

(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
2020年5月22日(22.05.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/100567 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/00 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) *F04B 37/16* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/042243

(22) 国際出願日: 2019年10月29日(29.10.2019)

(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 2018-216064 2018年11月17日(17.11.2018) JP

(71) 出願人: 東洋製罐グループホールディングス
株式会社(TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS,

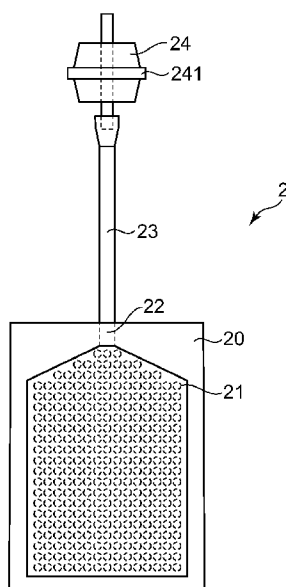
LTD.) [JP/JP]; 〒1418627 東京都品川区東五反田2丁目18番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小関 修(KOSEKI Osamu); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町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 Kanagawa (JP). 田中 郷史(TANAKA Satoshi); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町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 Kanagawa (JP). 光石 真稀(MITSUISHI Maki); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町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 Kanagawa (JP).

(54) Title: MEDIUM-FILLING SOLUTION, MEDIUM FILLING METHOD, CULTURE CONTAINER, AND BUBBLE-REMOVING APPARATUS FOR FILLING MEDIUM

(54) 発明の名称: 培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置

[図4]



(57) Abstract: According to the present invention, when cells are cultured using a culture container having fine recessed portions, bubbles collected in the fine recessed portions can be effectively removed, which can be applied to a culture container having a large culture surface. This medium filling solution is a solution in which when a medium is filled into a culture container having a culture surface in which a plurality of fine recessed portions are formed, the bubbles collected in the fine recessed portions are removed prior to the filling of the medium. This medium-filling solution is filled into the culture container having the culture surface in which the plurality of fine recessed portions are formed and is left standing for a certain period of time, a medium is then passed through the culture container, and the medium-filling solution is substituted with the medium.

(57) 要約: 微小凹部を有する培養容器を用いて細胞を培養するにあたり、微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去することを可能とし、またこれを培養面の大きな培養容器に適用することを可能とする。複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、凹部に溜まった気泡を除去する培地充填液であって、脱気されている培地充填液とする。このような培地充填液を、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に充填して一定時間静置させ、ついで培養容器に培地を通液して、培地充填液を培地に置き換える。

(74) 代理人: 生 富 成 一 (IKUTOMI Shigekazu);
〒1580083 東京都世田谷区奥沢 6 丁目 3 4 番
1 号 内海第 2 ビル 5 階 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, 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.

(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, 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).

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：

培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養技術に関し、特に微小な凹部を備えた培養容器を用いて培養を行う技術に関する。

背景技術

[0002] 近年、i P S細胞やE S細胞などの幹細胞等の接着細胞を大量に培養する場合には、細胞を培養容器に接着させて増殖させるだけではなく、細胞に対して接着性の低い材料を塗工したマイクロウェルプレートなどの培養容器を使用して、スフェア（スフェロイド、凝集塊）を形成させることによって、細胞をより生体内に近い三次元的な状態で培養する方法が用いられている。

[0003] このような培養では、微小な凹部（ウェル）が多数形成されている培養容器が用いられる場合がある。ところが、この培養容器に培地を充填すると、微小凹部に気泡が閉じ込められて溜まってしまい、細胞培養に支障が出るという問題があった。すなわち、微小凹部に気泡が残ると、スフェアの形成が阻害されてしまうが、微小凹部から全ての気泡を除去することは、極めて困難であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2015-43751号公報

特許文献2：特開2005-305407号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ここで、微小凹部に溜まった気泡を除去するために、マイクロピペットなどを用いて気泡に液を拭きかけることにより、水圧で気泡を除去することが行われている。

しかしながら、このようなピペットによる操作では気泡を除去できない場合があった。

[0006] すなわち、このようなピペット操作による方法では、凹部の開口部の直径が1 mm以下の場合には、気泡を除去することが難しく、凹部の開口部の直径が0.2 mm以下の場合には、気泡を除去することが非常に困難であった。

また、この方法では、たとえ気泡を除去できても、培養容器の培養面が大きい場合には、非常に手間がかかり、また培養容器を長時間開放させた状態での操作が必要になるため、培養容器内を汚染する危険性が高くなるという問題もあった。

[0007] このような問題の解消に関連する技術として、特許文献1に記載の加振装置を挙げることができる。

この加振装置には、培養容器を底面と直交する方向へ加振する加振部が備えられており、培養容器に振動を与えることによって、培養容器の凹部に溜まった気泡を除去する構成となっている。

このような加振装置によれば、気泡の大きさや形状によってはこれを除去することができるが、一方で振動だけでは除去できない場合があった。また、培養容器の培養面が大きい場合には手間がかかり、加振装置を用いるためのコストが必要になるという問題があった。さらに、振動によって培養容器から液が飛び出し、周辺に培地をこぼす危険性もあった。

[0008] また、特許文献2に記載のマイクロウェルプレート用攪拌・脱泡装置を挙げることができる。この装置によれば、マイクロウェルプレートを公転及び自転させることにより、マイクロウェルプレートのウェル内の溶液を同時に均一に攪拌して、溶液中の微小な気泡を除去することを可能としている。

この攪拌・脱泡装置によれば、直径が約2 mm程度のウェル（1536ウェル）の場合は、気泡を除去できるが、直径が1 mm以下のウェルや、さらに直径が0.2 mm以下のウェルに対しては、この装置のような遠心による方法では、気泡を完全に除去することは難しかった。

[0009] また、これらの従来の方法や装置では、A4サイズなどの大きな培養面を有する培養容器の凹部から気泡を除去する場合には、適用することが難しかった。

[0010] そこで、本発明者らは鋭意研究し、培養容器に培地を充填するのに先だって、培養容器にまず脱気した培地充填液を充填して一定時間静置させることにより、培養容器における微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去できることを見いだした。

また、培養容器に培地を充填するのに先だって、培養容器に培地充填液を充填した後、真空排気装置により培養容器を真空にさらすことにより、培養容器における微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去できることを見いだした。

さらに、これらの方法によれば、培養面の大きな培養容器にも容易に適用することが可能であるため、スフェアなどの大量培養に好適に用いることが可能となる。

[0011] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、微小凹部を有する培養容器を用いて細胞を培養するにあたり、微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去することができ、また培養面の大きな培養容器に容易に適用することが可能な培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 上記目的を達成するため、本発明の培地充填液は、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填液であって、脱気されている構成としてある。

[0013] また、本発明の培地充填方法は、上記の培地充填液を、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に充填して一定時間静置させ、ついで前記培養容器に培地を通液して、前記培地充填液を培地に置き換える方法としてある。

[0014] また、本発明の培地充填方法は、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填方法であって、前記培養容器に培地充填液を充填した後、前記培地充填液を充填した状態で前記培養容器を真空排気装置に入れて、前記培地充填液における溶存空気量が50%以下になるように真空引きを行う方法としてある。

[0015] また、本発明の培養容器は、上記の培地充填方法に用いられる複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器であって、前記培養容器が、軟包材からなる閉鎖系の培養バッグであり、チューブを接続したポートを有し、前記チューブの端部にフィルタを備えた構成としてある。

[0016] また、本発明の培地充填用気泡除去装置は、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填用気泡除去装置であって、真空排気装置を備え、前記培養容器に培地充填液を充填した後、前記培地充填液を充填した状態で前記培養容器を前記真空排気装置に入れて真空引きを行う構成としてある。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、微小凹部を有する培養容器を用いて細胞を培養するにあたり、微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去することができ、また培養面の大きな培養容器に容易に適用することが可能な培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置の提供が可能となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]マイクロウェルプレートに培地を充填した直後の状態の写真（左は箱形のウェル、右は四角錐状のウェル）を示す図である。

[図2]マイクロウェルプレートに本発明の実施形態に係る培地充填液を充填して12時間静置させて気泡が除去された状態の写真（実施例1）と、マイクロウェルプレートに培地を充填して12時間静置させて気泡が残った状態の写真（比較例1）を示す図である。

[図3]本発明の実施形態に係る培地充填用気泡除去装置の構成を示す模式図である。

[図4]本発明の実施形態に係る培養容器の構成を示す模式図である。

[図5]本発明の実施形態に係る培地充填液により気泡が除去されたマイクロウェルプレートを用いてスフェアを形成した状態の写真（試験１）と、気泡が残ったマイクロウェルプレートを用いてスフェアを形成した状態の写真（試験２）を示す図である。

[図6]本発明の実施形態に係る培地充填方法を示す模式図である。

[図7]参考例１の培地充填方法を示す模式図である。

[図8]参考例２の培地充填方法を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態及び実施例の具体的な内容に限定されるものではない。

[0020] まず、本発明の実施形態に係る培地充填液について詳細に説明する。

本実施形態の培地充填液は、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、凹部に溜まった気泡を除去する培地充填液であって、脱気されていることを特徴とする。

[0021] 「脱気」とは、液体中の溶存空気を排出することであり、上記の「脱気されている」とは、培地充填液に溶存していた空気が一定程度まで除去された状態であることを意味する。

脱気は、減圧、加熱、超音波等の方法により行うことができる。減圧による脱気は、気圧を低くすることによって液体を沸騰させ、液体中に溶存していた空気を除去する方法である。減圧による真空度と水の沸騰する温度との関係は、以下の通りである。

[0022] <水の沸騰する温度>	<真空度>
100.0℃	760 Torr
51.3℃	100 Torr

37.8℃	50 Torr
22.0℃	20 Torr
17.5℃	15 Torr
11.4℃	10 Torr
7.9℃	8 Torr

(1 Torr $\div$ 133 Pa)

[0023] 例えば、室温が22℃の場合、培地充填液を収容した容器を真空チャンバに入れて減圧し、20 Torr (2.67 kPa)の真空度で、1分程度保持することによって、培地充填液における溶存空気量を10%以下にすることができる。

本実施形態の培地充填液は、溶存空気量が50%以下に脱気されていることが好ましく、10%以下に脱気されていることがより好ましい。

[0024] 本実施形態の培地充填液は、培地、生理食塩水、又はリン酸緩衝液のいずれかを脱気させて得られたものとするのが好ましく、その後の培養に悪影響を及ぼさないものであれば、特に限定されない。

ここで、培地充填液にタンパク質が含まれていると、培養容器の凹部から気泡が除去されて凹部の表面が一旦培地充填液によって濡れた後に、その状態を保持しやすいことが分かった。このため、培地充填液としては、培地を用いることが好ましく、また生理食塩水やリン酸緩衝液に例えばアルブミンなどのタンパク質を溶解したものを用いることも好ましい。

[0025] また、本実施形態の培地充填液は、ガスバリア性を有する容器に封入されたものとするのが好ましい。具体的には、例えば、ガラスやアルミパックなどからなる容器に封入されたものとするのが好ましい。

本実施形態の培地充填液をこのような構成にすれば、長期保存に適したものとすることができる。

[0026] なお、本実施形態において、培養対象物としては、シングルセル（単一細胞）やスフェア（スフェロイド、凝集塊）、オルガノイド等とすることができ、培養可能なものであればよく、特に限定されない。

[0027] ここで、マイクロウェルプレートに培地を充填した直後の状態の写真を図1に示す。

左側の写真は、箱形（四角柱状）のウェルを備えたマイクロウェルプレートを示し、右側の写真は、四角錐状のウェルを備えたマイクロウェルプレートを示す。これらの凹部の開口部の一辺は、0.2 mmである。

これらの図に示すように、いずれの写真でも全てのウェルに気泡が溜まっていることが分かる。

[0028] なお、箱形のウェルでは気泡は球状を示し、四角錐状のウェルでは気泡は四角錐状を示している。その理由は、箱形のウェルでは気泡が球状でウェルに収容されるサイズである一方、四角錐状のウェルでは気泡が球状でウェルに収容できないサイズであるため、表面張力によりウェルの壁面に沿った形状で収容されていると考えられる。

[0029] 次に、四角錐状のウェルを備えたマイクロウェルプレートを2枚用意し、一方に本実施形態に係る培地充填液を充填し（実施例1）、もう一方に培地を充填して（比較例1）、12時間静置させた状態を図2に示す（詳細については、実施例において後述する）。

その結果、実施例1のマイクロウェルプレートでは、気泡が完全に除去されたことが分かる。これに対して、比較例1のマイクロウェルプレートでは、気泡の一部が自然になくなっているものの、完全には除去されてはおらず、多くの気泡がウェルに残存していることが分かる。

[0030] このように本実施形態の培地充填液によれば、培養容器の微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去することが可能である。また、これを培養面の大きな培養容器に適用することも容易である。さらに、従来の加振装置などを用いる必要がないため、周辺を汚染する危険性を排除することも可能となっている。

[0031] 本実施形態の培地充填方法は、上記の培地充填液を、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に充填して一定時間静置させ、ついで培養容器に培地を通液して、培地充填液を培地に置き換えることを特徴とする。

[0032] このとき、培養容器の複数の凹部における開口部の円又は内接円の直径は、2 mm以下であることが好ましく、1.5 mm以下であることがより好ましく、1.0 mm以下であることがさらに好ましい。また、0.5 mm以下、0.2 mm以下、0.1 mm以下等にしてもよいが、0.3 mm～0.5 mmとすることが特に好ましい。

なお、凹部における開口部の形状は、円や多角形の場合がある。そのため、これらの直径として、多角形に内接する円の直径を含めている。

[0033] ここで、脱気した培地充填液は、培養に必要な酸素が含まれておらず、培養には適さないため、気泡の除去が完了した後、培養容器から排出することが望ましい。

そこで、本実施形態の培地充填方法では、培地充填液を培養容器に充填して一定時間静置させ、気泡の除去が完了した後に、培養容器に培地を通液することによって、培地充填液を培地に混合し、培地充填液を培地に次第に置き換えていくようにしている。

[0034] 本実施形態の培地充填方法では、上記のように、培養を開始する時間の前に予め培養容器に培地充填液を充填して気泡を除去するようにしている。その理由は、本実施形態の脱気された培地充填液を用いる方法では、直ぐには気泡が消えず、気泡の除去に一定の時間がかかるためである。

[0035] 本実施形態の培地充填用気泡除去装置は、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、凹部に溜まった気泡を除去する培地充填用気泡除去装置であって、真空排気装置を備え、培養容器に培地充填液を充填した後、培地充填液を充填した状態で培養容器を真空排気装置に入れて真空引きを行うことを特徴とする。

[0036] 具体的には、図3に示すように、本実施形態の培地充填用気泡除去装置1は、真空排気装置を備えてなり、真空排気装置は、真空チャンバ10、真空ポンプ11、大気開放弁12、及びフィルタ装置13を有するものとすることが好ましい。

真空チャンバ10は滅菌機能を有しており、大気開放弁12は、真空チャ

ンバ１０及び真空ポンプ１１の間の配管部材に接続して備えられている。この滅菌機能としては、例えば、ＵＶランプや１６０℃、２時間の乾熱滅菌などによるものとすることができる。また、フィルタ装置１３は、大気開放弁１２が備えられた配管部材の端部に備えられている。

[0037] 本実施形態の培地充填用気泡除去装置は、真空チャンバ１０に収容された培養容器の培地充填液における溶存空気量が５０％以下になるように、真空ポンプ１１によって真空引きを行う。

[0038] そこで、本実施形態の培地充填方法を、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、凹部に溜まった気泡を除去する培地充填方法であって、培養容器に培地充填液を充填した後、培地充填液を充填した状態で培養容器を真空排気装置に入れて、培地充填液における溶存空気量が５０％以下になるように真空引きを行う方法とすることも好ましい。

[0039] また、このとき、培養容器の培養面が水平になるように真空排気装置内に配置し、培養容器を押圧板により押圧して、真空引きを行うことも好ましい。

例えば、培養容器の上面にガイドピンに沿って上下移動する押圧板を載せ、この押圧板の自重により培養容器を一定の圧力で押圧するように固定して、真空引きを行うことができる。また、ガイドピンにバネ材を設置し、押圧板を培養容器に適宜押し付けることによって、実現することも可能である。

本実施形態の培地充填方法をこのような方法にすれば、培養容器のサイズが比較的大きい場合でも、培養容器の全ての凹部から気泡を適切に除去することが可能である。

[0040] また、本実施形態の培養容器は、このような本実施形態の培地充填方法に用いられる複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器であって、培養容器が、軟包材からなる閉鎖系の培養バッグであり、チューブを接続したポートを有し、チューブの端部にフィルタを備えた構成とすることが好ましい。

[0041] 具体的には、図4に示すように、本実施形態の培養容器2は、容器本体20に多数の微小な凹部21を備え、またポート22を備えている。ポート22にはチューブ23が接続され、他方の端部にフィルタ装置24が配置されている。このフィルタ装置24には無菌フィルタ241が備えられている。

無菌フィルタ241としては、例えば0.2 μm や0.45 μm の孔を有するメンブレンフィルタや多孔質膜などを用いることができる。

[0042] また、本実施形態の培養容器2の凹部21における開口部の円又は内接円の直径は、2 mm以下であることが好ましく、1.5 mm以下であることがより好ましく、1.0 mm以下であることがさらに好ましい。また、0.5 mm以下、0.2 mm以下、0.1 mm以下等にしてもよいが、0.3 mm～0.5 mmとすることが特に好ましい。

[0043] また、本実施形態の培養容器2の凹部21の深さは、2 mm以下であることが好ましく、1.5 mm以下であることがより好ましく、1.0 mm以下であることがさらに好ましく、0.3 mm～0.5 mmとすることが特に好ましい。なお、凹部21において貫通孔は形成されていない。

[0044] 本実施形態の培養容器2の材料としては、ポリエチレン、エチレン- α -オレフィンの共重合体、環状オレフィンコポリマー、エチレン-酢酸ビニル共重合体、アイオノマー、エチレンとアクリル酸やメタクリル酸共重合体と金属イオンを用いたアイオノマー等を挙げることができる。また、ポリオレフィン、スチレン系エラストマー、ポリエステル系熱可塑性エラストマー、シリコン系熱可塑性エラストマー、シリコン樹脂等を用いることもできる。さらに、ポリウレタン系熱可塑性エラストマー、ポリエステル系熱可塑性エラストマー、シリコン系熱可塑性エラストマー、スチレン系エラストマー、フッ素系樹脂等、またはそれらを組み合わせて用いることが好ましく、ポリエチレン系樹脂を用いることが特に好ましい。

[0045] 本実施形態の培地充填用気泡除去装置の真空チャンバ10に、培養容器2を収容して、真空引きすることで、培養容器2における培地充填液が脱気されて凹部21から気泡が除去されるようになっている。

このとき、真空チャンバ内において、培養容器 2 の内外で圧力差がないため、容器が破裂することはない。

[0046] また、図 4 に示す培養容器 2 に、培養面が直立した状態で、培養面の半分が浸漬する程度に培地充填液を充填して真空引きを行うと、培地充填液が毛细管現象により培養面全体に伝わり、凹部 2 1 が培地充填液により濡れることで、気泡が凹部 2 1 から除去されて、チューブ 2 3 を通じて培養容器 2 の外部へ排出される。

このような本実施形態の培地充填用気泡除去装置を用いる真空引き方式によれば、上述した本実施形態の培地充填液を用いる脱気方式に比較して、極めて短時間で凹部における気泡を除去することが可能である。

[0047] さらに、本実施形態の培地充填用気泡除去装置を用いるにあたり、培養容器としては、本実施形態の培養容器に限定されず、シャーレなどのリジッドで凹部を有する培養容器を使用することもできる。

この場合でも、本実施形態の培地充填用気泡除去装置を用いることで、培養容器の凹部から気泡を効率的に除去することが可能である。またこの場合、シャーレ本体と蓋の隙間で空気の出し入れが行われ、極端に強い大気開放をしない限り基本的には汚染することなく、隙間から空気を抜くことが可能になっている。

[0048] また、本実施形態の培地充填用気泡除去装置における真空チャンバ 1 0 を、脱気モジュールで構成することによって、培地充填液を脱気モジュールに通液して真空引きを行い、培地充填液を脱気する構成とすることも可能である。

実施例

[0049] 以下、本発明の実施形態に係る培地充填液、及びこれを用いた培地充填方法の実施例等、これらの効果を確認するために行った試験、並びに本発明の実施形態に係る培養容器、及びこれを用いた培地充填方法の実施例等について説明する。

[0050] (実施例 1)

まず、本実施形態の培地充填液を次のように作成した。

培地（StemFit AK02N（味の素株式会社、品番RCAK02N））500 mLを1 Lのボトルに入れ、これを真空排気装置（ヤマト科学株式会社、ADP300）内に静置して真空引きを行った。真空引きは、室温22℃の状態で20 Torrの真空度で、1分程度保持することにより行った。これにより、溶存空気量が10%以下に脱気された培地充填液を得た。

[0051] 次に、得られた培地充填液をマイクロウェルプレート（株式会社クラレ、品番SQ200）に充填して、12時間静置させた。マイクロウェルプレートは、四角錐状の凹部を複数備えており、凹部の開口部は一辺0.2 mm、凹部の深さは0.5 mmであった。

培地充填液を充填した直後のマイクロウェルプレートにおける凹部の写真を図1（右側）に示す。また、12時間経過後のマイクロウェルプレートにおける凹部の写真を図2（実施例1）に示す。

[0052] これらの図に示されるように、培地充填液を充填した直後のマイクロウェルプレートでは、全ての凹部に気泡が溜まっていることが分かる。

これに対して、培地充填液を充填して12時間経過後のマイクロウェルプレートでは、全ての凹部から気泡が除去されていることが分かる。

このように、本実施形態の培地充填液によれば、微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去できることが明らかとなった。

[0053] （比較例1）

次に、脱気を行っていない通常の培地として、所定量のStemFit AK02N（味の素株式会社、品番RCAK02N）をマイクロウェルプレート（株式会社クラレ、品番SQ200）に充填して12時間静置させた。マイクロウェルプレートは、実施例1のものと同一である。

培地充填液を充填した直後のマイクロウェルプレートにおける凹部は、図1（右側）と同様の状態であった。また、12時間経過後のマイクロウェルプレートにおける凹部の写真を図2（比較例1）に示す。

[0054] このように、通常の培地を充填して12時間経過後のマイクロウェルプレ

ートでは、一部の凹部から気泡が除去されているものの、多くの凹部には気泡が残存していることが分かる。

[0055] (試験1)

次に、実施例1の気泡が除去されたマイクロウェルプレートを用いて、スフェアを形成させた試験について説明する。

具体的には、このマイクロウェルプレートに10 mM Y-27632（和光純薬工業株式会社）を含むStemFit AK02N（味の素株式会社、品番RCAK02N）を通液して、脱気に使用した培地充填液を当該培地に置き換えた。

[0056] 次に、このマイクロウェルプレートの各凹部にiPS細胞（1231A3株）が500個ずつ収容されるように播種し、48時間培養してスフェアの形成を行った。その結果を図5（試験1）に示す。

同図に示されるように、各凹部において、スフェアが形成されていることが分かる。

このように、本実施形態の培地充填液によって気泡が除去されたマイクロウェルプレートを用いることで、スフェアを好適に形成できることが明らかとなった。

[0057] (試験2)

次に、比較例1の気泡が除去されていないマイクロウェルプレートを用いて、スフェアを形成させた試験について説明する。

具体的には、このマイクロウェルプレートの培地に10 mM Y-27632（和光純薬工業株式会社）を添加して、各凹部にiPS細胞（1231A3株）が500個ずつ収容されるように播種し、48時間培養してスフェアの形成を行った。その結果を図5（試験2）に示す。

同図に示されるように、各凹部に気泡が溜まっているため、凹部間の培養面に多くの細胞が堆積し、スフェアを適切に形成することができなかった。

[0058] (実施例2)

培養容器として、図4の培養容器2に示すものを準備した。

培養容器の材料としては、ポリエチレン（東洋製罐製培養バッグ）を使用

し、100mm×70mmの2枚のフィルムを作成した。培養容器の培養面には、開口部の直径が0.3mm、深さの0.2mmの凹部を0.4mmの間隔で形成した。そして、培養面を形成したフィルムと、もう一方のフィルムをヒートシールにより貼り合わせた。このとき、ポートを1つ形成し、このポートにチューブを介して無菌フィルタ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、0.45μmメンブレンフィルタ723-2545）を接続した。

[0059] この培養容器に、培養面が直立した状態で、培養面の半分程度が浸漬するように、培地充填液として、培地（StemFit AK02N（味の素株式会社、品番RC AK02N））を充填した。そして、そのまま培養面が直立した状態で、真空排気装置（ヤマト科学株式会社、ADP300）内に静置し、真空引きを行った。

真空引きは、室温22℃の状態で20Torrの真空度で、1分程度保持することにより行った。これにより、培地充填液における溶存空気量を10%以下にすることができる。

その結果、培地充填液が毛細管現象により培養面全体に伝わり、凹部が培地充填液により濡れることによって、気泡を全ての凹部から除去することができた。

[0060] （実施例3）

培養容器として、実施例2と同様の構成を備え、サイズがより大きいものを準備した。

培養容器の材料としては、ポリエチレン（東洋製罐製培養バッグ）を使用し、300mm×200mmの2枚のフィルムを作成した。培養容器の培養面には、開口部の直径が0.3mm、深さの0.2mmの凹部を0.4mmの間隔で形成した。そして、培養面を形成したフィルムと、もう一方のフィルムをヒートシールにより貼り合わせた。このとき、ポートを1つ形成し、このポートにチューブを介して無菌フィルタ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、0.45μmメンブレンフィルタ723-2545）を接続した。

[0061] この培養容器に、培地充填液として、所定量の培地（StemFit AK02N（味の素株式会社、品番RCAK02N））を充填した。そして、真空排気装置（ヤマト科学株式会社、ADP300）内に静置して、真空引きを行った。

真空引きは、室温 22℃の状態 で 20 Torr の真空度で、1 分程度保持することにより行った。これにより、培地充填液における溶存空気量を 10% 以下にすることができる。

[0062] このとき、図 6 に示すように、培養容器の培養面が水平になるように、培養容器を真空排気装置内に配置した。そして、培養容器の上面にガイドピン 5 に沿って上下移動する重さ 2 kg の押圧板 4 を載せ、この押圧板 4 の自重により培養容器を一定の圧力で押圧するように固定した。

[0063] その結果、培地充填液 3 の沸騰により生じた気体が、直径 50 mm 程度の比較的大きい気泡にまとまって培養容器内の上方へ移動し、そのまとまった大きな気泡 6 がポート側の引圧に引かれ、ポートを介して培養容器から排出された。この際、気体の発生とポートからの排出に伴って、押圧板は上下に移動した。また、培地充填液 3 からの気体の発生が終了すると、押圧板は静止し、培養容器における全ての凹部から気泡は除去されていた。

[0064] （参考例 1）

実施例 3 で作成した培養容器を用いて、実施例 3 と異なる態様で真空引きを行った。

具体的には、図 7 に示すように、この培養容器に、培養面が直立した状態で、培養面の半分程度が浸漬するように、培地充填液として、培地（StemFit AK02N（味の素株式会社、品番RCAK02N））を充填した。なお、図 7 において、培養容器の培養面に形成されている凹部は省略している。

[0065] そして、そのまま培養面が直立した状態で、真空排気装置（ヤマト科学株式会社、ADP300）内に静置し、真空引きを行った。真空引きは、室温 22℃の状態 で 20 Torr の真空度で、1 分程度保持することにより行った。

[0066] その結果、培養容器の培養面全体に培地充填液が移動することができず、全ての凹部の気泡を除去することはできなかった。

すなわち、培養容器のサイズが大きいと、それに応じて培養面全体を濡らすために必要な培地充填液の量が多く必要になるが、培養面が直立した状態で設置すると、図7のように培地充填液が下方に多く溜まってしまう。このため、2枚のフィルムが離れ、毛細管現象が生じ得る状態にならず、培地充填液に浸漬していない上方の凹部の気泡を除去することができなかった。

[0067] (参考例2)

実施例3で作成した培養容器を用いて、実施例3と異なる態様で真空引きを行った。

具体的には、この培養容器に、培地充填液として、所定量の培地 (StemFit AK02N (味の素株式会社, 品番RCAK02N)) を充填した。そして、図8に示すように、培養面が水平になるように、真空排気装置 (ヤマト科学株式会社, ADP300) 内に静置して、真空引きを行った。真空引きは、室温22℃の状態で20Torrの真空度で、1分程度保持することにより行った。なお、図8において、培養容器の培養面に形成されている凹部は省略している。

[0068] その結果、培地充填液の沸騰により生じた気体が、培養容器の中央に溜まって培養容器が大きく膨らみ、ポートから気体を適切に排出することができず、培養容器の凹部から気泡を十分に除去することができなかった。

すなわち、押圧板がないため、まとまった気泡が中央に集まって、ポートが培地充填液で塞がれてしまい、気泡がポート側に移動できなかった。そして、培養容器内と外部の圧力差が増大し、培養容器のフィルム材を伸ばしてしまう程に気泡が膨らみ、気泡を排出することはできなかった。

[0069] このように培養容器のサイズが比較的大きい場合は、培養面が水平になるように、培養容器を真空排気装置内に静置させると共に、培地充填液が沸騰して生じる気体により培養容器の中央が膨らむことを防止するために、実施例3に示すように、培養容器の上方から一定の荷重が掛かるように押圧板を配置して、真空引きを行うことが好ましい。これにより、培養容器の膨らみが抑えられて気体をポートから適切に排出することができ、培養容器の全ての凹部から気泡を除去することが可能である。

[0070] 以上説明したように、本発明の培地充填液、培地充填方法、培養容器、及び培地充填用気泡除去装置によれば、微小凹部を有する培養容器を用いて細胞を培養するにあたり、微小凹部に溜まった気泡を効率よく除去することができ、またこれを培養面の大きな培養容器に適用することが可能である。

[0071] 本発明は、以上の実施形態及び実施例に限定されるものではなく、本発明の範囲内において、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、培養容器として、例えば50万個～100万個のスフェアを形成可能な大きさのものを用いるなど適宜変更することが可能である。

産業上の利用可能性

[0072] 本発明は、スフェアなどの培養対象物を効率的に大量に作成する場合などに、好適に利用することが可能である。

[0073] この明細書に記載の文献及び本願のパリ優先の基礎となる日本出願明細書の内容を全てここに援用する。

符号の説明

- [0074]
- 1 培地充填用気泡除去装置
 - 10 真空チャンバ
 - 11 真空ポンプ
 - 12 大気開放弁
 - 13 フィルタ装置
 - 2, 2a 培養容器
 - 20, 20a 容器本体
 - 21 凹部
 - 22 ポート
 - 23 チューブ
 - 24, 24a フィルタ装置
 - 241 無菌フィルタ
 - 3 培地充填液
 - 4 押圧板

5 ガイドピン

6 気泡

請求の範囲

- [請求項1] 複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填液であって、脱気されていることを特徴とする培地充填液。
- [請求項2] 溶存空気量が50%以下に脱気されていることを特徴とする請求項1記載の培地充填液。
- [請求項3] 培地、生理食塩水、又はリン酸緩衝液のいずれかを脱気させて得られたことを特徴とする請求項1又は2記載の培地充填液。
- [請求項4] ガスバリア性を有する容器に封入されていることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の培地充填液。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれかに記載の培地充填液を、複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に充填して一定時間静置させ、ついで前記培養容器に培地を通液して、前記培地充填液を培地に置き換えることを特徴とする培地充填方法。
- [請求項6] 前記複数の凹部における開口部の円又は内接円の直径が2mm以下であることを特徴とする請求項5記載の培地充填方法。
- [請求項7] 複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填方法であって、
前記培養容器に培地充填液を充填した後、前記培地充填液を充填した状態で前記培養容器を真空排気装置に入れて、前記培地充填液における溶存空気量が50%以下になるように真空引きを行う
ことを特徴とする培地充填方法。
- [請求項8] 前記培養容器の培養面が水平になるように、前記培養容器を前記真空排気装置内に配置し、前記培養容器を押圧板により押圧して、真空引きを行う
ことを特徴とする請求項7記載の培地充填方法。
- [請求項9] 請求項7又は8記載の培地充填方法に用いられる複数の凹部が形成

された培養面を有する培養容器であって、

前記培養容器が、軟包材からなる閉鎖系の培養バッグであり、チューブを接続したポートを有し、前記チューブの端部にフィルタを備えた

ことを特徴とする培養容器。

[請求項10] 前記複数の凹部における開口部の円又は内接円の直径が2 mm以下であることを特徴とする請求項9記載の培養容器。

[請求項11] 複数の凹部が形成された培養面を有する培養容器に培地を充填する際に、培地の充填に先立って、前記凹部に溜まった気泡を除去する培地充填用気泡除去装置であって、

真空排気装置を備え、

前記培養容器に培地充填液を充填した後、前記培地充填液を充填した状態で前記培養容器を前記真空排気装置に入れて真空引きを行う

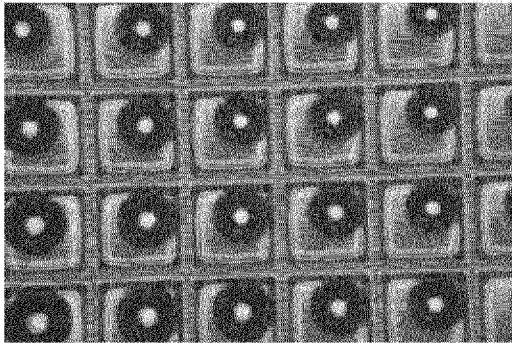
ことを特徴とする培地充填用気泡除去装置。

[請求項12] 前記培地充填液における溶存空気量が50%以下になるように、前記真空引きを行うことを特徴とする請求項11記載の培地充填用気泡除去装置。

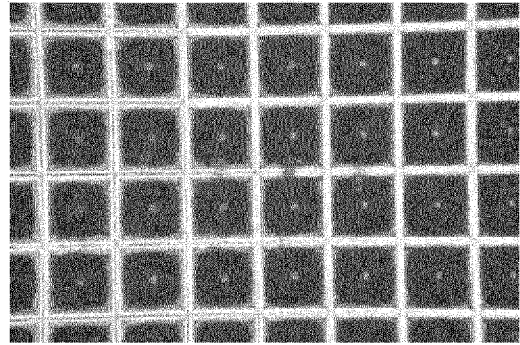
[請求項13] 前記真空排気装置が、真空チャンバと、真空ポンプと、前記真空チャンバ及び前記真空ポンプの間に大気開放弁とを備え、前記真空チャンバが滅菌機能を有し、前記大気開放弁が備えられた配管部材の端部にフィルタを有することを特徴とする請求項11又は12記載の培地充填用気泡除去装置。

[図1]

(箱形のウェル 培地充填直後)

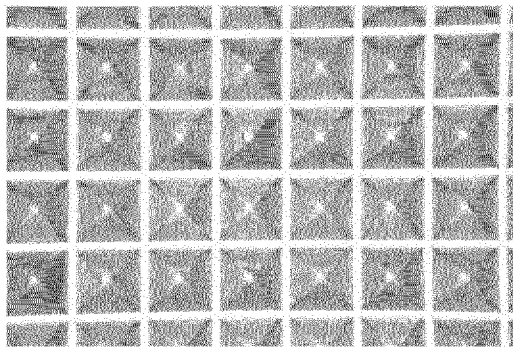


(四角錐状のウェル 培地充填直後)

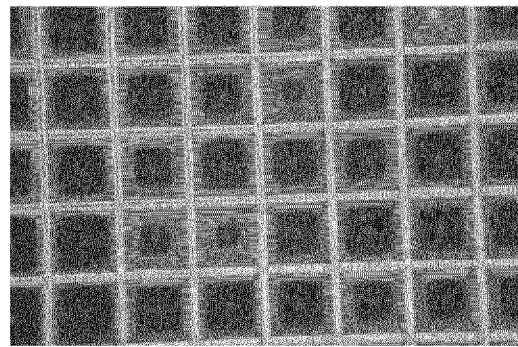


[図2]

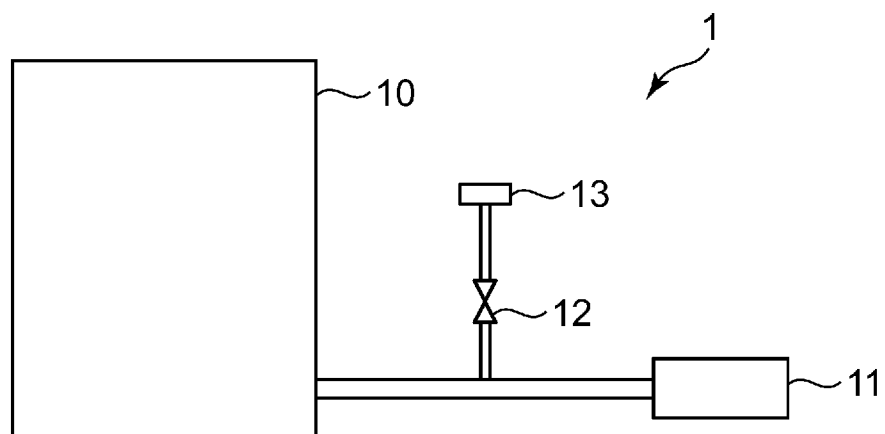
(実施例1)



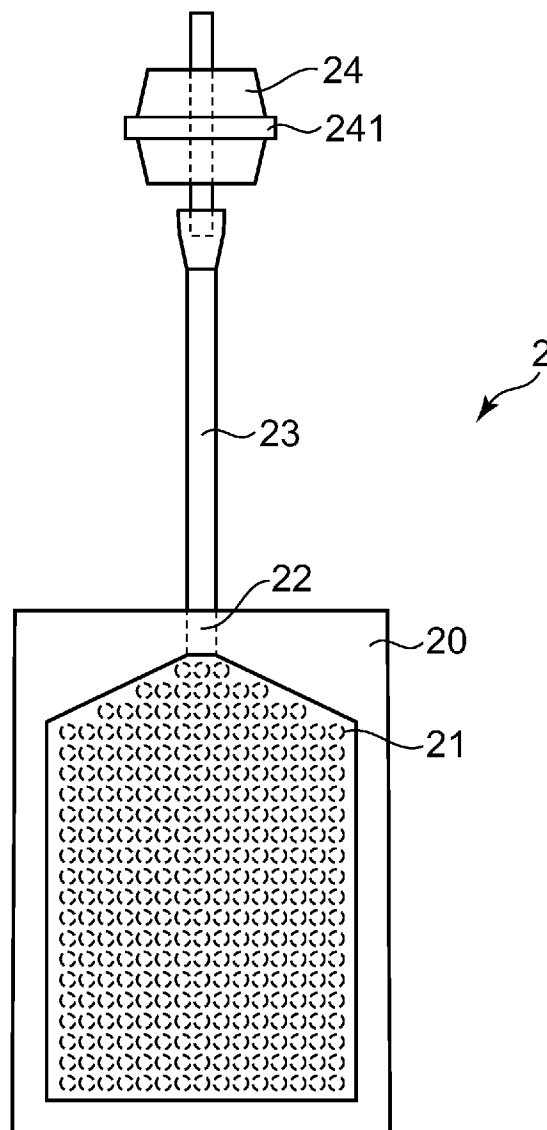
(比較例1)



[図3]

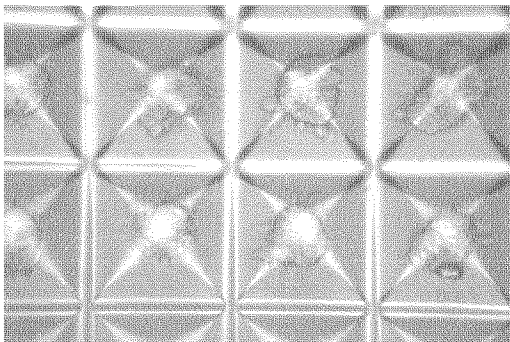


[図4]

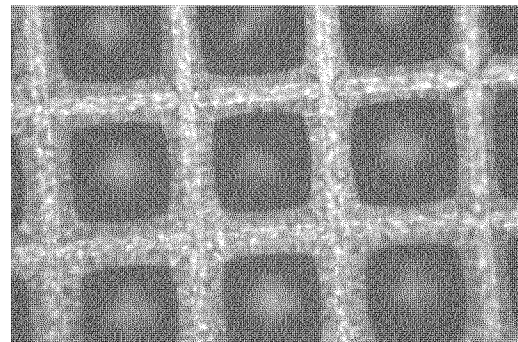


[図5]

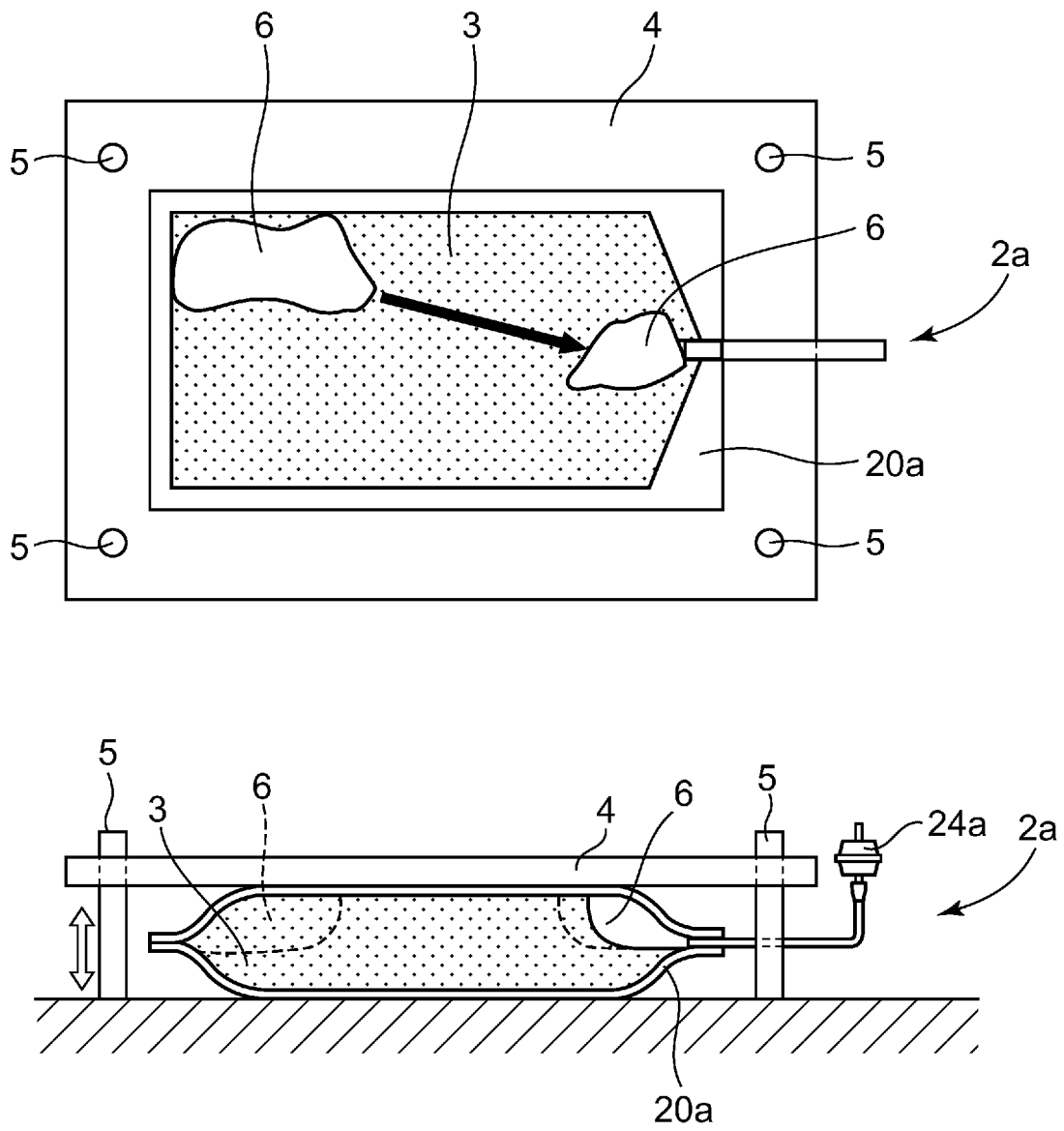
(試験1)



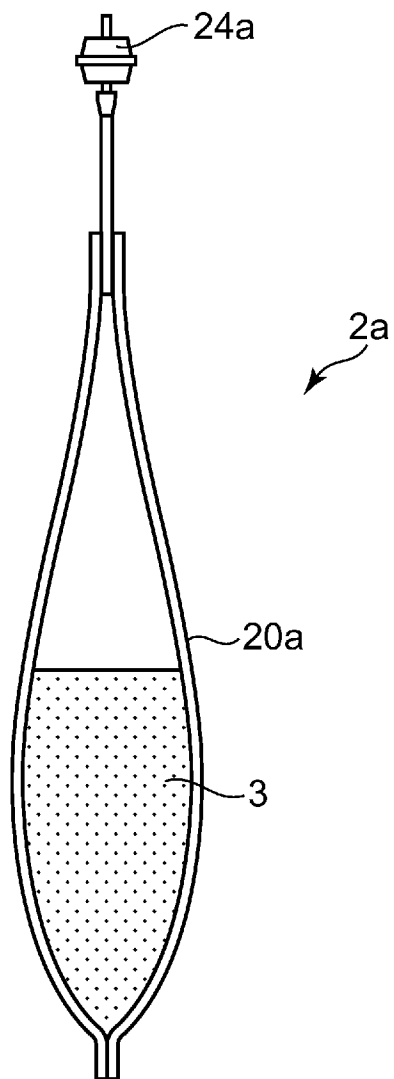
(試験2)



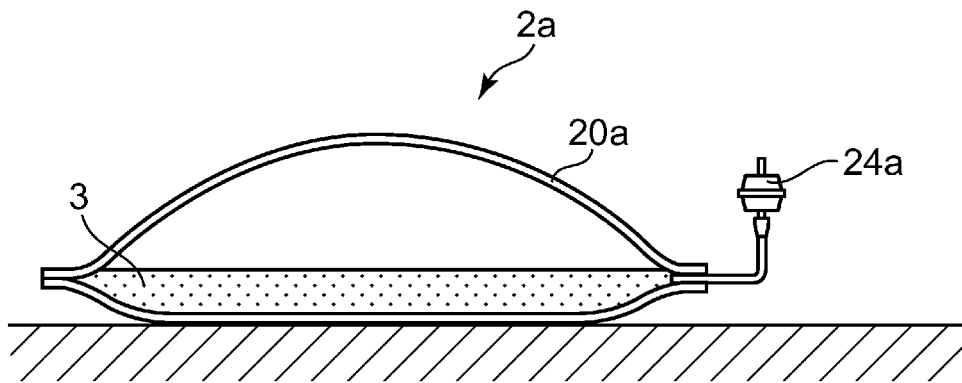
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12M1/00 (2006.01) i, C12M3/00 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) n,
C12N1/00 (2006.01) i, F04B37/16 (2006.01) i

FI: C12N1/00 F, C12M1/00 C, G12M3/00 A, F04B37/16 Z, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. G12M1/00, C12M3/00, C12N5/10, C12N1/00, F04B37/16

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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.
X A	MIWA, Aya and KUDO, Nobuki, Study on Effects of Pressure and Duration of Ultrasound Pulse on Pulsation of Cultured Cardiomyocytes, 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2016, pp. 1-4, abstract, page 1, right column, third and fourth paragraphs, page 2, right column, third to fifth paragraphs, fig. 1	1-4 5-13
X A	WO 2017/170335 A1 (TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.) 05 October 2017, paragraphs [0007]-[0013], [0018], [0025], [0029], [0036], [0037], fig. 1-3	9-10 1-8, 11-13
X A	JP 2018-13278 A (YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD.) 25 January 2018, claims, paragraphs [0045], [0046], fig. 6	11-13 1-10



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
15.01.2020

Date of mailing of the international search report
28.01.2020

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/JP2019/042243

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2015-213497 A (NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.) 03 December 2015, claims, paragraphs [0173], [0177], [0191]	7, 9-13 1-6, 8
Y A	JP 2005-507492 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 17 March 2005, paragraphs [0022], [0043], [0044]	7, 9-13 1-6, 8
Y A	US 2008/0145908 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 June 2008, paragraphs [0063], [0064], fig. 5	7, 9-13 1-6, 8
A	JP 2015-043751 A (DAINIPPON PRINTING CO., LTD.) 12 March 2015, paragraphs [0001]-[0015], [0025]-[0029]	1-13
A	US 2016/0222336 A1 (LEE, Oscar Kuang-Sheng, YEN, Meng-Hua and KUO, Shu-Wen) 04 August 2016, paragraphs [0002]-[0005]	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/042243

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/170335 A1	05.10.2017	US 2019/0031994 A1 paragraphs [0008]- [0014], [0021], [0031], [0035], [0044], [0045] EP 3438237 A1 KR 10-2018-0098407 A CN 108699500 A JP 2017-184716 A (Family: none)	
JP 2018-13278 A	25.01.2018	US 2017/0175078 A1 claims, paragraphs [0495], [0500], [0517]	
JP 2015-213497 A	03.12.2015	WO 2015/163043 A1 EP 3135752 A1	
JP 2005-507492 A	17.03.2005	US 2002/0001546 A1 paragraphs [0056], [0085], [0086] WO 1999/034920 A1 EP 1051259 A1	
US 2008/0145908 A1	19.06.2008	WO 2002/086452 A2	
JP 2015-043751 A	12.03.2015	(Family: none)	
US 2016/0222336 A1	04.08.2016	TW 201627670 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)n; C12N 1/00(2006.01)i; F04B 37/16(2006.01)i FI: C12N1/00 F; C12M1/00 C; C12M3/00 A; F04B37/16 Z; C12N5/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M1/00; C12M3/00; C12N5/10; C12N1/00; F04B37/16		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/Biosis/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	MIWA, Aya and KUDO, Nobuki, Study on Effects of Pressure and Duration of Ultrasound Pulse on Pulsation of Cultured Cardiomyocytes, 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2016, pp. 1-4 要約、第1頁右欄第3-4段落、第2頁右欄第3-5段落、Fig.1	1-4
A		5-13
X	WO 2017/170335 A1（東洋製罐グループホールディングス株式会社）05.10.2017 (2017-10-05) [0007]-[0013]、[0018]、[0025]、[0029]、 [0036]-[0037]、図1-3	9-10
A		1-8, 11-13
X	JP 2018-13278 A（ヤマト科学株式会社）25.01.2018 (2018-01-25) 特許請求の範囲、[0045]-[0046]、図6	11-13
A		1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.01.2020		国際調査報告の発送日 28.01.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 堂畑 厚志 4N 7880 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2015-213497 A (株式会社日本触媒) 03.12.2015 (2015 - 12 - 03) 特許請求の範囲、[0173]、[0177]、[0191]	7, 9 - 13 1-6, 8
Y A	JP 2005-507492 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 17.03.2005 (2005 - 03 - 17) [0022]、[0043] - [0044]	7, 9 - 13 1-6, 8
Y A	US 2008/0145908 A1 (President and Fellows of Harvard College) 19.06.2008 (2008 - 06 - 19) [0063] - [0064]、Fig. 5	7, 9 - 13 1-6, 8
A	JP 2015-043751 A (大日本印刷株式会社) 12.03.2015 (2015 - 03 - 12) [0001] - [0015]、[0025] - [0029]	1-13
A	US 2016/0222336 A1 (LEE, Oscar Kuang-Sheng, YEN, Meng-Hua and KUO, Shu-Wen) 04.08.2016 (2016 - 08 - 04) [0002] - [0005]	1-13

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/042243

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/170335	A1	05.10.2017	US 2019/0031994 A1 [0008]-[0014], [0021], [0031], [0035], [0044]- [0045] EP 3438237 A1 KR 10-2018-0098407 A CN 108699500 A JP 2017-184716 A	
JP	2018-13278	A	25.01.2018	(ファミリーなし)	
JP	2015-213497	A	03.12.2015	US 2017/0175078 A1 claims, [0495], [0500], [0517] WO 2015/163043 A1 EP 3135752 A1	
JP	2005-507492	A	17.03.2005	US 2002/0001546 A1 [0056], [0085]-[0086] WO 1999/034920 A1 EP 1051259 A1	
US	2008/0145908	A1	19.06.2008	WO 2002/086452 A2	
JP	2015-043751	A	12.03.2015	(ファミリーなし)	
US	2016/0222336	A1	04.08.2016	TW 201627670 A	