



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115478045 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 16

(21) 申请号 202211151066.1

(22) 申请日 2016.08.31

(30) 优先权数据

2015-170797 2015.08.31 JP

62/356,199 2016.06.29 US

(62) 分案原申请数据

201680050144.5 2016.08.31

(71) 申请人 爱平世股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州帕罗奥图市

申请人 田边刚士

(72) 发明人 田边刚士 布兰登·凯莉

须藤健太 下田英范 平出亮二

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司

公司 11286

专利代理师 陈宇 金玉兰

(51) Int. Cl.

G12N 5/074 (2010.01)

G12M 3/00 (2006.01)

G12M 1/12 (2006.01)

G12M 1/36 (2006.01)

G12M 1/38 (2006.01)

G12M 1/00 (2006.01)

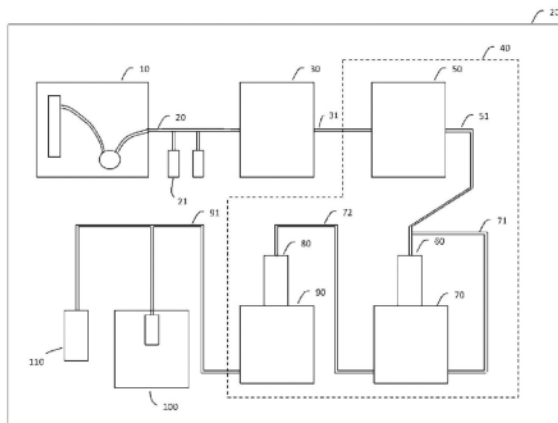
权利要求书3页 说明书38页 附图25页

(54) 发明名称

用于制作诱导多能干细胞的方法

(57) 摘要

一种用于制作诱导多能干细胞的方法,所述方法包括:将包含细胞的含细胞溶液通过导入前细胞送液通路送至与所述导入前细胞送液通路连接的因子导入装置;将多能性诱导因子自保存多能性诱导因子的因子保存单元经由因子送液通路送至所述因子导入装置;在所述因子导入装置中向所述细胞中导入所述多能性诱导因子而制作包含因子导入细胞的细胞;以及在细胞团制作装置中对所述因子导入细胞进行培养而制作包含诱导多能干细胞的细胞团或多个细胞团,其中,所述细胞团制作装置包括培养所述因子导入细胞的初始化培养装置。



1. 一种用于制作诱导多能干细胞的方法,所述方法包括:  
将包含细胞的含细胞溶液通过导入前细胞送液通路送至与所述导入前细胞送液通路连接的因子导入装置;  
将多能性诱导因子自保存多能性诱导因子的因子保存单元经由因子送液通路送至所述因子导入装置;  
在所述因子导入装置中向所述细胞中导入所述多能性诱导因子而制作包含因子导入细胞的细胞;以及  
在细胞团制作装置中对所述因子导入细胞进行培养而制作包含诱导多能干细胞的细胞团或多个细胞团,  
其中,所述细胞团制作装置包括培养所述因子导入细胞的初始化培养装置。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述细胞团制作装置还包括扩增所述因子导入细胞的扩增培养装置,并且  
其中,所述方法还包括在所述扩增培养装置中扩增培养所述因子导入细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,泵将包含所述多能性诱导因子的溶液自所述因子保存单元经由所述因子送液通路送至所述因子导入装置。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,在所述因子导入装置中通过RNA脂转染将所述多能性诱导因子导入至所述细胞中。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述多能性诱导因子包括从由DNA、RNA和蛋白质构成的组中选择的至少一种。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述多能性诱导因子被植入到载体中。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述载体包括仙台病毒载体。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述因子导入装置还包括用于使所述因子送液通路中的包括所述多能性诱导因子的液体流动的泵,并且  
其中,所述泵为隔膜泵、管式泵或蠕动泵。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述初始化培养装置包括悬浮培养器,所述悬浮培养器包括:  
半透膜,其中放入所述因子导入细胞与培养基;以及  
容器,其中放入所述半透膜,并且  
于所述半透膜的周围放入所述培养基。
10. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括将所述因子导入细胞自所述因子导入装置经由细胞送液通路送至所述初始化培养装置。
11. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述扩增培养装置包括:  
悬浮培养器,包括其中放入有所述细胞团或所述多个细胞团与培养基的半透膜;以及  
容器,其中放入所述半透膜,并且  
于所述半透膜的周围放入所述培养基。
12. 根据权利要求2所述的方法,所述方法还包括将所述因子导入细胞自所述初始化培养装置经由细胞送液通路送至所述扩增培养装置。
13. 根据权利要求2所述的方法,所述方法还包括通过细胞送液通路将所述初始化培养装置的悬浮培养器的半透膜的内部与所述扩增培养装置的悬浮培养器的半透膜的内部连

接,

其中,所述因子导入细胞和培养基被放入所述初始化培养装置的所述悬浮培养器的所述半透膜中,并且

其中,所述细胞团或所述多个细胞团和培养基被放入所述扩增培养装置的所述悬浮培养器的所述半透膜中。

14. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述细胞团制作装置还包括:

第1分割机构,将包含诱导多能干细胞的所述细胞团或所述多个细胞团分割为至少一个第1细胞团;以及

第2分割机构,将包含诱导多能干细胞的所述细胞团或所述多个细胞团分割为至少一个第2细胞团,所述至少一个第2细胞团包括扩增的细胞或由扩增的细胞组成。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述第1分割机构设置于将所述初始化培养装置与所述扩增培养装置连接的细胞送液通路中。

16. 根据权利要求14所述的方法,所述方法还包括利用所述第1分割机构或所述第2分割机构中的至少一者将所述细胞团或所述多个细胞团分割为单细胞。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述第1分割机构或所述第2分割机构中的至少一者包括在内部具有贯通孔的分割器,所述贯通孔具有大孔径部与小孔径部,所述小孔径部与所述大孔径部连通,

其中,所述大孔径部与所述小孔径部交替,并且所述细胞团或所述多个细胞团流过所述贯通孔。

18. 根据权利要求14所述的方法,

所述第1分割机构或所述第2分割机构中的至少一者包括连结区块,在所述连结区块的内部设有贯通孔,所述连结区块包括第1端部和第2端部,

其中,在所述连结区块的所述第1端部设有凹部,并且在所述连结区块的所述第2端部设有凸部,并且

其中,凸部与邻接的连结区块的凹部嵌合,并且

所述贯通孔包含:第1大孔径部,与所述凹部连通;小孔径部,与所述第1大孔径部连通,并具有比所述第1大孔径部小的孔径;以及第2大孔径部,与所述小孔径部连通,所述第2大孔径部具有比所述小孔径部大的孔径,并且在所述凸部的前端具有开口,并且

所述至少一个第1细胞团或所述至少一个第2细胞团流过所述贯通孔。

19. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括在封装装置中对所述细胞团或所述多个细胞团进行封装。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述封装装置将所述细胞团或所述多个细胞团冻结。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中,溶液置换器连接到所述细胞团制作装置或所述初始化培养装置,所述溶液置换器包括:

筒状构件;以及

液体透过滤器,设置在所述筒状构件内部;

在所述筒状构件上设有:

细胞团导入孔,设置在所述筒状构件内部,用以将溶液自所述细胞团制作装置或所述

初始化培养装置导入至所述液体透过过滤器上；

置换溶液导入孔,用以将置换溶液导入至所述液体透过过滤器上；

细胞团流出孔,用以使含有所述细胞团或所述多个细胞团的所述置换溶液流出至所述液体透过过滤器上;以及

废液流出孔,使透过所述液体透过过滤器的溶液流出。

22. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括通过分离装置自血液中分离细胞,其中,分离的细胞包含在所述含细胞溶液中,以通过所述导入前细胞送液通路运送。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述分离装置还包括对单核细胞进行纯化的单核细胞纯化过滤器。

24. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述因子导入装置、所述初始化培养装置的悬浮培养器或所述扩增培养装置的悬浮培养器中的至少一种被壳体容纳。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,所述初始化培养装置的所述悬浮培养器、所述扩增培养装置的所述悬浮培养器、或所述壳体中的至少一者为一次性的。

26. 根据权利要求2所述的方法,其中,从由所述因子导入装置、所述初始化培养装置的悬浮培养器和所述扩增培养装置的悬浮培养器构成的组中选择的至少一种被容纳在多个壳体中的每个中。

27. 根据权利要求22所述的方法,其中,从由所述分离装置、所述因子导入装置、所述初始化培养装置的悬浮培养器和所述扩增培养装置的悬浮培养器构成的组中选择的至少一种被容纳在多个壳体中的每个中。

28. 根据权利要求2所述的方法,所述方法包括通过温度管理装置管理所述初始化培养装置和所述扩增培养装置中的培养基的温度。

29. 根据权利要求1所述的方法,其中,

利用服务器,基于作业顺序而控制所述诱导因子送液机构、因子导入装置、及细胞团制作装置,并且所述服务器监视所述诱导因子送液机构、所述因子导入装置、及细胞团制作装置是否基于所述作业顺序而运转,并作成运转记录。

30. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述导入前细胞送液通路、所述因子导入装置和所述细胞团制作装置被壳体容纳。

## 用于制作诱导多能干细胞的方法

[0001] 本申请是申请日为2016年8月31日、申请号为201680050144.5、发明名称为“多能性干细胞制造系统”的专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种细胞保存技术,特别涉及一种多能性干细胞制造系统。

### 背景技术

[0003] 胚胎干细胞(Embryonic Stem cell,ES细胞)是由人类或小鼠的早期胚胎而确立的干细胞。ES细胞具有可分化为生物体内所存在的所有细胞的多能性。现在,人类ES细胞可以在帕金森病、幼年型糖尿病、及白血病等众多疾病的细胞移植疗法中利用。然而,在ES细胞的移植中也存在障碍。特别是ES细胞的移植可能引起与不成功的器官移植后所产生的排斥反应同样的免疫排斥反应。而且,对于利用破坏人类胚胎而确立的ES细胞,来自伦理性观点的批判或反对意见较多。

[0004] 在此种背景的状况下,京都大学的山中伸弥教授通过将4种基因:Oct3/4、Klf4、c-Myc、及Sox2导入至体细胞而成功地确立诱导多能干细胞(iPS细胞)。因此,山中教授获得了2012年的诺贝尔生理学或医学奖(例如参照专利文献1)。iPS细胞是并无排斥反应或伦理问题的理想的多能性细胞。因此,期待将iPS细胞应用于细胞移植疗法中。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本专利第4183742号公报

### 发明内容

[0008] 发明所欲解决的课题

[0009] iPS细胞这样的诱导干细胞可通过于细胞中导入基因等诱导因子而确立,从而进行扩增培养、冻结保存。然而,例如在制作临床用iPS细胞(例如GLP、GMP级)、产业化中存在如下所述的问题点。

[0010] 1) 成本

[0011] 临床用iPS细胞需要在保持得非常干净的洁净室中制作、保存。然而,维持所要求的水准的清洁度的成本非常高。因此,需要消耗成本来制作iPS细胞,成为产业化的较大的障碍。

[0012] 2) 品质

[0013] 从干细胞的确立到保存的一系列作业复杂,需要手工操作之处较多。而且,干细胞的制作有时依赖个人的技能。因此,可能由于制作者或实验批次而产生iPS细胞的品质偏差。

[0014] 3) 时间

[0015] 为了防止在洁净室中与特定供体以外的其他人的iPS细胞交叉污染,花费规定时

间在洁净室内制作仅仅源自一个人的iPS细胞。而且,iPS细胞的确立、品质评价需要较长时间。然而,在洁净室内一次仅仅为一个人制作iPS细胞,因此需要非常长的时间来制作众多需求者的iPS细胞。

[0016] 4) 人材

[0017] 如上所述,现状是iPS细胞的制作需要手工作业之处较多。然而,具有能够制作临床用iPS细胞所需的技术的技术人员少。

[0018] 存在从干细胞的确立到保存的一系列作业复杂的问题。对此,本发明的目的之一是提供可制造干细胞的干细胞制造系统。

[0019] 解决问题的手段

[0020] 根据本发明的形态而提供一种干细胞制造系统,其包含:导入前细胞送液通路,使含有细胞的溶液通过;因子导入装置,与导入前细胞送液通路连接,于细胞中导入多能性诱导因子而制作诱导因子导入细胞;细胞团制作装置,对诱导因子导入细胞进行培养而制作包含干细胞的多个细胞团;壳体,容纳导入前细胞送液通路、诱导因子送液机构、因子导入装置、及细胞团制作装置;细胞团制作装置包含:初始化培养装置,对在因子导入装置中所制作的诱导因子导入细胞进行培养;扩增培养装置,对在初始化培养装置中所确立的包含干细胞的多个细胞团进行扩增培养;初始化培养装置包含第1培养基补给装置,对诱导因子导入细胞补给培养基,扩增培养装置包含第2培养基补给装置,对多个细胞团补给培养基。

[0021] 在所述干细胞制造系统中,第1培养基补给装置连续地对诱导因子导入细胞补给培养基。

[0022] 在所述干细胞制造系统中,第1培养基补给装置以规定时机对诱导因子导入细胞补给所述培养基。

[0023] 在所述干细胞制造系统中,第2培养基补给装置连续地对多个细胞团补给培养基。

[0024] 在所述干细胞制造系统中,第2培养基补给装置以规定时机对多个细胞团补给培养基。

[0025] 在所述干细胞制造系统中,因子导入装置包含:因子导入部,与导入前细胞送液通路连接;因子保存部,保存多能性诱导因子;因子送液通路,用以使多能性诱导因子自因子保存部向因子导入部流动;泵,用以使因子送液通路内的液体流动。

[0026] 在所述干细胞制造系统中,在因子导入部中,利用RNA脂质转染而于细胞中导入多能性诱导因子。

[0027] 在所述干细胞制造系统中,多能性诱导因子是DNA、RNA、或蛋白质。

[0028] 在所述干细胞制造系统中,多能性诱导因子植入至载体中。

[0029] 在所述干细胞制造系统中,载体是仙台病毒载体。

[0030] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。

[0031] 在所述干细胞制造系统中,初始化培养装置包含悬浮培养器,所述悬浮培养器包含:透析管,放入有诱导因子导入细胞与凝胶培养基;容器,放入有透析管,于透析管的周围放入有凝胶培养基。

[0032] 在所述干细胞制造系统中,透析管的截留分子量为0.1KDa以上。

[0033] 在所述干细胞制造系统中,透析管包含选自纤维素酯、纤维素酯类、再生纤维素、及乙酸纤维素的至少一种。

- [0034] 在所述干细胞制造系统中,第1培养基补给装置对容器内的透析管的周围补给凝胶培养基。
- [0035] 在所述干细胞制造系统中,第1培养基补给装置对透析管内补给凝胶培养基。
- [0036] 所述干细胞制造系统更包含培养基送液通路,补给的凝胶培养基流过所述培养基送液通路。
- [0037] 在所述干细胞制造系统中,培养基送液通路是二氧化碳透过性。
- [0038] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使培养基送液通路内的液体流动。
- [0039] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0040] 所述干细胞制造系统更包含冷藏保存部,冷藏保存所补给的凝胶培养基。
- [0041] 所述干细胞制造系统更包含废液送液通路,所述废液送液通路与容器连接,用以使容器内的凝胶培养基流出至外部。
- [0042] 所述干细胞制造系统更包含导入细胞送液通路,用以将诱导因子导入细胞自因子导入装置送至初始化培养装置。
- [0043] 在所述干细胞制造系统中,导入细胞送液通路是二氧化碳透过性。
- [0044] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使导入细胞送液通路内的液体流动。
- [0045] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0046] 在所述干细胞制造系统中,扩增培养装置包含悬浮培养器,所述悬浮培养器包含:透析管,放入多个细胞团与凝胶培养基;容器,放入透析管,于透析管的周围放入凝胶培养基。
- [0047] 在所述干细胞制造系统中,透析管的截留分子量为0.1KDa以上。
- [0048] 在所述干细胞制造系统中,透析管包含选自纤维素酯、纤维素酯类、再生纤维素、及乙酸纤维素的至少一种。
- [0049] 在所述干细胞制造系统中,第2培养基补给装置对容器内的透析管的周围补给凝胶培养基。
- [0050] 在所述干细胞制造系统中,第2培养基补给装置对透析管内补给凝胶培养基。
- [0051] 所述干细胞制造系统更包含培养基送液通路,所补给的凝胶培养基流过所述培养基送液通路。
- [0052] 在所述干细胞制造系统中,培养基送液通路是二氧化碳透过性。
- [0053] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使培养基送液通路内的液体流动。
- [0054] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0055] 所述干细胞制造系统更包含冷藏保存部,冷藏保存所补给的凝胶培养基。
- [0056] 所述干细胞制造系统更包含废液送液通路,所述废液送液通路与容器连接,用以使容器内的凝胶培养基流出至外部。
- [0057] 所述干细胞制造系统更包含导入细胞送液通路,用以将诱导因子导入细胞自初始化培养装置送至扩增培养装置。
- [0058] 所述干细胞制造系统更包含导入细胞送液通路,将初始化培养装置的悬浮培养器的透析管内与扩增培养装置的悬浮培养器的透析管内连接。
- [0059] 在所述干细胞制造系统中,导入细胞送液通路是二氧化碳透过性。
- [0060] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使导入细胞送液通路内的液体流动。

- [0061] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0062] 在所述干细胞制造系统中,初始化培养装置及扩增培养装置的至少一者包含在内部放入有培养基的二氧化碳透过性袋。
- [0063] 在所述干细胞制造系统中,细胞团制作装置更包含:第1分割机构,将在初始化培养装置中确立的包含干细胞的细胞团分割为多个细胞团;第2分割机构,将在扩增培养装置中扩增培养的包含干细胞的细胞团分割为多个细胞团。
- [0064] 在所述干细胞制造系统中,第1分割机构设于导入细胞送液通路上,所述导入细胞送液通路用以将诱导因子导入细胞自初始化培养装置送至扩增培养装置。
- [0065] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构的至少一者将细胞团分割为单细胞。
- [0066] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构的至少一者包含在内部具有贯通孔的分割器,贯通孔交互具有大孔径部与小孔径部,所述小孔径部与大孔径部连通,孔径比大孔径部小,含有细胞团的培养基流过贯通孔。
- [0067] 在所述干细胞制造系统中,大孔径部的中心轴与小孔径部的中心轴偏移。
- [0068] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构的至少一者分别包含在内部设有贯通孔的连结区块,在该连结区块的第1端部设有凹部,在该连结区块的第2端部设有凸部,在具有多个该连结区块的情况下,凸部与邻接的连结区块的凹部嵌合,贯通孔包含:第1大孔径部,与凹部连通;小孔径部,与第1大孔径部连通,孔径比第1大孔径部小;第2大孔径部,与小孔径部连通,孔径比小孔径部大,在凸部的前端具有开口,含有细胞团的培养基流过贯通孔。
- [0069] 在所述干细胞制造系统中,在具有多个连结区块,该多个连结区块连结的情况下,第2大孔径部与邻接的连结区块的第1大孔径部平滑地连通。
- [0070] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2大孔径部的中心轴与小孔径部的中心轴偏移。
- [0071] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构分别更包含在内部设有贯通孔的前端区块,在该前端区块的第1端部设有凹部,在该前端区块的第2端部设有管嘴,该前端区块的凹部与连结区块的凸部嵌合,贯通孔包含大孔径部与小孔径部,所述大孔径部与凹部连通,所述小孔径部与大孔径部连通,孔径比大孔径部小,且在管嘴的前端具有开口。
- [0072] 在所述干细胞制造系统中,在连结区块与前端区块连结时,连结区块的第2大孔径部与前端区块的大孔径部平滑地连通。
- [0073] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构分别更包含在内部设有贯通孔的末端区块,在该末端区块的第1端部设有凹部,在末端区块的第2端部设有凸部,该末端区块的凸部与连结区块的凹部嵌合。
- [0074] 在所述干细胞制造系统中,第1及第2分割机构分别更包含:插入管嘴,插入至末端区块的凹部;吸引排出器,与插入管嘴连通,吸引排出含有细胞团的培养基。
- [0075] 在所述干细胞制造系统中,更包含封装装置,依序对多个细胞团的各个进行封装,壳体容纳封装装置。
- [0076] 在所述干细胞制造系统中,细胞团制作装置更包含细胞团搬送机构,将多个细胞团依序送至封装装置。



- [0077] 在所述干细胞制造系统中,封装装置使用帕尔贴元件或液氮而将细胞团冻结。
- [0078] 在所述干细胞制造系统中,封装装置利用气化压缩或气化吸收而将细胞团冻结。
- [0079] 所述干细胞制造系统更包含溶液置换器,所述溶液置换器包含筒状构件、及配置于筒状构件内部的液体透过过滤器,在筒状构件上设有细胞团导入孔,用以将含有多个细胞团的溶液导入至液体透过过滤器上;置换溶液导入孔,用以将置换溶液导入至液体透过过滤器上;细胞团流出孔,用以使含有多个细胞团的置换溶液流出至液体透过过滤器上;废液流出孔,使透过液体透过过滤器的溶液流出。
- [0080] 所述干细胞制造系统更包含与废液流出孔连接的废液送液通路,在废弃含有多个细胞团的溶液时,容许废液送液通路中的溶液流动,在使多个细胞团分散于置换溶液中时,并不容许废液送液通路中的溶液流动。
- [0081] 在所述干细胞制造系统中,置换溶液是培养基、冻结保存液、或细胞团分割酶溶液。
- [0082] 所述干细胞制造系统更包含导入细胞送液通路,用以将多个细胞团自扩增培养装置送至溶液置换器。
- [0083] 所述干细胞制造系统更包含导入细胞送液通路,将扩增培养装置的悬浮培养器的透析管内与溶液置换器的细胞团导入孔连接。
- [0084] 在所述干细胞制造系统中,导入细胞送液通路是二氧化碳透过性。
- [0085] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使导入细胞送液通路内的液体流动。
- [0086] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0087] 所述干细胞制造系统更包含自血液中分离细胞的分离装置,含有在分离装置中分离的细胞的溶液通过导入前细胞送液通路。
- [0088] 在所述干细胞制造系统中,分离装置利用磁性细胞分离方法或使用红血球凝聚剂的方法而自血液分离单核细胞。
- [0089] 在所述干细胞制造系统中,分离装置更包含对单核细胞进行纯化的单核细胞纯化过滤器。
- [0090] 所述干细胞制造系统更包含泵,用以使导入前细胞送液通路内的液体流动。
- [0091] 在所述干细胞制造系统中,泵是隔膜泵、管式泵、或蠕动泵(注册商标)。
- [0092] 所述干细胞制造系统更包含箱体,所述箱体容纳因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、与扩增培养装置的悬浮培养器的至少任一种,配置于壳体内。
- [0093] 在所述干细胞制造系统中,初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮培养器、与箱体为一次性的。
- [0094] 所述干细胞制造系统更包含箱体,所述箱体容纳分离装置、因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮培养器、与溶液置换器的至少任一种,配置于壳体内。
- [0095] 在所述干细胞制造系统中,分离装置、因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮培养器、溶液置换器、与箱体为一次性的。
- [0096] 所述干细胞制造系统更包含配置于壳体内的多个箱体,在多个盒体的各个中容纳因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、与扩增培养装置的悬浮培养器的至少任一种。
- [0097] 在所述干细胞制造系统中,初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮

培养器、与多个箱体为一次性的。

[0098] 所述干细胞制造系统更包含配置于壳体内的多个箱体,在多个箱体的各个中容纳分离装置、因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮培养器、与溶液置换器的至少任一种。

[0099] 在所述干细胞制造系统中,分离装置、因子导入部、初始化培养装置的悬浮培养器、扩增培养装置的悬浮培养器、溶液置换器、与多个箱体为一次性的。

[0100] 在所述干细胞制造系统中,箱体与壳体具有相互嵌合的嵌合部,箱体配置于壳体内的规定位置。

[0101] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的送液通路与箱体外的泵连接。

[0102] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的因子导入部与箱体外的因子保存部连接。

[0103] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的初始化培养装置的悬浮培养器及扩增培养装置的悬浮培养器与箱体外的保存培养基的培养基保存部连接。

[0104] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的初始化培养装置的悬浮培养器及扩增培养装置的悬浮培养器与箱体外的保管废液的废液保管部连接。

[0105] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的分离装置与箱体外的保存血液的血液保存部连接。

[0106] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的分离装置与箱体外的保存血液分离剂的分离剂保存部连接。

[0107] 在所述干细胞制造系统中,如果在壳体内配置箱体,则箱体内的溶液置换器与箱体外的保存冻结保存液的冻结保存液保存部连接。

[0108] 所述干细胞制造系统更包含初始化培养摄影装置,对在初始化培养装置中培养的细胞进行摄影,扩增培养摄影装置,对在扩增培养装置中培养的细胞进行摄影。

[0109] 在所述干细胞制造系统中,初始化培养摄影装置及扩增培养摄影装置分别经由焦阑透镜而对细胞进行摄影。

[0110] 所述干细胞制造系统更包含图像处理部,对初始化培养摄影装置及扩增培养摄影装置的至少任一种所获得的图像应用高通滤波。

[0111] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部对应用了高通滤波的图像应用分水岭算法,抽出图像中的细胞团。

[0112] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部在对图像应用分水岭算法之前,对图像应用距离变换(Distance Transform)法。

[0113] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部算出所抽出的细胞团的大小。

[0114] 在所述干细胞制造系统中,在根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的大小为阈值以上的情况下,在初始化培养装置中确立的包含干细胞的多个细胞团移动至扩增培养装置中。

[0115] 在所述干细胞制造系统中,在根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的大小为阈值以上的情况下,在扩增培养装置中,多个细胞团进行继代。

[0116] 在所述干细胞制造系统中,在初始化培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团

的大小而变化,所述细胞团的大小根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0117] 在所述干细胞制造系统中,在扩增培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团的大小而变化,所述细胞团的大小根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0118] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部算出所抽出的细胞团数。

[0119] 在所述干细胞制造系统中,在初始化培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团数而变化,所述细胞团数根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0120] 在所述干细胞制造系统中,在扩增培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团数而变化,所述细胞团数根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0121] 所述干细胞制造系统更包含关系储存装置,储存培养基的浊度与培养基中的细胞团的密度的关系,且更包含图像处理部,基于初始化培养摄影装置及扩增培养摄影装置的至少任一种所获得的图像,算出培养细胞的培养基的浊度值,基于所算出的浊度值与关系,算出所摄影的细胞团的密度值。

[0122] 在所述干细胞制造系统中,在根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的密度为阈值以上的情况下,在初始化培养装置中确立的包含干细胞的多个细胞团移动至扩增培养装置中。

[0123] 在所述干细胞制造系统中,在根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的密度为阈值以上的情况下,在扩增培养摄影装置中,多个细胞团进行继代。

[0124] 在所述干细胞制造系统中,在初始化培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团的密度而变化,所述细胞团的密度根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0125] 在所述干细胞制造系统中,在扩增培养装置中,培养基的供给速度根据细胞团的密度而变化,所述细胞团的密度根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出。

[0126] 所述干细胞制造系统更包含关系储存装置,储存培养基的颜色与培养基的氢离子指数的关系,且更包含图像处理部,算出初始化培养摄影装置及扩增培养摄影装置的至少任一种所获得的图像中的培养基的颜色的值,基于所算出的颜色的值与关系,算出所摄影的培养基的氢离子指数值。

[0127] 在所述干细胞制造系统中,在根据初始化培养摄影装置所摄影的图像而算出的氢离子指数为规定范围外的情况下,在初始化培养装置中交换培养基。

[0128] 在所述干细胞制造系统中,在根据扩增培养摄影装置所摄影的图像而算出的氢离子指数为规定范围外的情况下,在扩增培养装置中交换培养基。

[0129] 在所述干细胞制造系统中,培养基的颜色是培养基的色相。

[0130] 在所述干细胞制造系统中,在初始化培养装置中所测定的氢离子指数为规定范围外的情况下,在初始化培养装置中交换培养基。

[0131] 在所述干细胞制造系统中,在扩增培养装置中所测定的氢离子指数为规定的范围外的情况下,在扩增培养装置中交换培养基。

[0132] 在所述干细胞制造系统中,导入前细胞送液通路的内壁为细胞非附着性。

[0133] 在所述干细胞制造系统中,导入前细胞送液通路与诱导因子送液机构设于基板上。

[0134] 所述干细胞制造系统更包含空气清洁装置,使壳体内的气体变清洁。

[0135] 所述干细胞制造系统更包含温度管理装置,管理壳体内的气体的温度。

[0136] 所述干细胞制造系统更包含温度管理装置,管理初始化培养装置及扩增培养装置中的培养基的温度。

[0137] 在所述干细胞制造系统中,温度管理装置在培养基的温度低于规定范围的情况下,使培养基的温度上升,在培养基的温度高于规定范围的情况下,使所述培养基的温度降低。

[0138] 所述干细胞制造系统更包含二氧化碳浓度管理装置,管理壳体内的气体的二氧化碳浓度。

[0139] 所述干细胞制造系统更包含杀菌装置,对壳体内进行干热杀菌或气体杀菌。

[0140] 在所述干细胞制造系统中,利用服务器,基于作业顺序而控制诱导因子送液机构、因子导入装置、及细胞团制作装置,服务器监视诱导因子送液机构、因子导入装置、及细胞团制作装置是否基于作业顺序而运转,作成运转记录。

[0141] 而且,根据本发明的形态而提供一种细胞团分割器,其包含连结区块,所述连结区块在内部设有流过含有细胞团的培养基的贯通孔,在该连结区块的第1端部设有凹部,在该连结区块的第2端部设有凸部,在具有多个该连结区块的情况下,凸部与邻接的连结区块的凹部嵌合,贯通孔包含:第1大孔径部,与凹部连通;小孔径部,与第1大孔径部连通,孔径比第1大孔径部小;第2大孔径部,与小孔径部连通,孔径比小孔径部大,在凸部的前端具有开口。

[0142] 在所述细胞团分割器中,在具有多个连结区块,多个连结区块连结的情况下,第2大孔径部与邻接的连结区块的第1大孔径部平滑地连通。

[0143] 在所述细胞团分割器中,第1及第2大孔径部的中心轴与小孔径部的中心轴偏移。

[0144] 所述细胞团分割器更包含在内部设有贯通孔的前端区块,在该前端区块的第1端部设有凹部,在该前端区块的第2端部设有管嘴,该前端区块的凹部与连结区块的凸部嵌合,贯通孔包含大孔径部与小孔径部,所述大孔径部与凹部连通,所述小孔径部与大孔径部连通,孔径比大孔径部小,且在管嘴的前端具有开口。

[0145] 在所述细胞团分割器中,在连结区块与前端区块连结时,连结区块的第2大孔径部与前端区块的大孔径部平滑地连通。

[0146] 所述细胞团分割器更包含在内部设有贯通孔的末端区块,在末端区块的第1端部设有凹部,在末端区块的第2端部设有凸部,该末端区块的凸部与所述连结区块的凹部嵌合。

[0147] 所述细胞团分割器更包含插入管嘴,插入至末端区块的凹部;吸引排出器,与插入管嘴连通,吸引排出含有细胞团的培养基。

[0148] 而且,根据本发明的形态而提供一种干细胞制造系统,其包含:摄影装置,对培养细胞进行摄影;图像处理部,对摄影装置所获得的图像应用高通滤波。

[0149] 在所述干细胞制造系统中,摄影装置经由焦阑透镜而对细胞进行摄影。

[0150] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部对应用了高通滤波的图像应用分水岭算法,抽出图像中的细胞团。

[0151] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部在对图像应用分水岭算法之前,对图像应用距离变换法。

[0152] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部算出所抽出的细胞团的大小。

[0153] 在所述干细胞制造系统中,在根据摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的大小为阈值以上的情况下,在初始化培养中确立的包含干细胞的多个细胞团移动至扩增培养。

[0154] 在所述干细胞制造系统中,在根据摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的大小为阈值以上的情况下,在扩增培养中,多个细胞团进行继代。

[0155] 在所述干细胞制造系统中,培养器中的培养基的供给速度根据细胞团的大小而变化,所述细胞团的大小根据摄影装置所摄影的图像而算出。

[0156] 在所述干细胞制造系统中,图像处理部算出所抽出的细胞团数。

[0157] 在所述干细胞制造系统中,培养器中的培养基的供给速度根据细胞团数而变化,所述细胞团数根据摄影装置所摄影的图像而算出。

[0158] 而且,根据本发明的形态而提供一种干细胞制造系统,其包含:摄影装置,对培养细胞进行摄影;关系储存装置,储存培养基的浊度与培养基中的细胞团的密度的关系;图像处理部,基于摄影装置所获得的图像,算出培养细胞的培养基的浊度值,基于所算出的浊度值与关系而算出所摄影的细胞团的密度值。

[0159] 在所述干细胞制造系统中,摄影装置经由焦阑透镜而对细胞进行摄影。

[0160] 在所述干细胞制造系统中,在根据摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的密度为阈值以上的情况下,在初始化培养中确立的包含干细胞的多个细胞团移动至扩增培养。

[0161] 在所述干细胞制造系统中,在根据摄影装置所摄影的图像而算出的细胞团的密度为阈值以上的情况下,在扩增培养中,多个细胞团进行继代。

[0162] 在所述干细胞制造系统中,在培养器中,培养基的供给速度根据细胞团的密度而变化,所述细胞团的密度根据摄影装置所摄影的图像而算出。

[0163] 而且,根据本发明的形态而提供一种干细胞制造系统,其包含:摄影装置,对培养细胞进行摄影;关系储存装置,储存培养基的颜色与培养基的氢离子指数的关系;图像处理部,算出摄影装置所获得的图像中的培养基的颜色的值,基于所算出的颜色的值与关系,算出所摄影的培养基的氢离子指数值。

[0164] 在所述干细胞制造系统中,在根据摄影装置所摄影的图像而算出的氢离子指数为规定范围外的情况下,在培养器中交换培养基。

[0165] 在所述干细胞制造系统中,培养基的颜色是培养基的色相。

[0166] 发明的效果

[0167] 根据本发明可提供能够制造干细胞的干细胞制造系统。

## 附图说明

[0168] 图1是本发明的实施方式的干细胞制造系统的示意图。

[0169] 图2是本发明的实施方式的干细胞制造系统的导入细胞送液通路的一例的示意性剖视图。

[0170] 图3是本发明的实施方式的干细胞制造系统的导入细胞送液通路的一例的示意性剖视图。

[0171] 图4是本发明的实施方式的干细胞制造系统中所使用的培养袋的示意图。

[0172] 图5是本发明的实施方式的悬浮培养器的示意图。

[0173] 图6是本发明的实施方式的补给培养基送液泵与悬浮培养器的示意图。

- [0174] 图7是本发明的实施方式的补给培养基送液泵与悬浮培养器的示意图。
- [0175] 图8是本发明的实施方式的悬浮培养器与摄影装置的示意图。
- [0176] 图9是本发明的实施方式的悬浮培养器与摄影装置的示意图。
- [0177] 图10是本发明的实施方式的细胞的图像的一例。
- [0178] 图11是本发明的实施方式的中央处理器的示意图。
- [0179] 图12是本发明的实施方式的细胞团的图像的一例。
- [0180] 图13是本发明的实施方式的进行了二值化处理的细胞团的图像的一例。
- [0181] 图14是本发明的实施方式的应用了高通滤波的细胞团的图像的一例。
- [0182] 图15是本发明的实施方式的应用了分水岭算法的细胞团的图像的一例。
- [0183] 图16是本发明的实施方式的应用了距离变换法的细胞团的图像的一例。
- [0184] 图17是本发明的实施方式的应用了分水岭算法的细胞团的图像的一例。
- [0185] 图18是本发明的实施方式的分割为多个区域的细胞团的图像的一例。
- [0186] 图19是本发明的实施方式的抽出轮廓的细胞团的图像的一例。
- [0187] 图20是本发明的实施方式的抽出轮廓的细胞团的图像的一例。
- [0188] 图21是本发明的实施方式的细胞的尺寸的直方图的一例。
- [0189] 图22是本发明的实施方式的悬浮培养器与摄影装置的示意图。
- [0190] 图23是表示本发明的实施方式的培养基的pH与培养基的色相的关系的图表的一例。
- [0191] 图24是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0192] 图25是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0193] 图26是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0194] 图27是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0195] 图28是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0196] 图29是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0197] 图30是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0198] 图31是本发明的实施方式的细胞团分割器的示意图。
- [0199] 图32是本发明的实施方式的被分割的细胞团的图像的一例。
- [0200] 图33是本发明的实施方式的溶液置换器的示意图。
- [0201] 图34是本发明的实施方式的干细胞制造系统的示意图。
- [0202] 图35是实施例1的荧光显微镜照片。
- [0203] 图36是表示实施例1的荧光激活流式细胞仪的分析结果的图表。
- [0204] 图37是实施例2的iPS细胞集落的照片。
- [0205] 图38是实施例2的iPS细胞集落的照片。
- [0206] 图39是实施例2的iPS细胞集落的照片。
- [0207] 图40是表示实施例2的iPS细胞集落的分化状态的图表。
- [0208] 图41是实施例3的iPS细胞集落的照片。
- [0209] 图42是表示实施例4的结果的图表。
- [0210] 图43是实施例5的iPS细胞团的照片。
- [0211] 图44是表示实施例5的结果的图表。

## 具体实施方式

[0212] 以下,对本发明的实施方式加以说明。在以下附图的记载中,以同一或类似符号表示同一或类似部分。但附图是示意性的。因此,具体的尺寸等应对照以下的说明而判断。而且,在附图相互之间,当然包含相互的尺寸关系或比例不同的部分。

[0213] 本发明的实施方式的干细胞制造系统如图1所示那样包含:分离装置10,自血液中分离细胞;导入前细胞送液通路20,使含有分离装置10中所分离的细胞的溶液通过;诱导因子送液机构21,将多能性诱导因子送至导入前细胞送液通路20内;因子导入装置30,与导入前细胞送液通路20连接,于细胞中导入多能性诱导因子而制作诱导因子导入细胞;细胞团制作装置40,对诱导因子导入细胞进行培养而制作包含干细胞的多个细胞团;封装装置100,依序对多个细胞团的各个进行封装。

[0214] 干细胞制造系统进一步包含小型的壳体200,容纳分离装置10、导入前细胞送液通路20、诱导因子送液机构21、因子导入装置30、细胞团制作装置40、及封装装置100。

[0215] 干细胞制造系统还可以进一步包含:空气清洁装置,使壳体200内的气体变清洁;温度管理装置,管理壳体200内的气体的温度;及二氧化碳浓度管理装置,管理壳体200内的气体的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)浓度。空气清洁装置还可以包含清洁度传感器,监视壳体200内的气体的清洁度。空气清洁装置例如使用高效微粒空气(High Efficiency Particulate Air, HEPA)过滤器等而对壳体200内的空气进行净化。空气清洁装置例如使壳体200内的空气的清洁度成为ISO基准14644-1中的ISO1至ISO6的等级。温度管理装置还可以包含温度传感器,监视壳体200内的气体温度。CO<sub>2</sub>浓度管理装置还可以包含CO<sub>2</sub>浓度传感器,监视壳体200内的气体的CO<sub>2</sub>浓度。

[0216] 在壳体200上例如设有挡板等,在挡板关闭的状态下,内部完全封闭,可以将内部空气的清洁度、温度、及CO<sub>2</sub>浓度保持为固定。壳体200优选为透明,从而可自外部观察内部的装置状态。而且,壳体200还可以是一体化有橡胶手套等手套的手套箱(glove box)。

[0217] 分离装置10接收例如放入有人类血液的小瓶。分离装置10包含抗凝聚剂罐,保存例如乙二胺四乙酸(EDTA)、肝素、及生物学制剂基准血液保存液A液(ACD-A液、泰尔茂株式会社)等抗凝聚剂。分离装置10使用泵等,将抗凝聚剂自抗凝聚剂罐添加至人类血液中。

[0218] 而且,分离装置10包含分离用试剂罐,保存例如Ficoll-Paque PREMIUM(注册商标、日本通用电气医疗株式会社)等单核细胞分离用试剂。分离装置10使用泵等,将单核细胞分离用试剂自分离用试剂罐每次5mL地分注于例如2根15mL的管中。另外,还可以使用树脂袋而替代管。

[0219] 另外,分离装置10包含缓冲液罐,保存磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)等缓冲液。分离装置10使用泵等,将5mL缓冲液自缓冲液罐加入至例如5mL人类血液中而进行稀释。而且,进一步而言,分离装置10使用泵等,将所稀释的人类血液每次5mL地加入至管中的单核细胞分离用试剂上。

[0220] 分离装置10进一步包含可设定温度的离心机。离心机设定为例如18℃。分离装置10使用移动装置等,将放入有单核细胞分离用试剂及人类血液等的管放到离心机的固定器上。离心机以例如400×g对管中的溶液进行30分钟的离心。还可以使树脂袋离心而替代管。

[0221] 在离心后,分离装置10用泵等回收管中的溶液的单核细胞的白色浑浊的中间层。分离装置10使用泵等,将所回收的单核细胞的悬浮液送出至导入前细胞送液通路20。或者,

进一步而言,分离装置10对2mL所回收的单核细胞溶液加入例如12mL的PBS,将管放到离心机的固定器上。离心机以例如 $200 \times g$ 对管中的溶液进行10分钟的离心。

[0222] 在离心后,分离装置10使用泵等,将管中的溶液的上清液吸引除去,将X-VIVO 10(注册商标、日本龙沙株式会社)等的单核细胞培养基3mL加入至管中的单核细胞溶液中而使其悬浮。分离装置10使用泵等,将单核细胞悬浮液送出至导入前细胞送液通路20。另外,分离装置10还可以使用透析膜,自血液中分离单核细胞。而且,在使用自皮肤等预先分离的纤维母细胞等体细胞的情况下,也可以并无分离装置10。

[0223] 分离装置10还可以利用离心分离以外的方法而分离适合诱导的细胞。例如,如果需分离的细胞是T细胞,则可利用淘选(panning)而分离CD3、CD4、CD8的任意者为阳性的细胞。如果需分离的细胞是血管内皮前驱细胞,则可利用淘选而分离CD34为阳性的细胞。如果需分离的细胞是B细胞,则可利用淘选而分离CD10、CD19、CD20的任意者为阳性的细胞。而且,并不限定于淘选,还可以利用磁性细胞分离方法(MACS)或流式细胞仪等而分离。而且,适合诱导的细胞并不限定于源自血液的细胞。

[0224] 诱导因子送液机构21包含诱导因子导入试剂罐,保存诱导因子导入试剂溶液等。基因导入试剂溶液等诱导因子导入试剂溶液例如包含人类T细胞Nucleofector(Human T Cell Nucleofector)(注册商标、日本龙沙株式会社)溶液等电穿孔溶液、增补物溶液、及质粒套装(Plasmid Set)。质粒套装例如包含pCXLE-hOCT3/4-shp53-F 0.83 $\mu$ g、pCXLE-hSK 0.83 $\mu$ g、pCE-hUL 0.83 $\mu$ g、及pCXWB-EBNA1 0.5 $\mu$ g。诱导因子送液机构21使用微泵等,以单核细胞悬浮液悬浮于诱导因子导入试剂溶液中的方式,将诱导因子导入试剂溶液送出至导入前细胞送液通路20。

[0225] 还可以在导入前细胞送液通路20的内壁涂层细胞并不附着的聚甲基丙烯酸-2-羟基乙酯(poly 2-hydroxyethyl methacrylate,poly-HEMA),使其成为细胞非附着性。或者,导入前细胞送液通路20的材料还可以使用细胞难以附着材料。而且,导入前细胞送液通路20的材料使用导热率良好、CO<sub>2</sub>透过性的材料,由此使导入前细胞送液通路20内的条件变得与壳体200内所管理的温度及CO<sub>2</sub>浓度同等。进一步自防止污染的观点考虑,还可以在导入前细胞送液通路20设有逆流防止阀。

[0226] 与导入前细胞送液通路20连接的因子导入装置30例如为电穿孔器,接收诱导因子导入试剂溶液与单核细胞悬浮液的混合液,对单核细胞实施质粒的电穿孔。因子导入装置30在实施电穿孔后,在含有对质粒进行了电穿孔的单核细胞的溶液中加入单核细胞培养基。因子导入装置30使用泵等,将含有对质粒进行了电穿孔的单核细胞(以下称为“诱导因子导入细胞”)的溶液送出至导入细胞送液通路31中。

[0227] 另外,因子导入装置30并不限定于电穿孔器。因子导入装置30还可以利用脂转染(lipofection)法将编码启动因子的RNA导入至细胞中。所谓脂转染法是利用电性相互作用而形成作为阴性荷电物质的核酸与阳性荷电脂质的复合物,利用内吞作用(endocytosis)或膜融合而将复合物取入至细胞内的方法。脂转染法具有如下优点:对细胞的损伤少,导入效率优异,操作简单,并不花费时间等。而且,在脂转染法中,并无在细胞的基因组(genome)中插入启动因子的可能性,因此将所获得的干细胞作为全基因组序列,无需确认有无插入外来基因。作为多能性诱导因子的启动因子RNA例如包含Oct3/4的mRNA、Sox2的mRNA、Klf4的mRNA、及c-Myc的mRNA。



[0228] 在启动因子RNA的脂质转染中使用例如小分子干扰RNA (siRNA) 或脂质转染试剂。RNA的脂质转染试剂可使用siRNA的脂质转染试剂及mRNA的脂质转染试剂。更具体而言, RNA的脂质转染试剂可使用Lipofectamine (注册商标) RNAiMAX (赛默飞世尔科技, Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine (注册商标) MessengerMAX (赛默飞世尔科技)、Lipofectamin (注册商标) 2000、Lipofectamin (注册商标) 3000、NeonTransfection System (赛默飞世尔科技)、Stemfect RNA转染试剂 (Stemfect)、NextFect (注册商标) RNA转染试剂 (BiooScientific)、Amaxa (注册商品) 人类T细胞Nucleofector (注册商品) 试剂盒 (龙沙 (Lonza) 公司、VAPA-1002)、Amaxa (注册商品) 人类CD34细胞Nucleofector (注册商品) 试剂盒 (龙沙公司、VAPA-1003)、及ReproRNA (注册商标) 转染试剂 (干细胞技术公司, STEMCELL Technologies) 等。

[0229] 因子导入装置30在利用脂转染法将启动因子导入至细胞的情况下, 通过诱导因子送液机构21将启动因子RNA及试剂等送出至导入前细胞送液通路20。

[0230] 也可以在导入细胞送液通路31的内壁涂层细胞并不附着的poly-HEMA而使其成为非附着性。或者, 导入细胞送液通路31的材料还可以使用细胞难以附着材料。而且, 导入细胞送液通路31的材料使用导热率良好、CO<sub>2</sub>透过性的材料, 由此使导入细胞送液通路31内的条件变得与壳体200内所管理的温度及CO<sub>2</sub>浓度同等。进一步自防止污染的观点考虑, 还可以在导入细胞送液通路31设有逆流防止阀。而且, 在电穿孔后, 会产生许多细胞将死、已死的细胞的细胞团。因此, 还可以在导入细胞送液通路31设置除去死细胞团的过滤器。或者, 还可以如图2所示那样, 在导入细胞送液通路31内部设置使内径断续地变化的一个或多个皱襞。而且, 或者还可以如图3所示那样, 使导入细胞送液通路31的内径断续地变化。

[0231] 如图1所示, 与导入细胞送液通路31连接的细胞团制作装置40包含: 初始化培养装置50, 对在因子导入装置30中制作的诱导因子导入细胞进行培养; 第1分割机构60, 将在初始化培养装置50中确立的包含干细胞的细胞团 (细胞集落) 分割为多个细胞团; 扩增培养装置70, 对在第1分割机构60中分割的多个细胞团进行扩增培养; 第2分割机构80, 将在扩增培养装置70中扩增培养的包含干细胞的细胞团分割为多个细胞团; 细胞团搬送机构90, 将多个细胞团依序送至封装装置100。

[0232] 初始化培养装置50可以在内部容纳孔板。而且, 初始化培养装置50包含移液机。初始化培养装置50自导入细胞送液通路31接收含有诱导因子导入细胞的溶液, 利用移液机将溶液分配至孔中。初始化培养装置50在将诱导因子导入细胞分配至孔中之后, 在例如第3、5、7日加入StemFit (注册商标、味之素株式会社) 等干细胞培养基。还可以在培养基中添加碱性的纤维母细胞生长因子 (basic FGF) 作为增补物。另外, 还可以将StemBeads FGF2 (Funakoshi) 这样的将FGF-2 (basic FGF、bFGF、FGF-b) 持续供给至培养基的缓释性珠粒添加于培养基中。而且, 存在FGF不稳定的情况, 因此还可以使类肝素化聚合物与FGF共轭, 从而使FGF稳定化。进一步而言, 还可以在培养基中添加转移生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 或激活素 (Activin) 等。初始化培养装置50在将诱导因子导入细胞分配至孔中后, 例如在第9日进行培养基交换, 以后每隔2日进行培养基交换直至iPS细胞的细胞团 (集落) 超过1mm的程度。另外, 所谓交换培养基, 还包含置换一部分培养基或者补给培养基。

[0233] 如果形成细胞团, 则初始化培养装置50利用移液机而回收细胞团, 在所回收的细胞团中添加TrypLE Select (注册商标、生命技术公司) 等胰蛋白酶替代重组酶。进一步而

言,初始化培养装置50将放入有所回收的细胞团的容器放到培养箱中,在37℃、CO<sub>2</sub>为5%下使细胞团与胰蛋白酶替代重组酶进行10分钟的反应。另外,在使细胞团物理性破碎的情况下,也可以并无胰蛋白酶替代重组酶。例如,初始化培养装置50利用移液机的移液(pipetting)而使细胞团破碎。而且,或者初始化培养装置50还可以使细胞团通过设有过滤器的导管(pipe),或与如图2或图3所示的导入细胞送液通路31同样地使内径断续地变化的导管,从而使细胞团破碎。其后,初始化培养装置50在放入有破碎的细胞团的溶液中加入StemFit(注册商标、味之素株式会社)等多能性干细胞用培养基。

[0234] 另外,初始化培养装置50中的培养还可以并不在孔板中进行,而是在CO<sub>2</sub>透过性袋中进行。而且,培养可以是附着培养,还可以是悬浮培养。在悬浮培养的情况下,还可以进行搅拌培养。而且,培养基还可以是琼脂状。琼脂状的培养基可列举结冷胶(gellan gum)聚合物。如果使用琼脂状的培养基,则并无细胞沉淀、或附着的现象,因此虽然是悬浮培养,但可以无需搅拌地制作源自一种细胞的单一细胞团,进一步而言,初始化培养装置50中的培养还可以是悬滴培养。

[0235] 初始化培养装置50还可以包含第1培养基补给装置,将含有培养液的培养基补给至孔板或CO<sub>2</sub>透过性袋。第1培养基补给装置还可以回收孔板或CO<sub>2</sub>透过性袋内的培养液,使用过滤器或透析膜对培养液进行过滤,再利用所净化的培养液。而且,此时还可以在再培养液中添加生长因子等。而且,初始化培养装置50还可以进一步包含管理培养基的温度的温度管理装置、及管理培养基附近的湿度的湿度管理装置等。

[0236] 在初始化培养装置50中,例如还可以将细胞放入至如图4所示的透析膜等培养液透过性袋301中,将培养液透过性袋301放入至培养液非透过性的CO<sub>2</sub>透过性袋302中,在袋301、302中放入培养液。初始化培养装置50还可以预先准备多个放入有新鲜培养液的袋302,每隔规定的时间将放入有加入细胞的袋301的袋302,交换为放入有新鲜培养液的袋302。

[0237] 而且,初始化培养装置50中的培养方法并不限于上述方法,还可以使用如图5所示的悬浮培养器。如图5所示的悬浮培养器包含:透析管75,放入诱导因子导入细胞与凝胶培养基;容器76,放入透析管75,且于透析管75的周围放入凝胶培养基。而且,悬浮培养器还可以在透析管75的周围具有测定凝胶培养基的氢离子指数(pH)的pH传感器。

[0238] 透析管75由半透膜而形成,例如使ROCK抑制剂透过。透析管75的截留分子量为0.1KDa以上、10KDa以上、或50KDa以上。透析管75例如由纤维素酯、乙基纤维素、纤维素酯类、再生纤维素、聚砜、聚丙烯腈、聚甲基丙烯酸甲酯、乙烯-乙醇共聚物、聚酯系聚合物合金、聚碳酸酯、聚酰胺、纤维素乙酸酯、纤维素二乙酸酯、纤维素三乙酸酯、铜铵人造丝、碱化纤维素、血仿膜、磷脂酰胆碱膜、及维生素E涂层膜等而形成。

[0239] 容器76可使用如离心管这样的圆锥管。容器76例如由聚丙烯而形成。容器76还可以是CO<sub>2</sub>透过性。CO<sub>2</sub>透过性的容器76可使用G-Rex(注册商标、Wilson Wolf)。

[0240] 诱导因子导入细胞进入至透析管75内。并不对凝胶培养基进行搅拌。而且,凝胶培养基不含饲养细胞。在透析管75上还可以连接用以将含有细胞的培养基送液至透析管75内的送液通路。而且,在透析管75上还可以连接用以将透析管75内的含有细胞的培养基送液至容器外部的送液通路。

[0241] 凝胶培养基例如通过如下方式而制备:在血液细胞培养基或干细胞用培养基中添

加脱酰化结冷胶以使最终浓度成为0.5重量%~0.001重量%、0.1重量%~0.005重量%、或0.05重量%~0.01重量%。例如在初始化培养的开始使用由血液细胞培养基而制作的凝胶培养基,其后使用由干细胞用培养基而制作的凝胶培养基。

[0242] 干细胞用培养基例如可使用Primate ES Cell Medium(灵长类动物胚胎干细胞培养基)(ReproCELL)等人类ES/iPS培养基。

[0243] 但干细胞用培养基并不限于于此,可使用各种干细胞培养基。例如可利用Primate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF(Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR(干细胞技术公司)、PluriSTEM(注册商标)人类ES/iPS培养基(Merck)、NutriStem(注册商标)XF/FF人类iPS/ES细胞培养基(Culture Medium for Human iPS and ES Cells)、Pluriton重编程培养基(reprogramming medium)(Stemgent)、PluriSTEM(注册商标)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03(味之素)、ESC-Sure(注册商标)hESC/iPS无血清/饲养培养基(serum and feeder free medium for hESC/iPS)(Applied StemCell)、及L7(注册商标)hPSC培养系统(Culture System)(龙沙)等。

[0244] 凝胶培养基可以包含选自由结冷胶、透明质酸、鼠李聚糖胶(rhamsan gum)、定优胶(diutan gum)、黄原胶、卡拉胶、褐藻糖胶、果胶、果胶酸、果胶酯酸、硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)、肝素、硫酸乙酰肝素(heparitin sulfate)、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸鼠李聚糖、及这些化合物的盐所构成的群的至少一种高分子化合物。而且,凝胶培养基还可以含有甲基纤维素。通过含有甲基纤维素而进一步抑制细胞彼此的凝聚。

[0245] 或者凝胶培养基还可以含有选自聚(甘油单甲基丙烯酸酯)(PGMA)、聚(甲基丙烯酸-2-羟基丙酯)(PHPMA)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)、胺端基、羧酸端基、马来酰亚胺端基、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)酯端基、三乙氧基硅烷端基、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸丁酯)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-甲基丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-甲基丙烯酸-共-丙烯酸十八酯)、及N-异丙基丙烯酰胺的至少一种的温度敏感性凝胶。

[0246] 进入至透析管75内的凝胶培养基也可以不含ROCK抑制剂。在进入至容器76内的透析管75的周围的凝胶培养基中,例如每日添加ROCK抑制剂以使最终浓度成为1000 $\mu\text{mol/L}$ 以上0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、100 $\mu\text{mol/L}$ 以上1 $\mu\text{mol/L}$ 以下、或5 $\mu\text{mol/L}$ 以上20 $\mu\text{mol/L}$ 以下。通过将ROCK抑制剂添加至透析管75的周围的凝胶培养基中,使ROCK抑制剂渗透至透析管75内,促进细胞的集落形成。

[0247] 凝胶培养基例如可以含有碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)或TGF- $\beta$ 等生长因子,还可以不含。

[0248] 在透析管75内对细胞进行悬浮培养的期间,交换容器76内的透析管75的周围的凝胶培养基。另外,所谓交换培养基,还包括置换一部分培养基或者补充培养基。在这种情况下,也可以并不向透析管75内补给凝胶培养基。或者,在透析管75内对细胞进行悬浮培养的期间,向透析管75内补给凝胶培养基。在这种情况下,也可以并不向容器76内的透析管75的周围补给凝胶培养基。

[0249] 实施方式的干细胞制造系统如图6所示那样,使用作为培养基补给装置的补给培养基送液泵77,对容器76内的透析管75的周围的凝胶培养基进行交换或补给。补给培养基

送液泵77可使用在点滴中所使用的泵等。补给培养基送液泵77与悬浮培养器的容器76通过送液管78而连接。补给培养基送液泵77经由送液管78而向悬浮培养器的容器76内送液凝胶培养基。在悬浮培养器的容器76上连接有废液管79。悬浮培养器的容器76内的凝胶培养基经由废液管79而排出。悬浮培养器的容器76内的凝胶培养基例如可通过由补给培养基送液泵77所补给的新鲜的凝胶培养基的压力而排出,也可以利用重力而排出,还可以利用排出泵而排出。

[0250] 例如以培养器中的凝胶培养基的温度并不急遽变化的方式设定自补给培养基送液泵77送液至培养器的凝胶培养基的温度。例如,在培养器中的凝胶培养基的温度为37℃的情况下,送液至培养器的凝胶培养基的温度也设定为37℃。但是送液至培养器之前的培养基也可以在冷藏保存部,在例如4℃等的低温下进行冷藏保存。

[0251] 例如,补给培养基送液泵77以如下方式进行控制:由补给培养基送液泵77送液至悬浮培养器的容器76内的凝胶培养基的量与自悬浮培养器的容器76排出的凝胶培养基的量变得相同。补给培养基送液泵77可以将凝胶培养基即时送液至悬浮培养器的容器76内,也可以将凝胶培养基以适宜间隔送液至悬浮培养器的容器76内。

[0252] 在即时送液凝胶培养基的情况下,所送液的凝胶培养基的流量可以固定,也可以不固定。例如,可以如后述那样利用摄影装置监视培养基及培养基中的细胞团,根据培养基及培养基中的细胞团的状态使所送液的凝胶培养基的流量增加或减少。

[0253] 而且,也可以并不即使送液凝胶培养基,根据培养基及培养基中的细胞团的状态而进行凝胶培养基的送液的开始及结束。在这种情况下,还可以根据培养基及培养基中的细胞团的状态而使所送液的凝胶培养基的流量增加或减少。

[0254] 另外,如果送液至培养器的凝胶培养基的流量过大,则存在培养器内的细胞由于凝胶培养基的压力而受到损伤的情况。因此,以细胞并不受到损伤的方式设定送液至培养器的凝胶培养基的流量。

[0255] 如果并不交换培养基地继续细胞的培养,则细胞所排出的乳酸等废产物的蓄积或pH的变化会对细胞培养造成不良影响。而且,培养基中所含的bFGF或重组蛋白质等各种蛋白质分解,细胞培养所需的成分可能由于培养基而受损。

[0256] 相对于此,可以通过利用补给培养基送液泵77将新鲜的培养基送液至培养器中,将旧的培养基自培养器中排出,从而自培养器中除去废产物,将培养基中的pH保持为适宜的范围内,补给细胞的培养中所需的成分。由此可将培养基的状态保持为稳定地相近的状态。

[0257] 另外,在图6中表示利用送液管78连接补给培养基送液泵77与悬浮培养器的容器76的例子。相对于此,还可以如图7所示那样,利用送液管78将补给培养基送液泵77与悬浮培养器的容器76内的透析管75内连接。通过将新鲜的凝胶培养基送液至透析管75内,将透析管75内的培养基中所含的废产物排出至透析管75外。而且,可以将透析管75内的培养基的pH保持为适宜的范围内,对透析管75内的培养基补给细胞培养所需的成分。

[0258] 图1所示的干细胞制造系统可以进一步包含对初始化培养装置50中的培养进行摄影的照相机或摄像机等初始化培养摄影装置。此处,如果在初始化培养装置50中所使用的培养基中使用无色的培养基,则变得可抑制在使用有色培养基的情况下所可能产生的漫反射或自体荧光。但是,为了确认培养基的pH,还可以含有酚红等pH指示剂。而且,在被诱导的

细胞与未被诱导的细胞中,细胞的形状及大小等不同,因此干细胞制造系统还可以进一步包含诱导状态监视装置,通过对初始化培养装置50中的细胞进行摄影,算出被诱导的细胞的比例。或者诱导状态监视装置还可以利用抗体免疫染色法或RNA抽出法而确定被诱导的细胞的比例。进一步而言,干细胞制造系统还可以包含未诱导细胞除去装置,利用磁性细胞分离方法或流式细胞仪等而将未被诱导的细胞除去。

[0259] 在如培养皿这样的平坦的皿上培养细胞的情况下,细胞的存在范围平面性地扩大。因此,如果以摄影装置的透镜的光轴与皿面正交的方式配置摄影装置与培养皿,则可聚焦于培养皿上的几乎所有细胞上。

[0260] 然而,在使细胞在培养基中浮动而进行悬浮培养的情况下,细胞的存在范围3维地扩大,因此在自摄影装置至各细胞的光轴方向的距离上产生偏差。因此,可能变得难以并不使用透镜而聚焦于所有细胞上。

[0261] 对此,可以通过如下方式使景深变深:使用明亮的透镜(F值小的透镜),或者对被测定对象物照射明亮的照明,尽可能地缩小透镜的光圈而进行拍摄。

[0262] 或者,还可以一面使透镜的焦点位置每次稍许地变化,一面拍摄多枚图像,对所拍摄的多枚图像进行合成,模拟地获得较深地聚焦的图像。而且,多枚图像的各个成为聚焦的细胞的与并未聚焦的模糊的细胞混杂的图像。因此,可以自多枚图像收集对焦的部分图像而合成1枚合成图像。

[0263] 或者,还可以如图8所示那样,在初始化培养摄影装置171与悬浮培养器内的细胞等被拍摄体之间配置焦阑透镜172。焦阑透镜172使自细胞等被拍摄体通过透镜光圈中心的主光线与透镜光轴平行,因此即使自初始化培养摄影装置171至悬浮培养器内的多个细胞的各个的距离不一样,所拍摄的细胞的大小也不根据距离而变化。

[0264] 图9是自上方观看图8所示的悬浮培养器等的示意图。另外,在图9中,省略图8中所示的容器76。在利用初始化培养摄影装置171对细胞进行拍摄的情况下,还可以使用散射光照明法,亦即在相对于初始化培养摄影装置171的光轴垂直的方向、或自垂直的方向接近摄影装置的方向配置细胞观察用照明光源173,自细胞观察用照明光源173对细胞照射照明光。因此,与细胞接触的照明光的散射光到达初始化培养摄影装置171,但并不与细胞接触的照明光透过培养基而变得并未到达初始化培养摄影装置171。因此,在图像中,培养基的部分相对性变暗,细胞的部分相对性变亮。但是,如果可以在图像中识别细胞,则照明法并不限于于此。图10是利用散射光照明法所拍摄的细胞的图像的一例。培养基的部分相对性变暗,细胞的部分相对性变亮。

[0265] 实施方式的干细胞制造系统还可以如图11所示那样包含中央处理器(CPU)500,该CPU 500包含对初始化培养摄影装置171所拍摄的图像进行图像处理的图像处理部501。还可以在CPU 500上连接键盘及鼠标等输入装置401、以及显示器等输出装置402。CPU 500经由总线及图像接口等而自初始化培养摄影装置171接收图像。

[0266] 图像处理部501还可以包含轮廓定义部511,在细胞的图像中,定义细胞或细胞团的轮廓。图12是经由微距变焦透镜等而放大拍摄的iPS细胞团的图像的一例。在图12所示的图像中,看上去为白块的部分是iPS细胞团,背景暗的部分是培养基。

[0267] 此处,在图12所示的图像为8位的灰度图像的情况下,如果对图像施加二值化处理(将具有规定阈值以上的亮度值的像素的亮度值设为例如255这样的最高亮度值,将具有不

足规定阈值的亮度值的像素的亮度值置换为例如0这样的最低亮度值),则如图13所示那样,不仅培养基的部分,而且细胞团的内部也成为最低亮度的黑色,可能产生细胞团的内部与培养基的部分连结的部分。因此,在二值化处理中,存在无法抽出细胞或细胞团的情况。

[0268] 对此,图11中所示的实施方式的干细胞制造系统的轮廓定义部511对细胞的图像应用高通滤波,亦即使空间频率中所含的规定频率以上的高频成分通过,阻挡不足规定频率的低频成分,将亮度值设为例如0这样的最低值。在细胞的图像中,在细胞或细胞团的部分中,空间频率中所含的高频成分多,在培养基的部分中,空间频率中所含的高频成分少。因此,如图14所示那样,在应用高通滤波的细胞的图像中,培养基部分的亮度值成为例如0这样的最低值,在细胞或细胞团的部分中,亮度值成为原来的值。因此,可以将亮度并不成为最低值的部分视为细胞或细胞团。

[0269] 此处,在图14所示的图像中,即是将亮度并未成为最低值的部分作为斑点(Blob),利用斑点分析进行检测,也存在例如将相互相接的2个细胞团识别为1个细胞团的情况。

[0270] 对此,图11中所示的实施方式的干细胞制造系统的轮廓定义部511对应用了高通滤波的图像应用分水岭算法。分水岭算法以如下方式进行图像的分割:将图像的亮度梯度视为山的起伏,将自山高的位置(亮度值大的位置)向较低的位置(亮度值小的位置)流入的水所形成的区域作为1个区域。

[0271] 例如,实施方式的干细胞制造系统的轮廓定义部511在对图像应用分水岭算法之前,用距离变换法对图像进行转换。所谓距离变换法是根据直至最近的背景像素的距离而对图像的各像素的亮度值进行置换的图像转换的方法。例如,如图15(a)所示那样,在应用高通滤波的图像中,将培养基区域的亮度值一次性转化为最高亮度值255,如图15(b)所示那样设为白的背景。进一步将细胞区域内部的各像素的亮度值,根据直至最近的背景像素的距离而转换为0以上、不足255。例如,越自最近的背景像素离开,亮度值越变低。

[0272] 其次,实施方式的干细胞制造系统的轮廓定义部511对利用距离变换法进行了转换的图像应用分水岭算法。在图15(b)所示的图像中,将亮度低的较暗的部分视为山峰,相对于图像而自垂直方向上使水落下时,如图15(c)的箭头所示那样,推测水如何向前流动,如图15(c)的虚线所示那样,将自各种方向流来的水碰撞的部位视为谷,在该谷底中对细胞区域进行分割。

[0273] 如果利用距离变换法对图14中所示的图像的细胞区域的像素进行转换,则获得图16所示的图像。如果对图16所示的图像应用分水岭算法,则获得图17所示的图像。如果使所获得的分割线与图12所示的原来的图像重叠,则获得图18所示的图像。在图18中,存在于由分割线所分割的各区域的细胞团并非多个细胞团相接而成的团,可视为1个细胞团。因此,在各区域中,如图19所示那样抽出细胞团的轮廓,由此变得可正确地抽出1个细胞团。

[0274] 图11所示的实施方式的干细胞制造系统的图像处理部501还可以进一步包含细胞评价部512。细胞评价部512对轮廓定义部511所抽出的1个细胞团的大小等进行评价。例如,细胞评价部512算出轮廓定义部511所抽出的1个细胞团的面积。进一步而言,例如在将1个细胞团的形状视为圆形的情况下,细胞评价部512使用下述式(1),根据面积而算出1个细胞团的直径。

$$[0275] \quad D=2(s/\pi)^{1/2} \quad (1)$$

[0276] 此处,D表示直径,S表示面积。

[0277] 如果细胞团过于生长得较大,则存在培养基中所含的营养或激素并未到达内部,造成细胞分化的情况。而且,如果以细胞团过小的状态移动至并未使用ROCK抑制剂的扩增培养中,则存在产生细胞死亡或核型异常的情况。因此,细胞评价部512还可以在各个细胞团的大小成为适宜的范围外的情况下发出警告。而且,细胞评价部512还可以在各个细胞团的大小成为规定阈值以上的情况下,输出其是移动至扩增培养的时机。进一步而言,还可以根据所算出的细胞团的大小,使初始化培养装置50中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团的大小变大而上升。

[0278] 实施方式的干细胞制造系统的图像处理部501还可以进一步包含统计处理部513,对由进行了图像处理的图像所获得的信息进行统计处理。图20是对图10所示的图像进行图像处理,抽出细胞团部分而赋予轮廓的例子。图21是基于图20所示的图像而作成的细胞团尺寸的直方图的一例。如上所述,连续且定期地获得细胞的信息,由此可定量地掌握细胞团的生长度、数量、及密集度等,可使培养结果稳定化。而且,还可以根据所算出的细胞团数而使初始化培养装置50中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团数增加而上升。

[0279] 图11中所示的实施方式的干细胞制造系统的图像处理部501还可以进一步包含密度算出部514,根据培养基的图像算出培养基的浊度,基于培养基的浊度而算出培养基中的细胞团的密度。

[0280] 例如,在CPU500上连接有包含挥发性存储器、或非挥发性存储器等的关系储存装置403。关系储存装置403保存例如预先获得的培养基的浊度与培养基中的细胞团的密度的关系。密度算出部514自关系储存装置403读取浊度与密度的关系。进一步而言,密度算出部514基于根据培养基的图像而算出的培养基的浊度值、浊度与密度的关系而算出培养基中的细胞团的值的密度。由此,可并不自培养基选取细胞团地,非破坏性地测定细胞团的密度。

[0281] 而且,密度算出部514还可以在细胞团的密度成为规定阈值以上的情况下,输出其是移动至扩增培养的时机。进一步而言,密度算出部514还可以经时性算出培养基中的细胞团的密度,从而算出细胞团的增殖速度。异常的增殖速度有时表示细胞异常。例如密度算出部514在算出异常的增殖速度的情况下,发出警告。在这种情况下,可以中止细胞的培养。

[0282] 如果培养基中的细胞团的密度变高,细胞团彼此的距离变得过近,则存在多个细胞团彼此附着而成为一个大的细胞团的情况。存在于大的细胞团中,培养基中所含的营养或激素并未到达内部,造成内部的细胞分化的情况。另一方面,如果培养基中的细胞团的密度低于适宜的范围,则存在细胞团的生长速度、及细胞团的形成能力显著降低的情况。

[0283] 对此,如果利用密度算出部514,则可以算出细胞团的密度,因此可以容易地判断细胞团的密度是否为适宜的范围。在细胞团的密度低于适宜的范围的情况下,例如可以作出中止培养的判断。进一步而言,可以根据所算出的细胞团的密度而使初始化培养装置50中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团的密度增加而上升。

[0284] 而且,为了观察细胞代谢等所伴随的培养基的颜色的变化,可以如图22所示那样,在夹着悬浮培养器而与初始化培养摄影装置171对向的位置配置培养基观察用照明光源174。培养基观察用照明光源174例如可使用面光源,培养基观察用照明光源174例如发出白

色平行光。培养基观察用照明光源174所发出的照明光透过培养基而射入至初始化培养摄影装置171,因此可利用初始化培养摄影装置171而拍摄培养基的颜色。

[0285] 通常在进行细胞培养的情况下,培养基的pH设为6.8至7.2附近的固定值。在测定培养基的pH时,在培养基中添加酚红等pH试剂。酚红由于培养基的pH而变化。在与培养基相接的气体中的二氧化碳浓度不充分的情况下,培养基中所含的源自重碳酸(bicarbonic acid)的二氧化碳与气体中的二氧化碳变得并不平衡,因此培养基成为碱性,培养基的颜色成为红紫色。而且,如果蓄积以细胞所排出的乳酸为主的废弃物,培养基成为酸性,培养基的颜色成为黄色。培养基成为酸性表示培养基中的营养成分枯竭。

[0286] 图11所示的实施方式的干细胞制造系统的图像处理部501还可以进一步包含培养基评价部515,基于利用培养基观察用照明光源而照明的培养基的图像,进行培养基的评价。培养基评价部515例如对培养基的图像进行图像处理,根据HSV而以色相(Hue)、色度(Saturation)、明度(Value)这3个参数表示培养基的颜色。其中,色相一般是与“色调”或“色泽”的概念对应的参数。色相一般用角度的单位而表示。

[0287] 图23是表示并未交换培养基而长时间培养细胞的情况下的培养基的色相变化与培养基的pH变化的关系的图表的一例。在培养开始之后,培养基的pH为近7.7附近,但随着时间的经过,培养基的pH减低至7.1附近。伴随于此,培养基的色相虽然在培养开始之后为40附近,但随着时间的经过,上升至60附近。如上所述,培养基的色相与培养时间、及培养基的pH相关。因此,图11所示的培养基评价部515通过监视培养基的色相而判断培养基的状态。

[0288] 例如,关系储存装置403保存预先获得的培养基的色相与培养基的pH。培养基评价部515自关系储存装置403读取色相与pH的关系。进一步而言,培养基评价部515基于根据培养基的图像而算出的培养基的色相的值、色相与pH的关系而算出所摄影的培养基的pH值。例如,培养基评价部515还可以经时性地获得培养基的图像,算出培养基的pH值。

[0289] 另外,还可以如图7所示那样利用pH传感器271而测定培养基的pH。而且,还可以利用温度计272而测定培养基的温度。在这种情况下,培养基评价部515可以自pH传感器271接收培养基的pH值,还可以自温度计272接收培养基的温度值。

[0290] 培养基评价部515在培养基的色相或培养基的pH成为规定范围以外的情况下,可以判断为促进培养基的交换,或判断为在培养基中产生污染。另外,所谓交换培养基,包含置换一部分培养基或补充培养基。

[0291] 对培养基的成分进行化学分析的方法存在如下的可能:消耗成本,而且为了对培养基进行化学分析而将培养基取出至系统的外部,无法保持培养基的无菌状态。相对于此,通过监视培养基的色相而监视培养基的状态的方法的成本低,而且并不对培养基的无菌状态造成影响。

[0292] 在培养基评价部515判断培养基的色相或培养基的pH为规定的范围以外的情况下,利用例如图6所示的补给培养基送液泵77而交换悬浮培养器的透析管75的周围的培养基。或者,在一直进行培养基的交换的情况下,利用补给培养基送液泵77的悬浮培养器的透析管75的周围的培养基的交换速度上升,所交换的培养基的流量上升。由此可将培养基的pH维持为适合细胞培养的范围,可对培养基补给充分的营养成分。

[0293] 进一步而言,培养基评价部515可以根据培养基的色相的变化速度而算出细胞的



增殖速度。例如,关系储存装置403保存预先获得的培养基的色相的变化速度与细胞的增殖速度的关系。培养基评价部515自关系储存装置403读取色相的变化速度与增殖速度的关系。进一步而言,培养基评价部515基于所算出的色相的变化速度的值、色相的变化速度与增殖速度的关系而算出细胞的增殖速度的值。

[0294] 而且,在培养基评价部515判断培养基的温度为规定的范围以外的情况下,还可以以变更培养器的周围的温度、或所供给的培养基的温度的方式控制温度管理装置。例如,在培养基的温度低于规定的范围的情况下,培养基评价部515以提高培养基的温度的方式控制温度管理装置。而且,在培养基的温度高于规定的范围的情况下,培养基评价部515以降低培养基的温度的方式控制温度管理装置。

[0295] 在图1所示的初始化培养装置50上连接第1细胞团送液通路51。初始化培养装置50使用泵等将含有胰蛋白酶替代重组酶与细胞团的液体送出至第1细胞团送液通路51。另外,在使细胞团物理性破碎的情况下,也可以并无胰蛋白酶替代重组酶。而且,第1细胞团送液通路51与分支流路连接,该分支流路具有仅仅使不足规定大小的被诱导的细胞通过的内径,将规定大小以上的未被诱导的细胞除去。如上所述,在使用凝胶培养基的情况下,可以通过抽出凝胶培养基而回收细胞团。

[0296] 还可以在例如图11所示的细胞评价部512所算出的细胞团的大小的值成为规定阈值以上的情况下,驱动将含有细胞团的溶液送出至第1细胞团送液通路51的泵。或者,还可以在例如图11所示的密度算出部514所算出的细胞团的密度的值成为规定阈值以上的情况下,驱动将含有细胞团的溶液送出至图1所示的第1细胞团送液通路51的泵。

[0297] 还可以在图1所示的第1细胞团送液通路51的内壁涂层细胞并不附着的poly-HEMA而使其成为细胞非附着性。或者,第1细胞团送液通路51的材料还可以使用细胞难以附着材料。而且,第1细胞团送液通路51的材料使用导热率良好、CO<sub>2</sub>透过性的材料,由此使第1细胞团送液通路51内的条件变得与壳体200内所管理的温度及CO<sub>2</sub>浓度同等。进一步自防止污染的观点考虑,还可以在第1细胞团送液通路51设有逆流防止阀。

[0298] 第1细胞团送液通路51与第1分割机构60连接。第1分割机构60例如具有网格。溶液中所含的细胞团由于水压而通过网格时,被分割为网格的各孔大小的多个细胞团。例如,如果网格的各孔大小均一,则分割后的多个细胞团的大小也变得基本均一。或者,第1分割机构60还可以包含管嘴。例如,通过将略圆锥状的管嘴的内部微细加工为阶梯状,在溶液中所含的细胞团通过管嘴时,分割为多个细胞团。

[0299] 而且,或者第1分割机构60还可以包含细胞团分割器,该细胞团分割器如图24所示那样包含末端区块61、连结区块62、及前端区块63。末端区块61、连结区块62、及前端区块63分别在内部设有贯通孔,含有细胞团的培养基流过该贯通孔。如图25及图26所示那样,末端区块61、连结区块62、及前端区块63连结。细胞团分割器可包含一个连结区块62,也可以包含多个连结区块62。

[0300] 如图24所示,在连结区块62的第1端部设有凹部62a,在与连结区块62的第1端部对向的第2端部设有凸部62b。凸部62b例如为圆柱状。如图25及图26所示,在具有多个连结区块62的情况下,凸部62b与邻接的连结区块62的凹部62a嵌合。图24所示的凸部62b的侧壁可以平滑,也可以设有外螺纹。凹部62a的内壁可以平滑,也可以设有内螺纹。

[0301] 在连结区块62上所设的贯通孔包含:第1大孔径部62c,与凹部62a连通;小孔径部

62d,与第1大孔径部62c连通,孔径比第1大孔径部62c小;第2大孔径部62e,与小孔径部62d连通,孔径比小孔径部62d大,在凸部62b的前端具有开口。

[0302] 第1大孔径部62c、小孔径部62d、及第2大孔径部62e的各个的剖面形状例如为圆。第1大孔径部62c的孔径与第2大孔径部62e的孔径例如相同。由此而在如图25及图26所示那样具有多个连结区块62,多个连结区块62连结的情况下,第2大孔径部62e与所邻接的连结区块62的第1大孔径部62c平滑地连通。

[0303] 图24所示的第1及第2大孔径部62c、62e的孔径例如为2.0mm以上4.0mm以下,但并无特别限定。小孔径部62d的孔径例如为0.4mm以上1.2mm以下,但并无特别限定。在第1大孔径部62c至小孔径部62d中连续的部分形成阶。而且,在孔径部62d至第2大孔径部62e中连续的部分形成有阶。阶的侧壁可以相对于贯通孔的中心轴而垂直,也可以倾斜为不足 $90^\circ$ 。

[0304] 连结区块62的第1及第2大孔径部62c、62e的中心轴与小孔径部62d的中心轴可以一致。或者可以如图27所示那样,连结区块62的第1及第2大孔径部62c、62e的中心轴与小孔径部62d的中心轴偏移。

[0305] 在图24所示的前端区块63的第1端部设有凹部63a,在与前端区块63的第1端部对向的第2端部设有管嘴部63b。在将前端区块63与连结区块62连结时,前端区块63的凹部63a与连结区块62的凸部62b嵌合。凹部63a的内壁可以平滑,也可以设有内螺纹。

[0306] 设于前端区块63的贯通孔包含:大孔径部63c,与凹部63a连通;小孔径部63d,与大孔径部63c连通,孔径小于大孔径部63c,在管嘴部63b的前端具有开口。

[0307] 大孔径部63c及小孔径部63d的各个的剖面形状例如为圆。前端区块63的大孔径部63c的孔径与连结区块62的第2大孔径部62e的孔径例如相同。由此,在如图25及图26所示那样将连结区块62与前端区块63连结的情况下,连结区块62的第2大孔径部62e与邻接的前端区块63的大孔径部63c平滑地连通。

[0308] 图24中所示的大孔径部63c的孔径例如为2.0mm以上4.0mm以下,但并无特别限定。小孔径部63d的孔径例如为0.4mm以上1.2mm以下,但并无特别限定。在大孔径部63c至小孔径部63d中连续的部分中形成阶。阶的侧壁可相对于贯通孔的中心轴而垂直,也可以倾斜为不足 $90^\circ$ 。

[0309] 在末端区块61的第1端部设有凹部61a,在与末端区块61的第1端部对向的第2端部设有凸部61b。在将末端区块61与连结区块62连结时,末端区块的凸部61b与连结区块62的凹部62a嵌合。末端区块的凸部61b的侧壁可以平滑,也可以设有外螺纹。

[0310] 设于末端区块61的贯通孔至少具有与凹部61a连通,于凸部61b的前端具有开口的大孔径部61c。

[0311] 凹部61a及大孔径部61c的各个的剖面形状例如为圆。末端区块61的大孔径部61c的孔径与连结区块62的第2大孔径部62e的孔径例如相同。由此,在如图25及图26所示那样将末端区块61与连结区块62连结的情况下,末端区块61的大孔径部61c与邻接的连结区块62的大孔径部62c平滑地连通。

[0312] 图24中所示的大孔径部61c的孔径例如为2.0mm以上4.0mm以下,但并无特别限定。

[0313] 末端区块61、连结区块62、及前端区块63的各个的材料可列举聚丙烯等树脂,但并不限于此。

[0314] 如图25、图26、及图27所示那样,在末端区块61的凹部61a插入例如插入管嘴64。在

插入管嘴64上,直接或经由管等而连接吸引排出器,将含有细胞团的培养基吸引排出。将末端区块61、连结区块62、及前端区块63连结,将前端区块63的管嘴部63b刺入至含有细胞团的培养基,利用吸引排出器进行1次培养基的吸引排出,或者反复进行培养基的吸引排出,含有细胞团的培养基在连结区块62、及前端区块63内的贯通孔内往返。在连结区块62、及前端区块63内的贯通孔设有阶,因此可将培养基中的细胞团有效率地分割小的细胞团。

[0315] 目前,细胞团的分割是技术人员使用吉尔森P型移液器(Pipetman)等而进行。然而,如图32(a)所示那样,在现有的方法中,所分割的细胞团的大小不均一。而且,由于技术人员,所获得的细胞团的大小各种各样。如果分割后的细胞团过大,则存在培养基中所含的营养或激素未能到达内部,造成细胞分化的情况。而且,如果细胞团过小,则在并未使用ROCK抑制剂的情况下,存在产生细胞死亡或核型异常的情况。相对于此,如果使用如图25、图26、及图27中所示的细胞团分割器,则可以如图32(b)所示那样将细胞团分割为均一大小的细胞团。另外,在使用细胞团分割器而对细胞团进行分割时,培养基还可以含有胰蛋白酶、或TrypLE Express(注册商标、赛默飞世尔科技)、TrypLE Select(注册商标、赛默飞世尔科技)、或TrypLE Select(注册商标、赛默飞世尔科技)等酶。而且,还可以通过增加连结区块62,或使吸引排出培养基时的压力上升而使细胞团分解至单细胞。

[0316] 另外,在决定大孔径部与小孔径部的适当的重复数、长度等的情况下,细胞团分割器也可以不包含多个区块。例如,细胞团分割器具有如图28中所示的在内部具有贯通孔的一体式柱状形状,含有细胞团的培养基流过的贯通孔可以交互具有大孔径部65a、65c、65e、65g与小孔径部65b、65d、65f,所述小孔径部65b、65d、65f与大孔径部65a、65c、65e、65g连通,孔径比大孔径部65a、65c、65e、65g小。在这种情况下,也如图29所示那样,大孔径部65a、65c、65e、65g的中心轴与小孔径部65b、65d、65f的至少一部分的中心轴偏移。

[0317] 而且,可以使培养基仅通过1次细胞团分割器而将培养基中的细胞团分割为小的细胞团。在这种情况下,可以如图30所示那样,在细胞团分割器的两端设置可插入管等的插入部66a、66b。培养基自插入部66a起经过贯通孔而从插入部66b排出,其间培养基中所含的细胞团被分割。在这种情况下,也如图31所示那样,大孔径部65a、65c、65e、65g的中心轴与小孔径部65b、65d、65f的至少一部分的中心轴偏移。

[0318] 在图1中所示的第1分割机构60上连接有扩增培养装置70。利用第1分割机构60所分割的含有细胞团的溶液被送至扩增培养装置70。

[0319] 扩增培养装置70可以在内部容纳孔板。而且,扩增培养装置70包含移液机。扩增培养装置70自第1分割机构60接收含有多个细胞团的溶液,利用移液机而将溶液分配至孔中。扩增培养装置70在将细胞团分配至孔中后,在37℃、CO<sub>2</sub>为5%下对细胞团进行例如8日左右的培养。而且,扩增培养装置70适宜地进行培养基交换。

[0320] 其后,扩增培养装置70对细胞团添加TrypLE Select(注册商标、生命技术公司)等胰蛋白酶替代重组酶。进一步而言,扩增培养装置70将进入有细胞团的容器放入至培养箱中,在37℃、CO<sub>2</sub>为5%下使细胞团与胰蛋白酶替代重组酶反应1分钟。另外,在使细胞团物理性破碎的情况下,也可以并无胰蛋白酶替代重组酶。例如,扩增培养装置70利用移液机的移液而使细胞团破碎。而且,或者扩增培养装置70还可以使细胞团通过设有过滤器的导管,或与图2或图3所示的导入细胞送液通路31同样地使内径断续地变化的导管,从而使细胞团破碎。其后,扩增培养装置70在进入有细胞团的溶液中加入维持培养的培养基等培养基。进一

步而言,扩增培养装置70在附着培养的情况下,用自动细胞刮刀等而自容器剥下细胞团,将含有细胞团的溶液经由扩增培养送液通路71送至第1分割机构60。

[0321] 另外,扩增培养装置70中的培养还可以并不在孔板中进行,而是在CO<sub>2</sub>透过性袋中进行。而且,培养可以是附着培养,还可以是悬浮培养,还可以是悬滴培养。在悬浮培养的情况下,还可以进行搅拌培养。而且,培养基还可以是琼脂状。琼脂状的培养基可列举结冷胶(gellan gum)聚合物。如果使用琼脂状的培养基,则并无细胞沉淀、或附着的现象,因此虽然是悬浮培养,但无需搅拌。

[0322] 扩增培养装置70还可以包含第2培养基补给装置,将含有培养液补给至孔板或CO<sub>2</sub>透过性袋。第2培养基补给装置还可以回收孔板或CO<sub>2</sub>透过性袋内的培养液,使用过滤器或透析膜而对培养液进行过滤,再利用所净化的培养液。而且,此时还可以在再利用的培养液中添加生长因子等。而且,扩增培养装置70还可以进一步包含管理培养基的温度的温度管理装置、及管理培养基附近的湿度的湿度管理装置等。

[0323] 在扩增培养装置70中,例如还可以将细胞放入至如图4中所示的透析膜等培养液透过性袋301中,将培养液透过性袋301放入至培养液非透过性的CO<sub>2</sub>透过性袋302中,在袋301、302中放入培养液。初始化培养装置50还可以预先准备多个放入有新鲜培养液的袋302,每隔规定的时间将放入有加入细胞的袋301的袋302,交换为加入新鲜培养液的袋302。

[0324] 而且,扩增培养装置70中的培养方法并不限于上述方法,可以与初始化培养装置50中的培养方法同样地使用如图5中所示的悬浮培养器。在扩增培养装置70中,在图5中所示的悬浮培养器的透析管75中进入多个细胞团。悬浮培养器的详细如上所述。而且,在扩增培养装置70中,也如图6所示那样,使用补给培养基送液泵77而对容器76内的透析管75的周围的凝胶培养基进行交换或补给。或者,还可以如图7所示那样,利用送液管78将补给培养基送液泵77与悬浮培养器的容器76内的透析管75内连接,对透析管75内的培养基补给细胞培养所需的成分。

[0325] 图1中所示的干细胞制造系统可以进一步包含对扩增培养装置70中的培养进行摄影的扩增培养摄影装置。此处,如果在扩增培养装置70中所使用的培养基中使用无色的培养基,则变得可抑制在使用有色培养基的情况下所可能产生的漫反射或自体荧光。但是,为了确认培养基的pH,还可以含有酚红等pH指示剂。而且,在被诱导的细胞与未被诱导的细胞中,细胞的形状及大小等不同,因此干细胞制造系统还可以进一步包含诱导状态监视装置,通过对扩增培养装置70中的细胞进行摄影,算出被诱导的细胞的比例。或者诱导状态监视装置还可以利用抗体免疫染色法或RNA抽出法而确定被诱导的细胞的比例。进一步而言,干细胞制造系统还可以包含未诱导细胞除去装置,利用磁性细胞分离方法或流式细胞仪等而将未被诱导的细胞除去。

[0326] 扩增培养摄影装置与图8中所示的初始化培养摄影装置171同样,可以经由焦阑透镜172而对扩增培养装置70中的培养摄影。扩增培养摄影装置进行摄影时的照明方法等也和初始化培养摄影装置171进行摄影时的照明方法等同样,如上所述。

[0327] 扩增培养摄影装置还与图11中所示的包含图像处理部501的CPU 500连接。包含轮廓定义部511、细胞评价部512、统计处理部513、密度算出部514、及培养基评价部515的图像处理部501与初始化培养摄影装置171所拍摄的图像同样地对扩增培养摄影装置所拍摄的图像进行图像处理。图像处理部501的详细如上所述。

[0328] 例如,在扩增培养中,如果细胞团过于生长得较大,则存在培养基中所含的营养或激素并未到达内部,造成细胞分化的情况。而且,如果在细胞团过小的状态下直接进行继代,则在并未使用ROCK抑制剂的情况下,存在产生细胞死亡或核型异常的情况。因此,细胞评价部512在各个细胞团的大小成为适宜的范围外的情况下发出警告。而且,细胞评价部512还可以在各个细胞团的大小成为规定阈值以上的情况下,输出其是进行继代的时机。在这种情况下,还可以对细胞团进行粉碎而使各个细胞团变小,再次在培养器中进行重新进行培养的继代。进一步而言,还可以在继代中使细胞团破碎后,算出各个细胞团的大小,由此而判断是否适宜地进行了破碎。而且,进一步根据所算出的细胞团的大小,使扩增培养装置70中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团的大小变大而上升。

[0329] 而且,还可以根据统计处理部513所算出的细胞团数而使扩增培养装置70中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团数增加而上升。

[0330] 密度算出部514还可以在细胞团的密度成为规定阈值以上的情况下,输出其是进行继代的时机。在细胞团的密度变得比适宜的范围高的情况下,例如可通过进行继代而将细胞团的密度调整为适宜的范围。进一步而言,还可以在继代中使细胞团破碎后而算出细胞团的密度,由此而判断是否适宜地进行了破碎。进一步而言,还可以根据所算出的细胞团的密度而使扩增培养装置70中的培养基的供给速度变化。例如,可以使培养基的供给速度随着细胞团的密度增加而上升。

[0331] 在培养基评价部515判断培养基的色相或培养基的pH为规定范围以外的情况下,在扩增培养装置70中也利用例如图6中所示的补给培养基送液泵77而交换悬浮培养器的透析管75的周围的培养基。或者,在一直进行培养基的交换的情况下,利用补给培养基送液泵77的悬浮培养器的透析管75的周围的培养基的交换速度上升,所交换的培养基的流量上升。由此可将培养基的pH维持为适合细胞培养的范围,可对培养基补给充分的营养成分。

[0332] 图1中所示的第1分割机构60所分割的细胞团再次于扩增培养装置70内得到培养。反复进行第1分割机构60中的细胞团的分割与在扩增培养装置70内的细胞团的培养直至获得所需的细胞量。

[0333] 还可以在例如图11所示的细胞评价部512所算出的细胞团的大小的值成为规定阈值以上的情况下,驱动将扩增培养装置70中的含有细胞团的溶液经由扩增培养送液通路71而送出至第1分割机构60的泵。或者,还可以在例如图11所示的密度算出部514所算出的细胞团的密度的值成为规定阈值以上的情况下,驱动将含有细胞团的溶液送出至图1中所示的第1细胞团送液通路51的泵。

[0334] 在扩增培养装置70上连接第2细胞团送液通路72。扩增培养装置70使用泵等将扩增培养的自容器剥离的细胞团含有液,送出至第2细胞团送液通路72。其中,在悬浮培养的情况下无需剥离。第2细胞团送液通路72与分支流路连接,该分支流路具有仅仅使不足规定大小的被诱导的细胞通过的内径,将规定大小以上的未被诱导的细胞除去。

[0335] 还可以在第二细胞团送液通路72的内壁涂层细胞并不附着的poly-HEMA而使其成为细胞非附着性。或者,第2细胞团送液通路72的材料可以使用细胞难以附着材料。而且,第2细胞团送液通路72的材料使用导热率良好、CO<sub>2</sub>透过性的材料,由此使第2细胞团送液通路72内的条件变得与壳体200内所管理的温度及CO<sub>2</sub>浓度同等。进一步自防止污染的观点考

虑,还可以在第2细胞团送液通路72设有逆流防止阀。

[0336] 第2细胞团送液通路72与第2分割机构80连接。第2分割机构80例如具有网格。溶液中所含的细胞团由于水压而通过网格时,被分割为网格的各孔大小的多个细胞团。例如,如果网格的各孔大小均一,则分割后的多个细胞团的大小也变得基本均一。或者,第2分割机构80还可以包含管嘴。例如,通过将略圆锥状的管嘴的内部微细加工为阶梯状,在溶液中所含的细胞团通过管嘴时,分割为多个细胞团。

[0337] 或者,第2分割机构80还可以与第1分割机构60同样地包含如图24至图27中所示的包含末端区块61、连结区块62、及前端区块63的细胞团分割器,或者如图28至图31中所示的一体式细胞分割器。细胞团分割器的详细如上所述。

[0338] 在图1中所示的第2分割机构80上连接有细胞团搬送机构90,将多个细胞团依序送至封装装置100。在细胞团搬送机构90与封装装置100之间连接有封装前细胞流路91。细胞团搬送机构90使用泵等,将第2分割机构80所分割的细胞团的各个经由封装前细胞流路91而依序送至封装装置100。

[0339] 还可以在封装前细胞流路91上涂层细胞并不附着的poly-HEMA。或者,封装前细胞流路91的材料还可以使用细胞难以附着材料。而且,封装前细胞流路91的材料使用导热率良好、CO<sub>2</sub>透过性的材料,由此使封装前细胞流路91内的条件变得与壳体200内所管理的温度及CO<sub>2</sub>浓度同等。自防止污染的观点考虑,还可以在封装前细胞流路91设有逆流防止阀。

[0340] 在封装前细胞流路91上连接有冻结保存液送液机构110。冻结保存液送液机构110将细胞冻结保存液送入至封装前细胞流路91。因此,在封装前细胞流路91内,细胞团悬浮于细胞冻结保存液中。

[0341] 封装装置100依序对经由封装前细胞流路91而送达的多个细胞团的各个进行冻结。例如,封装装置100在接收细胞团时将细胞团放入至低温保存管等冻结保存容器中,将细胞团溶液瞬间冻结至例如-80℃以下。如果使用每体积的表面积小的冻结保存容器,则存在冻结花费时间的倾向,因此优选使用每体积的表面积大的冻结保存容器。通过使用每体积的表面积大的冻结保存容器,变得可提高解冻后的细胞的生存率。冻结保存容器的形状可列举毛细管状及球状,但并不限于这些形状。而且,根据所需的解冻后的细胞的生存率,也可以不必瞬间冻结。

[0342] 冻结例如使用玻璃化(Vitrification)法。在这种情况下,细胞冻结保存液可使用DAP213(COSMO BIO株式会社)及Freezing Medium(ReproCELL株式会社)。冻结可以利用玻璃化法以外的通常方法而进行。在这种情况下,细胞冻结保存液可使用CryoDefend-Stem Cell(R&D Systems公司)、或STEM-CELLBANKER(注册商标、日本全药工业株式会社)等。冻结可以利用液氮而进行,也可以利用帕尔贴元件而进行。如果使用帕尔贴元件,则变得可控制温度变化、抑制温度不均。封装装置100将冻结保存容器搬出至壳体200外。在冻结细胞为临床用途的情况下,冻结保存容器优选为全封闭系统。但是,封装装置100也可以并不对干细胞进行冻结而将其封装于保存容器内。

[0343] 或者可以于封装装置100中,使用图33中所示的溶液置换器101,将细胞团的溶液自培养基置换为冻结保存液。在溶液置换器101的内部设有过滤器102,所述过滤器102在底面上设有细胞团并不透过的细孔。而且,在溶液置换器101上设有:细胞团导入孔,在内部的

过滤器102上连接对含有细胞团的培养基进行送液的第1送液流路103;置换溶液导入孔,在内部的过滤器102上连接对不含细胞团的冻结液进行送液的第2送液流路104;细胞团流出孔,自内部的过滤器102上连接将含有细胞团的冻结液排出的第1排出流路105。进一步在溶液置换器101上设有废液流出孔,连接将透过过滤器102的溶液的第2排出流路106。第1送液流路103、第2送液流路104、第1排出流路105、及第2排出流路106的各个可使用管等。

[0344] 首先,如图33(a)及图33(b)所示那样,在使第2排出流路106中的溶液流动停止的状态下,含有细胞团的培养基自第1送液流路103进入至溶液置换器101内部。其次,如图33(c)所示那样,设为容许第2排出流路106中的溶液流动的状态,将培养基自溶液置换器101排出。此时,如图33(d)所示那样,细胞团残留于过滤器102上。进一步如图33(e)及图33(f)所示那样,在使第2排出流路106中的溶液流动停止的状态下,冻结保存液自第2送液流路104进入至溶液置换器101内部,使细胞团分散于冻结保存液中。其后,如图33(g)所示那样,将含有细胞团的冻结保存液自第1排出流路105排出。将含有细胞团的冻结保存液经由第1排出流路105而送至冻结保存容器等中。

[0345] 另外,图33中所示的溶液置换器101不仅可用于自培养基向冻结保存液的置换中,而且可用于自旧的培养基向新的培养基的置换中。在这种情况下,第2送液流路104送液新的培养基。或者,溶液置换器101还可以用以在对细胞团进行分割时,将培养基置换为含有细胞团分割酶的溶液。作为细胞团分割酶的例子,例如可列举胰蛋白酶、或TrypLE Select(注册商标、生命技术公司)等胰蛋白酶替代重组酶。在这种情况下,第2送液流路104送液含有细胞团分割酶的溶液。

[0346] 图1中所示的干细胞制造系统还可以进一步包含封装步骤摄影装置,对封装装置100中的封装步骤进行摄影。

[0347] 干细胞制造系统还可以进一步包含对壳体200内进行杀菌的杀菌装置。杀菌装置可以是干热杀菌装置。在这种情况下,分离装置10、导入前细胞送液通路20、诱导因子送液机构21、因子导入装置30、细胞团制作装置40、及封装装置100等使用电的装置的配线优选为具有耐热性的配线。或者,杀菌装置还可以将臭氧气体、过氧化氢气体、或福尔马林气体等杀菌气体放出至壳体200内,对壳体200内进行杀菌。

[0348] 干细胞制造系统还可以通过有线或无线而将分离装置10、导入前细胞送液通路20、诱导因子送液机构21、因子导入装置30、细胞团制作装置40、及封装装置100等的运作记录、以及摄影装置所摄影的图像传送至外部服务器。而且,在外部服务器中,还可以通过神经网络对例如诱导因子导入条件、培养条件、及冻结条件等条件与干细胞的不完全的初始化、干细胞的分化及增殖的失败、及染色体异常等结果的关联进行分析,抽出导致结果的条件,对结果进行预测。进一步而言,外部服务器还可以基于标准作业标准作业程序(SOP)而控制干细胞制造系统的分离装置10、诱导因子送液机构21、因子导入装置30、细胞团制作装置40、及封装装置100等,基于SOP而监视各装置是否运转,自动生成各装置的运转记录。

[0349] 利用以上所说明的干细胞制造系统,变得可全自动地总括进行iPS细胞等干细胞的诱导、确立、扩增培养、及冻结保存。

[0350] 另外,实施方式的干细胞制造系统并不限定于图1中所示的构成。例如,在图34中所示的实施方式的干细胞制造系统中,经由血液送液通路202而自血液保存部201向单核细胞分离部203送液血液。血液保存部201及单核细胞分离部203例如可使用管。血液送液通路

202例如是树脂管或硅管等。后述的其他送液通路也同样。还可以在血液保存部201上附上条形码等标识符,管理血液的信息。在送液中使用泵204。泵204可使用容积式泵。作为容积式泵的例子,可列举:包含活塞泵、柱塞泵、及隔膜泵的往复泵,或包含齿轮泵、叶片泵、及螺杆泵的旋转泵。作为隔膜泵的例子,可列举管式泵及压电 (piezo) 泵。作为管式泵的例子,可列举蠕动泵(注册商标、ATTO株式会社)、以及RP-Q1及RP-TX(高砂电气工业株式会社)。作为压电泵的例子,可列举SDMP304、SDP306、SDM320、及APP-20KG(高砂电气工业株式会社)。而且,还可以使用各种泵组合而成的微流体芯片模块(高砂电气工业株式会社)。如果使用蠕动泵(注册商标)、管式泵、及隔膜泵等密闭型泵,则可使泵并不直接接触血液送液通路202内部的血液地进行送液。在后述的其他泵中也同样。或者,泵204、以及后述的泵207、泵216、泵222、泵225、泵234、泵242、及泵252还可以使用注射泵。即使是密闭型泵以外的泵,也可以通过加热杀菌处理等而再利用。

[0351] 将红血球凝聚剂自分离剂保存部205,经由送液通路206及泵207而送至单核细胞分离部203。分离剂保存部205例如可使用管。还可以对分离剂保存部205附上条形码等标识符而管理分离剂的信息。红血球凝聚剂例如可使用HetaSep(注册商标、干细胞技术公司)或红血球凝聚剂(尼普洛(NIPRO)公司)等。在单核细胞分离部203内,由于红血球凝聚剂而使红血球沉降,从而分离单核细胞。将单核细胞分离部203内的含有单核细胞的上清液经由单核细胞送液通路208及泵209而送至单核细胞纯化过滤器210。在单核细胞纯化过滤器210中,将单核细胞以外的成分除去,获得含有单核细胞的溶液。作为单核细胞纯化过滤器210,可使用Purecell(注册商标、PALL)、Cellsorba E(旭化成株式会社)、Sepacell PL(旭化成株式会社)、Adacolumn(注册商标、JIMRO)、及分离袋(尼普洛株式会社)等。

[0352] 在图34中,单核细胞分离部203、分离剂保存部205、单核细胞纯化过滤器210、及泵204、207、209等构成分离装置。

[0353] 将含有单核细胞的溶液经由导入前细胞送液通路211及泵212而送至因子导入部213。因子导入部213例如可使用管。将多能性诱导因子自包含多能性诱导因子的因子保存部214,经由因子送液通路215及泵216而送至因子导入部213。因子保存部214例如可使用管。还可以在因子保存部214上附上条形码等标识符,管理多能性诱导因子的信息。因子保存部214及泵216等构成诱导因子送液机构。在作为因子导入装置的因子导入部213中,利用例如RNA脂转染法而将多能性诱导因子导入至细胞中,制作诱导因子导入细胞。然而,诱导因子的转染方法并不限定于RNA脂转染法。例如还可以使用含有多能性诱导因子的仙台病毒载体。或者,多能性诱导因子还可以是蛋白质。

[0354] 将诱导因子导入细胞经由导入细胞送液通路217及泵218而送至作为细胞团制作装置的一部分的初始化培养器219。导入细胞送液通路217例如为温度透过性且为CO<sub>2</sub>透过性。初始化培养器219还可以使用图5中所示的悬浮培养器。在这种情况下,诱导因子导入细胞进入至透析管内。在将多能性诱导因子导入至细胞后的最初数日,自包含血液细胞培养基的血液细胞培养基保存部220,经由培养基送液通路221及泵222而对图34中所示的初始化培养器219补给血液细胞培养基。培养基送液通路221例如为温度透过性且为CO<sub>2</sub>透过性。还可以在血液细胞培养基保存部220上附上条形码等标识符,管理血液细胞培养基的信息。血液细胞培养基保存部220、培养基送液通路221、及泵222构成培养基补给装置。泵222可以依照图11中所示的CPU500的指示而连续地补给血液细胞培养基,还可以以规定时机补给血



液细胞培养基。

[0355] 其后,将干细胞培养基自包含干细胞培养基的干细胞培养基保存部223,经由培养基送液通路224及泵225而补给至图34中所示的初始化培养器219。还可以在干细胞培养基保存部223上附上条形码等标识符,管理干细胞培养基的信息。培养基送液通路224例如是温度透过性且CO<sub>2</sub>透过性。干细胞培养基保存部223、培养基送液通路224、及泵225构成培养基补给装置。泵225可以依照图11中所示的CPU500的指示,连续地补给干细胞培养基,还可以以规定时机补给干细胞培养基。

[0356] 血液细胞培养基保存部220及干细胞培养基保存部223可以在例如冷藏保存部259中以4℃等的低温进行冷藏保存。自血液细胞培养基保存部220及干细胞培养基保存部223所送的培养基可以利用例如冷藏保存部259以外的加热器升温至37℃后送至培养器中。或者,低温保存的培养基还可以以进入送液通路的时候升温至37℃的方式设定送液通路周围的温度。将初始化培养器219内变旧的培养基经由废液送液通路226及泵227而送至废液保管部228。还可以在废液保管部228附上条形码等标识符,管理废液的信息。

[0357] 将在初始化培养器219中培养的细胞团,经由导入细胞送液通路229、泵230、及细胞团分割器231而送至作为细胞团制作装置的一部分的第1扩增培养器232中。细胞团分割器231可以具有例如图30或图31中所示的构成。通过使其通过细胞团分割器231而将细胞团分割为更小的细胞团。图34中所示的第1扩增培养器232可使用图5中所示的悬浮培养器。在这种情况下,细胞团进入至透析管内。将干细胞培养基,自包含干细胞培养基的干细胞培养基保存部223,经由培养基送液通路233及泵234而补给至图34中所示的第1扩增培养器232。导入细胞送液通路229及培养基送液通路233例如为温度透过性且为CO<sub>2</sub>透过性。干细胞培养基保存部223、培养基送液通路233、及泵234构成培养基补给装置。泵234可以依照图11所示的CPU500的指示而连续地补给干细胞培养基,还可以以规定时机补给干细胞培养基。

[0358] 将图34中所示的第1扩增培养器232内变旧的培养基经由废液送液通路235及泵236而送至废液保管部228。

[0359] 将在第1扩增培养器232中培养的细胞团,经过导入细胞送液通路237、泵238、细胞团分割器239而送至作为细胞团制作装置的一部分的第2扩增培养器240中。细胞团分割器239可以具有例如图30或图31中所示的构成。通过使其通过细胞团分割器239而将细胞团分割为更小的细胞团。图34中所示的第2扩增培养器240可使用图5中所示的悬浮培养器。在这种情况下,细胞团进入至透析管内。将干细胞培养基,自包含干细胞培养基的干细胞培养基保存部223,经由培养基送液通路241及泵242而补给至图34中所示的第2扩增培养器240。导入细胞送液通路237及培养基送液通路241例如为温度透过性且为CO<sub>2</sub>透过性。干细胞培养基保存部223、培养基送液通路241、及泵242构成培养基补给装置。泵242可以依照图11所示的CPU500的指示而连续地补给干细胞培养基,还可以以规定时机补给干细胞培养基。

[0360] 将在图34中所示的第2扩增培养器240内变旧的培养基经由废液送液通路243及泵244而送至废液保管部228。

[0361] 将在第2扩增培养器240中培养的细胞团,经过导入细胞送液通路245及泵246而送至溶液置换器247中。溶液置换器247还可以具有例如图33中所示的构成。在图34中所示的溶液置换器247内,由过滤器而保持细胞团,将培养基经由废液送液通路248及泵249而送至废液保管部228。

[0362] 在通过停止泵249的驱动而停止废液送液通路248内的溶液流动之后,或者用阀等将废液送液通路248关闭后,冻结保存液自包含冻结保存液的冻结保存液保存部250,经由送液通路251及泵252而进入至溶液置换器247。由此而在冻结保存液中分散细胞团。

[0363] 将分散有细胞团的冻结保存液,经由作为封装装置的一部分的送液通路253及泵254而送至冻结保存容器255内。将冻结保存容器255放入至低温保管库256中。将例如-80℃的液氮,自液氮保管库257经由送液通路258而送至低温保管库256。由此而使冻结保存容器255内的细胞团冻结。然而,细胞团的冻结也可以不利用液氮。例如,低温保管库256可以是压缩式冷冻库、吸取式冷冻库、或帕尔贴式冷冻库等冷冻库。

[0364] 在上述的送液通路上还可以适宜设置逆流防止阀。将上述的送液通路、单核细胞分离部203、单核细胞纯化过滤器210、因子导入部213、初始化培养器219、第1扩增培养器232、第2扩增培养器240、及溶液置换器247等容纳至包含树脂等的例如盒状的箱体259中。箱体259例如包含可杀菌处理的耐热性材料。箱体259内设为例如37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%这样的适合细胞培养的环境。培养基流过的送液通路例如包含CO<sub>2</sub>透过性材料。然而,箱体259并不限定为盒状。例如可以是柔性袋。而且,上述的送液通路、单核细胞分离部203、单核细胞纯化过滤器210、因子导入部213、初始化培养器219、第1扩增培养器232、第2扩增培养器240、及溶液置换器247等还可以分割容纳于多个箱体中。

[0365] 箱体259配置于壳体200内。泵、血液保存部201、分离剂保存部205、因子保存部214、血液细胞培养基保存部220、干细胞培养基保存部223、废液保管部228、冻结保存容器255、低温保管库256、及液氮保管库257配置于壳体200的内部且箱体259的外部。

[0366] 箱体259与壳体200具有例如相互嵌合的嵌合部。因此,箱体259配置于壳体200内的规定位置。而且,在壳体200内,泵、血液保存部201、分离剂保存部205、因子保存部214、血液细胞培养基保存部220、干细胞培养基保存部223、废液保管部228、冻结保存容器255、低温保管库256、及液氮保管库257配置于规定位置。如果箱体259配置于壳体200内的规定位置,则箱体259内的送液通路与泵、血液保存部201、分离剂保存部205、因子保存部214、血液细胞培养基保存部220、干细胞培养基保存部223、废液保管部228、冻结保存容器255、低温保管库256、及液氮保管库257相接。

[0367] 例如,箱体259及其内含物为一次性的,在细胞团的冻结完成后,可以废弃而交换为新的。或者,在再利用箱体259及其内含物的情况下,还可以在箱体259上附上条形码等标识符,管理使用次数等。

[0368] 利用以上所说明的实施方式的干细胞制造系统,可以并不经由人地由血液而自动地制造iPS细胞等干细胞的冷冻保存物。

[0369] (其他实施方式)

[0370] 如上所述地利用实施方式而记载本发明,但不应理解为进行该揭示的一部分的记述及附图限定本发明。根据该揭示,本领域技术人员应明白各种替代实施方式、实施方式及运用技术。例如,因子导入装置30也可以不通过电穿孔或RNA脂质转染,而是通过使用逆转录病毒、慢病毒、及仙台病毒等病毒载体或质粒的转染,或者蛋白质转染而对细胞进行诱导。而且,导入前细胞送液通路20、导入细胞送液通路31、细胞团送液通路51、扩增培养送液通路71、细胞团送液通路72、及封装前细胞流路91也可以利用微流体技术而设于基板上。如上所述,应理解本发明包含此处并未记载的各种实施方式等。

[0371] (实施例1)

[0372] (准备)

[0373] 自健康的成年男性获得人类血液细胞。而且,准备修饰化mRNA (TriLink公司)、非附着皿、15mL的管、50mL的管、聚蔗糖、旁通流量计 (BD)、对于CD34的抗体 (美天旎生物公司)、对于CD3的抗体 (美天旎生物公司)、MACS (注册商标) 缓冲液 (美天旎生物公司)、T细胞培养基、低血清培养基 (Opti-MEM (注册商标)、Gibco)、siRNA导入试剂 (Lipofectamine (注册商标) RNAiMAX、ThermoFisherScience)、及对于TRA-1-60的抗体 (BD)。

[0374] T细胞 (CD3阳性细胞) 培养基是以下A培养基与B培养基的混合液。A培养基是15mL的X vivo-10 (龙沙公司、04-743Q) 及IL-2 (10 $\mu$ g/mL) 的混合液。B培养基是在1.5mL的管中将X vivo-10及戴诺磁珠 (Dynabeads) CD3/CD28 (生命技术公司,111-31D) 50 $\mu$ L加以混合,进行5秒的涡旋后,进行旋转下降,在DynaMag-2 (Thermo fisher Science) 中进行静置,静置一分钟后除去上清液而成的培养基。

[0375] 而且,在10mL无血清培养基 (StemSpan H3000、干细胞技术公司) 中加入10 $\mu$ L IL-6 (100 $\mu$ g/mL)、10 $\mu$ L SCF (300 $\mu$ g/mL)、10 $\mu$ L TPO (300 $\mu$ g/mL)、10 $\mu$ L Flt3配体 (300 $\mu$ g/mL)、及10 $\mu$ L IL-3 (10 $\mu$ g/mL) 而制备血球培养基 (血液干/前驱细胞培养基)。

[0376] 而且,分别准备浓度为100ng/ $\mu$ L的OCT3/4的mRNA含有液、SOX2的mRNA含有液、KLF4的mRNA含有液、c-MYC的mRNA含有液、LIN28A的mRNA含有液、及绿色荧光蛋白质 (GFP) 的mRNA含有液。其次,将385 $\mu$ L OCT3/4的mRNA含有液、119 $\mu$ L SOX2的mRNA含有液、156 $\mu$ L KLF4的mRNA含有液、148 $\mu$ L c-MYC的mRNA含有液、83 $\mu$ L LIN28A的mRNA含有液、及110 $\mu$ L GFP的mRNA含有液加以混合而获得启动因子混合液。将所获得的启动因子混合液每次50 $\mu$ L地分注于容量为1.5mL的RNase-Free的管 (艾本德管 (Eppendorf Tube) (注册商标)、艾本德公司) 中,保存于-80 $^{\circ}$ C的冷冻库中。

[0377] (单核细胞的制备)

[0378] 将离心机设定为18 $^{\circ}$ C。采集5mL至50mL的血液,在血液中加入EDTA而充分混合。而且,将人类淋巴球分离用介质 (Ficoll-Paque PREMIUM、日本通用电气医疗) 每次5mL地分注于2根15mL的管中。将5mL PBS加入至血液中而进行稀释,每次5mL地重层于管中的人类淋巴球分离用介质上。此时,以不使界面变乱的方式,使稀释血液沿着管的管壁缓缓地加于介质上。

[0379] 在400 $\times$ g、18 $^{\circ}$ C下对管中的溶液进行30分钟的离心。此时,加速、减速均缓缓地进行。在离心后,在管中出现白色浑浊的中间层。该白色浑浊的中间层包含单核细胞。利用吉尔森P型移液器缓缓地回收管中的白色浑浊的中间层,移到新的15mL的管中。此时,并不吸取下层。白色浑浊的中间层可自1根管中回收1mL左右。将2根管的中间层汇总移到1根管中。

[0380] 对于所回收的单核细胞,加入12mL PBS,进一步在200 $\times$ g、18 $^{\circ}$ C下对溶液进行10分钟离心。其后,使用吸引器将溶液的上清液吸引除去,加入3mL组成已知的无血清造血细胞培养基 (X-VIVO (注册商标) 10、龙沙) 而进行悬浮,获得单核细胞悬浮液。用台盼蓝对其中10 $\mu$ L的单核细胞悬浮液进行染色,用血球计进行计数。

[0381] (CD34或CD3阳性细胞的分离)

[0382] 使1 $\times$ 10<sup>7</sup>个单核细胞与CD34抗体或CD3抗体在4 $^{\circ}$ C的溶液100 $\mu$ L中进行15分钟反应。于反应后,在溶液中加入5mL MACS (注册商标) 缓冲液 (美天旎生物公司),以270g进行离

心。于离心后将上清液除去,添加1mL MACS缓冲液。其后,利用自动磁性细胞分离装置(autoMACS、美天旎生物公司)的分离程序而将单核细胞中的CD34阳性细胞或CD3阳性细胞分离。

[0383] (所分离的细胞的培养)

[0384] 使所分离的 $5 \times 10^6$ 个单核细胞悬浮于1mL的T细胞培养基、或血液干/前驱细胞培养基中,播种于12孔板中进行培养。培养条件是CO<sub>2</sub>浓度为5%、氧浓度为19%、及温度为37℃。

[0385] (启动因子的脂质转染)

[0386] 将100μL低血清培养基(Opti-MEM(注册商标)、Gibco)与25μL启动因子混合液加以混合而制成第1混合液。而且,将112.5μL低血清培养基(Opti-MEM(注册商标)、Gibco)与12.5μL siRNA导入试剂(Lipofectamine(注册商标)RNAiMAX、ThermoFisherScience)加以混合而制成第2混合液。其后,将第1混合液与第2混合液加以混合,在室温下静置15分钟而制成脂质转染反应液。

[0387] 将所获得的脂质转染反应液中的60μL平稳地添加于培养单核细胞的12孔板中,接着于37℃下对单核细胞进行18小时的无饲养层培养。培养条件是CO<sub>2</sub>浓度为5%、氧浓度为19%、及温度为37℃。添加脂质转染反应液时的单核细胞的密度为 $3 \times 10^6$ 。在18小时后,将单核细胞回收至15mL的管中,以300g进行离心,将上清液除去。其后,将1.25mL CD34用血球培养基添加于15mL的管中,使单核细胞悬浮液返回至相同的12孔板中,在37度下对单核细胞进行一夜的无饲养层培养。培养条件是CO<sub>2</sub>浓度为5%、及氧浓度为19%。上述步骤每2日进行1次,在7日内反复进行。

[0388] (GFP的表达的确认)

[0389] 在开始脂质转染后的第7日,合计进行4次脂质转染的细胞的密度为 $3 \times 10^6$ 。将细胞的一部分自12孔板中取出,用荧光显微镜确认GFP的表达,结果如图35所示那样,确认了GFP的表达。由此而确认在单核细胞中转染了mRNA,由所转染的mRNA合成蛋白质。

[0390] (TRA-1-60的表达的确认)

[0391] 在开始脂质转染后的第7日,自12孔板中取出细胞的一部分,用如下抗体对对所取出的细胞进行染色,所述抗体是对于在开始初始化的iPS细胞中特异性表达的表面抗原TRA-1-60的抗体,用别藻蓝蛋白(Allophycocyanin,APC)荧光色素进行了标识。其后,利用荧光激活细胞分选仪(FACS(注册商标)、BD)确认TRA-1-60阳性细胞的比例,由此而确定在细胞中开始重新编程,iPS细胞基因进行表达,产生iPS细胞。

[0392] 如图36所示那样,制成以自体荧光强度为x轴、荧光标识抗TRA-1-60抗体的荧光强度为y轴的点图。在未导入基因的阴性对照中并未检测出TRA-1-60阳性细胞。相对于此,在实验1、2及3中并未检测出TRA-1-60阳性细胞。另外,实验1是由并未进行利用标记物的分离的单核细胞全体所诱导的结果,实验2是由利用CD3阳性而进行分离的细胞所诱导的结构,实验3是由利用CD34阳性而进行分离的细胞所诱导的结果。因此表示使用启动因子RNA的脂质转染,在源自血液的细胞中导入启动因子,从而可诱导iPS细胞。

[0393] (实施例2)

[0394] 将500mL的Primate ES Cell Medium(ReproCELL)、及0.2mL的浓度为10μg/mL的bFGF(Gibco PHG0266)加以混合而制备含有bFGF的人类iPS培养基。

[0395] 而且,在含有bFGF的人类iPS培养基中以浓度成为0.02重量%的方式添加脱酰化结冷胶(日产化学),制备含有bFGF的人类iPS凝胶培养基。进一步将5mL的浓度为2.5重量%的胰蛋白酶、5mL的浓度为1mg/mL的胶原酶IV、0.5mL的浓度为0.1mol/L的CaCl<sub>2</sub>、10mL的KnockOut血清替代(注册商标、Invitrogen 10828-028)、及30mL的纯化水加以混合,制备一般被称为CTK溶液的剥离液。

[0396] 在饲养细胞上培养iPS细胞的6孔皿(Thermoscientific 12-556-004)中添加300μL的CTK溶液,在CO<sub>2</sub>培养箱中进行3分钟的培养。在3分钟后将皿自培养箱中取出,确认仅仅饲养细胞剥落,使用吸引器而将CTK溶液除去。将CTK溶液除去后,在6孔皿中添加500μL的PBS(Santa Cruz Biotech sc-362183),对iPS细胞进行清洗后,自6孔皿中除去PBS,将0.3mL的剥离液(Accutase、注册商标)添加于6孔皿中,放入至CO<sub>2</sub>培养箱中进行5分钟的培养。其后,将0.7mL的含有bFGF的iPS培养基添加于6孔皿中,使iPS细胞悬浮直至成为单细胞。

[0397] 在使iPS细胞悬浮后,将4mL的含有bFGF的人类iPS培养基添加于15mL的离心管中,使用离心机以270g对iPS细胞悬浮液进行离心。在离心后,将上清液除去,将1mL的含有bFGF的人类iPS培养基添加于15mL的离心管中,使用血球计计算细胞数。在细胞计算后,每次5×10<sup>5</sup>个地将iPS细胞播种于15mL的Falcon tube(注册商标、Corning 352096)或非附着皿中,以后并不进行搅拌地进行悬浮培养。

[0398] 在15mL的管中,使用2mL的含有bFGF的人类iPS凝胶培养基。在非附着皿中,使用2mL的并未凝胶化的含有bFGF的人类iPS培养基。在各培养基中以成为10μmol/L的方式添加ROCK抑制剂(Selleck S1049)。其后,在15mL的管及非附着皿中,每日添加500μL的含有bFGF的人类iPS凝胶培养基,在非附着皿中,每日添加500μL的含有bFGF的人类iPS培养基。而且,在15mL的管及非附着皿中,每日以最终浓度成为10μmol/L的方式添加ROCK抑制剂,继续进行7日的悬浮培养。

[0399] 将其结果表示于图37中。如图37(b)所示那样,在非附着皿中使用并未凝胶化的含有bFGF的人类iPS培养基而培养iPS细胞的情况下,明显发现iPS细胞的集落彼此凝聚。相对于此,如图37(a)所示那样,在15mL的管中使用含有bFGF的人类iPS凝胶培养基而培养iPS细胞的情况下,并未发现明显的凝聚。图38(a)是在15mL的管中,使用含有bFGF的人类iPS凝胶培养基而培养iPS细胞时的第1日的照片,图38(b)是在15mL的管中,使用含有bFGF的人类iPS凝胶培养基而培养iPS细胞时的第9日的照片。根据图38(a)及图38(b)的照片而确认不同株的iPS细胞彼此并未凝聚地形成集落。

[0400] 图39(a)是在凝胶培养基中悬浮培养7日的iPS细胞的集落马上再播种于饲养细胞上之前时的照片。图39(b)是在其3日后确认集落形态时的照片。其结果如图40所示那样,确认95%以上的集落未分化。因此,表示可在凝胶培养基中,维持未分化的状态地培养iPS细胞。

[0401] (实施例3)

[0402] 与实施例2同样地制备含有bFGF的人类iPS培养基、及含有bFGF的人类iPS凝胶培养基。在饲养细胞上培养iPS细胞的6孔皿中添加300μL的CTK溶液,在CO<sub>2</sub>培养箱中进行3分钟的培养。3分钟后将皿自培养箱中取出,确认仅仅饲养细胞剥落,使用吸引器而将CTK溶液除去。将CTK溶液除去后,在皿中添加500μL的PBS,对iPS细胞进行清洗后,自皿中除去PBS,

将0.3mL的Accumax添加于皿中,将皿放入至CO<sub>2</sub>培养箱中进行5分钟的培养。其后,将0.7mL的含有bFGF的iPS培养基添加于皿中,使iPS细胞悬浮直至成为单细胞。

[0403] 在使iPS细胞悬浮后,将4mL的含有bFGF的人类iPS培养基添加于15mL的离心管中,使用离心机以270g对iPS细胞悬浮液进行离心。在离心后,将上清液除去,将1mL的含有bFGF的人类iPS培养基添加于15mL的离心管中,使用血球计计算细胞数。在细胞计算后,每次 $5 \times 10^5$ 个地将iPS细胞播种于15mL的管中,以后并不进行搅拌地进行悬浮培养。

[0404] 在15mL的管中,使用2mL的含有bFGF的人类iPS凝胶培养基。在各培养基中以成为10 $\mu$ mol/L的方式添加ROCK抑制剂。其后,在15mL的管中,每日添加500 $\mu$ L的含有bFGF的人类iPS凝胶培养基。另外,500 $\mu$ L的凝胶培养基含有0.5 $\mu$ L的ROCK抑制剂。而且,作为对照,并未添加ROCK抑制剂,除此以外在相同的条件下对iPS细胞进行7日的悬浮培养。

[0405] 如图41(a)所示那样,在含有bFGF的人类iPS培养基中并未添加ROCK抑制剂的情况下,iPS细胞并未形成集落。相对于此,如图41(b)所示那样,在含有bFGF的人类iPS培养基中添加ROCK抑制剂的情况下,iPS细胞形成集落。根据该结果,表示在由单细胞而悬浮培养iPS细胞的情况下,ROCK抑制剂有效。

[0406] (实施例4)

[0407] 容纳透析管的容器使用并非CO<sub>2</sub>透过性的容器Falcon离心管50mL(注册商标)与CO<sub>2</sub>透过性的容器G-Rex(注册商标、Wilson Wolf),除了容器以外在相同条件下对细胞进行悬浮培养。其结果如图42所示那样,使用CO<sub>2</sub>透过性的容器而进行培养的细胞的生存率高。

[0408] (实施例5)

[0409] 将含有iPS细胞的凝胶培养基放入至具有截留分子量为100kDa的透析管的2个透析模块(Spectrum G235035)的各个中。进一步将透析模块分别放入至50mL的离心管中,在离心管内的透析管的周围放入凝胶培养基。而且,将含有iPS细胞的凝胶培养基直接放入至其他的50mL的离心管中。

[0410] 其后,在数日内,在内部放入有透析管的2个离心管中的一个离心管上,如图6中所示那样连接泵,连续性交换离心管内的凝胶培养基。以如下方式设定凝胶培养基:在4 $^{\circ}$ C下保管,在到达离心管时成为37 $^{\circ}$ C。在内部放入有透析管的2个离心管中的另一个离心管上并未连接泵,并不交换离心管内的凝胶培养基。而且,在内部并未放入透析管的离心管内的凝胶培养基也不进行交换。

[0411] 在培养相同的时间后,观察在各个容器内所培养的细胞,结果如图43及图44所示那样,在透析管内培养细胞团,用泵连续性交换透析管周围的凝胶培养基的情况下,形成许多细胞团。而且,分化的细胞极少。然而,在透析管内培养细胞团,并未用泵连续性交换透析管周围的凝胶培养基的情况下,细胞团变少,分化的细胞增加。而且,在并未使用透析管而培养细胞团,并未用泵连续性交换凝胶培养基的情况下,基本上未形成细胞团。

[0412] 符号说明

[0413] 10 分离装置

[0414] 20 导入前细胞送液通路

[0415] 21 诱导因子送液机构

[0416] 30 因子导入装置

[0417] 31 导入细胞送液通路

- [0418] 40 细胞团制作装置
- [0419] 50 初始化培养装置
- [0420] 51 细胞团送液通路
- [0421] 60 分割机构
- [0422] 61 末端区块
- [0423] 61a 凹部
- [0424] 61b 凸部
- [0425] 61c 大孔径部
- [0426] 62 连结区块
- [0427] 62a 凹部
- [0428] 62b 凸部
- [0429] 62c 大孔径部
- [0430] 62d 小孔径部
- [0431] 62e 大孔径部
- [0432] 63 前端区块
- [0433] 63a 凹部
- [0434] 63b 管嘴部
- [0435] 63c 大孔径部
- [0436] 63d 小孔径部
- [0437] 64 插入管嘴
- [0438] 65a 大孔径部
- [0439] 65b 小孔径部
- [0440] 66a 插入部
- [0441] 66b 插入部
- [0442] 70 扩增培养装置
- [0443] 71 扩增培养送液通路
- [0444] 72 细胞团送液通路
- [0445] 75 透析管
- [0446] 76 容器
- [0447] 77 补给培养基送液泵
- [0448] 78 送液管
- [0449] 79 废液管
- [0450] 80 分割机构
- [0451] 90 细胞团搬送机构
- [0452] 91 封装前细胞流路
- [0453] 100 封装装置
- [0454] 101 溶液置换器
- [0455] 102 过滤器
- [0456] 103 送液流路

- [0457] 104 送液流路
- [0458] 105 排出流路
- [0459] 106 排出流路
- [0460] 110 冻结保存液送液机构
- [0461] 171 初始化培养摄影装置
- [0462] 172 焦阑透镜
- [0463] 173 细胞观察用照明光源
- [0464] 174 培养基观察用照明光源
- [0465] 200 壳体
- [0466] 201 血液保存部
- [0467] 202 血液送液通路
- [0468] 203 单核细胞分离部
- [0469] 204 泵
- [0470] 205 分离剂保存部
- [0471] 206 送液通路
- [0472] 207 泵
- [0473] 208 单核细胞送液通路
- [0474] 209 泵
- [0475] 210 单核细胞纯化过滤器
- [0476] 212 泵
- [0477] 213 因子导入部
- [0478] 214 因子保存部
- [0479] 215 因子送液通路
- [0480] 216 泵
- [0481] 217 导入细胞送液通路
- [0482] 218 泵
- [0483] 219 初始化培养器
- [0484] 220 血液细胞培养基保存部
- [0485] 221 培养基送液通路
- [0486] 222 泵
- [0487] 223 干细胞培养基保存部
- [0488] 224 培养基送液通路
- [0489] 224 泵
- [0490] 225 泵
- [0491] 226 废液送液通路
- [0492] 227 泵
- [0493] 228 废液保管部
- [0494] 229 导入细胞送液通路
- [0495] 230 泵



- [0496] 231 细胞团分割器
- [0497] 232 扩增培养器
- [0498] 233 培养基送液通路
- [0499] 234 泵
- [0500] 235 废液送液通路
- [0501] 236 泵
- [0502] 237 导入细胞送液通路
- [0503] 238 泵
- [0504] 239 细胞团分割器
- [0505] 240 扩增培养器
- [0506] 241 培养基送液通路
- [0507] 242 泵
- [0508] 243 废液送液通路
- [0509] 244 泵
- [0510] 245 导入细胞送液通路
- [0511] 246 泵
- [0512] 247 溶液置换器
- [0513] 248 废液送液通路
- [0514] 249 泵
- [0515] 250 冻结保存液保存部
- [0516] 251 送液通路
- [0517] 252 泵
- [0518] 253 送液通路
- [0519] 254 泵
- [0520] 255 冻结保存容器
- [0521] 256 低温保管库
- [0522] 257 液氮保管库
- [0523] 258 送液通路
- [0524] 259 冷藏保存部
- [0525] 259 箱体
- [0526] 271 传感器
- [0527] 272 温度计
- [0528] 301 袋
- [0529] 302 袋
- [0530] 401 输入装置
- [0531] 402 输出装置
- [0532] 403 关系储存装置
- [0533] 500 CPU
- [0534] 501 图像处理部

- [0535] 511 轮廓定义部
- [0536] 512 细胞评价部
- [0537] 513 统计处理部
- [0538] 514 密度算出部
- [0539] 515 培养基评价部

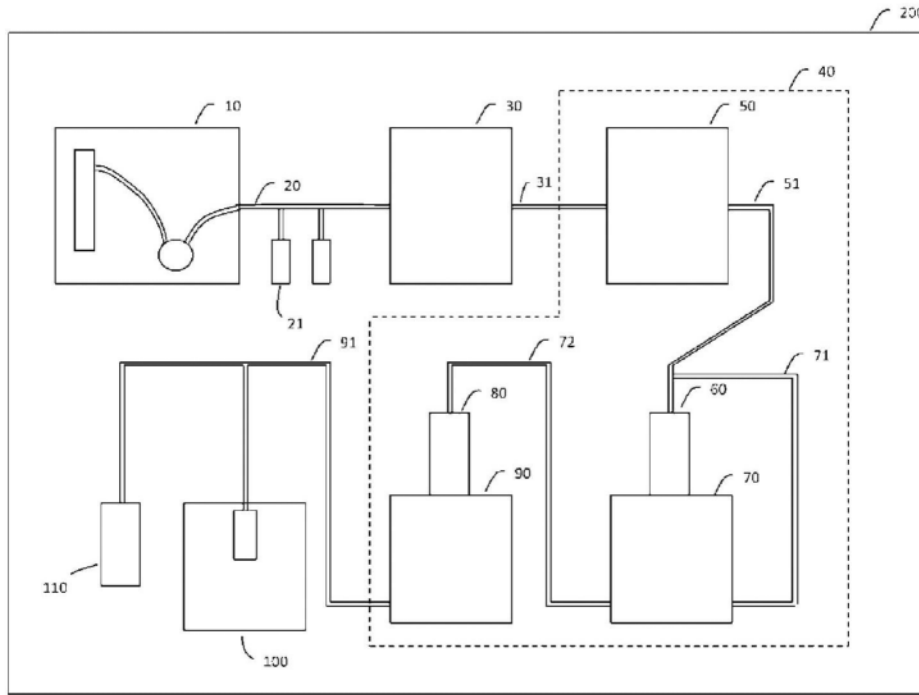


图1

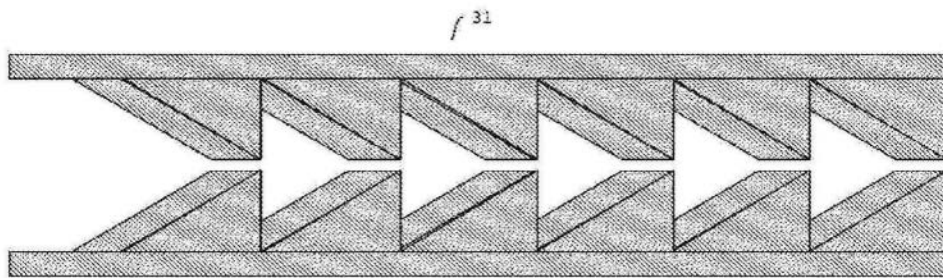


图2

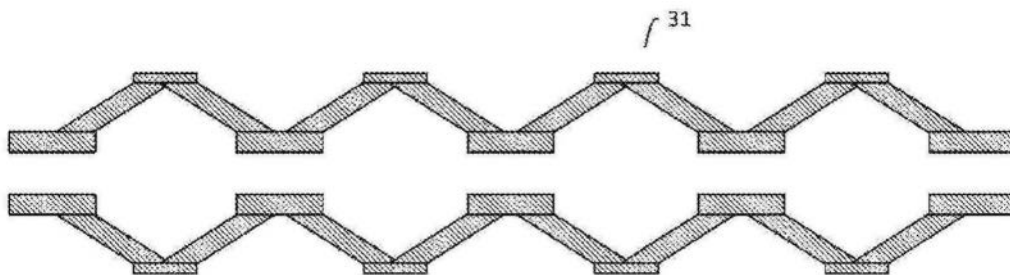


图3

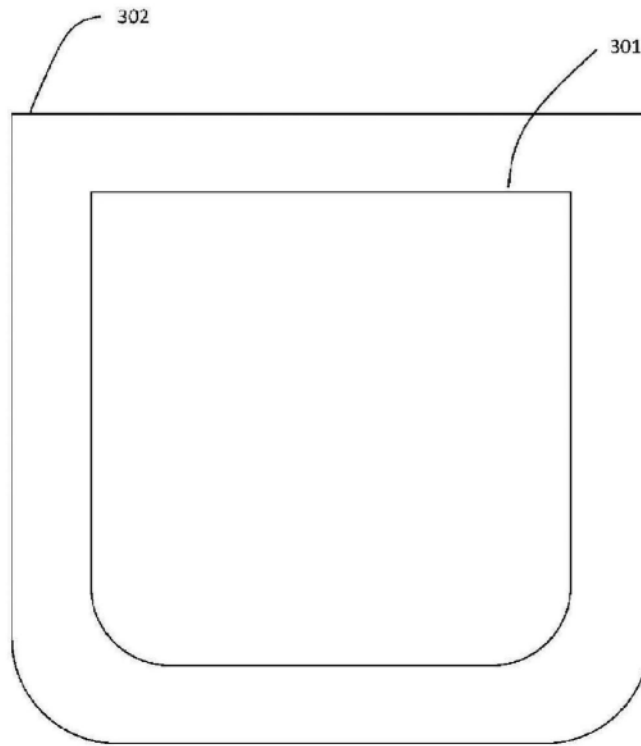


图4

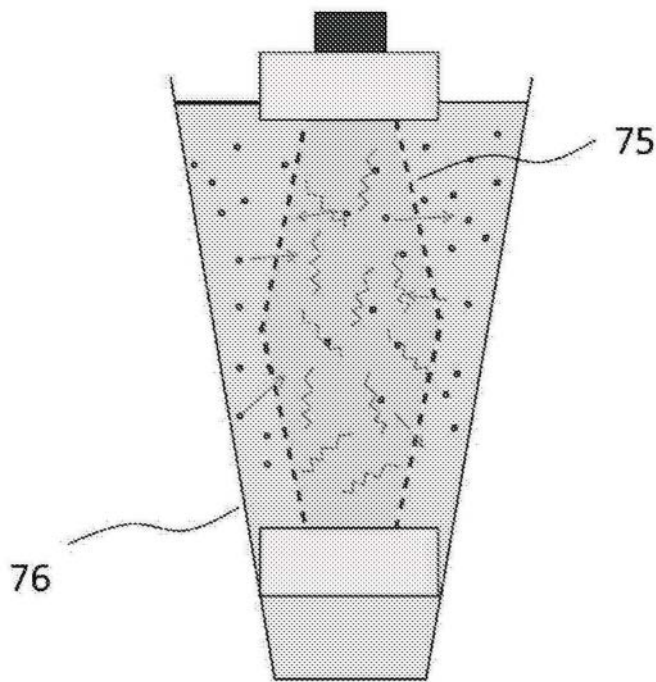


图5

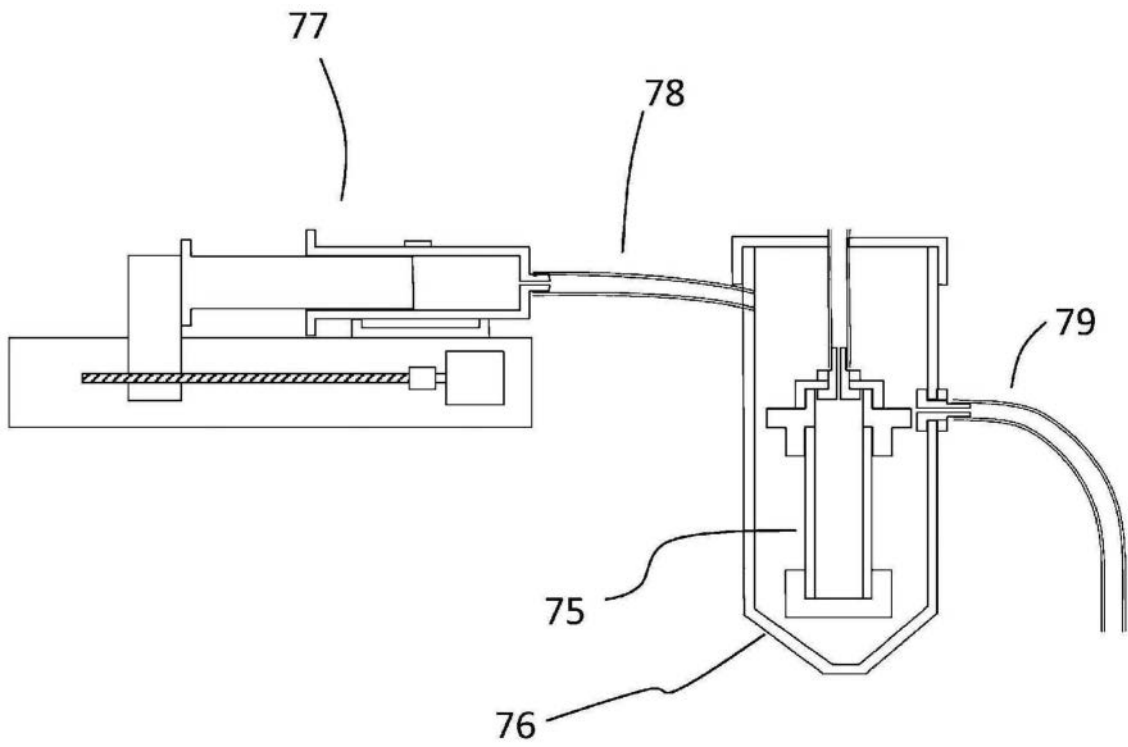


图6

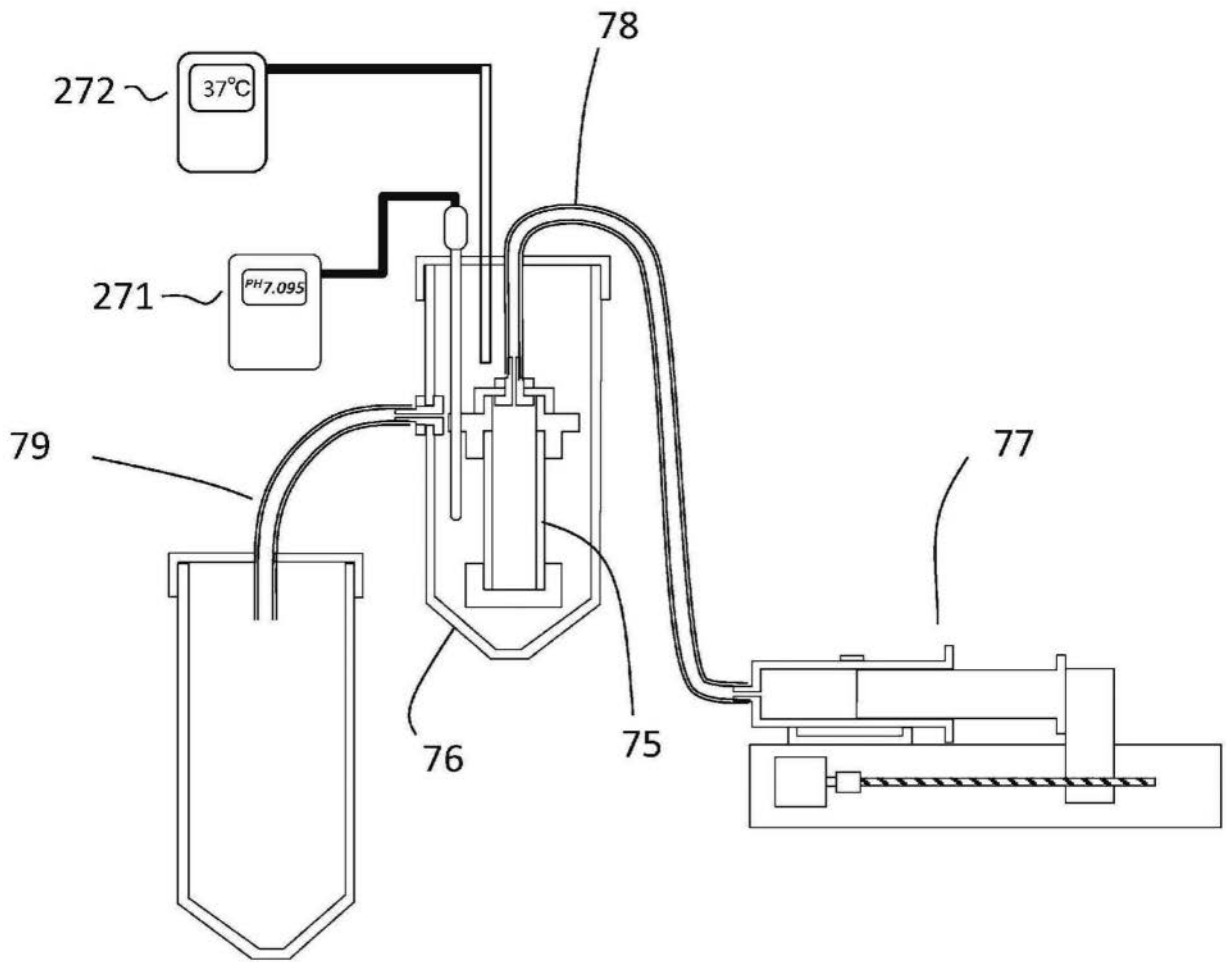


图7

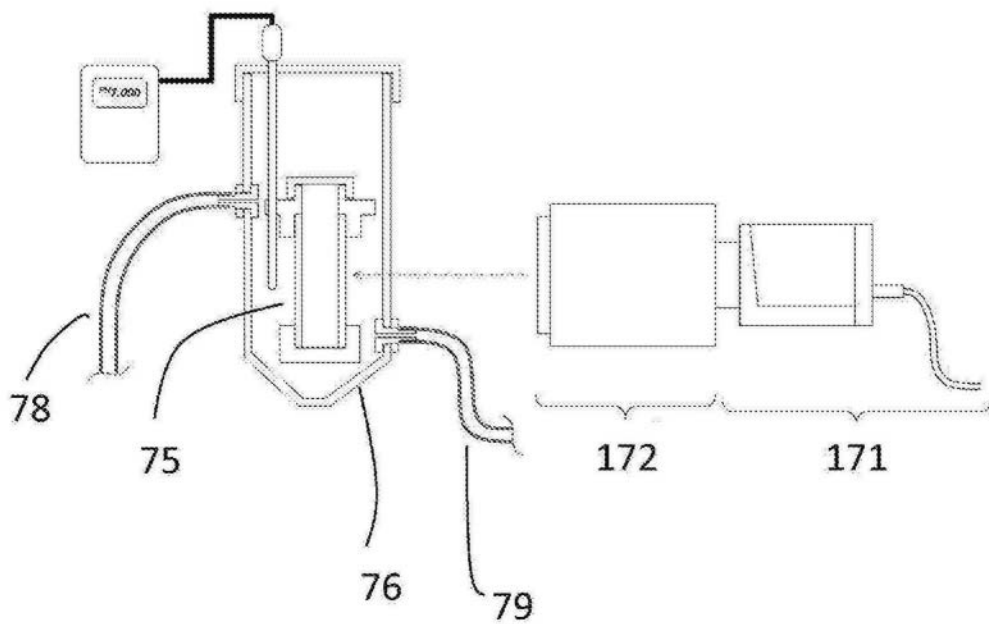


图8

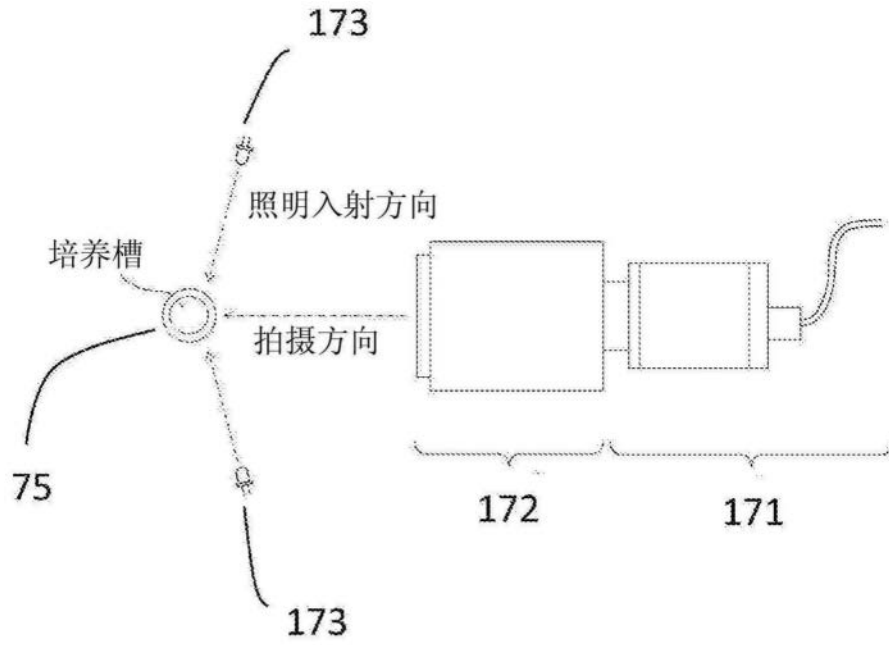


图9

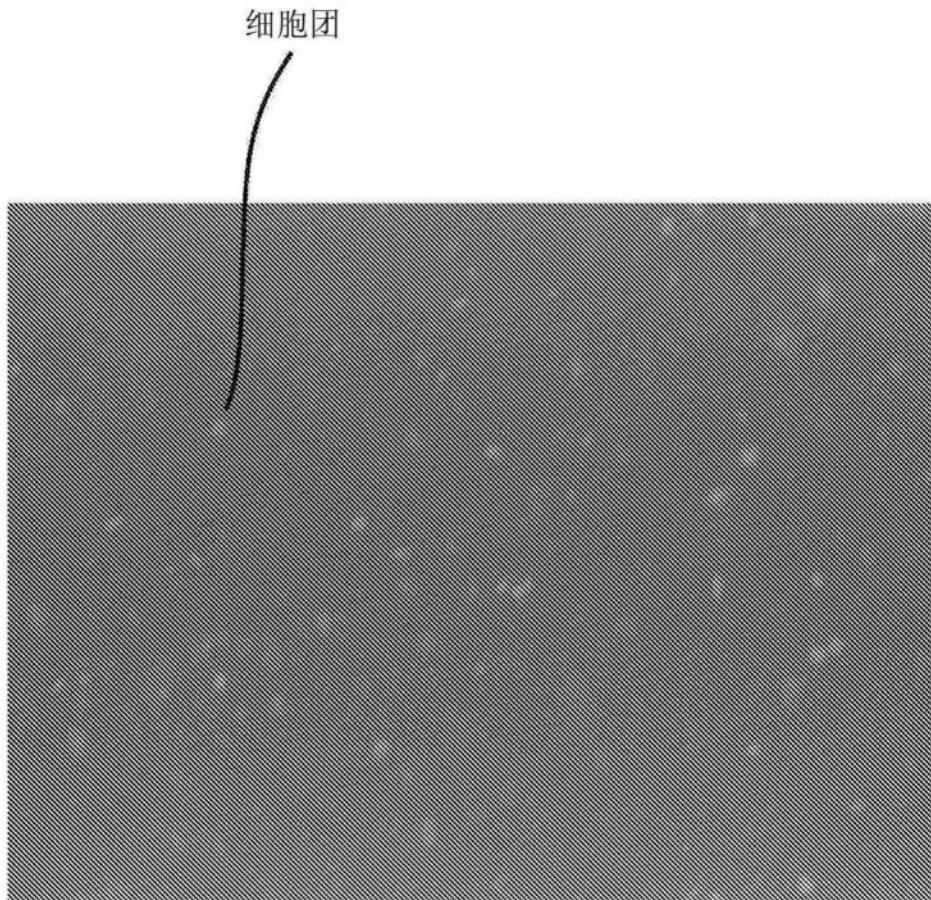


图10

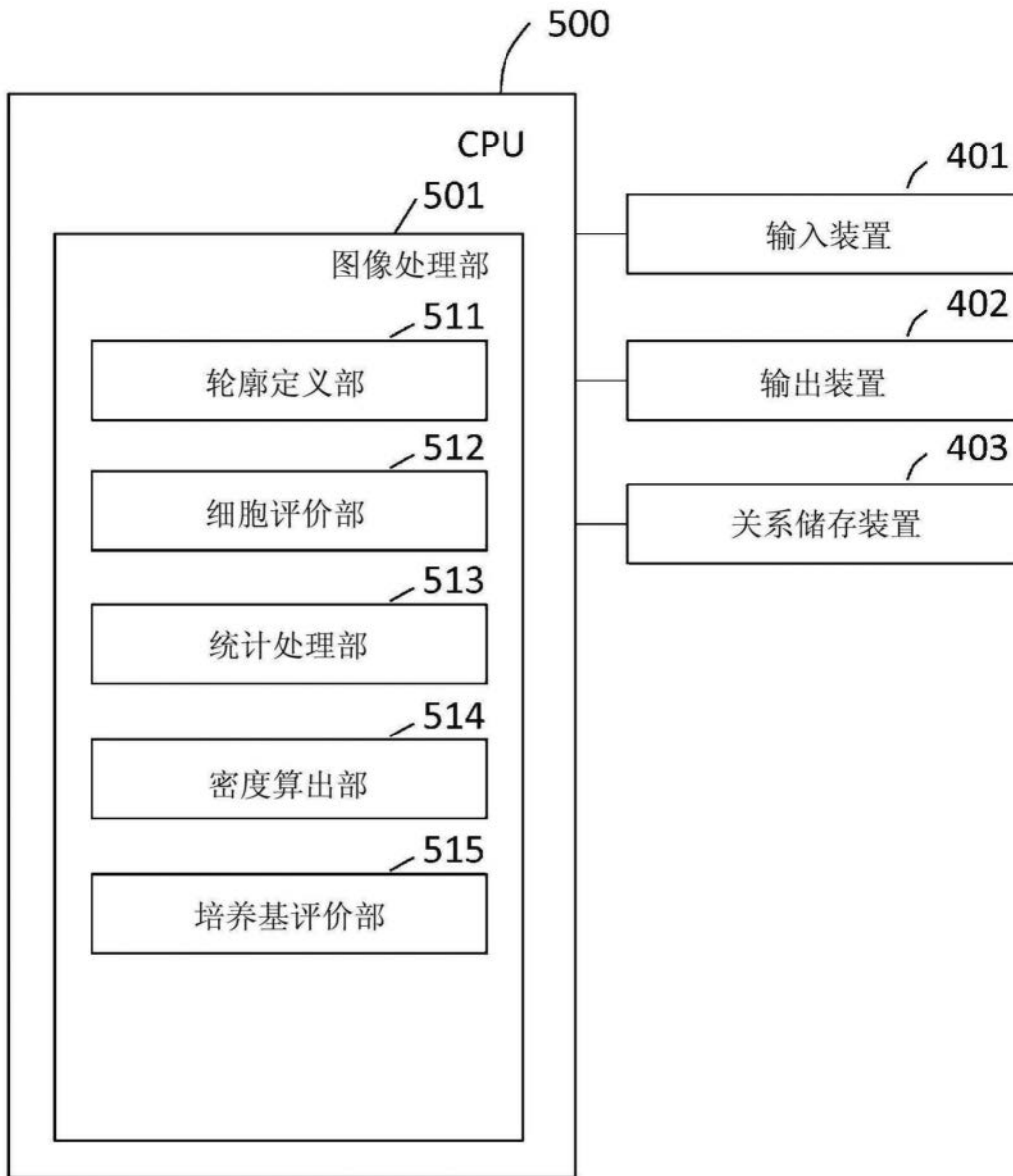


图11



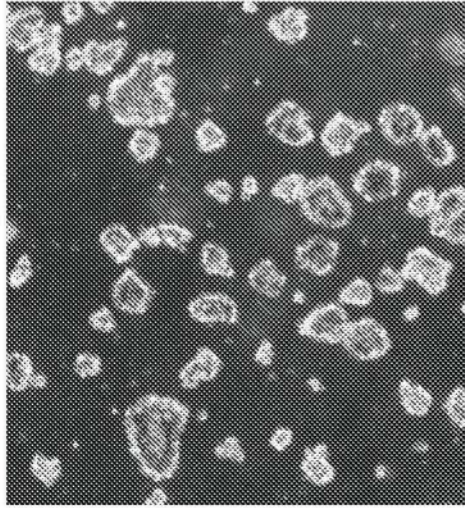


图12

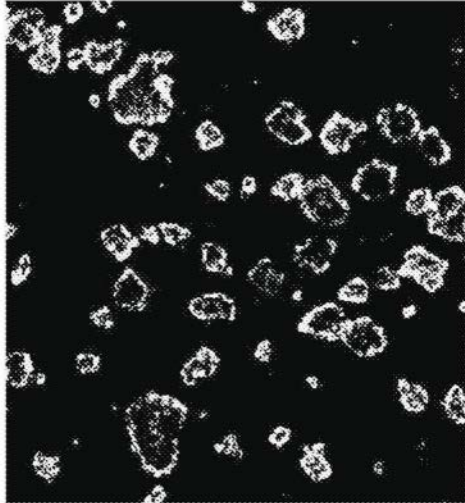


图13

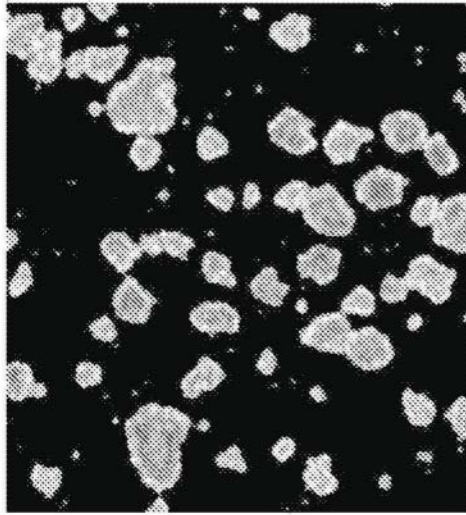


图14

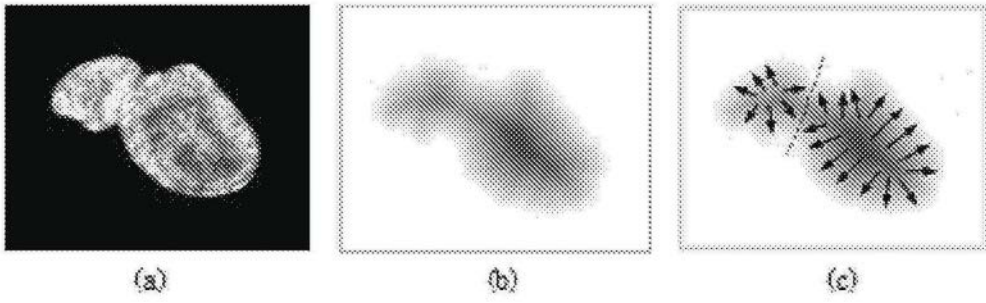


图15

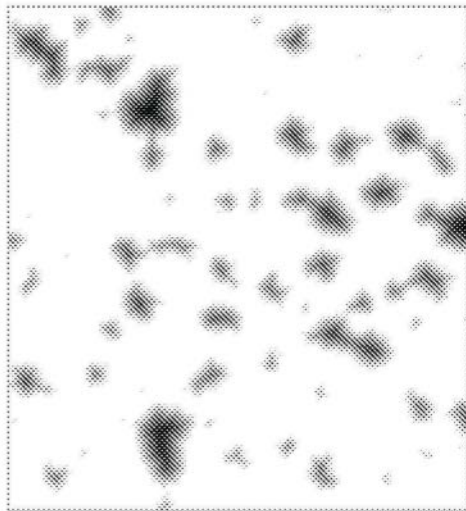


图16

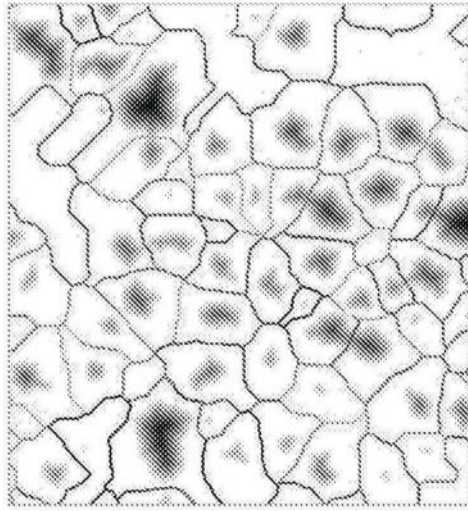


图17

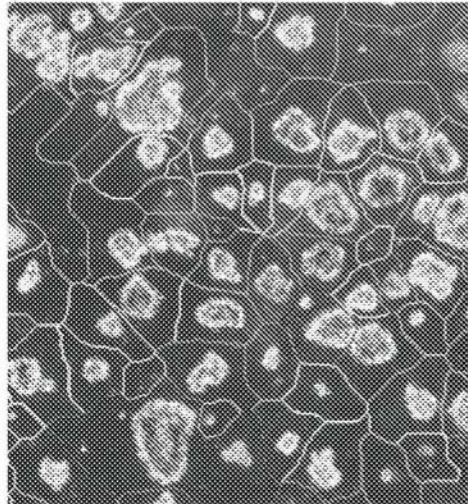


图18

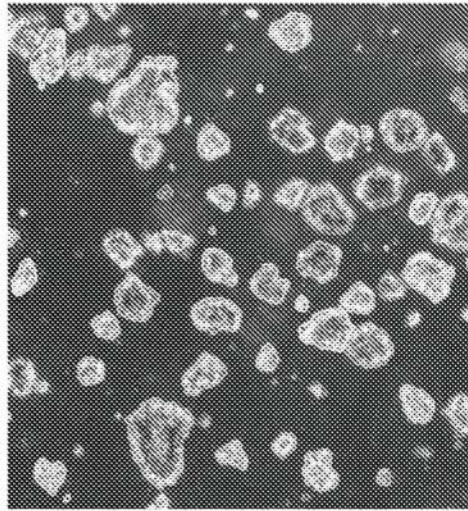


图19

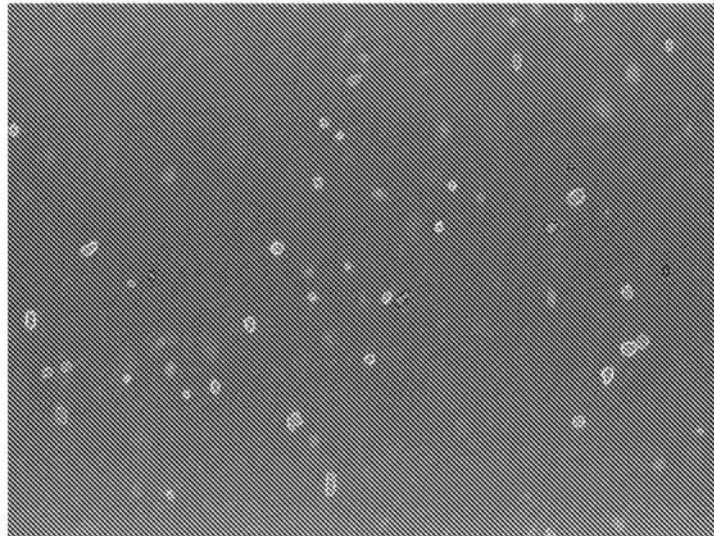


图20

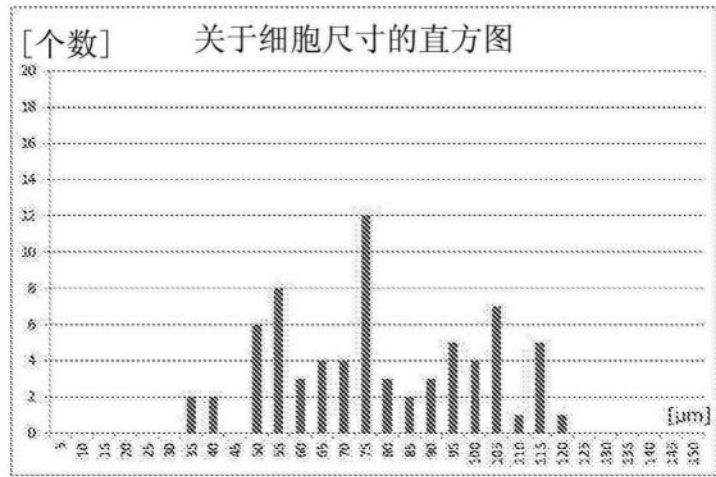


图21

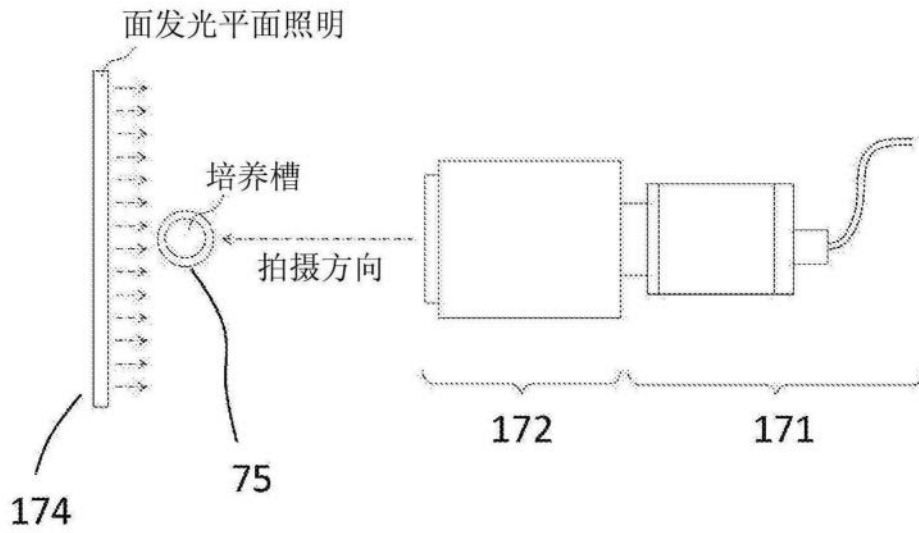


图22

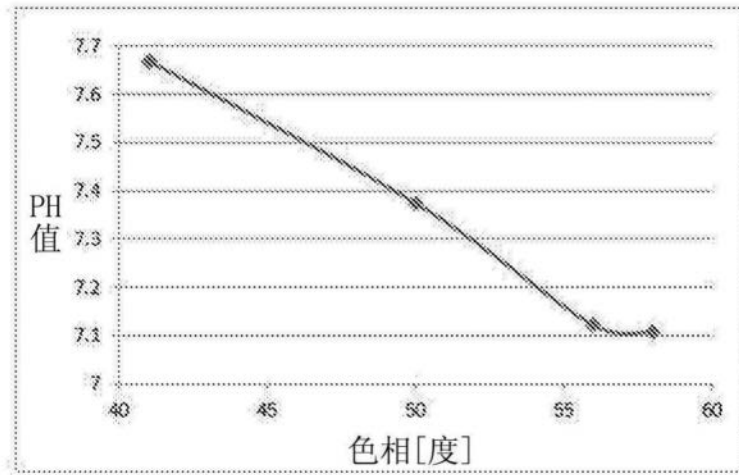


图23

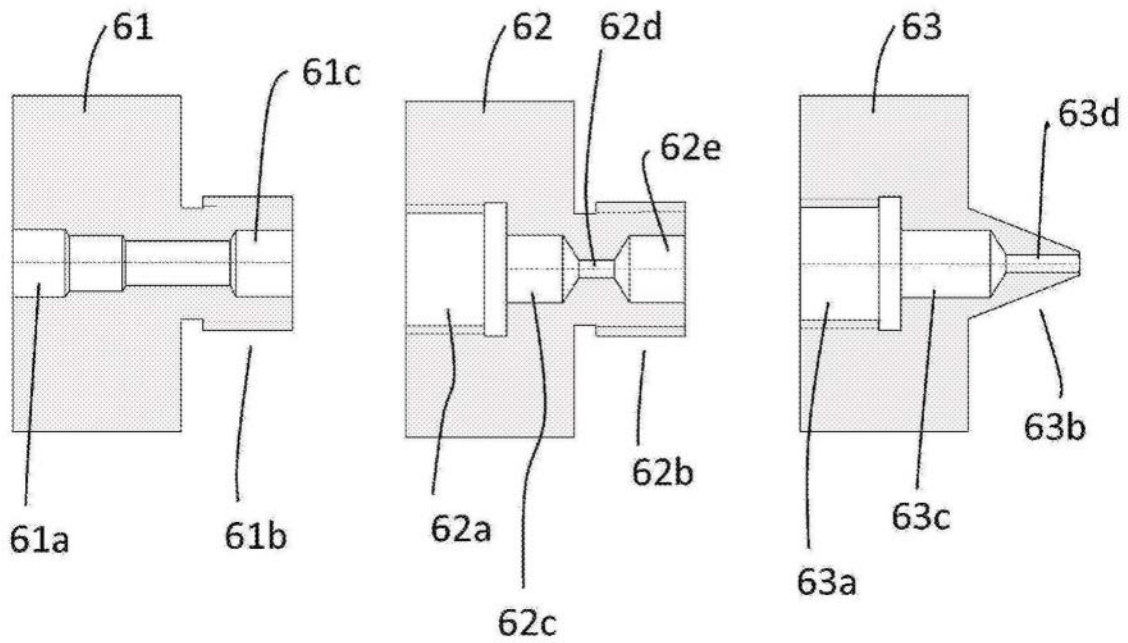


图24

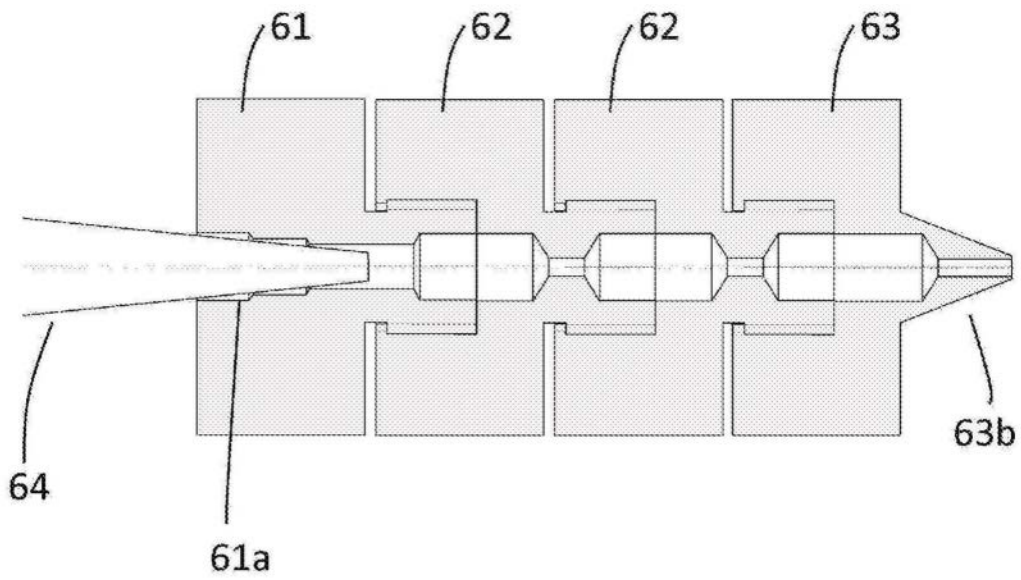


图25

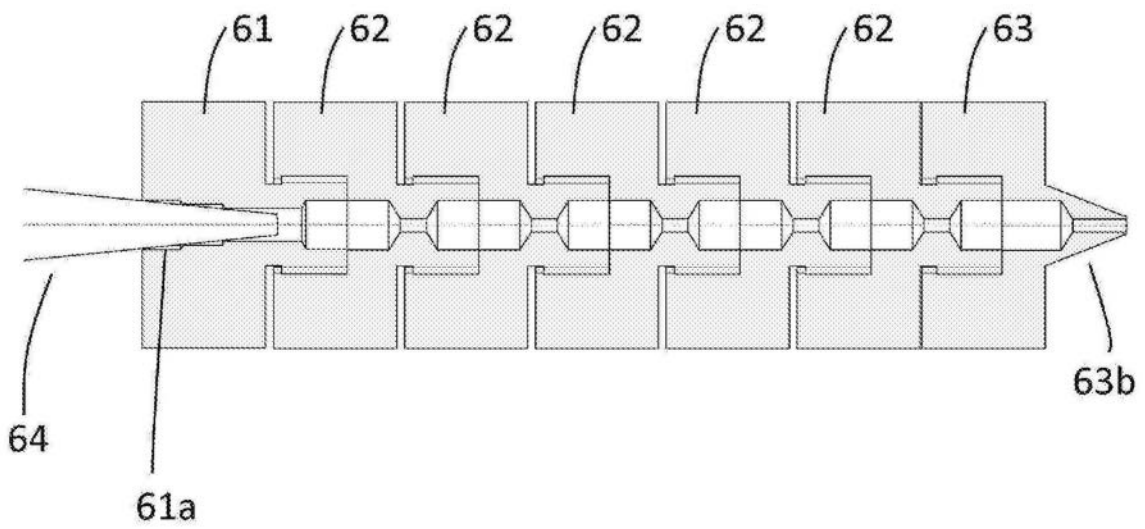


图26

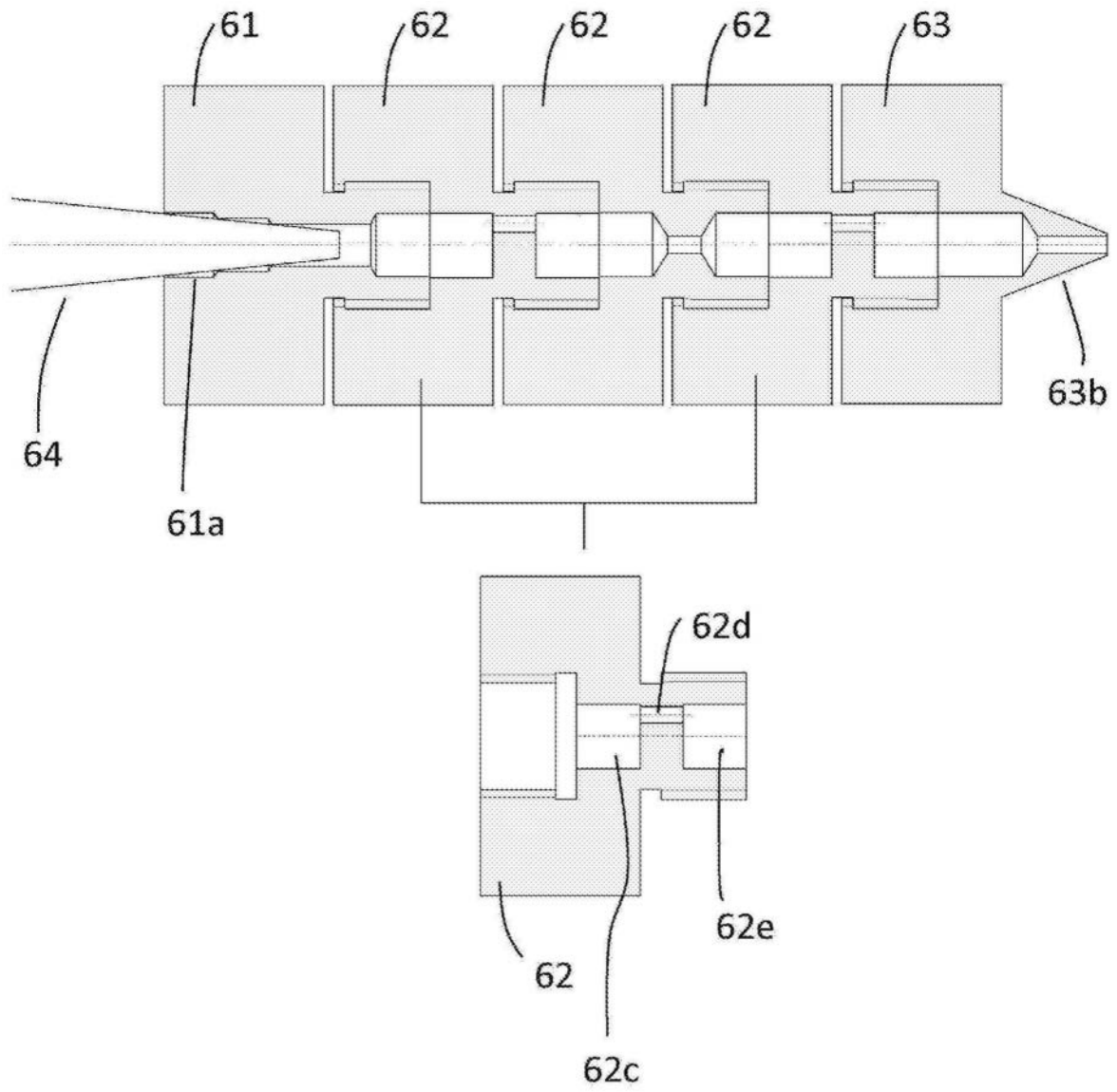


图27



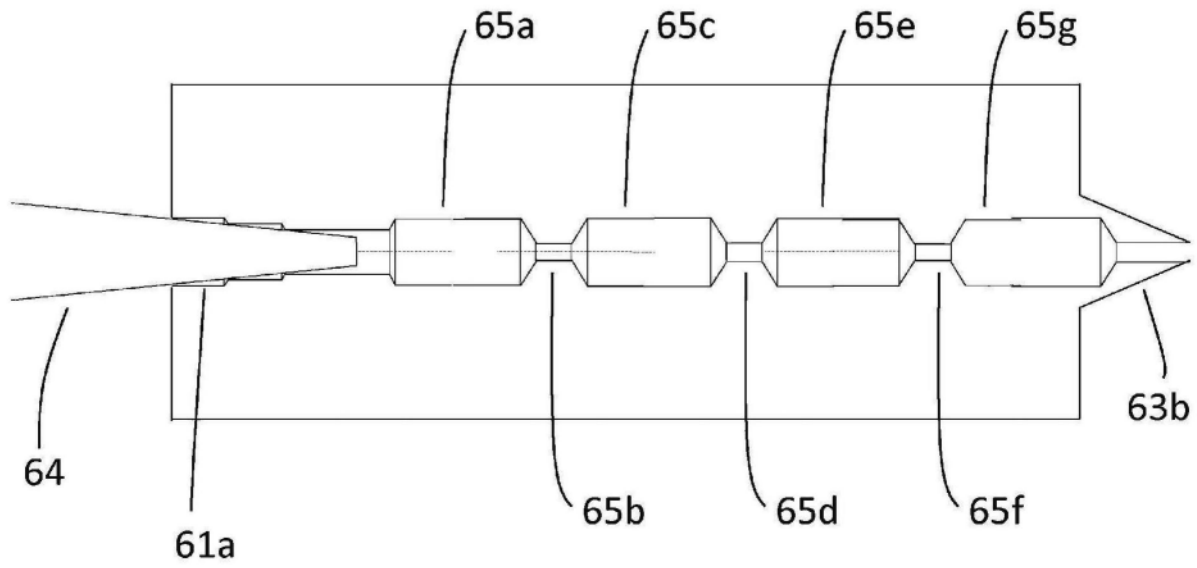


图28

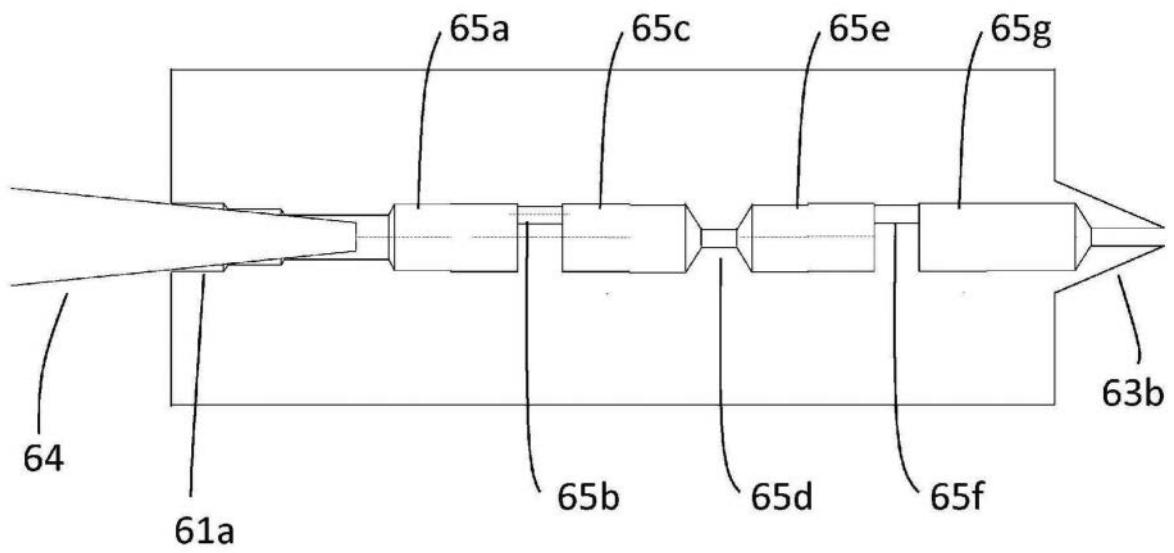


图29

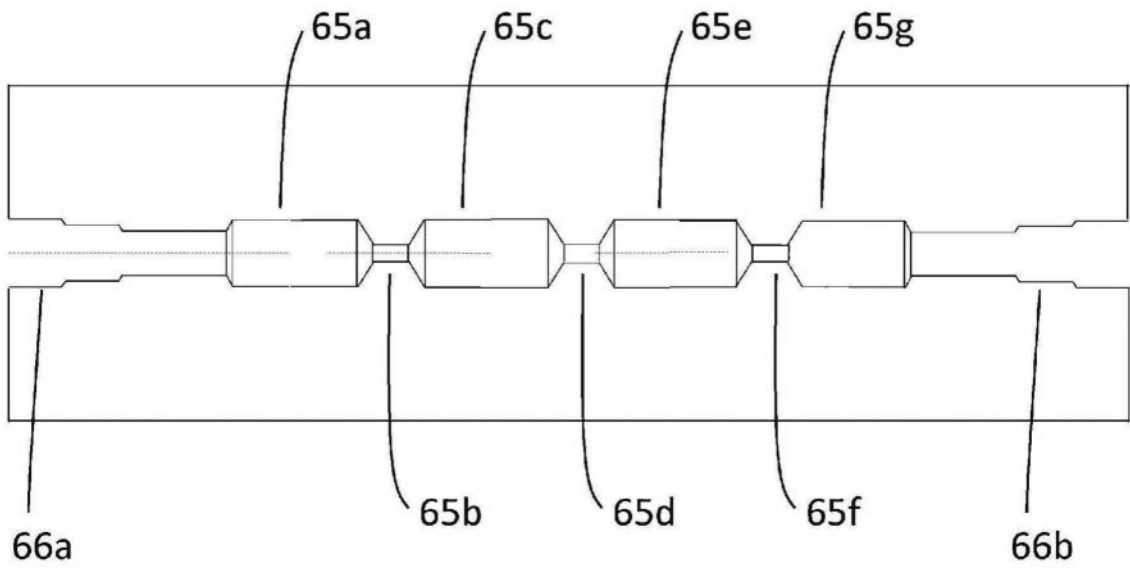


图30

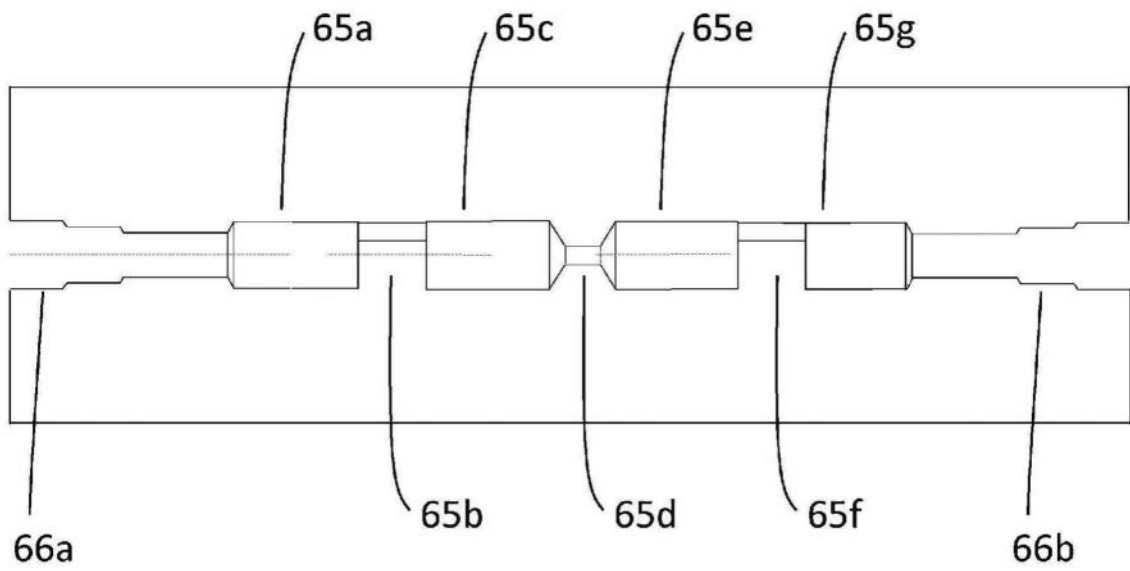


图31

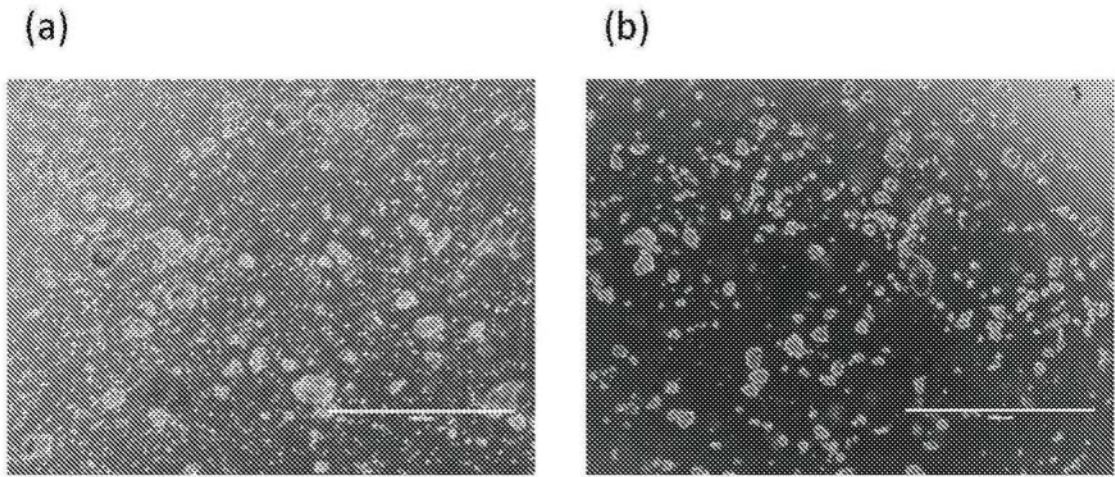


图32

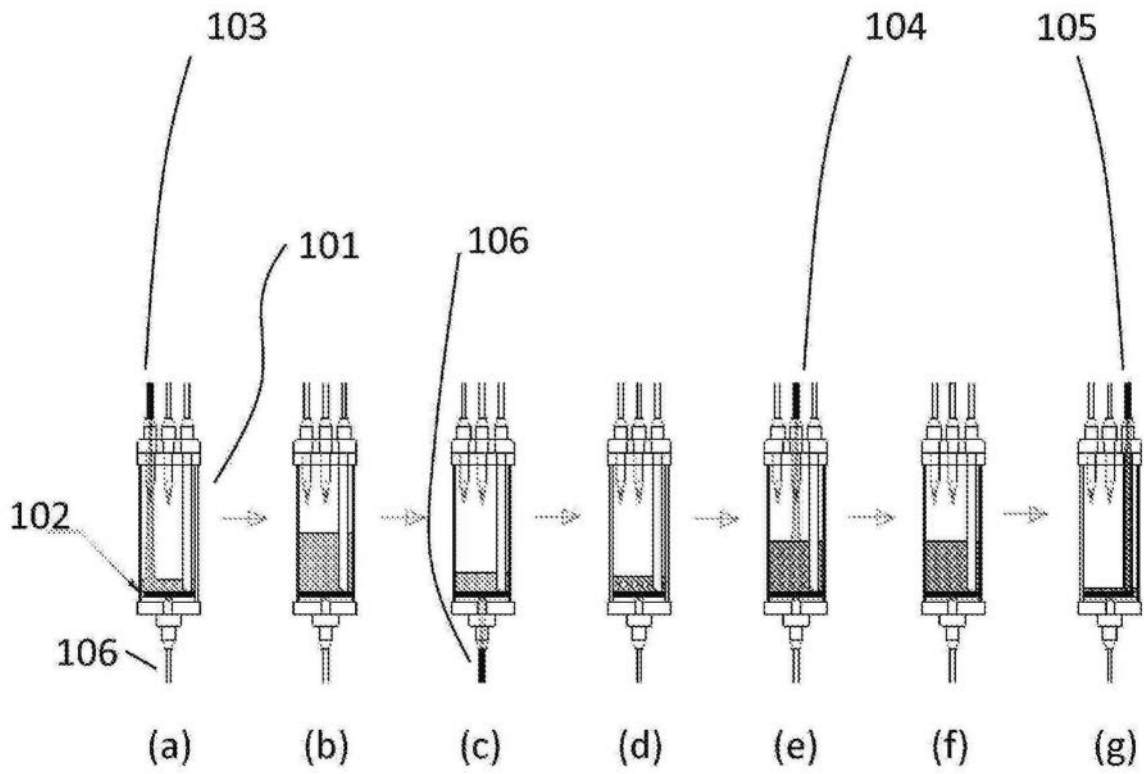


图33

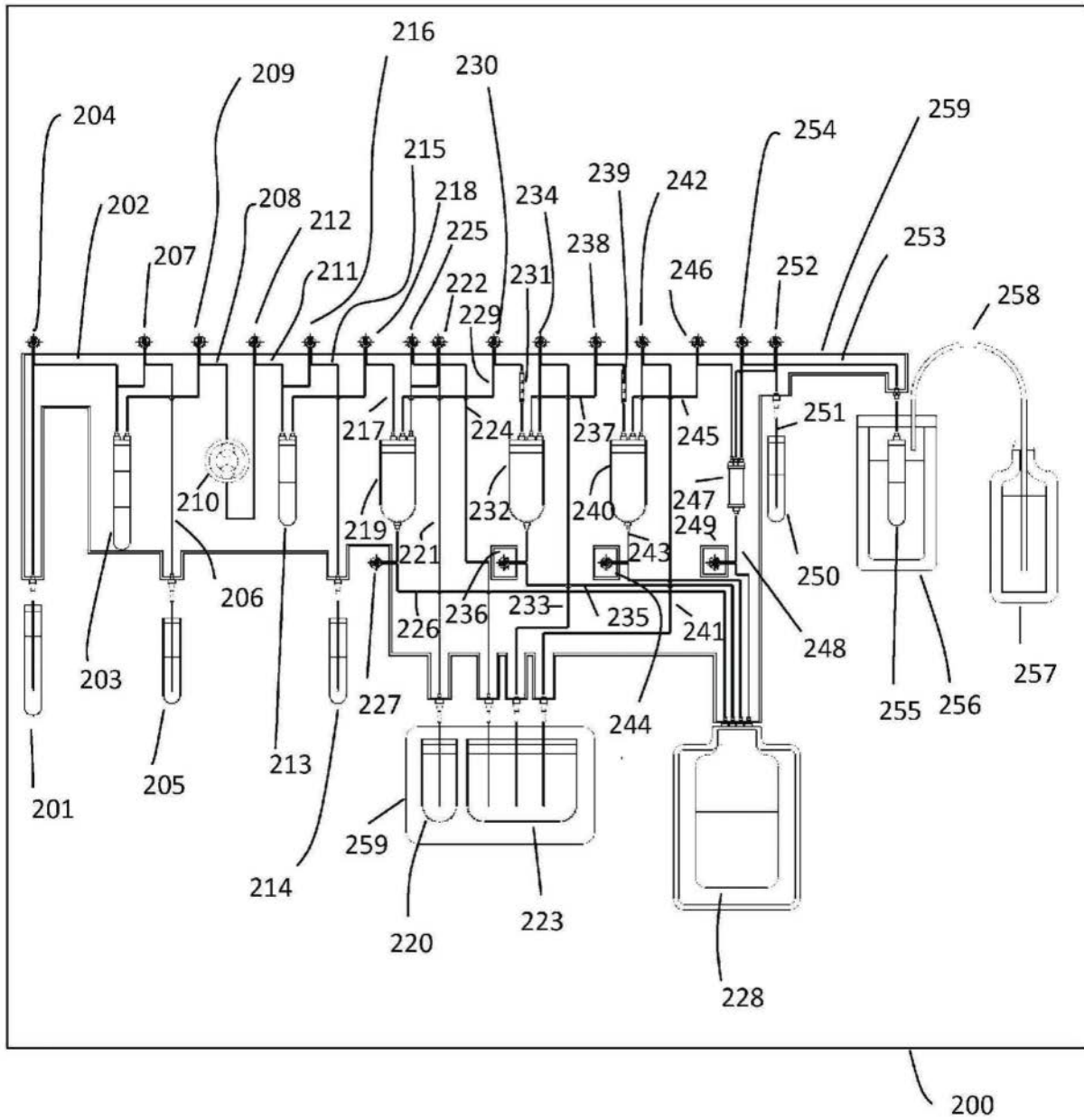


图34

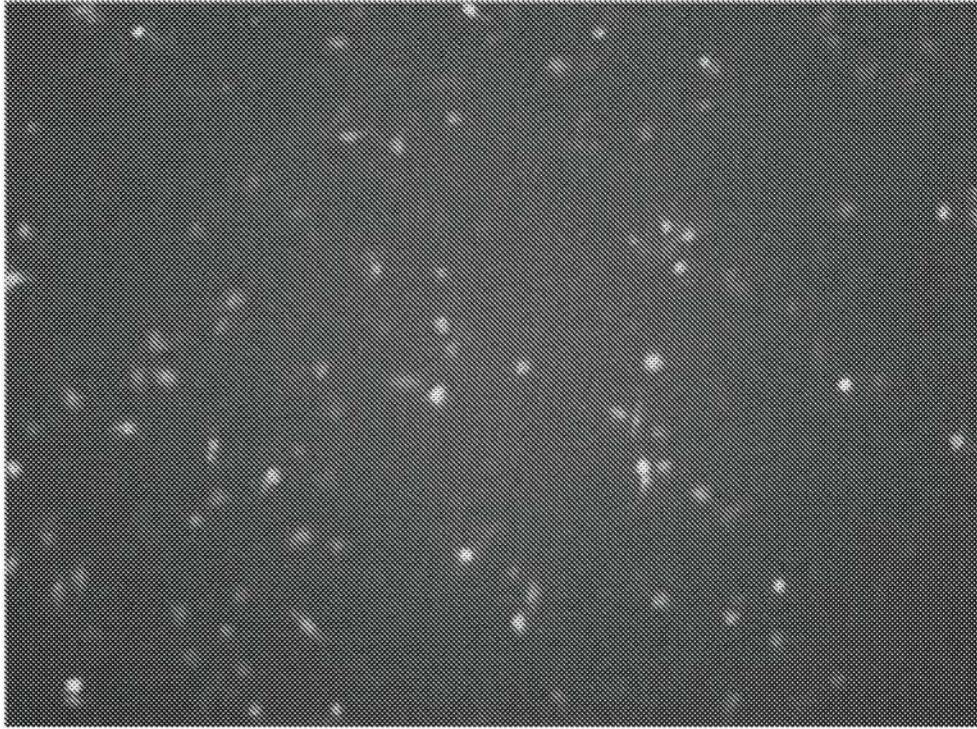


图35

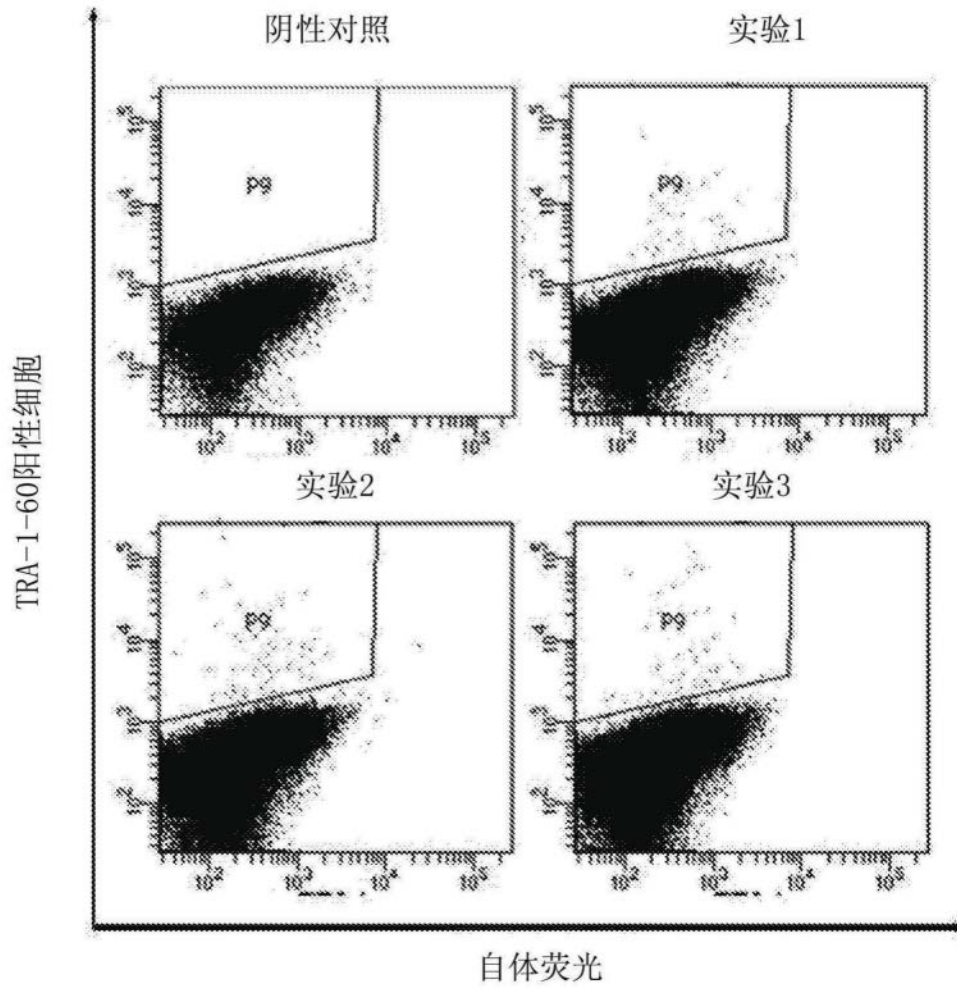


图36

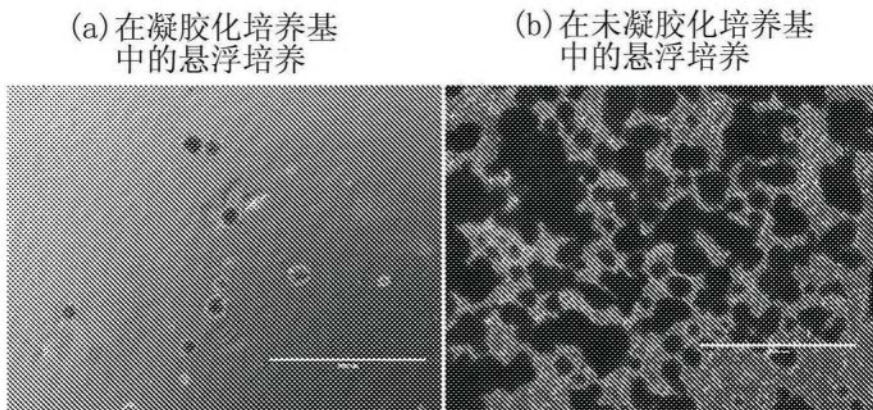


图37

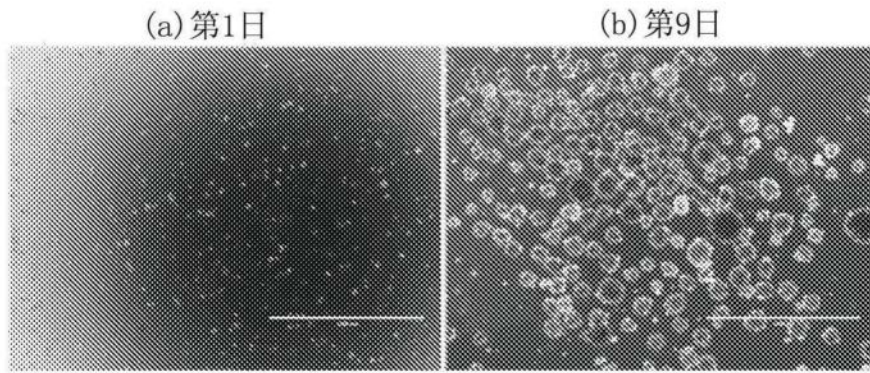


图38

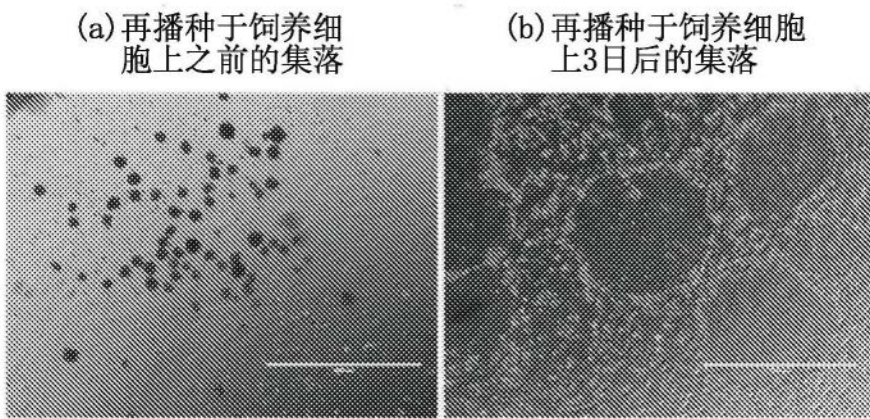


图39

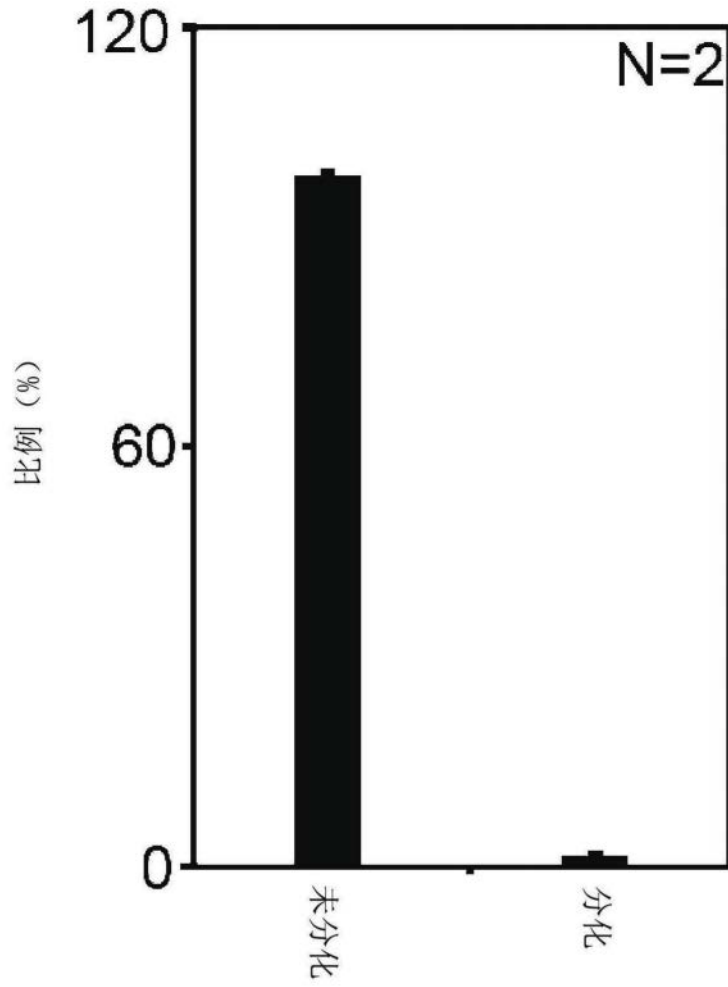


图40

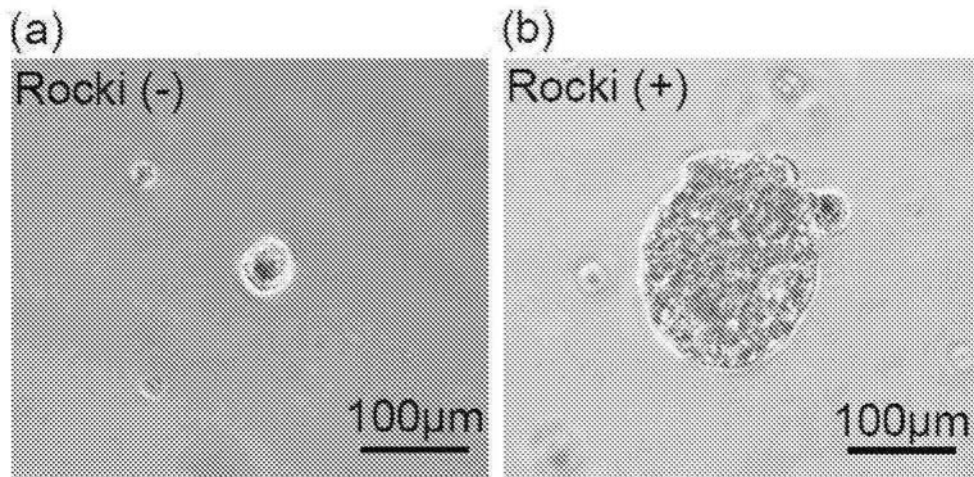


图41



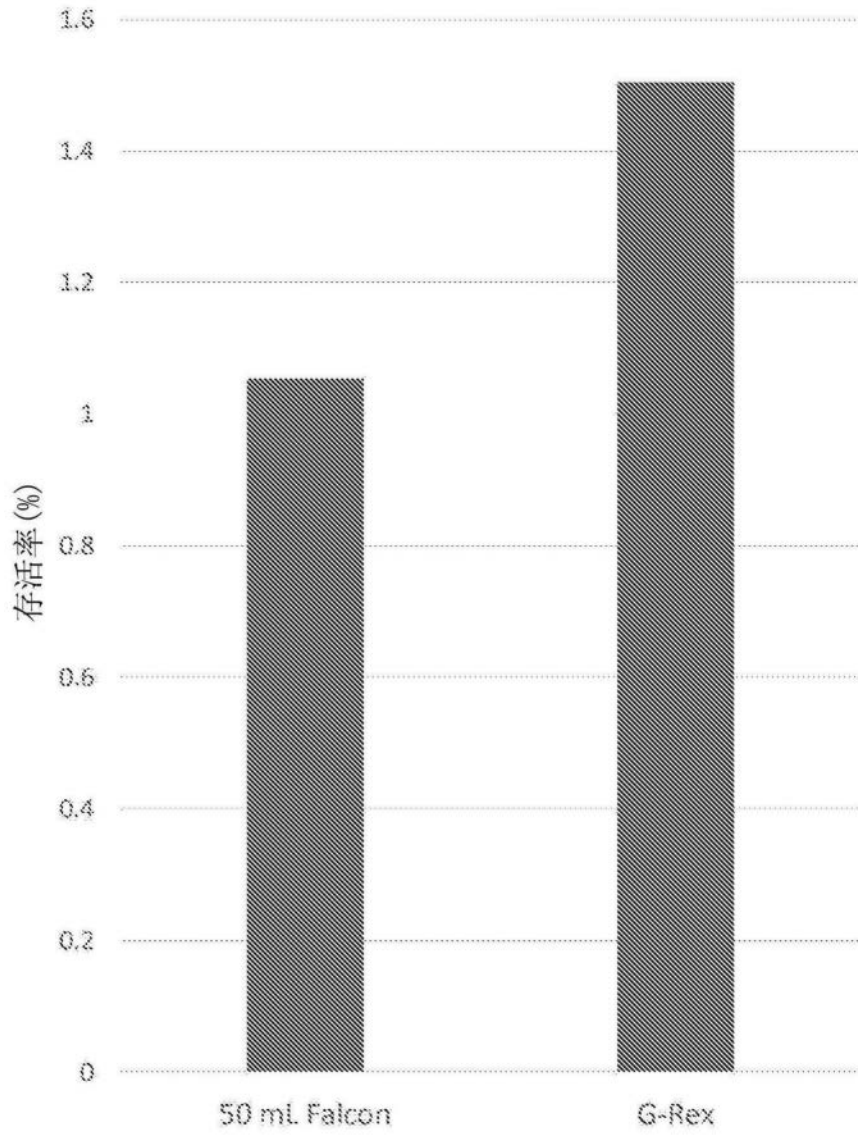
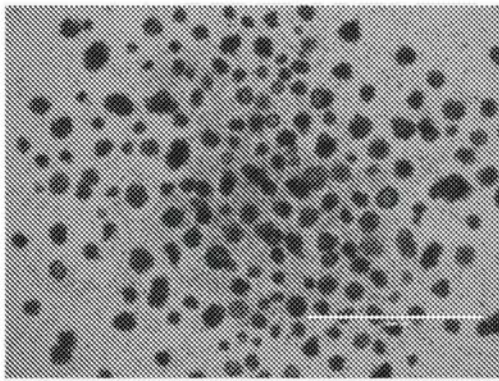
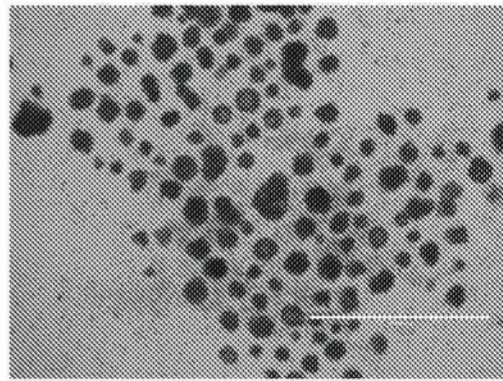


图42

(a)有透析管有培养基交换



(b)有透析管无培养基交换



(c)无透析管无培养基交换

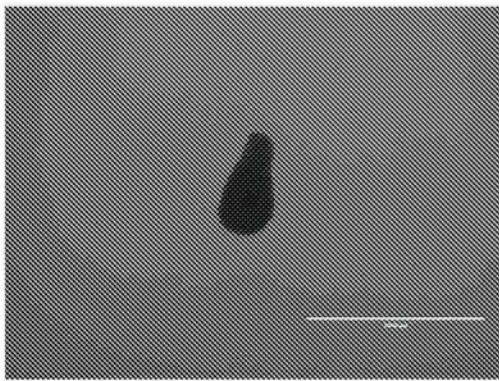


图43

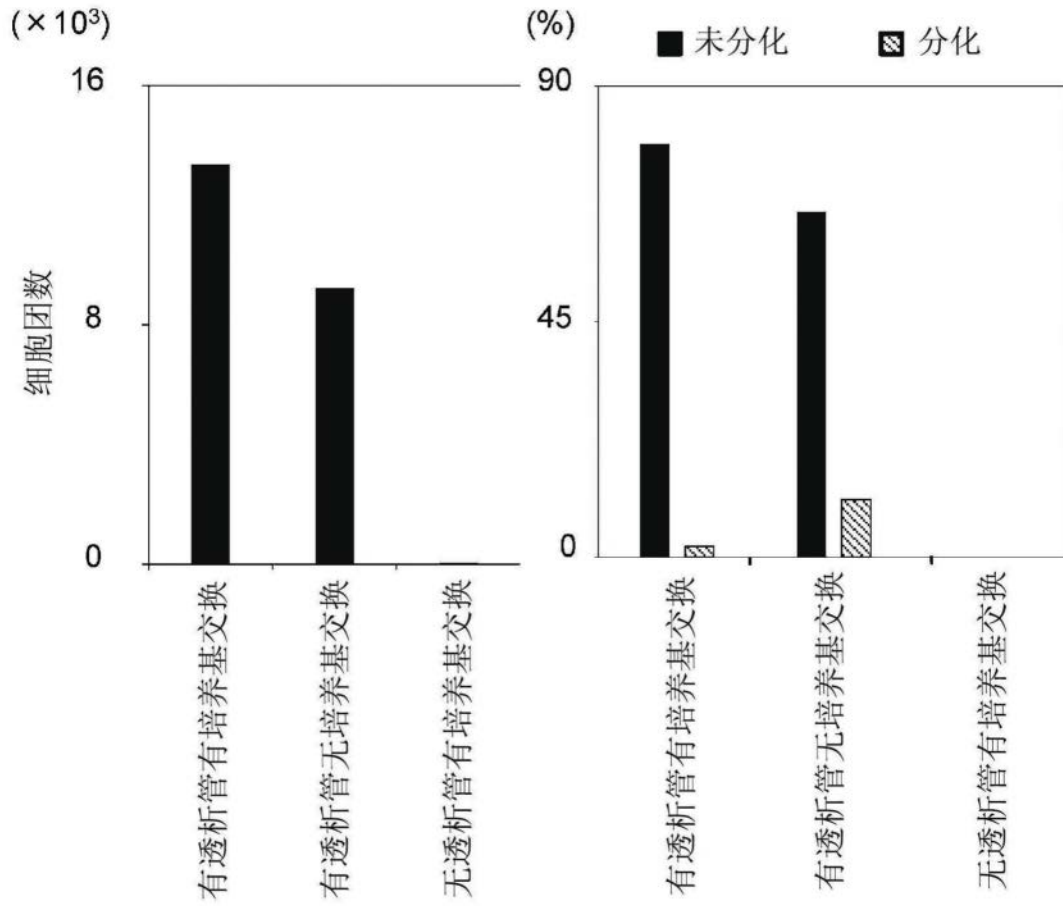


图44