(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7102734号
(P7102734)

(45)発行日　令和4年7月20日(2022.7.20)

(24)登録日　令和4年7月11日(2022.7.11)

(51)国際特許分類		FI		
C12N	*1/00 (2006.01)*	C12N	1/00	A
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	
C12M	*1/00 (2006.01)*	C12M	1/00	A
C12M	*3/00 (2006.01)*	C12M	3/00	A

請求項の数　15　（全16頁）

(21)出願番号　特願2018-1091(P2018-1091)
(22)出願日　平成30年1月9日(2018.1.9)
(65)公開番号　特開2019-118319(P2019-118319A)
(43)公開日　令和1年7月22日(2019.7.22)
審査請求日　令和2年12月23日(2020.12.23)

(73)特許権者　000003768
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弁理士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 綜合研究所内
(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 綜合研究所内
審査官　山本 晋也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞培養方法及び装置

(57)【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、前記下面フィルムに細胞培養部となる複数の凹部が形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る細胞培養バッグを用いて、前記複数の凹部において細胞又は細胞の凝集塊を培養する細胞培養方法であって、
細胞又は細胞の凝集塊を培養する際に、
前記バッグ本体に収容された培地を前記ポートから排出して、前記上面フィルムで前記複数の凹部を閉塞して前記複数の凹部内で培養されている細胞又は細胞の凝集塊を閉じ込める閉塞工程と、
前記上面フィルムによって閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、当該凹部の内面に接着している前記細胞又は細胞の凝集塊を剥離する剥離工程と
を有することを特徴とする、細胞培養方法。
【請求項２】
前記剥離工程において、閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、前記細胞培養バッグの外部から前記凹部に物理的な刺激を与えて、当該凹部の内面に接着している細胞又は細胞の凝集塊を剥離する
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】
前記剥離工程において、閉塞された前記複数の凹部のうちの一部又は全部の凹部に振動又

は揺動を与える
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】
前記剥離工程において、閉塞された前記複数の凹部のうちの一部又は全部の凹部を外側から突く
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】
前記剥離工程において、前記複数の凹部を閉塞したまま、前記細胞培養バッグを上下反転及び／又は傾斜させる
ことを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞培養方法。
【請求項６】
前記剥離工程において、前記複数の凹部の一部の凹部内の細胞又は細胞の凝集塊を選択的に剥離し、
前記剥離工程に続いて、
前記ポートから前記バッグ本体内に培地を注入して、前記上面フィルムによる前記複数の凹部の閉塞を解除する解除工程と、
前記剥離工程において選択的に剥離した細胞又は細胞の凝集塊を、培地と共に前記ポートから前記バッグ本体の外部へ排出する排出工程と
を有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】
前記排出工程において、前記細胞培養バッグを上下反転させた状態で、前記選択的に剥離した細胞又は細胞の凝集塊を、培地と共に前記ポートから前記バッグ本体の外部へ排出する
ことを特徴とする、請求項６記載の細胞培養方法。
【請求項８】
前記排出工程において、前記ポートが前記複数の凹部よりも下方に位置するように、前記細胞培養バッグを傾斜させた状態で、前記選択的に剥離した細胞又は細胞の凝集塊を、培地と共に前記ポートから前記バッグ本体の外部へ排出する
ことを特徴とする、請求項７記載の細胞培養方法。
【請求項９】
前記閉塞工程において、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、請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞培養方法。
【請求項１０】
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、前記下面フィルムに細胞培養部となる複数の凹部が形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る細胞培養バッグと、
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、
前記複数の凹部内で培養されている細胞又は細胞の凝集塊を閉じ込めるように、前記上面フィルムで前記複数の凹部が閉塞されるまで、前記バッグ本体に収容された培地を前記ポートから排出する送液手段と、
前記上面フィルムによって閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、当該凹部の内面に接着している前記細胞又は細胞の凝集塊を剥離する剥離手段と
を備えることを特徴とする、細胞培養装置。
【請求項１１】
前記剥離手段は、閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、当該凹部の内面に接着している細胞又は細胞の凝集塊を剥離させるために、前記細胞培養バッグの外部から当該凹部に物理的な刺激を与える
ことを特徴とする、請求項１０記載の細胞培養装置。
【請求項１２】
前記剥離手段は、閉塞された前記複数の凹部のうちの一部又は全部の凹部に振動又は揺動を与える

ことを特徴とする、請求項１０又は１１記載の細胞培養装置。
【請求項１３】
前記剥離手段は、閉塞された前記複数の凹部のうちの一部又は全部の凹部を下方から突き上げる突上げ部材と、
前記突上げ部材を上下動させるアクチュエータと
を備え、
前記架台の前記載置面に、前記突上げ部材が上下動可能な開口部が形成されている
ことを特徴とする、請求項１０～１２のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
【請求項１４】
前記剥離手段は、前記複数の凹部のうちの一部の凹部の内面に接着した細胞を選択的に剥離し、
前記送液手段は、前記ポートから前記バッグ本体内に培地を注入して、前記上面フィルムによる前記複数の凹部の閉塞を解除し、次いで、前記剥離手段により選択的に剥離された細胞又は細胞の凝集塊を培地と共に前記ポートから前記バッグ本体の外部へ排出する
ことを特徴とする、請求項１０～１３のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
【請求項１５】
前記細胞培養バッグの前記上面フィルムを上方から押圧する押圧部材を更に備える
ことを特徴とする、請求項１０～１４のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
【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、複数の凹部を設けた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。
【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。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。
【０００４】
ところで、細胞培養においては、一般に、細胞の増殖に伴い培地中の細胞濃度が高くなり過ぎると、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て細胞の増殖効率が低下し、一方、培地中の細胞濃度が低過ぎても、細胞の増殖・分化誘導の効率が低下する。このため、細胞の培養・分化誘導効率を向上させるためには、細胞濃度を適正な範囲に維持する必要がある。
【０００５】
複数の凹部を設けた細胞培養バッグを使用してスフェロイド培養を行う場合においても、各凹部で細胞濃度を適正な範囲に維持する必要があり、そのため、各凹部の細胞数が均一になるように、各凹部に細胞が播種される。
【０００６】
さらに、かかるスフェロイド培養では、各凹部で均一で適切な大きさのスフェロイド（細胞の凝集塊）を形成させるため、各凹部にスフェロイドを１つずつ形成させ、１つの凹部につき１つの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。
【０００７】
１つの凹部に１つのスフェロイドを形成するためには、細胞培養バッグの内面に、細胞を

接着し難くする細胞低接着処理を施して、細胞を細胞培養バッグの冠球状の凹部の底部中央に集めることが好ましい。細胞低接着処理としては、例えば、リン脂質ポリマー、ポリビニルアルコール誘導体、界面活性剤又はアルブミンのようなタンパク質などをコーティングしてプラスチックフィルムの表面に細胞接着性タンパクが吸着するのを阻害する処理などが挙げられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【文献】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】

【０００９】

ところが、細胞培養バッグに細胞低接着処理を施していても、処理むらや培養細胞の接着力等の種々の要因により、細胞やスフェロイドが凹部の内面に接着することがある。例えば、図１０に示すように、培地Ｓを収容した細胞培養バッグ１の各凹部４に播種した細胞Ｃが、細胞接着性タンパクにより凹部４の内面の複数箇所に接着してしまうことがある。その場合、各細胞Ｃは、接着した位置を起点としてそれぞれスフェロイドを形成するため、１つの凹部４に小さな複数のスフェロイドが形成されてしまう。そして、凹部４の内面に接着しているスフェロイドは移動しないため、スフェロイドどうしが接着して１つのスフェロイドを形成することができない。

【００１０】

このため、各凹部にスフェロイドを１つずつ形成するためには、凹部内面の複数箇所に接着している細胞を剥離させ、凹部内の１カ所（例えば、底部中央）に集める必要がある。

【００１１】

また、各凹部にスフェロイドが１つずつ形成されている場合であっても、スフェロイドが凹部の内面に接着することがある。スフェロイドのうち凹部内面に接着した部分では、培地成分が枯渇しやすく、かつ代謝産物が蓄積しやすいため、スフェロイド全体の細胞の増殖・分化誘導効率が低下してしまう。

このため、スフェロイド培養においては、細胞の増殖・分化誘導効率を向上させるために、凹部内面に接着しているスフェロイドを定期的に（例えば、培地交換時に）剥離させ、スフェロイドの接着位置を変えることが求められる。

【００１２】

従来のウエルプレートを使用した細胞培養であれば、ピペットでウエル（凹部）内の培地に噴流を起こすことによって、ウエルの内面に接着している細胞（例えば、播種直後の細胞、又はスフェロイドを形成している細胞）を剥離することができる。具体的には、ウエルにピペット先端を挿入し、細胞を吸わないようにしながら培地を静かに吸い上げ、次いで、吸い上げた培地を勢い良くウエルに注入して培地に噴流を起こし、噴流によって細胞を剥離することができる。

【００１３】

しかしながら、細胞培養バッグを使用した細胞培養においては、閉鎖系を維持したまま、細胞培養バッグ内の凹部にピペットを挿入することが困難である。

【００１４】

なお、細胞培養バッグを使用した細胞培養において図１１（ａ）に示すように、ポート３から培地Ｓを強く注入して細胞培養バッグ１内に培地Ｓの水流を発生させ、凹部４の内壁に接着している細胞Ｃを剥離させる方法が考えられる。

しかし、この方法では、図１１（ｂ）に示すように、凹部４内に沈殿していた細胞Ｃや剥離した細胞Ｃが他の凹部４へ移動してしまい、各凹部４内の細胞濃度が不均一となってしまう。特に、１つの凹部４に多くの細胞Ｃが入ると、やがて大き過ぎる塊Ｃ’となり、細胞の増殖・分化誘導効率が低下してしまう。

【００１５】

本発明は、上記の事情に鑑みなされたものであり、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、細胞の凹部間の移動を防止しつつ、凹部の内面に接着している細胞又は細胞の凝集塊を剥離させて、細胞又は細胞の凝集塊の増殖・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】

【００１６】

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、前記下面フィルムに細胞培養部となる複数の凹部が形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る細胞培養バッグを用いて、前記複数の凹部において細胞又は細胞の凝集塊を培養する細胞培養方法であって、前記バッグ本体に収容された培地を前記ポートから排出して、前記上面フィルムで前記複数の凹部を閉塞して前記複数の凹部内で培養されている細胞又は細胞の凝集塊を閉じ込める閉塞工程と、前記上面フィルムによって閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、前記細胞培養バッグの外部から前記凹部に物理的な刺激を与えて、当該凹部の内面に接着している前記細胞又は細胞の凝集塊を剥離する剥離工程とを有することを特徴としている。

【００１７】

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、前記下面フィルムに細胞培養部となる複数の凹部が形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る細胞培養バッグと、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、前記複数の凹部内で培養されている細胞又は細胞の凝集塊を閉じ込めるように、前記上面フィルムが前記複数の凹部を閉塞するまで、前記バッグ本体に収容された培地を前記ポートから排出する送液手段と、前記上面フィルムによって閉塞された前記複数の凹部の一部又は全部の凹部において、当該凹部の内面に接着している前記細胞又は細胞の凝集塊を剥離するために、前記細胞培養バッグの外部から当該凹部に物理的な刺激を与える剥離手段とを備えることを特徴としている。

【発明の効果】

【００１８】

本発明の細胞培養方法及び装置によれば、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、細胞の凹部間の移動を防止しつつ、凹部の内面に接着している細胞又は細胞の凝集塊を剥離させて、細胞又は細胞の凝集塊の増殖・分化誘導効率を向上させることができる。

【００１９】

例えば、細胞培養バッグの凹部の内面の複数箇所に接着している場合において、凹部を閉塞して、凹部に物理的な刺激を与えることによって、細胞の凹部間の移動を防止しつつ、細胞を剥離させて一箇所に集合させて、１つの凹部に１つの細胞凝集塊（スフェロイド）を効率良く形成させ、細胞の増殖・分化誘導効率を向上させることができる。

さらに、例えば、細胞培養バッグの凹部の内面に細胞凝集塊が接着している場合において、凹部を閉塞して、凹部に物理的な刺激を与えることによって、細胞凝集塊の凹部間の移動を防止しつつ、細胞凝集塊を剥離させて細胞凝集塊の接着部位を変え、細胞凝集塊の増殖・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】

【００２０】

【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。

【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、本発明の第１実施形態における細胞培養中の状態を示す断面模式図であり、（ｂ）は、本発明の第１実施形態における閉塞工程を示す細胞培養バッグの断面模式図である。

【図４】本発明の第１実施形態における剥離工程を説明する説明する細胞培養バッグの断

面模式図である。
【図５】細胞が播種された１つの凹部内を示す写真であり、（ａ）は、播種から４８時間後の凹部内を示し、（ｂ）は、閉塞工程後の凹部内を示し、（ｃ）は、剥離工程直後の凹部内を示し、（ｄ）は、剥離工程から１５時間後の凹部内を示す。
【図６】本発明の第２実施形態を説明する説明する細胞培養バッグの断面模式図であり、（ａ）は、上下反転させた細胞培養バッグを示し、（ｂ）は、傾斜させた細胞培養バッグを示し、（ｃ）は、上下反転させ、かつ傾斜させた細胞培養バッグを示す。
【図７】本発明の第３実施形態の剥離工程を説明する説明する細胞培養バッグの断面模式図である。
【図８】本発明の第４実施形態に係る細胞培養方法を説明する細胞培養バッグの断面模式図であり、（ａ）は、剥離工程を示し、（ｂ）は、解除工程を示し、（ｃ）は、排出工程を示す。
【図９】本発明の第５実施形態に係る細胞培養方法を説明する細胞培養バッグの断面模式図である。
【図１０】細胞培養バッグの凹部の内面の複数箇所に細胞が接着した状態を示す細胞培養バッグの断面模式図である。
【図１１】（ａ）は、細胞培養バッグ内の凹部からスフェロイドが剥離された状態を示す細胞培養バッグの断面模式図であり、（ｂ）は、細胞培養バッグ内で剥離したスフェロイドが凹部間を移動した状態を示す細胞培養バッグの断面模式図である。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
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。
【００２２】
（細胞培養バッグ）
まず、本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、本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。
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。
【００２３】
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０．３～１０ｍｍ、深さｄが０．１ｍｍ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。
【００２４】
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は球冠状の形状を有している。なお、凹部４の形状は、これに限定されない。例えば、凹部４は、擂り鉢状（円錐状）に窪んだ形状を有していてもよい。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。
【００２５】
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傾斜部分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。

【００２６】

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、ＪＩＳＫ　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、５０００ｍＬ／（ｍ^2・ｄａｙ・ａｔｍ）以上であるのが好ましい。

【００２７】

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。

【００２８】

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３０～２００μｍであるのが好ましい。

【００２９】

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。

【００３０】

（第１実施形態）

次に、図２及び図３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分を押圧する底面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。

なお、図２では、細胞培養バッグ１のポート３から培地の注入、排出を行う送液手段としてのポンプ、細胞培養バッグ１の凹部４からスフェロイドを剥離する剥離手段の図示を省略する。なお、ポンプとしては、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が挙げられる。

なお、送液手段は、ポンプに限定されず、例えば、シリンジであってもよい。

【００３１】

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。

【００３２】

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板状部材であり、平坦な底面６ａを有している。

【００３３】

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磁石７３で構成されている。永久磁石７３同士の間に働く斥力により、押圧部材６は、上面フィルム２１の高さに従って上下に移動する。
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。

【００３４】

次に、図３及び図４を参照して、本実施形態の細胞培養方法を説明する。なお、図３及び図４では、図２に示した細胞培養装置のうち、支持機構７の図示を省略する。
図３（ａ）に示すように、細胞培養中、形成されたスフェロイドＣは、各凹部４に均一な細胞濃度で収容されている。

【００３５】

図３（ｂ）に示すように、閉塞工程では、ポンプ（図示せず）でバッグ本体２に収容された培地Ｓをポート３から排出することによって、上面フィルム２１で複数の凹部４が全て閉塞される。上面フィルム２１を押圧部材６の平坦な底面６ａで押圧しているため、上面フィルム２１が平坦となり、上面フィルム２１で複数の凹部４の各々が確実に閉塞される。これにより、各凹部４内にそれぞれスフェロイドＣが閉じ込められるので、次の剥離工程において、スフェロイドＣの各凹部４からの流出が防止される。
なお、上面フィルム２１による複数の凹部４の閉塞にあたっては、各凹部４を密閉してもよいし、密閉しなくてもよい。複数の凹部４が密閉されない場合には、細胞の凹部４からの流出が阻止できる程度に、複数の凹部４が塞がれていればよい。

【００３６】

次に、図４に示すように、剥離工程では、閉塞された複数の凹部４の一部又は全部において、当該凹部４の内面からスフェロイドＣを剥離する。
剥離工程では、複数の凹部のうちの一部又は全部の凹部４に振動又は揺動を与えるとよい。その場合、細胞培養装置１００全体に、振動又は揺動を与えてもよいし、凹部４を形成している下面フィルム２２に、振動又は揺動の物理的な力を加えてもよい。凹部４に加えられた振動又は揺動は、凹部４の内面に接着したスフェロイドＣにも伝わり、スフェロイドＣが、凹部４内面から剥離する。
なお、振動又は揺動を与える手段として、図４に示した、細胞培養装置の架台５に取り付けられた振動子（バイブレータ）８を用いてもよいし、揺動装置を利用してもよい。また、凹部４に振動子を直接接触させて、凹部４に振動を直接加えてもよい。また、一部の凹部４に、選択的に振動又は揺動を加えてもよい。
また、振動及び揺動は、往復運動でもよいし、例えば試験官ミキサーによる回転運動でもよい。

【００３７】

ここで、図５に、本実施形態において、細胞が播種された１つの凹部４内を示す写真を示す。ここでは、味の素株式会社製の培地（ＳｔｅｍＦｉｔ（登録商標））を使用し、未分化ｉＰＳ細胞（細胞株１２３１Ａ３）を、１つの凹部（ウエル）あたり３×１０^{4}個播種した。

【００３８】

図５（ａ）は、播種から４８時間後の凹部を示す。同図に示すように、播種された細胞は、凹部の底部中央だけでなく、凹部の内面の至る所に接着してスフェロイドを形成している。なお、同図では、凹部の周囲内面に接着しているスフェロイドは、写真の焦点面から離れているため、明瞭に現れていない。

【００３９】

図５（ｂ）は、閉塞工程後の凹部を示す。凹部４を閉塞しただけでは、まだ、スフェロイドは内面の各所に接着したままである。

閉塞工程では、送液手段としてペリスタポンプを使用し、１．０ｍｌ／分の送液速度で、上面フィルム２１が各凹部４を閉塞するまで培地をポート３から排出した。

【００４０】

図５（ｃ）は、剥離工程直後の凹部を示す。振動子８により架台５を振動させた。同図に示すように、凹部４の周囲内面から剥離した多数の小さなスフェロイドが、凹部の底部中央に集まっている。

剥離工程では、剥離手段として振動子８である試験管ミキサー８を使用した。そして、図４に示したように、試験管ミキサー８を細胞培養装置１００の架台５の下面に１分間押し当てることによって、細胞培養バッグ１の各凹部４に外部から物理的な刺激を与えた。試験官ミキサー８としては、振動速度：約２８００回転／分、水平振動式のタイテック社製のプレゼントミキサー６０７６８８１を使用した。

【００４１】

図５（ｄ）は、剥離工程から１５時間後の凹部を示す。剥離工程後、バッグ本体２内に培地を注入し、培養を再開した。同図に示すように、凹部４の底部中央に１つのスフェロイドが形成されている。

【００４２】

このように、本実施形態によれば、スフェロイドの凹部４間の移動を防止しつつ、スフェロイドを内面から剥離させて一箇所に集合させる。これにより、１つの凹部４に１つのスフェロイドを効率良く形成させてスフェロイドの増殖・分化誘導効率を向上させることができる。

【００４３】

さらに、1つの凹部４に１つのスフェロイドが形成されていても、凹部４の内面にスフェロイドが接着している場合には、再度凹部４を閉塞して、凹部４に物理的な刺激を与えることによって、スフェロイドの凹部４間の移動を防止しつつ、スフェロイドを内面から剥離させてスフェロイドの接着部位を変え、スフェロイドの増殖・分化誘導効率を向上させることができる。

【００４４】

（第２実施形態）

次に、図６を参照して、本発明の第２実施形態を説明する。同図では、第1実施形態と同一構成部分の図示を一部省略する。

本実施形態では、第１実施形態で説明した閉塞工程後、剥離工程において、細胞培養バッグの凹部４に外部から物理的な刺激を与える代わりに、図６（ａ）に示すように、各凹部４を閉塞したまま、細胞培養バッグ１を図１に示した細胞培養装置１００ごと上下反転させる。

【００４５】

また、図６（ｂ）に示すように、剥離工程において、凹部に外部から物理的な刺激を与える代わりに、各凹部４を閉塞したまま、細胞培養バッグ１を図１に示した細胞培養装置１００ごと傾斜させてもよい。なお、細胞培養バッグ１の水平に対する傾斜角度は、特に限定されず、例えば、９０度まで傾斜させてもよい。

【００４６】

さらに、図６（ｃ）に示すように、剥離工程において、凹部に外部から物理的な刺激を与える代わりに、各凹部４を閉塞したまま、細胞培養バッグ１を図１に示した細胞培養装置１００ごと上下反転させ、かつ傾斜させてもよい。

【００４７】

このように、本実施形態では、培養バッグ１００を上下反転及び／又は傾斜させるという簡単な操作によって、凹部４の内面に接着していたスフェロイドＣが、重力により剥離するまた、各凹部４が上面フィルム２１で閉塞されているため、剥離した細胞又はスフェロイドＣが他の凹部４へ移動することが回避される。

また、本実施形態は、細胞培養バッグ１の凹部４の内側に接着している細胞及び凝集塊が細胞培養バッグ１を上下反転及び／又は傾斜させただけで剥離する場合に好適である。

【００４８】
なお、細胞培養バッグ１は、人手で上下反転及び／又は傾斜させてもよいし、ロボットアーム等の機構により上下反転及び／又は傾斜させてもよい。
また、上述した第１実施形態の剥離工程において、更に本実施形態のように細胞培養バッグ１を上下反転及び／又は傾斜させてもよい。また、後述の第３及び４実施形態の剥離工程においても、更に本実施形態のように細胞培養バッグ１００を上下反転及び／又は傾斜させてもよい。
【００４９】
（第３実施形態）
次に、図７を参照して、本発明の第３実施形態を説明する。同図では、第1実施形態と同一構成部分の図示を一部省略する。
本実施形態では、第１実施形態で説明した閉塞工程後、剥離工程において、細胞培養バッグの凹部４に振動又は揺動を与える代わりに、複数の凹部４の下方にそれぞれ配置された突上げ部材９によって各凹部を下方から突き上げることによって、各凹部４に物理的な刺激を与える。
【００５０】
突上げ部材９は、架台５の載置面５ａに形成された開口部５ｂ内をアクチュエータ（図示せず）によって上下動する。下側に凸状に湾曲した冠球状の凹部４の底部は、突上げ部材９によって突き上げられ、上側に凸状に湾曲するように膨らみが反転する。凹部４を突き上げることによって、凹部４の内面に接着したスフェロイドＣが剥離する。
【００５１】
凹部４が上側に反転したままとなった場合には、例えば、次に培地をバッグ本体２内に注入した後に、押圧部材６等でバッグ本体２を押圧してバッグ本体２の内圧を上昇させることによって、元の下側に凸状に湾曲した冠球状の形状を回復させることができる。また、例えば、上側に反転した凹部４を下側から吸引することによっても、凹部４の形状を回復させることができる。
【００５２】
なお、図７では、突上げ部材９が全部の凹部４を同時に突き上げた例を示したが、突上げ部材は一部の凹部４を選択的に突き上げてもよい。
また、１つの突上げ部材９が、凹部４を１つずつ順次に突き上げてもよい。その場合、アクチュエータ（図示せず）は、突上げ部材９を上下動させるだけでなく、突上げ部材を水平方向移動させて所望の凹部４の下方に順次に位置決めするように構成するとよい。
また、凹部４を突き上げ部材９で突き上げるとともに、細胞培養バッグ１に振動又は揺動を加えることによって、凹部４に物理的な刺激を与え、凹部４の内面に接着しているスフェロイドＣを剥離してもよい。
【００５３】
このように、細胞培養バッグ１を使用した細胞培養であっても、スフェロイドＣの凹４部間の移動を防止しつつ、凹部４内でスフェロイドＣの接着位置を変えることができる。これにより、細胞の培養・分化誘導効率を向上させることができる。
【００５４】
（第４実施形態）
次に、図８を参照して、本発明の第４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、第２実施形態のものと同じにすることができる。本実施形態では、第１実施形態で説明した閉塞工程後、不要なスフェロイドＣ１を選択的に剥離して排除する。
【００５５】
図８（ａ）に示すように、剥離工程では、閉塞された複数の凹部４のうち、一部の凹部内のスフェロイドＣ１を選択的に剥離する。本実施形態においても、第１実施形態と同じ剥離手段を用いる。
【００５６】

次に、図８（ｂ）に示すように、解除工程では、ポンプでポート３からバッグ本体２内に培地を注入することによって、上面フィルム２１による凹部４の閉塞が解除される。凹部４の閉塞が解除された結果、剥離したスフェロイドＣ１は、当該凹部４の外部へ流出可能な状態となる。

【００５７】

次に、図８（ｃ）に示すように、排出工程では、ポンプでポート３からバッグ本体２内の培地を排出することによって、選択的に剥離したスフェロイドＣ１が、培地Ｓと共に排出される。このようにして、不要なスフェロイドＣ１が選択的に剥離して除去することができる。

不要なスフェロイドＣ１が選択的に剥離、除去される一方、選択されなかった他の凹部４のスフェロイドＣは、各凹部４内面にそれぞれ接着しているため、ポート３から排出されない。

なお、本実施形態では、不要なスフェロイドＣ１を選択したが、選択されるスフェロイドは不要なものに限定されず、例えば、抽出サンプルとして選択してもよい。また、２つ以上の凹部４内のスフェロイドを選択的に剥離することもできる。

【００５８】

（第５実施形態）

次に、図９を参照して、本発明の第５実施形態を説明する。

本実施形態の細胞培養装置の構造は、第４実施形態のものと同じにすることができる。

本実施形態では、第４実施形態で説明した排出工程において、細胞培養バッグ１を上下反転させ、かつ、ポート３が複数の凹部４よりも下方に位置するように、細胞培養バッグ１を傾斜させた状態で、選択的に剥離したスフェロイドＣ１を、培地Ｓと共にポート３からバッグ本体２の外部へ排出する。

【００５９】

なお、細胞培養バッグ１を傾斜させずに上下反転だけさせた状態で、剥離されスフェロイドＣ１を、培地Ｓと共にポート３からバッグ本体２の外部へ排出してもよい。

また、本実施形態は、細胞培養バッグ１の凹部４の内側に接着している細胞及び凝集塊が細胞培養バッグ１を上下反転させただけでは剥離しない場合に好適である。

また、細胞培養バッグ１の上下反転及び／又は傾斜させる操作は、排出工程において実施してもよいし、排出工程よりも前段階で実施してもよい。

【００６０】

このように、細胞培養バッグ１を上下反転させることにより、剥離工程で選択的に剥離されスフェロイドＣ１が凹部４の外部へ移動し、ポート３から容易に排出される。さらに、細胞培養バッグ１を、ポート３が複数の凹部４よりも下方に位置するように傾斜させれば、剥離した巣フェロイドＣ１をポート３からより容易に排出することができる。

【００６１】

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。前述した実施形態では、棒状の突上げ部材を使用したが、突上げ部材の形状はこれに限定されない。また、上述した実施形態では、押圧部材で上面フィルムを押圧した例を説明したが、本発明では押圧部材を省略してもよい。

【００６２】

また、上述した実施形態では、細胞培養バッグの凹部の内面に接着したスフェロイドを剥離する例を説明したが、本発明は、スフェロイドを形成していない細胞を細胞培養バッグの凹部の内面から剥離する場合にも適用することができる。

【産業上の利用可能性】

【００６３】

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。

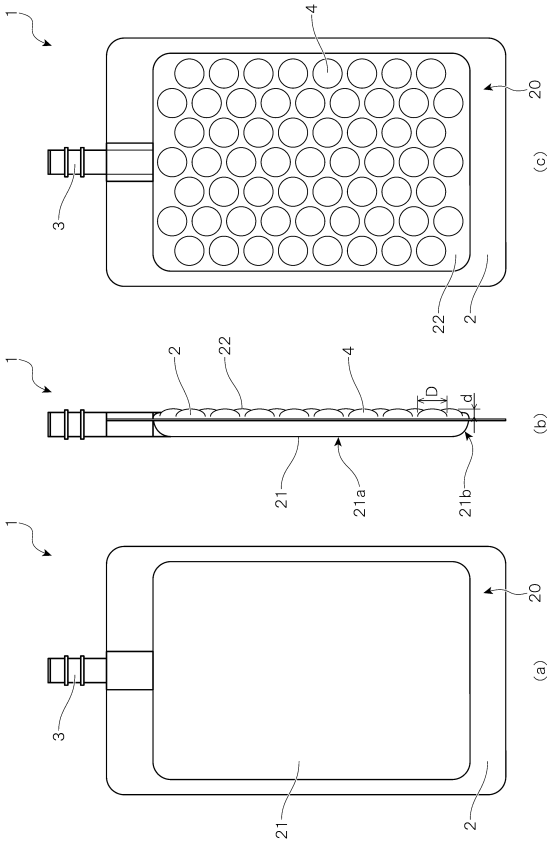
【符号の説明】

【００６４】

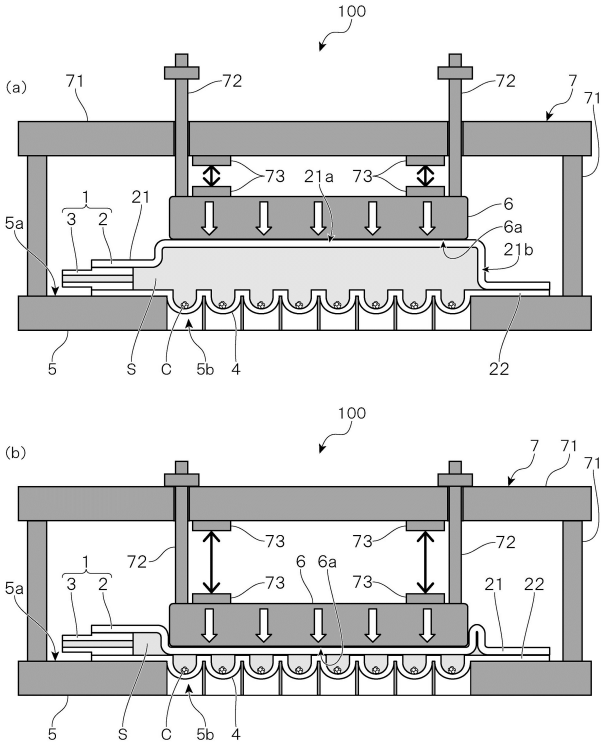
１　細胞培養バッグ
２　バッグ本体
２０　周辺部
２１　上面フィルム
２１ａ　天面部分
２１ｂ　傾斜部分
２２　下面フィルム
３　ポート
４　凹部（ウエル）
５　架台
５ａ　載置面
５ｂ　開口部
６　押圧部材
６ａ　底面
７　支持機構
７１　フレーム
７２　ガイドピン
７３　付勢手段（磁石）
８　振動子（試験管ミキサー）
９　突上げ部材
１００　細胞培養装置
Ｃ，Ｃ’，Ｃ１　細胞又は細胞の凝集塊（スフェロイド）
Ｓ　培地

【図面】

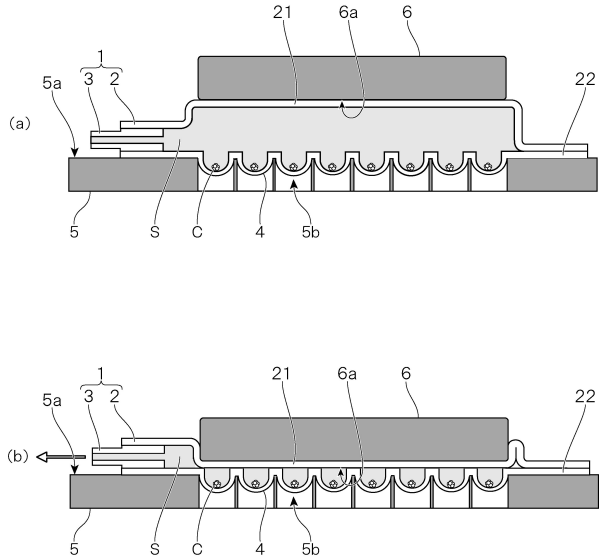
【図１】



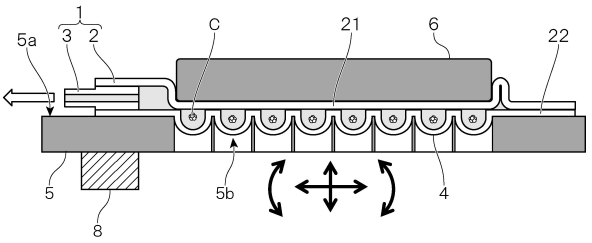
【図２】



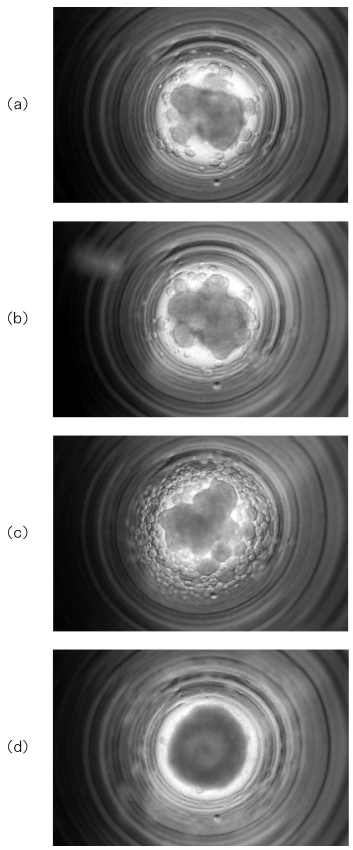
【図３】


(a)
(b)
1
2
3
5a
6
6a
21
22
5
S
C
4
5b

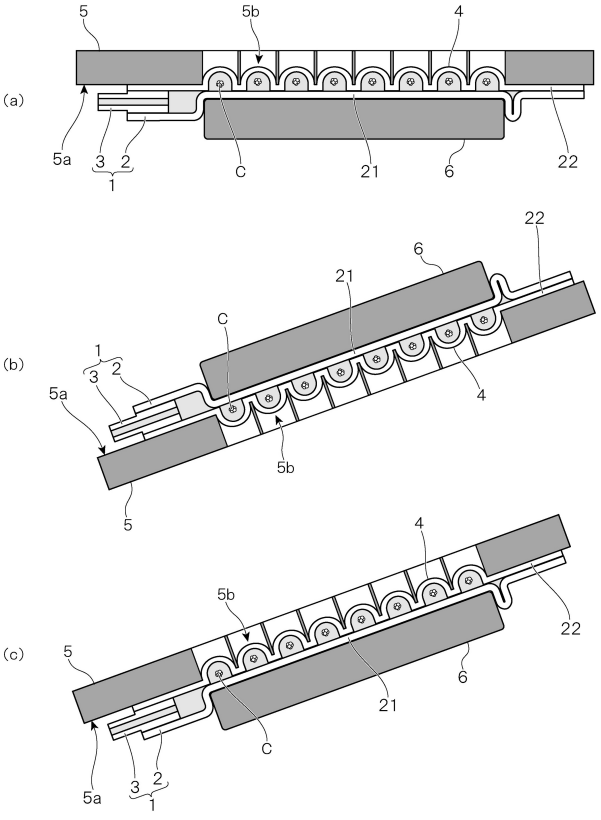
【図４】


1
2
3
5a
C
21
6
22
5
5b
4
8

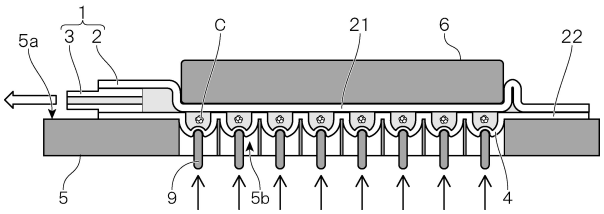
【図５】


(a)
(b)
(c)
(d)

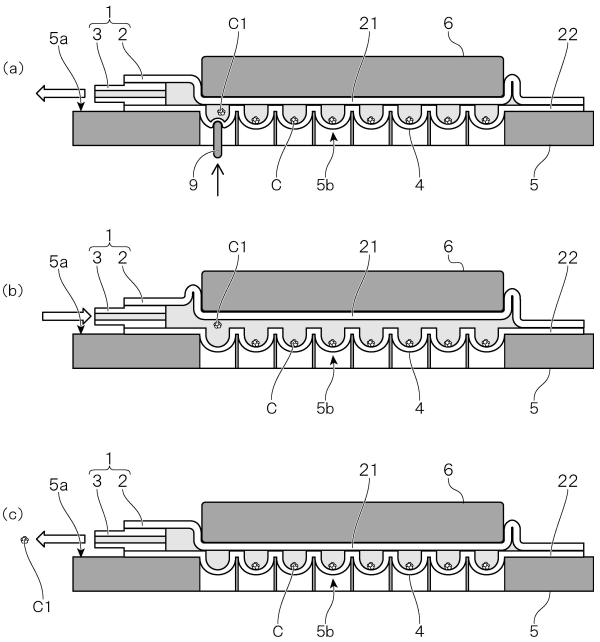
【図６】


(a)
(b)
(c)
5
5b
4
5a
3
2
1
C
21
6
22

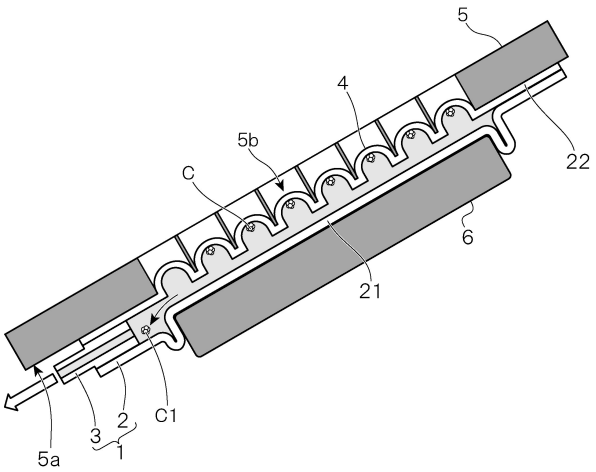
【図７】


1
3
2
5a
C
21
6
22
5
9
5b
4

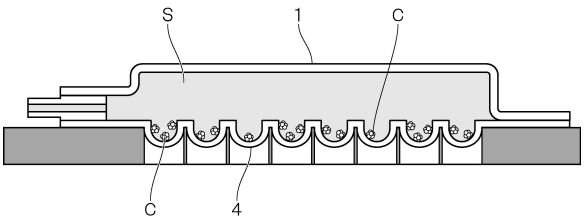
【図８】


(a)
(b)
(c)
1
3
2
5a
C1
21
6
22
9
C
5b
4
5
C1

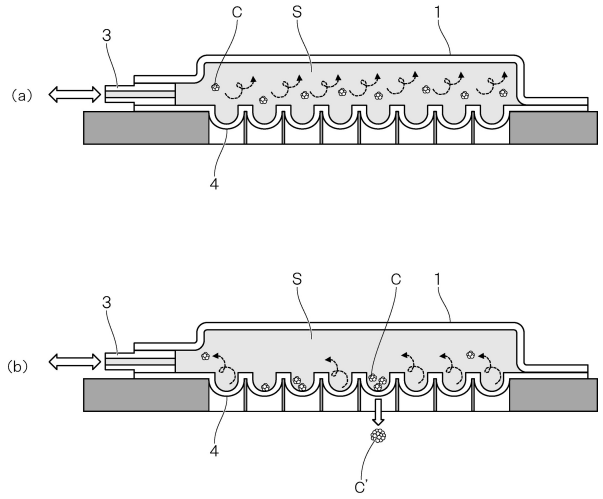
【図９】


5
4
5b
C
22
6
21
5a
3
2
1
C1

【図１０】


S
1
C
C
4

【図１１】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開２０１５－００８６６７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１７－１８４７１６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／２０８５２６（WO，Ａ１）
特開２０１３－２４７９２６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１４－０２３５４０（ＪＰ，Ａ）
特開２０１９－０００００５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１８／２３０５４４（WO，Ａ１）
特開２０１６－０８６７７４（ＪＰ，Ａ）
特開２００９－０１１２６０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／１２１２９２（WO，Ａ１）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ
Ｃ１２Ｎ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）