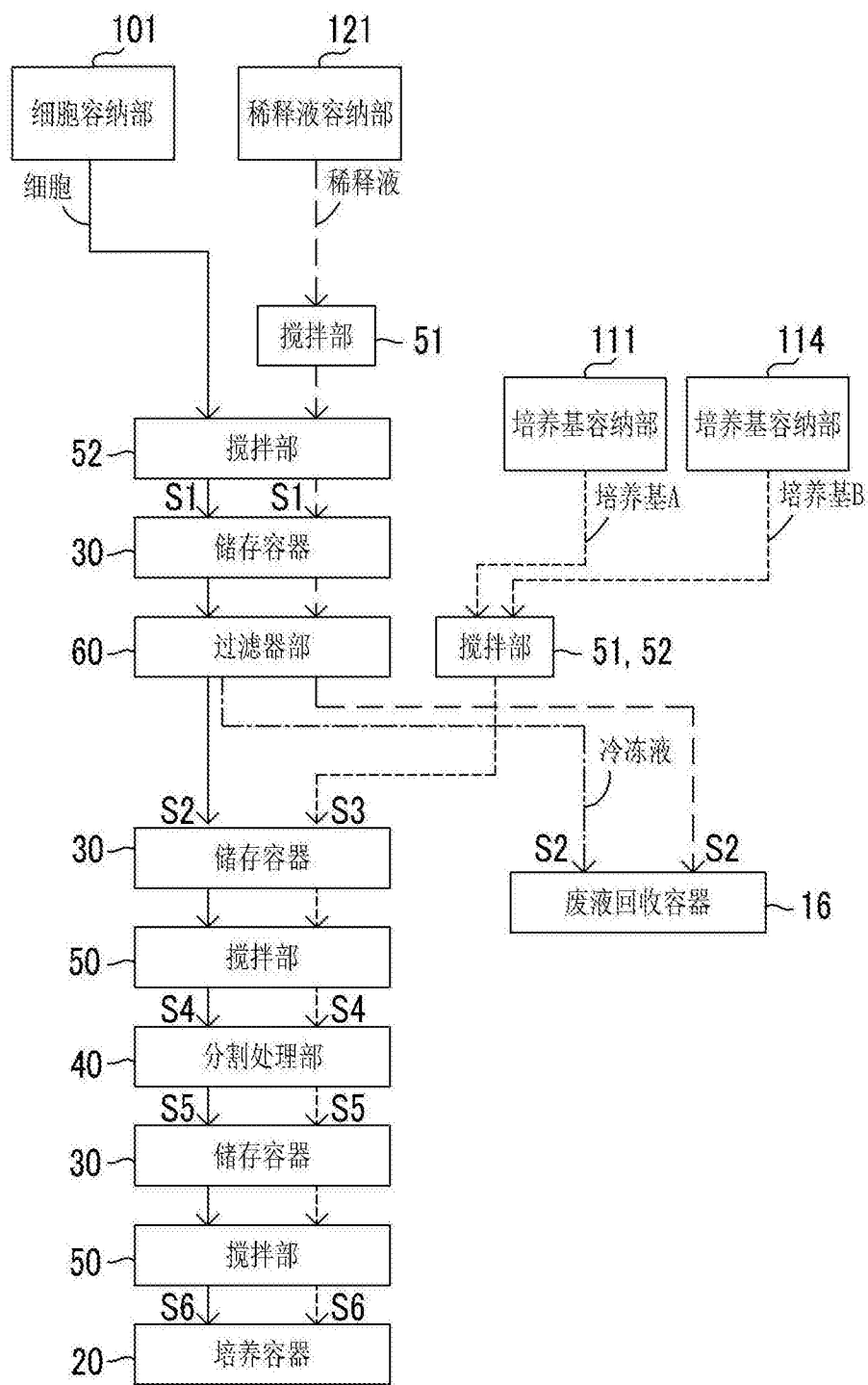


图15

培养基更换处理

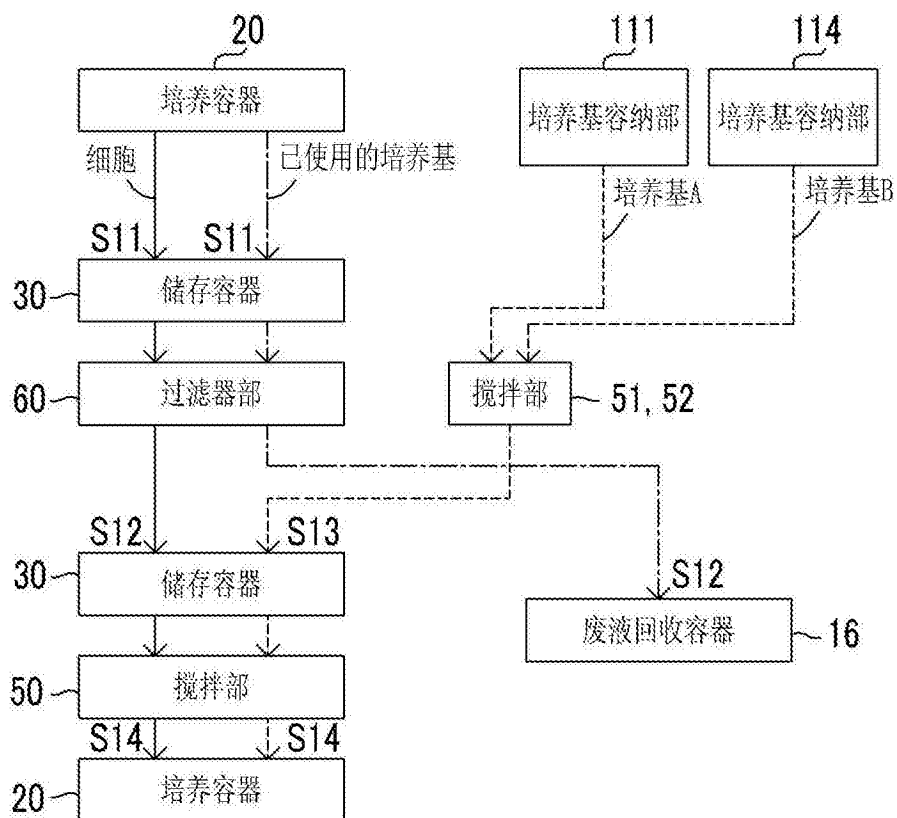


图16

分割处理

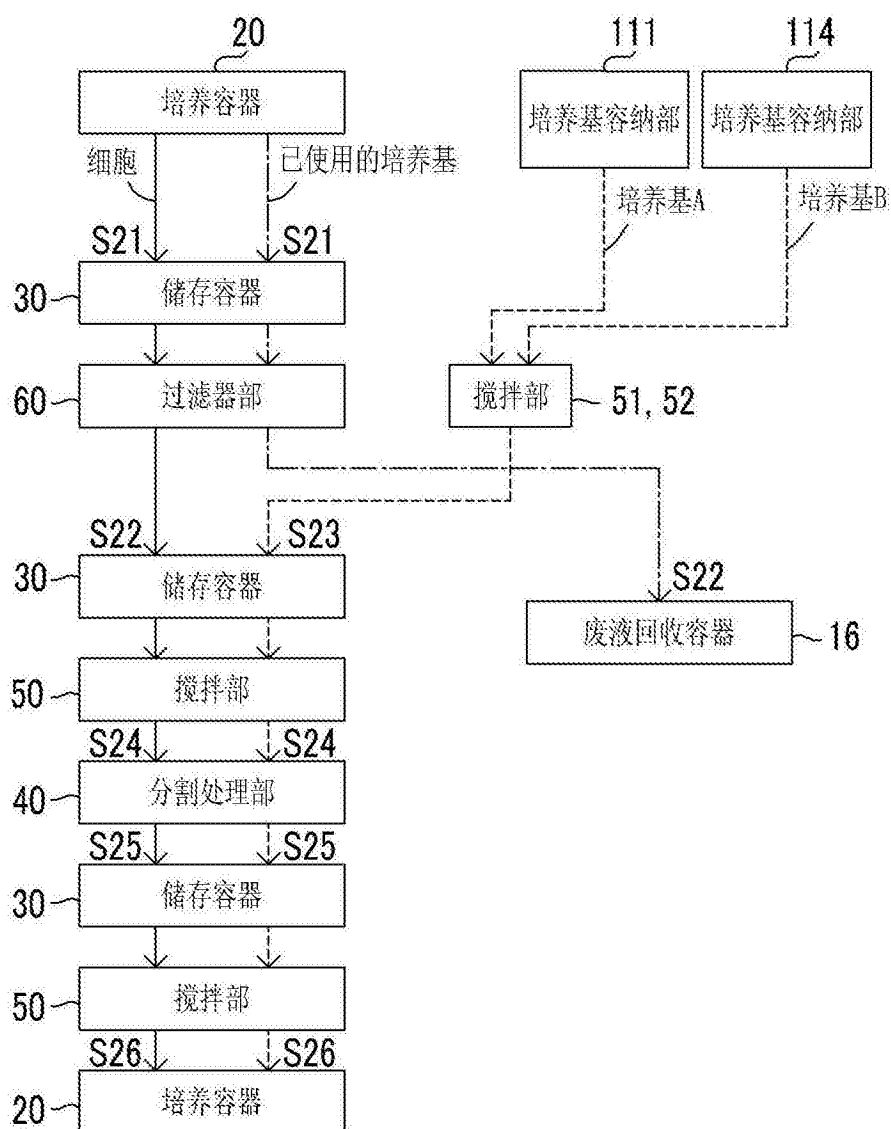


图17

冷冻处理

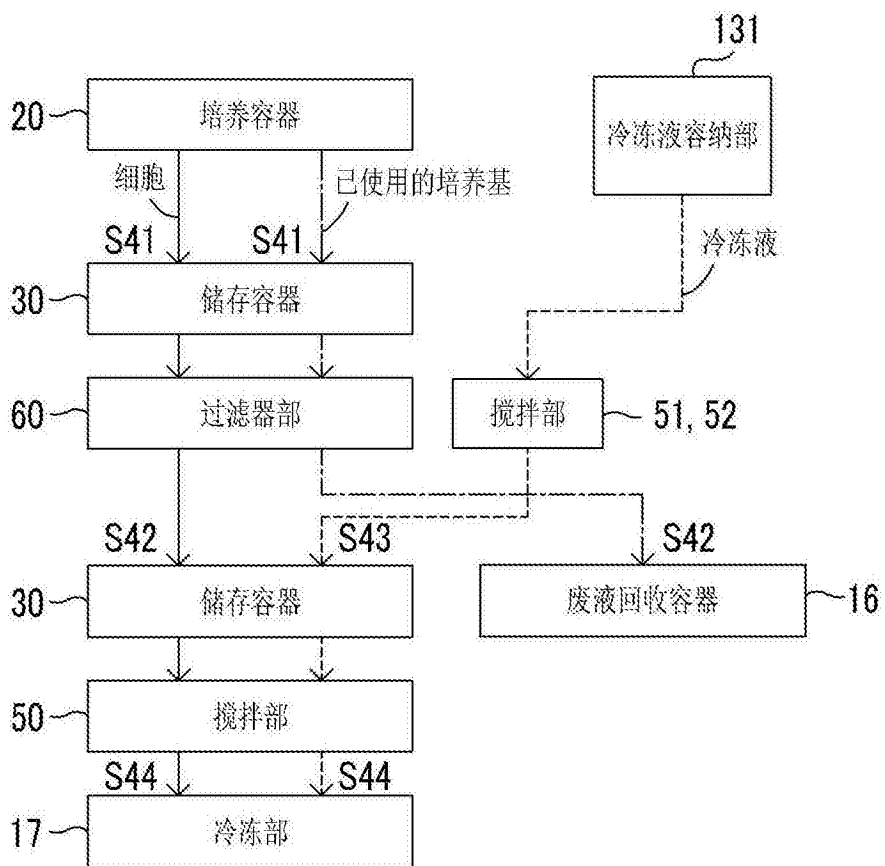


图18

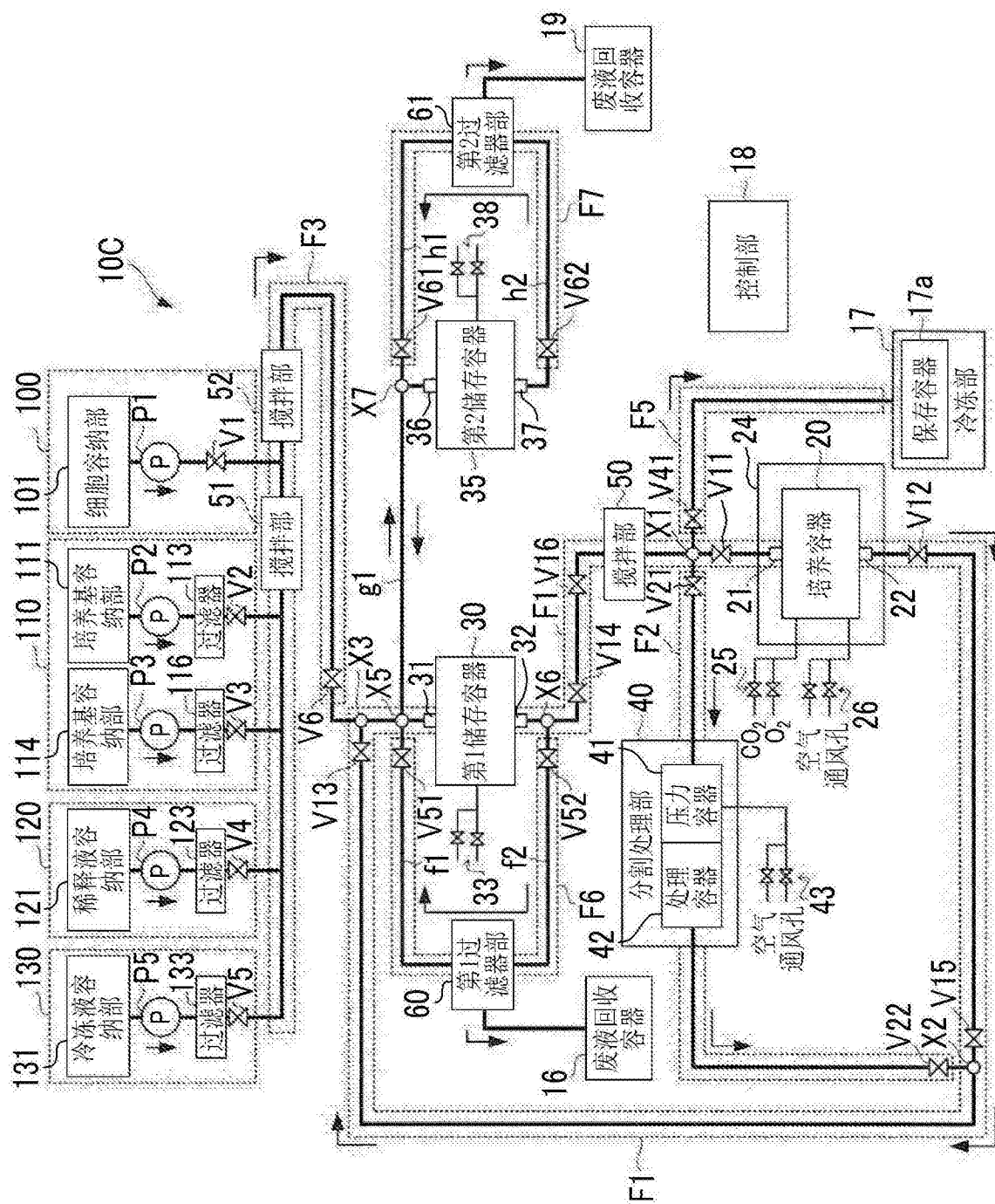


图19

浓缩处理

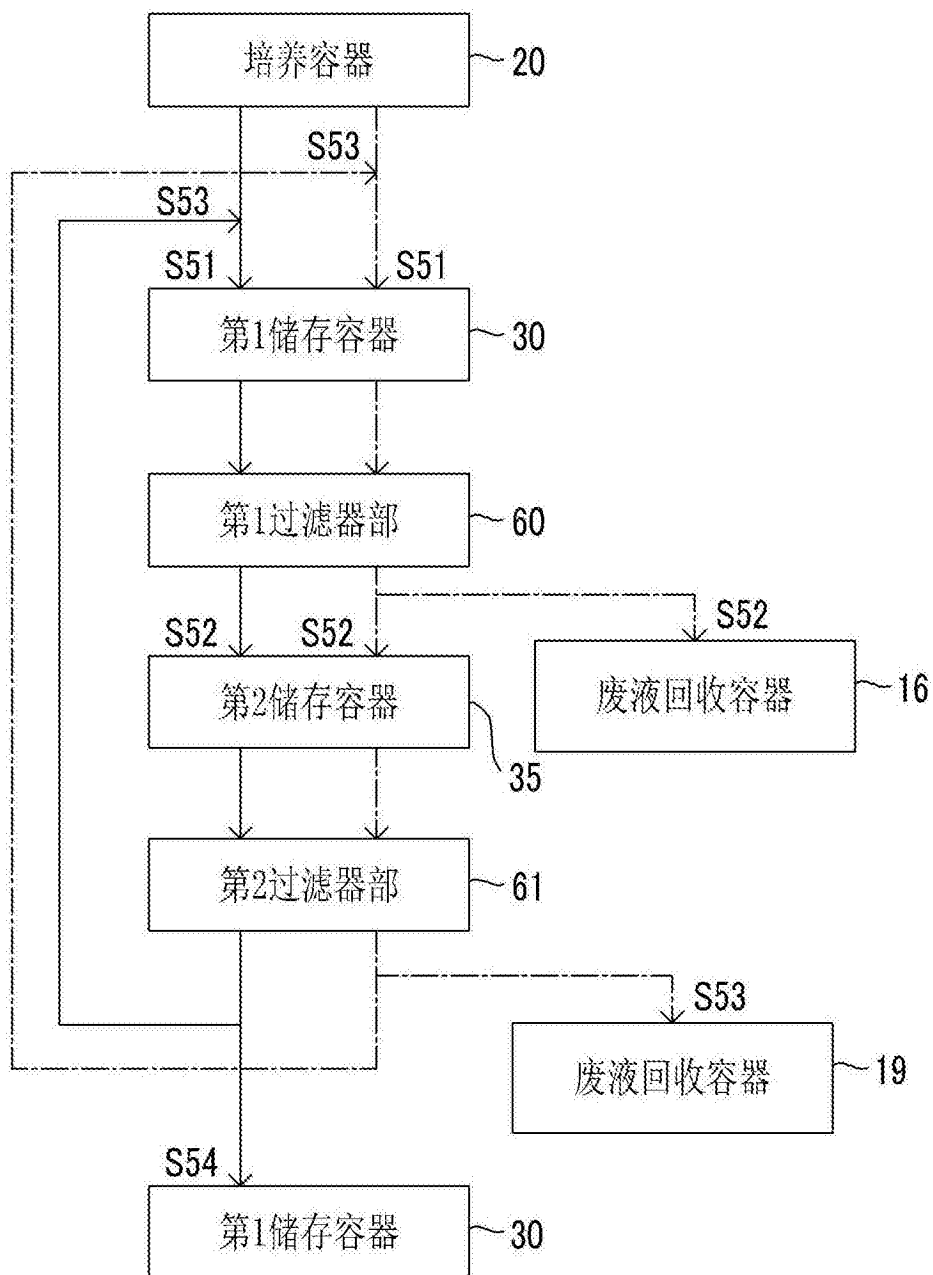
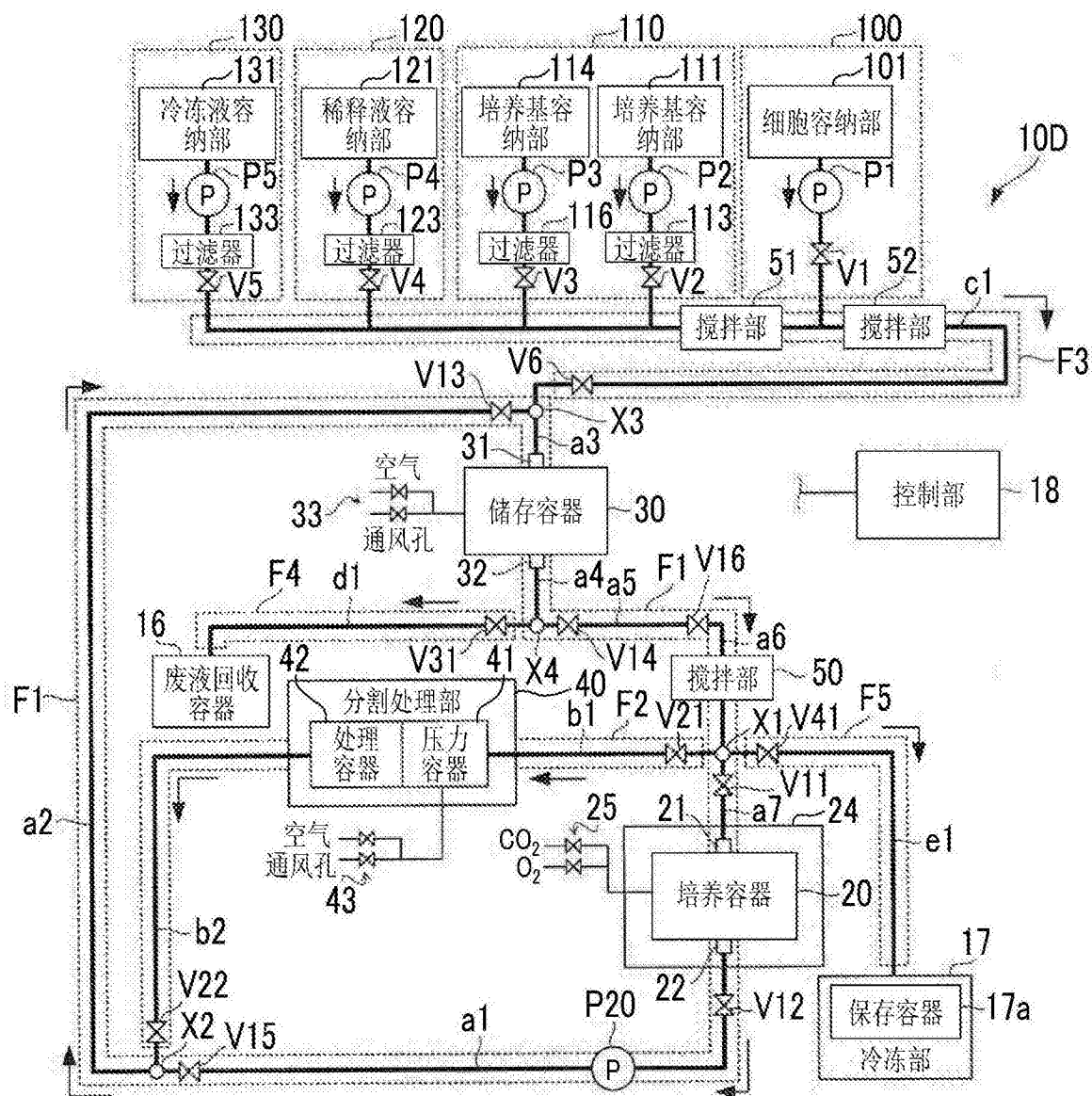


图20



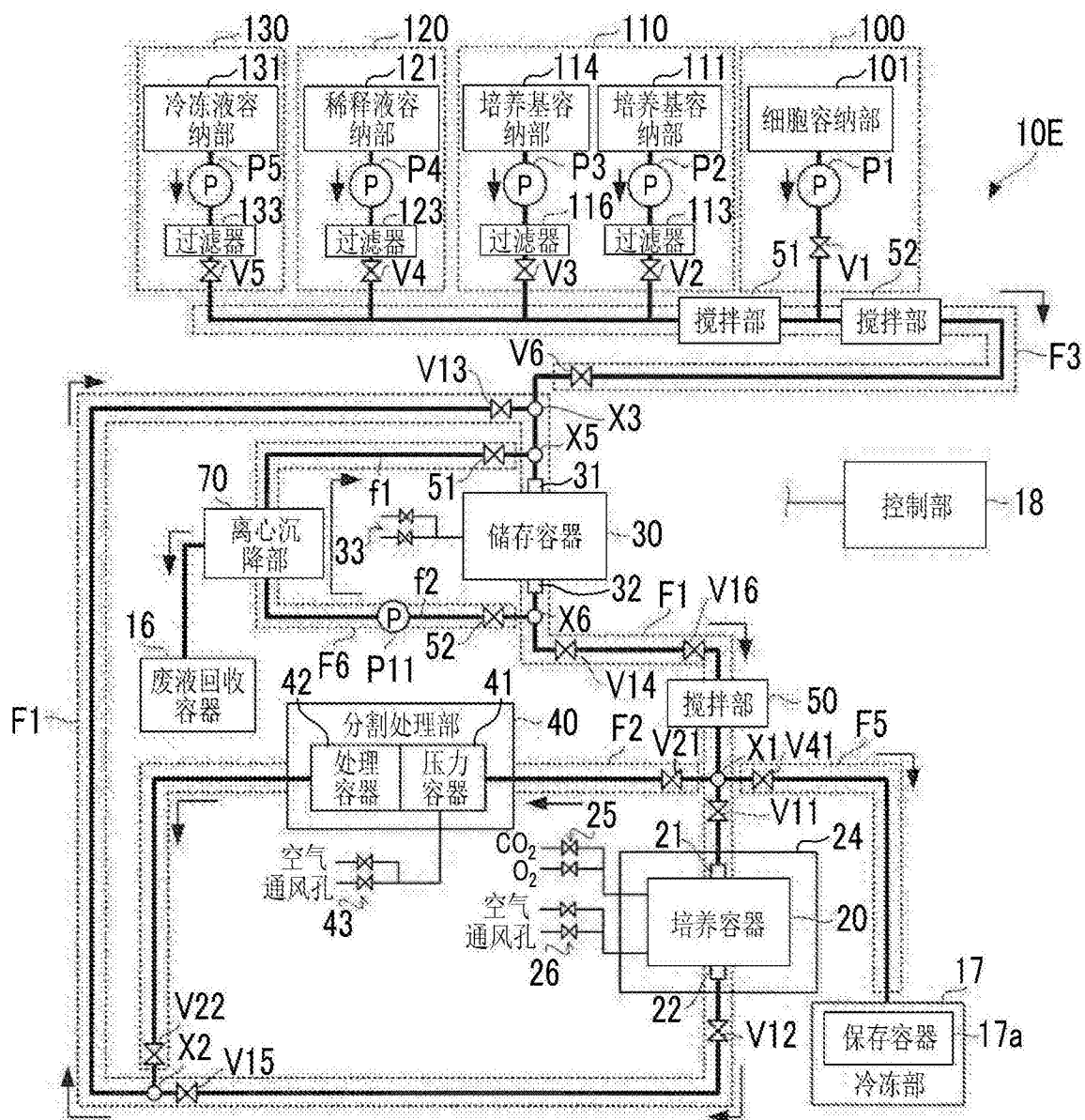


图22

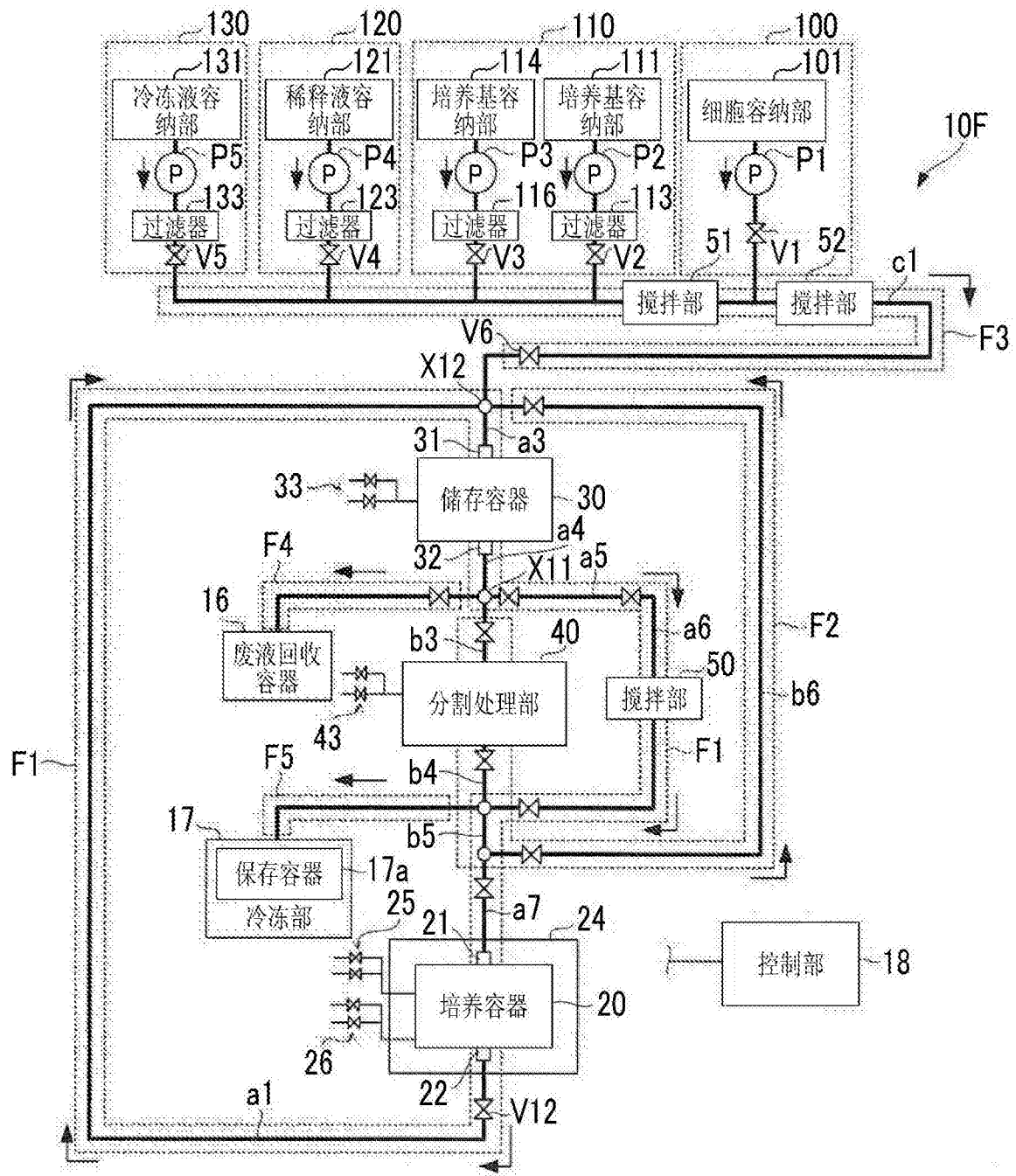


图23