(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6326817号
(P6326817)

(45)発行日　平成30年5月23日(2018.5.23)　(24)登録日　平成30年4月27日(2018.4.27)

(51)Int.Cl.　F I
C12M 1/00 (2006.01)　C12M 1/00 D
C12N 5/071 (2010.01)　C12N 5/071

請求項の数 1　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願2013-556254(P2013-556254)
(86)(22)出願日　平成25年1月28日(2013.1.28)
(86)国際出願番号　PCT/JP2013/000410
(87)国際公開番号　WO2013/114845
(87)国際公開日　平成25年8月8日(2013.8.8)
審査請求日　平成27年12月16日(2015.12.16)
(31)優先権主張番号　特願2012-19559(P2012-19559)
(32)優先日　平成24年2月1日(2012.2.1)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(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
特許業務法人平和国際特許事務所
(72)発明者　田中　郷史
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　綜合研究所内
(72)発明者　戸谷　貴彦
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　綜合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞培養用キットの使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞を培養するための閉鎖系細胞培養用キットの使用方法であって、
前記細胞培養用キットに、細胞を培養するための培養容器と、培地等を貯蔵しておくための培地貯蔵容器と、細胞を注入するための細胞注入容器と、培養後の細胞懸濁液を回収する細胞回収容器と、がそれぞれ少なくとも１つ以上備えられ、前記培地貯蔵容器が、培養後の培地を回収する廃液容器としても用いられ、前記培養容器、前記培地貯蔵容器、前記細胞注入容器、及び前記細胞回収容器が導管によって連結され、
前記細胞注入容器が、前記培地貯蔵容器と前記培養容器を連結する導管における、前記培養容器の際から分岐し、
前記培地貯蔵容器から培地等が、前記細胞注入容器に移送されるとともに、前記培地貯蔵容器と前記細胞注入容器間の導管の内部に存在していた空気が、前記細胞注入容器の内部に移動し、
前記細胞注入容器から細胞及び培地等が、前記培養容器に移送され、
次いで、前記培地貯蔵容器から培地等が、前記培養容器に移送される
ことを特徴とする細胞培養用キットの使用方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、培養容器を用いて細胞培養を行う自動細胞培養装置に用いるための細胞培養

用キットの使用方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、医薬品の生産や、遺伝子治療、再生医療、免疫療法等の分野において、細胞や組織、微生物などを人工的な環境下で効率良く大量に培養することが求められている。
このような細胞の大量培養では、培養容器を用いて自動的に細胞培養を行う自動細胞培養装置を好適に用いることができる。
自動細胞培養装置を使用するにあたっては、コンタミネーションのリスクを低減すべく、閉鎖系で行うことが重要である。しかしながら、細胞注入から培地追加、サンプリング、回収までを、閉鎖系を維持しながら自動培養可能な簡便な細胞培養用キットは、これまで存在していなかった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】国際公開２００７／０５２７１６号パンフレット
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
すなわち、これまでに自動細胞培養装置は幾つか提案されており、またその装置に使う容器キットも提案されているが、臨床応用に当たって必要となる細胞注入から培地追加、サンプリング、回収までを閉鎖系を維持したまま、簡便に達成できる細胞培養用キットは存在していなかった。
具体的には、培養容器を用いて自動的に細胞培養を行う自動細胞培養装置として、例えば特許文献１に記載の細胞培養装置を挙げることができる。この装置では、培地貯留手段、機能発現用培養容器、及び増殖用培養容器が閉鎖系で構成されている（請求項７参照）。しかし、この細胞培養装置では、廃液バックから細胞回収バックに交換する際については閉鎖系を維持できる構成は見られず、開放系で行われていると考えられる。また、その他にも、細胞注入から回収までを閉鎖系を維持したまま実現可能にするための細胞培養用キットは見当たらなかった。
【０００５】
また、自動細胞培養装置を使用するにあたり、細胞培養用キットにおける培地貯蔵容器は冷蔵されることがある。しかしながら、冷蔵された培地を培地貯蔵容器から培養容器に直接送液すると、培養容器内の培地温度が低下して、細胞の増殖が悪くなるという問題があった。
さらに、冷蔵された培地は気体の溶解度が高く、多量の炭酸ガスや酸素が溶け込んでいる。これを培養容器に移して加温すると、気体の溶解度は液温が高くなるにつれて低くなるため、培養容器内で気泡が発生するという問題があった。培養容器内で発生した気泡は、容器内を攪拌する際に細かく泡立ち、細胞に対して悪影響を与える。また、容器内部を観察する際に気泡が邪魔になり、観察しにくくなるという問題があった。
このような問題の対策として、培地貯蔵容器自体を加温しておくことが考えられるが、培地は加温時間が長くなると細胞の培養効率が低下してしまう。このため、なるべく培養する直前までは、培地を冷蔵保存することが望ましい。
【０００６】
本発明は、上記の事情にかんがみなされたものであり、培養容器を用いた細胞培養において、細胞注入から培地追加、サンプリング、回収までをキット内で閉鎖系を維持しながら自動的に行うことを可能にする細胞培養用キットを用いた細胞培養用キットの使用方法の提供を目的とする。
また、培地の温度を調整するための温度調整容器を備えた細胞培養用キットの使用方法の提供を目的とする。
【課題を解決するための手段】

【０００７】
上記目的を達成するため、本発明の細胞培養用キットの使用方法は、細胞培養用キットに、細胞を培養するための培養容器と、培地等を貯蔵しておくための培地貯蔵容器と、細胞を注入するための細胞注入容器と、培養後の細胞懸濁液を回収する細胞回収容器と、がそれぞれ少なくとも１つ以上備えられ、培地貯蔵容器が、培養後の培地を回収する廃液容器としても用いられ、培養容器、培地貯蔵容器、細胞注入容器、及び細胞回収容器が導管によって連結され、細胞注入容器が、培地貯蔵容器と培養容器を連結する導管における、培養容器の際から分岐し、培地貯蔵容器から培地等が、細胞注入容器に移送されるとともに、培地貯蔵容器と細胞注入容器間の導管の内部に存在していた空気が、細胞注入容器の内部に移動し、細胞注入容器から細胞及び培地等が、培養容器に移送され、次いで、培地貯蔵容器から培地等が、培養容器に移送される方法としてある。
【０００８】
また、培地貯蔵容器において培地等が冷蔵され、この冷蔵された培地等の一部又は全部が、培地貯蔵容器から温度調整容器へ移送され、温度調整容器において、培地等が所定の温度に昇温され、温度が調節された培地等が、培養容器に移送される方法としてもよい。
【発明の効果】
【０００９】
培養容器を用いた細胞培養において、細胞注入から培地追加、サンプリング、回収までをキット内で閉鎖系を維持しながら行うことが可能となる。また、培養開始時に、培地貯蔵容器から培養容器へ培地を注入するにあたり、導管内の空気が培養容器へ入るのを最小限に抑制することが可能となる。

【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】本発明の第一実施形態の細胞培養用キット（１ポート仕様）の構成を示す図である。
【図２】本発明の第二実施形態の細胞培養用キット（２ポート仕様）の構成を示す図である。
【図３】本発明の第三実施形態の細胞培養用キット（３ポート仕様）の構成を示す図である。
【図４】本発明の第四実施形態の細胞培養用キット（１ポート仕様）の構成を示す図である。
【図５】本発明の第四実施形態の細胞培養用キット（２ポート仕様）の構成を示す図である。
【図６】本発明の第四実施形態の細胞培養用キット（３ポート仕様）の構成を示す図である。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１１】
以下、本発明の細胞培養用キット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。
【００１２】
［第一実施形態］
まず、図１を参照して、本発明の第一実施形態について説明する。同図は、本実施形態の細胞培養用キットの構成を示す図である。
本実施形態の細胞培養用キットは、培養容器１０、培地貯蔵容器２０、細胞注入容器３０、細胞回収容器４０を備えている。また、サンプリング容器５０を備えることが好ましい。
【００１３】
培養容器１０は、可撓性素材を材料として、袋状（バック型）に形成した容器であり、培地（培養液）を入れると共に、培養対象の細胞を播種して、細胞を大量に培養するため

の容器である。
培養容器１０は、細胞の培養に必要なガス透過性を有していることが必要である。具体的には、5000ml／m^2・day・atm（37℃－80％RH）以上の酸素透過率を有することが好ましい。
また、内容物を確認できるように、培養容器１０の全部又は一部は、透明性を有していることが好ましい。図１において、培養容器１０上には、シワが生じ難く、内部の観察をし易くすることができる観察枠１１が示されている。
さらに、培養容器１０は、高い細胞増殖効率を実現するために、低細胞毒性、低溶出性、及び放射線滅菌適性を有することが好ましい。
【００１４】
このような条件を満たす培養容器１０の材料としては、ポリエチレン系樹脂が好ましい。ポリエチレン系樹脂とはポリエチレン、エチレンとα－オレフィンの共重合体、エチレンと酢酸ビニルの共重合体、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が挙げられる。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、シリコーン系熱可塑性エラストマー、シリコーン樹脂等を用いることもできる。
【００１５】
また、培養容器１０は、培地や細胞の注入、回収などを行うためのポートを備える。このポートの数は特に限定されないが、後述するように１～３ポートのものが好適に用いられる。
【００１６】
培地貯蔵容器２０は、培養容器１０へ移送する、細胞を培養するための培地を格納する容器である。培地貯蔵容器２０は、格納している培地のｐＨが培養期間中に大きく変化しないように、ガスバリア性を有することが好ましい。具体的には1000ml／m^2・day・atm（23℃－80％RH）以下の二酸化炭素透過率を有することが好ましい。これは、培地中に含まれている高濃度の炭酸ガスが空気中に抜け、培地中の炭酸ガス濃度が低下し、結果としてｐＨが上昇することを回避するために、培地貯蔵容器２０の内部から二酸化炭素が外部に漏れ出るのをできるだけ少なくすることが望ましいからである。
【００１７】
また、培地貯蔵容器２０には、少なくとも２つのポートを備えることが好ましい。このうち１つのポートには、培養容器１０と連結する導管（チューブ）が接続され、この培地貯蔵容器２０から新鮮な培地が、培養細胞の増殖等に合わせて、少しずつ培養容器１０へ送られる。培地が封入された培地貯蔵容器２０は、冷蔵庫で保存されることが望ましい。また、培地貯蔵容器２０の他の１つのポートは、本実施形態の細胞培養用キットの外部から、培地を培地貯蔵容器２０に供給するための培地充填口２１であり、無菌接合装置等を介してこの培地充填口２１から培地が充填される。
なお、本実施形態の細胞培養用キットにおいて、１つのポートのみを備えた培地貯蔵容器２０を用いて、このポートから培地を培地貯蔵容器２０に充填した後に、同ポートから培地を培養容器１０へ移送することもできる。
【００１８】
さらに、培地貯蔵容器２０は、培養完了後、廃液容器として用いることができる。すなわち、培養容器１０から細胞回収容器４０に細胞を回収するのに先立って培地の上澄みを廃液容器としての培地貯蔵容器２０へ移送することで、その後濃縮された細胞懸濁液を培養容器１０から細胞回収容器４０へ送ることが可能となる。これは、専用の廃液容器を用いない第二実施形態においても同様である。
【００１９】
また、本実施形態の細胞培養用キットにおいて、培地貯蔵容器２０を２以上備えることもできる。これにより、同一の培地を２倍量貯蔵できる他、それぞれ異なる培地を貯蔵することで、培養容器１０に様々なバリエーションで培地を供給することも可能となる。
【００２０】

細胞注入容器３０は、培養開始時に必要となる細胞と培地が入った容器である。この容器の内容物を培養容器１０へ移して、培養が開始される。細胞注入容器３０に入れられる細胞と培地は、総量約２５０ｍｌ程度とすることが好ましいが、これに限定されるものではない。

【００２１】

また、細胞注入容器３０は、細胞と培地を入れる容器であるため、培養容器１０と同様にガス透過性を有していることが好ましい。また、低細胞毒性、低溶出性などを有することも好ましい。このため、細胞注入容器３０の材料としては、培養容器１０と同様のものを用いることが好ましい。

この細胞注入容器３０には、少なくとも１つのポートが備えられる。そして、このポートを介して、細胞注入容器３０から培養容器１０へ培養開始時の細胞と培地が送られる。

【００２２】

細胞回収容器４０は、培養終了後に、培養された細胞と培地の一部を培養容器１０から回収するための容器である。このため、細胞回収容器４０も培養容器１０と同様の特性を備えていることが好ましく、その材料として培養容器１０と同様のものを用いることが好ましい。

細胞回収容器４０には、少なくとも１つのポートが備えられ、このポートを介して、培養容器１０から細胞回収容器４０へ細胞と培地の一部が送られる。

【００２３】

サンプリング容器５０は、細胞の培養中や培養終了後に、培養容器１０における細胞懸濁液の一部を移送してサンプリングを行うための容器である。このサンプリング容器５０へ移送するサンプルとしての例えば１０ｍｌ程度の量とすることが好ましいが、これに限定されるものではない。

サンプリング容器５０には、２つのポートが備えられ、このうち一方のポートには、培養容器１０と連結する導管（チューブ）が接続され、培養容器１０から細胞懸濁液がサンプリング容器５０へ送られる。また、もう一方のポートは、各種分析を行うためにサンプリング容器５０内の細胞懸濁液の一部取り出すために用いられる。なお、これらを共に行う１つのポートを備えたものとすることや、３つ以上のポートを備え、複数回の分取を可能とする構成にすることもできる。

【００２４】

次に、本実施形態の細胞培養用キットにおける各容器を接続する導管について、説明する。

これらの導管の材料は、使用目的に応じて適切なものを適宜選択することが望ましい。例えば、シリコーン樹脂、軟質塩化ビニル樹脂、ポリブタジエン樹脂、エチレン－酢酸ビニル共重合体、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、シリコーン系熱可塑性エラストマー、スチレン系エラストマー、例えば、ＳＢＳ（スチレン・ブタジエン・スチレン）、ＳＩＳ（スチレン・イソプレン・スチレン）、ＳＥＢＳ（スチレン・エチレン・ブチレン・スチレン）、ＳＥＰＳ（スチレン・エチレン・プロピレン・スチレン）、ポリオレフィン樹脂、フッ素系樹脂等を用いることができる。

【００２５】

また、本実施形態の細胞培養用キットにおいて、導管には、大きく分けて２種類の異なるものが用いられる。

すなわち、培養容器１０と培地貯蔵容器２０を接続するための培地供給用チューブと、その他の容器の組み合わせの間を接続する培地移送用チューブである。

培養容器１０と培地貯蔵容器２０を接続するための培地供給用チューブとしては、特にポリオレフィンまたはシリコーン樹脂からなるものを用いることが好ましい。培地供給用チューブは、培養期間を通じて、培地を少しずつ培養容器１０へ移送するものであるため、特に優れた低細胞毒性、低溶出性等を有することが望ましい。一方、この培地供給用チューブは、培養工程において、特に溶断する必要性はない。そこで、これらを考慮して、上記材料からなるものを用いることが好ましいとしている。

図１において、培地貯蔵容器接続チューブ２２は、このような培地供給用チューブで構成することを想定しており、例えば内径３．５ｍｍ、外径６．０ｍｍのシリコンチューブなどを好適に用いることができる。

【００２６】

その他の容器の組み合わせの間を接続する培地移送用チューブは、長時間にわたって培地を移送するものではないため、低細胞毒性、低溶出性等について高い機能を備えたものにする必要はない。また、導管を溶断することにより、細胞注入容器や、細胞回収容器（廃液容器）、サンプリング容器を、閉鎖系を維持したまま本実施形態の細胞培養用キットから取り外して使用できることが望ましい。

そこで、これらの容器に接続される培地移送用チューブとして、少なくとも一箇所が、熱可塑性樹脂で形成されたものを用いることが好ましい。また、培地移送用チューブの全体を熱可塑性樹脂で形成することもできる。

【００２７】

また、熱可塑性樹脂としては、例えば軟質塩化ビニル樹脂を用いることができるが、これに限定されない。

図１において、細胞注入容器接続チューブ３１、細胞回収容器接続チューブ４１、及びサンプリング容器接続チューブ５１は、このような培地移送用チューブで構成することを想定しており、例えば内径３．３ｍｍ、外径５．０ｍｍの塩ビチューブなどを好適に用いることができる。

【００２８】

なお、本実施形態の細胞培養用キットの外部から培地を培地貯蔵容器２０に供給するための培地充填口２１を形成するポートには、熱可塑性樹脂からなるチューブを接続することが好ましく、特に軟質塩化ビニル樹脂からなるチューブを接続することが好ましい。これは、培地貯蔵容器２０には、無菌接合装置を介してこの培地充填口２１から培地が充填されるが、現在この無菌接合装置への接続には主に軟質塩化ビニル樹脂が用いられているためである。また、チューブの先端処理に関しては、本実施形態の二段シール以外にもルアーコネクター、ニードルレスコネクター、セプタム等の部材を適用することもできる。

【００２９】

本実施形態の細胞培養用キットは、図１に示すように、培養容器１０にポートが１つのみ備えられている１ポート仕様である。

すなわち、本実施形態の細胞培養用キットでは、培養容器１０に第一ポート１２が備えられ、この第一ポート１２に培地貯蔵容器接続チューブ２２を介して培地貯蔵容器２０が接続される。そして、この培地貯蔵容器接続チューブ２２に、その他の容器が接続される構成となっている。

【００３０】

すなわち、細胞注入容器３０は、細胞注入容器接続チューブ３１を介して、培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続される。また、細胞回収容器４０は、細胞回収容器接続チューブ４１を介して、培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続される。また、サンプリング容器５０は、サンプリング容器接続チューブ５１を介して、培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続される。そして、チューブポンプが、培地貯蔵容器接続チューブ２２のみに備えられている。

【００３１】

ここで、細胞注入容器３０は、培地貯蔵容器接続チューブ２２における培養容器１０の際（きわ）に接続する。このようにすれば、培養開始時に、培地貯蔵容器２０から培養容器１０へ培地を注入するにあたり、培地貯蔵容器接続チューブ２２内の空気が培養容器１０へ入るのを最小限に抑制することができるためである。

【００３２】

具体的には、まず培地貯蔵容器２０から細胞注入容器３０へ培地が送られて、培地貯蔵容器２０と細胞注入容器３０間を接続する導管の内部には培地が満たされる。このとき、その導管の内部に存在していた空気は細胞注入容器３０の内部に移動する。次に、細胞注

入容器３０から培養容器１０へ細胞と培地を送るときに、細胞注入容器３０内の空気を上部に移動させ、細胞と培地のみを細胞注入容器３０から培養容器１０へ送り出すことができる。

【００３３】

このため、培養容器１０へ入る空気は、細胞注入容器３０が接続されている培地貯蔵容器接続チューブ２２の際から培養容器１０までに存在するもののみとなる。したがって、細胞注入容器３０を培地貯蔵容器接続チューブ２２において、培養容器１０にできるだけ近い位置に接続することで、培養容器１０に送られる空気を、細胞の観察や撮影の邪魔にならない程度に最小限に抑制することが可能となる。

【００３４】

また、少なくとも培地貯蔵容器２０と細胞注入容器３０については、細胞培養用キットにおいて取り外し可能に構成することが好ましい。これは、使用前に培地貯蔵容器２０には培地が充填され、細胞注入容器３０には細胞と培地とが充填されて、使用時にこれらを細胞培養用キットに接続して用いるためである。これら以外の培養容器１０、細胞回収容器４０、サンプリング容器５０とこれらに付属するチューブ類は、使用前（製造時）に一体として構成することが好ましい。なお、後述する廃液容器６０も使用前に一体として構成することができる。

【００３５】

さらに、各チューブにクリップを備えたり、電磁弁などで各チューブにおける培地等の移送を制御したりすることが好ましい。

また、培地貯蔵容器接続チューブ２２における連結部分には、キャップ付き又はカバー付きのルアーコネクター（ニードレスコネクター）などを用いることができる。

【００３６】

さらに、本実施形態の細胞培養用キットでは、培地貯蔵容器接続チューブ２２にはシリコンチューブを、それ以外には塩ビチューブを用い、必要に応じてジョイント管（例えば内径５．３ｍｍ、外径７．０ｍｍ）を使用しているが、本発明はこれらのような具体的構成に限定されるものではない。

【００３７】

本実施形態の細胞培養用キットは、例えば以下のような方法で使用することができる。

まず、図１に示す細胞培養用キットにおいて、培地を充填した培地貯蔵容器２０の培地貯蔵容器接続チューブ２２におけるコネクターを連結すると共に、細胞と培地を充填した細胞注入容器３０の細胞注入容器接続チューブ３１をコネクターによって接続する。

【００３８】

次に、培地貯蔵容器２０から培地貯蔵容器接続チューブ２２と細胞注入容器接続チューブ３１を介して細胞注入容器３０まで培地を移送する。このとき、培地が移送された部分のチューブに入っていた空気は細胞注入容器３０に入る。

次に、細胞注入容器３０から培養容器１０へ細胞と培地を移送する。このとき、細胞注入容器３０のポートを下側にして縦にし、細胞注入容器３０に入っている空気を上部に集めることなどにより、空気を培養容器１０へ送ることなく、細胞と培地のみを培養容器１０へ移送することができる。

【００３９】

次に、培地貯蔵容器２０から培地貯蔵容器接続チューブ２２を介して、培地を培養容器１０へ移送する。なお、細胞注入容器３０から細胞と培地を培養容器１０へ移送させるタイミングは上記に限定されるものではなく、例えば培地貯蔵容器２０から培養容器１０へ一部又は全部の培地を移送したタイミングで行うこともできる。

そして、培養容器１０に所定量の培地と細胞が充填されると、適宜振とうやかく拌が行われて、一定期間細胞の培養が行われる。細胞培養中には、サンプルを培養容器１０からサンプリング容器５０へ適宜移送することにより、調査や分析に用いることができる。

【００４０】

一定期間の細胞培養が完了すると、細胞の回収が行われる。このとき、培地貯蔵容器２

０は、廃液容器として用いられる。
すなわち、まず培養容器１０を静止させて細胞を下部に沈降させた後に、細胞懸濁液の上澄みを培養容器１０から培地貯蔵容器２０へ移送させる。これによって、培養容器１０における細胞懸濁液を濃縮することができ、細胞回収容器４０へ移送する液量を低減することができる。次いで、この濃縮された細胞懸濁液を培養容器１０から細胞回収容器４０に回収する。
このように、本実施形態の細胞培養用キットを用いることで、閉鎖系で細胞培養を行うことができる。
【００４１】
以上の通り、本実施形態の細胞培養用キットによれば、培養容器を用いた細胞培養において、細胞注入から培地追加、サンプリング、回収までをキット内で閉鎖系を維持しながら自動的に行うことが可能である。また、本実施形態の細胞培養用キットは、１ポート仕様であるため、送液用チューブポンプが１個で済み、装置をシンプルにすることが可能となっている。
【００４２】
［第二実施形態］
次に、図２を参照して、本発明の第二実施形態について説明する。同図は、本実施形態の細胞培養用キットの構成を示す図である。
本実施形態の細胞培養用キットは、２ポート仕様となっている点で第一実施形態と異なり、その他の点では、第一実施形態の細胞培養用キットと同様の構成となっている。すなわち、本実施形態の細胞培養用キットは、培養容器１１０、培地貯蔵容器２０、細胞注入容器３０、細胞回収容器４０を備え、またサンプリング容器５０を備えることが好ましい。
【００４３】
本実施形態の細胞培養用キットにおける培養容器１１０は、図２に示されるように、第一ポート１１２と、第二ポート１１３を備えている。
第一ポート１１２には、第一実施形態と同様に、培地貯蔵容器２０が培地貯蔵容器接続チューブ２２を介して接続されている。第二ポート１１３には、細胞回収容器４０が細胞回収容器接続チューブ４１を介して接続されている。培地貯蔵容器接続チューブ２２及び細胞回収容器接続チューブ４１には、それぞれチューブポンプが用いられ、それぞれ培地、細胞懸濁液の移送が行われる。
また、細胞注入容器３０は細胞注入容器接続チューブ３１を介して培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続され、サンプリング容器５０はサンプリング容器接続チューブ５１を介して培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続されている。
【００４４】
本実施形態の細胞培養用キットの使用方法は、細胞の培養完了までは、第一実施形態と同様の方法とすることができる。そして、細胞の回収時は、培地貯蔵容器接続チューブ２２を経由することなく、第二ポート１１３と細胞回収容器接続チューブ４１を経由して、チューブポンプにより細胞懸濁液を細胞回収容器４０に回収することが可能となっている。
【００４５】
本実施形態の細胞培養用キットによれば、上記の通り、細胞の回収時に、培地貯蔵容器接続チューブ２２を経由することなく、専用のチューブポンプにより細胞懸濁液を培養容器１１０から細胞回収容器４０に回収することができる。このため、細胞の回収をより効率的に行うことが可能となる。本実施形態は２ポート仕様の一例であり、細胞回収容器４０の代わりに、第二ポート１１３とサンプリング容器接続チューブ５１を介してサンプリング容器５０を接続することも可能である。
【００４６】
［第三実施形態］
次に、図３を参照して、本発明の第三実施形態について説明する。同図は、本実施形態

の細胞培養用キットの構成を示す図である。
本実施形態の細胞培養用キットは、３ポート仕様となっている点で第一実施形態と異なっており、その他の点では、第一実施形態の細胞培養用キットと同様の構成となっている。すなわち、本実施形態の細胞培養用キットは、培養容器２１０、培地貯蔵容器２０、細胞注入容器３０、細胞回収容器４０、廃液容器６０を備え、またサンプリング容器５０を備えることが好ましい。また、培地貯蔵容器２０として、培地貯蔵容器２０ａと２０ｂの２つが備えられている。
【００４７】
本実施形態の細胞培養用キットにおける培養容器２１０は、図３に示されるように、第一ポート２１２、第二ポート２１３、及び第三ポート２１４を備えている。
本実施形態では、第一ポートには、サンプリング容器５０と廃液容器６０がそれぞれサンプリング容器接続チューブ５１、廃液容器接続チューブ６１を介して接続されている。また、これらのチューブが合流したチューブ部分には、チューブポンプが用いられ、サンプリング容器５０への細胞懸濁液の移送、及び廃液容器６０への上澄み液の移送がそれぞれ行われる。
【００４８】
また、第二ポート２１３には、培地貯蔵容器接続チューブ２２（２２ａ，２２ｂ）を介して、培地貯蔵容器２０ａ，２０ｂが接続されている。このように培地貯蔵容器を複数用いることで、異なる組成の培地を組み合わせて、培養容器１０へ移送することができ、供給する培地の組成やタイミングなどにバリエーションを持たせることが可能となっている。また、培地貯蔵容器接続チューブ２２にはチューブポンプが用いられて、培養容器２１０への培地の移送が行われる。
また、第三ポート２１４には、細胞回収容器４０が細胞回収容器接続チューブ４１を介して接続されており、チューブポンプにより、細胞懸濁液が培養容器２１０から細胞回収容器４０へ移送される。
【００４９】
本実施形態の細胞培養用キットの使用方法は、まず細胞の培養を開始するまでは、第一実施形態と同様の方法とすることができる。なお、図３では、記載スペースの制約から、細胞注入容器接続チューブ３１が、培地貯蔵容器接続チューブ２２の中程に接続されているが、実際には培養容器２１０に空気が入ることを抑止するため、第二ポートの際に接続することが好ましい。
また、細胞培養中には、サンプルを培養容器２１０からサンプリング容器５０へ適宜移送することにより、調査や分析に用いることができる。
【００５０】
さらに、細胞培養完了後には、細胞懸濁液の上澄みを培養容器２１０から廃液容器６０へ廃液容器接続チューブ６１を介して移送させて、培養容器２１０における細胞懸濁液を濃縮することができる。最後に、この濃縮された細胞懸濁液を培養容器２１０から細胞回収容器４０に回収する。
本実施形態の細胞培養用キットによれば、複数の動作を同時に行うことが可能となる。特に培地貯蔵容器２０や培地貯蔵容器接続チューブ２２にまだ培地が残存している場合でも、サンプリング容器５０へのサンプリングを行うことができ、培地の供給とサンプリングのタイミングを柔軟に調整することが可能となる。
【００５１】
［第四実施形態］
次に、図４～図６を参照して、本発明の第四実施形態について説明する。これらの図は、本実施形態の細胞培養用キットの構成を示す図である。
本実施形態の細胞培養用キットは、第一実施形態～第三実施形態の構成に加えて、培地の温度を調整するための温度調整容器７０及び温度調整容器接続チューブ７１を備える点に特徴がある。その他の構成については、第一実施形態～第三実施形態におけるものと同様のものとすることができる。

以下、第一実施形態の細胞培養用キットに温度調整容器７０及び温度調整容器接続チューブ７１を追加した本実施形態の細胞培養用キットを示す図４を用いて説明するが、図５，６における温度調整容器７０及び温度調整容器接続チューブ７１についても図４と同様である。

【００５２】

温度調整容器７０は、培地貯蔵容器２０から培養容器１０へ培地を移送するに際して、移送させる培地を一旦貯留して、培地の温度を調整するための容器である。移送する培地の量は、特に限定されず、培地貯蔵容器２０内における培地の一部又は全部とすることができる。また、細胞培養用キットに複数の培地貯蔵容器２０が備えられている場合であって、その一部の培地貯蔵容器２０に培地ではなく、培養容器１０における培養中の培地に追加するための生理活性物質やサイトカインその他様々な物質が貯蔵されている場合には、温度調整容器７０によりこれらを昇温させることも可能である。温度調整容器７０の容器は、培地貯蔵容器２０と同様のガスバリア性を有することが好ましい。

【００５３】

温度調整容器７０には、少なくとも１つのポートが備えられ、ポートに温度調整容器接続チューブ７１が接続され、温度調整容器接続チューブ７１は、培地貯蔵容器２０と培養容器１０を接続する培地貯蔵容器接続チューブ２２に接続されている。すなわち、温度調整容器７０は、培地貯蔵容器２０と培養容器１０を接続するチューブから分岐され、閉鎖系を維持した形で細胞培養用キットに備えられる。温度調整容器接続チューブ７１と培地貯蔵容器接続チューブ２２は一体に形成されたものであっても良い。

【００５４】

また、温度調整容器７０は、軟包材からなるものとすることが好ましく、空気抜きを有する構成とすることも好ましい。温度調整容器７０において培地が昇温されると、培地中に溶解していたガスが抜ける。このとき、温度調整容器７０のポートを下側にしておくことで、ガスを温度調整容器７０の上部に集めることができ、培地のみを培養容器１０へ送液することができる。このため、培養容器１０内に余計な気泡を混入させることなく、培地を移送することが可能となる。

【００５５】

温度調整容器７０は、培養容器１０が配置されるインキュベータの内部に配置することが好ましい。この場合、温度調整容器７０内の培地は、培養容器１０内の培地と同じ温度に調節することが可能となる。その温度としては、例えば３７℃とすることができる。

また、温度調整容器７０をインキュベータの外部に配置して、例えば別個の加温装置によって温度調整容器７０を加温し、温度調整容器７０内の培地温度を調整することも好ましい。この場合は、例えば３０～３７℃などの温度範囲に調整することができる。

さらに、温度調整容器７０をインキュベータの外部に配置して、特別な加温装置を設けることなく静置させておくことで、温度調整容器７０内の培地温度を常温（室温）に戻すことも可能である。

また、本実施形態の細胞培養用キットにおいて、温度調整容器７０を２以上備えることもできる。これにより、同時に２倍量以上の培地やその他の物質の温度を調節することが可能となる。

【００５６】

温度調整容器接続チューブ７１は、培養期間を通じて、培地を少しずつ培養容器１０へ移送するものであるため、特に優れた低細胞毒性、低溶出性等を有することが望ましく、また培養工程において、特に溶断する必要性はない。このため、温度調整容器接続チューブ７１は、培養容器１０と培地貯蔵容器２０を接続する培地貯蔵容器接続チューブ２２と同様のものとすることが好ましい。

【００５７】

以上の通り、本実施形態の細胞培養用キットによれば、培養容器に移送するために必要な量の培地を温度調整容器に入れて昇温した後に、培養容器へ送液することができる。このため、培養容器内の培地温度が低下せず、細胞の増殖阻害を阻止することが可能とな

る。

また、このように温度調整容器によって培地を昇温できるため、培地貯蔵容器内の培地はこれまで通り冷蔵保存可能であり、培地の加熱時間が長くなる場合に細胞の培養効率が低下するという問題の発生を防止することが可能となる。

さらに、昇温により培地に溶解していたガスが抜けるため、温度調整容器から培養容器に培地のみを移送することができ、培養容器内に気泡が混入するのを防止することが可能となる。

【００５８】

本発明は、以上の実施形態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。

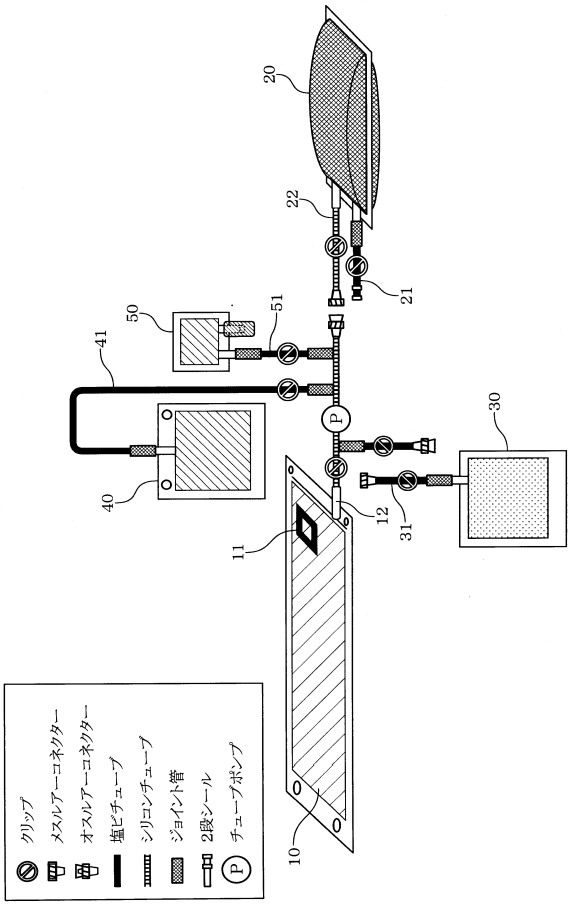
例えば、実施形態では特定サイズのチューブを用いる例が示されており、また特定のコネクターが使用されているが、本発明の技術的範囲の範囲内において、同じ機能が得られる他の部品を用いるなど適宜変更することが可能である。また、培養中の培地に追加するための生理活性物質やサイトカインその他様々な物質を充填済みの容器を実施形態のキットに付加して取り付けておくことも可能である。

【産業上の利用可能性】

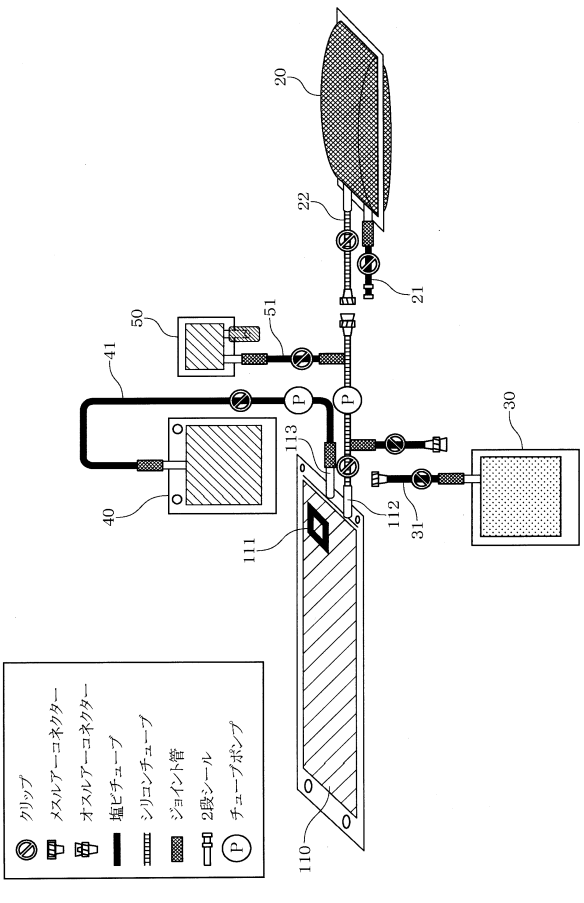
【００５９】

本発明は、大量の細胞を培養する必要のあるバイオ医薬や再生医療、免疫療法等の分野において、好適に利用することが可能である。

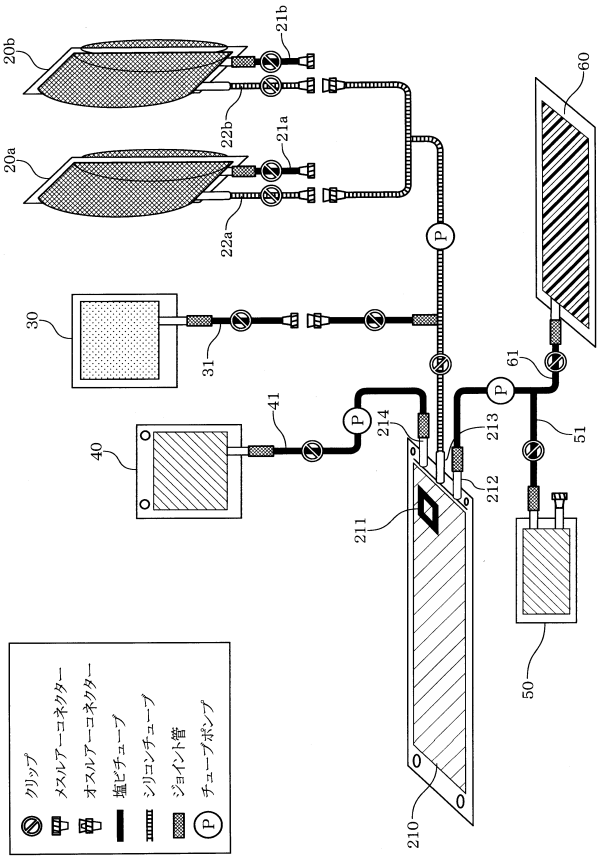
【図１】



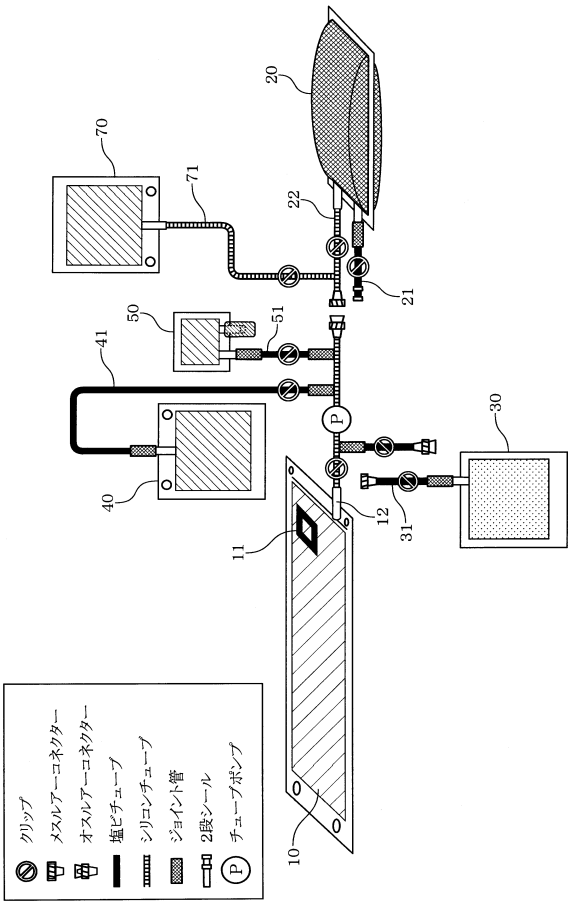
【図２】



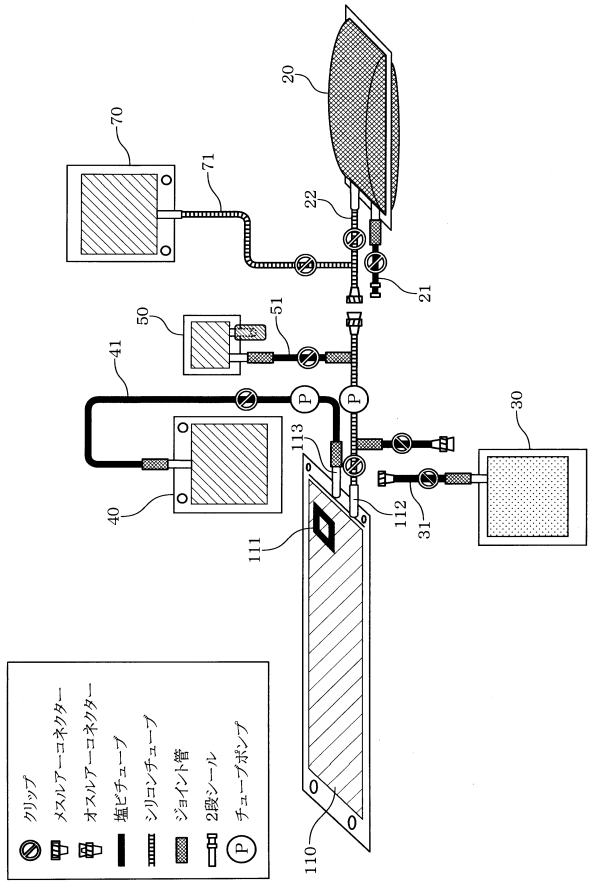
【図３】


20b
21b
22b
21a
20a
22a
60
30
31
41
40
214
213
61
51
212
211
210
50
クリップ
メスルアーコネクター
オスルアーコネクター
塩ビチューブ
シリコンチューブ
ジョイント管
チューブポンプ

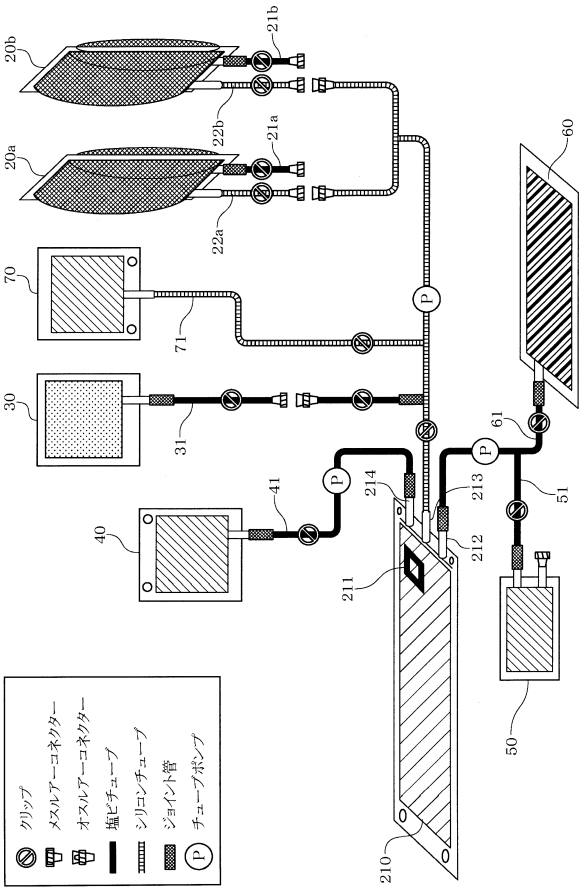
【図４】


20
70
71
22
21
50
51
41
30
40
12
31
11
10
クリップ
メスルアーコネクター
オスルアーコネクター
塩ビチューブ
シリコンチューブ
ジョイント管
2段シール
チューブポンプ

【図５】


20
70
71
22
21
50
51
41
30
40
113
112
31
111
110
クリップ
メスルアーコネクター
オスルアーコネクター
塩ビチューブ
シリコンチューブ
ジョイント管
2段シール
チューブポンプ

【図６】


20b
21b
22b
21a
20a
22a
60
70
71
30
31
61
41
214
213
51
40
212
211
210
50
クリップ
メスルアーコネクター
オスルアーコネクター
塩ビチューブ
シリコンチューブ
ジョイント管
チューブポンプ

フロントページの続き

(72)発明者　石▲崎▼　庸一
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　綜合研究所内

審査官　野村　英雄

(56)参考文献　特開２００４－０７３０８４（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－２８７４２５（ＪＰ，Ａ）
特開２００７－１７５０２８（ＪＰ，Ａ）
特開２００７－２９５８２７（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－００８１１１（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－２７１８５０（ＪＰ，Ａ）
特表昭６３－５０３２０１（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－０４８６４４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００８／１３６３７１（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　　１／００－　３／１０
Ｃ１２Ｎ　　１／００－　７／０８
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ