

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-45

(P2019-45A)

(43) 公開日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 Z	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-118066 (P2017-118066)	(71) 出願人	000003768
(22) 出願日	平成29年6月15日 (2017. 6. 15)		東洋製罐グループホールディングス株式会社
			東京都品川区東五反田2丁目18番1号
		(74) 代理人	110002354
			特許業務法人平和国際特許事務所
		(72) 発明者	末永 亮
			神奈川県横浜市保土ケ谷区岡沢町22番地
			4 東洋製罐グループホールディングス株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	光石 真稀
			神奈川県横浜市保土ケ谷区岡沢町22番地
			4 東洋製罐グループホールディングス株式会社総合研究所内
		最終頁に続く	

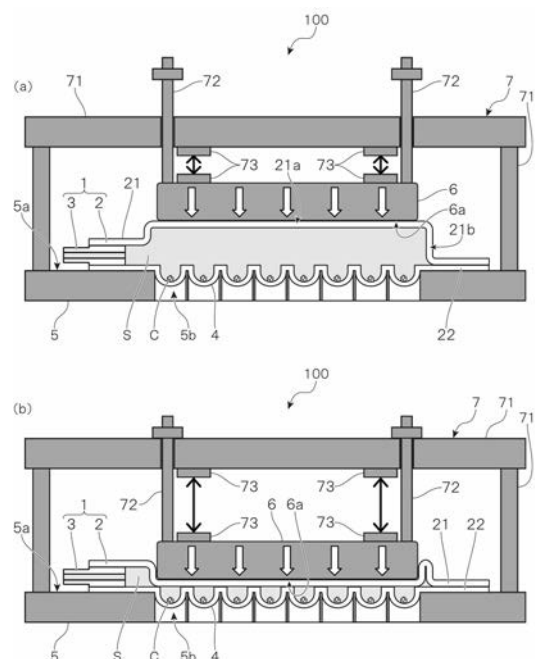
(54) 【発明の名称】細胞培養方法及び装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数の凹部が形成された細胞培養バッグを使用して細胞培養を行うにあたり、培地交換時に、細胞の流動防止を図りつつ、培地の交換効率を向上させることによって、効率良く細胞を培養・分化誘導する、細胞培養方法の提供。

【解決手段】周辺部をシールした上面フィルム21及び下面フィルム22から構成されたバッグ本体2と、バッグ本体2に取り付けられたポート3とを備えた細胞培養バッグ1を使用する細胞培養方法であって、細胞培養バッグ1を架台5の載置面5aに載置し、ポート3から培地Sの注入又は排出を行う間、載置面5aと実質的に平行な底面6aを有する押圧部材6で、上面フィルム21を上から押圧する細胞培養方法。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

周辺部をシールした上面及び下面フィルムから構成されたバッグ本体と、前記バッグ本体に取り付けられたポートとを備え、細胞培養バッグを使用する細胞培養方法であって、前記細胞培養バッグを架台の載置面に載置し、前記ポートから培地の注入又は排出を行う間、前記載置面と実質的に平行な底面を有する押圧部材で、前記上面フィルムを上方から押圧する

ことを特徴とする、細胞培養方法。

【請求項 2】

前記細胞培養バッグの前記下面フィルムに、複数の凹部が形成され、

前記培地の排出時に、前記上面フィルムが前記複数の凹部を閉塞するまで、前記押圧部材を下降させる

ことを特徴とする、請求項 1 記載の細胞培養方法。

【請求項 3】

前記上面フィルムは、前記天面部分と、前記天面部分の周囲に形成された立ち上がり部分とから構成された膨出形状を有し、

前記押圧部材の前記底面は、前記立ち上がり部分よりも内側の範囲で前記天面部分と接触して前記上面フィルムを押圧する

ことを特徴とする、請求項 2 記載の細胞培養方法。

【請求項 4】

前記押圧部材の前記底面は、前記複数の凹部の周縁に対応する位置に、平面部を有し、かつ、前記複数の凹部に対応する位置に、前記平面部から突出した突起部を有する

ことを特徴とする、請求項 2 又は 3 記載の細胞培養方法。

【請求項 5】

前記押圧部材で前記上面フィルムを押圧しながら、前記ポートに接続した注入排出手段で前記ポートから培地を注入する

ことを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

【請求項 6】

前記ポートから前記培地を注入又は排出する際に、前記架台の前記載置面から前記押圧部材の前記底面までの高さが低いほど、前記ポートを通る前記培地の流量を小さくする

ことを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

【請求項 7】

周辺部をシールした上面及び下面フィルムから構成されたバッグ本体と、前記バッグ本体に取り付けられたポートとを備えた細胞培養バッグを使用する細胞培養装置であって、

前記細胞培養バッグが載置される載置面を有する架台と、

前記載置面と実質的に平行な底面を有する押圧部材とを備え、

前記ポートから培地の注入又は排出を行う間、前記押圧部材の前記底面が前記上面フィルムを上方から押圧する

ることを特徴とする、細胞培養装置。

【請求項 8】

前記細胞培養バッグの前記下面フィルムには、複数の凹部が形成され、

前記押圧部材が、前記上面フィルムの高さに従って上下に移動し、前記培地の排出時に、前記上面フィルムが前記複数の凹部を閉塞するまで下降するように、前記押圧部材を支持する支持機構を備える

ことを特徴とする、請求項 7 記載の細胞培養装置。

【請求項 9】

前記上面フィルムは、前記天面部分と、前記天面部分の周囲に形成された立ち上がり部分とから構成された膨出形状を有し、

前記押圧部材の前記底面は、前記立ち上がり部分よりも内側の範囲で前記天面部分と接

10

20

30

40

50

触して前記上面フィルムを押圧すること
ことを特徴とする、請求項 8 記載の細胞培養装置。

【請求項 10】

前記架台の前記載置面には、前記下面フィルムの前記複数の凹部に対応する位置に、前記複数の凹部を受け入れる複数の開口又は凹部が形成されている
ことを特徴とする、請求項 8 又は 9 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

【請求項 11】

前記押圧部材の前記底面は、前記複数の凹部の周縁に対応する位置に、平面部を有し、かつ、前記複数の凹部に対応する位置に、前記平面部から突出した突起部を有する
ことを特徴とする、請求項 8～10 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

10

【請求項 12】

前記ポートに接続した注入排出手段を備え、
前記押圧部材が前記上面フィルムを押圧したまま、前記注入排出手段は、前記ポートから前記培地を注入する
ことを特徴とする、請求項 7～10 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

【請求項 13】

前記ポートから前記培地の注入及び排出を行うときに、前記ポートを通る前記培地の流量を制御する流量制御手段を備え、
前記流量制御手段は、前記架台の前記載置面から前記押圧部材の前記底面までの高さが低いほど、前記ポートを通る前記培地の流量が小さくなるように、流量制御を行う
ことを特徴とする、請求項 7～12 のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養方法及び装置に係り、より詳細には、細胞培養バッグを使用する細胞培養方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、医薬品の生産や、遺伝子治療、再生医療、免疫療法などの分野において、細胞（組織、微生物、ウイルスなどを含む）を人工的な環境下で効率良く大量に培養・分化誘導することが求められている。

30

【0003】

そのような細胞培養においては、コンタミネーションのリスクを回避するため、閉鎖系の細胞培養バッグが使用されることがある。細胞培養バッグは、例えば、周辺部をシールしたプラスチックフィルムで構成されたバッグ本体と、バッグ本体に取り付けられたポートとから構成されている。

【0004】

細胞培養バッグを使用した細胞培養においては、細胞培養バッグ内での細胞濃度の偏りを回避して、細胞濃度を適正な範囲に維持することが必要である。すなわち、細胞の増殖に伴い培地中の細胞濃度が高くなると、増殖に必要な培地成分の枯渇や、細胞自身の代謝産物の蓄積などにより細胞の成長が阻害され、細胞の増殖効率が低下し、一方、培地中の細胞濃度が低すぎても、細胞の増殖・分化誘導の効率が低下するからである。

40

【0005】

特に、複数の凹部を設けた細胞培養バッグを使用したスフェロイド培養においては、各凹部で適切な大きさのスフェロイド（細胞凝集塊）が形成されるよう、細胞数が均一になるように細胞が播種される。そして、各凹部のスフェロイドの大きさが均一となるように、1凹部につき1スフェロイドを培養終了まで維持することが求められる。

【0006】

また、特許文献 1 には、バッグ本体の底面に複数の凹部を設けることにより、細胞培養バッグ内での細胞の移動を抑制した細胞培養バッグが記載されている。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2009-11260号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

細胞の培養には、通常、数日から数週間の期間を要し、細胞培養バッグを使用した細胞培養においては、その期間中、閉鎖系を維持したまま、必要に応じて培地交換が行われる。培地交換では、ポートに接続された液送チューブを介して、細胞培養バッグ内に細胞を残したまま、細胞培養バッグ内の古い培地がポートから排出され、次いで、ポートから細胞培養バッグ内へ新しい培地が注入される。

10

【0009】

ところで、培地交換中、細胞培養バッグの上面フィルムに、皺や歪みのような起伏が生じることがある。特に、図9(a)に示すように、上面フィルム21を膨出形状とした細胞培養バッグ10は、二枚のプラスチックフィルムを重ねて周辺部をシールしただけの平パウチ状の容器と比較して、容器内を培地で満たしても周辺部が持ち上がって下面フィルム22が変形することが少ない点で優れているが、上面フィルム21に起伏が生じやすい。

【0010】

20

細胞培養バッグ10の上面フィルム21に起伏が生じ、細胞培養バッグ1内の培地Sの厚さが不均一となったまま、培地Sの排出を続けると、図9(b)に示すように、上面フィルム21が、培地Sの厚さが薄い領域Saで、培地Sの厚さが厚い領域Sbよりも早く下面フィルム22に部分的に接触する。その結果、細胞培養バッグ1内の培地Sを分断する分断部分Dが形成されてしまうことがある。

【0011】

細胞培養バッグ10に分断部分Dが形成されると、図9(c)に示すように、ポート3から培地Sを吸引しても、分断部分Dよりも手前にある培地Sだけしか排出されない。その一方で、分断部分Dよりも奥にある残留培地S1は排出されず、細胞培養バッグ1内に残り残されてしまう。その結果、培地Sの交換効率が低下して、細胞の培養・分化誘導効率が低下してしまう。

30

【0012】

なお、培地交換中に、図9(c)に示したような分断部分Dが形成された場合、ポート3側を低くするように細胞培養バッグ10を傾ければ、細胞培養バッグ10内の培地Sの分断が解消され、残り残されていた残留培地S1を排出することができる。しかし、細胞培養バッグ1を傾けると、培地Sとともに細胞がポート3から排出されるおそれがあるうえ、図11に示す下面フィルム22に複数の凹部4を設けた細胞培養バッグ1においては、凹部4内の培地とともに細胞までも凹部4から流出してしまうおそれがある。このため、培地交換中に細胞培養バッグ10を傾けることは好ましくない。

【0013】

40

さらに、下面フィルム22上で細胞を平面培養（二次元培養）している場合、上面フィルム21の起伏により、上面フィルム21が下面フィルム22に部分的に接触すると、その接触部分で下面フィルム22に接着していた細胞が剥離し、培地Sと共にポート1から排出されてしまうことがある。また、剥離した細胞がポート1から排出されなかった場合であっても、細胞が細胞培養バッグ1内で流動し、細胞濃度に偏りが生じてしまうことがある。

【0014】

また、上面フィルム21の起伏により培地Sの厚さが不均一であると、図10(a)及び図10(b)に示すように、細胞培養バッグ1内の培地Sの厚さが薄い領域Saでは、培地Sの厚さが厚い領域Sbより、培地交換時の培地Sの流速が局所的に増大する。そ

50

の結果、培地流速が増大した部分では、細胞が流動し易くなってしまう。

【0015】

例えば、下面フィルム22上で細胞を平面培養している場合、上面フィルム21が下面フィルム22と接触しなくとも、培地流速が増大した部分では、下面フィルム22に接している細胞が剥離することがある。その結果、培地交換時に、剥離した細胞が培地と一緒に流動し、ポート3から排出されてしまうことがある。

【0016】

また、例えば、図11に示すように、下面フィルム22に複数の凹部4を設けた細胞培養バッグ1でスフェロイド培養している場合においても、培地交換の際に、培地Sの流速が局所的に増大すると、凹部4内に沈殿していたスフェロイド細胞Cが培地Sと共に流動し、ポート3から排出されてしまうおそれがあるだけでなく、他の凹部4へ移動して、各凹部4内の細胞濃度が不均一となってしまうことがある。特に、1つの凹部4に複数のスフェロイドCが入ると、やがて一つの大きな塊のスフェロイドC'となり、スフェロイドC'が大きくなり過ぎるために培養・分化誘導効率が低下してしまう。

【0017】

本発明は、上記の事情に鑑みなされたものであり、細胞培養バッグを使用して細胞培養を行うにあたり、培地交換時に、細胞の流動防止を図りつつ、培地の交換効率を向上させることによって、細胞の培養・分化誘導効率を向上させることができる細胞培養方法及び装置の提供を目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明に係る細胞培養方法は、周辺部をシールした上面及び下面フィルムから構成されたバッグ本体と、前記バッグ本体に取り付けられたポートとを備え、細胞培養バッグを使用する細胞培養方法であって、前記細胞培養バッグを架台の載置面に載置し、前記ポートから培地の注入又は排出を行う間、前記載置面と実質的に平行な底面を有する押圧部材で、前記上面フィルムを上方から押圧することを特徴としている。

【0019】

また、本発明に係る細胞培養装置は、周辺部をシールした上面及び下面フィルムから構成されたバッグ本体と、前記バッグ本体に取り付けられたポートとを備えた細胞培養バッグを使用する細胞培養装置であって、前記細胞培養バッグが載置される載置面を有する架台と、前記載置面と実質的に平行な底面を有する押圧部材とを備え、前記ポートから培地の注入又は排出を行う間、前記押圧部材の前記底面が前記上面フィルムを上方から押圧することを特徴としている。

【0020】

本発明の細胞培養方法及び装置によれば、細胞培養バッグを使用した細胞培養において、ポートから培地の注入又は排出を行う間、載置面と実質的に平行な底面を有する押圧部材で、上面フィルムが押圧されることにより、上面フィルムの起伏の発生が抑制される。その結果、培地の注入又は排出を行う間、上面フィルムが架台の載置面と平行に保たれ、培地の厚さが均一となる。

【0021】

これにより、培地の排出又は注入を行う間、上面フィルムの起伏による細胞培養バッグの分断の発生が抑制され、細胞培養バッグ内に取り残される残留培地が低減するので、培地の交換効率が向上する。

また、培地の排出又は注入を行う間、培地の厚さが均一であるので、培地の厚さむらによる流速むらの発生が抑制される。その結果、局所的に大きい培地流速の発生が抑制されるので、細胞の流動防止が図られる。

【0022】

例えば、下面フィルム上で細胞を平面培養している場合、培地交換の際に、上面フィルムの部分的な接触又は局所的な流速の増大による細胞の剥離、流動化が防止される。

また、例えば、下面フィルムに複数の凹部を設けた細胞培養バッグでスフェロイド培養

10

20

30

40

50

している場合においても、培地交換の際に、局所的な流速の増大による、凹部内のスフェロイド細胞の流動、特に、他の凹部４への移動が防止される。

【発明の効果】

【００２３】

本発明の細胞培養方法及び装置によれば、細胞培養バッグを使用して細胞培養を行うにあたり、培地交換時に、細胞の防止を図りつつ、培地の交換効率を向上させることによって、細胞の培養・分化誘導効率を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】本発明の実施形態で使用する細胞培養バッグの概略を示す説明図であり、（ａ）は平面図、（ｂ）は側面図、（ｃ）は下面図である。 10

【図２】本発明の第１実施形態に係る細胞培養装置の断面模式図あり、（ａ）は押圧部材が上がった状態を示し、（ｂ）は押圧部材が下がった状態を示す。

【図３】（ａ）は、細胞培養バッグの天面部分と押圧部材の底面との大小関係を示す断面模式図であり、（ｂ）は、押圧部材が細胞培養バッグを挟み込んだ様子を示す断面模式図である。

【図４】本発明の実施形態に係る細胞培養方法を説明する断面模式図であり、（ａ）は、培地排出前の状態を示し、（ｂ）は、培地排出後の状態を示す。

【図５】（ａ）は、本発明の第２実施形態に係る細胞培養装置の押圧部材の断面模式図であり、（ｂ）は、本発明の第２実施形態に係る細胞培養装置を説明する断面模式図である。 20

【図６】培地の排出速度と、細胞が動き出したときの液厚との関係を示すグラフである。

【図７】本発明の第３実施形態に係る細胞培養方法を説明する断面模式図であり、（ａ）は、液厚が厚いときの大きな排出流量を示し、（ｂ）は、液厚が薄いときの小さな排出流量を示す。

【図８】本発明の実施形態に係る細胞培養方法を説明する断面模式図であり、（ａ）は、培地排出前の状態を示し、（ｂ）は、培地排出後の状態を示す。

【図９】細胞培養バッグの断面模式図であり、（ａ）は、上面フィルムに起伏が生じた状態を示し、（ｂ）は、培地排出時に培地が分断された状態を示し、（ｃ）は、培地排出時に培地が取り残された状態を示す。 30

【図１０】（ａ）は、細胞培養バッグの平面模式図であり、（ｂ）は、（ａ）のＢ-Ｂ線に沿った断面模式図である。

【図１１】培地交換時の細胞培養バッグ内の細胞の凹部からの流出を説明する断面模式図である。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

以下、本発明の好ましい実施形態について、図面を参照しつつ説明する。

【００２６】

（細胞培養バッグ）

まず、実施形態に係る細胞培養装置の説明に先立ち、図１を参照して、第１～第３実施形態で使用する細胞培養バッグを説明する。図１（ａ）～図１（ｃ）に示す細胞培養バッグ１は、重ね合わせて周辺部２０をヒートシールした上面フィルム２１及び下面フィルム２２から構成されたバッグ本体２と、このバッグ本体２に取り付けられたポート３とを備えている。バッグ本体２の大きさは特に限定されないが、例えば、縦５０～５００ｍｍ、横５０～５００ｍｍとするのが好ましい。 40

なお、図１を含む各図において、ポート３に接続されたチューブ等の流路、及び、流路を閉塞するピンチ又はバルブ等の閉塞手段の図示を省略する。

【００２７】

下面フィルム２２には、図１（ｃ）に示すように、各々が細胞培養部となる複数の凹部４が形成されている。凹部４は、バッグ本体２内における細胞の移動を抑止して、培養中 50

の細胞が一つの凹部 4 に留まるようにするために、開口径（直径）D が 0.3 ～ 1.0 mm、深さ d が 0.1 mm 以上であるのが好ましい。凹部 4 はまた、全ての凹部 4 で同一開口径としてもよいし、開口径が異なる二種以上の凹部を含んでもよい。例えば、下面フィルム 22 を複数の領域に分割して、それぞれの領域ごとに凹部 4 の開口径を異ならせてもよい。その場合、培地とともに培養対象の細胞をバッグ本体 2 に注入した際に、全ての凹部 4 に同程度の数の細胞が沈降して入ってくるように、周辺部側では凹部 4 の開口径を大きくするのが好ましい。

【0028】

また、細胞培養バッグ 1 では、凹部 4 の底部に細胞が集まり易くするため、図 1（b）に示すように、凹部 4 の形状を球冠状としている。なお、凹部 4 の形状は、これに限定されない。凹部 4 の底部に細胞が集まり易くするには、凹部 4 の直径 D に対する深さ d の比 d/D を 0.05 ～ 1 とするのが好ましい。

また、凹部 4 の配列は、図 1（c）に示すように千鳥状として、下面フィルム 22 に占める凹部 4 の占有面積ができるだけ大きくなるようにするのが好ましいが、必要に応じて格子状に配列してもよい。

【0029】

上面フィルム 21 は、図 1（b）に示すように、複数の凹部 4 全体の上方を覆う実質的に平坦な天面部分 21a と、天面部分 21a の周囲に形成された立ち上がり部分 21b とから構成された台地状に膨出した膨出形状を有する。これにより、二枚のプラスチックフィルムを重ねて周辺部をシールしただけの平パウチ状の容器と比較して、バッグ本体 2 を培地で満たしても、下面フィルム 22 の周辺部が持ち上がる変形が抑制される。

【0030】

バッグ本体 2 を形成する上面フィルム 21 及び下面フィルム 22 は、ガス透過性を有するプラスチックフィルムで形成される。このプラスチックフィルムのガス透過性は、JIS K 7126 のガス透過度試験方法に準拠して、試験温度 37℃ で測定した酸素の透過度が、 $5000 \text{ mL} / (\text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm})$ 以上であるのが好ましい。

【0031】

バッグ本体 2 を形成するプラスチックフィルムに用いる材料としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリエステル、シリコーン系エラストマー、ポリスチレン系エラストマー、テトラフルオロエチレン-ヘキサフルオロプロピレン共重合体（FEP）などの熱可塑性樹脂が挙げられる。これらは単層で用いても、同種又は異種の材料を積層して用いてもよいが、周辺部をヒートシールする際の熱融着性を考慮すると、シーラント層として機能する層を有しているのが好ましい。

【0032】

また、上面フィルム 21 が可撓性を有しながらも膨出形状を保ち、かつ、下面フィルム 22 が凹部 4 の形状を保つように、バッグ本体 2 を形成するプラスチックフィルムの厚みは、適度の形状保持性を有する $30 \sim 200 \mu\text{m}$ であるのが好ましい。

【0033】

ポート 3 は、培地や細胞などが流通可能な管状の部材からなり、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、塩化ビニル、ポリスチレン系エラストマー、FEP などの熱可塑性樹脂で成形することができる。

【0034】

（第 1 実施形態）

次に、図 2 を参照して、本発明の実施形態に係る細胞培養方法及び装置を説明する。図 2 は、第 1 実施形態に係る細胞培養装置 100 の断面模式図あり、図 2（a）は押圧部材が上がった状態を示し、図 2（b）は押圧部材が下がった状態を示す。

本実施形態の細胞培養装置 100 は、細胞培養バッグ 1 が載置される架台 5 と、上面フィルム 21 のうち天面部分 21a を押圧する底面 6a を有する押圧部材 6 と、押圧部材 6 を支持する支持機構 7 とを備えている。さらに、本実施形態の細胞培養装置 100 は、ポート 3 に接続したポンプ等の注入排出手段（図示せず）を備えている。

【0035】

架台5は、細胞培養バッグ1が水平に載置される載置面5aを有する。この載置面5aには、細胞培養バッグ1の下面フィルム22に形成された複数の凹部4の各々を受け入れる形状として、開口部5bが形成されている。これにより、載置面5aが下面フィルム22を凹部4に非接触で支持するので、凹部4の潰れ、変形が回避されて凹部4内の細胞の流出が防止され、さらに、下面フィルム22からのガス透過性が高まる。

なお、複数の凹部4の各々を受け入れる形状は、開口部に限定されず、例えば、凹部であってもよいし、金網状であってもよい。

【0036】

押圧部材6は、細胞培養バッグ1の天面部分21aに合わせた略長方形の平面形状を有する厚さ10mmの板状部材であり、架台5の載置面5aと実質的に平行で平坦な底面6aを有している。

押圧部材6は、例えば、ポリカーボネートのような合成樹脂で形成してもよいし、ガラスで形成してもよい。また、押圧部材6は、細胞培養の進行状況や細胞の状態などを確認できるように、一部又は全部が透明性を有しているのが好ましい。

【0037】

支持機構7は、架台5上に設けたフレーム71と、押圧部材6の上面の四隅から上方に延びてフレーム71を上下動可能に貫通しているガイドピン72と、押圧部材6を下方へ付勢する付勢手段73とから構成されている。付勢手段73は、押圧部材6の上面と、フレーム71とに互いに同極側を対向させて配置した永久磁石73で構成されている。永久磁石73同士の間働く斥力により、押圧部材6は、上面フィルム21を上方から押圧したまま、上面フィルム21の高さに従って上下に移動する。

これにより培地を注入する際には、押圧部材6が上面フィルム21を押圧したまま、ポート3に接続した注入排出手段によりポート3から培地Sが注入される。また、培地を排出する際にも、押圧部材6が上面フィルム21を押圧したまま、注入排出手段によりポート3から培地Sが排出される。

なお、付勢手段73は、永久磁石に限定されない。また、付勢手段73を省略し、押圧部材6の自重により、押圧部材6を上面フィルム21の高さに従って上下に移動させてもよい。

【0038】

ポート3から培地の注入又は排出を行う間、押圧部材6の底面6aが上面フィルム21の天面部分21aを押圧することによって、上面フィルム21の天面部分21aに、皺や歪みによる起伏が発生することが抑制される。そして、支持機構7により、押圧部材6の底面6aは、架台5の載置面5aと平行に保たれる。これにより、培地交換中、上面フィルム21の天面部分21aが架台5の載置面5aと平行に保たれ、細胞培養バッグ1内の培地Sの厚さが均一となる。

【0039】

これにより、培地交換時に、培地の厚さむらによって流速むらが発生することが抑制され、培地流速が局所的に大きくなることが抑制されるので、細胞の凹部4からの流出防止が図られる。

また、培地排出時には、上面フィルム21の天面部分21aが、実質的に全域で一斉に下面フィルム22の凹部4の周囲と接触することになるため、細胞培養バッグ1の内部が分断されない。このため、細胞培養バッグ1内に取り残される残留培地が低減するので、培地の交換効率が向上する。

このように、培地交換時に、細胞Cの凹部4からの流出を防止して均一な細胞濃度を維持しつつ、残留培地を低減して培地Sの交換効率が向上するため、細胞の培養・分化誘導効率を向上させることができる。

【0040】

また、培地排出時には、押圧部材6が下降して、上面フィルム21の天面部分21aが複数の凹部4の各々を閉塞する。これにより、各凹部4内にそれぞれ細胞Cが閉じ込めら

10

20

30

40

50

れるので、培地排出時に、凹部 4 内の細胞 C が培地 S と一緒に排出されることが防止される。

また、各凹部 4 内に細胞 C が閉じ込められているので、ポート 3 を不図示のバルブなどで閉鎖して細胞培養装置 100 または培養バッグ 1 を CO₂ インキュベータから取り出し、傾けたり、振動、衝撃が加わるような操作、例えば、異なる細胞処理区画への移送などを行ったりしたとしても、細胞 C が凹部 4 から流出しない。これにより、各凹部 4 に一つずつ形成された細胞スフェロイド C を、他の凹部 4 の細胞スフェロイド C から分離したまま、各凹部 4 の細胞スフェロイド C を一度に輸送することができる。

【0041】

ところで、図 3 (a) に示すように、押圧部材 6 の底面 6 a が細胞培養バッグ 1 の上面フィルム 2 1 の天面部分 2 1 a よりも広い場合、下降した押圧部材 6 の底面 6 a が上面フィルム 2 1 の立ち上がり部分 2 1 b を踏みつけてしまう。図 3 (b) 中に円 B で示すように、押圧部材 6 の底面 6 a と架台 5 の載置面 5 a との間に上面フィルム 2 1 の立ち上がり部分 2 1 b が挟まると、上面フィルム 2 1 の天面部分 2 1 a が下面フィルム 2 2 と接触することができず、上面フィルム 2 1 で凹部 4 の各々を閉塞することが困難となる。

【0042】

そこで、本実施形態では、図 4 (a) に示すように、押圧部材 6 の底面 6 a が上面フィルム 2 1 の立ち上がり部分 2 1 b よりも内側に配置されるように、押圧部材 6 を寸法決めている。これにより、図 4 (b) に示すように、培地排出時に、押圧部材 6 が下降し、押圧部材 6 の底面 6 a が、立ち上がり部分 2 1 b よりも内側の範囲で天面部分 2 1 a と接触して上面フィルム 2 1 を押圧し、底面 6 a が立ち上がり部分 2 1 b を踏みつけることなく、上面フィルム 2 1 の天面部分 2 1 a で複数の凹部 4 の各々を閉塞することができる。

【0043】

なお、上面フィルム 2 1 による凹部 4 の閉塞にあたっては、細胞が凹部 4 からの流出を阻止できればよく、必ずしも凹部 4 を密閉しなくともよい。また、上面フィルム 2 1 の天面部分 2 1 a で、すべての凹部 4 を閉塞することが望ましいが、必ずしも全ての凹部 4 を閉塞しなくともよい。

また、下降した押圧部材 6 が立ち上がり部分 2 1 b を踏みつけることを回避するためには、押圧部材 6 は、底面部 6 a が立ち上がり部分 2 1 b よりも内側の範囲でのみ天面部分 2 1 a と接触する寸法形状であればよく、押圧部材 6 の上部が立ち上がり部分 2 1 b よりも外側に張り出しているてもよい。

【0044】

(第 2 実施形態)

次に、図 5 を参照して、第 2 実施形態の細胞培養方法及び装置を説明する。本実施形態の細胞培養装置の構造は、押圧部材 60 の形状を除き、図 1 に示した第 1 実施形態のものと同一である。なお、図 5 では、図 1 に示した支持機構 7 の図示を省略している。

図 5 (a) に示すように、押圧部材 60 の底面 60 a は、複数の凹部 4 の周縁に対応する位置に、平面部 61 を有し、かつ、複数の凹部 4 に対応する位置に、平面部 61 から突出した突起部 62 を有する。

なお、凹部 4 内の細胞 C がダメージを受けることを回避するため、突起部 62 の平面部 61 に対する高さは、下面フィルム 2 2 の凹部 4 の深さよりも小さいことが好ましい。また、突起部 62 は、全ての凹部 4 に対応して設けられることが望ましいが、必ずしもすべての凹部 4 に対応して設けられなくともよい。

【0045】

図 5 (b) に示すように、培地が排出され、押圧部材 60 が下降して、上面フィルム 2 1 の天面部分 2 1 a で複数の凹部 4 の各々を閉塞したときに、押圧部材 60 の底面 60 a の突起部 62 によって、上面フィルム 2 1 が、下面フィルム 2 2 の各凹部 4 の内部へ陥入する。その結果、第 1 実施形態と比較して、突起部 62 の体積だけ各凹部 4 内に残留する培地 S が減少する。これにより、培地 S の交換効率を高めて、細胞の培養・分化誘導効率を更に向上させることができる。

10

20

30

40

50

【0046】

(第3実施形態)

次に、図6及び図7を参照して、第3実施形態の細胞培養方法及び装置を説明する。なお、図6では、図1に示した支持機構7の図示を省略する。

本実施形態の細胞培養装置の構造は、ポート3から培地Sの注入及び排出を行うときに、ポート3を通る培地Sの流量を制御する流量制御手段(図示せず)を除いて、第1実施形態のものと同一である。流量制御手段としては、例えば、ポート3にチューブを介して接続したペリスタポンプやシリンジポンプのようなポンプが低速で高精度な送液が可能のため好ましい。

【0047】

第1実施形態で説明したように、培地交換時に押圧部材6で細胞培養バッグ1の上面フィルム21を押圧して培地Sの厚さを均一にすることによって、バッグ本体2内の培地の流速むらを低減し、細胞の凹部4からの流出が抑制される。

【0048】

しかし、ポート3を通過する培地Sの流量が極端に大きいと、押圧部材6を使用しても、細胞Cが凹部4から流出してしまうことがある。一方、ポート3を通過する培地Sの流量を極端に小さくすれば、細胞Cの凹部4からの流出は防止できるものの、培地交換に長時間を要することになる。

【0049】

ここで、図6に、培地排出時にポート3を通過する培地Sの流量(排出速度(ml/分))と、細胞が動き出した時の液厚(mm)との関係を示すグラフを示す。この液厚は、上面フィルム21と下面フィルム22の凹部4の縁部との間の距離を表す。なお、この液厚に、上面及び下面フィルム21及び22の厚さを加えたものが、架台5の載置面5aから押圧部材6の底面6aまでの高さに実質的に相当する。

【0050】

グラフ中の直線Iで示すように、培地Sの液厚が小さいほど、小さい流量で細胞Cが動き出している。これは、ポート3を通過する流量が一定であるとき、培地Sの液厚が大きいほどバッグ本体2内の流路が広くなって、培地Sの流速が遅くなるため、細胞Cが流されにくくなり、一方、液厚が薄いほどバッグ本体2内の流路が狭くなって、培地Sの流速が速くなるため、細胞Cが流されやすくなるためである。

【0051】

上記の知見に基づき、本実施形態では、流量制御手段が、図7(a)に示すように、架台5の載置面5aから押圧部材6の底面6aまでの高さHが高いほど、ポート3を通過する培地Sの流量が大きくなり、図7(b)に示すように、流量制御手段は、架台5の載置面5aから押圧部材6の底面6aまでの高さHが低いほど、ポート3を通過する培地Sの流量が小さくなるように、流量制御を行う。すなわち、培地Sを排出する際には、液厚が薄くなるに従って、ポート3から排出する培地Sの流量を小さくし、培地Sを注入する際には、液厚が厚くなるに従って、ポート3から注入する培地Sの流量を大きくする。

なお、流量制御にあたっては、流量を段階的に変化させてもよいし、連続的に変化させてもよい。また、液厚に対する流量の具体的な数値は、バッグ本体2の形状、細胞Cの種類、及び凹部4の形状等に異なるため、実験的に求めるとよい。

【0052】

このように流量制御を行うことにより、細胞Cの凹部4からの流出を抑制しつつ、培地交換の所要時間を短縮することができる。

【0053】

なお、本実施形態では、流量制御手段は、ポート3に接続された注入排出手段を兼ねるポンプに限定されず、流量調整を可能にする種々の手段を採用することができる。

例えば、ポート3に接続された流路の断面積を変化させることによって、流量を制御することもできる。具体的には、流路に可変バルブや絞り機構を設けるとよい。この場合、ポンプで吸引又は送出しながら、流路断面積を変化させることが好ましい。

10

20

30

40

50

また、ポート 3 に接続された流路に、メッシュやフィルタのような障害物を挿入することによって、流量を制御することもできる。

また、細胞培養装置を収納したインキュベータ等のチャンバ内の気圧と大気圧との圧力差を調整して、流量制御を行うこともできる。具体的には、培地 S を排出する際に、液厚が薄くなるに従ってチャンバ内の圧力を低下させて、ポート 3 から排出する培地 S の流量を小さくするとよい。一方、培地 S を注入する際には、液厚が厚くなるに従ってチャンバ内の圧力を上昇させて、ポート 3 から注入する培地 S の流量を大きくするとよい。この場合、ポート 3 には、ポンプ等の注入排出手段を接続してもよいし、接続しなくてよい。

【0054】

(第 4 実施形態)

図 8 を参照して、第 4 実施形態の細胞培養方法及び装置を説明する。

【0055】

上述した第 1 ～第 3 実施形態においては、下面フィルム 22 に複数の凹部 4 が形成された細胞培養バッグ 1 を使用した細胞培養方法及び装置の例を説明したが、本発明は、図 8 に示す下面フィルム 22 に凹部が形成されていない平面培養用の細胞培養バッグ 10 を使用する細胞培養方法及び装置にも適用することができる。

本実施形態で使用する平面培養用の細胞培養バッグ 10 は、下面フィルム 22 に凹部が形成されていない点を除いて、図 1 に示した細胞培養バッグ 1 と同一寸法、同一材料で形成されている。

【0056】

また、本実施形態の細胞培養装置は、架台 5' 及び押圧部材 6' 以外は、図 2 に示した第 1 実施形態の細胞培養装置 100 と同一の構成を有している。

図 8 (a) に示すように、架台 5' の載置面 5a は平坦面であり、凹部を受け入れる開口部が形成されていない。

【0057】

また、図 8 (a) に示すように、押圧部材 6' も平坦な底面 6a を有しているが、押圧部材 6' の底面 6a は、細胞培養バッグ 10 の上面フィルム 21 の天面部分 21a よりも広い寸法を有している。

このため、押圧部材 6' が下降すると、図 8 (b) 中に円 B で示すように、押圧部材 6' の底面 6a が上面フィルム 21 の立ち上がり部分 21b を踏みつける。その結果、押圧部材 6' の底面 6a と架台 5' の載置面 5a との間に上面フィルム 21 の立ち上がり部分 21b が挟まり、上面フィルム 21 が下面フィルム 22 と接触することが回避される。これにより、培地交換時に、上面フィルム 21 が下面フィルム 22 に接着している細胞と接触することが防止され、細胞の剥離が防止される。

【0058】

なお、本実施形態では、底面 6a が天面部分 21a よりも狭い場合には、細胞の剥離防止のため、押圧部材 6' は、上面及び下面フィルム 21 及び 22 間に所定の間隔を維持するように下降を停止し、両フィルム 21 及び 22 の接触を回避することが好ましい。

【0059】

以上、本発明について、好ましい実施形態を示して説明したが、本発明は、前述した実施形態に限定されるものではなく、本発明の範囲で種々の変更実施が可能であることは言うまでもない。例えば、前述した実施形態では、押圧部材は板状であるが、押圧部材の形状はこれに限定されず、例えば、上面に凹凸があってもよい。

【産業上の利用可能性】

【0060】

本発明は、種々の細胞を効率良く培養する技術として利用できる。

【符号の説明】

【0061】

- 1、10 細胞培養バッグ
- 2 バッグ本体

10

20

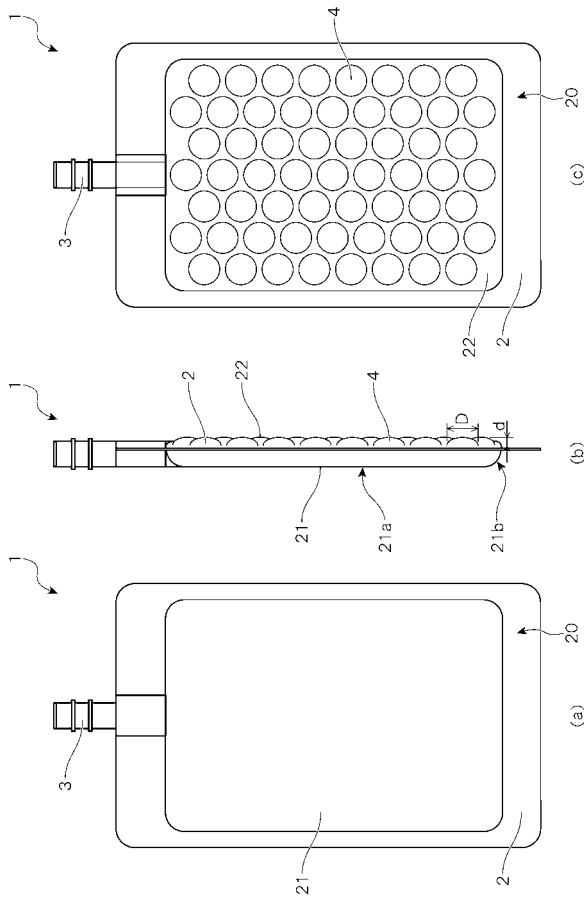
30

40

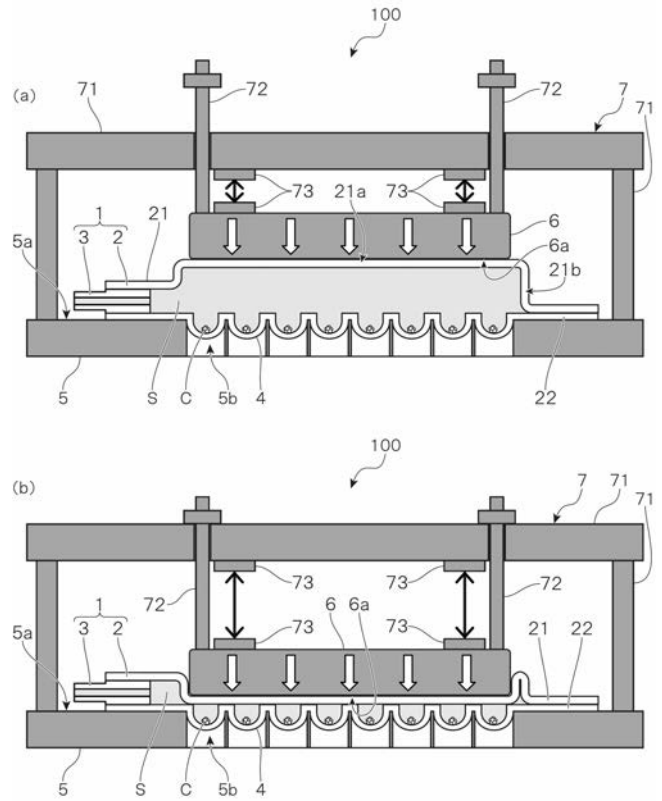
50

2 0	周辺部	
2 1	上面フィルム	
2 1 a	天面部分	
2 1 b	立ち上がり部分	
2 2	下面フィルム	
3	ポート	
4	凹部	
5, 5'	架台	
5 a	載置面	
5 b	開口部	10
6, 6'	押圧部材	
6 a	底面	
6 0	押圧部材	
6 0 a	底面	
6 1	平面部	
6 2	突起部	
7	支持機構	
7 1	フレーム	
7 2	ガイドピン	
7 3	永久磁石	20
1 0 0	細胞培養装置	
C	細胞、スフェロイド	
S	培地	
S 1	残留培地	
S a	培地の薄い領域	
S b	培地の厚い領域	

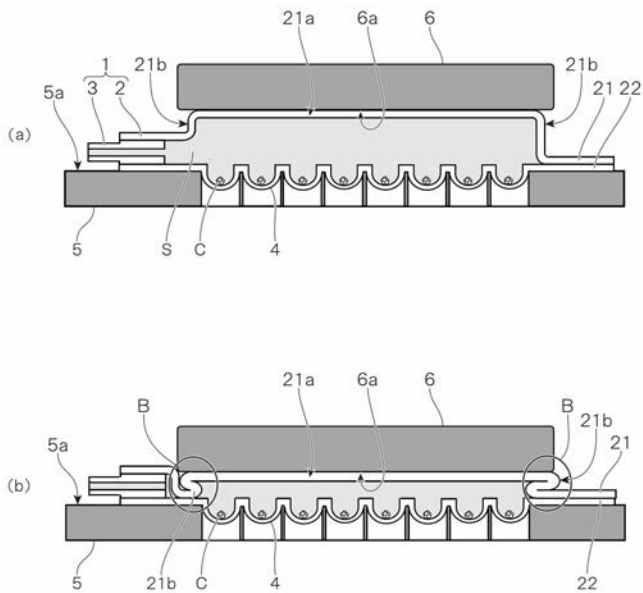
【図 1】



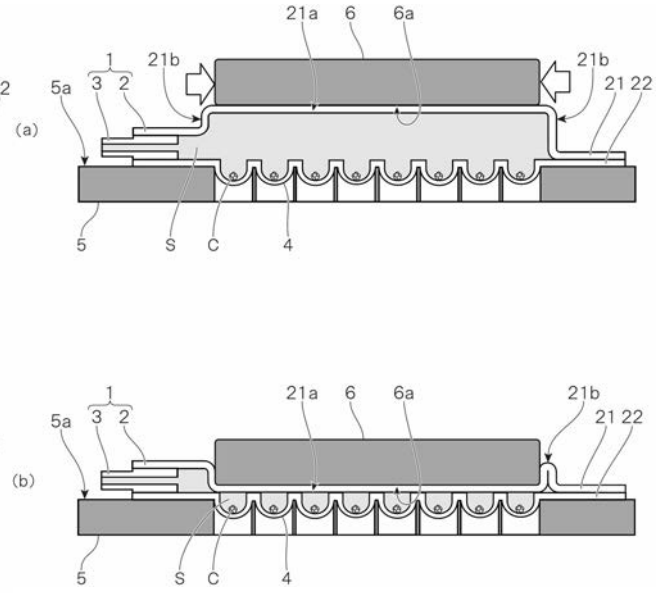
【図 2】



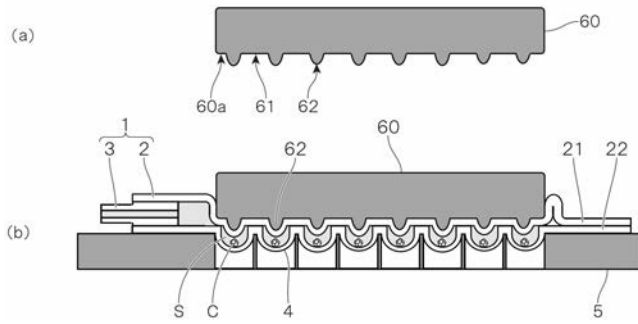
【図 3】



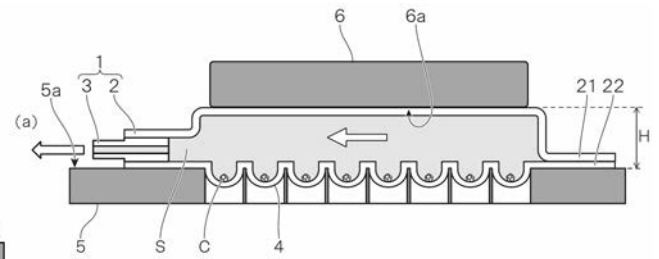
【図 4】



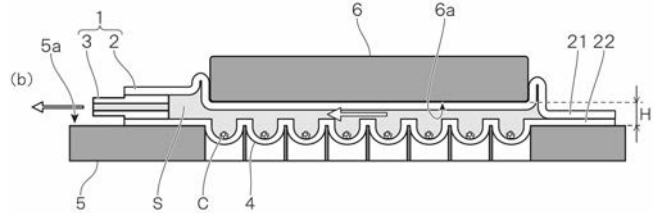
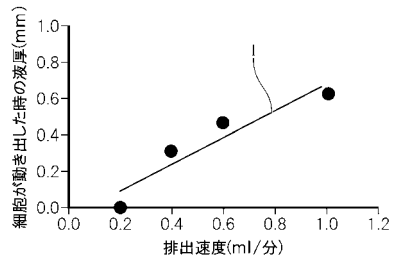
【図 5】



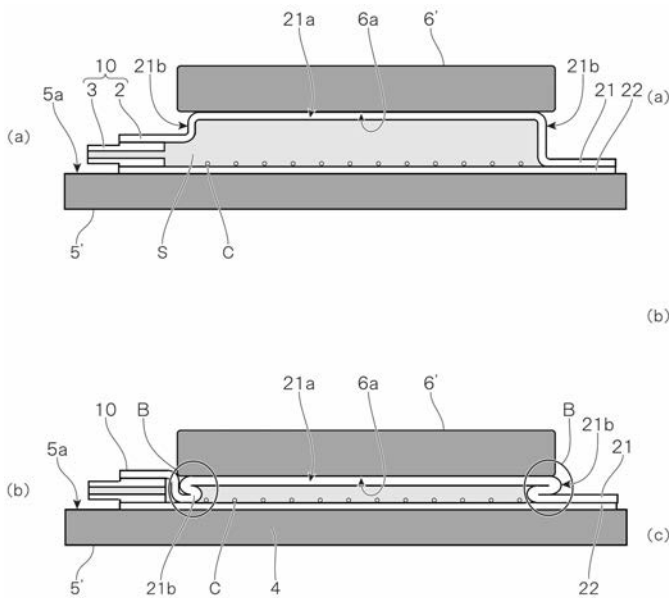
【図 7】



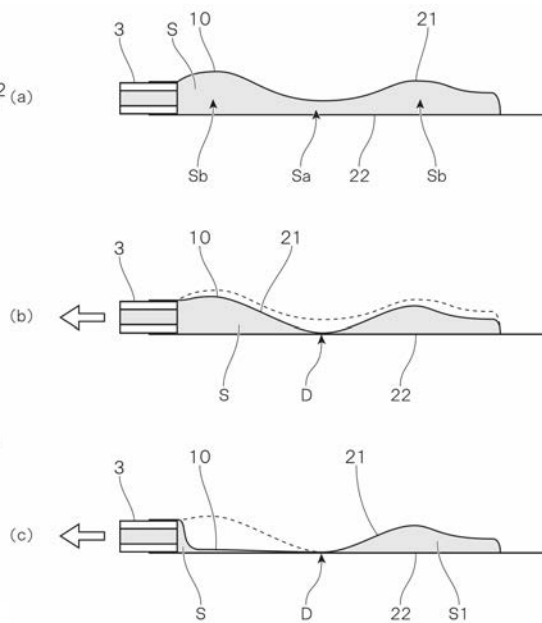
【図 6】



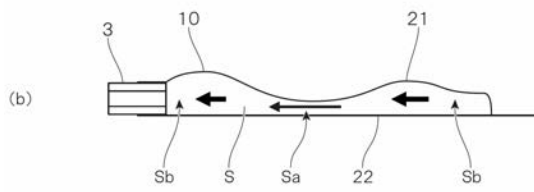
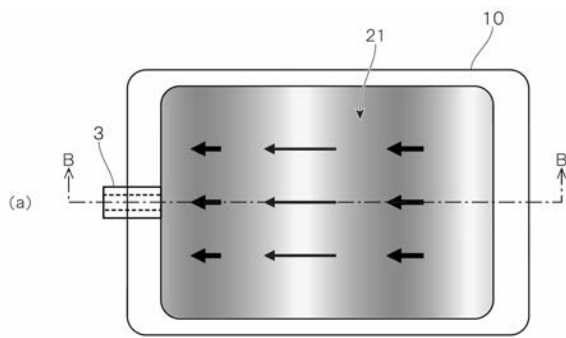
【図 8】



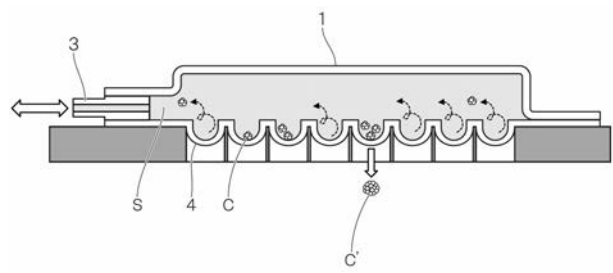
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	C 1 2 M 1/00	D

Fターム(参考)	4B029	AA02	BB01	BB11	CC01	CC02	CC08	DA07	DC01	DF03	DF06
		DG06	GA08	GB02							
	4B065	AA00	AA90X	BC11	BC12	BC26	BC50	CA46			