

(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2月27日(27.02.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/039911 A1

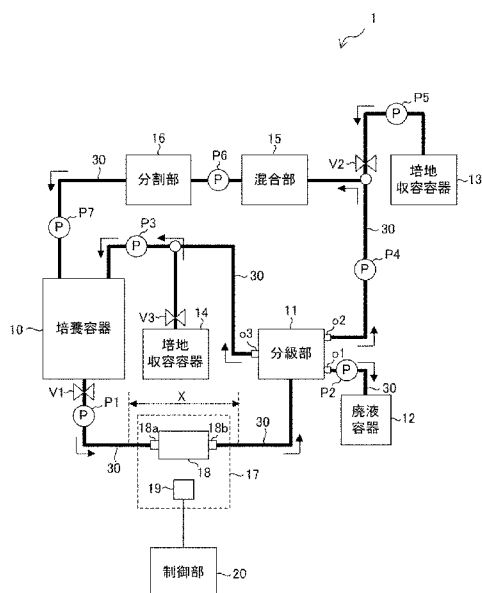
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 3/06* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/030860
- (22) 国際出願日: 2019年8月6日(06.08.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2018-154089 2018年8月20日(20.08.2018) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 稲田 淳史 (INADA, Atsushi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 高山 英俊 (TAKAYAMA, Hidetoshi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人太陽国際特許事務所 (TAIYO, NAKAJIMA & KATO); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 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, JP, 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,

(54) Title: CELL CULTURE METHOD AND CELL CULTURE DEVICE

(54) 発明の名称: 細胞培養方法及び細胞培養装置

(57) Abstract: This cell culture method comprises: a sorting step for separating components of a cell suspension containing cell aggregates transferred from a culture vessel, according to size; a first recovery step for recovering cell aggregates that have been separated in the sorting step and have a relatively small size; a division step for dividing cell aggregates that have been separated in the sorting step and have a relatively large size; and a second recovery step for recovering the cell aggregates divided in the division step into the culture vessel or a recovery vessel different from the culture vessel.

(57) 要約: 細胞培養方法は、培養容器から移送された細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分を、サイズに応じて分離する分級工程と、分級工程において分離されたサイズが相対的に小さい細胞凝集体を培養容器に回収する第1の回収工程と、分級工程において分離されたサイズが相対的に大きい細胞凝集体を分割する分割工程と、分割工程において分割された細胞凝集体を、培養容器または培養容器とは異なる回収容器に回収する第2の回収工程と、を含む。



- 10 Culture vessel
- 11 Sorting part
- 12 Waste liquid container
- 13, 14 Culture medium storage container
- 15 Mixing part
- 16 Division part
- 20 Control part



WO 2020/039911 A1

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：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：細胞培養方法及び細胞培養装置

技術分野

[0001] 本願は2018年8月20日出願の日本出願第2018-154089号の優先権を主張すると共に、その全文を参照により本明細書に援用する。

開示の技術は、細胞培養方法及び細胞培養装置に関する。

背景技術

[0002] 細胞培養装置に関し、例えば、特開2016-131538号公報には、培養容器、貯留容器、細胞凝集体を分割する分割処理を行う分割処理部と、流路内に培地を供給する培地供給部と、を含む細胞培養装置が記載されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] iPS細胞(induced pluripotent stem cells)等の幹細胞の培養においては、細胞を浮遊培養することによって生じる細胞凝集体(スフェア)のサイズが過大となると、細胞凝集体同士が接着融合し、細胞が分化を開始したり、細胞凝集体の中心部の細胞が壊死したりする場合がある。従って、細胞凝集体のサイズが過大となることを防止するために、細胞の培養期間中の適切な時期に、細胞凝集体を、より小さいサイズの複数の細胞凝集体に分割(解砕)する分割処理が行われている。

[0004] 細胞凝集体を分割する手法として、細胞凝集体を含む細胞懸濁液を、複数の開口部(網目)を有するメッシュに通過させることで細胞凝集体を機械的に分割する手法が提案されている。メッシュを用いた分割処理においては、メッシュ衝突時に細胞凝集体がダメージを受け、多くの死細胞が発生する。特に、サイズが比較的小さい細胞凝集体は、メッシュを用いた分割処理に対して脆弱である。培養期間中、培養容器内には、様々なサイズの細胞凝集体が収容されているところ、培養容器内に収容されている細胞凝集体に対して

無差別に分割処理を行うと、サイズが比較的小さい細胞凝集体に対しても分割処理が行われることとなり、死細胞の発生率の抑制が困難となる。

[0005] 開示の技術は、サイズが比較的小さい細胞凝集体に対する分割処理の実施を抑制することで、死細胞の発生を抑制できる細胞培養方法及び細胞培養装置を提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 開示の技術に係る細胞培養方法は、培養容器から移送された細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分を、サイズに応じて分離する分級工程と、分級工程において分離されたサイズが相対的に小さい細胞凝集体を培養容器に回収する第1の回収工程と、分級工程において分離されたサイズが相対的に大きい細胞凝集体を分割する分割工程と、分割工程において分割された細胞凝集体を、培養容器または培養容器とは異なる回収容器に回収する第2の回収工程と、を含む。開示の技術に係る細胞培養方法によれば、サイズが比較的小さい細胞凝集体に対する分割処理の実施が抑制され、死細胞の発生を抑制することが可能となる。

[0007] 開示の技術に係る細胞培養方法は、分級工程において分離されたサイズが最も小さい階級に属する成分を廃棄する廃棄工程を更に含んでもよい。これにより、細胞懸濁液から死細胞等のデブリスを除去することが可能となる。

[0008] 開示の技術に係る細胞培養方法は、分割工程において細胞凝集体を分割する前に当該細胞凝集体と培地と混合する混合工程を更に含んでもよい。これにより、分級工程を経た細胞懸濁液における細胞濃度を適正な濃度に調整することができる。

[0009] 開示の技術に係る細胞培養方法は、第2の回収工程において、回収容器に回収された細胞を回収容器内で培養する第1の培養工程と、第1の培養工程を経た細胞を、培養容器内で培養する第2の培養工程と、を更に含んでもよい。これにより、細胞の状態に適した環境で培養することができ、細胞の生存率及び品質を高めることが可能となる。

[0010] 例えば、第1の培養工程において用いられる培地の組成は、第2の培養工程において用いられる培地の組成と異なってもよい。具体的には、第1の培養工程において用いられる培地にはROCK阻害剤が添加されていてもよく、第2の培養工程において用いられる培地にはROCK阻害剤が添加されていないことが好ましい。また、第1の培養工程において用いられる培地の粘度は、第2の培養工程において用いられる培地の粘度よりも低くてもよい。

[0011] 開示の技術に係る細胞培養装置は、細胞凝集体を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分を、サイズに応じて分離する分級部と、細胞凝集体を分割する分割部と、培養容器、分級部及び分割部に接続された流路と、流路を介した細胞懸濁液の移送を制御する制御部と、を含む。制御部は、培養容器に収容されている細胞懸濁液を分級部に移送し、分級部において分離されたサイズが相対的に小さい細胞凝集体を含む細胞懸濁液を培養容器に移送し、分級部において分離されたサイズが相対的に大きい細胞凝集体を含む細胞懸濁液を分割部に移送し、分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を流路に接続された容器に移送する。開示の技術に係る細胞培養装置によれば、サイズが比較的小さい細胞凝集体に対する分割処理の実施を抑制することができ、死細胞の発生を抑制することが可能となる。

[0012] 開示の技術に係る細胞培養装置は、流路に接続された廃液容器を更に含んでもよい。この場合、制御部は、分級部において分離されたサイズが最も小さい階級に属する成分を廃液容器に移送してもよい。これにより、細胞懸濁液から死細胞等のデブリスを除去することが可能となる。

[0013] 制御部は、分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を培養容器に移送してもよい。また、開示の技術に係る細胞培養装置は、流路に接続された回収容器を更に含んでもよい。この場合、制御部は、分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を回収容器に移送してもよい。

[0014] 制御部は、回収容器に移送され、回収容器内で培養された細胞を含む細胞懸濁液を培養容器に移送してもよい。これにより、細胞の状態に適した環境で培養することができ、細胞の生存率及び品質を高めることが可能となる。

[0015] 開示の技術に係る細胞培養装置は、流路に接続され、細胞懸濁液を濾過する濾過部を更に含んでいてもよい。この場合、制御部は、回収容器に移送され、回収容器内で培養された細胞を含む細胞懸濁液を培養容器に移送する前に濾過部に移送し、濾過部において濾過された細胞懸濁液を培養容器に移送してもよい。これにより、細胞懸濁液から死細胞等のデブリスを除去することが可能となる。

発明の効果

[0016] 開示の技術によれば、サイズが比較的小さい細胞凝集体に対する分割処理の実施が抑制され、死細胞の発生を抑制することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法における処理の流れの一例を示す工程フロー図である。

[図2]開示の技術の実施形態に係る細胞培養装置の構成の一例を示す図である。

[図3A]開示の技術の実施形態に係る分割部16の構成の一例を示す断面図である。

[図3B]開示の技術の実施形態に係るメッシュの平面図である。

[図3C]図3Bにおいて破線で囲んだ部分Yの拡大図である。

[図4]培地交換処理を行う場合に、開示の技術の実施形態に係る制御部において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。

[図5]分割処理を行う場合に、開示の技術の実施形態に係る制御部において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。

[図6]開示の技術の他の実施形態に係る細胞培養方法における処理の流れの一例を示す工程フロー図である。

[図7]開示の技術の他の実施形態に係る細胞培養装置の構成の一例を示す図で

ある。

[図8]分割処理を行う場合に、開示の技術の実施形態に係る制御部において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、開示の技術の実施形態の一例を、図面を参照しつつ説明する。なお、各図面において同一または等価な構成要素および部分には同一の参照符号を付与している。

[0019] [第1の実施形態]

図1は、開示の技術の第1の実施形態に係る細胞培養方法における処理の流れの一例を示す工程フロー図である。本実施形態に係る細胞培養方法においては、iPS細胞、間葉系胚細胞、ES細胞等の増殖性を有する幹細胞を培養の対象とする。また、培養容器内において、例えば、 1×10^9 個またはそれよりも多くの細胞が、略球状の凝集体（スフェア）を形成して、培地中に浮遊した状態で培養されるものとする。本実施形態に係る細胞培養方法は、分級工程A1、廃棄工程A2、第1の回収工程A3、混合工程A4、分割工程A5、第2の回収工程A6を含む。

[0020] 分級工程A1では、培養容器から移送された細胞懸濁液に含まれる成分を分級する分級処理が行われる。本実施形態に係る分級工程A1では、細胞懸濁液に含まれる成分が、そのサイズに応じて3つの階級に分けられる。サイズが最も小さい階級に属する成分には、サイズが例えば $50 \mu\text{m}$ 未満の死細胞及び細胞から分泌された分泌物等のデブリスが含まれる。サイズが最も大きい階級に属する成分には、サイズが相対的に大きい（例えば $200 \mu\text{m}$ 以上）細胞凝集体（以下、大サイズスフェア）が含まれる。サイズが中程度の階級に属する成分には、サイズが相対的に小さい（例えば $50 \mu\text{m}$ 以上 $200 \mu\text{m}$ 未満）細胞凝集体（以下、小サイズスフェアという）が含まれる。

[0021] 廃棄工程A2では、分級工程において他の階級成分から分離された、サイズが最も小さい階級に属する成分に含まれる死細胞等のデブリスが廃棄される。

- [0022] 第1の回収工程A3では、分級工程A1において他の階級成分から分離された小サイズスフェアが元の培養容器に回収される。
- [0023] 混合工程A4では、分級工程A1において他の階級成分から分離された大サイズスフェアを含む細胞懸濁液と、新鮮な培地とを混合する混合処理が行われる。分級工程A1においては、細胞凝集体と培地とが分離され、分級工程A1を経た細胞懸濁液は、細胞濃度が過度に高まるので、大サイズスフェアを含む細胞懸濁液と、新鮮な培地とを混合することで、大サイズスフェアを含む細胞懸濁液における細胞濃度が適正な濃度に調整される。
- [0024] 分割工程A5では、分級工程A1において他の階級成分から分離された大サイズスフェアを、サイズがより小さい細胞凝集体に分割する分割処理が行われる。分割工程A5における細胞凝集体の分割は、細胞凝集体をメッシュに通すことにより行われる。iPS細胞等の幹細胞の培養においては、細胞を浮遊培養することによって生じる細胞凝集体のサイズが過大となると、細胞凝集体同士が接着融合し、細胞が分化を開始したり、細胞凝集体の中心部の細胞が壊死したりする場合がある。分割工程A5において、分割処理が行われることで、細胞凝集体のサイズが過大となることが抑制される。
- [0025] 第2の回収工程A6では、分割工程A5において分割された細胞凝集体が、元の培養容器またはこれとは別の回収容器に回収される。回収された細胞は、元の培養容器またはこれとは別の回収容器内で、継続して培養される。この培養により、例えば細胞凝集体の平均サイズが、分割処理が必要となる所定のサイズにまで成長した場合、上記の各工程（A1～A6）における処理が繰り返し行われる。
- [0026] 図2は、上記した細胞培養方法を実現する開示の技術の第1の実施形態に係る細胞培養装置1の構成の一例を示す図である。
- [0027] 細胞培養装置1は、培養容器10、培地収容容器13、14、分級部11、廃液容器12、混合部15、分割部16、モニタ部17、制御部20、ポンプP1～P7及びバルブV1～V3を含んで構成されている。培養容器10、培地収容容器13、14、分級部11、廃液容器12、混合部15、分

割部 16 は、それぞれ流路 30 に接続されている。

[0028] 培養容器 10 には、培養対象である複数の細胞からなる細胞凝集体及び培地を含む細胞懸濁液が収容される。培養容器 10 は、例えば、 1×10^9 個またはそれよりも多くの細胞を収容可能な容積を有する。培養容器 10 の形態は、特に限定されず、例えば、ガラス容器または金属容器を培養容器 10 として用いることが可能である。培養容器 10 は、例えばガス透過性を有するフィルムを含んで構成されるバッグの形態を有していてもよい。培地収容容器 13、14 には、それぞれ、新鮮な培地が収容される。

[0029] 分級部 11 は、本実施形態に係る細胞培養方法の分級工程 A1 における分級処理を行う。すなわち、分級部 11 は、細胞懸濁液に含まれる成分を、そのサイズに応じて 3 階級に分ける分級処理を行う。分級部 11 は、分級処理によって分離したサイズが互いに異なる成分を、別々の流出口 01、02、03 から流出させる。サイズが最も小さい階級に属する成分（主として、死細胞等のデブリス）が流出する流出口 01 は、流路 30 を介して廃液容器 12 に接続されている。サイズが最も大きい階級に属する成分（主として大サイズスフェア）が流出する流出口 02 は、流路 30 を介して混合部 15 に接続されている。サイズが中程度の階級に属する成分（主として小サイズスフェア）が流出する流出口 03 は、流路 30 を介して培養容器 10 に接続されている。

[0030] 分級部 11 における分級の階級数は可変とされており、細胞懸濁液に含まれる成分を、そのサイズに応じて例えば 2 つの階級に分けることも可能である。これにより、分級部 11 は、細胞懸濁液に含まれる死細胞等のデブリスを除去する濾過処理を行う濾過部としても機能する。分級部 11 として公知の分級装置を用いることが可能である。分級部 11 を構成する分級装置として、例えば、分級対象のサイズ毎の沈降速度の差を利用するもの、遠心分離を利用するもの、またはフィルタ膜による膜分離を行うもの等を使用することができる。

[0031] 混合部 15 は、本実施形態に係る細胞培養方法の混合工程 A4 における混

合処理を行う。すなわち、分級工程 A 1 において分離された大サイズスフェアと、培地収容容器 1 3 から移送された新鮮な培地とが混合部 1 5 において混合される。混合部 1 5 は、流入する流体を攪拌する機能を有する。混合部 1 5 は、駆動部を有しない所謂スタティックミキサを含んで構成されていてもよく、例えば、管状体と、管状体の内部に固定設置され、管状体の内部にらせん状の流路を形成する攪拌エレメントと、を含んで構成され得る。なお、混合部 1 5 は、回転軸に取り付けられた攪拌翼を回転軸の周りに回転させる攪拌装置を含んで構成されていてもよい。

[0032] 分割部 1 6 は、本実施形態に係る細胞培養方法の分割工程 A 5 における分割処理を行う。すなわち、分割部 1 6 は、分級部 1 1 において分離され、混合部 1 5 において新鮮な培地と混合された大サイズスフェアを、サイズがより小さい細胞凝集体に分割する。

[0033] 図 3 A は、分割部 1 6 の構成の一例を示す断面図である。分割部 1 6 は、流入口 2 0 2 及び流出口 2 0 3 を有するケース 2 0 1 と、ケース 2 0 1 の内部の、流入口 2 0 2 と流出口 2 0 3 との間に設けられたメッシュ 2 1 0 とを含んで構成されている。図 3 B は、メッシュ 2 1 0 の平面図、図 3 C は、図 3 B において破線で囲んだ部分 Y の拡大図である。メッシュ 2 1 0 は、複数の繊維状部材 2 1 2 を例えば平織りすることによって形成された複数の開口部（網目） 2 1 1 を有する。なお、繊維状部材 2 1 2 の織り方は、平織りに限定されない。繊維状部材 2 1 2 の材質は、特に限定されるものではないが、耐食性の高い材料で構成されていることが好ましく、例えばナイロンまたはステンレスを好適に用いることができる。メッシュ 2 1 0 は、複数の開口部 2 1 1 を有する主面が、細胞懸濁液の流れ方向 FL と交差する方向に延在するようにケース 2 0 1 内に設置されている。細胞懸濁液が、メッシュ 2 1 0 を通過することで、細胞懸濁液に含まれる細胞凝集体が機械的に分割される。分割部 1 6 が有するメッシュ 2 1 0 の孔径 L は、例えば、分割処理前の細胞凝集体の平均径よりも小さい大きさとされ、分割処理後の細胞凝集体の目標サイズに応じて定められる。細胞凝集体の平均径として、細胞凝集体の

各々を球形近似したときの、当該球形の直径の算術平均を適用することが可能である。

[0034] モニタ部 17 は、流路 30 の、培養容器 10 と分級部 11 との間の区間 X に設けられている。モニタ部 17 は、区間 X を通過する細胞懸濁液をモニタする。モニタ部 17 は、フローセル 18 及び撮像装置 19 を含んで構成されている。

[0035] フローセル 18 は、その全体が、ガラスまたはプラスチック等の光透過性を有する材料で構成されている。フローセル 18 は、第 1 の流通口 18 a と、第 1 の流通口 18 a に連通する第 2 の流通口 18 b とを有している。撮像装置 19 は、フローセル 18 の第 1 の流通口 18 a と第 2 の流通口 18 b との間の領域に撮像視野が設定されており、フローセル 18 の内部を流れる細胞懸濁液に含まれる細胞（細胞凝集体）を、フローセル 18 越しに連続的に撮像する。撮像装置 19 によって撮像された複数の画像は、制御部 20 に送信される。また、フローセル 18 の内部を流れる細胞懸濁液に含まれる培地を撮像装置 19 によって撮像して色味を評価し、予め登録された色見本と照合することで培地の pH（水素イオン指数）を定量する。

[0036] 流路 30 は、培養容器 10 から分級部 11 への細胞懸濁液の移送、分級部 11 から培養容器 10、廃液容器 12 及び混合部 15 への細胞懸濁液の移送、混合部 15 から分割部 16 への細胞懸濁液の移送、分割部 16 から培養容器 10 への細胞懸濁液の移送をそれぞれ可能とするように構成されている。また、流路 30 は、培地収容容器 13 から混合部 15 への培地の移送、培地収容容器 14 から培養容器 10 への培地の移送をそれぞれ可能とするように構成されている。また、流路 30 は、培養容器 10 から抜き出された細胞懸濁液が、分級部 11、混合部 15 及び分割部 16 を経由して、培養容器 10 に戻る第 1 の循環ルート、培養容器 10 から抜き出された細胞懸濁液が、分級部 11 して培養容器 10 に戻る第 2 の循環ルートを形成するように構成されている。

[0037] ポンプ P 1 ~ P 7 及びバルブ V 1 ~ V 3 は、流路 30 の各所に適宜配置さ

れる。ポンプP 1～P 7は、制御部20から供給される制御信号に応じて駆動し、バルブV 1～V 3は、制御部20から供給される制御信号に応じて開閉する。なお、流路30の構成及びポンプP 1～P 7及びバルブV 1～V 3の配置は、図2に例示されたものに限定されず、本実施形態に係る細胞培養方法を実施できるように構成されていればよい。

[0038] 制御部20は、制御信号を用いてポンプP 1～P 7の駆動制御及びバルブV 1～V 3の開閉制御を行うことにより、流路30を介した細胞懸濁液の移送を制御する。

[0039] 培養容器10内で、細胞培養を行うと、死細胞及び細胞から分泌された分泌物等のデブリスが培養容器10内に蓄積される。これらのデブリスは、細胞の生存率及び増殖性に悪影響を与えるおそれがあることから、定期的に（例えば、24時間毎に）培養容器10内の培地を新鮮な培地に交換する培地交換処理を実施することが好ましい。

[0040] 図4は、細胞培養装置1において培地交換処理を行う場合に、制御部20において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。

[0041] ステップS 1において、制御部20は、バルブV 1を開状態に制御し、ポンプP 1を駆動させることで、培養容器10に収容されている細胞懸濁液の一部を分級部11に移送する。細胞懸濁液が、流路30の区間Xを通過する間、当該細胞懸濁液に含まれる細胞が、モニタ部17によってモニタされる。すなわち、撮像装置19は、フローセル18を通過する細胞懸濁液に含まれる細胞（細胞凝集体）を連続的に撮像する。撮像装置19は、例えば、流路30の区間Xを通過する細胞懸濁液に含まれる全ての細胞（細胞凝集体）を撮像可能な間隔で撮像を行う。なお、撮像装置19は、流路30の区間Xを通過する細胞懸濁液に含まれる一部の細胞（細胞凝集体）を撮像してもよい。

[0042] ステップS 2において、制御部20は、モニタ部17の撮像装置19によって撮像された細胞の画像を取得する。

[0043] 分級部11は、濾過部として機能し、培養容器10から移送された細胞懸

濁液に対して濾過処理を行う。すなわち、分級部 11 は、培養容器 10 から移送された細胞懸濁液に含まれる、サイズが相対的に大きい細胞凝集体と、サイズが相対的に小さい死細胞等のデブリスとを分離する。分級部 11 は、サイズが相対的に大きい細胞凝集体を流出口 3 から流出させ、サイズが相対的に小さい細胞凝集体を流出口 1 から流出させる。

- [0044] ステップ S3 において、制御部 20 は、ポンプ P2 を駆動させることで、流出口 1 から流出する死細胞等のデブリスを廃液容器 12 に移送する。
- [0045] ステップ S4 において、制御部 20 は、ポンプ P3 を駆動させることで、流出口 3 から流出する細胞凝集体を含む細胞懸濁液を培養容器 10 に移送する。
- [0046] ステップ S5 において、制御部 20 は、ポンプ P3 を駆動させ、バルブ V3 を開状態に制御することで、培地収容容器 14 に収容されている新鮮な培地を培養容器 10 に移送する。これにより、培養容器 10 内に、新鮮な培地が補充される。このとき、制御部 20 は、ステップ S2 においてモニタ部 17 から取得した画像や評価結果に基づいて培地の移送量を導出する。制御部 20 は、培地の移送量を例えば以下のように導出する。すなわち、制御部 20 は、ステップ S2 において取得した画像に基づいて、培養容器 10 内の現在の細胞濃度を導出する。現在の細胞濃度は、例えば、ステップ S2 において取得した画像に含まれる細胞凝集体の個々のサイズの積算値と、撮像装置 19 の撮像視野の面積との比から導出することが可能である。制御部 20 は、導出した培養容器 10 内の現在の細胞濃度に基づいて、培養容器 10 内の細胞濃度を所定の濃度とするために追加すべき培地の量を、培地収容容器 14 から培養容器 10 への培地の移送量として導出する。
- [0047] ステップ S6 において、制御部 20 は、ステップ S2 においてモニタ部 17 から取得した画像に基づいて、分割処理の要否を判断する。制御部 20 は、分割処理の要否の判断を例えば、以下のようにして行う。制御部 20 は、例えば、ステップ S2 においてモニタ部 17 から取得した画像に含まれる細胞凝集体の平均径を導出し、導出した平均径が所定の大きさよりも大きい場

合には、分割処理が必要であると判断し、導出した平均径が所定の大きさよりも小さい場合には、分割処理が不要であると判断する。細胞凝集体の平均径として、細胞凝集体の各々を球形近似したときの、当該球形の直径の算術平均を適用することが可能である。

[0048] 制御部20は、上記ステップS1～S6の処理を連続的または断続的に繰り返し実施することにより、培養容器10内における培地の鮮度を一定レベルに保持する。

[0049] iPS細胞等の幹細胞の培養においては、細胞を浮遊培養することによって生じる細胞凝集体のサイズが過大となると、細胞凝集体同士が接着融合し、細胞が分化を開始したり、細胞凝集体の中心部の細胞が壊死したりする場合がある。従って、細胞凝集体のサイズが過大となることを防止するために、細胞の培養期間中の適切な時期に、細胞凝集体を、より小さいサイズの複数の細胞凝集体に分割する分割処理を行うことが好ましい。

[0050] 本実施形態に係る細胞培養装置1においては、培地換処理を行う場合に、制御部20において実施される処理のステップS6（図4参照）において分割処理が必要であると判断された場合に分割処理が行われる。

[0051] 図5は、細胞培養装置1において分割処理を行う場合に、制御部20において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。

[0052] ステップS11において、制御部20は、バルブV1を開状態に制御し、ポンプP1を駆動させることで、培養容器10に收容されている細胞懸濁液の一部を、培養容器10から分級部11に移送する。細胞懸濁液が、流路30の区間Xを通過する間、当該細胞懸濁液に含まれる細胞が、モニタ部17によってモニタされる。すなわち、撮像装置19は、フローセル18を通過する細胞懸濁液に含まれる細胞（細胞凝集体）を連続的に撮像する。

[0053] ステップS12において、制御部20は、モニタ部17の撮像装置19によって撮像された細胞の画像を取得する。

[0054] 分級部11は、培養容器10から移送された細胞懸濁液に含まれる成分を、そのサイズに応じて3つの階級に分ける分級処理を行う。すなわち、分級

部 1 1 は、培養容器 1 0 から移送された細胞懸濁液に含まれる大サイズスフェア、小サイズスフェア及び死細胞等のデブリスを互いに分離する。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における分級工程 A 1 が実現される。分級部 1 1 は、大サイズスフェアを流出口 0 2 から流出させ、小サイズスフェアを流出口 0 3 から流出させ、死細胞等のデブリスを流出口 0 1 から流出させる。

[0055] ステップ S 1 3 において、制御部 2 0 は、ポンプ P 2 を駆動させることで、流出口 0 1 から流出する死細胞等のデブリスを廃液容器 1 2 に移送する。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における廃棄工程 A 2 が実現される。

[0056] ステップ S 1 4 において、制御部 2 0 は、ポンプ P 3 を駆動させることで、流出口 0 3 から流出する小サイズスフェアを含む細胞懸濁液を培養容器 1 0 に移送する。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における第 1 の回収工程 A 3 が実現される。すなわち、培養容器 1 0 から抜き出された小サイズスフェアは、分割部 1 6 において分割処理が施されることなく培養容器 1 0 に回収される。

[0057] ステップ S 1 5 において、制御部 2 0 は、ポンプ P 4、P 6 を駆動させることで、流出口 0 2 から流出する大サイズスフェアを含む細胞懸濁液を分割部 1 6 に移送する。大サイズスフェアを含む細胞懸濁液は、分級部 1 1 から混合部 1 5 を経由して分割部 1 6 に移送される。

[0058] ステップ S 1 6 において、制御部 2 0 は、バルブ V 2 を開状態に制御し、ポンプ P 5 を駆動させることで、培地収容容器 1 3 に収容されている新鮮な培地を混合部 1 5 に移送する。分級部 1 1 から分割部 1 6 に向かう大サイズスフェアを含む細胞懸濁液は、培地収容容器 1 3 から移送された新鮮な培地と、混合部 1 5 において合流し、混合及び攪拌される。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における混合工程 A 4 が実現される。分級部 1 1 においては、細胞凝集体と培地とが分離され、分級部 1 1 を通過した細胞懸濁液は、細胞濃度が過度に高まるので、分級部 1 1 を通過した大サイズスフェア

アを含む細胞懸濁液と、新鮮な培地とを混合することで、大サイズスフェアを含む細胞懸濁液における細胞濃度が適正な濃度に調整される。

[0059] 分割部16に移送された大サイズスフェアは、分割部16のメッシュ210（図3A、図3B、図3C参照）を通過することにより、サイズのより小さい細胞凝集体に分割される。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における分割工程A5が実現される。

[0060] ステップS17において、制御部20は、ポンプP7を駆動させることで、分割部16において分割された細胞凝集体を培養容器10に移送する。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における第2の回収工程A6が実現される。培養容器10に回収された細胞を、培養容器10内で継続して培養してもよい。

[0061] ステップS18において、制御部20は、ポンプP3を駆動させ、バルブV3を開状態に制御することで、培地収容容器14に収容されている新鮮な培地を培養容器10に移送する。これにより、培養容器10内に、新鮮な培地が補充される。このとき、制御部20は、ステップS12においてモニタ部17から取得した画像や評価結果に基づいて培地の移送量を導出する。制御部20は、培地の移送量を例えば以下のように導出する。すなわち、制御部20は、ステップS12において取得した画像に基づいて、培養容器10内の現在の細胞濃度を導出する。現在の細胞濃度は、例えば、ステップS12において取得した画像に含まれる細胞凝集体の個数とサイズの積と、撮像装置19の撮像視野の面積との比から導出することが可能である。制御部20は、導出した培養容器10内の現在の細胞濃度に基づいて、培養容器10内の細胞濃度を所定の濃度とするために追加すべき培地の量を、培地収容容器14から培養容器10への培地の移送量として導出する。

[0062] なお、培養容器10への培地の補充を、培地収容容器13に収容されている培地によって補充してもよい。この場合、ステップS14において、小サイズスフェアとともに培地を培養容器10に移送してもよい。また、ステップS16において、大サイズスフェアと混合される培地によって、培養容器

10への培地の補充を行ってもよい。

[0063] 以上のように、開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法及び細胞培養装置1によれば、培養容器10から移送された細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分が、分級部11において分級される。分級により他の階級成分から分離された大サイズスフェアは、分割部16において分割処理が施された後、培養容器10に回収される。一方、分級により他の階級成分から分離された小サイズスフェアは、分割処理が施されることなく、培養容器10に回収される。

[0064] ここで、メッシュを用いた分割処理においては、メッシュ衝突時に細胞凝集体がダメージを受け、多くの死細胞が発生する。特に、小サイズスフェアは、メッシュを用いた分割処理に対して脆弱である。培養容器10内には、様々なサイズの細胞凝集体が收容されているところ、培養容器10内に收容されている細胞凝集体に対して無差別に分割処理を行うと、小サイズスフェアに対しても分割処理が行われることとなり、死細胞の発生率の抑制が困難となる。

[0065] 開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法及び細胞培養装置1によれば、大サイズスフェアに対して分割処理が施される一方、小サイズスフェアは、分割処理が施されることなく、培養容器10に回収される。これにより、分割処理に伴う死細胞の発生を抑制することができ、細胞の生産性を高めることができる。なお、小サイズスフェアに対しては、本来、分割処理が不要であるため、小サイズスフェアに対する分割処理を抑制することによる弊害はないものと考えられる。

[0066] また、メッシュを用いた分割処理においては、メッシュを通過できない細胞がメッシュ上に滞留することによるロスが発生する。開示の技術の実施形態に係る細胞培養方法及び細胞培養装置1によれば、小サイズスフェアに対する分割処理が回避されるので、分割処理に伴う細胞のロスを抑制することが可能である。

[0067] なお、本実施形態に係る細胞培養装置1においては、分割部16において

分割された細胞凝集体を、培養容器 10 に回収する場合を例示したが、この態様に限定されない。例えば、培養容器 10 とは別の回収容器を設け、分割部 16 において分割された細胞凝集体を、上記回収容器に回収してもよい。

[0068] [第 2 の実施形態]

図 6 は、開示の技術の第 2 の実施形態に係る細胞培養方法における処理の流れの一例を示す工程フロー図である。第 2 の実施形態に係る細胞培養方法は、第 2 の回収工程 A 6 が、上記した第 1 の実施形態に係る細胞培養方法における第 2 の回収工程 A 6 とは異なる。また、第 2 の実施形態に係る細胞培養方法は、第 1 の培養工程 A 7 及び第 2 の培養工程 A 8 を更に含む。第 2 の実施形態に係る細胞培養方法における、分級工程 A 1、廃棄工程 A 2、第 1 の回収工程 A 3、混合工程 A 4、分割工程 A 5 は、上記した第 1 の実施形態に係る培養方法と同じであるので、重複する説明は省略する。

[0069] 第 2 の実施形態に係る第 2 の回収工程 A 6 では、分割工程 A 5 において分割された細胞凝集体が、元の培養容器とは別の回収容器に回収される。

[0070] 第 1 の培養工程 A 7 では、回収容器に回収された細胞が回収容器内で培養される。すなわち、分割工程における分割処理によってダメージを受けた細胞は、回収容器内で培養される。

[0071] 第 2 の培養工程 A 8 では、第 1 の培養工程 A 7 を経た細胞が、元の培養容器内で培養される。すなわち、第 1 の培養工程 A 7 を経ることにより、ダメージから回復した細胞は、元の培養容器に移送され、培養容器内で培養される。

[0072] 第 1 の培養工程 A 7 における培養期間は、例えば、分割処理によるダメージからの回復に要する期間（例えば、数時間～1 日程度）とされる。第 2 の培養工程 A 8 における培養期間は、例えば、細胞凝集体が、分割処理が必要となるサイズにまで成長するのに要する期間（例えば 5 日間程度）とされる。第 2 の培養工程 A 8 における培養により、例えば培養容器内の細胞凝集体の平均サイズが、分割処理が必要となる所定のサイズにまで成長した場合、上記の各工程（A 1～A 8）における処理が繰り返し行われる。

[0073] 第1の培養工程A7において用いられる培地の組成と、第2の培養工程A8において用いられる培地の組成とは、互いに異なっていてもよい。分割処理によるダメージを受けた細胞は、自らを細胞死に誘導する場合がある。この分割処理後に発現する細胞死は、細胞の生産性を低下させる要因となっている。この分割処理後に発現する細胞死は、ROCKと呼ばれる細胞内のリン酸化酵素の働きを阻害することで抑制できることが知られている。そこで、分割処理の直後に実施される第1の培養工程A7において用いられる培地には、ROCKの働きを阻害するROCK阻害剤が添加されていてもよい。第1の培養工程A7において用いられる培地にROCK阻害剤を添加することで、分割処理後に発現する細胞死を抑制する効果が期待できる。一方、細胞による自発的な細胞死は、細胞の増殖過程において必要な事象であることから、自発的な細胞死を人為的に阻害することによるデメリットを抑制することが好ましい。従って、分割処理によるダメージから回復した後に行われる第2の培養工程A8において用いられる培地には、ROCK阻害剤が含まれていないことが好ましい。

[0074] また、回収容器に回収される細胞凝集体は、分割処理によって小サイズ化されているので、回収容器に收容される細胞凝集体を培地中において浮遊状態を維持するために必要とされる培地の粘度は比較的低い。一方、第1の培養工程A7を経た細胞が收容される培養容器10内における細胞凝集体の平均サイズは、回収容器内における細胞凝集体の平均サイズよりも大きい。従って、培養容器に收容される細胞凝集体を培地中に浮遊状態を維持するために必要とされる培地の粘度は比較的高い。そこで、第1の培養工程A7において用いられる培地の粘度を、第2の培養工程A8において用いられる培地の粘度よりも低くしてもよい。

[0075] このように、第1の培養工程A7において用いられる培地の組成と、第2の培養工程A8において用いられる培地の組成とを互いに異ならせることにより、各培養工程において、細胞の状態に適した培養を行うことが可能となる。

[0076] 図7は、上記した細胞培養方法を実現する開示の技術の第2の実施形態に係る細胞培養装置1Aの構成の一例を示す図である。細胞培養装置1Aは、上記した第1の実施形態に係る細胞培養装置1（図2参照）が備える構成に加え、流路30に接続された回収容器21、濾過部22、廃液容器23、培地收容容器24、混合部25を更に含む。

[0077] 回収容器21は、分割部16における分割処理後の細胞凝集体及び培地を含む細胞懸濁液が收容される。回収容器21の形態は、特に限定されず、例えば、ガラス容器または金属容器を回収容器21として用いることが可能である。回収容器21は、例えばガス透過性を有するフィルムを含んで構成されるバッグの形態を有していてもよい。回収容器21の容積は、培養容器10と同等または培養容器10の容積よりも小さくてもよい。

[0078] 濾過部22は、細胞懸濁液に対して濾過処理を行うことにより、細胞懸濁液に含まれる細胞凝集体と死細胞等のデブリスとを分離する。濾過部22における濾過処理は、例えば、濾過膜を用いた膜分離によって行われてもよい。濾過部22における濾過処理を、膜分離によって行う場合、膜分離の方式は、細胞に対するダメージが比較的小さいタンジェンシャルフロー方式であることが好ましい。濾過部22において、分離された死細胞等のデブリスは、廃液容器23に收容される。培地收容容器24には、新鮮な培地が收容される。

[0079] 混合部25は、濾過部22において死細胞等のデブリスが除去された細胞懸濁液と、培地收容容器24から移送された新鮮な培地とを混合する混合処理を行う。濾過部22において濾過処理が施された細胞懸濁液は、細胞濃度が過度に高まるので、濾過処理済みの細胞懸濁液と、新鮮な培地とを混合することで、濾過処理済みの細胞懸濁液における細胞濃度が適正な濃度に調整される。混合部25は、混合部15と同様の構成を有していてもよく、例えばスタティックミキサを含んで構成されていてもよい。

[0080] 流路30は、培養容器10から分級部11への細胞懸濁液の移送、分級部11から培養容器10、廃液容器12及び混合部15への細胞懸濁液の移送

、混合部 15 から分割部 16 への細胞懸濁液の移送、分割部 16 から回収容器 21 への細胞懸濁液の移送、回収容器 21 から濾過部 22 への細胞懸濁液の移送、濾過部 22 から廃液容器 23 及び混合部 25 への細胞懸濁液の移送、混合部 25 から培養容器 10 への細胞懸濁液の移送をそれぞれ可能とするように構成されている。また、流路 30 は、培地収容容器 13 から混合部 15 への培地の移送、培地収容容器 14 から培養容器 10 への培地の移送、培地収容容器 24 から混合部 25 への培地の移送をそれぞれ可能とするように構成されている。また、流路 30 は、培養容器 10 から抜き出された細胞懸濁液が、分級部 11、混合部 15、分割部 16、回収容器 21、濾過部 22 及び混合部 25 を経由して、培養容器 10 に戻る第 1 の循環ルート、培養容器 10 から抜き出された細胞懸濁液が、分級部 11 して培養容器 10 に戻る第 2 の循環ルートを形成するように構成されている。

[0081] 図 8 は、細胞培養装置 1A において、分割処理を行う場合に、制御部 20 において実施される処理の流れの一例を示すフローチャートである。なお、図 8 に示すフローチャートのステップ S21～S26、S28 における処理は、図 5 に示すフローチャートのステップ S11～S16、S18 と同じであるので、説明は省略する。

[0082] ステップ S27 において、制御部 20 は、ポンプ P7 を駆動させることで、分割部 16 において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を回収容器 21 に移送する。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における第 2 の回収工程 A6 が実現される。回収容器 21 に移送された細胞懸濁液に含まれる細胞は、回収容器 21 内で継続して培養される。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における第 1 の培養工程 A7 が実現される。

[0083] 第 1 の培養工程 A7 を開始してから所定期間（例えば数時間～1日）経過すると、ステップ S29 において、制御部 20 は、バルブ V4 を開状態に制御し、ポンプ P8 を駆動させることで、回収容器 21 に收容されている細胞懸濁液を濾過部 22 に移送する。

[0084] 濾過部 22 は、回収容器 21 から移送された細胞懸濁液に対して濾過処理

を行う。すなわち、濾過部 22 は、回収容器 21 から移送された細胞懸濁液に含まれる、サイズが相対的に大きい細胞凝集体と、サイズが相対的に小さい死細胞等のデブリスとを分離する。

[0085] ステップ S30 において、制御部 20 は、ポンプ P9 を駆動させることで、死細胞等のデブリスを濾過部 22 から廃液容器 23 に移送する。

[0086] ステップ S31 において、制御部 20 は、ポンプ P10 を駆動させることで、死細胞等のデブリスが除去された細胞懸濁液を培養容器 10 に移送する。細胞懸濁液は、濾過部 22 から混合部 25 を経由して培養容器 10 に移送される。

[0087] ステップ S32 において、制御部 20 は、バルブ V5 を開状態に制御し、ポンプ P11 を駆動させることで、培地収容容器 24 に収容されている新鮮な培地を混合部 25 に移送する。濾過部 22 から培養容器 10 に向かう濾過処理済みの細胞懸濁液は、培地収容容器 24 から移送された新鮮な培地と、混合部 25 において合流し、混合及び攪拌される。濾過部 22 において濾過処理が施された細胞懸濁液は、細胞濃度が過度に高まるので、濾過処理済みの細胞懸濁液と、新鮮な培地とを混合することで、濾過処理済みの細胞懸濁液における細胞濃度が適正な濃度に調整される。

[0088] 培養容器 10 に移送された細胞懸濁液に含まれる細胞は、培養容器 10 内で継続して培養される。これにより、本実施形態に係る細胞培養方法における第 2 の培養工程 A8 が実現される。

[0089] 回収容器 21 内で行われる第 1 の培養工程 A7 において用いられる培地には、ROCK 阻害剤が添加されていてもよく、培養容器 10 内で行われる第 2 の培養工程 A8 において用いられる培地には、ROCK 阻害剤が添加されていないことが好ましい。また、第 1 の培養工程 A7 において用いられる培地の粘度は、第 2 の培養工程 A8 において用いられる培地の粘度よりも低くてもよい。

[0090] 開示の技術の第 2 の実施形態に係る細胞培養方法及び細胞培養装置 1 によれば、分割された細胞凝集体が、培養容器 10 とは異なる回収容器 21 に回

収され、回収容器 21 内で培養される（第 1 の培養工程）。回収容器 21 内で培養された細胞は、所定期間の経過後、培養容器 10 に移送され、培養容器 10 内で培養される（第 2 の培養工程）。

[0091] このように、分割処理によるダメージを受けた細胞を培養対象とする第 1 の培養工程と、分割処理によるダメージから回復した細胞を培養対象とする第 2 の培養工程とを、互いに異なる容器で培養を行うことで、細胞の状態に適した環境で培養することができる。これにより、細胞の生存率及び品質を高めることが可能となる。例えば、第 1 の培養工程 A 7 において用いられる培地の組成と、第 2 の培養工程 A 8 において用いられる培地の組成とを、互いに異ならせることも可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 培養容器から移送された細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分を、サイズに応じて分離する分級工程と、
前記分級工程において分離されたサイズが相対的に小さい細胞凝集体を前記培養容器に回収する第1の回収工程と、
前記分級工程において分離されたサイズが相対的に大きい細胞凝集体を分割する分割工程と、
前記分割工程において分割された細胞凝集体を、前記培養容器または前記培養容器とは異なる回収容器に回収する第2の回収工程と、
を含む細胞培養方法。
- [請求項2] 前記分級工程において分離されたサイズが最も小さい階級に属する成分を廃棄する廃棄工程を更に含む
請求項1に記載の細胞培養方法。
- [請求項3] 前記分割工程において細胞凝集体を分割する前に当該細胞凝集体と培地と混合する混合工程を更に含む
請求項1または請求項2に記載の細胞培養方法。
- [請求項4] 前記第2の回収工程において、前記回収容器に回収された細胞を前記回収容器内で培養する第1の培養工程と、
前記第1の培養工程を経た細胞を、前記培養容器内で培養する第2の培養工程と、
を更に含む請求項1から請求項3のいずれか1項に記載の細胞培養方法。
- [請求項5] 前記第1の培養工程において用いられる培地の組成は、前記第2の培養工程において用いられる培地の組成と異なる
請求項4に記載の細胞培養方法。
- [請求項6] 前記第1の培養工程において用いられる培地にはROCK阻害剤が添加され、前記第2の培養工程において用いられる培地にはROCK阻害剤が添加されない

請求項 5 に記載の細胞培養方法。

[請求項7] 前記第 1 の培養工程において用いられる培地の粘度は、前記第 2 の培養工程において用いられる培地の粘度よりも低い

請求項 5 または請求項 6 に記載の細胞培養方法。

[請求項8] 細胞凝集体を含む細胞懸濁液を収容する培養容器と、
細胞凝集体を含む細胞懸濁液の成分を、サイズに応じて分離する分級部と、

細胞凝集体を分割する分割部と、

前記培養容器、前記分級部及び前記分割部に接続された流路と、

前記流路を介した細胞懸濁液の移送を制御する制御部と、

を含み、

前記制御部は、

前記培養容器に収容されている細胞懸濁液を前記分級部に移送し、

前記分級部において分離されたサイズが相対的に小さい細胞凝集体を含む細胞懸濁液を前記培養容器に移送し、

前記分級部において分離されたサイズが相対的に大きい細胞凝集体を含む細胞懸濁液を前記分割部に移送し、

前記分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を前記流路に接続された容器に移送する

細胞培養装置。

[請求項9] 前記流路に接続された廃液容器を更に含み、

前記制御部は、前記分級部において分離されたサイズが最も小さい階級に属する成分を前記廃液容器に移送する

請求項 8 に記載の細胞培養装置。

[請求項10] 前記制御部は、前記分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を前記培養容器に移送する

請求項 8 または請求項 9 に記載の細胞培養装置。

[請求項11] 前記流路に接続された回収容器を更に含み、

前記制御部は、前記分割部において分割された細胞凝集体を含む細胞懸濁液を前記回収容器に移送する

請求項 8 から請求項 10 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[請求項12]

前記制御部は、前記回収容器に移送され、前記回収容器内で培養された細胞を含む細胞懸濁液を前記培養容器に移送する

請求項 11 に記載の細胞培養装置。

[請求項13]

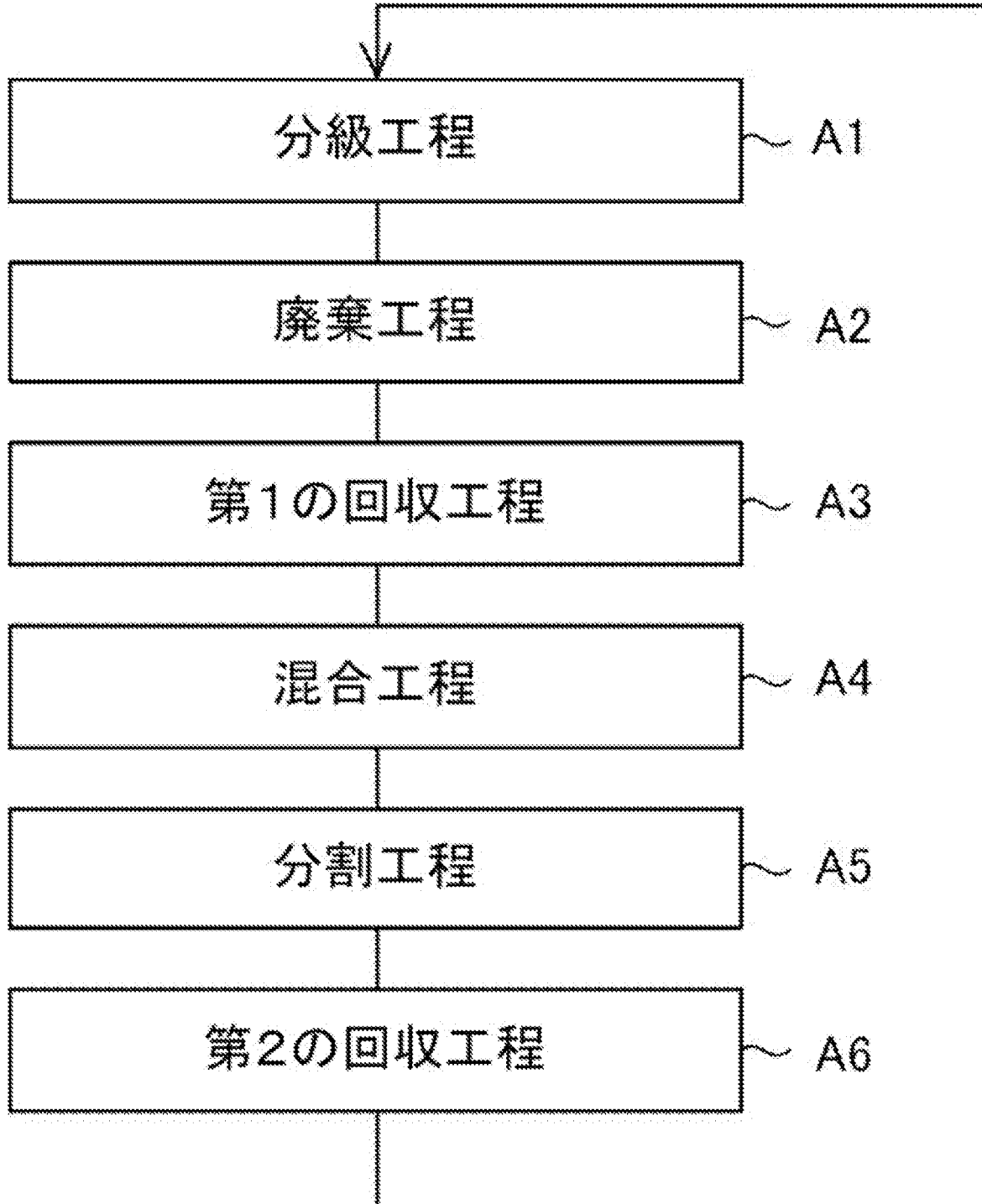
前記流路に接続され、細胞懸濁液を濾過する濾過部を更に含み、
前記制御部は、

前記回収容器に移送され、前記回収容器内で培養された細胞を含む細胞懸濁液を前記培養容器に移送する前に前記濾過部に移送し、

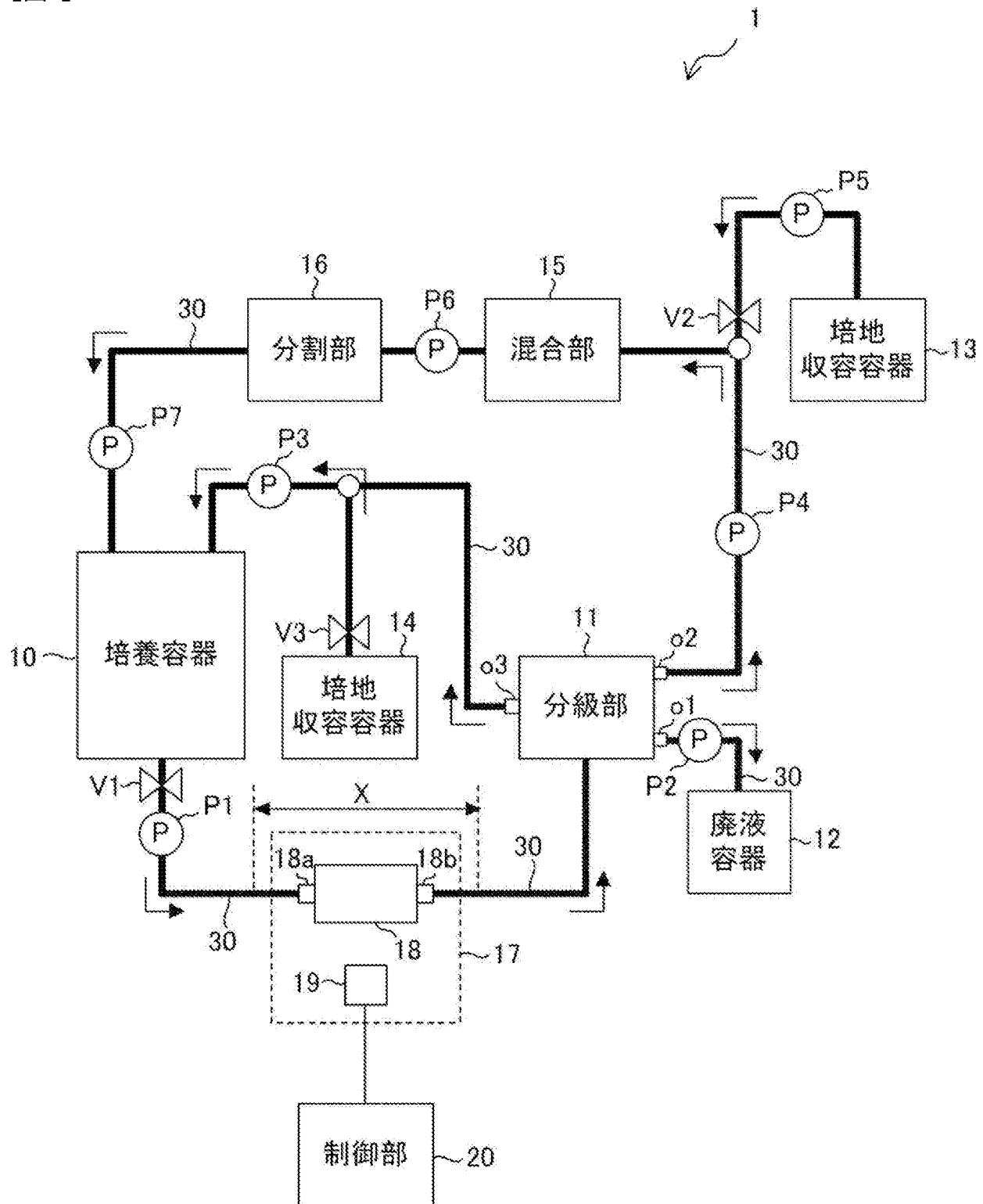
前記濾過部において濾過された細胞懸濁液を前記培養容器に移送する

請求項 11 または請求項 12 に記載の細胞培養装置。

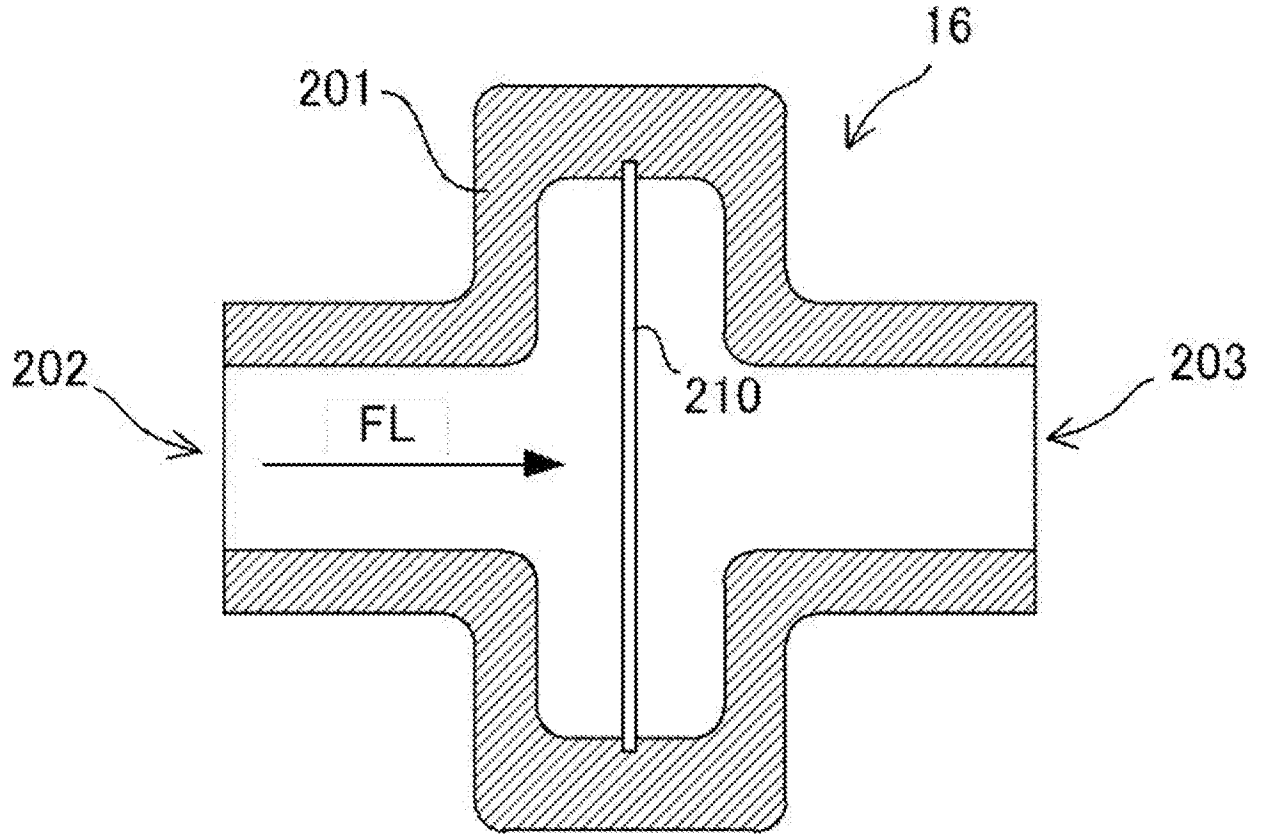
[図1]



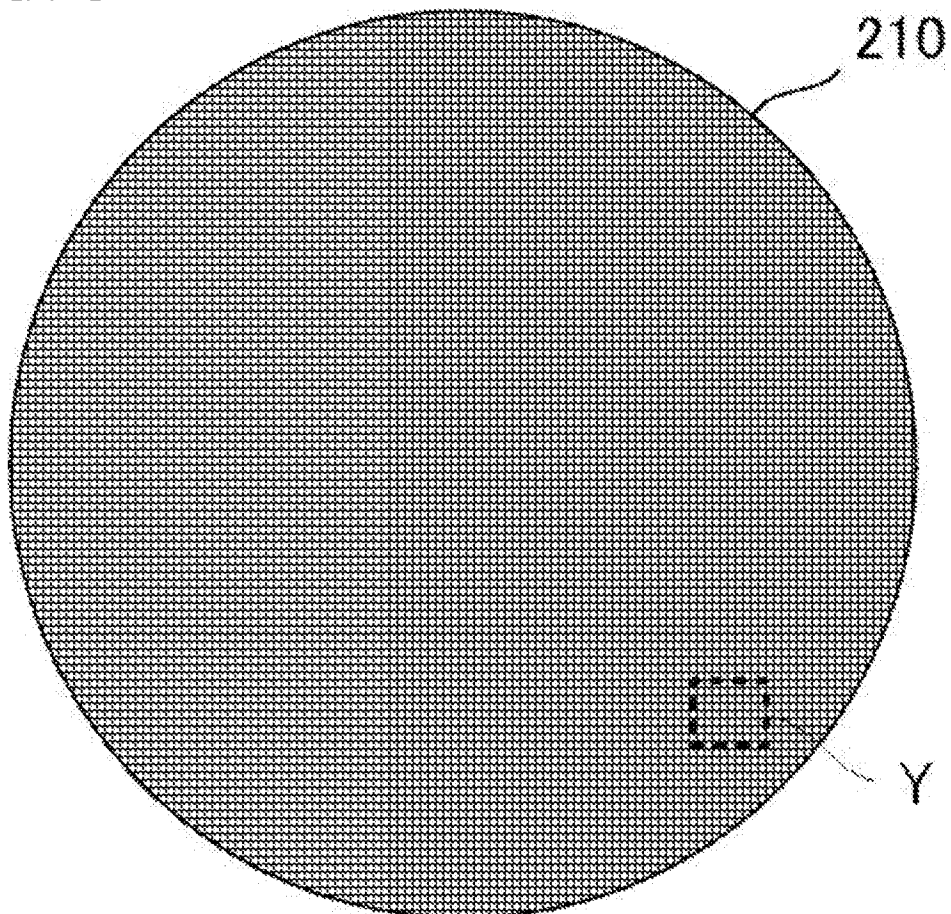
[図2]



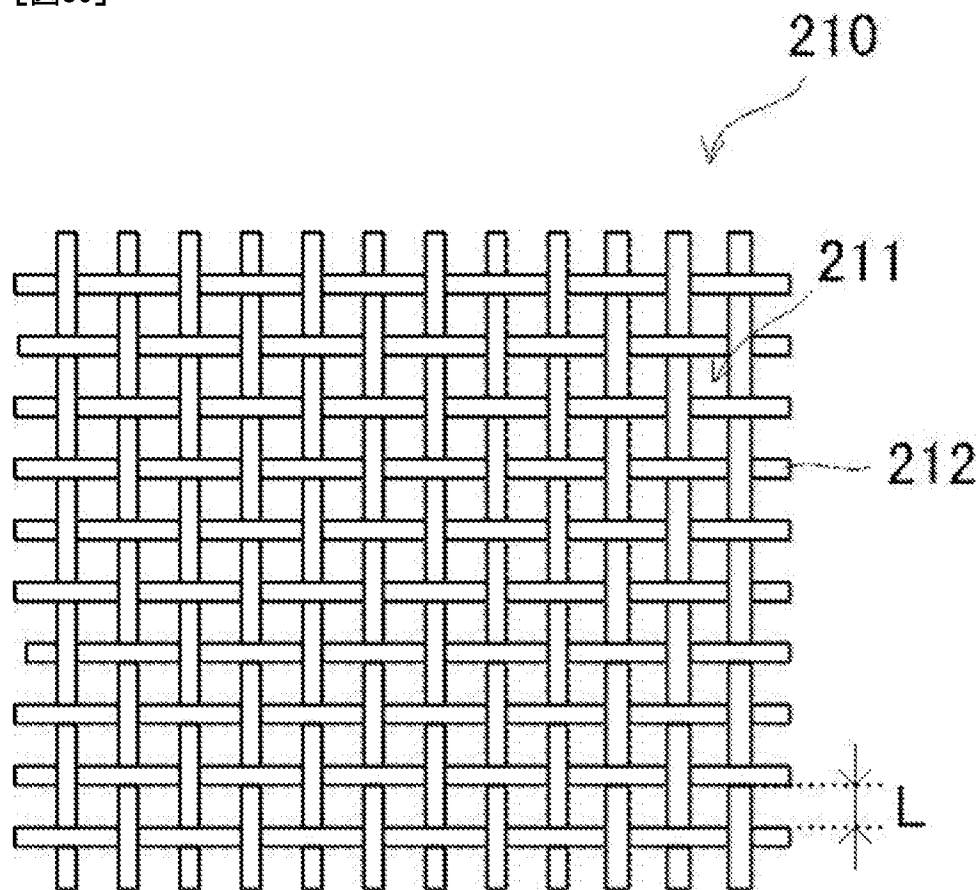
[図3A]



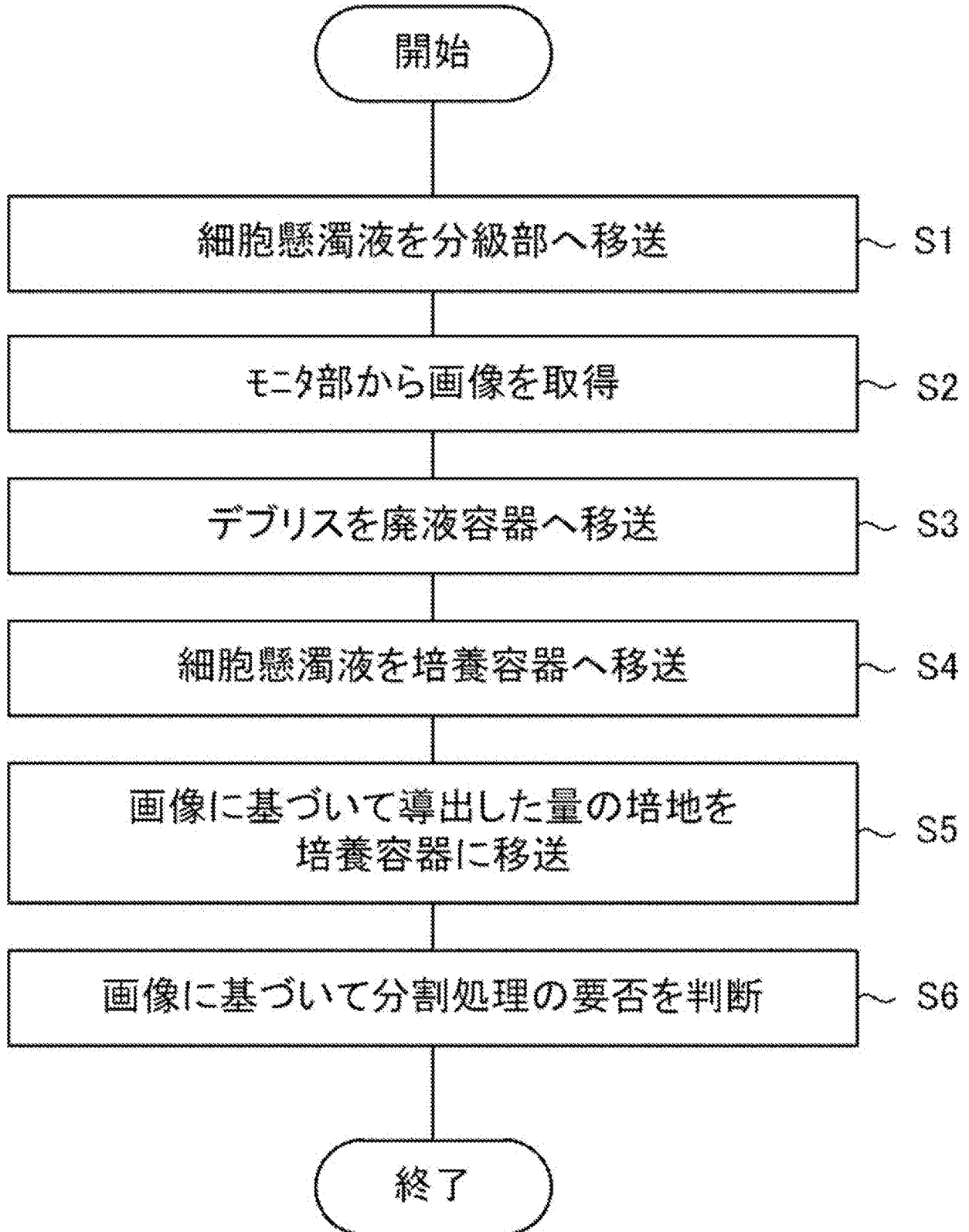
[図3B]



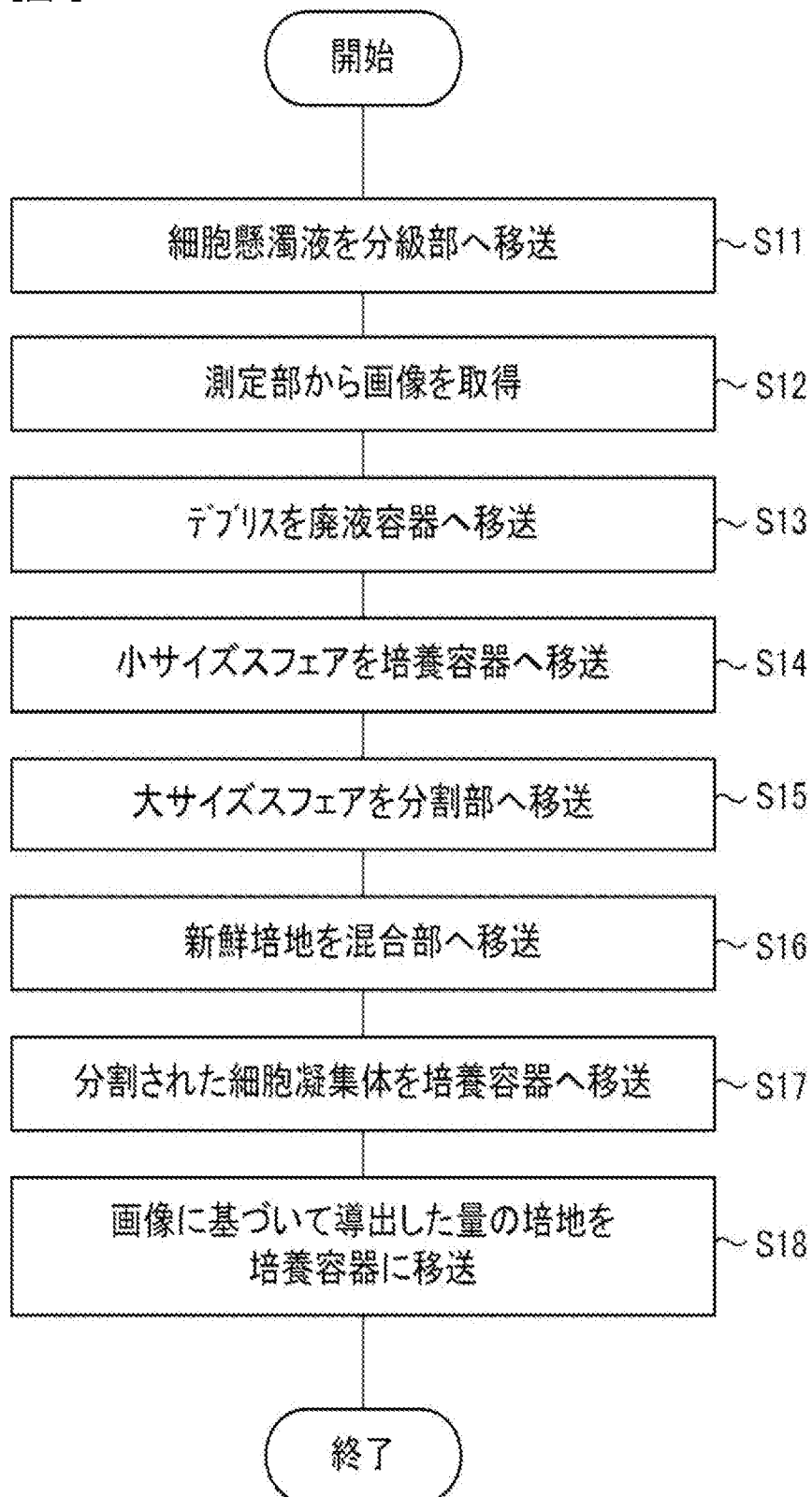
[図3C]



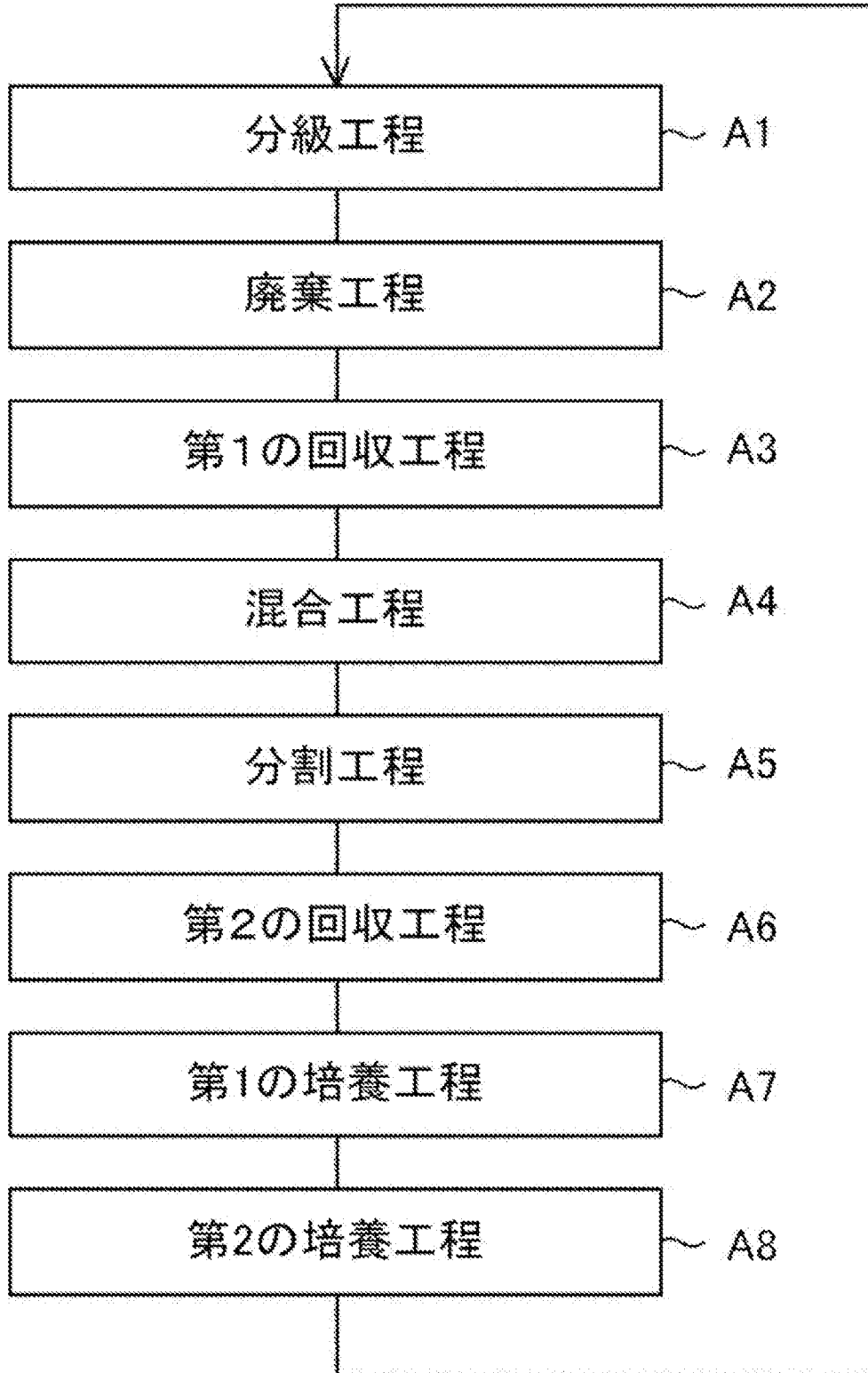
[図4]



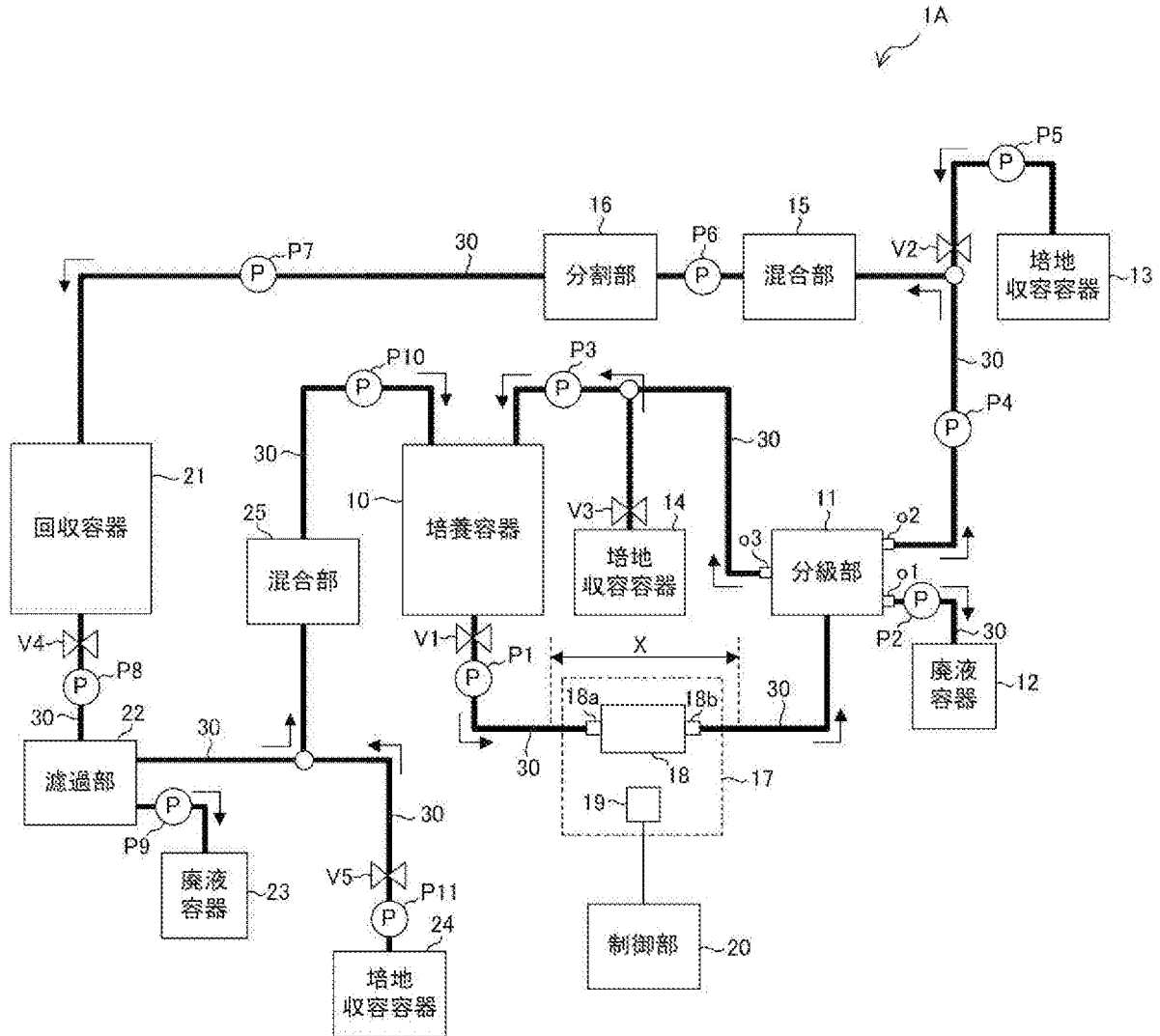
[図5]



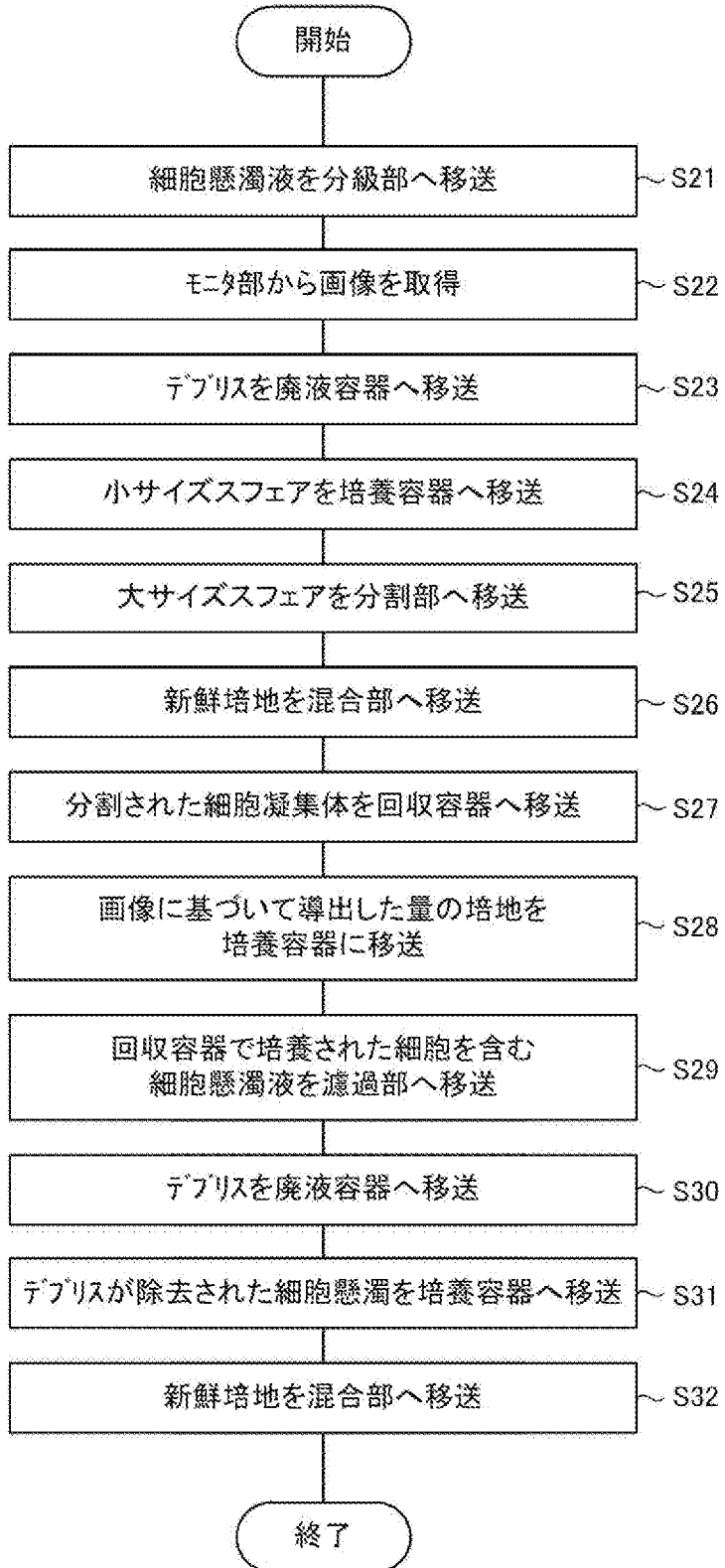
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/030860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N5/00 (2006.01) i, C12M1/00 (2006.01) i, C12M3/00 (2006.01) i, C12M3/06 (2006.01) i 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. C12N5/00-5/28, C12M1/00-3/10, C12Q1/00-3/00 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 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), 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.
A	US 2011/0233148 A1 (ANTONCHUK, Jennifer et al.) 29 September 2011, paragraph [0011], example 18 & WO 2010/069080 A1	1-13
A	WO 2017/159367 A1 (MURATA MANUFACTURING CO., LTD.) 21 September 2017, claims, example 3 & US 2018/0362917 A1, claims, example 3 & JP 17-159367 A1	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "I" 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 28 October 2019 (28.10.2019)		Date of mailing of the international search report 05 November 2019 (05.11.2019)
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/JP2019/030860

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/191775 A1 (FUJIFILM CORP.) 09 November 2017, paragraphs [0028], [0040]-[0065], fig. 3 & US 2019/0078058 A1, paragraphs [0048], [0060]-[0096], fig. 3 & EP 3453753 A1 & KR 10-2018-0132836 A & CN 109153972 A & JP 17-191775 A1	1-13
A	WO 2013/077423 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 30 May 2013, claims & US 2014/0329317 A1, claims & EP 2784153 A1 & JP 13-77423 A1	1-13
A	WO 2018/003476 A1 (FUJIFILM CORP.) 04 January 2018, claims & US 2019/0112565 A1, claims & EP 3480293 A1 & KR 10-2019-0009810 A & CN 109415679 A & JP 18-3476 A1	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12M3/06(2006.01)i

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))

Int.Cl. C12N5/00-5/28, C12M1/00-3/10, C12Q1/00-3/00

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使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), 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
A	US 2011/0233148 A1 (ANTONCHUK Jennifer et al.) 2011.09.29, [0011]、実施例18 & WO 2010/069080 A1	1-13
A	WO 2017/159367 A1 (株式会社村田製作所) 2017.09.21, 請求の範囲、実施例3 & US 2018/0362917 A1、請求の範囲、実施例3 & JP 17-159367 A1	1-13

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矛盾するものではなく、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

28.10.2019

国際調査報告の発送日

05.11.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西 賢二

4N

5803

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 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
A	WO 2017/191775 A1 (富士フイルム株式会社) 2017. 11. 09, [0028]、[0040] – [0065]、図3 & US 2019/0078058 A1、[0048]、[0060] – [0096]、 図3 & EP 3453753 A1 & KR 10-2018-0132836 A & CN 109153972 A & JP 17-191775 A1	1-13
A	WO 2013/077423 A1 (国立大学法人京都大学) 2013. 05. 30, 請求の範囲 & US 2014/0329317 A1、請求の範囲 & EP 2784153 A1 & JP 13-77423 A1	1-13
A	WO 2018/003476 A1 (富士フイルム株式会社) 2018. 01. 04, 請求の範囲 & US 2019/0112565 A1、請求の範囲 & EP 3480293 A1 & KR 10-2019-0009810 A & CN 109415679 A & JP 18-3476 A1	1-13