

(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 2020/040135 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01) C12M 3/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/032438
- (22) 国際出願日: 2019年8月20日(20.08.2019)
- (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:
62/766,598 2018年8月20日(20.08.2018) US
- (71) 出願人: アイピース, インコーポレイテッド
(I PEACE, INC.) [US/US]; 94303 カリフォルニア州パロアルト, サンアントニオロード 809, スイート7 California (US).
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 田邊 剛士 (TANABE, Koji) [JP/US];
94303 カリフォルニア州パロアルト, サンアントニオロード 809, スイート7 アイピース, インコーポレイテッド内 California (US).
- (72) 発明者: 須藤 健太 (SUTO, Kenta); 94303 カリフォルニア州パロアルト, サンアントニオロード

ード 809, スイート7 アイピース, インコーポレイテッド内 California (US).

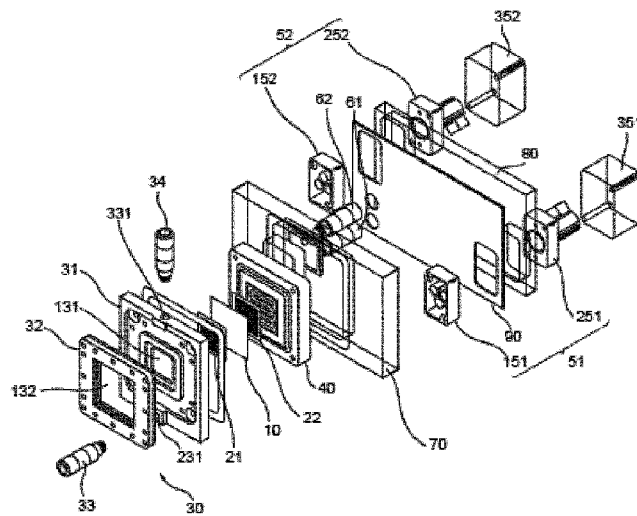
(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.);
〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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,

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING OR INDUCING CELLS

(54) 発明の名称: 細胞の培養又は誘導方法



(57) Abstract: Provided is a method for cultivating or inducing cells that includes cultivating or inducing cells within a closed system.

(57) 要約: 閉鎖系内で細胞を培養又は誘導することを含む、細胞の培養又は誘導方法が提供される。



WO 2020/040135 A1

TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：細胞の培養又は誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は細胞技術に関し、細胞の培養又は誘導方法に関する。

背景技術

[0002] 胚性幹細胞（ES細胞）は、ヒトやマウスの初期胚から樹立された幹細胞である。ES細胞は、生体に存在する全ての細胞へと分化できる多能性を有する。現在、ヒトES細胞は、パーキンソン病、若年性糖尿病、及び白血病等、多くの疾患に対する細胞移植療法に利用可能である。しかし、ES細胞の移植には障害もある。特に、ES細胞の移植は、不成功な臓器移植に続いて起こる拒絶反応と同様の免疫拒絶反応を惹起しうる。また、ヒト胚を破壊して樹立されるES細胞の利用に対しては、倫理の見地から批判や反対意見が多い。

[0003] このような背景の状況の下、京都大学の山中伸弥教授は、4種の遺伝子：OCT3/4、KLF4、c-MYC、及びSOX2を体細胞に導入することにより、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）を樹立することに成功した。これにより、山中教授は、2012年のノーベル生理学・医学賞を受賞した（例えば、特許文献1、2参照。）。iPS細胞は、拒絶反応や倫理的問題のない理想的な多能性細胞である。したがって、iPS細胞は、細胞移植療法への利用が期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第4183742号公報

特許文献2：特開2014-114997号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] iPS細胞に限らず、様々な細胞を効率よく簡便に培養又は誘導可能な方

法が望まれている。そこで、本発明は、細胞を効率よく簡便に培養又は誘導可能な方法を提供することを目的の一つとする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明の態様によれば、閉鎖系内で細胞を培養又は誘導することを含む、細胞の培養又は誘導方法が提供される。
- [0007] 上記の方法において、誘導が、リプログラミング、初期化、分化転換、分化誘導及び細胞の運命変更の少なくともいずれかを含んでもよい。
- [0008] 上記の方法において、閉鎖系内と外部との間でガスの交換が生じなくともよい。
- [0009] 上記の方法が、閉鎖系内の温度を制御することをさらに含んでもよい。
- [0010] 上記の方法の培養することにおいて、閉鎖系が密閉されていてもよい。
- [0011] 上記の方法において、閉鎖系が密閉された状態で、閉鎖系内に外気が進入しなくともよい。
- [0012] 上記の方法において、閉鎖系が密閉された状態で、閉鎖系内に閉鎖系外の細胞、微生物、ウイルス、及び塵が進入しなくともよい。
- [0013] 上記の方法において、閉鎖系が密閉された状態で、閉鎖系内の物質が閉鎖系外に流出しなくともよい。
- [0014] 上記の方法において、閉鎖系内に二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガスの少なくともいずれかが供給されなくともよい。
- [0015] 上記の方法において、閉鎖系内の培地のpHが所定の範囲内に保たれてもよい。
- [0016] 上記の方法において、閉鎖系の少なくとも一部が、ガス非透過性物質に埋め込まれることにより形成されていてもよい。
- [0017] 上記の方法において、閉鎖系の少なくとも一部が、ガス非透過性物質からなってもよい。
- [0018] 上記の方法において、閉鎖系内で培地を補充又は交換しながら細胞を培養又は誘導してもよい。

- [0019] 上記の方法において、閉鎖系内で培地を循環しながら細胞を培養又は誘導してもよい。
- [0020] 上記の方法において、閉鎖系が細胞を培養する培養槽を備え、培養槽内に流体を供給するための供給口と、閉鎖系内の流体を排出するための排出口と、が、培養槽に設けられており、供給口及び排出口が密閉可能であってもよい。
- [0021] 上記の方法において、供給口に流体を供給するための供給器が着脱可能であり、排出口に流体を排出するための排出器が着脱可能であり、供給器から培養槽内に流体を供給すると、培養槽内の流体が排出器内に移動してもよい。
- [0022] 上記の方法において、供給器から培養槽内に培地を供給すると、培養槽内の空気が排出器内に移動してもよい。
- [0023] 上記の方法において、供給器から培養槽内に培地を供給すると、培養槽内の培地が排出器内に移動してもよい。
- [0024] 上記の方法において、培地が細胞を含有してもよい。
- [0025] 上記の方法において、供給器から培養槽内に流体を供給する際に、外気が培養槽内に進入しなくともよい。
- [0026] 上記の方法において、培養することにおいて、閉鎖系内の二酸化炭素濃度が制御されなくともよい。
- [0027] 上記の方法の培養することにおいて、閉鎖系外の二酸化炭素濃度が制御されなくともよい。
- [0028] 上記の方法の培養することにおいて、閉鎖系内の半透膜を介して閉鎖系内の物質が移動してもよい。
- [0029] 上記の方法において、閉鎖系が、細胞を培養する培養槽と、培養槽に接続された流路と、を備え、培地が培養槽と流路を循環してもよい。
- [0030] 上記の方法において、流路において外部とガスの交換が生じなくともよい。
- [0031] 上記の方法において、培地が循環することにより、培養槽内の培地のpH

が所定の範囲内に保たれてもよい。

- [0032] 上記の方法において、培養が浮遊培養であってもよい。
- [0033] 上記の方法において、培養が接着培養であってもよい。
- [0034] 上記の方法において、閉鎖系内のゲル培地中で細胞を培養してもよい。
- [0035] 上記の方法において、閉鎖系内の液体培地中で細胞を培養してもよい。
- [0036] 上記の方法において、閉鎖系内の培地が攪拌されてもよい。
- [0037] 上記の方法において、閉鎖系内の培地が攪拌されなくともよい。
- [0038] 上記の方法が、細胞を継代することをさらに含んでもよい。
- [0039] 上記の方法において、播種と継代の間に培地の追加及び交換をしなくともよい。
- [0040] 上記の方法において、播種と継代の間に培地の追加又は交換をしてもよい。
- [0041] 上記の方法において、継代と継代の間に培地の追加及び交換をしなくともよい。
- [0042] 上記の方法において、継代と継代の間に培地の追加又は交換をしてもよい。
- [0043] 上記の方法において、細胞が幹細胞であってもよい。
- [0044] 上記の方法において、幹細胞が i P S 細胞、E S 細胞、又は体性幹細胞であってもよい。
- [0045] 上記の方法の培養することにおいて、幹細胞が未分化状態を維持してもよい。
- [0046] 上記の方法において、培養することにおいて、幹細胞が多能性を維持してもよい。
- [0047] 上記の方法において、細胞が体細胞であってもよい。
- [0048] 上記の方法において、細胞が、血液系細胞、神経系細胞、心筋系細胞、上皮系細胞、間葉系細胞、肝細胞、インスリン産生細胞、網膜色素上皮細胞、及び角膜細胞から選択される少なくとも一つであってもよい。
- [0049] 上記の方法において、細胞が誘導因子を導入された細胞であってもよい。

- [0050] 上記の方法において、閉鎖系内の培地に誘導因子を添加し、閉鎖系内で培養されている細胞に誘導因子を導入してもよい。
- [0051] 上記の方法において、細胞が幹細胞に誘導されてもよい。
- [0052] 上記の方法において、幹細胞がiPS細胞であってもよい。
- [0053] 上記の方法において、細胞が血液系細胞であってもよい。
- [0054] 上記の方法において、細胞が別種の細胞に誘導されてもよい。
- [0055] 上記の方法において、細胞が血液系細胞であり、閉鎖系内の培地に誘導因子を添加し、閉鎖系内で培養されている血液系細胞に誘導因子を導入し、血液系細胞をiPS細胞に誘導してもよい。
- [0056] 上記の方法において、誘導因子がプラスミドに含まれていてもよい。
- [0057] 上記の方法において、誘導因子がRNAであってもよい。
- [0058] 上記の方法において、誘導因子がセンダイウイルスに含まれていてもよい。
- [0059] また、本発明の態様によれば、培養成分が透過可能な培養成分透過部材と、培養成分透過部材の一方の面を覆う、細胞含有培地を保持し、細胞を培養するための培養槽と、培養成分透過部材の他方の面を覆う、培地を保持するための培地保持槽と、を備える、細胞培養器を用意することと、培養槽中で細胞を培養又は誘導することと、を含む、細胞の培養又は誘導方法が提供される。
- [0060] 上記の方法において、誘導が、リプログラミング、初期化、分化転換、分化誘導及び細胞の運命変更の少なくともいずれかを含んでいてもよい。
- [0061] 上記の方法において、細胞培養器の内部が外部から閉鎖されていてもよい。
- [0062] 上記の方法において、細胞培養器内の培地のpHが所定の範囲内に保たれてもよい。
- [0063] 上記の方法において、培養が浮遊培養であってもよい。
- [0064] 上記の方法において、細胞が幹細胞であってもよい。
- [0065] 上記の方法において、細胞が体細胞であってもよい。

- [0066] 上記の方法において、細胞が、血液系細胞、神経系細胞、心筋系細胞、上皮系細胞、間葉系細胞、肝細胞、インスリン産生細胞、網膜色素上皮細胞、及び角膜細胞から選択される少なくとも一つであってもよい。
- [0067] 上記の方法において、細胞が誘導因子を導入された細胞であってもよい。
- [0068] 上記の方法において、培養槽内の培地に誘導因子を添加し、培養槽内で培養されている細胞に誘導因子を導入してもよい。
- [0069] 上記の方法において、細胞が別種の細胞に誘導されてもよい。
- [0070] 上記の方法において、細胞培養器が、培養成分透過部材の培養槽側の面に重ねられた、開口が設けられた培養側プレートをさらに備えていてもよい。
- [0071] 上記の方法において、細胞培養器が、培養成分透過部材の培地保持槽側の面に重ねられた、開口が設けられた培地側プレートをさらに備えていてもよい。
- [0072] 上記の方法において、培養側プレートが濃色であってもよい。
- [0073] 上記の方法が、培養側プレートの開口が設けられていない部分を背景にして細胞又は細胞からなる細胞塊を観察することをさらに含んでいてもよい。
- [0074] 上記の方法が、培養側プレートの開口が設けられていない部分を背景にして細胞又は細胞からなる細胞塊を撮影することをさらに含んでいてもよい。
- [0075] 上記の方法が、培地保持槽の培地を補充又は置換することをさらに含んでいてもよい。

発明の効果

- [0076] 本発明によれば、細胞を効率よく簡便に培養又は誘導可能な方法を提供可能である。

図面の簡単な説明

- [0077] [図1]実施形態に係る細胞培養器の分解斜視図である。
[図2]実施形態に係る細胞培養器の斜視図である。
[図3]実施形態に係る細胞培養器の一部の正面図である。
[図4]実施形態に係る細胞培養器の一部の斜視図である。
[図5]実施形態に係る細胞培養器の一部の正面図である。

[図6]実施形態に係る細胞培養器の背面図である。

[図7]実施形態に係る細胞培養器の分解斜視図である。

[図8]実施例1に係る培養方法で培養された細胞の光学顕微鏡写真である。

[図9]実施例1に係る培養方法で培養された細胞をフローサイトメトリーで分析した結果を示すヒストグラムである。

[図10]図10(a)は、実施例2に係る培養方法で使用されたチューブの写真である。図10(b)は、実施例2に係る培養方法で培養された細胞の光学顕微鏡写真である。

[図11]実施例2に係る培養方法で培養された細胞をフローサイトメトリーで分析した結果を示すヒストグラムである。

[図12]実施例3に係る培養方法で培養された細胞の光学顕微鏡写真である。

[図13]実施例3に係る培養方法で培養された細胞をフローサイトメトリーで分析した結果を示すヒストグラムである。

[図14]実施例4に係る人工多能性幹細胞の作製方法で使用されたフラスコの写真である。

[図15]実施例4に係る人工多能性幹細胞の作製方法で作製された細胞の光学顕微鏡写真である。

[図16]実施例4に係る人工多能性幹細胞の作製方法で作製された細胞のコロニー数をコロニーの形態ごとに示すグラフである。

[図17]実施例4に係る人工多能性幹細胞の作製方法で作製された細胞をフローサイトメトリーで分析した結果を示すヒストグラムである。

[図18]実施例5に係る人工多能性幹細胞の作製方法で作製された細胞の光学顕微鏡写真である。

[図19]実施例5に係る人工多能性幹細胞の作製方法で作製された細胞をフローサイトメトリーで分析した結果を示すヒストグラムである。

[図20]実施例6に係る細胞培養器の分解斜視図である。

[図21]実施例6に係る細胞培養器の斜視図である。

[図22]実施例6に係る細胞塊の顕微鏡写真である。

[図23]実施例6に係るiPS細胞のフローサイトメトリーの結果を示すヒストグラムである。

[図24]実施例7に係る細胞塊の顕微鏡写真である。

[図25]実施例7に係るiPS細胞のフローサイトメトリーの結果を示すヒストグラムである。

[図26]実施例8に係る細胞塊の顕微鏡写真である。

[図27]実施例8に係るiPS細胞のフローサイトメトリーの結果を示すヒストグラムである。

発明を実施するための形態

- [0078] 実施形態に係る細胞の培養方法は、閉鎖系内で細胞を培養することを含む。閉鎖系とは、例えば、完全に閉鎖された系であり、閉鎖系内と外部との間でガスの交換が生じない。閉鎖系は、例えば密閉されており、閉鎖系内に外気が進入しない。例えば、閉鎖系内に閉鎖系外の細胞、微生物、ウイルス、及び塵が進入しない。例えば、閉鎖系内の物質が閉鎖系外に流出しない。
- [0079] 細胞は、閉鎖系内の液体培地中で培養されてもよいし、ゲル培地中で培養されてもよい。また、細胞は、閉鎖系内で接着培養されてもよいし、浮遊培養されてもよい。閉鎖系内で細胞を培養している間、培地は攪拌されてもよいし、攪拌されなくともよい。細胞を接着培養する際には、フィーダー細胞を用いてもよいし、フィーダー細胞を用いなくともよい。細胞を浮遊培養する際には、フィーダー細胞を用いなくともよい。
- [0080] 閉鎖系内で培養される細胞は、ヒトを含む動物細胞であってもよいし、昆虫細胞であってもよいし、植物細胞であってもよい。
- [0081] 閉鎖系内で培養される細胞は、例えば体細胞であってもよいし、分化細胞であってもよいし、未分化細胞であってもよいし、幹細胞であってもよい。閉鎖系内で培養される細胞は、特に限定されないが、例えば、血液系細胞、神経系細胞、心筋系細胞、上皮系細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞、線維芽細胞、肝細胞、インスリン産生細胞、網膜色素上皮細胞、及び角膜細胞であってもよい。

- [0082] 血液系細胞は、T細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞、メガカリオサイト、マクロファージ、顆粒球、好中球、好酸球、造血幹細胞、血液幹・前駆細胞、赤血球、白血球及び血小板等の血液細胞であってもよい。神経系細胞は、神経細胞及びグリア細胞、オリゴデンドロサイト、神経幹細胞であってもよい。心筋系細胞は、心筋幹細胞及び心筋細胞、ペースメーカー細胞であってもよい。上皮系細胞は、ケラチノサイト、腸管上皮細胞、口腔上皮、角膜上皮細胞上皮細胞であってもよい。間葉系細胞は、真皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、及び軟骨細胞等であってもよい。
- [0083] 幹細胞は、例えば、人工多能性幹（iPS）細胞、胚性幹細胞（ES細胞）及び体性幹細胞である。体性幹細胞は、間葉系幹細胞であってもよい。細胞が幹細胞である場合、幹細胞は、培地中で、未分化の状態を維持し、多能性を維持したまま増殖する。
- [0084] 例えば、幹細胞は、浮遊培養される前に、シングルセル又は細胞塊に分解され、シングルセル又は細胞塊に分解された幹細胞が、培地に入れられる。シングルセル又は細胞塊は、クローナリティを保ったまま増殖し、培地中でコロニーを形成する。
- [0085] 幹細胞は、例えば、幹細胞用培地中で培養される。幹細胞用培地としては、例えば、mTeSR1（登録商標、STEMCELL TECHNOLOGIES）等のヒトES/iPS培地を使用可能である。
- [0086] ただし、幹細胞用培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えば、20%KnockOut SR（登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC）、GlutaMAX（登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC）、及び非必須アミノ酸（NEAA）を含む培地を幹細胞培地として使用してもよい。あるいは、Primate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF（Reprocell）、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR（STEMCELL Technologies）、PluriSTEM（登録商標）Human E

S/iPS Medium (Merck)、NutriStem (登録商標) XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium (Stemgent)、PluriSTEM (登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03 (Ajinomoto)、ESC-Sure (登録商標) serum and feeder free medium for hESC/iPS (Applied StemCell)、及びL7 (登録商標) hPSC Culture System (LONZA)等を幹細胞培地として使用してもよい。

[0087] 閉鎖系内の培地は、閉鎖系内で培養される細胞の種類に応じて、適宜選択される。例えば、細胞が血液系細胞である場合、血液系細胞に適した培地が閉鎖系に入れられる。例えば、細胞が間葉系細胞である場合、間葉系細胞に適した培地が閉鎖系に入れられる。

[0088] 培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF)等の成長因子を含まなくともよい。あるいは、培地は、bFGF等の成長因子を、 $400\mu\text{g}/\text{L}$ 以下、 $40\mu\text{g}/\text{L}$ 以下、あるいは $10\mu\text{g}/\text{L}$ 以下の低濃度で含んでもよい。

[0089] また、培地は、tgf- β を含まなくともよい。あるいは、培地は、tgf- β を $2\mu\text{g}/\text{L}$ ($2\text{ng}/\text{mL}$)以下、 $600\text{ng}/\text{L}$ 以下、 $300\text{ng}/\text{L}$ 以下、あるいは $100\text{ng}/\text{L}$ 以下の低濃度で含んでもよい。

[0090] 培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでもよい。

[0091] 培地がゲル培地である場合、ゲル培地は、例えば、培地に脱アシル化ジェランガムを終濃度が0.001重量%から0.5重量%、0.005重量%から0.1重量%、あるいは0.01重量%から0.05重量%となるよう添加することにより調製される。

[0092] ゲル培地は、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータン

ガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

[0093] あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

[0094] なお、本開示において、ゲル状の培地あるいはゲル培地とは、ポリマー培地を包含する。

[0095] 閉鎖系内で細胞を培養している間、閉鎖系内の培地の温度は、例えば、0℃以上、4℃以上、15℃以上、20℃以上、あるいは34℃以上に保たれる。また、閉鎖系内で細胞を培養している間、閉鎖系内の培地の温度は、例えば、45℃以下、39℃以下、あるいは20℃以下に保たれる。閉鎖系内で細胞を培養している間、ヒーター及びクーラー等の温度制御装置を用いて、閉鎖系内の培地の温度を制御してもよい。

[0096] 閉鎖系に入れられる培地のpHは、例えば、4.0以上、5.0以上、6.0以上、7.0以上、あるいは8.0以上である。また、閉鎖系に入れられる培地のpHは、例えば、10.0以下、9.0以下、8.8以下、あるいは8.0以下である。閉鎖系内に入れられた培地は、閉鎖系内に存在する

ことにより、細胞を培養している間、pHが上記範囲内に保たれる傾向にある。閉鎖系に入れられる培地のpHが7.0以上あるいは8.0以上であると、閉鎖系内で細胞を培養中に乳酸を中和してpHの低下を抑制するので、好ましい。

- [0097] 閉鎖系内で細胞を培養している間、閉鎖系内に二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガスの少なくともいずれか、あるいは全てを供給しなくともよい。また、閉鎖系内で細胞を培養している間、閉鎖系内の二酸化炭素濃度を制御しなくともよい。閉鎖系内で細胞を培養している間、閉鎖系外の二酸化炭素濃度を制御しなくともよい。例えば、閉鎖系を、二酸化炭素(CO₂)インキュベーター内に配置しなくともよい。ただし、閉鎖系を、二酸化炭素(CO₂)インキュベーター内に配置することは妨げられない。
- [0098] 閉鎖系内で細胞を培養する際には、閉鎖系内に空気層等のガス層がないか、少ないことが好ましい。そのため、閉鎖系内にはガス層が残らないか、少なくなるように、閉鎖系内に培地が充填されることが好ましい。
- [0099] 閉鎖系内で細胞を培養している間、培地は、外気に触れないように、閉鎖系内で循環させてもよい。閉鎖系内において、細胞懸濁液と、循環する培地との間に、半透膜を配置し、半透膜を介して、培地の有効成分を細胞懸濁液に浸透させてもよい。
- [0100] 閉鎖系内で、細胞は、例えば、3時間以上、1日以上、14日以上、あるいは30日以上培養される。ただし、継代、培地の交換、及び培地の追加の際には、閉鎖系は開放されてもよい。
- [0101] なお、細胞の播種と継代に間に、培地の交換及び追加を行わなくともよい。この場合、播種と継代の間では、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養される。播種と継代の間、例えば、1日以上、5日以上、あるいは10日以上、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養される。
- [0102] 細胞の継代と継代に間に、培地の交換及び追加を行わなくともよい。この場合、継代と継代の間では、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の

細胞は培養される。継代と継代の間、例えば、1日以上、5日以上、あるいは10日以上、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養される。

[0103] あるいは、細胞の播種と継代に間に、閉鎖系を開放し、培地の追加又は交換をしてもよい。また、細胞の継代と継代に間に、閉鎖系を開放し、培地の追加又は交換をしてもよい。培地の追加又は交換は、1日以上おき、2日以上おき、あるいは5日以上おきにしてもよい。培地に追加又は交換と継代のとき以外は、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養される。

[0104] また、実施形態に係る細胞の誘導方法は、閉鎖系内で細胞を誘導することを含む。閉鎖系は、上述したとおりである。誘導とは、リプログラミング、初期化、分化転換(Transdifferentiation or Lineage reprogramming)、分化誘導及び細胞の運命変更(Cell fate reprogramming)等を指す。

[0105] 閉鎖系内で誘導される細胞は、予め閉鎖系外で誘導因子を導入された細胞であってもよい。あるいは、閉鎖系内の培地に誘導因子を添加し、閉鎖系内で培養されている誘導因子を導入されていない細胞に誘導因子を導入して、閉鎖系内で細胞を誘導してもよい。

[0106] 閉鎖系内で誘導される細胞は、動物細胞であってもよいし、植物細胞であってもよい。

[0107] 細胞は、閉鎖系内の液体培地中で誘導されてもよいし、閉鎖系内のゲル培地中で誘導されてもよい。また、細胞は、閉鎖系内で接着培養されながら誘導されてもよいし、浮遊培養されながら誘導されてもよい。閉鎖系内で細胞を誘導している間、培地は攪拌されてもよいし、攪拌されなくともよい。細胞を接着培養しながら誘導する際には、フィーダー細胞を用いてもよいし、フィーダー細胞を用いなくともよい。細胞を浮遊培養しながら誘導する際には、フィーダー細胞を用いなくともよい。

[0108] 閉鎖系内で細胞は、iPS細胞等の幹細胞に誘導されてもよい。閉鎖系内で細胞は、幹細胞以外の別種の細胞に誘導されてもよい。閉鎖系内でiPS

細胞及びES細胞等の幹細胞が、別種の細胞に誘導されてもよい。

[0109] 閉鎖系内でiPS細胞に誘導される細胞は、血液細胞等の血液系細胞であってもよい。あるいは、閉鎖系内でiPS細胞に誘導される細胞は、繊維芽細胞、髄幹細胞、ケラチノサイト、毛乳頭細胞、口腔上皮細胞、及び体性幹前駆細胞等であってもよい。閉鎖系内で細胞は、例えば、血液系細胞、神経系細胞、心筋系細胞、上皮系細胞、間葉系細胞、肝細胞、インスリン産生細胞、網膜色素上皮細胞、及び角膜細胞に誘導されてもよい。

[0110] 血液細胞は、血液から分離される。血液は、例えば末梢血及び臍帯血であるが、これらに限定されない。血液は、成年から採取されてもよいし、未成年から採取されてもよい。採血の際には、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液A液(ACD-A)液等の抗凝固剤を用いる。

[0111] 血液細胞は、例えば、単核球細胞(Mononuclear cell)、好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージ、血液幹・前駆細胞、及び血管内皮細胞等の有核細胞であり、赤血球、及び血小板を含まない。血液細胞は、例えば血管内皮前駆細胞、血液幹・前駆細胞、T細胞、又はB細胞であってもよい。T細胞は、例えば $\alpha\beta$ T細胞である。

[0112] 単核球細胞は、血液細胞の分離用媒体、及び遠心分離装置等を用いて、血液から分離される。血液細胞の分離用媒体としてFicoll(GEヘルスケア)を使用する場合の、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

[0113] 低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を4℃から42℃好ましくは18℃に設定する。成年又は未成年のヒトから10 μ Lから50mLの血液を採血し、血液が固まらないように血液にEDTAを含むキレート剤を加えて優しく混ぜる。また、ヒトリンパ球分離用の媒体(Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケアジャパン)を5mLずつ2本の15mLチューブに分注する。5mLの血液に対して5mLのPBSを加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に5mLずつ重層する。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブ

の管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上に加える。

[0114] チューブ中の溶液を、 $10\times g$ から $1000\times g$ 、好ましくは $400\times g$ で、 4°C から 42°C 好ましくは 18°C で5分から2時間、好ましくは30分間遠心する。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れる。この白く濁った中間層は、単核球細胞を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい15 mLチューブに移す。この際、下層は吸い取らないようにする。白く濁った中間層は、1本のチューブより1 mL程度回収できる。2本分の中間層をまとめて1本のチューブに移す。

[0115] 回収した単核球細胞に対し、1 mLから48 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、溶液をさらに $10\times g$ から $1000\times g$ 、好ましくは $200\times g$ 、 4°C から 42°C 、好ましくは 18°C で1分から60分、好ましくは10分間遠心する。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、1 mLから12 mL、好ましくは3 mLの既知組成無血清造血細胞培地（X-VIVO（登録商標）10、ロンザ）を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち $10\mu\text{L}$ の単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。

[0116] 採血管としてバキュティナ（登録商標、BD）を使用する場合の、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

[0117] 低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を 4°C から 42°C 、好ましくは 18°C に設定する。成年又は未成年のヒトから、採血管（バキュティナ（登録商標）、BD）を用いて8 mL採血し、転倒混和して抗凝固剤と混和する。その後、バランスを調整し、溶液を 4°C から 42°C 、好ましくは 18°C 、 $100\times g$ から $3000\times g$ 、好ましくは $1500\times g$ から $1800\times g$ でスイングロータで1分から60分、好ましくは20分間遠心する。遠心後、血漿層である上層を取り除き、ピペティングして単核球層とゲルに張り付いている血球を懸濁して懸濁液を得る。得られた懸濁液を、別の15 mLチューブに移す。

- [0118] 15 mLチューブの懸濁液に1 mLから14 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、懸濁液を4°Cから42°C、好ましくは18°C、100×gから3000×g、好ましくは200×gで1分から60分、好ましくは5分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去する。また、溶血剤（PharmLyse（登録商標）、10倍濃度、BD）を滅菌水で1倍濃度に希釈する。15 mLチューブ中のペレットをタッピングでほぐし、1 mLから14 mL、好ましくは1 mLの溶血剤を加える。その後、室温で遮光し、1分から60分間、好ましくは1分間溶液を静置する。
- [0119] 次に、15 mLチューブに1 mLから14 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、4°Cから42°C、好ましくは室温で、100×gから3000×g、好ましくは200×gで1分から60分、5分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去し、1 mLから15 mL、好ましくは3 mLの既知組成無血清造血細胞培地（X-VIVO（登録商標）10、ロンザ）を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち10 μLの単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。
- [0120] 血液から単核球細胞を分離する方法は、上記の方法に限られず、例えば、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、全血単核球濃縮用ピュアセルセレクトシステム（登録商標、PALL）、血球細胞除去用浄化器（セルソーバE、登録商標、旭化成）、及び血小板製剤用白血球除去フィルター（セパセルPL、登録商標、PLX-5B-SCD、旭化成）等のフィルターも使用可能である。
- [0121] 単核球細胞は、赤血球を重力沈降又は遠心分離することにより有核細胞を分離することが可能な赤血球沈降剤を用いて分離されてもよい。赤血球沈降剤の例としては、HetaSep（登録商標、STEMCELL Technologies）及びHES40（NIPRO）が挙げられる。
- [0122] また、単核球細胞としては、Cellular Technology Limited社から販売されているCTL-UP1や、Sanguine Biosciences社のPBMC-001等を使用してもよい。

- [0123] あるいは、血液細胞としては、セルバンカー 1、ステムセルバンカー GMP グレード、及びステムセルバンカー DMSO フリー GMP グレード（ゼノアック）等の細胞凍結保存液を用いて凍結保存された血液細胞を解凍して用いてもよい。
- [0124] 単核球細胞を解凍する際には、まず、15 mL チューブに 1 mL から 15 mL、好ましくは 8 mL の既知組成無血清造血細胞培地（X-VIVO（登録商標）10、ロンザ）を入れておき、凍結した単核球細胞の入ったチューブを 4℃ から 42℃、好ましくは 37℃ の温浴槽に入れて、単核球細胞を溶かし始める。その後、少し氷が残っている状態で、単核球細胞の入ったチューブを温浴槽から引きあげ、単核球細胞を既知組成無血清造血細胞培地の入ったチューブに移す。そのうち 10 μ L の単核球細胞懸濁液をトリパンプルで染色して血球計算盤でカウントする。
- [0125] 血液細胞は、細胞表面マーカーに基づいて分離されてもよい。血液幹・前駆細胞は、CD34 が陽性である。T 細胞は、CD3、CD4、CD8 のいずれかが陽性である。B 細胞は、CD10、CD19、CD20 のいずれかが陽性である。血液幹・前駆細胞、T 細胞、又は B 細胞は、例えば、自動磁気細胞分離装置及び免疫磁気ビーズを用いて、血液細胞から分離される。あるいは、予め分離された単核球細胞を用意してもよい。ただし、細胞表面マーカーに基づいて分離されていない血液細胞を用いてもよい。
- [0126] CD34 陽性細胞は、幹・前駆細胞であり、リプログラミングされやすい傾向にある。また、CD3 陽性細胞である T 細胞を用いて iPS 細胞を作製すると、T 細胞由来の iPS 細胞は TCR リコンビネーションの型を保持しているので、T 細胞に効率的に分化誘導できる傾向にある。
- [0127] 接着培養されている細胞に、誘導因子を導入する。あるいは、ゲル培地で浮遊培養されている細胞に、誘導因子を導入する。誘導因子は RNA であってもよい。誘導因子は、センダイウイルスに含まれていてもよい。あるいは、誘導因子は、トランスフェクションにより細胞に導入されてもよい。誘導因子は DNA であってもよい。誘導因子は、プラスミドに含まれていてもよ

い。

- [0128] 誘導因子は、例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、及びレトロウイルスに含まれていてもよい。
- [0129] 誘導因子はタンパク質であってもよい。
- [0130] センダイウイルスとしては、Cyt oTune（登録商標、Invitrogen）が使用可能である。センダイウイルスの力価（タイター）の指標としては、感染多重度（MOI）が挙げられる。センダイウイルスのMOIは、例えば、0.1から100.0、あるいは1.0から50.0である。
- [0131] 細胞を幹細胞に誘導する場合、例えば細胞に導入される誘導因子は、OCT3/4のmRNA、SOX2のmRNA、KLF4のmRNA、及びc-MYCのmRNAを含む。誘導因子として、OCT4を改良したM₃Oを使用してもよい。また、誘導因子は、LIN28A、FOXH1、LIN28B、GLIS1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANOG、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、E-RAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOXD3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、TH2B、及びP53DDからなる群から選択される少なくとも一つの因子のmRNAをさらに含んでもよい。これらのmRNAは、TriLinkから入手可能である。
- [0132] 誘導因子に含まれるmRNAは、プソイドウリジン（Ψ）、5-メチルシトシン（m⁵C）、5-メチルウリジン（5meU又はm⁵U）、N1-メチルシュードウリジン（me1Ψ）、5-メトキシウリジン（5moU）、5-ヒドロキシメチルウリジン（5hmU）、5-フォーミルウリジン（5fU）、5-カルボキシメチルエステルウリジン（5camU）、チエノグアノシン（thG）、N4-メチルシチジン（me⁴C）、5-メチルシチジン（m⁵C）、5-メチオキシチジン（5moC）、5-ヒドロキシメチルシチ

ジン (5 h m C)、5-ヒドロキシシチジン (5 h o C)、5-フォルムシチジン (5 f C)、5-カルボキシシチジン (5 c a C)、N⁶-メチル-2-アミノアデノシン (m⁶ D A P)、ジアミノプリン (D A P)、2'-O-メチルウリジン (U m 又は m^{2'}-O U)、2-チオウリジン (s² U)、及び N⁶-メチルアデノシン (m⁶ A) からなる群から選択される少なくとも1つで修飾されていてもよい。

[0133] シトシンは5-メチルシトシン (m⁵ C) で置換されてもよい。ウラシルはシュードウラシルで置換されてもよい。

[0134] 誘導因子に含まれるmRNAは、ポリアデニル化されていてもよい。

[0135] 誘導因子に含まれるmRNAは、インビトロで転写される (I V T) R N A のポリアデニル化によって調製されてもよい。mRNAは、ポリ (A) 末端をコードするDNAテンプレートを用いることによって、I V T の間にポリアデニル化されてもよい。mRNAがキャッピングされてもよい。細胞における発現の効率性を最大化するために、大部分のmRNA分子がキャップを含有することが好ましい。mRNAは5' c a p [m 7 G (5') p p p (5') G] 構造を有していてもよい。当該配列はmRNAを安定化させ、転写を促進させる配列である。5' t r i p h o s p h a t e をもつmRNAからは、脱リン酸化処理により5' t r i p h o s p h a t e を取り除いてもよい。mRNAはA n t i - R e v e r s e C a p A n a l o g (A R C A) として [3' O - M e - m 7 G (5') p p p (5') G] を有していてもよい。A R C A は転写開始点より前に挿入される配列であり、転写されるmRNAの効率は二倍となる。mRNAはP o l y A テールを有していてもよい。

[0136] 誘導因子に含まれるmRNAは、リボヌクレアーゼ I I I (R N a s e I I I) で処理されていてもよい。

[0137] また、誘導因子に含まれるmRNAは、自己増殖能を持つリプリケイティブRNAであってもよい。リプリケイティブRNAとは、自己増殖能を持つRNAであり、通常のRNAと異なり、RNAの複製に必要なタンパク質を

発現させる能力を併せ持っている。リプリケイティブRNAはアルファウイルスの一種であるベネズエラ馬脳炎（VEE）ウイルス由来である。リプリケイティブRNAを細胞にトランスフェクションすると、リプログラミング因子を作り続けるRNAを細胞に発現させることができるため、誘導因子RNAを細胞に複数回導入することを省くことが可能となる。

[0138] リプリケイティブRNAの配列は、アルファウイルスレプリコンRNA、東部ウマ脳炎ウイルス（EEE）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEE）、エバーグレーズ（Everglades）ウイルス、ムカンボ（Mucambo）ウイルス、ピクスナ（Pixuna）ウイルス、及び西部ウマ脳炎ウイルス（WEE）からなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでよい。

[0139] また、リプリケイティブRNAは、シンドビス（Sindbis）ウイルス、セムリキ森林（Semliki Forest）ウイルス、ミデルブルグ（Middelburg）ウイルス、チクングニア（Chikungunya）ウイルス、オニヨンニヨン（O'nyong-nyong）ウイルス、ロスリバー（Ross River）ウイルス、バーマフォレスト（Barmah Forest）ウイルス、ゲタ（Getah）ウイルス、サギヤマ（Sagiyama）ウイルス、ベバル（Bebaru）ウイルス、マヤロ（Mayaro）ウイルス、ウナ（Una）ウイルス、アウラ（Aura）ウイルス、ワタロア（Whataroa）ウイルス、ババンキ（Babanki）ウイルス、Kyzylagachウイルス、ハイランドJ（Highlands J）ウイルス、フォートモーガン（Fort Morgan）ウイルス、ヌドゥム（Ndumu）ウイルス、及びバギークリーク（Buggy Creek）ウイルスからなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでよい。

[0140] リプリケイティブRNAは、例えば、5' から3' に向かって、（VEE RNAレプリカーゼ）－（プロモーター）－（RF1）－（自己切断型ペプチド）－（RF2）－（自己切断型ペプチド）－（RF3）－（IRES

もしくはコアプロモーター) - (RF4) - (IRESもしくは任意のプロモーター) - (任意に選択可能なマーカー) - (VEE 3' UTR及びポリAテール) - (任意に選択可能なマーカー) - プロモーターを含んでいる。上記のRF1-4は、多能性細胞への細胞の脱分化を誘導する因子である。上記のRF2-3、RF3-4、RF4は任意である。上記のRF1-4は、OCT-4、KLF4、SOX-2、c-MYC、LIN28A、LIN28B、GLIS1、FOXH1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANOG、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、E-RAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOXD3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、及びTH2Bからなる群から選択されてもよい。

[0141] 誘導因を導入される細胞が培養される培地は、誘導因を導入される細胞の種類に応じて適宜選択される。また、誘導因を導入された細胞が培養される培地は、誘導因を導入された細胞の種類に応じて適宜選択される。

[0142] 上述したように、培地は、例えば、bFGF等の成長因子を含まなくてもよいし、あるいは、成長因子を低濃度で含んでもよい。また、培地は、tgf- β を含まないか、tgf- β を低濃度で含んでもよい。培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでもよい。

[0143] 培地がゲル培地である場合、培地は、上述したように少なくとも1種の高分子化合物を含んでもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでもよい。あるいは、ゲル培地は、上述したように、温度感受性ゲルを含んでもよい。

[0144] 閉鎖系内で細胞を誘導している間、閉鎖系内の培地の温度は、例えば、上述した閉鎖系内で細胞を培養している間の温度と同様である。

- [0145] 細胞が誘導される閉鎖系に入れられる培地のpHは、例えば、上述した細胞が培養される閉鎖系に入れられる培地のpHと同様である。
- [0146] 閉鎖系内で細胞を誘導している間、閉鎖系内に二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガスの少なくともいずれか、あるいは全てを供給しなくともよい。また、閉鎖系内で細胞を誘導している間、閉鎖系内の二酸化炭素濃度を制御しなくともよい。閉鎖系内で細胞を誘導している間、閉鎖系外の二酸化炭素濃度を制御しなくともよい。例えば、閉鎖系を、二酸化炭素(CO₂)インキュベーター内に配置しなくともよい。ただし、閉鎖系を、二酸化炭素(CO₂)インキュベーター内に配置することは妨げられない。
- [0147] 閉鎖系内で細胞を誘導する際には、閉鎖系内に空気層等のガス層がないか、少ないことが好ましい。そのため、閉鎖系内にはガス層が残らないか、少なくなるように、閉鎖系内に培地が充填されることが好ましい。
- [0148] 閉鎖系内で細胞を誘導している間、培地は、外気に触れないように、閉鎖系内で循環させてもよい。閉鎖系内において、細胞懸濁液と、循環する培地との間に、半透膜を配置し、半透膜を介して、培地の有効成分を細胞懸濁液に浸透させてもよい。
- [0149] 閉鎖系内で、細胞は、例えば、1日以上、14日以上、あるいは30日以上培養されながら誘導される。ただし、継代、培地の交換、及び培地の追加の際には、閉鎖系は開放されてもよい。
- [0150] なお、細胞の播種と継代に間に、培地の交換及び追加を行わなくともよい。この場合、播種と継代の間では、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養されながら誘導される。播種と継代の間、例えば、1日以上、5日以上、あるいは10日以上、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養されながら誘導される。
- [0151] 細胞の継代と継代に間に、培地の交換及び追加を行わなくともよい。この場合、継代と継代の間では、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養されながら誘導される。継代と継代の間、例えば、1日以上、5日以上、あるいは10日以上、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内

の細胞は培養されながら誘導される。

[0152] あるいは、細胞の播種と継代に間に、閉鎖系を開放し、培地の追加又は交換をしてもよい。また、細胞の継代と継代に間に、閉鎖系を開放し、培地の追加又は交換をしてもよい。培地の追加又は交換は、1日以上おき、2日以上おき、あるいは5日以上おきにしてもよい。培地に追加又は交換と継代のとき以外は、閉鎖系が全く開放されることなく、閉鎖系内の細胞は培養されながら誘導される。

[0153] 誘導因子を導入された細胞がiPS細胞に誘導（リプログラミング）されたか否かは、例えば、細胞の形態から確認することができる。あるいは、細胞がiPS細胞に誘導されたか否かは、サイトフローメータで、未分化であることを示す細胞表面マーカーであるTRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-1、及びSSEA5から選択される少なくとも一つの表面マーカーが陽性であるか否かを分析することにより行うことができる。TRA-1-60は、iPS/ES細胞に特異的な抗原であり、分化細胞では検出されない。iPS細胞はTRA-1-60陽性画分からのみできることから、TRA-1-60陽性細胞はiPS細胞の種と考えられる。

[0154] 実施形態に係る内部で細胞を培養又は誘導するための閉鎖系は、例えば、図1に示すような細胞培養器を備えていてもよい。細胞培養器は、培養成分が透過可能な培養成分透過部材10と、培養成分透過部材10の一方の面を覆う、細胞含有培地を保持し、細胞を培養するための培養槽30と、培養成分透過部材10の他方の面を覆う、培地を保持するための培地保持槽40と、を備える。培養槽30内の細胞含有培地は、培養成分透過部材10に接触可能である。また、培地保持槽40内の培地は、培養成分透過部材10に接触可能である。培地保持槽40内の培地は、細胞を含有していない。

[0155] 培養成分透過部材10は、培地保持槽40内の培地の有効成分を、培養槽30内の細胞含有培地中に透過させる。また、培養成分透過部材10は、培養槽30内の細胞含有培地中の老廃物を、培地保持槽40内の培地中に透過させてもよい。培養成分透過部材10としては、例えば、半透膜及びメッシ

ユが使用可能である。半透膜は、透析膜を含む。

[0156] 培養成分透過部材10が半透膜である場合、半透膜の分画分子量は、例えば、0.1kDa以上、10kDa以上、あるいは50kDa以上である。半透膜は、例えば、セルロースエステル、エチルセルロース、セルロースエステル類、再生セルロース、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリメチルメタクリレート、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエステル系ポリマーアロイ、ポリカーボネート、ポリアミド、セルロースアセテート、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、銅アンモニウムレヨン、鹼化セルロース、ヘモファン膜、フォスファチジルコリン膜、及びビタミンEコーティング膜等からなる。

[0157] 培養成分透過部材10がメッシュである場合、メッシュは、培養槽30内で培養される細胞又は細胞塊よりも小さい孔を有する。これにより、培養槽30内の細胞又は細胞塊が培地保持槽40内に移動することが妨げられる。メッシュの材料は、例えば樹脂及び金属であるが、特に限定されない。培養成分透過部材10の表面は、細胞非接着性であってもよい。

[0158] 実施形態に係る細胞培養器は、培養成分透過部材10を挟む、それぞれ開口が設けられた培養側プレート21及び培地側プレート22と、をさらに備えていてもよい。培養側プレート21及び培地側プレート22は、培養槽30内の細胞含有培地及び培地保持槽40内の培地の圧力により、培養成分透過部材10が変動することを抑制するよう、培養成分透過部材10を挟み込むようにして、培養成分透過部材10を保持する。これにより、圧力変動により、培養成分透過部材10が培養槽30あるいは培地保持槽40の内壁に接触することが抑制される。培養側プレート21及び培地側プレート22は、培養槽30内の細胞含有培地及び培地保持槽40内の培地から受ける圧力で変動しない硬さを有する。培養側プレート21及び培地側プレート22の材料は、例えば樹脂及び金属であるが、特に限定されない。培養側プレート21の表面は、細胞非接着性であってもよい。なお、培養成分透過部材10が培養槽30内の細胞含有培地及び培地保持槽40内の培地から受ける圧力

により変動しない場合、培養側プレート 21 及び培地側プレート 22 は省略されてもよい。

[0159] 培養側プレート 21 には、培養槽 30 内の細胞含有培地が培養成分透過部材 10 に接することができるよう、開口が設けられている。また、培地側プレート 22 には、培地保持槽 40 内の培地が培養成分透過部材 10 に接することができるよう、開口が設けられている。培養側プレート 21 の開口を介して、培養槽 30 内の細胞含有培地の成分及び培地保持槽 40 内の培地の成分が培養成分透過部材 10 を透過可能である。培養側プレート 21 及び培地側プレート 22 のそれぞれに設けられた開口の形状は、例えば円であるが、特に限定されない。培養側プレート 21 及び培地側プレート 22 のそれぞれに設けられた開口は、培養成分透過部材 10 が変動することを抑制できる範囲内の大きさを有する。開口は、例えば、格子状に、あるいはランダムに、培養側プレート 21 及び培地側プレート 22 のそれぞれに設けられる。

[0160] 培養側プレート 21 は、例えば黒色等の濃色を有していてもよい。培養側プレート 21 が濃色を有していると、培養側プレート 21 を背景として、細胞含有培地中の細胞を高いコントラストで視認したり、画像化したりすることが可能である。培養側プレート 21 の開口が設けられていない部分の面積等の大きさが、細胞あるいは細胞塊よりも大きいと、培養側プレート 21 の開口が設けられていない部分を背景として細胞あるいは細胞塊を高いコントラストで視認したり、画像化したりすることが容易になる。ただし、細胞あるいは細胞塊に照射する光を調整することにより、培養成分透過部材 10 や培養側プレート 21 が透明であっても、細胞あるいは細胞塊を視認したり、画像化したりすることも可能である。

[0161] 培養槽 30 と、培地保持槽 40 と、は、ネジ、ピンあるいは電磁石等で固定されてもよい。培養槽 30 の接触部と、培養側プレート 21 の一方の面の少なくとも一部と、が密着する。培養側プレート 21 の他方の面の少なくとも一部と、培養成分透過部材 10 の一方の面の少なくとも一部と、が密着する。培養成分透過部材 10 の他方の面の少なくとも一部と、培地側プレート

22の一方の面の少なくとも一部と、が密着する。培地側プレート22の他方の面の少なくとも一部と、培地保持槽40の接触部と、が密着する。密着させる際には、適宜、パッキン等を使用してもよい。パッキンは、例えば、培養成分透過部材10と培養槽30の間に配置されてもよい。パッキンは、培養成分透過部材10の外周と培養槽30の間に配置されてもよい。培養成分透過部材10と培養槽30の間に配置されるパッキンの外径は、培養成分透過部材10の外径より大きくてもよい。また、パッキンは、例えば、培養成分透過部材10と培地保持槽40の間に配置されてもよい。パッキンは、培養成分透過部材10の外周と培地保持槽40の間に配置されてもよい。培養成分透過部材10と培地保持槽40の間に配置されるパッキンの外径は、培養成分透過部材10の外径より大きくてもよい。

[0162] 培養槽30は、例えば、筐体31及び筐体31を覆うカバー32を備える。筐体31及びカバー32は一体化していてもよい。培養槽30の内壁には、細胞が接着しないよう、poly-HEMA (poly 2-hydroxyethyl methacrylate) 等の細胞非接着性物質をコーティングして、培養槽30の内壁を細胞非接着性にしてもよい。筐体31には、培養側プレート21の開口を介して培養成分透過部材10を露出させるための開口131が設けられている。図2に示すように、培養槽30のカバー32には、培養槽30内の細胞含有培地を観察可能な窓132が設けられている。窓132の材料としては、例えば、ガラス及び樹脂が使用可能である。

[0163] 実施形態に係る細胞培養器は、窓132を加熱及び冷却するための、温度調節部を備えていてもよい。温度調節部は、窓132に配置され、窓を加熱する透明導電膜等の透明ヒーターであってもよい。あるいは、実施形態に係る細胞培養器は、培養槽30の筐体31又はカバー32を加熱及び冷却するための温度調節部を備えていてもよい。筐体31、カバー32、及び窓132のいずれかを温度調節部で温度調節することにより、培養槽30内の細胞含有培地を温度調節することが可能である。実施形態に係る細胞培養器は、

培養槽 30 内の細胞含有培地の温度を測る温度計をさらに備えていてもよい。温度計は、細胞含有培地に接触することなく培養槽 30 の温度に基づいて細胞含有培地の温度を測ってもよいし、細胞含有培地に接触して細胞含有培地の温度を直接測ってもよい。この場合、細胞含有培地の温度が所定の温度となるよう、温度調節部がフィードバック制御されてもよい。

[0164] 図 1 に示すように、培養槽 30 には、培養槽 30 内に流体を供給するための供給口 231 と、培養槽 30 内の流体を排出するための排出口 331 と、が、設けられている。例えば、供給口 231 に、流体を供給するためのバッグ、蛇腹及びシリンジ等の供給器を接続可能な図 2 に示すプラグ 33 が挿入される。供給器は、ポンプ等の流体機械であってもよい。ただし、図 1 に示す供給口 231 に、注入装置が直接接続されてもよい。供給器は供給口 231 に着脱可能であり、供給器が供給口 231 に接続されていない場合は、供給口 231 は密閉可能であり、供給口 231 を介した培養槽 30 内外の流体の交換が生じない。

[0165] プラグ 33 は、ニードルレスコネクターであってもよい。ニードルレスコネクターは、スプリットセプタム型であってもよいし、メカニカルバルブ型であってもよい。プラグ 33 がスプリットセプタム型のニードルレスコネクターである場合、プラグ 33 は、スリットが設けられたディスク弁を備える。培養槽 30 内に流体を供給する際には、ディスク弁のスリットに供給器あるいは供給器に接続された流路が挿入される。スリットに供給器あるいは供給器に接続された流路が挿入されていない場合、スリットは密閉する。スリットに供給器あるいは供給器に接続された流路が挿入された場合、ディスク弁は供給器あるいは供給器に接続された流路の外周に密着する。したがって、プラグ 33 に供給器あるいは供給器に接続された流路が挿入された場合も、プラグ 33 を介して外気が培養槽 30 内に進入しない。ただし、プラグ 33 は、針が刺入されるコネクターであってもよい。

[0166] また、例えば、排出口 331 に、培養槽 30 内の流体を排出するためのバッグ、蛇腹及びシリンジ等の排出器が接続可能な図 2 に示すプラグ 34 が挿

入される。排出器は、ポンプ等の流体機械であってもよい。ただし、図1に示す排出口331に、排出器が直接接続されてもよい。排出器は、能動的に培養槽30内の流体を吸引してもよい。あるいは、排出器は、培養槽30内の圧力に応じて受動的に内部容積を増加させ、培養槽30から押し出された流体を受容してもよい。排出器は排出口331に着脱可能であり、排出器が排出口331に接続されていない場合は、排出口331は密閉可能であり、排出口331を介した培養槽30内外の流体の交換が生じない。プラグ34は、ニードルレスコネクターであってもよい。ニードルレスコネクターは、スプリットセプタム型であってもよいし、メカニカルバルブ型であってもよい。プラグ34に排出器あるいは排出器に接続された流路が挿入された場合も、プラグ34を介して外気が培養槽30内に進入しない。ただし、プラグ34は、針が刺入されるコネクターであってもよい。

[0167] 例えば、培養槽30が、培養側プレート21、培養成分透過部材10、及び培地側プレート22を間に挟んで培地保持槽40に密着している状態であり、培養槽30内に空気が入っている場合、排出口331から培養槽30内の空気を排出しながら、供給口231から培養槽30内に細胞含有培地を注入することにより、図2に示す培養槽30内に細胞含有培地を入れることが可能である。また、培養槽30内の空気層を完全になくすことも可能である。ただし、培養槽30内に空気層が残っていてもよい。培養槽30内に既に細胞含有培地が入っている場合、図1に示す排出口331から培養槽30内の細胞含有培地を排出しながら、供給口231から培養槽30内に別の細胞含有培地を注入することにより、図2に示す培養槽30内の細胞含有培地の少なくとも一部を置換することが可能である。

[0168] 実施形態に係る細胞培養器は、培養槽30を保持可能であり、培養槽30の傾きを調整可能な培養槽保持部材をさらに備えていてもよい。培養槽30の傾きを調整することにより、培養槽30内の空気等のガスを排出することが容易になる。

[0169] 培養槽30の供給口231及び排出口331は、栓等により閉塞可能であ

る。あるいは、培養槽 30 の供給口 231 及び排出口 331 にそれぞれ接続されるプラグ 33 及びプラグ 34 が閉塞可能である。また、あるいは、培養槽 30 の供給口 231 は供給器に接続されることによって、外部から遮蔽され、培養槽 30 の排出口 331 は排出器に接続されることによって、外部から遮蔽されることが可能である。供給口 231 及び排出口 331 が閉塞され、図 2 に示すように培養槽 30 が培地保持槽 40 に密着させられた場合、培養槽 30 内は培養槽 30 外の空気から密閉される。これにより、培養槽 30 内に外気が進入することが抑制され、培養槽 30 内の細胞含有培地の pH の変化が抑制され、所定の範囲内に保たれる。なお、本発明者らの知見により、細胞は、完全に閉鎖された密閉空間で培養可能であるため、培養槽 30 内に、二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガス等を積極的に供給しなくともよい。そのため、培養槽 30 を CO₂ インキュベーター内に配置しなくともよい。また、密閉されている培養槽 30 内に、培養槽 30 外に存在する細胞、微生物、ウイルス、及び塵等が進入しないため、培養槽 30 内の清浄度が保たれる。そのため、培養槽 30 をクリーンルーム内に配置しなくともよい。培養槽 30 は、ガス非透過性物質で包埋されていてもよい。換言すれば、培養槽 30 は、ガス非透過性物質中に埋め込まれていてもよい。

[0170] 図 1 に示す培地保持槽 40 には、培地側プレート 22 の開口を介して培養成分透過部材 10 を露出させるための図 3 に示す開口 140 が設けられている。開口 140 は、図 1 に示す培養成分透過部材 10 で覆われる。また、図 3 に示す培地保持槽 40 には、培地保持槽 40 内に流体を導入するための導入口 240 と、培地保持槽 40 内の流体を排出するための排出口 340 が設けられている。さらに、培地保持槽 40 内には、複数の整流板 41 が配置されている。複数の整流板 41 は、例えば、培地保持槽 40 の対向する内壁から、交互に突出するように配置されている。

[0171] 例えば、培地保持槽 40 が、図 1 に示す培地側プレート 22、培養成分透過部材 10、及び培養側プレート 21 を間に挟んで培養槽 30 に密着している状態であり、培地保持槽 40 内に空気が入っている場合、図 3 に示す排出

口340から培地保持槽40内の空気を排出しながら、導入口240から培地保持槽40内に細胞培地を注入することにより、培地保持槽40内に細胞培地を入れることが可能である。また、培地保持槽40内に既に培地が入っている場合、排出口340から培地保持槽40内の細胞培地を排出しながら、導入口240から培地保持槽40内に細胞培地を注入することにより、培地保持槽40内に細胞培地を流すことが可能である。

[0172] 複数の整流板41が培地保持槽40内に配置されている場合、培地保持槽40内において、培地は、導入口240から排出口340に向かって、複数の整流板41に沿って流れる。そのため、培地の成分が、培養成分透過部材10に接触する機会が確保される。

[0173] あるいは、図4に示すように、培地保持槽40の内壁に、図3に示す導入口240に連通する1又は複数の吐出口241を設けてもよい。図4に示す複数の吐出口241は、例えば、横一列に設けられる。複数の吐出口241の数や、配列は、均等に配置されてもよいし、ランダムに配置されてもよい。複数の吐出口241の数や、配列は、培地の粘度等の特性に応じて設定される。図5に示すように、培地を複数の吐出口241から吐出することにより、培地保持槽40内において、培養成分透過部材10に接触する培地の均一性を向上することが可能である。

[0174] 培地保持槽40の内壁には、1又は複数の吐出口241が設けられた吐出ブロック145が挿入可能であってもよい。例えば、複数の吐出口241の数や配列等のパターンが異なる吐出ブロック145を用意して、培地や培養される細胞の特性に応じて使い分けてもよい。培地保持槽40の内壁の重力に対して上側は、上方又は下方に屈曲又は湾曲していてもよい。培地保持槽40の内壁の重力に対して下側は、上方又は下方に屈曲又は湾曲していてもよい。

[0175] 図4及び図5に示すように、培地保持槽40の内壁の複数の吐出口241近傍には、開口242が設けられていてもよい。複数の吐出口241から吐出された培地が培地保持槽40内に貯まるにつれて、培地保持槽40内の空

気が開口 242 から外部に流出する。培地を培地保持槽 40 に入れた後、開口 242 は密閉してもよい。

[0176] 図 3 に示すように、培地保持槽 40 の導入口 240 と排出口 340 は、培地流路 200 で接続され、培地保持槽 40 と、培地流路 200 と、の間を培地が循環可能であってもよい。培地流路 200 は、樹脂チューブやシリコンチューブ等を備えていてもよい。培地流路 200 は、ガス非透過性物質で包埋されていてもよい。換言すれば、培地流路 200 は、ガス非透過性物質中に埋め込まれていてもよい。例えば、培地流路 200 は、樹脂、ガラス、及び金属等からなる部材中に設けられた孔であってもよい。この場合、例えば、凹部が設けられた部材同士を貼りあわせることにより、培地流路 200 が形成される。培地流路 200 には、培地を培地保持槽 40 内に導入し、培地を培地保持槽 40 内から排出するための流体機械が設けられていてもよい。流体機械は、例えば、培地を培地保持槽 40 内に導入するための導入用流体機械 51 と、培地を培地保持槽 40 内から排出するための排出用流体機械 52 と、を備える。

[0177] 図 1 に示す導入用流体機械 51 及び排出用流体機械 52 としては、容積式ポンプが使用可能である。容積式ポンプの例としては、ピストンポンプ、プランジャーポンプ、及びダイヤフラムポンプを含む往復ポンプ、あるいは、ギアポンプ、ベーンポンプ、及びネジポンプを含む回転ポンプが挙げられる。ダイヤフラムポンプの例としては、チュービングポンプ及び圧電（ピエゾ）ポンプが挙げられる。チュービングポンプは、ペリスタルティックポンプと呼ばれる場合もある。また、様々な種類のポンプを組み合わせたマイクロ流体チップモジュールを用いてもよい。

[0178] ペリスタポンプ（登録商標）、チュービングポンプ、及びダイヤフラムポンプ等の密閉型ポンプを用いると、図 3 に示す培地流路 200 内部の培地にポンプが直接接触することなく、送液することが可能である。あるいは、導入用流体機械 51 及び排出用流体機械 52 としては、シリンジポンプを使用してもよい。密閉型ポンプ以外のポンプであっても、加熱滅菌処理等により

再利用が可能である。

[0179] 導入用流体機械51が密閉型ポンプである場合、図1に示すように、導入用流体機械51は、ポンプヘッド151と、モーター等の駆動部251と、を備える。ポンプヘッド151と、駆動部251と、は、着脱可能である。ポンプヘッド151は、チューブ等の培地流路を外側からしごくローラーを備える。駆動部251は、ポンプヘッド151のローラーを回転させる。排出用流体機械52が密閉型ポンプである場合、排出用流体機械52は、ポンプヘッド152と、モーター等の駆動部252と、を備える。ポンプヘッド152と、駆動部252と、は、着脱可能である。ポンプヘッド152は、チューブ等の培地流路を外側からしごくローラーを備える。駆動部252は、ポンプヘッド152のローラーを回転させる。

[0180] 図3に示すように、培地流路200には、培地が入ることができる培地タンク60が設けられていてもよい。培地流路200から培地タンク60に入った培地は、再び、培地流路200に流れ出ていく。培地タンク60を設けることにより、培地流路200と培地保持槽40との間を循環する培地の容量を大きくすることが可能である。

[0181] 培地タンク60には、培地タンク60内に流体を供給するための供給口と、培地タンク60内の流体を排出するための排出口と、が、設けられていてもよい。例えば、培地タンク60の供給口に、流体を供給するためのバッグ、蛇腹及びシリンジ等の供給器を接続可能な図6に示すプラグ61が挿入される。供給器は、ポンプ等の流体機械であってもよい。ただし、培地タンク60の供給口に、供給器が直接接続されてもよい。供給器は供給口に着脱可能であり、供給器が供給口に接続されていない場合は、供給口は密閉可能であり、供給口を介した培地流路200内外の流体の交換が生じない。あるいは、供給口は、供給器に接続されることによって、外部から遮蔽される。プラグ61は、ニードルレスコネクターであってもよい。ニードルレスコネクターは、スプリットセプタム型であってもよいし、メカニカルバルブ型であってもよい。プラグ61に供給器あるいは供給器に接続された流路が挿入さ

れた場合も、プラグ61を介して外気が培地タンク60内に進入しない。ただし、プラグ61は、針が刺入されるコネクターであってもよい。

[0182] また、例えば、培地タンク60の排出口に、培地タンク60内の流体を排出するためのバッグ、蛇腹及びシリンジ等の排出器が接続可能なプラグ62が挿入される。排出器は、ポンプ等の流体機械であってもよい。ただし、培地タンク60の排出口に、排出器が直接接続されてもよい。排出器は、能動的に培地流路内の流体を吸引してもよい。あるいは、排出器は、培地流路内の圧力に応じて受動的に内部容積を増加させ、培地流路から押し出された流体を受容してもよい。排出器は排出口に着脱可能であり、排出器が排出口に接続されていない場合は、排出口は密閉可能であり、排出口を介した培地流路200内外の流体の交換が生じない。あるいは、排出口は、排出器に接続されることによって、外部から遮蔽される。プラグ62は、ニードルレスコネクターであってもよい。ニードルレスコネクターは、スプリットセプタム型であってもよいし、メカニカルバルブ型であってもよい。プラグ62に排出器あるいは排出器に接続された流路が挿入された場合も、プラグ62を介して外気が培地タンク60内に進入しない。ただし、プラグ62は、針が刺入されるコネクターであってもよい。

[0183] 例えば、図1に示す培地保持槽40が、培地側プレート22、培養成分透過部材10、及び培養側プレート21を間に挟んで培養槽30に密着している状態であり、図3に示す培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内に空気が入っている場合、培地タンク60の排出口から培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内の空気を排出しながら、培地タンク60の供給口から培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内に培地を注入することにより、培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内に培地を入れることが可能である。培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内の空気層を完全になくしてもよいし、空気層が残っていてもよい。

[0184] 培地流路200に、培地が充填された供給器と空の排出器を接続し、流体

機械を駆動させて、供給器から培地流路200に培地を導入させ、排出器に空気を導入させてもよい。この際、供給器が能動的に培地流路200に培地を注入してもよいし、流体機械の駆動により低圧になった培地流路200に供給器内の培地が吸引され、供給器内の内部容積が受動的に減少してもよい。また、排出器が能動的に培地流路200内の空気を吸引してもよいし、流体機械の駆動により高圧になった培地流路200内の空気が排出器に流入し、排出器の内部容積が受動的に増加してもよい。

[0185] また、培地保持槽40、培地流路200及び培地タンク60内に既に培地が入っている場合、培地タンク60の排出口から培地タンク60内の培地を排出しながら、培地タンク60の供給口から培地タンク60内に培地を注入することにより、培地タンク60内に細胞培地を置換することが可能である。

[0186] 培地流路200に、培地が充填された供給器と空の排出器を接続し、流体機械を駆動させて、供給器から培地流路200に新しい培地を導入させ、排出器に古い培地を導入させてもよい。この際、供給器が能動的に培地流路200に新しい培地を注入してもよいし、流体機械の駆動により低圧になった培地流路200に供給器内の新しい培地が吸引され、供給器内の内部容積が受動的に減少してもよい。また、排出器が能動的に培地流路200内の古い培地を吸引してもよいし、流体機械の駆動により高圧になった培地流路200内の古い培地が排出器に流入し、排出器の内部容積が受動的に増加してもよい。

[0187] 培地流路200及び培地保持槽40内に培地を供給するための供給口と、培地流路200及び培地保持槽40内の空気を排出するための排出口は、培地流路200の培地タンク60が設けられた部分以外に設けられていてもよい。例えば、培地流路200及び培地保持槽40内に培地を供給するための供給口と、培地流路200及び培地保持槽40内の空気を排出するための排出口は、培地流路200に設けられていてもよい。

[0188] 実施形態に係る細胞培養器は、培地保持槽40、培地流路200、及び培

地タンク60の少なくともいずれかを加熱及び冷却するための、温度調節部を備えていてもよい。培地保持槽40、培地流路200、及び培地タンク60のいずれかを温度調節部で温度調節することにより、培地を温度調節することが可能である。実施形態に係る細胞培養器は、培地の温度を測る温度計をさらに備えていてもよい。温度計は、培地に接触することなく培地保持槽40、培地流路200、及び培地タンク60の少なくともいずれかの温度に基づいて培地の温度を測ってもよいし、培地に接触して培地の温度を直接測ってもよい。この場合、培地の温度が所定の温度となるよう、温度調節部がフィードバック制御されてもよい。

[0189] 図3に示すように、培地保持槽40、培地流路200、ポンプヘッド151、ポンプヘッド152、及び培地タンク60は、流路ケース70内に格納されてもよい。流路ケース70内において、培地保持槽40、培地流路200、ポンプヘッド151、ポンプヘッド152、及び培地タンク60は、ガス非透過性物質中に完全に埋め込まれていてもよい。培地流路200は、ガス非透過性物質中にトンネル状に設けられていてもよい。例えば、流路ケース70には、ポンプヘッド151に軸を挿入するための穴、ポンプヘッド152に軸を挿入するための穴、培地タンク60の供給口にプラグ61を挿入するための穴、及び培地タンク60の排出口にプラグ62を挿入するための穴が設けられている。培地タンク60の供給口にプラグ61を挿入するための穴、及び培地タンク60の排出口にプラグ62を挿入するための穴は、塞ぐことが可能であってもよい。

[0190] 図7に示すように、導入用流体機械51の駆動部251及び排出用流体機械52の駆動部252は、基板状の駆動部保持部材80に配置されてもよい。駆動部保持部材80には、培地タンク60の供給口にプラグ61を挿入するための穴、及び培地タンク60の排出口にプラグ62を挿入するための穴82が設けられている。培地タンク60の供給口にプラグ61を挿入するための穴、及び培地タンク60の排出口にプラグ62を挿入するための穴82は、塞ぐことが可能であってもよい。

- [0191] 駆動部保持部材 80 は、図 1 に示すパッキン 90 を介して、流路ケース 70 に密着させられる。パッキン 90 は、流路ケース 70 と駆動部保持部材 80 の接触部から流路ケース 70 内に空気が進入することを抑制する。
- [0192] 培地を培地保持槽 40 内に導入し、培地を培地保持槽 40 内から排出するための流体機械を流体機械用外気遮断部材で覆ってもよい。流体機械用外気遮断部材は、例えば、図 7 に示すように、駆動部保持部材 80 に配置された導入用流体機械 51 の駆動部 251 を覆う導入用流体機械用外気遮断部材 351 と、駆動部保持部材 80 に配置された排出用流体機械 52 の駆動部 252 を覆う排出用流体機械用外気遮断部材 352 と、を備える。
- [0193] 流路ケース 70 と、駆動部保持部材 80 と、は、着脱可能である。駆動部保持部材 80 を流路ケース 70 に密着させ、培地タンク 60 の供給口にプラグ 61 を挿入するための穴、及び培地タンク 60 の排出口にプラグ 62 を挿入するための穴を塞ぎ、導入用流体機械 51 の駆動部 251 を導入用流体機械用外気遮断部材 351 で覆い、排出用流体機械 52 の駆動部 252 を排出用流体機械用外気遮断部材 352 で覆うと、流路ケース 70 内が外気から遮断され、流路ケース 70 内に外気が進入することができなくなる。そのため、流路ケース 70 内外のガスの交換が生じなくなる。したがって、培地保持槽 40 及び培地流路 200 内に外気が進入しなくなる。培地流路用外気遮断部材の少なくとも一部を構成する流路ケース 70 内を外気から遮断することにより、培地流路 200 がガス透過性のチューブであっても、培地保持槽 40 及び培地流路 200 内の培地の pH の変動を抑制し、所定の範囲内に保つことが可能となる。
- [0194] なお、本発明者らの知見により、細胞は、完全に閉鎖された密閉空間で培養可能であるため、培地保持槽 40 及び培地流路 200 内に、二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガス等を積極的に供給しなくともよい。そのため、培地保持槽 40 及び培地流路 200 を CO₂ インキュベーター内に配置しなくともよい。また、密閉されている培地保持槽 40 及び培地流路 200 内に、培地保持槽 40 及び培地流路 200 外に存在する細胞、微生物、ウイルス、

及び塵等が進入しないため、培地保持槽40及び培地流路200内の清浄度が保たれる。そのため、培地保持槽40及び培地流路200をクリーンルーム内に配置しなくともよい。培地保持槽40は、ガス非透過性物質で包埋されていてもよい。換言すれば、培地保持槽40は、ガス非透過性物質中に埋め込まれていてもよい。

[0195] 流路ケース70から駆動部保持部材80を外した際、培地タンク60の供給口にプラグ61を挿入するための流路ケース70の穴、及び培地タンク60の排出口にプラグ62を挿入するための流路ケース70の穴を塞ぐことにより、流路ケース70内を密閉し、流路ケース70内部の物質が外部に流出したり、流路ケース70内に外気が進入したりすることを抑制することが可能である。

[0196] 内部に培地流路200及びポンプヘッド151、152を含む流路ケース70は、使い捨て可能である。一方、駆動部251、252を保持している駆動部保持部材80は、繰り返し利用することが可能である。

[0197] 例えば、図2に示す導入用流体機械51によって培地保持槽40内に送液される培地の量と、排出用流体機械52によって培地保持槽40から排出される培地の量と、が同じになるよう、導入用流体機械51及び排出用流体機械52は制御される。導入用流体機械51及び排出用流体機械52は、培地保持槽40内に、常時、培地を送液してもよいし、適宜間隔をおいて、培地を送液してもよい。

[0198] 培地を、常時、培地保持槽40内に送液する場合、培地保持槽40内に送液される培地の流量は、一定であっても、一定でなくてもよい。例えば、培地及び培地中の細胞塊を撮影装置で監視し、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、培地保持槽40内に送液される培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0199] また、培地保持槽40内に培地を常時送液せずに、例えば、培地の状態、培地中の細胞塊の状態、細胞数、細胞塊数、培地の濁度、及びpHの変化に応じて、培地の送液の開始及び終了をしてもよい。この場合も、培地及び培

地中の細胞塊の状態に応じて、送液される培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0200] 攪拌されている培地中では、細胞同士がランダムに衝突し、結合して、様々な大きさの細胞塊（コロニー）が形成される場合がある。そのためコロニー間の均質性が保てない場合がある。さらに、大きすぎるコロニーにおいては、コロニーの中まで栄養や成長因子が届かず、内部から分化、細胞死してしまう場合がある。その一方で、小さすぎるコロニーは、継代培養には適さない場合がある。これに対し、図2に示す培養槽30内では、培地の流速が遅いか、培地が流動しないため、細胞同士が衝突する頻度が低い。そのため、コロニーにおいてクローナリティを維持することが可能である。したがって、例えば、細胞がiPS細胞等の幹細胞である場合、1つの細胞由来の幹細胞のクローナリティを担保することが可能である。また、幹細胞同士が衝突する頻度が低いため、幹細胞のコロニーの大きさを均質に保つことが可能である。

[0201] 実施形態に係る細胞培養器は、培養槽30のカバー32の窓132を介して、培養槽30内の細胞含有培地を撮影する写真カメラやビデオカメラ等の撮影装置をさらに備えていてもよい。

[0202] 実施形態に係る細胞培養器によれば、例えば、完全閉鎖系で細胞が培養されるため、培養装置からの細胞の漏れ出しによるクロスコンタミネーションのリスクを低減することが可能である。また、例えば、細胞がHIV肝炎ウイルス等のウイルスに感染している場合であっても、細胞の漏れ出しによるオペレーターへの感染のリスクを低減することが可能である。さらに、細胞培養器内の培地が、細胞培養器外の空気中の細菌、ウイルス及びカビ等にコンタミネーションするリスクを低減することが可能である。またさらに、実施形態に係る細胞培養器によれば、CO₂インキュベーターを用いることなく、細胞を培養することも可能である。

[0203] なお、例えば、培地の循環が不要な場合は、図3に示す培地保持槽40に培地流路200を接続しなくともよい。また、培養槽30内で細胞は浮遊培

養されてもよいし、接着培養されてもよい。細胞が接着培養される場合、図1に示す培養側プレート21の表面が細胞接着性であってもよいし、培養成分透過部材10の表面が細胞接着性であってもよい。また、実施形態に係る細胞培養器の培養槽30内で、細胞を培養しながら誘導してもよい。さらに、培地流路が培地保持槽や培養槽に接続されずに使用され、閉鎖系としての培地流路内で細胞を培養又は誘導してもよい。

[0204] 閉鎖系は、図1から図7に示した細胞培養器に限定されない。例えば、閉鎖系は容器であってもよい。容器は、チューブやフラスコであってもよい。容器は、樹脂製であってもよいし、ガラス製であってもよい。容器内部を完全に閉鎖するために、容器のキャップや蓋等の周囲を、パラフィンフィルム等のフィルムで巻き付けてもよい。

実施例

[0205] (実施例1)

幹細胞培地(20%KnockOut SR(登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC)を含むDMEM/F12)をゲル化してゲル培地を作製した。ゲル培地のpHは、4.0から10.0の間に調整した。ゲル培地にシングルセル又は細胞塊にされたiPS細胞を 2×10^5 個/mLを添加した。15mLファルコンチューブ(登録商標、コーニング)にiPS細胞を含むゲル培地を入れた。その後、一部のファルコンチューブのキャップを固く締め、さらにファルコンチューブ及びキャップの周囲をパラフィンフィルム(パラフィルム、登録商標、Bemis)で巻きつけ、ファルコンチューブ内を外気から遮断し、ファルコンチューブ内のガス(空気)が完全に外気と交換されないようにした。他のファルコンチューブは、キャップを締めるのみで、パラフィンフィルムを巻きつけなかった。

[0206] パラフィンフィルムで巻きつけなかったファルコンチューブを37℃、二酸化炭素濃度が5%のインキュベーター内に配置し、iPS細胞の浮遊培養を開始した。また、パラフィンフィルムで巻きつけたファルコンチューブを37℃の恒温槽に配置し、CO₂インキュベーターには入れずにiPS細胞の

浮遊培養を開始した。恒温槽としては、温度を電子的に制御することができるビーズバス、ウォーターバス及び恒温機を使用した。恒温槽は、実験室内に配置され、実験室内の空気から遮蔽されていなかった。その後、2日に一度、それぞれのファルコンチューブのキャップを開け、2 mLのpHが4.0から10.0の間のゲル培地をファルコンチューブ内に追加した。ゲル培地を追加した後は、上記のとおり、キャップを締め、恒温槽に配置するファルコンチューブは、キャップの周囲をパラフィンフィルムで巻きつけた。

[0207] ファルコンチューブ内での培養を開始してから7から10日後、ファルコンチューブのキャップを開け、ゲル培地中に形成されたiPS細胞の細胞塊をフィルターを用いて回収し、PBSで洗浄し、ファルコンチューブに入れた。さらに、細胞塊に500 μ Lの細胞解離試薬 (TrypLE Select、登録商標、Thermo Fisher) を添加し、CO₂インキュベーター内で細胞塊を5分間インキュベートした。次に、インキュベーターからファルコンチューブを取り出し、ファルコンチューブ内に500 μ Lの幹細胞培地 (20% KnockOut SR (登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC) を含むDMEM/F12) を入れ、細胞塊を懸濁して、iPS細胞をシングルセルにした。ファルコンチューブ内に2 mLの幹細胞培地 (20% KnockOut SR (登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC) を含むDMEM/F12) を添加し、遠心機を用いて200 gでファルコンチューブを遠心した。遠心後、ファルコンチューブ内の上清を除去し、iPS細胞をゲル培地をファルコンチューブに入れた。その後、上記と同様に、2日に一度ゲル培地を追加しながら、7から10日間、iPS細胞を密閉されたファルコンチューブ内で浮遊培養した。

[0208] 以後、上記と同様に、継代及び7から10日間の浮遊培養を繰り返し、合計して1か月以上、iPS細胞を密閉されたファルコンチューブ内で浮遊培養した。

[0209] ファルコンチューブをインキュベーター内に配置して培養したiPS細胞

、及びファルコンチューブをビーズバスに配置して培養した i P S 細胞を顕微鏡で観察したところ、図 8 に示すように、いずれも、均一な細胞塊を形成していることが確認された。ビーズバス以外の恒温槽に配置されたファルコンチューブ内で培養された i P S 細胞でも同様の結果が得られた。

[0210] また、継代時に、一部のシングルセルの i P S 細胞を分注し、4 % - パラホルムアルデヒドを用いて i P S 細胞を固定した。さらに、フローサイトメーターを用いて、固定された i P S 細胞における細胞表面抗原 T R A - 1 - 6 0 の発現量を測定した。T R A - 1 - 6 0 は、多能性幹細胞の代表的な表面抗原であり、分化した細胞では発現量が減少することが知られている。

[0211] その結果、図 9 に示すように、培養開始から 8 日目、2 8 日目、及び 3 8 日目において、ファルコンチューブをインキュベーター内に配置して培養した i P S 細胞、及びファルコンチューブをビーズバスに配置して培養した i P S 細胞は、いずれも、ほぼ 1 0 0 % T R A 1 - 6 0 陽性であった。ビーズバス以外の恒温槽に配置されたファルコンチューブ内で培養された i P S 細胞でも同様の結果が得られた。したがって、容器を密閉して閉鎖系にすると、容器内の二酸化炭素濃度を制御せずとも、幹細胞を長期間にわたって、未分化状態で多能性を保ちながら培養できることが示された。

[0212] (実施例 2)

実施例 1 と同様にゲル培地を作製した。ゲル培地にシングルセルにされた i P S 細胞を 2×10^5 個 / mL を添加した。2 mL ゴムパッキン付きガス非透過性チューブに、内部に空気層が残らないように 2 mL の i P S 細胞を含むゲル培地を入れた。その後、チューブのキャップを固く締め、さらにチューブ及びキャップの周囲をパラフィンフィルムで巻きつけ、チューブ内を外気から遮断し、チューブ内に外気が侵入しないようにした。これにより、培養中に、ゲル培地がガス（空気）層に接触しないようにした。

[0213] パラフィンフィルムで巻きつけたチューブのそれぞれを 3 7 ° C の C O ₂ インキュベーター内及び C O ₂ インキュベーター外の 3 7 ° C の恒温槽に配置し、i P S 細胞の浮遊培養を開始した。恒温槽としては、温度を電子的に制御する

ことができるビーズバス、ウォーターバス及び恒温機を使用した。恒温槽は、実験室内に配置され、実験室内の空気から遮蔽されていなかった。培養の途中、培地の追加又は交換をしなかった。チューブ内での培養を開始してから10から11日後、チューブのキャップを開け、ゲル培地中に形成されたiPS細胞の細胞塊をフィルターを用いて回収し、PBSで洗浄し、チューブに入れた。さらに、細胞塊に500 μ Lの細胞解離試薬(TrypLE Select、登録商標、ThermoFisher)を添加し、CO₂インキュベーター内で細胞塊を5分間インキュベートした。次に、インキュベーターからチューブを取り出し、チューブ内に500 μ Lの幹細胞培地(20%KnockOut SR(登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC)を含むDMEM/F12)を入れ、細胞塊を懸濁して、iPS細胞をシングルセルにした。チューブ内に2mLの幹細胞培地(20%KnockOut SR(登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC)を含むDMEM/F12)を添加し、遠心機を用いて200gでチューブを遠心した。遠心後、チューブ内の上清を除去し、iPS細胞の細胞数が 2×10^5 個/mLとなるよう、ゲル培地をチューブに入れた。その後、上記と同様に、ゲル培地の追加又は交換をせずに、5から11日間、iPS細胞を密閉されたチューブ内で浮遊培養した。

[0214] 以後、上記と同様に、継代及び5から11日間の浮遊培養を繰り返し、合計して1か月以上、iPS細胞を密閉されたチューブ内で浮遊培養した。

[0215] チューブをインキュベーター内に配置して培養したiPS細胞をカメラ及び顕微鏡で観察したところ、図10に示すように、均一な細胞塊を形成していることが確認された。インキュベーター外の恒温槽に配置されたチューブ内で培養されたiPS細胞でも同様の結果が得られた。

[0216] また、継代時に、一部のシングルセルのiPS細胞を分注し、4%-パラホルムアルデヒドを用いてiPS細胞を固定した。さらに、フローサイトメーターを用いて、固定されたiPS細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定した。その結果、図11に示すように、培養開始から1

0日目、21日目、及び30日目において、チューブをインキュベーター内に配置して培養したiPS細胞は、90%以上TRA1-60陽性であった。インキュベーター外の恒温槽に配置されたチューブ内で培養されたiPS細胞でも同様の結果が得られた。したがって、容器を密閉すると、容器内の二酸化炭素濃度を制御せず、かつ培地の追加及び交換をせずとも、幹細胞を長期間にわたって、未分化状態で多能性を保ちながら培養できることが示された。

[0217] (実施例3)

実施例1と同様にゲル培地を作製した。ゲル培地にシングルセルにされたiPS細胞を添加した。15mLファルコンチューブに2mLのiPS細胞を含むゲル培地を入れた。その後、ファルコンチューブのキャップを固く締めた。

[0218] ファルコンチューブを37℃、CO₂インキュベーター内に配置し、iPS細胞の浮遊培養を開始した。その後、2日に一度、ファルコンチューブのキャップを開け、2mLのpHが4.0から10.0の間のゲル培地をファルコンチューブ内に追加した。ゲル培地を追加した後は、上記のとおり、キャップを締めた。

[0219] ファルコンチューブ内での培養を開始してから7から10日後、ファルコンチューブのキャップを開け、ゲル培地中に形成されたiPS細胞の細胞塊をフィルターを用いて回収し、PBSで洗浄し、ファルコンチューブに入れた。さらに、細胞塊に500μLの細胞解離試薬 (TrypLE Select、登録商標、ThermoFisher) を添加し、CO₂インキュベーター内で細胞塊を5分間インキュベートした。次に、インキュベーターからファルコンチューブを取り出し、ファルコンチューブ内に20%KnockOut SR (登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC)、GlutaMAX (登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC)、及び非必須アミノ酸 (NEAA) を含む500μLの培地を入れ、細胞塊を懸濁して、iPS細胞をシングルセルにした。ファルコ

ンチューブ内に2 mLの幹細胞培地（20% Knock Out SR（登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC）を含むDMEM / F12）を添加し、遠心機を用いて200 gでファルコンチューブを遠心した。遠心後、ファルコンチューブ内の上清を除去し、iPS細胞の細胞数が 2×10^5 個/mLとなるよう、ゲル培地をファルコンチューブに入れた。その後、上記と同様に、2日に一度ゲル培地を追加しながら、7から10日間、iPS細胞を密閉されたファルコンチューブ内で浮遊培養した。

[0220] 以後、上記と同様に、継代及び7から10日間の浮遊培養を繰り返し、合計して1か月以上、iPS細胞を密閉されたファルコンチューブ内で浮遊培養した。

[0221] ファルコンチューブ内で培養したiPS細胞を顕微鏡で観察したところ、図12に示すように、いずれも、細胞塊を形成していることが確認された。また、実施例3と同様に、フローサイトメーターを用いて、iPS細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定したところ、図13に示すように、培養開始から7から21日目におけるiPS細胞は、ほぼ100% TRA-1-60陽性であった。

[0222] （実施例4）

増殖因子を培地（StemSpan H3000、登録商標、STEMCELL Technologies Inc.）に添加し、さらに培地に脱アシル化ゲランガムを添加して、ゲル培地を用意した。

[0223] 用意したゲル培地を15 mLチューブに入れ、ゲル培地に 2×10^5 個の血液細胞（単核球）を播種した。その後、15 mLチューブを37°CのCO₂インキュベーター内に配置し、7日間、血液細胞を培養した。その後、ゲル培地にOCT3/4、SOX2、KLF4、cMYCを搭載するセンダイウイルスベクター（CytoTune-iPS2.0、株式会社IDファーマ）を感染多重度（MOI）が10.0となるよう添加し、血液細胞をセンダイウイルスに感染させた。

[0224] ゲル培地にセンダイウイルスを添加した後、ゲル培地に30 mLの幹細胞

培地（20% KnockOut SR（登録商標、ThermoFisher SCIENTIFIC）を含むDMEM/F12）を添加し、フィーダー細胞を播種したフラスコに、センダイウイルスに感染した細胞を含む培地を入れ、15日間、フラスコを放置し、センダイウイルスに感染した細胞を接着培養した。フラスコ内には、空気層が全くなかった。その間、図14に示すように、フラスコのキャップ周辺をパラフィンフィルムで巻き付け、フラスコ内を完全に閉鎖し、培地交換及びガス交換を全く行わず、フラスコ内のCO₂濃度の制御もしなかった。

[0225] 15日後、細胞を顕微鏡で観察したところ、図15に示すように、ES細胞様コロニーを形成していることが確認された。図16に示すように、コロニーのうち100%近くがES細胞様コロニーであった。また、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、フローサイトメーターを用いて、固定された細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定したところ、図17（a）に示すように、誘導前の細胞においては、ほぼ100%TRA-1-60陰性であったのに対し、図17（b）に示すように、誘導後の細胞においては、ほぼ100%TRA-1-60陽性であり、ほぼ完全にリプログラミングされていることが確認された。したがって、完全に閉鎖された環境下において、培地交換及びガス交換をすることなく、幹細胞以外の細胞からiPS細胞を誘導できることが示された。

[0226] （実施例5）

実施例4と同様に用意したゲル培地を15mLチューブに入れ、ゲル培地に 2×10^5 個の血液細胞（単核球）を播種した。その後、15mLチューブを37℃のCO₂インキュベーター内に配置し、7日間、血液細胞を培養した。その後、ゲル培地にOCT3/4、SOX2、KLF4、cMYCを搭載するセンダイウイルスベクター（Cytotune-iPS2.0、株式会社IDファーマ）を感染多重度（MOI）が10.0となるよう添加し、血液細胞をセンダイウイルスに感染させた。

[0227] ゲル培地にセンダイウイルスを添加した後、ゲル培地に15mLのゲル化

した幹細胞培地（20% Knock Out SR（登録商標、Thermo Fisher SCIENTIFIC）を含むDMEM/F12）を添加し、そのうち15 mLのセンダイウイルスに感染した細胞を含む培地を15 mLチューブに入れ、15日間、15 mLチューブを放置し、センダイウイルスに感染した細胞を浮遊培養した。15 mLチューブ内には、空気層が全くなかった。その間、15 mLチューブ内を完全に閉鎖し、培地交換及びガス交換を全く行わず、15 mLチューブ内のCO₂濃度の制御もしなかった。

[0228] 15日後、細胞を顕微鏡で観察したところ、図18に示すように、ES細胞様コロニーを形成していることが確認された。また、4%-パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、フローサイトメーターを用いて、固定された細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定したところ、図19に示すように、ほぼ100%TRA-1-60陽性であり、ほぼ完全にリプログラミングされていることが確認された。したがって、完全に閉鎖された環境下において、培地交換及びガス交換をすることなく、幹細胞以外の細胞からiPS細胞を誘導できることが示された。

[0229] （実施例6）

図20及び図21に示すように、半透膜110（旭化成株式会社又はSPECTRUM）を、培養側プレート21及び培地側プレート22で挟み、さらに、半透膜110、培養側プレート21及び培地側プレート22を、培養槽30及び培地保持槽40で挟み込んだ。

[0230] 20%の代替血清（Knock Out SR、登録商標、Gibco）を含む幹細胞培地（リプロセル）をゲル化してゲル培地を作製した。ゲル培地にシングルセルにされたiPS細胞を 2×10^5 個/mLを添加して、細胞含有培地を調製した。

[0231] 細胞含有培地をシリンジに入れ、シリンジをプラグ33を介して培養槽30の供給口231に接続した。また、空のシリンジをプラグ34を介して培養槽30の排出口331に接続した。次に、培養槽30の供給口231から培養槽30内に、シリンジ内の細胞含有培地を注入した。培養槽30内の圧

力上昇により、排出口331に接続されたシリンジのピストンが受動的に上昇し、培養槽30内の空気は、培養槽30の排出口331に接続されたシリンジ内に移動した。培養槽30内の空気層が完全になくなるまで、培養槽30内に細胞含有培地を注入した。その後、培養槽30の供給口231及び排出口331を遮蔽した。

[0232] ゲル培地をシリンジに入れ、シリンジをプラグ61を介して培地保持槽40の導入口240に接続した。また、空のシリンジをプラグ62を介して培地保持槽40の排出口340に接続した。次に、培地保持槽40の導入口240から培地保持槽40内に、シリンジ内のゲル培地を注入した。培地保持槽40内の圧力上昇により、培地保持槽40の排出口340に接続されたシリンジが受動的に上昇し、培地保持槽40内の空気は、培地保持槽40の排出口340に接続されたシリンジ内に移動した。培地保持槽40内の空気層が完全になくなるまで、培地保持槽40内にゲル培地を注入した。その後、培地保持槽40の導入口240及び排出口340を遮蔽した。これにより、培養槽30及び培地保持槽40内部を密閉し、培養槽30及び培地保持槽40の内部と外部とで、ガス交換が完全に生じないようにした。

[0233] 培養槽30内でiPS細胞の浮遊培養を開始した。その後、2日に一度、培地保持槽40内の2mLのゲル培地を、2mLの新鮮なゲル培地に交換した。培養槽30内での培養を開始してから7から10日後、培養槽30内の細胞含有培地をシリンジで排出し、ゲル培地中に形成されたiPS細胞の細胞塊をフィルターを用いて回収し、PBSで洗浄し、ファルコンチューブに入れた。さらに、細胞塊に500 μ Lの細胞解離酵素 (TrypLE Select, Thermo Fisher) を添加し、CO₂インキュベーター内で細胞塊を5分間インキュベートした。次に、インキュベーターからファルコンチューブを取り出し、ファルコンチューブ内に500 μ Lの細胞培地を入れ、細胞塊を懸濁して、iPS細胞をシングルセルにした。ファルコンチューブ内に2mLの細胞培地を添加し、遠心機を用いて200gでファルコンチューブを遠心した。遠心後、ファルコンチューブ内の上清を除去し、

iPS細胞とゲル培地をファルコンチューブに入れて、細胞含有培地を調製した。その後、上記と同様に、細胞含有培地を培養槽30に注入し、2日に一度、培地保持槽40内の2mLのゲル培地を交換しながら、7から10日間、iPS細胞を浮遊培養した。

[0234] 以後、上記と同様に、継代及び7から10日間の浮遊培養を繰り返し、合計して1か月以上、iPS細胞を密閉された培養槽30内で浮遊培養した。

[0235] 培養槽30で培養したiPS細胞を顕微鏡で観察したところ、図22に示すように、いずれも、均一な細胞塊を形成していることが確認された。

[0236] また、継代時に、一部のシングルセルのiPS細胞を分注し、4%パラホルムアルデヒドを用いてiPS細胞を固定した。さらに、フローサイトメーターを用いて、固定されたiPS細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定した。その結果、図23に示すように、培養開始から39日目におけるiPS細胞は、90%以上TRA-1-60陽性であった。したがって、容器を密閉すると、容器内の二酸化炭素濃度を制御せずとも、幹細胞を長期間にわたって、未分化状態で多能性を保ちながら培養できることが示された。

[0237] (実施例7)

実施例6と同様に細胞含有培地を調製した。また、図2に示した細胞培養器と同様の細胞培養器を用意した。培養槽30内の空気層が完全になくなるまで、培養槽30内に細胞含有培地を注入した。その後、培養槽30の供給口及び排出口を遮蔽した。また、培地保持槽40、培地流路200、及び培地タンク60をゲル培地で充填した。その後、培地タンク60の導入口及び排出口を遮蔽した。これにより、培養槽30及び培地保持槽40内部を密閉し、培養槽30及び培地保持槽40の内部と外部とで、ガス交換が完全に生じないようにした。

[0238] 培地保持槽40、培地流路200、及び培地タンク60内でゲル培地を循環させ、培養槽30内でiPS細胞の浮遊培養を開始した。その後、2から6日に一度、培地タンク60内の10mLのゲル培地を、10mLの新鮮な

ゲル培地に交換した。培養槽30内での培養を開始してから7から10日後、培養槽30内の細胞含有培地をシリンジで排出し、実施例6と同様の継代処理をして、上記と同様に、細胞含有培地を培養槽30に注入し、4日に一度、培地タンク60内の10mLのゲル培地を交換しながら、7から10日間、iPS細胞を浮遊培養した。

[0239] 以後、上記と同様に、継代及び7から10日間の浮遊培養を繰り返し、合計して1か月以上、iPS細胞を密閉された培養槽30内で浮遊培養した。

[0240] 培養槽30で培養したiPS細胞を顕微鏡で観察したところ、図24に示すように、いずれも、均一な細胞塊を形成していることが確認された。また、実施例6と同様に、フローサイトメーターを用いて、iPS細胞における細胞表面抗原TRA-1-60の発現量を測定したところ、図25に示すように、培養開始から15日目におけるiPS細胞は、ほぼ100%TRA-1-60陽性であった。

[0241] (実施例8)

増殖因子を培地(StemSpan H3000、登録商標、STEMCELL Technologies Inc.)に添加し、さらに培地に脱アシル化ゲランガムを添加して、ゲル培地を用意した。

[0242] 用意したゲル培地を15mLチューブに入れ、ゲル培地に 2×10^5 個の血液細胞を播種した。その後、15mLチューブをCO₂インキュベーター内に配置し、7日間、血液細胞(単核球)を培養した。その後、ゲル培地にOCT3/4、SOX2、KLF4、cMYCを搭載するセンダイウイルスベクター(CytoTune-iPS2.0、株式会社IDファーマ)を感染多重度(MOI)が10.0となるよう添加し、血液細胞をセンダイウイルスに感染させた。

[0243] ゲル培地にセンダイウイルスを添加した後、ゲル培地に15mLのゲル化した幹細胞培地(20%KnockOut SR(登録商標、Thermo Fisher SCIENTIFIC)を含むDMEM/F12)を添加し、そのうち15mLのセンダイウイルスに感染した細胞を含む培地を図20

及び図 2 1 に示す培養槽 3 0 に入れ、ゲル培地を培地保持槽 4 0 に注入した。実施例 6 と同様に、培養槽 3 0 及び培地保持槽 4 0 内部を密閉し、培養槽 3 0 及び培地保持槽 4 0 の内部と外部とで、ガス交換が完全に生じないようにした。

[0244] 培養槽 3 0 内で誘導因子を導入された細胞の浮遊培養を開始した。その後、2 日に一度、培地保持槽 4 0 内の 2 m L のゲル培地を、2 m L の新鮮なゲル培地に交換した。

[0245] 1 5 日後、細胞を顕微鏡で観察したところ、図 2 6 に示すように、ES 細胞様コロニーを形成していることが確認された。また、4 % - パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、フローサイトメーターを用いて、固定された細胞における細胞表面抗原 T R A - 1 - 6 0 の発現量を測定したところ、図 2 7 に示すように、9 0 % 以上 T R A - 1 - 6 0 陽性であり、ほぼ完全にリプログラミングされていることが確認された。したがって、完全に閉鎖された環境下において、培地交換及びガス交換をすることなく、幹細胞以外の細胞から i P S 細胞を誘導できることが示された。

符号の説明

[0246] 1 0 . . . 培養成分透過部材、2 1 . . . 培養側プレート、2 2 . . . 培地側プレート、3 0 . . . 培養槽、3 1 . . . 筐体、3 2 . . . カバー、3 3 . . . プラグ、3 4 . . . プラグ、4 0 . . . 培地保持槽、4 1 . . . 整流板、5 1 . . . 導入用流体機械、5 2 . . . 排出用流体機械、6 0 . . . 培地タンク、6 1 . . . プラグ、6 2 . . . プラグ、7 0 . . . 流路ケース、8 0 . . . 駆動部保持部材、8 2 . . . 穴、9 0 . . . パッキン、1 1 0 . . . 半透膜、1 3 1 . . . 開口、1 3 2 . . . 窓、1 4 0 . . . 開口、1 4 5 . . . 吐出ブロック、1 5 1 . . . ポンプヘッド、1 5 2 . . . ポンプヘッド、2 0 0 . . . 培地流路、2 3 1 . . . 供給口、2 4 0 . . . 導入口、2 4 1 . . . 吐出口、2 4 2 . . . 開口、2 5 1 . . . 駆動部、2 5 2 . . . 駆動部、3 3 1 . . . 排出口、3 4 0 . . . 排出口、3 5 1 . . . 導入用流体機械用外気遮断部材、3 5 2 . . . 排出用流体機械用外気遮断部材、

4 0 1 . . . 入力装置、4 0 2 . . . 出力装置、4 0 3 . . . 関係記憶装置
、5 0 1 . . . 画像処理部、5 1 1 . . . 輪郭定義部、5 1 2 . . . 細胞評
価部、5 1 3 . . . 統計処理部、5 1 4 . . . 密度算出部、5 1 5 . . . 培
地評価部

請求の範囲

- [請求項1] 閉鎖系内で細胞を培養又は誘導することを含む、細胞の培養又は誘導方法。
- [請求項2] 前記誘導が、リプログラミング、初期化、分化転換、分化誘導及び細胞の運命変更の少なくともいずれかを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記閉鎖系内と外部との間でガスの交換が生じない、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記閉鎖系内の温度を制御することをさらに含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記培養することにおいて、前記閉鎖系が密閉されている、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記閉鎖系が密閉された状態で、前記閉鎖系内に外気が進入しない、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 前記閉鎖系が密閉された状態で、前記閉鎖系内に前記閉鎖系外の細胞、微生物、ウイルス、及び塵が進入しない、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記閉鎖系が密閉された状態で、前記閉鎖系内の物質が前記閉鎖系外に流出しない、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記閉鎖系内に二酸化炭素ガス、窒素ガス、及び酸素ガスの少なくともいずれかが供給されない、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記閉鎖系内の培地のpHが所定の範囲内に保たれる、請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項11] 前記閉鎖系の少なくとも一部が、ガス非透過性物質に埋め込まれることにより形成されている、請求項1から10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 前記閉鎖系の少なくとも一部が、ガス非透過性物質からなる、請求

項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

- [請求項13] 前記閉鎖系内で培地を補充又は交換しながら前記細胞を培養又は誘導する、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項14] 前記閉鎖系内で培地を循環しながら前記細胞を培養又は誘導する、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項15] 前記閉鎖系が前記細胞を培養する培養槽を備え、
前記培養槽内に流体を供給するための供給口と、前記閉鎖系内の流体を排出するための排出口と、が、前記培養槽に設けられており、
前記供給口及び前記排出口が密閉可能である、
請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項16] 前記供給口に流体を供給するための供給器が着脱可能であり、
前記排出口に流体を排出するための排出器が着脱可能であり、
前記供給器から前記培養槽内に流体を供給すると、前記培養槽内の流体が前記排出器内に移動する、
請求項 1 5 に記載の方法。
- [請求項17] 前記供給器から前記培養槽内に培地を供給すると、前記培養槽内の空気が前記排出器内に移動する、請求項 1 6 に記載の方法。
- [請求項18] 前記供給器から前記培養槽内に培地を供給すると、前記培養槽内の培地が前記排出器内に移動する、請求項 1 6 に記載の方法。
- [請求項19] 前記培地が細胞を含有する、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の方法。
- [請求項20] 前記供給器から前記培養槽内に流体を供給する際に、外気が前記培養槽内に進入しない、請求項 1 6 から 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項21] 前記培養することにおいて、前記閉鎖系内の二酸化炭素濃度が制御されない、請求項 1 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項22] 前記培養することにおいて、前記閉鎖系外の二酸化炭素濃度が制御されない、請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項23] 前記培養することにおいて、前記閉鎖系内の半透膜を介して前記閉

鎖系内の物質が移動する、請求項 1 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

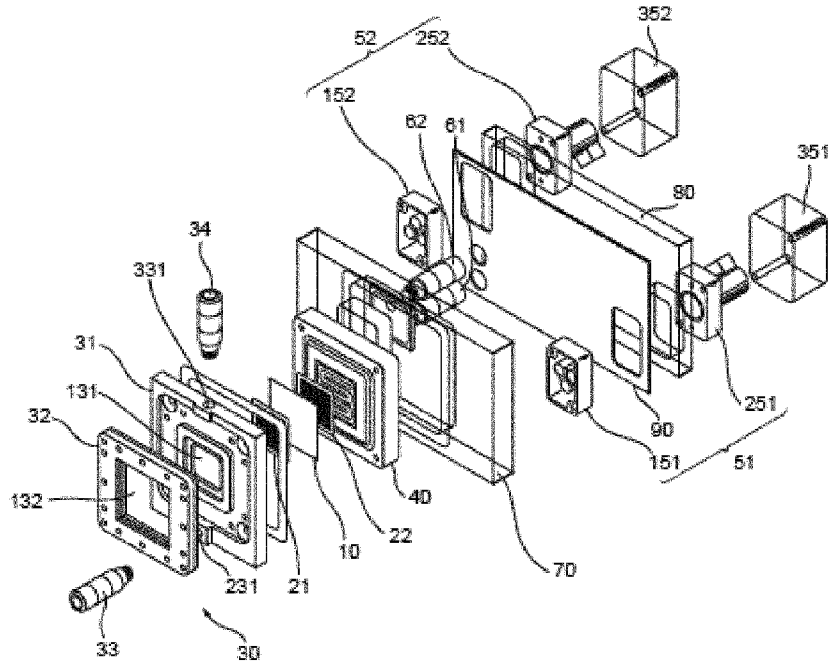
- [請求項24] 前記閉鎖系が、前記細胞を培養する培養槽と、前記培養槽に接続された流路と、を備え、
培地が前記培養槽と前記流路を循環する、
請求項 1 から 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項25] 前記流路において外部とガスの交換が生じない、請求項 2 4 に記載の方法。
- [請求項26] 前記培地が循環することにより、前記培養槽内の培地の pH が所定の範囲内に保たれる、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。
- [請求項27] 前記培養が浮遊培養である、請求項 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項28] 前記培養が接着培養である、請求項 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項29] 前記閉鎖系内のゲル培地中で前記細胞を培養する、請求項 1 から 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項30] 前記閉鎖系内の液体培地中で前記細胞を培養する、請求項 1 から 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項31] 前記閉鎖系内の培地が攪拌される、請求項 1 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項32] 前記閉鎖系内の培地が攪拌されない、請求項 1 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項33] 前記細胞を継代することをさらに含む、請求項 1 から 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項34] 播種と継代の間に培地の追加及び交換をしない、請求項 3 3 に記載の方法。
- [請求項35] 播種と継代の間に培地の追加又は交換をする、請求項 3 3 に記載の方法。

- [請求項36] 継代と継代の間に培地の追加及び交換をしない、請求項33に記載の方法。
- [請求項37] 継代と継代の間に培地の追加又は交換をする、請求項33に記載の方法。
- [請求項38] 前記細胞が幹細胞である、請求項1から37のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項39] 前記幹細胞がiPS細胞、ES細胞、又は体性幹細胞である、請求項38に記載の方法。
- [請求項40] 前記培養することにおいて、前記幹細胞が未分化状態を維持する、請求項38又は39に記載の方法。
- [請求項41] 前記培養することにおいて、前記幹細胞が多能性を維持する、請求項38から40のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項42] 前記細胞が体細胞である、請求項1から37のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項43] 前記細胞が血液系細胞である、請求項1から37及び42のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項44] 前記細胞が誘導因子を導入された細胞である、請求項1から43のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項45] 前記閉鎖系内の培地に誘導因子を添加し、前記閉鎖系内で培養されている前記細胞に前記誘導因子を導入する、請求項1から43のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項46] 前記細胞が幹細胞に誘導される、請求項44又は45に記載の方法。
- [請求項47] 前記幹細胞がiPS細胞である、請求項46に記載の方法。
- [請求項48] 前記細胞が血液系細胞である、請求項44から47のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項49] 前記細胞が別種の細胞に誘導される、請求項44又は45に記載の方法。

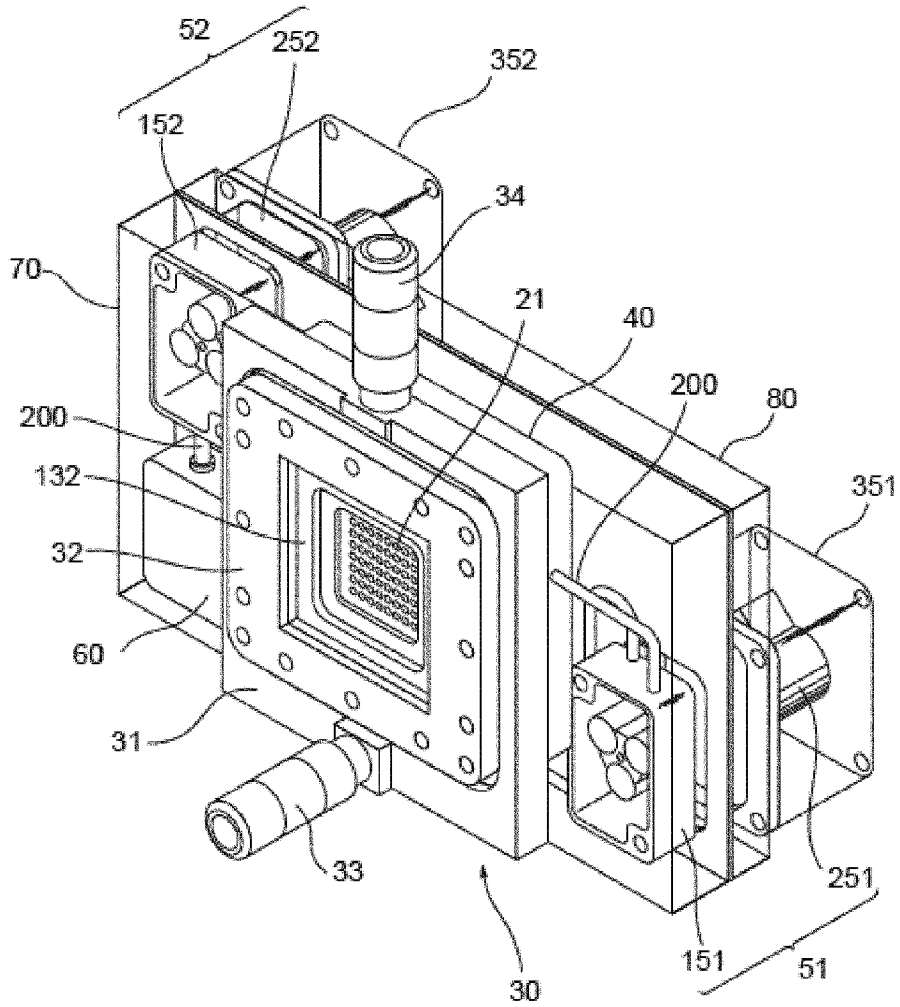
- [請求項50] 前記細胞が血液系細胞であり、
前記閉鎖系内の培地に誘導因子を添加し、前記閉鎖系内で培養されている前記血液系細胞に前記誘導因子を導入し、前記血液系細胞をiPS細胞に誘導する、請求項1から43のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項51] 前記誘導因子がプラスミドに含まれる、請求項44から50のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項52] 前記誘導因子がRNAである、請求項44から50のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項53] 前記誘導因子がセンダイウイルスに含まれる、請求項44から50のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項54] 培養成分が透過可能な培養成分透過部材と、
前記培養成分透過部材の一方の面を覆う、細胞含有培地を保持し、細胞を培養するための培養槽と、
前記培養成分透過部材の他方の面を覆う、培地を保持するための培地保持槽と、
を備える、細胞培養器を用意することと、
前記培養槽中で細胞を培養又は誘導することと、
を含む、細胞の培養又は誘導方法。
- [請求項55] 前記誘導が、リプログラミング、初期化、分化転換、分化誘導及び細胞の運命変更の少なくともいずれかを含む、請求項54に記載の方法。
- [請求項56] 前記細胞培養器の内部が外部から閉鎖されている、請求項54又は55に記載の方法。
- [請求項57] 前記細胞培養器内の培地のpHが所定の範囲内に保たれる、請求項54から56のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項58] 前記培養が浮遊培養である、請求項54から57のいずれか1項に記載の方法。

- [請求項59] 前記細胞が幹細胞である、請求項54から58のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項60] 前記細胞が体細胞である、請求項54から58のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項61] 前記細胞が血液系細胞である、請求項54から58及び60のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項62] 前記細胞が誘導因子を導入された細胞である、請求項54から61のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項63] 前記培養槽内の培地に誘導因子を添加し、前記培養槽内で培養されている前記細胞に前記誘導因子を導入する、請求項54から61のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項64] 前記細胞が別種の細胞に誘導される、請求項62又は63に記載の方法。
- [請求項65] 前記細胞培養器が、前記培養成分透過部材の前記培養槽側の面に重ねられた、開口が設けられた培養側プレートをさらに備える、請求項54から64のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項66] 前記細胞培養器が、前記培養成分透過部材の前記培地保持槽側の面に重ねられた、開口が設けられた培地側プレートをさらに備える、請求項54から65のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項67] 前記培養側プレートが濃色である、請求項65に記載の方法。
- [請求項68] 前記培養側プレートの前記開口が設けられていない部分を背景にして前記細胞又は前記細胞からなる細胞塊を観察することをさらに含む、請求項65又は67に記載の方法。
- [請求項69] 前記培養側プレートの前記開口が設けられていない部分を背景にして前記細胞又は前記細胞からなる細胞塊を撮影することをさらに含む、請求項65又は67に記載の方法。
- [請求項70] 前記培地保持槽の前記培地を補充又は置換することをさらに含む、請求項54から69のいずれか1項に記載の方法。

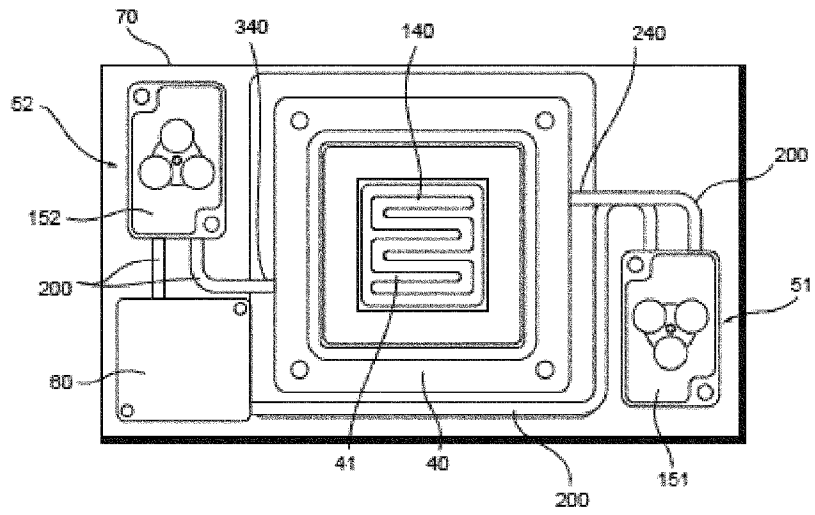
[図1]



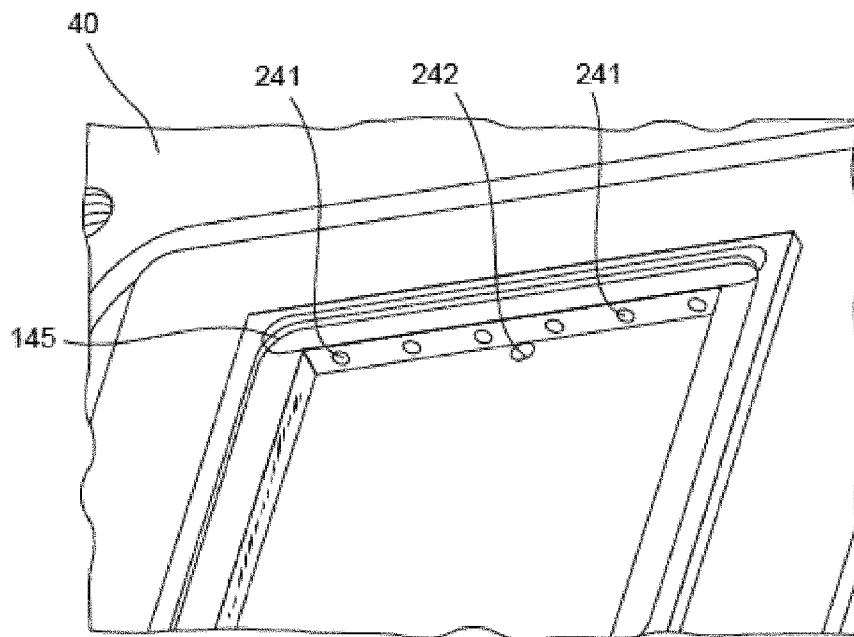
[図2]



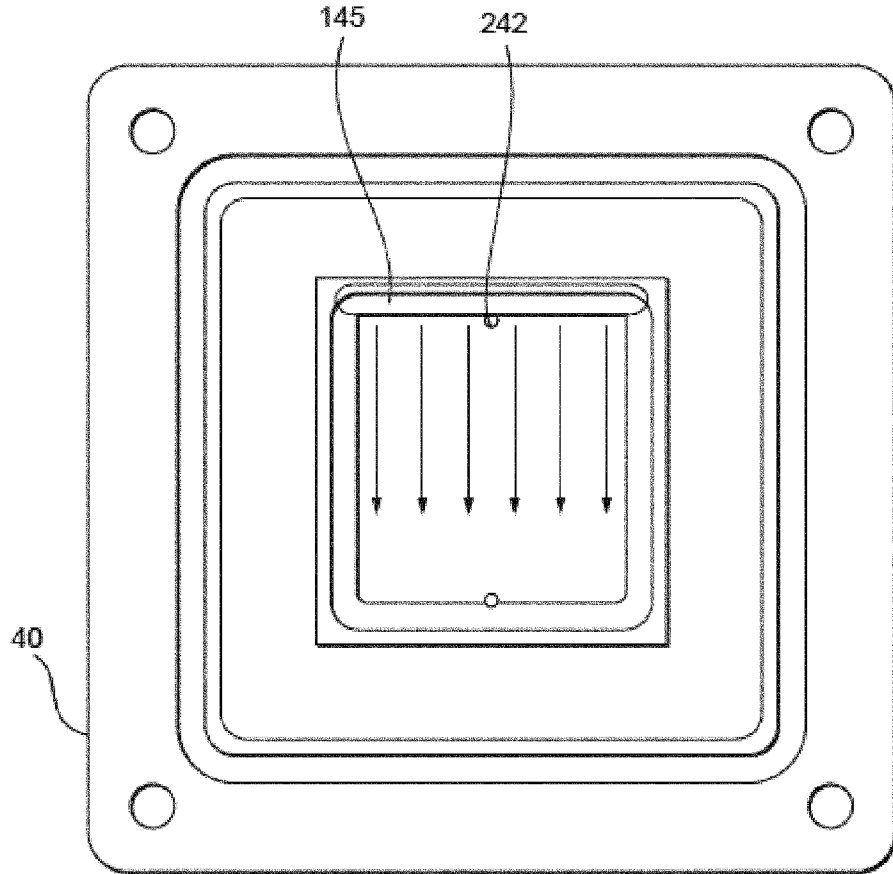
[図3]



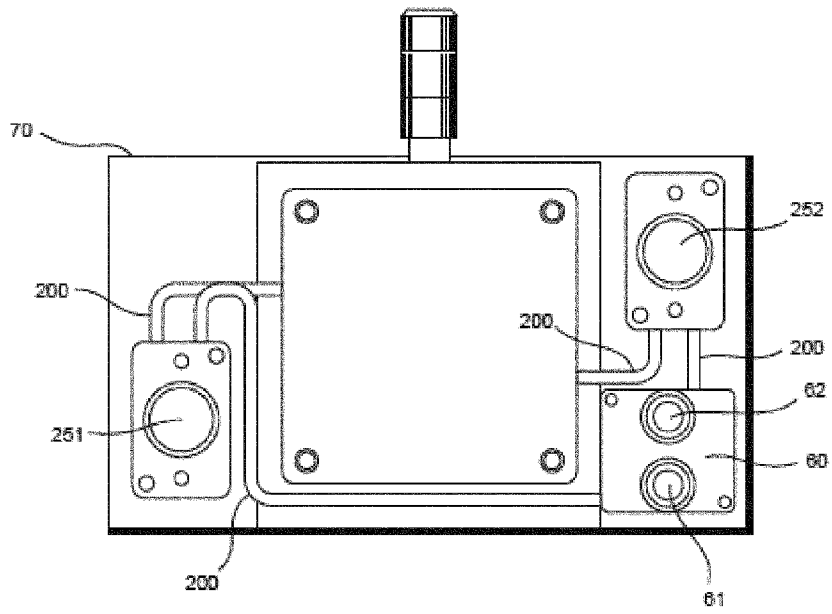
[図4]



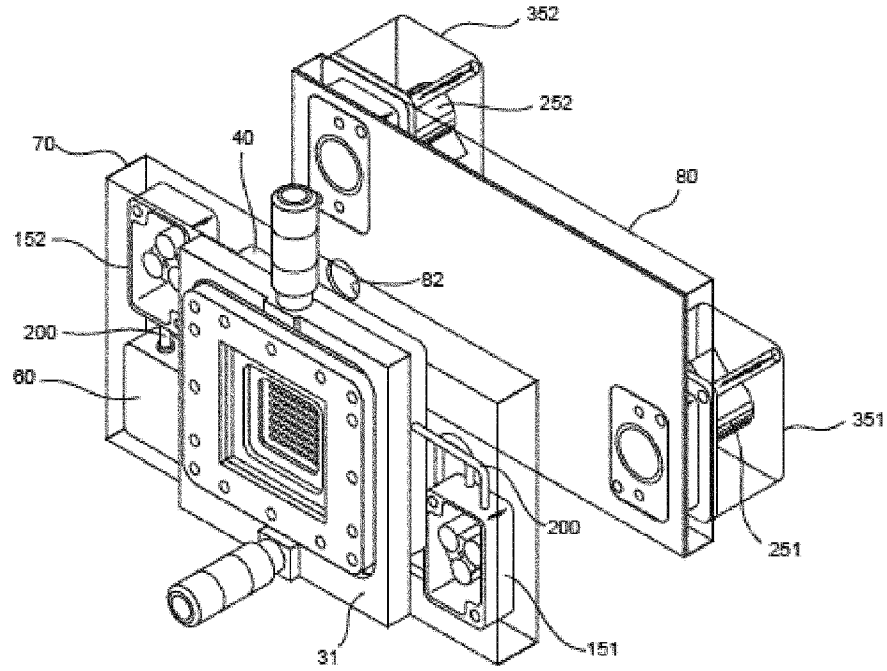
[図5]



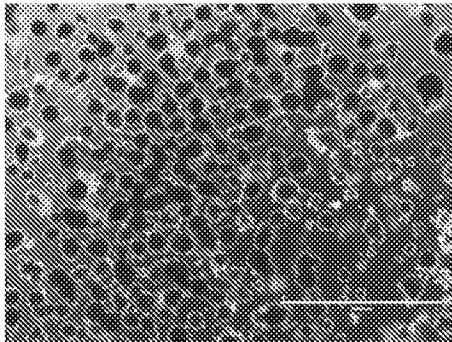
[図6]



[図7]

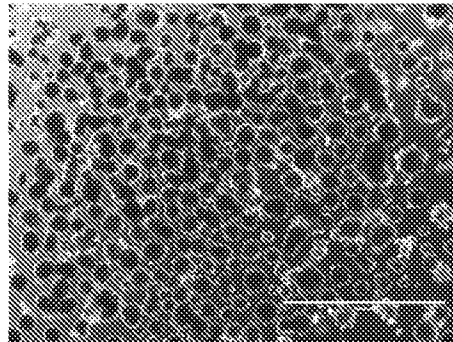


[図8]



(a)

チューブをインキュベーター内に配置して
培養されたiPS細胞の細胞塊

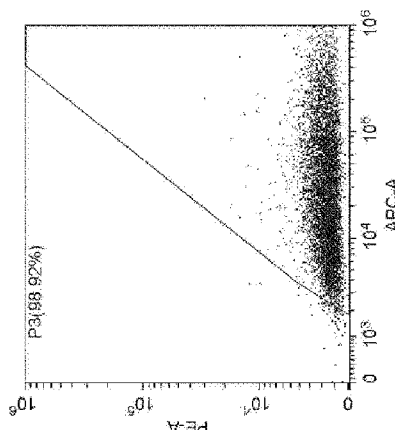
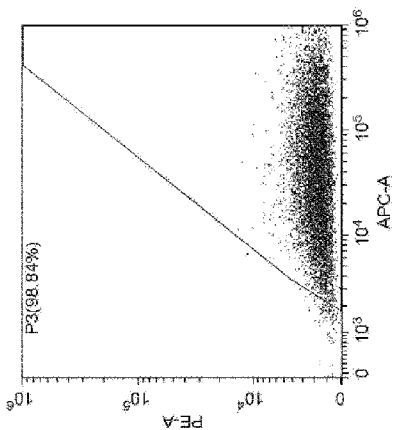


(b)

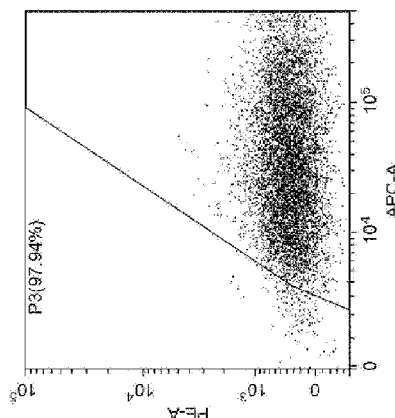
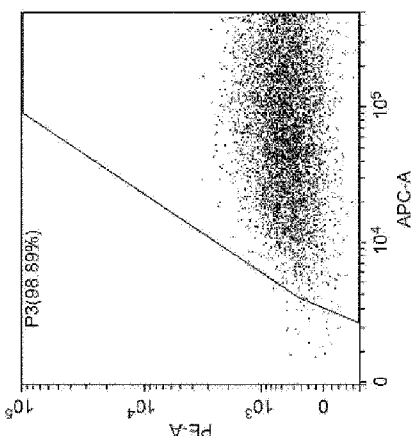
チューブをビーズバスに配置して
培養されたiPS細胞の細胞塊

[9]

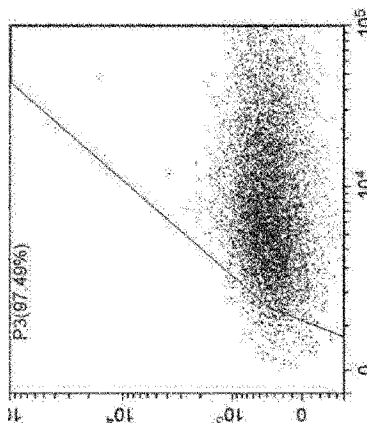
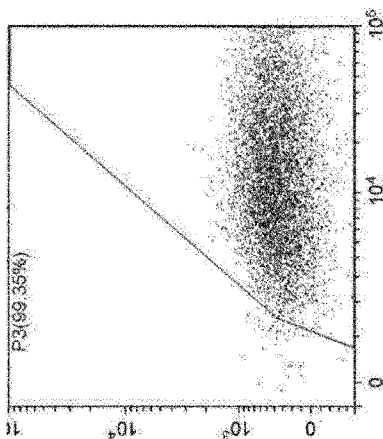
Day38



Day28



Day8



チューブを
インキュベーター内
に配置

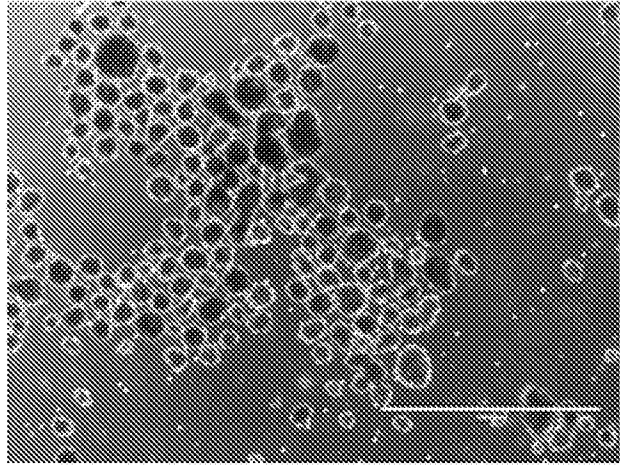
チューブを
ビーズバス
に配置

TRA-1-60

[図10]



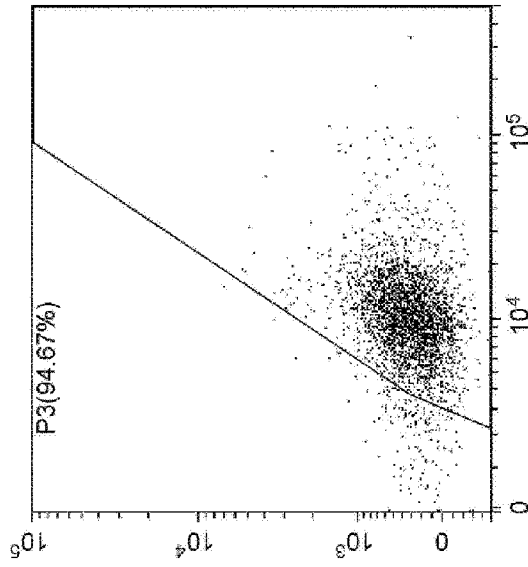
(a)



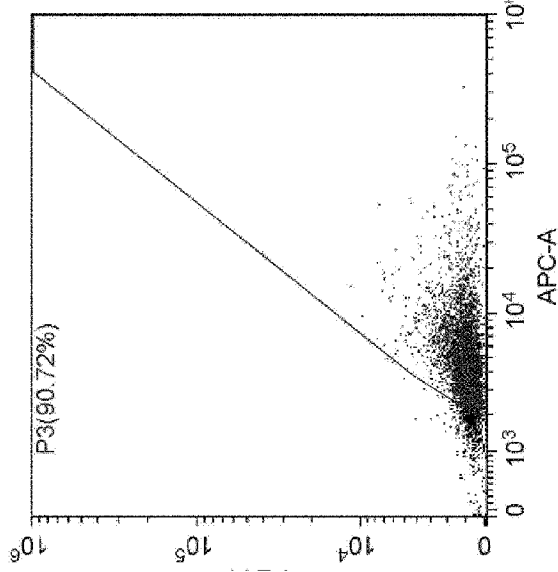
(b)

[11]

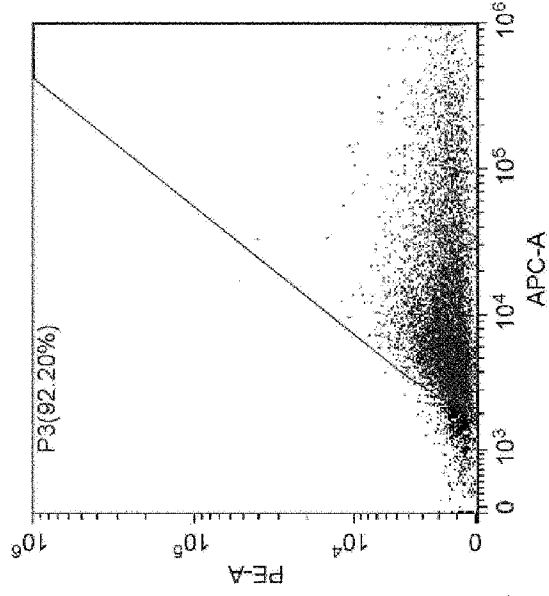
Day10



Day21



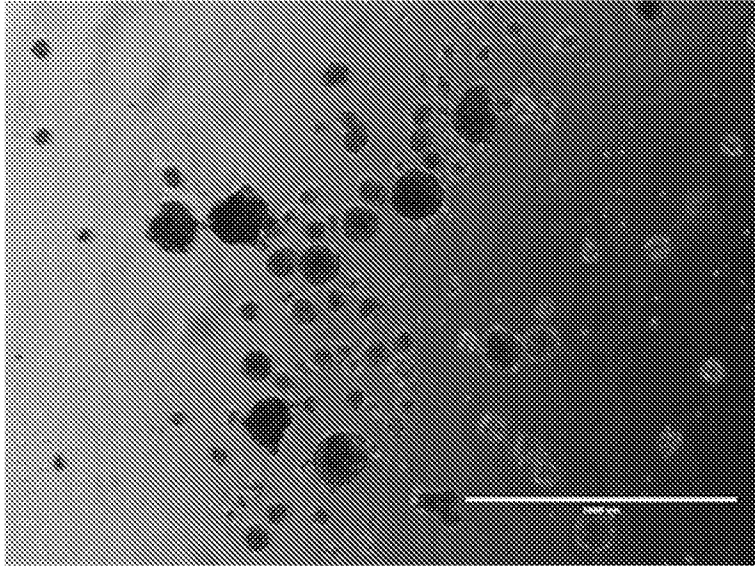
Day30




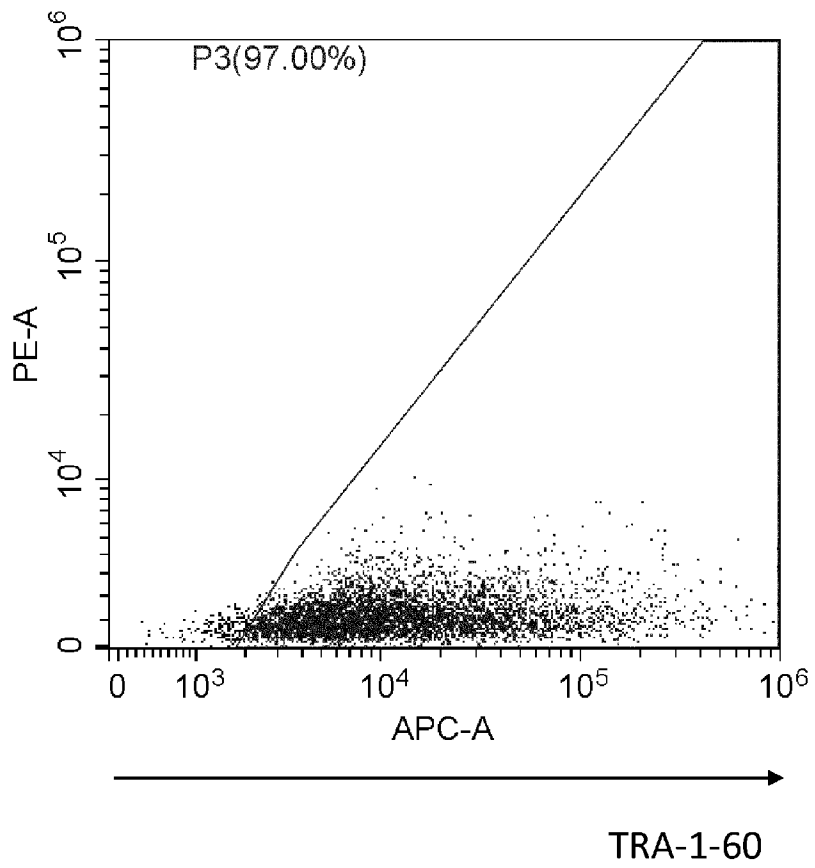
TRA-1-60



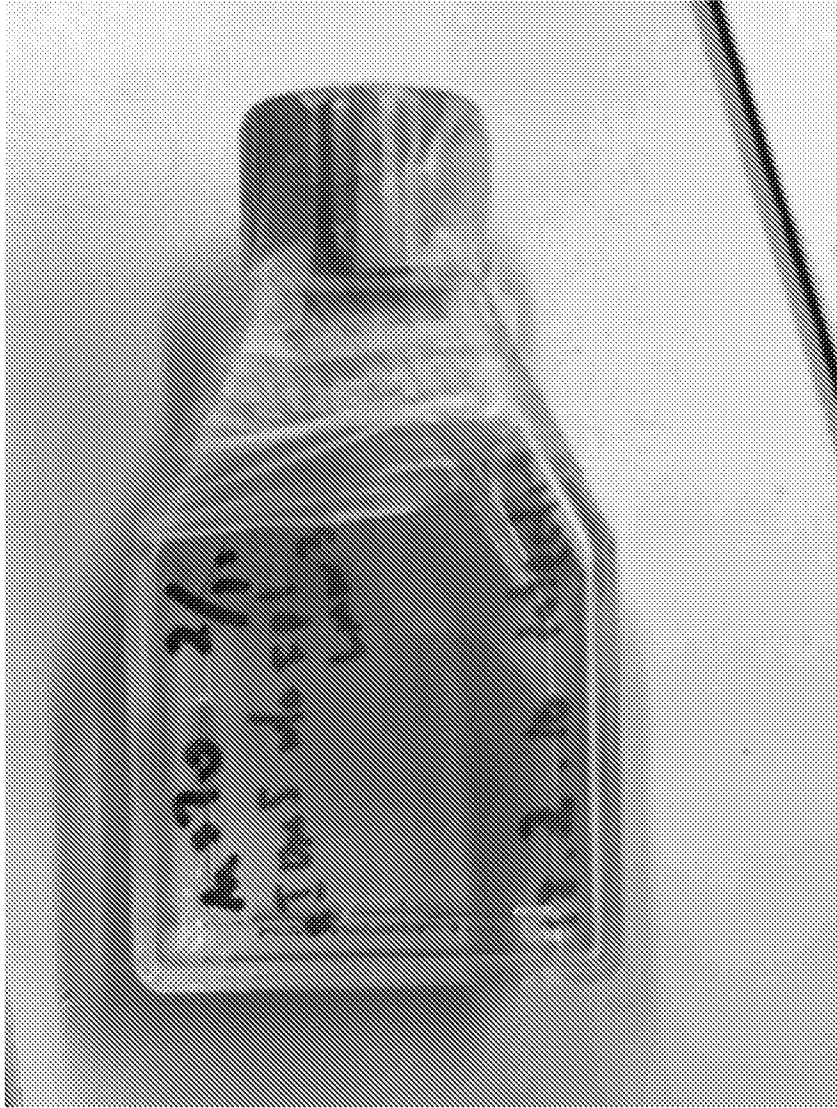
[12]



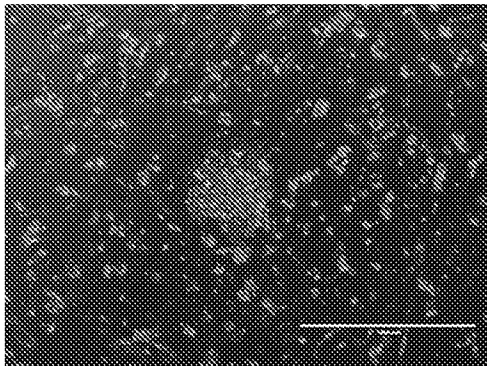
[13]



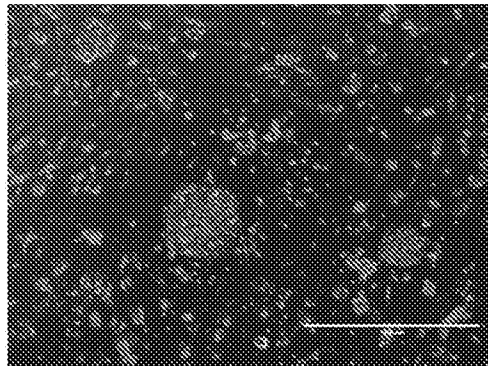
[図14]



[図15]



(a)



(b)

[図16]

コロニー数

160

80

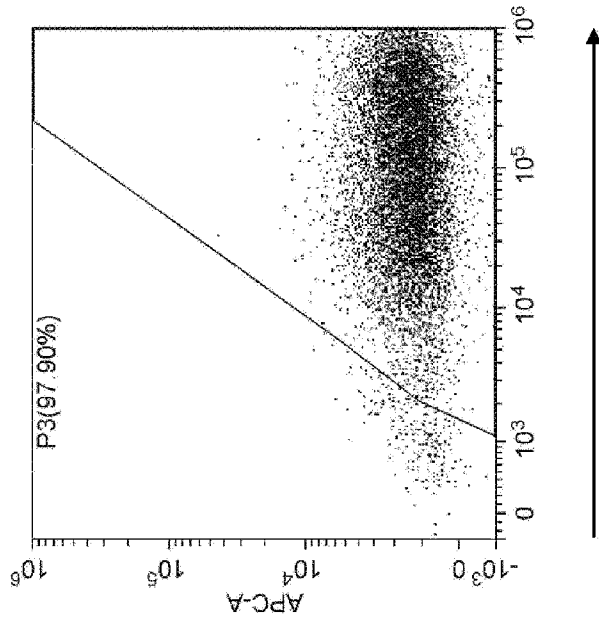
0



ES細胞様コロニー

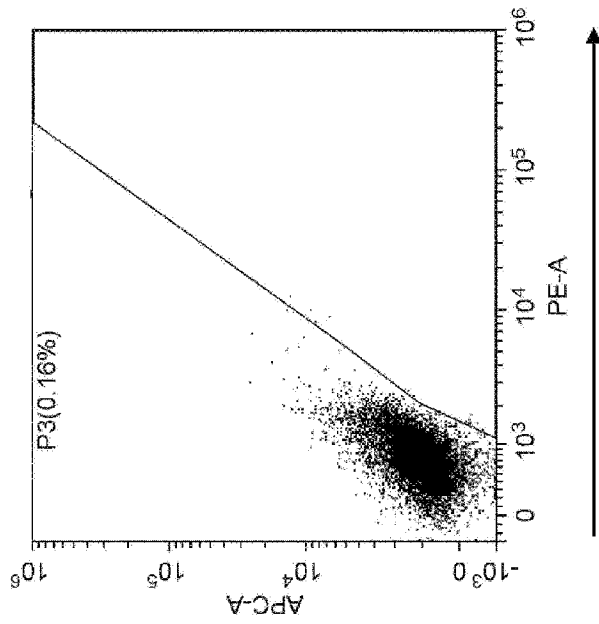
非ES細胞様コロニー

[17]



TRA-1-60

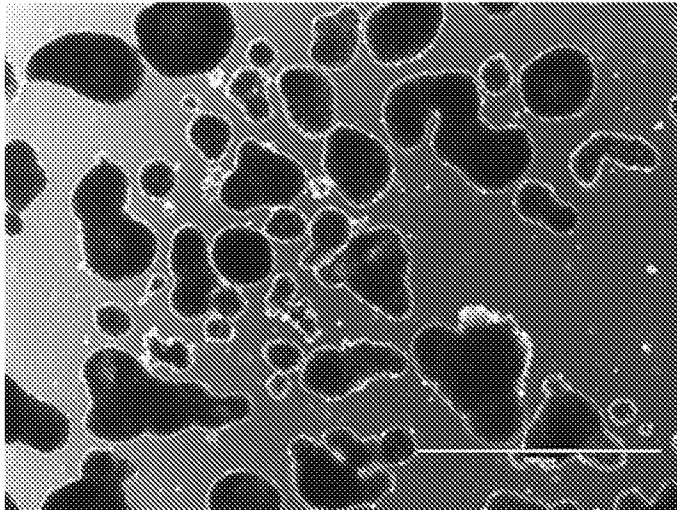
(b)




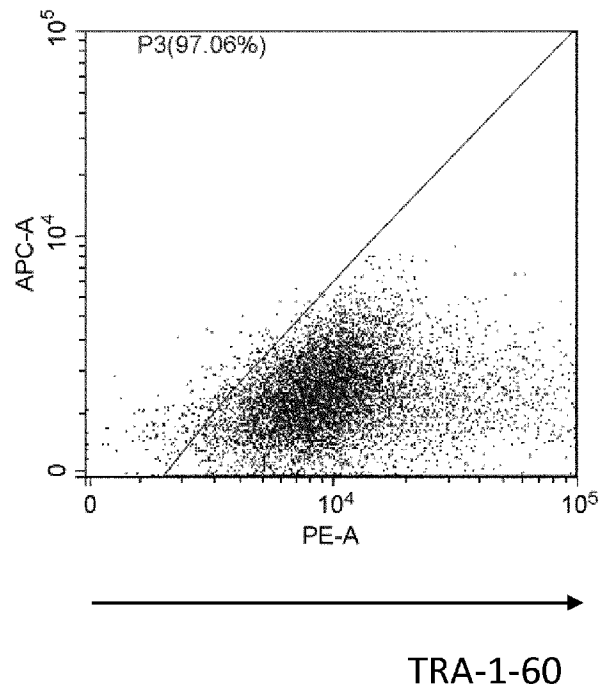
TRA-1-60

(a)

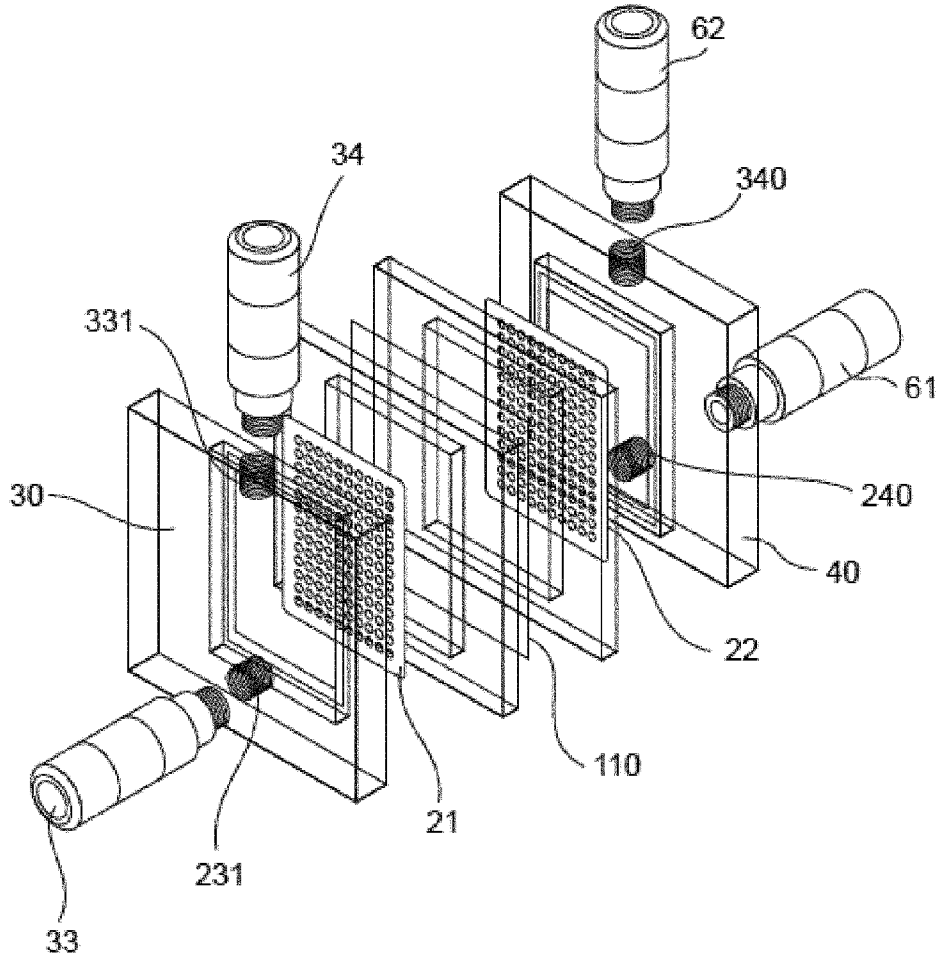
[18]



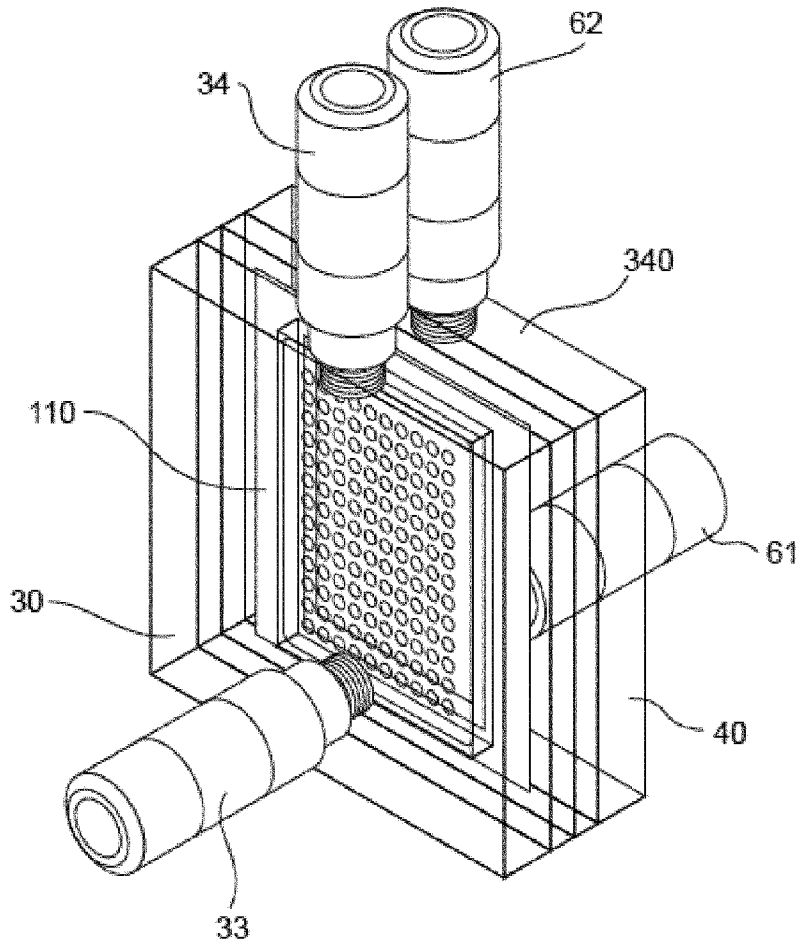
[19]



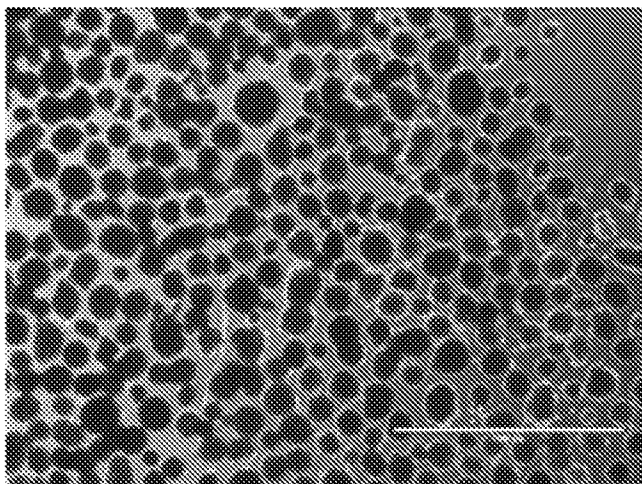
[図20]



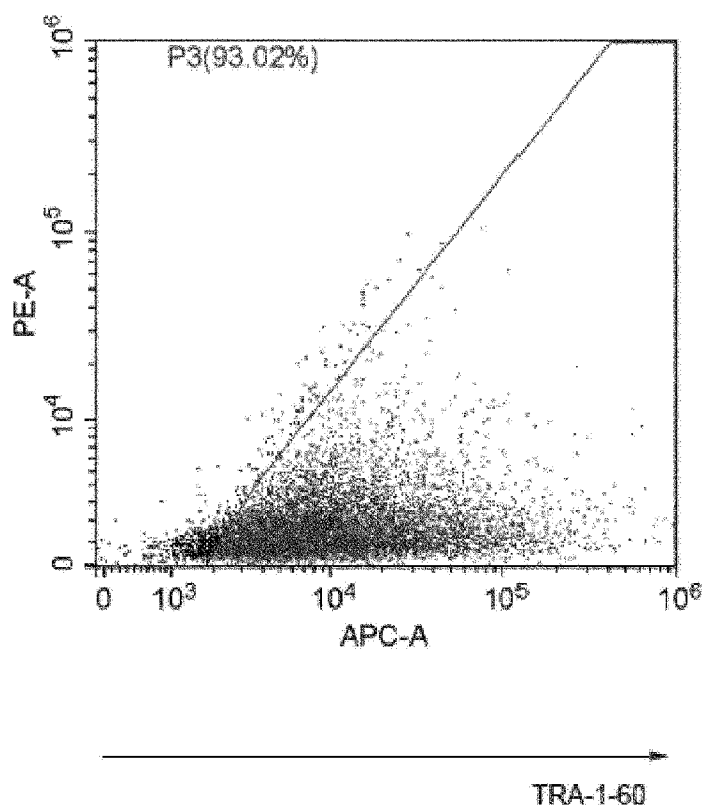
[図21]




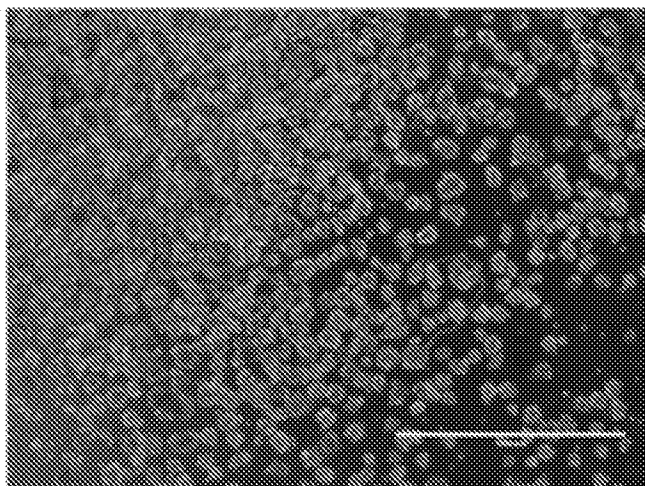
[圖22]




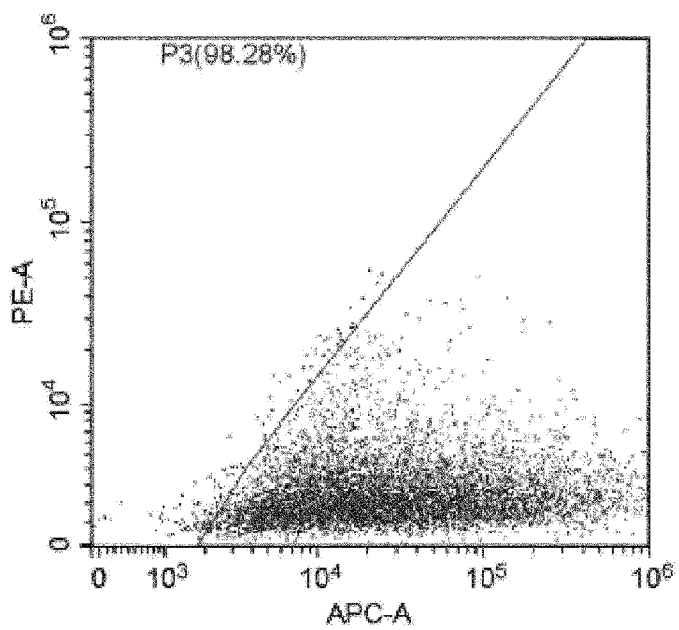
[圖23]



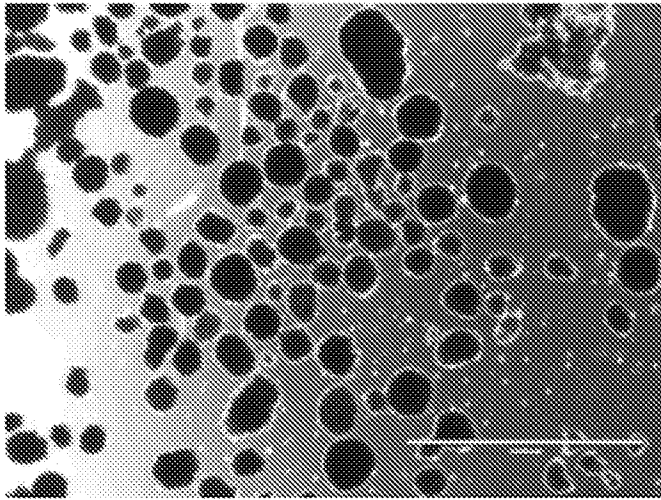
[24]



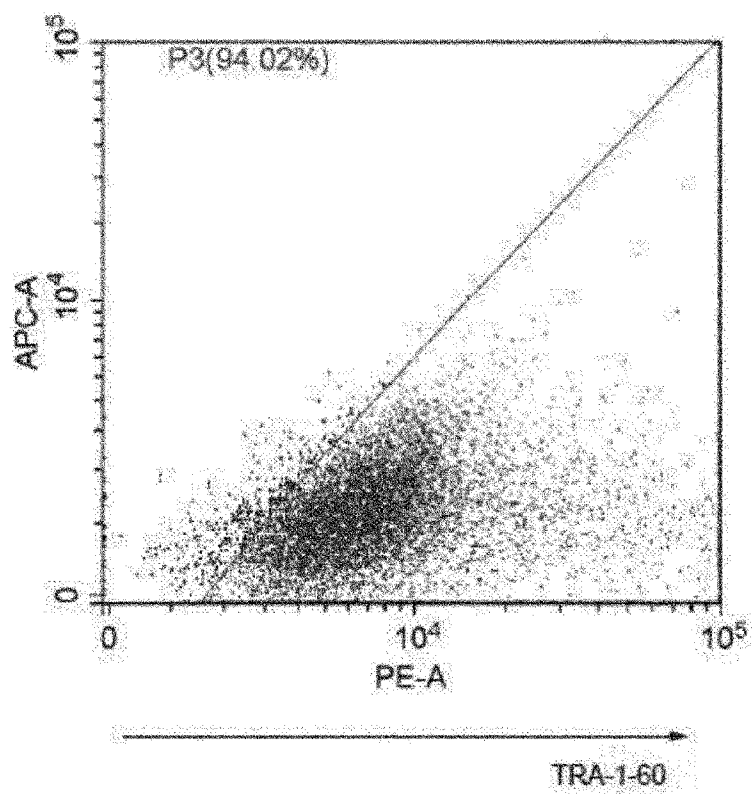
[25]



[図26]



[図27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/032438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/10 (2006.01) i, C12N5/078 (2010.01) i, C12N15/09 (2006.01) i,
C12M3/06 (2006.01) n

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. C12N5/10, C12N5/078, C12N15/09, C12M3/06

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/038887 A1 (I PEACE, INC.) 09 March 2017, claims, paragraphs [0163], [0181], [0266], [0277],	1-15, 21-33,
Y	[0309], [0311], [0314], examples 1-2, all drawings & US 2018/0245041 A1, claims, paragraphs [0206], [0224], [0310], [0321], [0353], [0355], [0358], examples 1-2, figures & JP 2018-526992 A & US 2018/0273891 A1 & WO 2017/040548 A1 & EP 3345990 A1 & EP 3344755 A1 & CN 108138113 A & CN 108138130 A	38-53 1-70

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- “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
12 November 2019 (12.11.2019)

Date of mailing of the international search report
26 November 2019 (26.11.2019)

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/JP2019/032438

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 61-108373 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 27 May 1986, claims, page 6, examples 1-2, all drawings & US 4748124 A, claims, column 6, examples 1-2, figures & EP 180165 A2	1, 5-7, 11-12, 23, 27-28, 30, 32, 42-43, 54, 56, 58, 60-61, 70
Y		1-70
X	US 5153131 A (WOLF, David A.) 06 October 1992, claim 8, columns 7, 9-10, all drawings (Family: none)	1, 5-7, 11-12, 23, 27, 30-31, 42-43, 54, 56, 58, 60-61, 65, 70
Y		1-70

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12M3/06(2006.01)n</p>												
<p>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. C12N5/10, C12N5/078, C12N15/09, C12M3/06</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>			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		
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											
<p>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)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017/038887 A1 (アイ・ピース株式会社) 2017.03.09, 請求項, 段落0163, 0181, 0266, 0277, 0309, 0311, 0314, 実施例1-2, 全図 & US 2018/0245041 A1, Claims, Paragraphs 0206, 0224, 0310, 0321, 0353, 0355, 0358, Examples 1-2, Figures & JP 2018-526992 A & US 2018/0273891 A1 & WO 2017/040548 A1 & EP 3345990 A1 & EP 3344755 A1 & CN 108138113 A & CN 108138130 A</td> <td>1-15, 21-33, 38-53 1-70</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2017/038887 A1 (アイ・ピース株式会社) 2017.03.09, 請求項, 段落0163, 0181, 0266, 0277, 0309, 0311, 0314, 実施例1-2, 全図 & US 2018/0245041 A1, Claims, Paragraphs 0206, 0224, 0310, 0321, 0353, 0355, 0358, Examples 1-2, Figures & JP 2018-526992 A & US 2018/0273891 A1 & WO 2017/040548 A1 & EP 3345990 A1 & EP 3344755 A1 & CN 108138113 A & CN 108138130 A	1-15, 21-33, 38-53 1-70				
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X	WO 2017/038887 A1 (アイ・ピース株式会社) 2017.03.09, 請求項, 段落0163, 0181, 0266, 0277, 0309, 0311, 0314, 実施例1-2, 全図 & US 2018/0245041 A1, Claims, Paragraphs 0206, 0224, 0310, 0321, 0353, 0355, 0358, Examples 1-2, Figures & JP 2018-526992 A & US 2018/0273891 A1 & WO 2017/040548 A1 & EP 3345990 A1 & EP 3344755 A1 & CN 108138113 A & CN 108138130 A	1-15, 21-33, 38-53 1-70										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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)	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 12.11.2019</p>	<p>国際調査報告の発送日 26.11.2019</p>											
<p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 木原 啓一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 4 8 6 7</p>										

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
X	JP 61-108373 A (イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー) 1986.05.27, 特許請求の範囲, 第6頁, 実施例1-2, 全図 & US 4748124 A, Claims, Column 6, Examples 1-2, Figures & EP 180165 A2	1, 5-7, 11-12, 23, 27-28, 30, 32, 42-43, 54, 56, 58, 60-61, 70
Y		1-70
X	US 5153131 A (WOLF, David A.) 1992.10.06, 請求項8, 第7, 9-10欄, 全図 (ファミリーなし)	1, 5-7, 11-12, 23, 27, 30-31, 42-43, 54, 56, 58, 60-61, 65, 70
Y		1-70