



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113785049 A

(43) 申请公布日 2021. 12. 10

(21) 申请号 202080033351.6

(22) 申请日 2020.06.10

(30) 优先权数据

62/859,307 2019.06.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/022839 2020.06.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/250927 JA 2020.12.17

(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 平出亮二 须藤健太

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司 11286

代理人 金玉兰 周爽

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/38 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

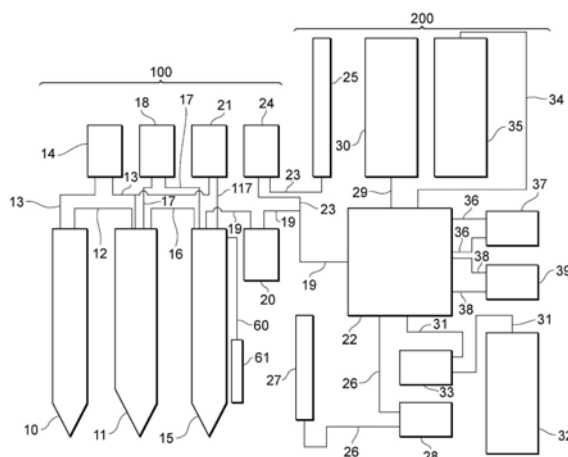
权利要求书2页 说明书23页 附图17页

(54) 发明名称

红细胞除去装置、单核细胞回收器、细胞培养装置、细胞培养系统、细胞培养方法及单核细胞的回收方法

(57) 摘要

提供一种细胞的培养方法,在细胞培养器内向细胞导入因子,并在与上述细胞培养器相同的细胞培养器内培养导入了上述因子的细胞。另外,提供一种单核细胞的回收方法,其包括:对血液进行处理,制作至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液;对处理血液进行稀释;使稀释后的处理血液中所含的单核细胞沉降;除去稀释后的处理血液的上清液;以及回收单核细胞。



1. 一种细胞的培养方法,其特征在于,在细胞培养器内向细胞导入因子,在与所述细胞培养器相同的细胞培养器内对导入了所述因子的细胞进行培养。
2. 根据权利要求1所述的细胞的培养方法,其特征在于,在向所述细胞导入因子并对导入了所述因子的细胞进行培养的期间,将所述细胞培养器封闭。
3. 根据权利要求1或2所述的细胞的培养方法,其特征在于,在所述细胞培养器连接有容积可变容器,流体在所述细胞培养器和所述容积可变容器内移动。
4. 根据权利要求3所述的细胞的培养方法,其特征在于,从所述容积可变容器供给所述因子。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的细胞的培养方法,其特征在于,在与所述细胞培养器相同的细胞培养器内将导入有所述因子的第1状态的细胞诱导为第2状态的细胞。
6. 根据权利要求5所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第1状态的细胞为体细胞。
7. 根据权利要求5或6所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第2状态的细胞为干细胞。
8. 根据权利要求5或6所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第2状态的细胞为iPS细胞。
9. 根据权利要求5所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第1状态的细胞为干细胞。
10. 根据权利要求5所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第2状态的细胞为体细胞。
11. 根据权利要求5所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第1状态的细胞为体细胞,所述第2状态的细胞为与所述第1状态的细胞不同的体细胞。
12. 根据权利要求5所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述第1状态的细胞为至少部分地除去了血小板和红细胞中的至少一者的血液细胞。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述因子是将第1状态的细胞诱导为第2状态的细胞的因子。
14. 根据权利要求1至8中任一项所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述因子为初始化因子。
15. 根据权利要求1至5中任一项所述的细胞的培养方法,其特征在于,所述因子为分化诱导因子。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的细胞的培养方法,其特征在于,从所述细胞培养器回收导入了所述因子的细胞,使所述细胞返回到与所述细胞培养器相同的细胞培养器,对所述细胞进行传代培养或扩增培养。
17. 一种单核细胞的回收方法,其特征在于,包括:
对血液进行处理而制作至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液;
对所述处理血液进行稀释;
使所述稀释后的处理血液中所含的单核细胞沉降;
除去所述稀释后的处理血液的上清液;以及
回收所述单核细胞。
18. 根据权利要求17所述的单核细胞的回收方法,其特征在于,在红细胞除去器内制作

所述处理血液，

在单核细胞回收器内进行所述处理血液的稀释、所述单核细胞的沉降和所述上清液的除去，将所述红细胞除去器和所述单核细胞回收器封闭。

19. 根据权利要求17或18所述的单核细胞的回收方法，其特征在于，利用红细胞沉降剂或红细胞除去剂对所述血液进行处理。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的单核细胞的回收方法，其特征在于，在所述回收了的单核细胞中，至少部分地除去血小板和红细胞中的至少一者。

红细胞除去装置、单核细胞回收器、细胞培养装置、细胞培养系统、细胞培养方法及单核细胞的回收方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞技术,涉及红细胞除去装置、单核细胞回收器、细胞培养装置、细胞培养系统、细胞培养方法及单核细胞的回收方法。

背景技术

[0002] 胚胎干细胞(ES细胞)是由人、小鼠的早期胚胎建立的干细胞。ES细胞具有能够分化为生物体中存在的所有细胞的多能性。目前,人ES细胞可以用于针对帕金森病、幼年型糖尿病和白血病等多种疾病的细胞移植疗法。但是,ES细胞的移植也存在障碍。特别是,ES细胞的移植可能引起与不成功的脏器移植后发生的排斥反应同样的免疫排斥反应。另外,对于破坏人胚胎而建立的ES细胞的应用而言,从伦理的观点出发,批评或反对意见多。

[0003] 在这样的背景状况下,京都大学的山中伸弥教授通过将4种基因:OCT3/4、KLF4、c-MYC和SOX2导入至体细胞中,成功建立了诱导性多能干细胞(iPS细胞)。由此,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、2)。iPS细胞是没有排斥反应、伦理问题的理想的多能性细胞。因此,期待iPS细胞在细胞移植疗法中的应用。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本专利第4183742号公报

[0007] 专利文献2:日本特开2014-114997号公报

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] iPS细胞有时由血液细胞诱导。不限于诱导iPS细胞的用途,期望能够有效地对血液细胞进行处理的技术。另外,不限于iPS细胞,期望能够高效地培养各种细胞的装置。因此,本发明的目的之一在于提供红细胞除去装置、单核细胞回收器、细胞培养装置、细胞培养系统、细胞培养方法及单核细胞的回收方法。

[0010] 技术方案

[0011] 根据本发明的方式,提供一种红细胞除去装置,其具备容纳血液的血液容器、从血液容器接受血液并从血液中至少部分地除去红细胞的红细胞除去器、以及用于至少将血液从血液容器输送至红细胞除去器的流路。

[0012] 在上述红细胞除去装置中,可以是,用于从血液容器向红细胞除去器输送血液的流路的内部能够相对于外部空气封闭。

[0013] 上述红细胞除去装置可以还具备单核细胞回收器和流路,所述单核细胞回收器接受从红细胞除去器中至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液,并从处理血液中回收单核细胞,所述流路用于至少将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液从红细胞除去器输送至单核细胞回收器。

- [0014] 在上述红细胞除去装置中,可以是,红细胞除去器能够除去内部的气体。
- [0015] 上述红细胞除去装置可以还具备供至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液流动的流路,供至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液流动的流路的内部能够相对于外部空气封闭。
- [0016] 在上述红细胞除去装置中,可以是,单核细胞回收器能够除去内部的气体。
- [0017] 在上述红细胞除去装置中,可以是,血液容器的内部和红细胞除去器的内部能够相对于外部空气封闭。
- [0018] 在上述红细胞除去装置中,可以是,单核细胞回收器的内部能够相对于外部空气封闭。
- [0019] 在上述红细胞除去装置中,包含血液容器的内部和红细胞除去器的内部的封闭空间可以不与外部进行气体的交换。
- [0020] 在上述红细胞除去装置中,血液容器和红细胞除去器可以被包埋。
- [0021] 在上述红细胞除去装置中,血液容器的至少一部分和/或红细胞除去器的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。
- [0022] 在上述红细胞除去装置中,单核细胞回收器可以被包埋。
- [0023] 在上述红细胞除去装置中,单核细胞回收器的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。
- [0024] 在上述红细胞除去装置中,可以是,在红细胞除去器内,血液与红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方混合。
- [0025] 上述红细胞除去装置可以还具备容纳红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方的红细胞处理剂容器,红细胞除去器从红细胞处理剂容器接受红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方。
- [0026] 上述红细胞除去装置可以还具备将血液与红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方混合的混合器,红细胞除去器从混合器接受与红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方混合后的血液。
- [0027] 在上述红细胞除去装置中,混合器可以具备供血液与红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方的混合液流动的弯折流路。
- [0028] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将血液从血液容器输送至红细胞除去器的流路。
- [0029] 上述红细胞除去装置可以具备真空容器,所述真空容器与用于至少将血液从血液容器输送至红细胞除去器的流路连接,能够使内部成为真空。
- [0030] 上述红细胞除去装置可以还具备容纳红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方的红细胞处理剂容器、以及用于从红细胞处理剂容器向红细胞除去器输送红细胞沉降剂和红细胞除去剂中的至少一方的流路。
- [0031] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将血液从血液容器输送至红细胞除去器的流体机械。
- [0032] 在上述红细胞除去装置中,可以是,血液容器能够变更该血液容器的容积。
- [0033] 在上述红细胞除去装置中,可以是,红细胞除去器能够变更该红细胞除去器的容积。

- [0034] 在上述红细胞除去装置中,可以是,单核细胞回收器能够变更该单核细胞回收器的容积。
- [0035] 在上述红细胞除去装置中,可以是,红细胞处理剂容器能够变更该红细胞处理剂容器的容积。
- [0036] 在上述红细胞除去装置中,可以是,在红细胞除去器内,红细胞沉降,红细胞除去器内的上清液以至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液的形式被输送至单核细胞回收器。
- [0037] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液从红细胞除去器输送至单核细胞回收器的流路。
- [0038] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液从红细胞除去器输送至单核细胞回收器的流体机械。
- [0039] 在上述红细胞除去装置中,可以是,在单核细胞回收器内,对至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液进行稀释。
- [0040] 在上述红细胞除去装置中,单核细胞可以在单核细胞回收器内沉降。
- [0041] 在上述红细胞除去装置中,血小板可以在处理血液的稀释液中悬浮。
- [0042] 在上述红细胞除去装置中,可以是,在处理血液的稀释液中,红细胞通过红细胞除去剂而溶血。
- [0043] 上述红细胞除去装置可以还具备稀释用液容器,所述稀释用液容器容纳用于对至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液进行稀释的稀释用液。
- [0044] 在上述红细胞除去装置中,稀释用液可以是缓冲液。
- [0045] 在上述红细胞除去装置中,可以是,稀释用液容器能够变更该稀释用液容器的容积。
- [0046] 在上述红细胞除去装置中,可以在单核细胞在单核细胞回收器内沉降后除去单核细胞回收器内的上清液。
- [0047] 在上述红细胞除去装置中,可以通过除去上清液来除去悬浮于上清液中的血小板。
- [0048] 在上述红细胞除去装置中,可以通过除去上清液来除去悬浮于上清液中的溶血的红细胞的成分。
- [0049] 在上述红细胞除去装置中,可以在单核细胞回收器的底部设置有第1开口,在重力方向上高于第1开口的位置设置有第2开口。
- [0050] 在上述红细胞除去装置中,可以是,单核细胞回收器的底部为漏斗状,在漏斗状的底部的前端设置有第1开口,在漏斗状的底部的侧面设置有第2开口。
- [0051] 在上述红细胞除去装置中,如果向单核细胞回收器导入至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液,则可以在底部蓄积单核细胞,从第2开口排出上清液。
- [0052] 在上述红细胞除去装置中,可以通过排出上清液来除去悬浮于上清液中的血小板。
- [0053] 在上述红细胞除去装置中,可以通过排出上清液来除去悬浮于上清液中的溶血的红细胞的成分。
- [0054] 上述红细胞除去装置可以还具备从第1开口抽吸单核细胞的单核细胞抽吸装置。

[0055] 在上述红细胞除去装置中,第1开口的大小可以设定为:在单核细胞不被单核细胞抽吸装置抽吸的情况下,单核细胞堵塞第1开口。

[0056] 上述红细胞除去装置可以还具备用于将红细胞除去器内的流体输送至血液容器的流路。

[0057] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将血液从血液容器输送至红细胞除去器的流体机械、以及用于将红细胞除去器内的流体输送至血液容器的流体机械中的至少一方。

[0058] 上述红细胞除去装置可以还具备用于将单核细胞回收器内的流体输送至红细胞除去器的流路。

[0059] 上述红细胞除去装置可以还具备用于至少将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液从红细胞除去器输送至单核细胞回收器的流体机械、以及用于将单核细胞回收器内的流体输送至红细胞除去器的流体机械中的至少一方。

[0060] 根据本发明的方式,提供一种单核细胞回收器,其具备容纳包含单核细胞的溶液的回收容器,其中,回收容器的底部呈漏斗状,在漏斗状的底部的前端设置有第1开口,在漏斗状的底部的侧面设置有第2开口。

[0061] 在上述单核细胞回收器中,可以是,如果向回收容器导入溶液,则单核细胞蓄积于漏斗状的底部的前端,溶液从第2开口排出。

[0062] 上述单核细胞回收器可以还具备抽吸蓄积于漏斗状的底部的前端的单核细胞的单核细胞抽吸装置。

[0063] 在上述单核细胞回收器中,第1开口的大小可以设定为:在单核细胞不被单核细胞抽吸装置抽吸的情况下,单核细胞堵塞第1开口。

[0064] 根据本发明的方式,提供一种细胞培养装置,其具备用于培养细胞的细胞培养器和与细胞培养器连接的容积可变容器,流体能够在细胞培养器和容积可变容器内移动。

[0065] 上述细胞培养装置可以至少具备第1容积可变容器和第2容积可变容器作为容积可变容器。

[0066] 在上述细胞培养装置中,可以是,如果细胞培养器内的流体移动到第1容积可变容器内,则第1容积可变容器的容积膨胀,第2容积可变容器的容积收缩。

[0067] 在上述细胞培养装置中,可以是,如果第1容积可变容器内的流体移动到细胞培养器内,则第1容积可变容器的容积收缩,第2容积可变容器的容积膨胀。

[0068] 在上述细胞培养装置中,可以是,如果第2容积可变容器内的流体移动到细胞培养器内,则第2容积可变容器的容积收缩,第1容积可变容器的容积膨胀。

[0069] 在上述细胞培养装置中,细胞培养器的内部、第1容积可变容器的内部和第2容积可变容器的内部可以相对于外部空气封闭。

[0070] 在上述细胞培养装置中,细胞培养器、第1容积可变容器和第2容积可变容器可以被包埋。

[0071] 在上述细胞培养装置中,细胞培养器的至少一部分、第1容积可变容器的至少一部分和第2容积可变容器的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。

[0072] 在上述细胞培养装置中,可以是第1容积可变容器容纳物质,通过流体的移动而使物质与细胞接触。

- [0073] 在上述细胞培养装置中,可以是物质为诱导因子,通过流体的移动而向细胞导入诱导因子。
- [0074] 上述细胞培养装置可以还具备用于使细胞培养器内的流体向第1容积可变容器移动的流体机械。
- [0075] 上述细胞培养装置可以还具备用于使细胞培养器内的流体向第2容积可变容器移动的流体机械。
- [0076] 上述细胞培养装置可以还具备用于向细胞培养器内供给细胞的流路。
- [0077] 上述细胞培养装置可以还具备与用于向细胞培养器内供给细胞的流路连接的、用于供给培养液的流路。
- [0078] 在上述细胞培养装置中,可以是,细胞与培养液在用于向细胞培养器内供给细胞的流路内混合,包含细胞的培养液被供给至细胞培养器内。
- [0079] 在上述细胞培养装置中,可以是,在从用于供给细胞的流路向细胞培养器内导入细胞时,第1容积可变容器和第2容积可变容器中的至少一者的容积膨胀。
- [0080] 上述细胞培养装置可以还具备用于向细胞培养器内供给细胞的流体机械。
- [0081] 在上述细胞培养装置中,细胞可以为体细胞或干细胞。
- [0082] 上述细胞培养装置可以还具备容纳供给至细胞培养器内的流体的流体容器。
- [0083] 在上述细胞培养装置中,流体可以为体细胞培养基或干细胞培养基。
- [0084] 在上述细胞培养装置中,干细胞培养基可以为诱导培养基、扩增培养基或维持培养基。
- [0085] 在上述细胞培养装置中,可以是,在从流体容器向细胞培养器内供给流体时,第1容积可变容器和第2容积可变容器中的至少任一个的容积膨胀。
- [0086] 上述细胞培养装置可以还具备用于向细胞培养器内供给流体的流体机械。
- [0087] 上述细胞培养装置可以还具备调节细胞培养器内的温度的温度调节部。
- [0088] 在上述细胞培养装置中,可以在细胞培养器内粘附培养细胞。
- [0089] 在上述细胞培养装置中,可以用细胞粘附性涂布剂对细胞培养器内进行涂布。
- [0090] 在上述细胞培养装置中,可以在细胞培养器内悬浮培养细胞。
- [0091] 上述细胞培养装置可以还具备配置于细胞培养器内的中空纤维膜。
- [0092] 在上述细胞培养装置中,可以在中空纤维膜的内侧培养细胞。
- [0093] 在上述细胞培养装置中,可以使细胞培养器内的细胞移动到容积可变容器。
- [0094] 上述细胞培养装置可以还具备与细胞培养器连接的流路和设置于该流路的流体机械,流体机械将细胞培养器内的细胞抽吸到流路,使流路内的细胞返回到细胞培养器内,由此进行细胞的传代培养和扩增培养中的至少一者。
- [0095] 在上述细胞培养装置中,流路可以具有将细胞团分割的结构。
- [0096] 根据本发明的方式,提供一种细胞培养系统,其具备从血液中回收单核细胞的单核细胞回收器、和从单核细胞回收器接受单核细胞的细胞培养器。
- [0097] 在上述细胞培养系统中,可以是单核细胞回收器接受至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液,从处理血液中回收单核细胞。
- [0098] 上述细胞培养系统可以还具备用于向单核细胞回收器供给至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液的红细胞除去器。

- [0099] 上述细胞培养系统可以还具备血液容器,所述血液容器用于向红细胞除去器供给至少部分地除去了红细胞之前的血液。
- [0100] 上述细胞培养系统可以具备与细胞培养器连接的容积可变容器,如果细胞培养器内的流体移动至容积可变容器,则容积可变容器的容积膨胀。
- [0101] 上述细胞培养系统可以具备与细胞培养器连接的第1容积可变容器和与细胞培养器连接的第2容积可变容器,如果细胞培养器内的流体移动至第1容积可变容器,则第1容积可变容器的容积膨胀,第2容积可变容器的容积收缩。
- [0102] 在上述细胞培养系统中,单核细胞回收器的内部和细胞培养器的内部可以相对于外部空气能够封闭。
- [0103] 在上述细胞培养系统中,红细胞除去器的内部可以相对于外部空气能够封闭。
- [0104] 在上述细胞培养系统中,血液容器的内部可以相对于外部空气能够封闭。
- [0105] 在上述细胞培养系统中,第1容积可变容器的内部和第2容积可变容器的内部可以相对于外部空气能够封闭。
- [0106] 在上述细胞培养系统中,血液容器、红细胞除去器、单核细胞回收器和细胞培养器可以被包埋。
- [0107] 在上述细胞培养系统中,血液容器的至少一部分、红细胞除去器的至少一部分、单核细胞回收器的至少一部分和细胞培养器的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。
- [0108] 在上述细胞培养系统中,第1容积可变容器和第2容积可变容器可以被包埋。
- [0109] 在上述细胞培养系统中,第1容积可变容器的至少一部分和第2容积可变容器的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。
- [0110] 在上述细胞培养系统中,第1容积可变容器的内部和第2容积可变容器的内部也可以不与外部进行气体的交换。
- [0111] 根据本发明的方式,提供一种细胞的培养方法,其在细胞培养器内向细胞导入因子,在与细胞培养器相同的细胞培养器内对导入了因子的细胞进行培养。
- [0112] 在上述细胞的培养方法中,可以是,在向细胞导入因子并对导入了因子的细胞进行培养的期间,将细胞培养器封闭。
- [0113] 在上述细胞的培养方法中,可以在细胞培养器连接有容积可变容器,使流体在细胞培养器和容积可变容器内移动。
- [0114] 在上述细胞的培养方法中,可以从容积可变容器供给因子。
- [0115] 在上述细胞的培养方法中,可以在相同的细胞培养器内将导入了因子的第1状态的细胞诱导为第2状态的细胞。
- [0116] 在上述细胞的培养方法中,可以是,第1状态为分化状态,第2状态为未分化状态。
- [0117] 在上述细胞的培养方法中,可以是,第1状态为脱分化状态,第2状态为分化状态。
- [0118] 在上述细胞的培养方法中,可以是,第1状态为脱分化状态,第2状态为与第1状态不同的脱分化状态。
- [0119] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以为体细胞。
- [0120] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以为血液细胞。
- [0121] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以为单核细胞。
- [0122] 在上述细胞的培养方法中,第2状态的细胞可以为干细胞。

- [0123] 在上述细胞的培养方法中,第2状态的细胞可以为iPS细胞。
- [0124] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以为干细胞。
- [0125] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以为iPS细胞。
- [0126] 在上述细胞的培养方法中,第2状态的细胞可以为体细胞。
- [0127] 在上述细胞的培养方法中,可以是,第1状态的细胞为体细胞,第2状态的细胞为与第1状态的细胞不同的体细胞。
- [0128] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以是至少部分地除去了红细胞的血液细胞。
- [0129] 在上述细胞的培养方法中,第1状态的细胞可以是至少部分地除去了血小板的血液细胞。
- [0130] 在上述细胞的培养方法中,因子可以是将第1状态的细胞诱导为第2状态的细胞的因子。
- [0131] 在上述细胞的培养方法中,因子可以是诱导特定的细胞状态的因子。
- [0132] 在上述细胞的培养方法中,因子可以是初始化因子。
- [0133] 在上述细胞的培养方法中,因子可以是分化诱导因子。
- [0134] 在上述细胞的培养方法中,可以从细胞培养器中回收导入了因子的细胞,将细胞返回到与该细胞培养器相同的细胞培养器,对细胞进行传代培养或扩增培养。
- [0135] 根据本发明的方式,提供一种单核细胞的回收方法,包括:对血液进行处理而制作至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液;对处理血液进行稀释;使稀释后的处理血液中所含的单核细胞沉降;除去稀释后的处理血液的上清液;以及回收单核细胞。
- [0136] 在上述单核细胞的回收方法中,可以在红细胞除去器内制作处理血液,在单核细胞回收器内进行处理血液的稀释、单核细胞的沉降和上清液的除去,将红细胞除去器和单核细胞回收器封闭。
- [0137] 在上述单核细胞的回收方法中,可以利用红细胞沉降剂或红细胞除去剂对血液进行处理。
- [0138] 在上述单核细胞的回收方法中,可以用磷酸缓冲液对处理血液进行稀释。
- [0139] 在上述单核细胞的回收方法中,稀释后的处理血液的上清液可以包含血小板。
- [0140] 在上述单核细胞的回收方法中,在回收后的单核细胞中,可以至少部分地除去红细胞。
- [0141] 在上述单核细胞的回收方法中,在回收后的单核细胞中,可以至少部分地除去血小板。
- [0142] 发明效果
- [0143] 根据本发明,能够提供红细胞除去装置、单核细胞回收器、细胞培养装置、细胞培养系统、细胞培养方法及单核细胞的回收方法。

附图说明

- [0144] 图1是第1实施方式的细胞培养系统的示意图。
- [0145] 图2是第1实施方式的单核细胞回收器的示意图。
- [0146] 图3是第2实施方式的红细胞除去装置的示意图。

- [0147] 图4是第3实施方式的红细胞除去装置的示意图。
- [0148] 图5是实施例1的细胞团的显微镜照片。
- [0149] 图6是表示实施例1的iPS细胞的流式细胞术的结果的直方图。
- [0150] 图7是实施例2的荧光激活细胞分选的分析结果。
- [0151] 图8的(a)是放入到实施例2的单核细胞回收器之前的处理血液的显微镜照片、图8的(b)是包含从单核细胞回收器回收的单核细胞的溶液的显微镜照片。
- [0152] 图9是表示放入到实施例2的单核细胞回收器之前的处理血液中的血小板数和包含从单核细胞回收器回收的单核细胞的溶液中的血小板数的图表。
- [0153] 图10的(a)是放入到实施例2的单核细胞回收器之前的加入有包含血小板的处理血液的培养液的照片、图10的(b)是加入有包含除去了血小板的单核细胞的溶液的培养液的照片。
- [0154] 图11是通过实施例3的iPS细胞的制作方法制作的细胞的显微镜照片。
- [0155] 图12是表示利用流式细胞术对通过实施例3的iPS细胞的制作方法制作的细胞进行分析的结果的直方图。
- [0156] 图13是通过实施例4的iPS细胞的制作方法制作的细胞的显微镜照片。
- [0157] 图14是表示利用流式细胞术对通过实施例4的iPS细胞的制作方法制作的细胞进行分析的结果的直方图。
- [0158] 图15是通过实施例5的iPS细胞的制作方法制作的细胞的显微镜照片。
- [0159] 图16是表示利用流式细胞术对通过实施例5的iPS细胞的制作方法制作的细胞进行分析的结果的直方图。
- [0160] 图17是通过实施例6的iPS细胞的制作方法制作的细胞的显微镜照片。
- [0161] 图18是表示利用流式细胞术对通过实施例6的iPS细胞的制作方法制作的细胞进行分析的结果的直方图。
- [0162] 符号说明
- [0163] 10 . . . 血液容器, 11 . . . 红细胞除去器, 12 . . . 流路, 13 . . . 流路, 14 . . . 流体机械, 15 . . . 单核细胞回收器, 16 . . . 流路, 17 . . . 流路, 18 . . . 流体机械, 19 . . . 流路, 20 . . . 单核细胞抽吸装置, 21 . . . 流体机械, 22 . . . 细胞培养器, 23 . . . 流路, 24 . . . 流体机械, 25 . . . 培养基容器, 26 . . . 流路, 27 . . . 容积可变容器, 28 . . . 流体机械, 29 . . . 流路, 30 . . . 容积可变容器, 31 . . . 流路, 32 . . . 培养基容器, 33 . . . 流体机械, 34 . . . 流路, 35 . . . 容积可变容器, 36 . . . 流路, 37 . . . 流体机械, 38 . . . 流路, 39 . . . 流体机械, 40 . . . 培养基保持槽, 50 . . . 血液容器, 51 . . . 流路, 52 . . . 流体机械, 53 . . . 红细胞处理剂容器, 54 . . . 流路, 55 . . . 流体机械, 56 . . . 流路, 57 . . . 混合器, 58 . . . 流路, 60 . . . 流路, 61 . . . 稀释用液容器, 70 . . . 真空容器, 71 . . . 真空容器, 100 . . . 红细胞除去装置, 101 . . . 红细胞除去装置, 115 . . . 开口, 116 . . . 开口, 117 . . . 流路, 200 . . . 细胞培养装置

具体实施方式

[0164] 以下,对本发明的实施方式进行说明。在以下的附图的记载中,对相同或类似的部

分用相同或类似的符号表示。然而,附图是示意性的。因此,具体的尺寸等应该对照以下的说明来判断。另外,当然在附图相互之间也包含彼此的尺寸的关系、比率不同的部分。

[0165] (第1实施方式)

[0166] 如图1所示,第1实施方式的红细胞除去装置100具备容纳血液的血液容器10、从血液容器10接受血液并从血液中至少部分地除去红细胞的红细胞除去器11。

[0167] 血液容器10在内部容纳血液。血液容器10可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括血液容器10的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体的交换。血液容器10可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。血液容器10的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。血液容器10的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。血液容器10可以能够改变该血液容器10的容积。

[0168] 红细胞除去器11例如在内部容纳红细胞沉降剂或红细胞除去剂。红细胞除去器11可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括红细胞除去器11的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。红细胞除去器11可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。红细胞除去器11的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。红细胞除去器11的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。红细胞除去器11可以能够改变该红细胞除去器11的容积。

[0169] 在血液容器10与红细胞除去器11之间设置有用于从血液容器10向红细胞除去器11输送血液的流路13。流路13可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路13的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路13可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路13的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路13的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0170] 另外,在血液容器10与红细胞除去器11之间设置有用于从红细胞除去器11向血液容器10输送空气等气体等流体的流路12。流路12可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路12的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路12可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路12的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路12的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0171] 血液容器10和流路12、13中的每一个可以通过连接器连接。连接器可以是无菌连接器。连接器可以是无针连接器。无针连接器可以是分隔膜型,也可以是机械阀型。

[0172] 在流路13设置有用于使流路13内的流体移动的泵等流体机械14。需要说明的是,可以在流路12设置有流体机械,也可以在流路12和流路13这两者设置有流体机械。需要说明的是,在本发明中,流体包括气体和液体这两者。

[0173] 作为流体机械14,可以使用容积式泵。作为容积式泵的例子,可举出包括活塞泵、柱塞泵和隔膜泵的往复泵、或者包括齿轮泵、叶片泵和螺杆泵的旋转泵。作为隔膜泵的例子,可举出管式泵和压电 (piezo) 泵。管式泵有时也被称为蠕动泵。另外,也可以使用组合了各种泵的微流体芯片模块。本发明中的其他流体机械也是同样。如果使用蠕动泵、管式泵和隔膜泵等密闭型泵,则能够在泵不与流路内部的流体直接接触的情况下输送流体。

[0174] 在预先在红细胞除去器11内填充有气体和红细胞沉降剂的情况下,如果流体机械14经由流路13抽吸血液容器10内的血液,并将所抽吸的血液供给至红细胞除去器11内,则红细胞除去器11内的气体被压力推动,介由流路12被输送至血液容器10内。这样,通过将血

液容器10内的血液输送至红细胞除去器11内,并将红细胞除去器11内的气体输送至血液容器10内,能够使血液容器10内和红细胞除去器11内的压力平均化。

[0175] 需要说明的是,流体机械14也可以经由流路13来抽吸红细胞除去器11内的气体,并将所抽吸的气体供给至血液容器10内。在该情况下,血液容器10内的血液被气压推动,经由流路12被输送至红细胞除去器11内。这样,通过除去红细胞除去器11内的气体,也能够将血液容器10内的血液输送至红细胞除去器11内。

[0176] 被送入至红细胞除去器11内的血液与红细胞除去器11内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂接触。流体机械14可以反复进行从红细胞除去器11内抽吸流体和向红细胞除去器11内送出流体来搅拌血液。在红细胞除去器11内容纳有红细胞沉降剂的情况下,红细胞在红细胞除去器11内沉降,从血液中至少部分地除去红细胞。在红细胞除去器11内容纳有红细胞除去剂的情况下,红细胞在红细胞除去器11内溶血,从血液中至少部分地除去红细胞。

[0177] 红细胞除去装置100可以进一步具备单核细胞回收器15,所述单核细胞回收器15从红细胞除去器11接受至少部分地除去了红细胞后的处理血液,从处理血液中回收单核细胞。单核细胞回收器15可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括单核细胞回收器15的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。单核细胞回收器15可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。单核细胞回收器15的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。单核细胞回收器15的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。单核细胞回收器15可以能够改变该单核细胞回收器15的容积。

[0178] 如图2所示,例如在单核细胞回收器15的底部设置有第1开口115,在单核细胞回收器15的侧面设置有第2开口116。第1开口115的位置在重力方向上比第2开口116靠下。

[0179] 在单核细胞回收器15的第1开口115连接有流路19。流路19可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路19的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路19可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路19的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路19的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0180] 在单核细胞回收器15的第2开口116连接有流路117。流路117可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路117的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路117可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路117的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路117的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。如图1所示,在流路117设置有用于使流路117内的流体移动的泵等流体机械21。

[0181] 如图2所示,单核细胞回收器15的底部可以呈漏斗状。在该情况下,例如在单核细胞回收器15的漏斗状的底部的前端设置有第1开口115,在漏斗状的底部的侧面设置有第2开口116。在第2开口116可以设置单核细胞无法通过的过滤器。

[0182] 单核细胞回收器15可以在内部容纳缓冲液等稀释液。稀释液可以从容纳稀释用液的图1所示的稀释用液容器61经由流路60导入至单核细胞回收器15内。稀释用液容器61可以能够改变该稀释用液容器的容积。另外,例如流路19和流路117内部被稀释液填充。

[0183] 稀释用液容器61和流路60中的至少任一者可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括稀释用液容器61和流路60的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气

体、病毒、微生物和杂质等的交换。稀释用液容器61和流路60可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。稀释用液容器61和流路60的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。稀释用液容器61和流路60的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0184] 在红细胞除去器11与单核细胞回收器15之间设置有用于将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液从红细胞除去器11输送至单核细胞回收器15的流路17。流路17可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路17的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路17可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路17的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路17的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0185] 另外,在红细胞除去器11与单核细胞回收器15之间设置有用于从单核细胞回收器15向红细胞除去器11输送空气等气体等流体的流路16。流路16可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路16的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路16可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路16的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路16的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0186] 在流路17设置有用于使流路17内的流体移动的泵等流体机械18。需要说明的是,可以在流路16设置流体机械,也可以在流路16和流路17这两者设置流体机械。

[0187] 在预先在单核细胞回收器15内填充有气体和稀释液的情况下,如果流体机械18介由流路17抽吸红细胞除去器11内的至少部分地除去了红细胞后的处理血液,将所抽吸的至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液供给至单核细胞回收器15内,则单核细胞回收器15内的气体被压力推动,介由流路16被输送至红细胞除去器11内。这样,通过将红细胞除去器11内的至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液输送至单核细胞回收器15内,并将单核细胞回收器15内的气体输送至红细胞除去器11内,能够使红细胞除去器11内和单核细胞回收器15内的压力平均化。稀释液可以从稀释用液容器61反复供给。

[0188] 需要说明的是,流体机械18可以介由流路17抽吸单核细胞回收器15内的气体,并将所抽吸的气体供给至红细胞除去器11内。在该情况下,红细胞除去器11内的至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液被气压推动,介由流路16被输送至单核细胞回收器15内。这样,通过除去单核细胞回收器15内的气体,也能够将红细胞除去器11内的至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液输送至单核细胞回收器15内。

[0189] 在红细胞除去器11内使红细胞沉降的情况下,红细胞除去器11内的上清液以至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液的形式被输送至单核细胞回收器15。

[0190] 被送入至单核细胞回收器15中的至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液如图2的(a)所示,用稀释液稀释。在稀释后的处理血液溶液中,血小板悬浮,单核细胞向单核细胞回收器15的底部沉降。需要说明的是,稀释液可以包含红细胞除去剂。在该情况下,残留于处理血液溶液中的红细胞溶血。

[0191] 如图2的(b)所示,沉降的单核细胞蓄积于单核细胞回收器15的漏斗状的底部的前端。在稀释后的处理血液溶液中沉降后,如图2的(c)所示,设置于与单核细胞回收器15的第2开口116连接的流路117的图1所示的流体机械21抽吸作为上清液的稀释后的处理血液溶液。抽吸上清液的抽吸力设定为难以抽吸图2的(c)所示的沉降的单核细胞。上清液包含血

小板和溶血的红细胞。因此,通过从单核细胞回收器15内抽吸除去上清液,能够从血小板和红细胞分离单核细胞。所抽吸的上清液可以被输送至图1所示的红细胞除去器11内或血液容器10内。另外,可以将与从单核细胞回收器15内抽吸的上清液相同程度的容积的气体从红细胞除去器11内或血液容器10内输送至单核细胞回收器15内。

[0192] 在流路19设置有抽吸蓄积于单核细胞回收器15的底部的单核细胞的单核细胞抽吸装置20。作为单核细胞抽吸装置20,可以使用泵等流体机械。图2所示的第1开口115的大小例如以如下方式设定:在单核细胞抽吸装置20未抽吸单核细胞的情况下,单核细胞堵塞于第1开口115,在单核细胞抽吸装置20抽吸单核细胞的情况下,单核细胞能够通过第1开口115。如果单核细胞抽吸装置20抽吸单核细胞,则单核细胞从单核细胞回收器15内向流路19移动。

[0193] 需要说明的是,也可以通过对单核细胞回收器15内进行加压而使单核细胞回收器15内的单核细胞移动至流路19。在该情况下,可以在流路19设置单核细胞抽吸装置20,也可以不设置单核细胞抽吸装置20。

[0194] 如图1所示,第1实施方式的细胞培养装置200具备用于培养细胞的细胞培养器22。细胞培养器22可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括细胞培养器22的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。细胞培养器22可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。细胞培养器22的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。细胞培养器22的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0195] 在细胞培养器22内,可以对细胞进行粘附培养,也可以对细胞进行悬浮培养。在对细胞进行粘附培养的情况下,可以用基质胶、胶原蛋白、聚赖氨酸、纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白等细胞粘附用涂布剂对细胞培养器22内进行涂布。以下,以悬浮培养为例进行说明。细胞培养器22内部可以由细胞无法透过但培养基成分和废物可以透过的培养基成分透过构件划分。也可以在细胞培养器22的内壁以细胞不粘附的方式涂布poly-HEMA (poly2-hydroxyethyl methacrylate:聚(甲基丙烯酸-2-羟基乙酯))等细胞非粘附性物质,使细胞培养器22的内壁成为细胞非粘附性。也可以在细胞培养器22设置能够观察内部的窗。作为窗的材料,例如可以使用玻璃和树脂。

[0196] 细胞培养器22中可以设置用于对窗进行加热和冷却的温度调节部。温度调节部可以是配置于窗并对窗进行加热的透明导电膜等透明加热器。或者,细胞培养器22中可以具备用于对框体进行加热和冷却的温度调节部。通过利用温度调节部对框体进行温度调节,能够对细胞培养器22内的培养基进行温度调节。细胞培养器22中还可以具备测量细胞培养器22内的培养基的温度的温度计。温度计可以不与培养基接触地基于细胞培养器22的温度来测量培养基的温度,也可以与培养基接触而直接测量培养基的温度。在该情况下,也可以对温度调节部进行反馈控制,以使得培养基的温度成为预定的温度。培养基的温度例如调节为20℃至45℃。

[0197] 在细胞培养器22连接有流路19。介由流路19将细胞输送至细胞培养器22内。在流路19连接有流路23。流路23可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路23的内部的封闭空间可以构成不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路23可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路23的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路23的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。在流路23设置有用

于使流路23内的流体移动的泵等流体机械24。

[0198] 在流路23连接有作为容纳例如分化细胞培养基等体细胞培养基的流体容器的第1培养基容器25。体细胞培养基可以为凝胶,也可以为液体。

[0199] 在培养基为凝胶状的情况下,培养基可以包含高分子化合物。高分子化合物例如可以为选自结冷胶、脱乙酰基结冷胶、透明质酸、中性树胶(Rhamsan gum)、定优胶(diutan gum)、黄原胶、角叉菜胶、褐藻糖胶、果胶、果胶酸、果胶酯酸、硫酸乙酰肝素、肝素、硫酸肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸鼠李聚糖和它们的盐中的至少1种。另外,培养基可以包含甲基纤维素。通过包含甲基纤维素,进一步抑制细胞彼此的凝集。

[0200] 或者,培养基可以包含选自聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)(poly(glycerol monomethacrylate),PGMA)、聚(甲基丙烯酸-2-羟丙基酯)(poly(2-hydroxypropyl methacrylate),PHPMA)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(Poly(N-isopropylacrylamide),PNIPAM)、胺封端(amine terminated)的、羧酸封端(carboxylic acid terminated)的、马来酰亚胺封端(maleimide terminated)的、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯封端(N-hydroxysuccinimide ester terminated)、三乙氧基硅烷封端(triethoxysilane terminated)的聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸丁酯)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-甲基丙烯酸)(Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid))、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-甲基丙烯酸-共聚-丙烯酸十八烷基酯(Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate))和N-异丙基丙烯酰胺(N-Isopropylacrylamide)中选择的少量温敏凝胶。

[0201] 需要说明的是,在本发明中,凝胶状的培养基或凝胶培养基包含聚合物培养基。

[0202] 在从流路19输送至细胞培养器22内的细胞为作为体细胞的单核细胞的情况下,作为体细胞培养基,例如可以使用血液细胞培养基。第1培养基容器25可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括第1培养基容器25的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。第1培养基容器25可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。第1培养基容器25的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。第1培养基容器25的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。第1培养基容器25可以能够改变该第1培养基容器25的容积。在该情况下,例如,第1培养基容器25具备容纳体细胞培养基的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳体细胞培养基的容积。或者,第1培养基容器25也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0203] 如果从单核细胞回收器15向流路19输送单核细胞,则流体机械24从第1培养基容器25介由流路23向流路19输送体细胞培养基。第1培养基容器25使能够容纳体细胞培养基的容积减少。需要说明的是,第1培养基容器25可以主动地使容积收缩,也可以利用来自于流路23内部的抽吸力而被动地使容积收缩。介由流路23输送至流路19的体细胞培养基与流路19内的单核细胞混合,输送至细胞培养器22内。

[0204] 可以在第1培养基容器25设置对第1培养基容器25内的培养基的温度进行调节的

温度调节装置。

[0205] 在细胞培养器22例如介由流路26连接有第1容积可变容器27。流路26可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路26的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路26可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路26的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路26的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。可以在流路26设置用于使流路26内的流体移动的泵等流体机械28。

[0206] 第1容积可变容器27可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括第1容积可变容器27的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。第1容积可变容器27可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。第1容积可变容器27的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。第1容积可变容器27的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。第1容积可变容器27可以能够改变该第1容积可变容器27的容积。在该情况下,例如,第1容积可变容器27具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳流体的容积。或者,第1容积可变容器27也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0207] 在细胞培养器22例如介由流路29连接有第2容积可变容器30。流路29可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路29的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路29可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路29的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路29的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。可以在流路29设置用于使流路29内的流体移动的泵等流体机械。

[0208] 第2容积可变容器30可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括第2容积可变容器30的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。第2容积可变容器30可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。第2容积可变容器30的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。第2容积可变容器30的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。第2容积可变容器30可以能够改变该第2容积可变容器30的容积。在该情况下,例如,第2容积可变容器30具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳流体的容积。或者,第2容积可变容器30也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0209] 如果从流路19向细胞培养器22内送入单核细胞和体细胞培养基,则细胞培养器22内的空气等气体例如移动到第2容积可变容器30内,第2容积可变容器30使容积膨胀,接受从细胞培养器22内移动来的气体。需要说明的是,第2容积可变容器30可以主动地使容积膨胀,也可以受到压力而被动地使容积膨胀。

[0210] 第1容积可变容器27例如在内部容纳诱导因子等将第1状态的细胞诱导为第2状态的细胞的因子等物质。诱导因子可以为RNA,也可以为蛋白质,还可以为化合物。RNA可以为修饰RNA,也可以为非修饰RNA。第1容积可变容器27例如可以容纳脂质转染试剂。诱导因子可以包含于质粒载体、或逆转录病毒载体、慢病毒载体、或仙台病毒载体等病毒载体或病毒中。在本发明中,诱导是指重编程、初始化、转化、转分化换(Transdifferentiation or Lineage reprogramming:转分化或谱系重编程)、分化诱导和细胞的命运变更(Cell fate

reprogramming)等。重编程因子例如包含OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC。在向单核细胞细胞导入重编程因子等诱导因子来制作iPS细胞时,流体机械28使细胞培养器22内的包含单核细胞的体细胞培养基介由流路26移动至第1容积可变容器27内。另外,第1容积可变容器27使容积膨胀,接受包含单核细胞细胞的体细胞培养基。需要说明的是,第1容积可变容器27可以主动地使容积膨胀,也可以接受压力而被动地使容积膨胀。容纳有气体的第2容积可变容器30使容积收缩,所容纳的气体被送入至细胞培养器22内。需要说明的是,第2容积可变容器30可以主动地使容积收缩,也可以通过来自于细胞培养器22内部的抽吸力而被动地使容积收缩。

[0211] 单核细胞通过从细胞培养器22内向第1容积可变容器27内移动,与第1容积可变容器27内的诱导因子接触,向单核细胞导入诱导因子。需要说明的是,第1容积可变容器27可以反复进行容积的膨胀和收缩来搅拌包含单核细胞和诱导因子的体细胞培养基。

[0212] 经过预定期间后,流体机械28使第1容积可变容器27内的包含导入了诱导因子的单核细胞的体细胞培养基介由流路26向细胞培养器22内移动。第1容积可变容器27使容积收缩。另外,第2容积可变容器30使容积膨胀,从细胞培养器22内接受气体。

[0213] 或者,在向单核细胞细胞导入重编程因子等诱导因子来制作iPS细胞时,流体机械28可以使第1容积可变容器27内的诱导因子介由流路26移动至细胞培养器22内。此时,可以是第1容积可变容器27使容积收缩,第2容积可变容器30使容积膨胀。诱导因子从第1容积可变容器27内向细胞培养器22内移动,由此与细胞培养器22内的单核细胞接触,向单核细胞导入诱导因子。需要说明的是,流体机械28也可以使第1容积可变容器27内的诱导因子介由流路26分成多次移动至细胞培养器22内。由此,将诱导因子分成多次导入至单核细胞中。

[0214] 在细胞培养器22例如介由流路31连接有作为容纳例如干细胞培养基、体细胞培养基等培养基的流体容器的第2培养基容器32。以下,对第2培养基容器32容纳干细胞培养基的例子进行说明。干细胞培养基可以是凝胶,也可以是液体。作为干细胞培养基,可以使用诱导培养基、扩增培养基和维持培养基。

[0215] 流路31可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路31的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路31可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路31的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路31的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。可以在流路31设置有助于使流路31内的流体移动的泵等流体机械33。

[0216] 第2培养基容器32可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括第2培养基容器32的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。第2培养基容器32可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。第2培养基容器32的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。第2培养基容器32的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。第2培养基容器32可以能够改变该第2培养基容器32的容积。在该情况下,例如,第2培养基容器32具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳流体的容积。或者,第2培养基容器32也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0217] 可以在第2培养基容器32设置对第2培养基容器32内的培养基的温度进行调节的温度调节装置。

[0218] 细胞培养器22例如介由流路34连接有第3容积可变容器35。流路34可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路34的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路34可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路34的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路34的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0219] 第3容积可变容器35可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括第3容积可变容器35的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。第3容积可变容器35可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。第3容积可变容器35的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。第3容积可变容器35的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。第3容积可变容器35可以能够改变该第3容积可变容器35的容积。在该情况下,例如,第3容积可变容器35具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的容纳能够流体的容积。或者,第3容积可变容器35也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0220] 从对单核细胞导入诱导因子之后经过预定期间后,流体机械33使第2培养基容器32内的干细胞培养基介由流路31移动至细胞培养器22内。干细胞培养基可以与细胞培养器22内的用培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区接触,加入到不存在细胞的分区中。从内部抽吸了干细胞培养基的第2培养基容器32使容积收缩。需要说明的是,第2培养基容器32可以主动地使容积收缩,也可以被动地使容积收缩。第3容积可变容器35使容积膨胀,介由流路34接受因干细胞培养基的流入而成为细胞培养器22内的剩余的流体。流路34可以与细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区接触,与不存在细胞的分区连接。需要说明的是,第3容积可变容器35可以主动地使容积膨胀,也可以受到压力而被动地使容积膨胀。

[0221] 或者,流路34可以与细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区接触。在该情况下,可以将细胞培养器22内的剩余的细胞介由流路34送出到第3容积可变容器35中。

[0222] 细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分分区中存在细胞的分区的培养基与不存在细胞的分区的培养基例如通过渗透压来交换培养基成分、废物。作为培养成分透过构件,例如可以使用半透膜、筛网和中空纤维膜。半透膜包括透析膜。

[0223] 在培养成分透过构件为半透膜的情况下,半透膜的截留分子量例如为0.1KDa以上、10KDa以上或50KDa以上。半透膜例如由纤维素酯、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、醋酸纤维素、二醋酸纤维素、三醋酸纤维素、铜铵人造丝、皂化纤维素、血仿膜、磷脂酰胆碱膜和维生素E涂膜等形成。

[0224] 在培养成分透过构件为筛网的情况下,筛网具有比在细胞培养器22内培养的细胞小的孔。筛网的材料例如为树脂和金属,但没有特别限定。培养成分透过构件的表面可以为细胞非粘附性。

[0225] 在培养成分透过构件为中空纤维膜的情况下,中空纤维膜具有比在细胞培养器22内培养的细胞小的孔。例如,可以在中空纤维膜的内侧培养细胞。

[0226] 可以在细胞培养器22内培养细胞的期间,在预定的时机,流体机械33使第2培养基

容器32内的干细胞培养基介由流路31向细胞培养器22内移动。第3容积可变容器35使容积膨胀,接受通过新鲜的干细胞培养基的流入而成为细胞培养器22内的剩余的用完的干细胞培养基。流体机械33例如可以根据培养基的状态、培养基中的细胞团的状态、细胞数、细胞团数、培养基的浊度和pH的变化来控制培养基的送液量、或者进行培养基的送液的开始和结束。

[0227] 可以在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区介由流路36连接有泵等流体机械37。流路36可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路36的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路36可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路36的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路36的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0228] 例如,为了控制细胞的凝集,流体机械37使培养基在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区与流路36之间循环。流体机械37可以始终使培养基循环,也可以在任意的时机使培养基循环。或者,流体机械37可以使培养基在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中存在细胞的分区与流路36之间往复运动,来搅拌培养基。流体机械37可以始终搅拌培养基,也可以在任意的时机搅拌培养基。流体机械37例如可以根据培养基的状态、培养基中的细胞团的状态、细胞数、细胞团数、培养基的浊度和pH的变化来控制培养基的送液量、或者进行培养基的送液的开始和结束。

[0229] 通过将细胞培养器22内的细胞抽吸至流路36内,使细胞返回至细胞培养器22内,可以对细胞进行传代培养和扩增培养。流路36内可以具有将细胞团分割的结构。例如,通过流路36内具有蜿蜒的结构、直径增减的结构,能够将在流路36内流动的细胞团分割。

[0230] 可以在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中不存在细胞的分区介由流路38连接有泵等流体机械39。流路38可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路38的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路38可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路38的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路38的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0231] 例如,为了增加培养基与培养基成分透过构件接触的机会,流体机械39使培养基在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中不存在细胞的分区与流路38之间循环。流体机械39可以始终使培养基循环,也可以在任意的时机使培养基循环。或者,流体机械39可以使培养基在细胞培养器22内的由培养基成分透过构件划分的分区中不存在细胞的分区与流路38之间往复运动,搅拌培养基。流体机械39可以始终搅拌培养基,也可以在任意的时机搅拌培养基。流体机械39例如可以根据培养基的状态、培养基中的细胞团的状态、细胞数、细胞团数、培养基的浊度和pH的变化来控制培养基的送液量、或者进行培养基的送液的开始和结束。

[0232] 例如,由在细胞培养器22内导入了诱导因子的单核细胞来制作iPS细胞,进行扩增培养后,从细胞培养器22内回收iPS细胞。iPS细胞可以在细胞培养器22内形成细胞团(集落)。

[0233] 根据本发明人等的见解,细胞能够在完全封闭的密闭空间进行培养,因此也可以不向细胞培养器22内积极地供给二氧化碳气体、氮气和氧气等。因此,也可以不将细胞培养器22配置于CO₂培养箱内。另外,存在于细胞培养器22外的细胞、微生物、病毒和灰尘等不会

进入到密闭的细胞培养器22内,因此细胞培养器22内的清洁度得以保持。因此,可以不将细胞培养器22配置于无尘室内。然而,并不一定妨碍向细胞所存在的封闭体系内供给二氧化碳气体、氮气和氧气等。

[0234] 根据实施方式的细胞培养装置200,例如在完全封闭体系中培养细胞,因此能够降低由细胞从培养装置漏出引起的交叉污染的风险。另外,例如,即使在细胞感染了HIV、肝炎病毒等病毒的情况下,也能够降低由细胞的漏出导致的对操作人员的感染的风险。此外,能够降低细胞培养器内的培养基被细胞培养器外的空气中的细菌、病毒和霉菌等污染的风险。此外,根据实施方式的细胞培养器,也可以不使用CO₂培养箱地对细胞进行培养。

[0235] (第2实施方式)

[0236] 如图3所示,第2实施方式的红细胞除去装置101具备容纳血液的血液容器50、以及容纳红细胞沉降剂或红细胞除去剂的红细胞处理剂容器53。

[0237] 血液容器50在内部容纳血液。血液容器50可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括血液容器50的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。血液容器50可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。血液容器50的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。血液容器50的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。血液容器50可以能够改变该血液容器50的容积。在该情况下,例如,血液容器50具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳流体的容积。或者,血液容器50也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0238] 红细胞处理剂容器53在内部容纳红细胞沉降剂或红细胞除去剂。红细胞处理剂容器53可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括红细胞处理剂容器53的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。红细胞处理剂容器53可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。红细胞处理剂容器53的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。红细胞处理剂容器53的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。红细胞处理剂容器53可以能够改变该红细胞处理剂容器53的容积。在该情况下,例如,红细胞处理剂容器53具备容纳流体的注射器和插入到注射器中且能够在注射器内移动的柱塞,通过柱塞的移动,能够变更注射器内的能够容纳流体的容积。或者,红细胞处理剂容器53也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0239] 第2实施方式的红细胞除去装置101还具备例如将血液与红细胞沉降剂或红细胞除去剂混合的混合器57。混合器57例如具备供血液与红细胞沉降剂或红细胞除去剂的混合液流动的弯折流路。弯折流路可以弯折成螺旋状。在弯折流路中,流路可以蜿蜒。在弯折流路中,截面积可以反复增减。混合器57可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括混合器57的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。混合器57可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。混合器57的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。混合器57的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0240] 在血液容器50连接有用于至少将血液从血液容器50输送至混合器57的流路51。在红细胞处理剂容器53连接有用于至少将红细胞沉降剂或红细胞除去剂从红细胞处理剂容器53输送至混合器57的流路54。流路51和流路54与流路56汇合。流路56与混合器57连接。在混合器57连接有流路58,所述流路58用于将在混合器57内混合的血液与红细胞沉降剂或红

细胞除去剂的混合液输送至红细胞除去器11内。

[0241] 可以在流路51设置用于使流路51内的流体移动的泵等流体机械52。可以在流路54设置用于使流路54内的流体移动的泵等流体机械55。

[0242] 流路51、54、56、58可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括流路51、54、56、58的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。流路51、54、56、58可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。流路51、54、56、58的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。流路51、54、56、58的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。

[0243] 在向红细胞除去器11输送血液与红细胞沉降剂或红细胞除去剂的混合液时,流体机械52使血液容器50内的血液介由流路51、56向混合器57内移动。另外,流体机械55使红细胞处理剂容器53内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂介由流路54、56向混合器57内移动。需要说明的是,也可以不在流路51、54设置流体机械,而在流路56设置流体机械,设置于流路56的流体机械使血液容器50内的血液和红细胞处理剂容器53内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂在移动至混合器57内。在混合器57内,血液与红细胞沉降剂或红细胞除去剂混合。在混合器57内混合的血液与红细胞沉降剂或红细胞除去剂的混合液介由流路58被输送至红细胞除去器11。在红细胞除去器11内,红细胞沉降或溶血的情况下与第1实施方式相同。另外,第2实施方式的红细胞除去装置101的其他构成要素也可以与第2实施方式的红细胞除去装置100相同。

[0244] (第3实施方式)

[0245] 如图4所示,第3实施方式的红细胞除去装置101具备真空容器70,该真空容器70设置于用于从血液容器50向混合器57至少输送血液的流路51,且能够使内部成为真空。

[0246] 真空容器70可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括真空容器70的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。真空容器70可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。真空容器70的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。真空容器70的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。真空容器70可以能够改变该真空容器70的容积。真空容器70也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0247] 第3实施方式的红细胞除去装置101具备真空容器71,所述真空容器71设置于用于从红细胞处理剂容器53向混合器57至少输送红细胞沉降剂或红细胞除去剂的流路54,且能够使内部成为真空。

[0248] 真空容器71可以具有能够将内部相对于外部空气封闭的结构。包括真空容器71的内部的封闭空间可以构成为不与外部进行气体、病毒、微生物和杂质等的交换。真空容器71可以嵌入并包埋于气体非透过性物质中。真空容器71的至少一部分可以通过刻入到构件中而形成。真空容器71的至少一部分可以通过刻入到部件中并使凹部重叠而形成。真空容器71可以能够改变该真空容器71的容积。真空容器71也可以是具有挠性的波纹管或袋。

[0249] 如果在预先使真空容器70内成为真空的状态下将血液容器50与流路51连接,则血液容器50内的血液移动到真空容器70内,进而血液介由流路51、56移动到混合器57内。另外,如果在预先使真空容器71内成为真空的状态下将红细胞处理剂容器53与流路54连接,则红细胞处理剂容器53内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂移动至真空容器71内,进而血液介由流路54、56移动到混合器57内。

[0250] 第3实施方式的红细胞除去装置101的其他构成要素可以与第2实施方式相同。

[0251] (第4实施方式)

[0252] 也可以省略图4所示的真空容器70、71,预先使红细胞除去器11成为真空。如果在预先使红细胞除去器11内成为真空的状态下将血液容器50与流路51连接,将红细胞处理剂容器53与流路54连接,则血液容器50内的血液介由流路51、56移动到混合器57内,红细胞处理剂容器53内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂介由流路54、56移动到混合器57内。此外,在混合器57内混合的血液和红细胞沉降剂或红细胞除去剂介由流路58向红细胞除去器11内移动。

[0253] 或者,如果用阀等闭塞流路51和流路54,使红细胞除去器11内成为真空,打开流路51和流路54的阀,则血液容器50内的血液介由流路51、56向混合器57内移动,红细胞处理剂容器53内的红细胞沉降剂或红细胞除去剂介由流路54、56向混合器57内移动。此外,在混合器57内混合的血液和红细胞沉降剂或红细胞除去剂介由流路58向红细胞除去器11内移动。

[0254] (其它实施方式)

[0255] 如上所述,通过实施方式记载了本发明,但不应理解为构成该公开的一部分的记述及附图限定本发明。根据本发明,本领域技术人员应该明白各种代替实施方式、实施方式和运用技术。例如,输送至图1所示的细胞培养器22的细胞不限于单核细胞。输送至细胞培养器22的细胞可以是干细胞、成纤维细胞或其他体细胞。输送至细胞培养器22的细胞是任意的。

[0256] 此外,在第1实施方式中,对在细胞培养器22内由单核细胞制作iPS细胞的例子进行了说明,但也可以在细胞培养器22内由干细胞制作神经细胞等分化细胞。干细胞可以是iPS细胞、胚胎干细胞(ES细胞)、成体干细胞或其他人工诱导的干细胞等。在该情况下,例如,第1容积可变容器27在内部容纳分化诱导因子。这样,应该理解本发明包括各种实施方式等。

[0257] 实施例

[0258] (实施例1)

[0259] 在本实施例中,示出在完全封闭的环境下不进行培养基更换和气体更换就能够培养细胞的例子。将生长因子添加到培养基(StemSpan H3000,注册商标,STEMCELL Technologies Inc.)中,进一步在培养基中添加脱酰基结冷胶,准备凝胶培养基。

[0260] 将准备好的凝胶培养基放入到15mL管中,在凝胶培养基中接种 2×10^5 个血液细胞。然后,将15mL管配置于CO₂培养箱内,培养血液细胞(单核细胞)7天。然后,在凝胶培养基中以感染复数(MOI)达到10.0的方式添加搭载OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC的仙台病毒载体,使仙台病毒感染血液细胞。

[0261] 在凝胶培养基中添加仙台病毒后,在凝胶培养基中添加15mL的经凝胶化的干细胞培养基(包含20%KnockOut SR(注册商标,ThermoFisher SCIENTIFIC)的DMEM/F12),将其中的15mL的包含感染了仙台病毒的细胞的培养基放入到可密闭的细胞培养器中,将凝胶培养基注入到细胞培养器中。然后,将细胞培养器内部密闭,使细胞培养器的内部与外部完全不发生气体交换。

[0262] 在细胞培养器内开始进行导入了初始化因子的细胞的悬浮培养。然后,将培养基保持槽40内的2mL的凝胶培养基每2天一次地更换为2mL的新鲜的凝胶培养基。

[0263] 15天后,用显微镜观察细胞,结果如图5所示,确认形成了ES细胞样集落。另外,使用4%-多聚甲醛来固定细胞,使用流式细胞仪对经固定的细胞中的细胞表面抗原TRA-1-60的表达量进行测定,结果如图6所示,90%以上为TRA-1-60阳性,确认到几乎完全被重编程。因此表明,在完全封闭的环境下,不进行培养基更换和气体更换就能够由干细胞以外的体细胞来诱导iPS细胞。

[0264] (实施例2)

[0265] 用红细胞沉降剂对血液进行处理,得到至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液。用表面细胞标志物抗体对处理血液进行处理,并通过荧光激活细胞分选(FACS)进行分析,将结果示于图7。处理血液包含CD3阳性细胞、CD14阳性细胞、CD31阳性细胞、CD33阳性细胞、CD34阳性细胞、CD19阳性细胞、CD41阳性细胞、CD42阳性细胞和CD56阳性细胞。

[0266] 将至少部分地除去了红细胞而得到的处理血液放入到图2所示那样的单核细胞回收器中,用缓冲液稀释,除去上清液。然后,从单核细胞回收器中回收单核细胞。如图8的(a)所示,放入到单核细胞回收器之前的处理血液包含大量血小板。另一方面,如图8的(b)所示,从单核细胞回收器回收的包含单核细胞的溶液的血小板几乎被除去。将表示每相同面积中的放入到单核细胞回收器之前的处理血液中的血小板数和从单核细胞回收器中回收的包含单核细胞的溶液中的血小板数的图表示于图9。

[0267] 如果将放入到单核细胞回收器之前的包含血小板的处理血液放入到培养液中,则如图10的(a)所示,发生了凝集。与此相对,如果将从单核细胞回收器回收的包含除去了血小板的单核细胞的溶液放入到培养液中,则如图10的(b)所示,未发生凝集。

[0268] (实施例3)

[0269] 在血液培养基中添加脱酰基结冷胶,准备凝胶培养基。将准备好的凝胶培养基放入到经层粘连蛋白涂布的6孔皿中,接种 2×10^5 个血液细胞(单核细胞)。然后,将6孔皿配置于37°C的CO₂培养箱内,培养血液细胞7天。然后,在血液增殖培养基中以感染复数(MOI)成为5的方式添加搭载OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC的仙台病毒载体(CytoTune-iPS2.0, ThermoFisher SCIENTIFIC),使仙台病毒感染血液细胞。

[0270] 在将细胞放入到6孔皿中的状态下,在血液增殖培养基中添加仙台病毒两天后,利用500μL的干细胞培养基(包含20%KnockOut SR(注册商标,ThermoFisher SCIENTIFIC)的DMEM/F12)或Stem Fit(日文原文:ステムフィット)进行培养基更换。

[0271] 在血液增殖培养基中添加仙台病毒15天后,用显微镜观察细胞,结果如图11所示,确认到形成了ES细胞样集落。另外,使用4%-多聚甲醛将细胞固定,使用流式细胞仪对经固定的细胞中的细胞表面抗原TRA-1-60的表达量进行测定,结果如图12所示,确认到诱导后的细胞几乎为100%TRA-1-60阳性,几乎完全被重编程。因此,显示了在细胞培养器内向细胞导入重编程因子,在相同的细胞培养器内培养导入了重编程因子的细胞,从而能够对细胞进行重编程。

[0272] (实施例4)

[0273] 在血液培养基中添加脱酰基结冷胶,准备凝胶培养基。将准备好的凝胶培养基放入到经层粘连蛋白涂布的烧瓶中,接种 5×10^5 个血液细胞(单核细胞)。然后,配置于37°C的CO₂培养箱内,培养血液细胞7天。然后,在血液增殖培养基中以感染复数(MOI)成为5的方式添加搭载OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC的仙台病毒载体(CytoTune-iPS2.0, ThermoFisher

SCIENTIFIC),使仙台病毒感染血液细胞。

[0274] 在血液增殖培养基中添加仙台病毒两天后,以烧瓶内不残留空气的方式用干细胞培养基(包含20%KnockOut SR(注册商标,ThermoFisher SCIENTIFIC)的DMEM/F12)或StemFit完全充满烧瓶,以不发生与外部的交换的方式盖上烧瓶的帽,以细胞、微生物和杂质等不透过的方式封闭烧瓶的内部。

[0275] 在血液增殖培养基中添加仙台病毒15天后,用显微镜观察细胞,结果如图13所示,确认到形成了ES细胞样集落。另外,使用4%-多聚甲醛将细胞固定,使用流式细胞仪对经固定的细胞中的细胞表面抗原TRA-1-60的表达量进行测定,结果如图14所示,诱导后的细胞几乎为100%TRA-1-60阳性,几乎完全被重编程。因此,显示了在细胞培养器内向细胞导入重编程因子,在同一封闭的细胞培养器内培养导入了重编程因子的细胞,从而能够对细胞进行重编程。

[0276] (实施例5)

[0277] 将非凝胶状的液体的血液增殖培养基放入到经层粘连蛋白涂布的6孔皿中,接种 2×10^5 个血液细胞(单核细胞)。然后,将6孔皿配置于37°C的CO₂培养箱内,培养血液细胞7天。然后,在血液增殖培养基中以感染复数(MOI)成为5的方式添加搭载OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC的仙台病毒载体(CytoTune-iPS2.0,ThermoFisher SCIENTIFIC),使仙台病毒感染血液细胞。

[0278] 在将细胞放入到6孔皿中的状态下在血液增殖培养基中添加仙台病毒两天后,利用500 μ L的干细胞培养基(包含20%KnockOut SR(注册商标,ThermoFisher SCIENTIFIC)的DMEM/F12)或StemFit进行培养基更换。

[0279] 在血液增殖培养基添加仙台病毒15天后,用显微镜观察细胞,结果如图15所示,确认到形成了ES细胞样集落。另外,使用4%-多聚甲醛将细胞固定,使用流式细胞仪对经固定的细胞中的细胞表面抗原TRA-1-60的表达量进行测定,结果如图16所示,确认到诱导后的细胞几乎为100%TRA-1-60阳性,几乎完全被重编程。因此,显示了在细胞培养器内向细胞导入重编程因子,在相同的细胞培养器内培养导入了重编程因子的细胞,从而能够对细胞进行重编程。

[0280] (实施例6)

[0281] 将非凝胶状的液体的血液增殖培养基放入到经层粘连蛋白涂布的烧瓶中,接种 5×10^5 个血液细胞(单核细胞)。然后,将烧瓶配置于37°C的CO₂培养箱内,培养血液细胞7天。然后,在血液增殖培养基以感染复数(MOI)成为5的方式添加搭载OCT3/4、SOX2、KLF4、cMYC的仙台病毒载体(CytoTune-iPS2.0,ThermoFisher SCIENTIFIC),使仙台病毒感染血液细胞。

[0282] 在血液增殖培养基中添加仙台病毒两天后,以烧瓶内不残留空气的方式用干细胞培养基(包含20%KnockOut SR(注册商标,ThermoFisher SCIENTIFIC)的DMEM/F12)或StemFit完全充满烧瓶,以不发生与外部的交换的方式盖上烧瓶的帽,以细胞、微生物和杂质等不透过的方式封闭烧瓶的内部。

[0283] 在血液增殖培养基中添加仙台病毒15天后,用显微镜观察细胞,结果如图17所示,确认到形成了ES细胞样集落。另外,使用4%-多聚甲醛将细胞固定,使用流式细胞仪对经固定的细胞中的细胞表面抗原TRA-1-60的表达量进行测定,结果如图18所示,确认到诱导后

的细胞几乎为100%TRA-1-60阳性,几乎完全被重编程。因此,显示了在细胞培养器内向细胞导入重编程因子,在同一封闭的细胞培养器内培养导入了重编程因子的细胞,从而能够对细胞进行重编程。

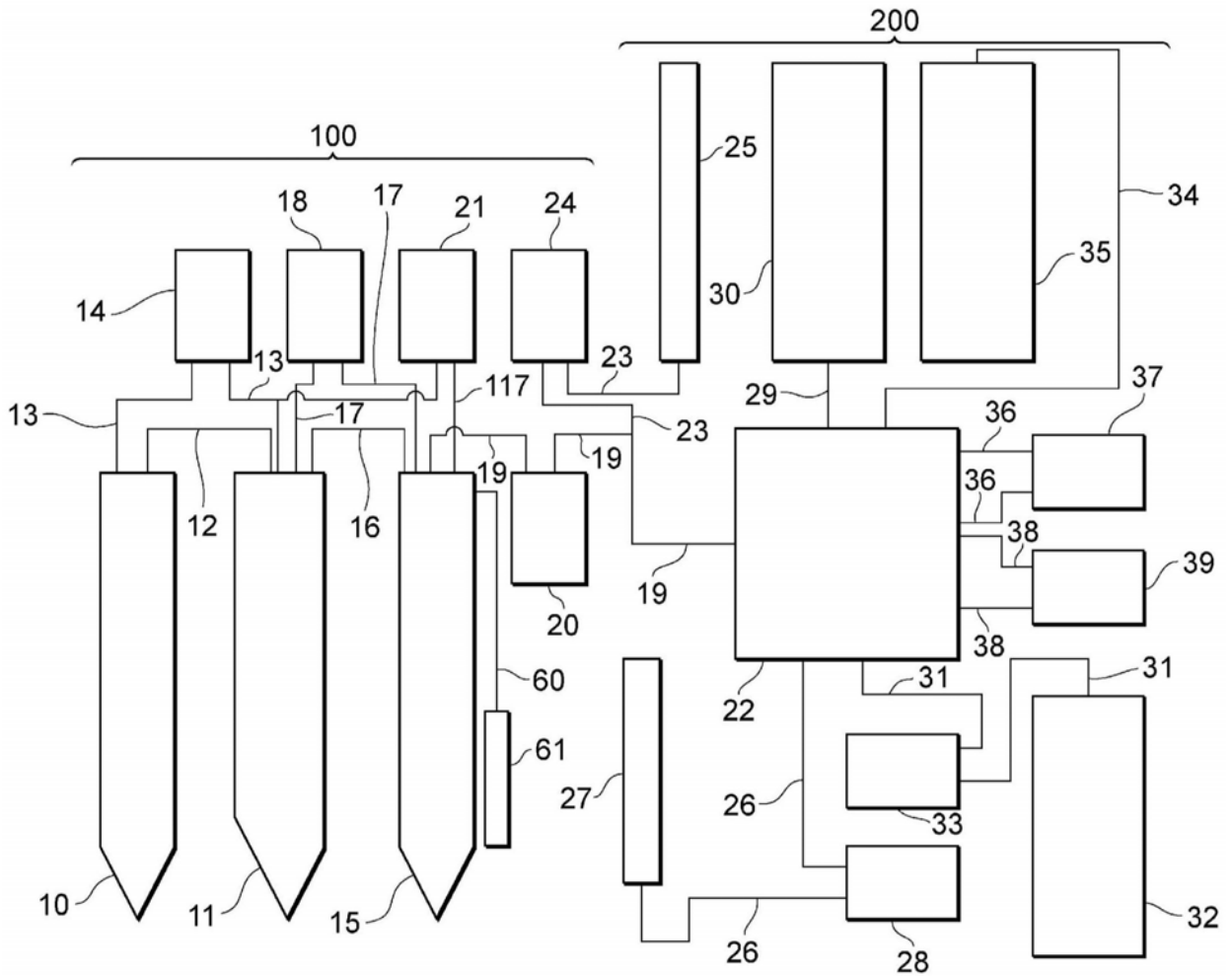


图1

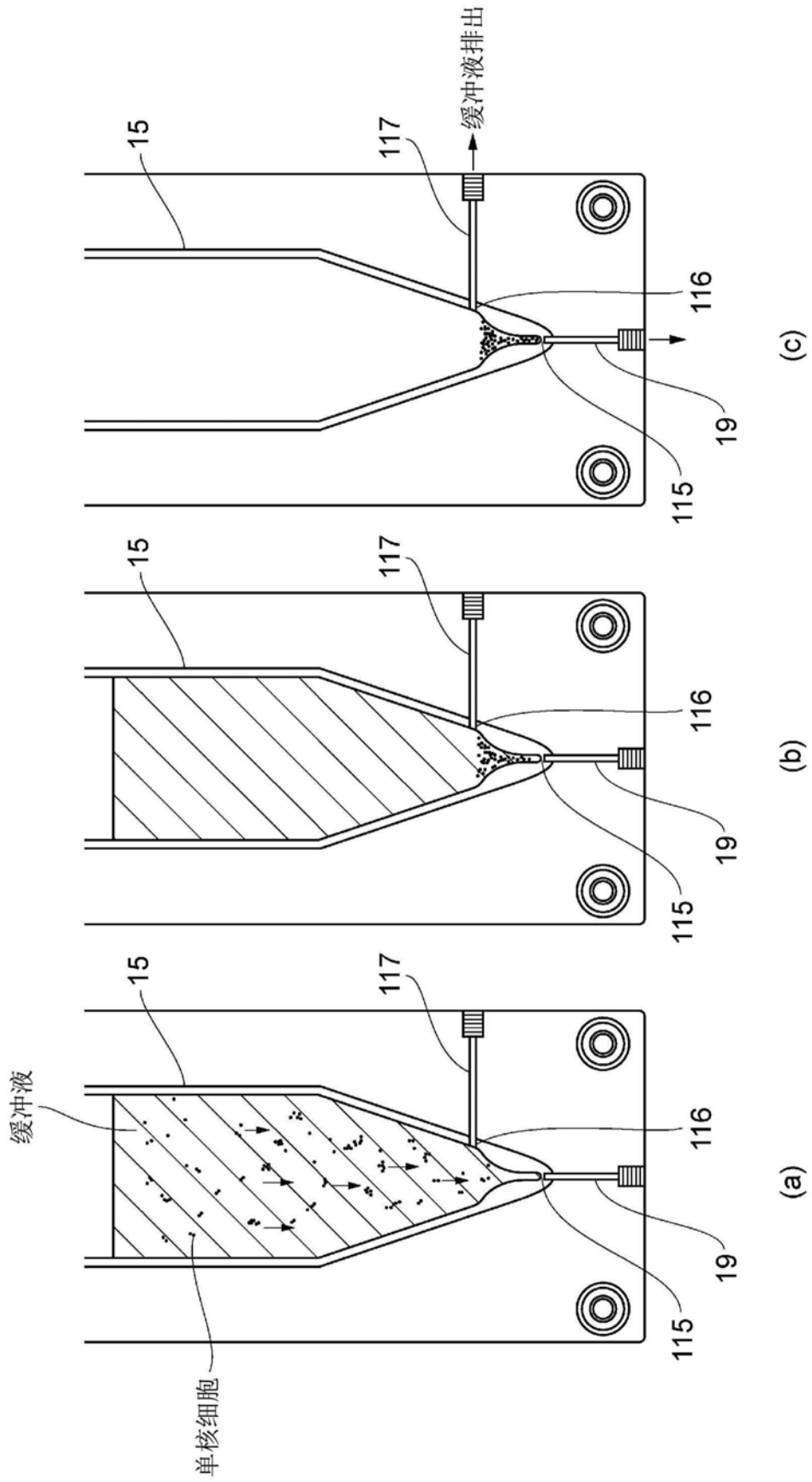


图2

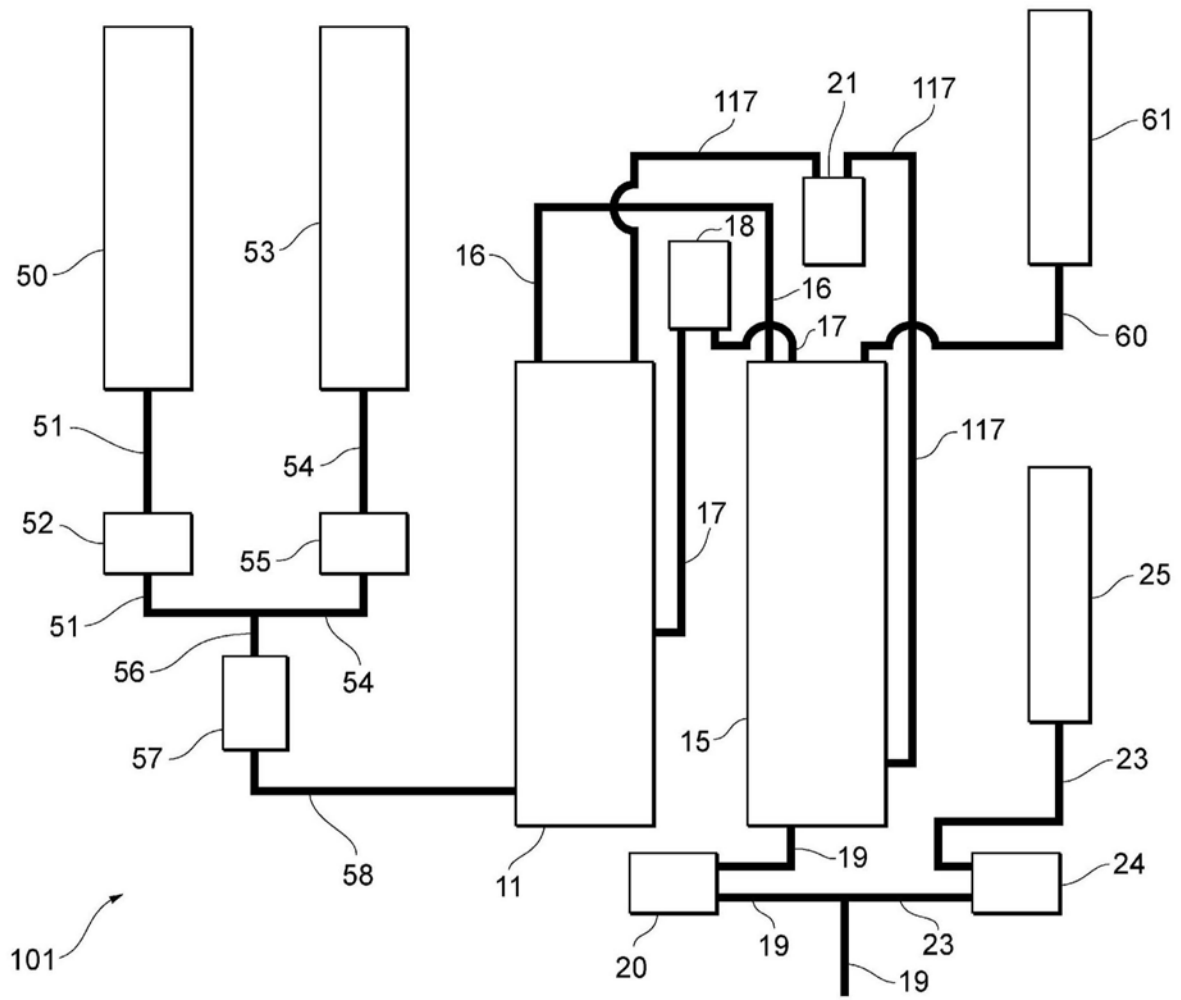


图3

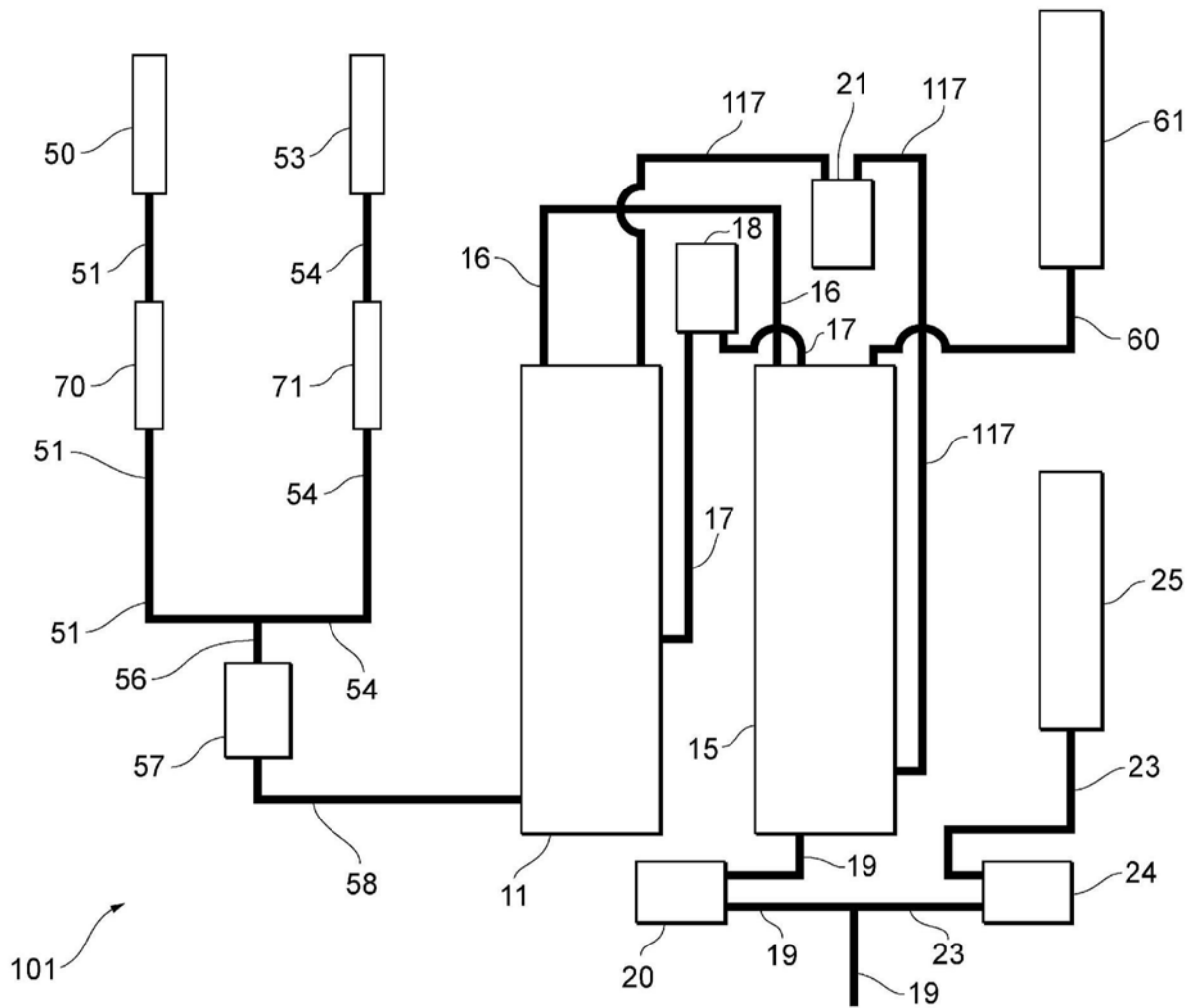


图4

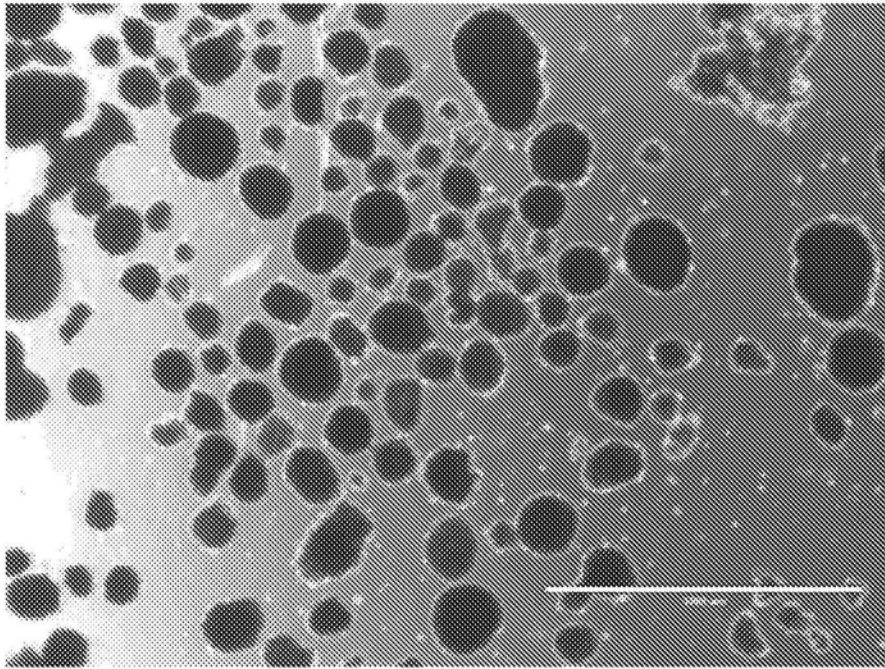


图5

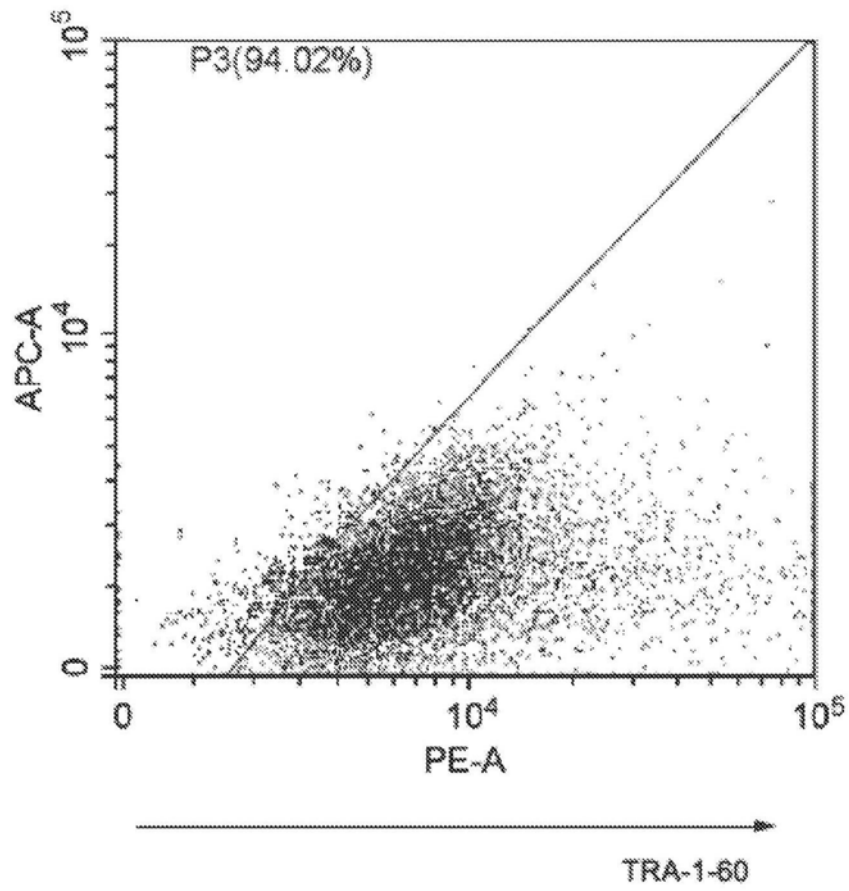


图6

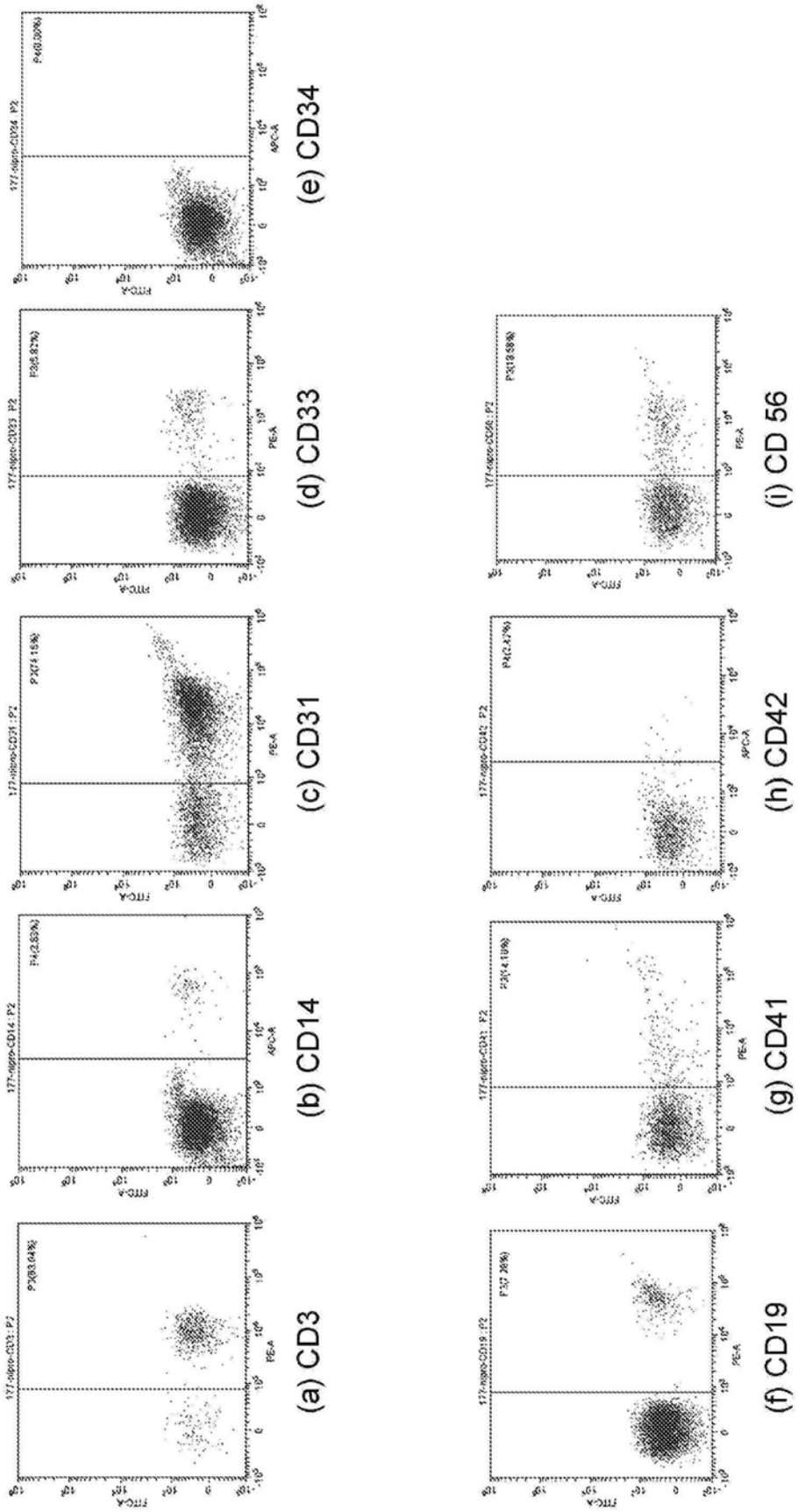


图7

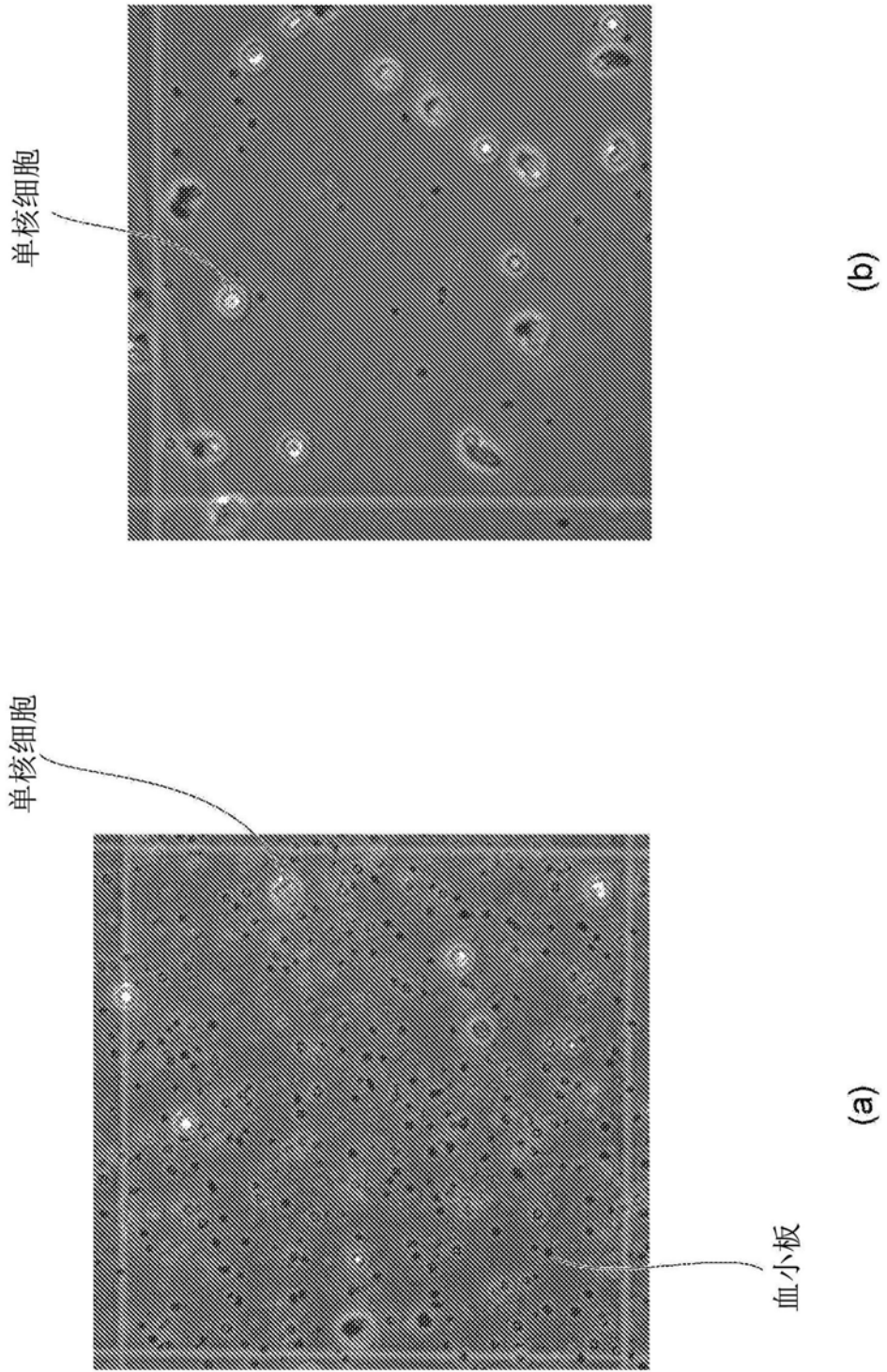


图8

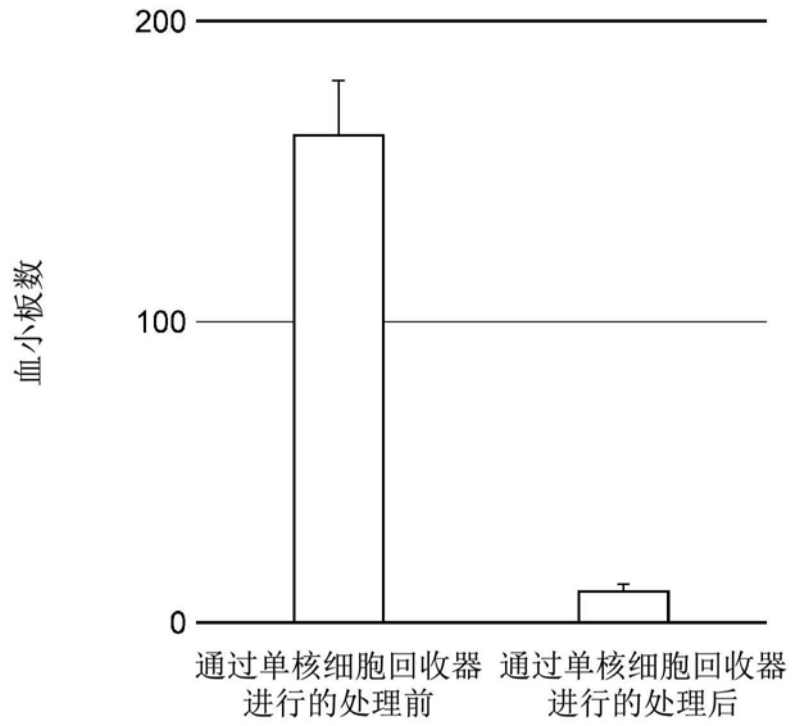
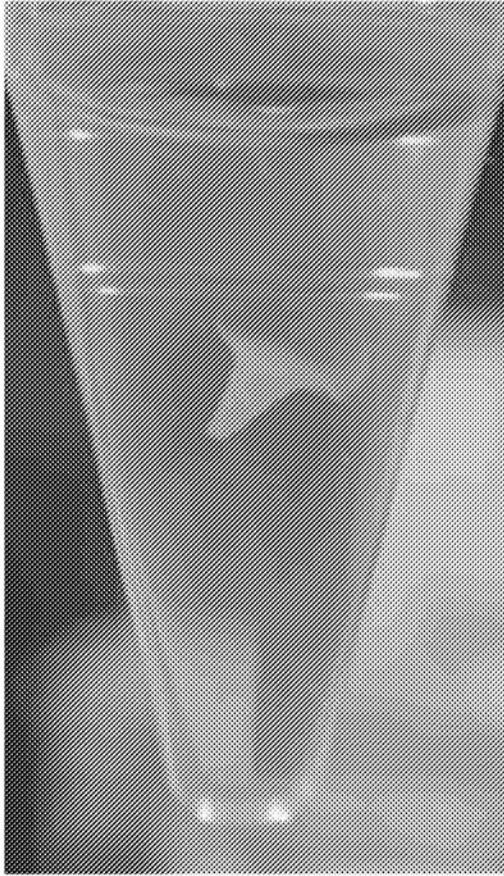
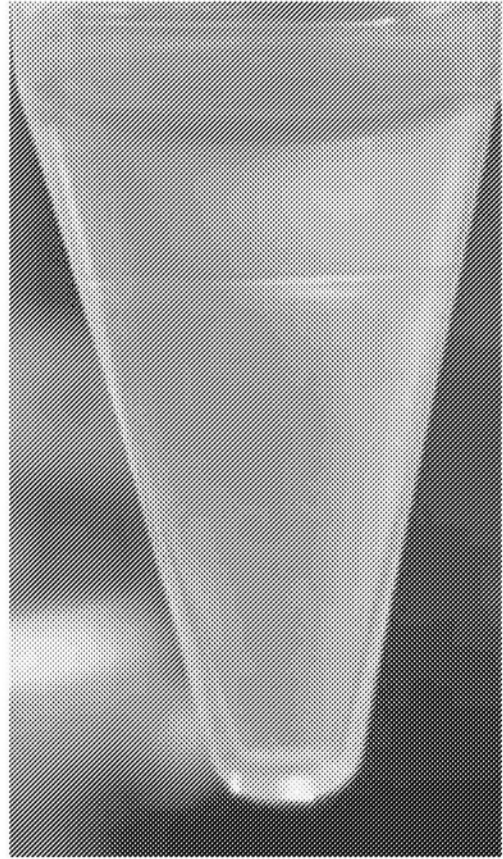


图9



(a)



(b)

图10

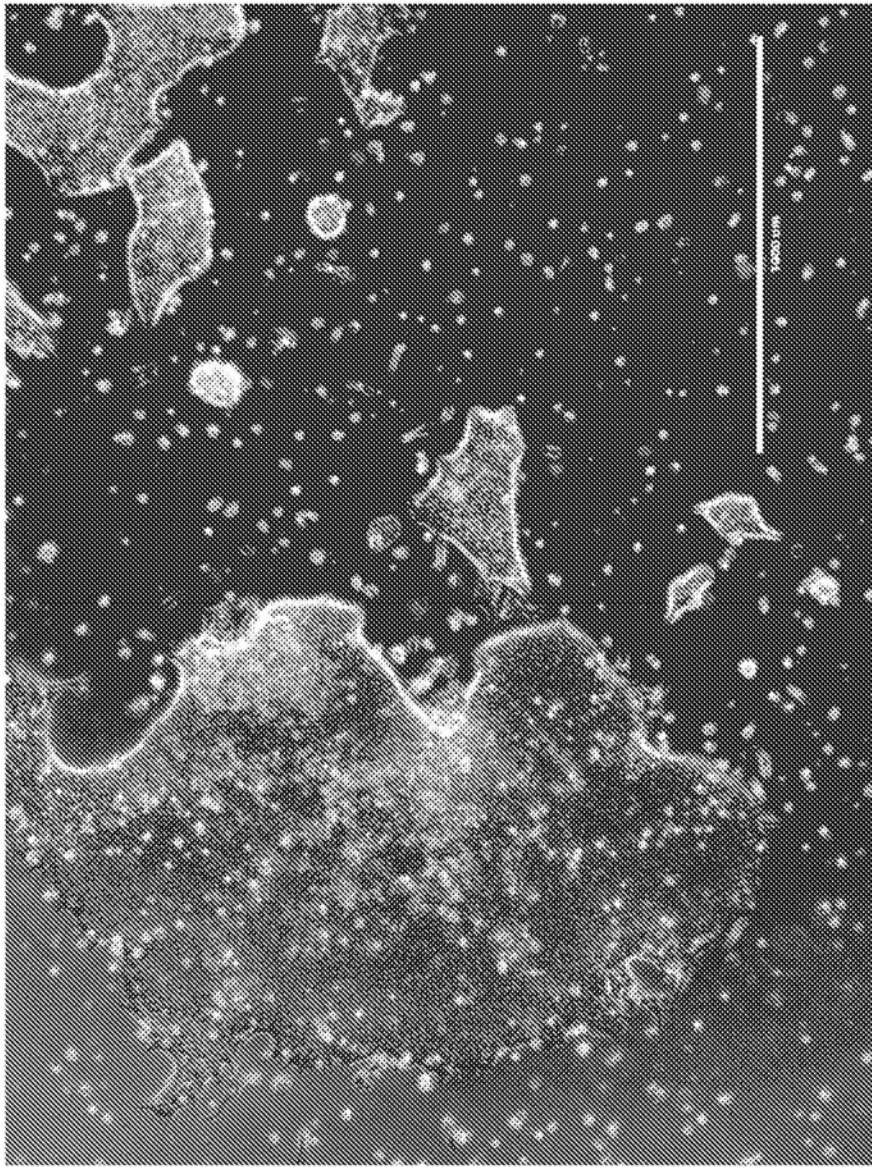


图11

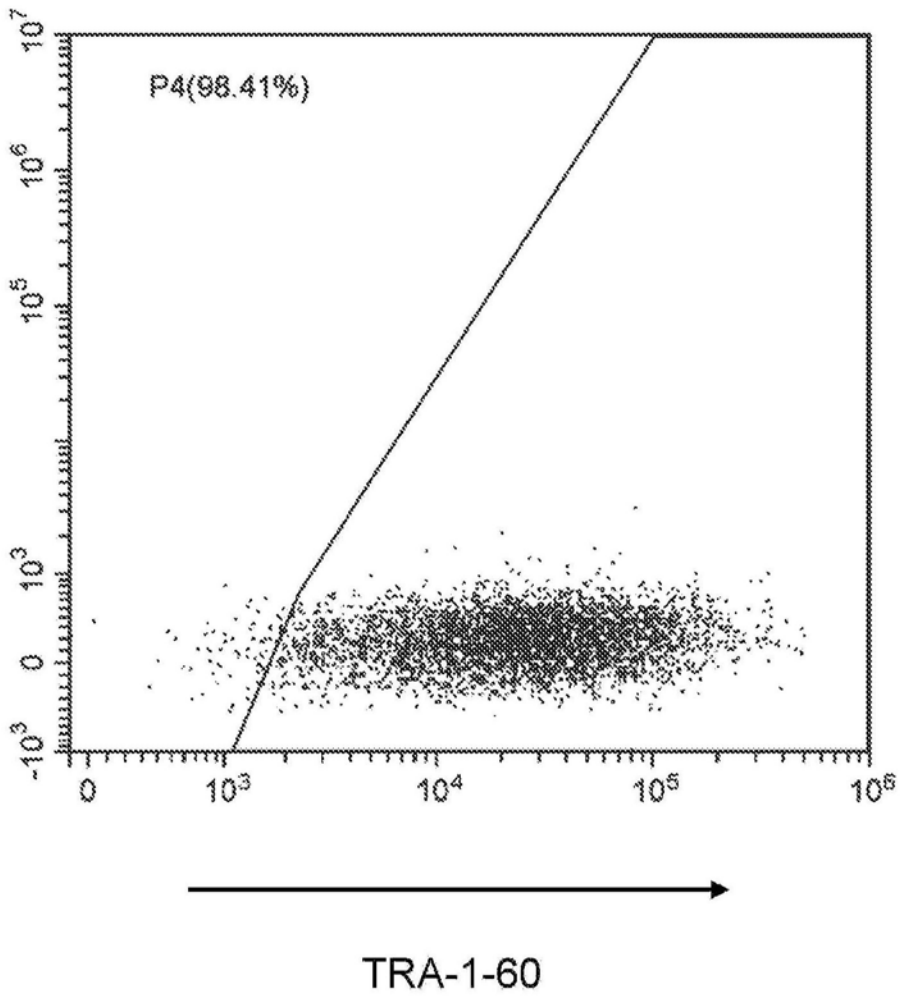


图12

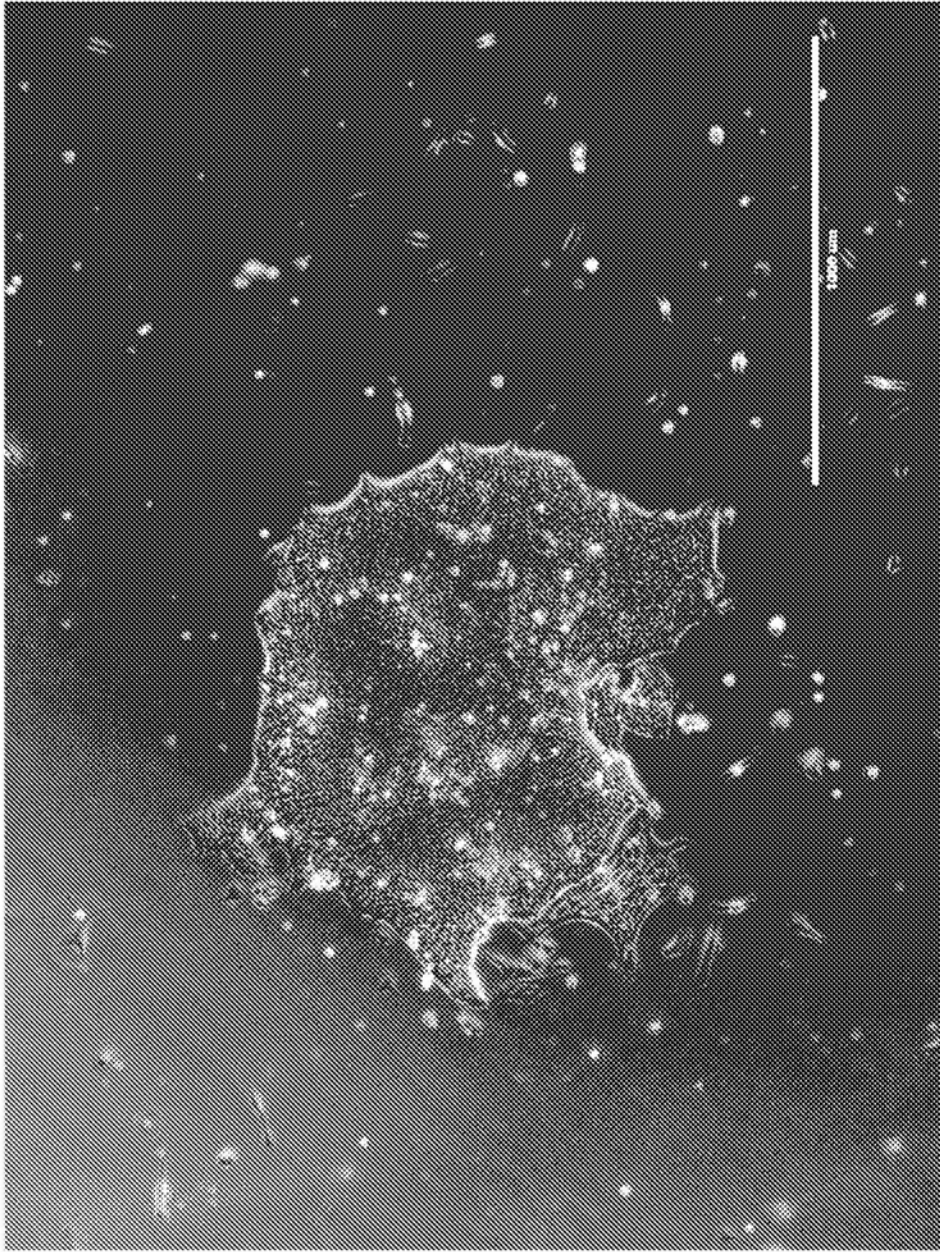


图13

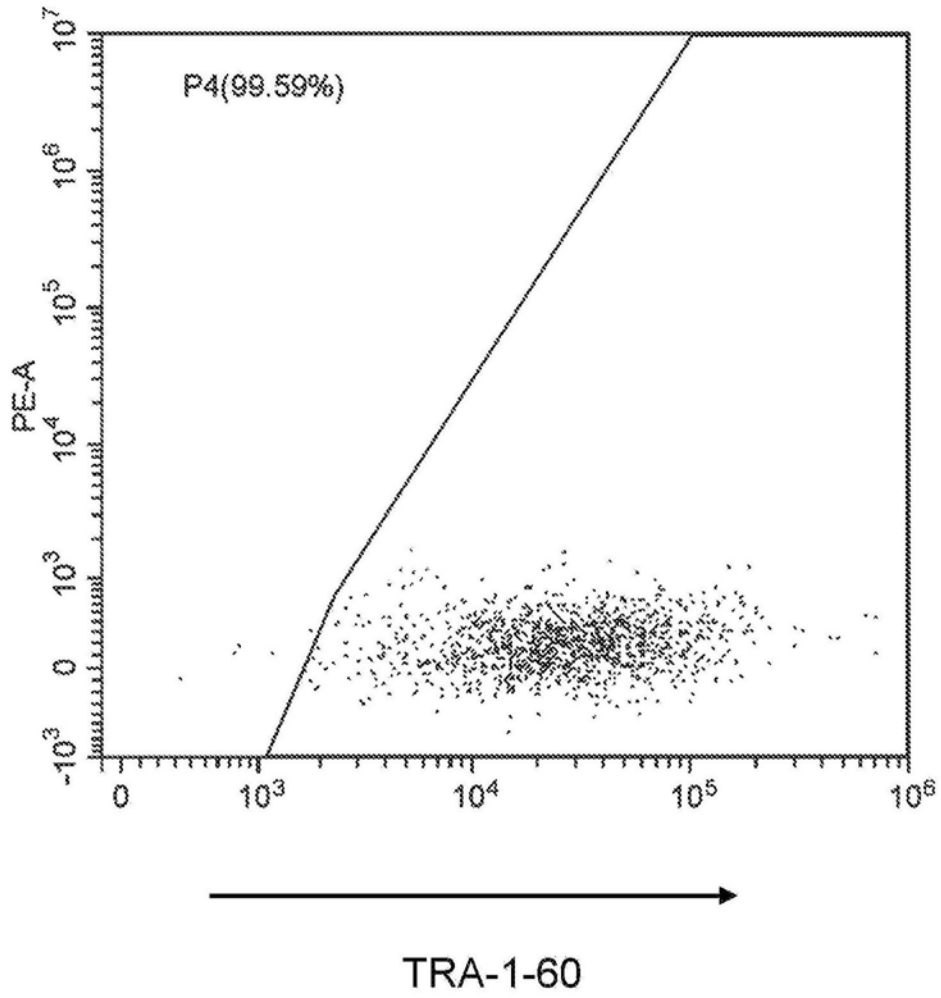


图14

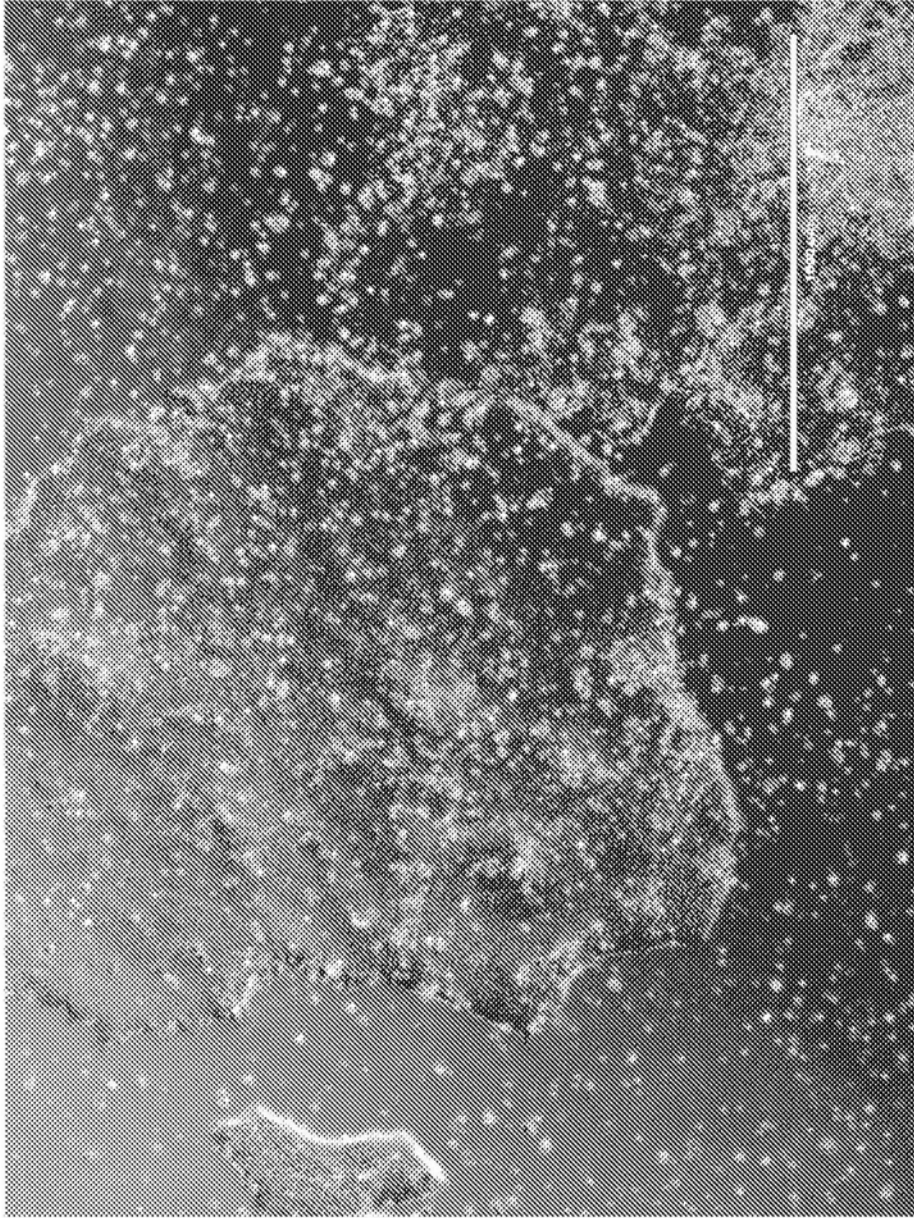


图15

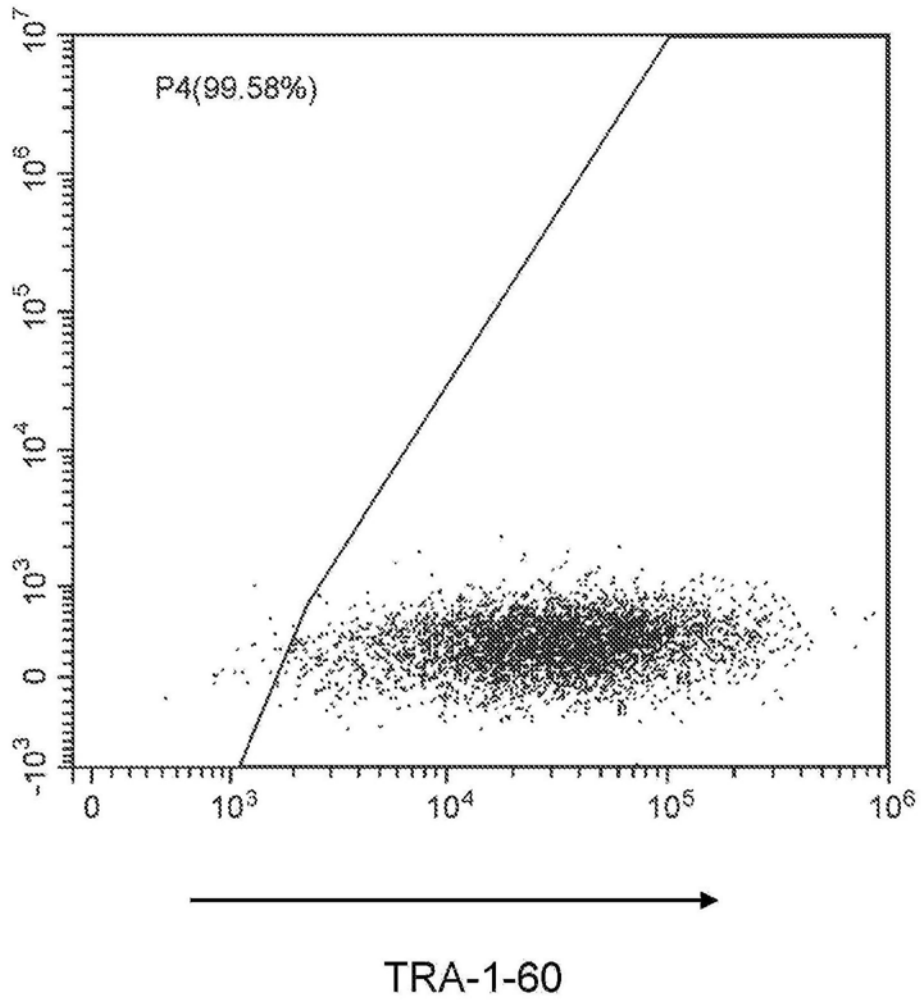


图16

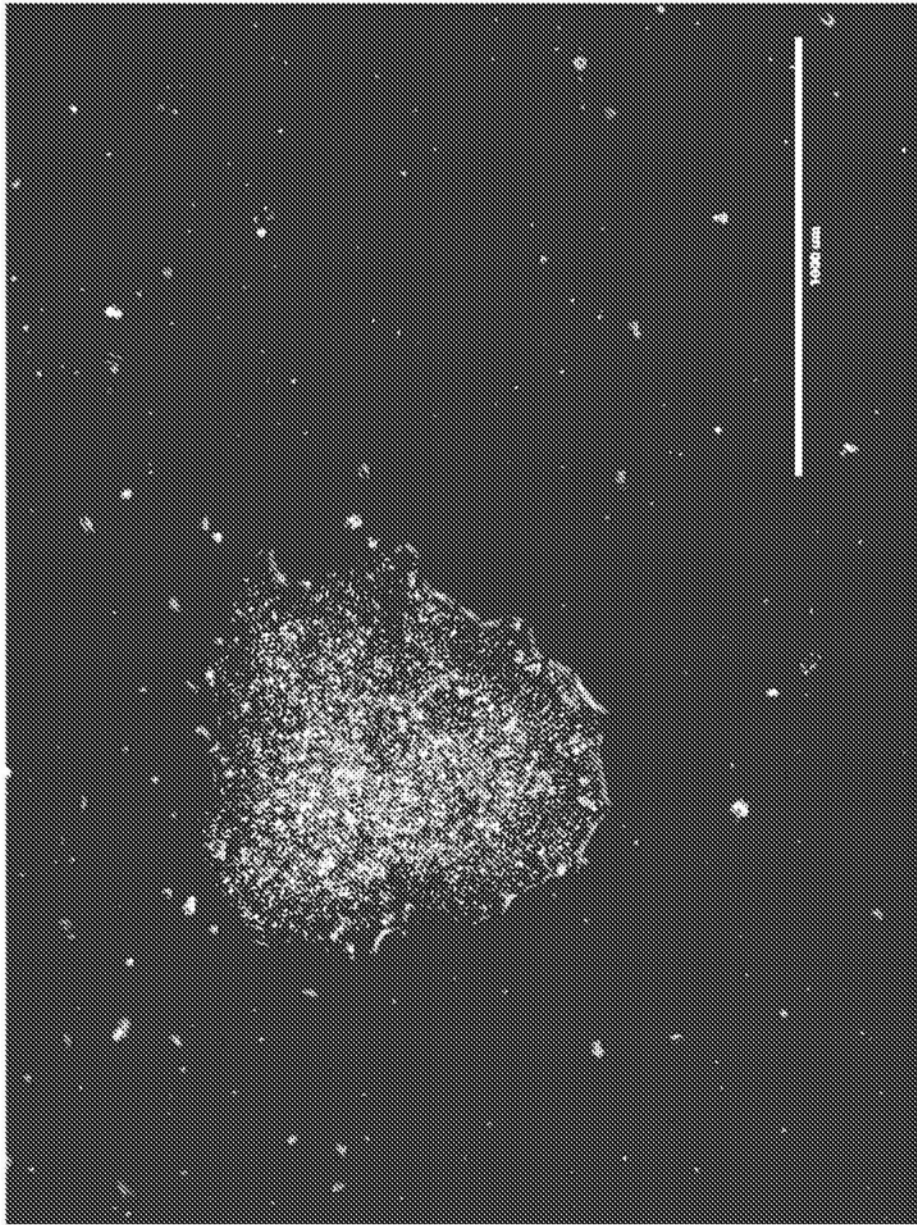


图17

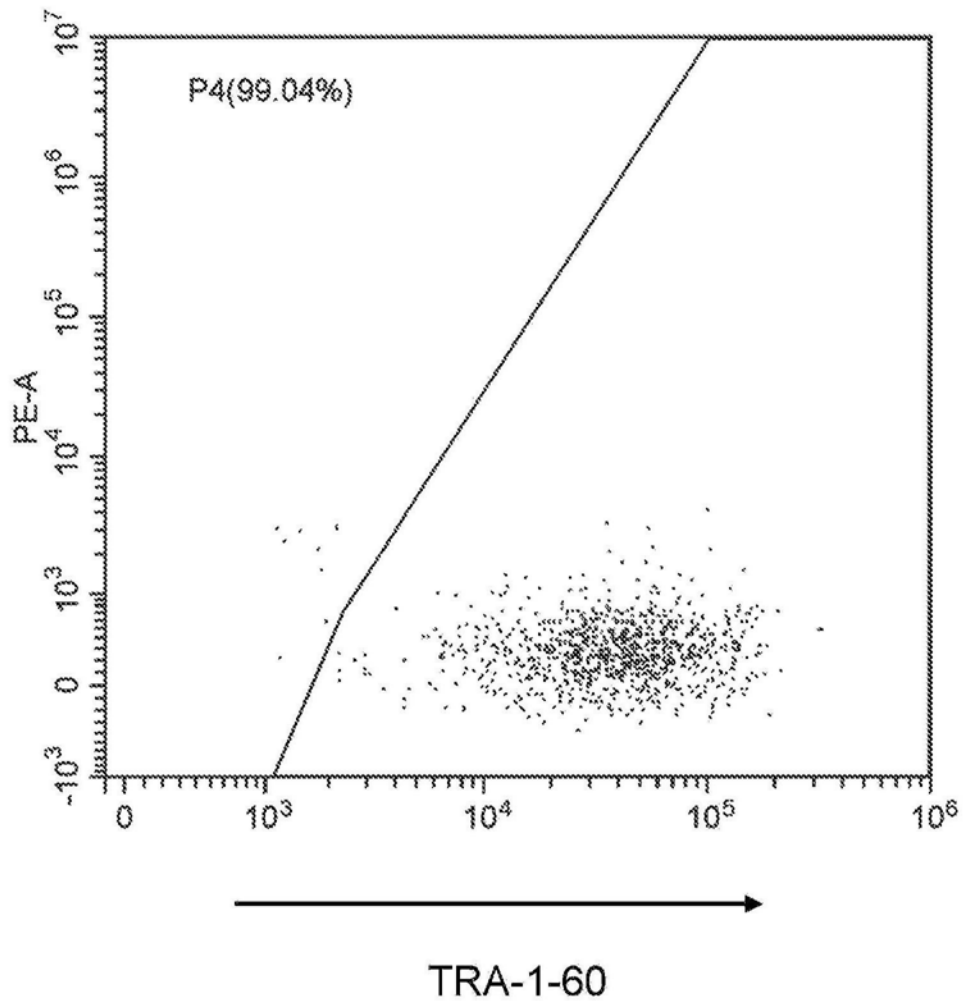


图18