

(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  
2018年7月26日(26.07.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/135633 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12M 1/00* (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)  
*C12M 3/00* (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)  
*C12N 5/071* (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/0735* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/001631
- (22) 国際出願日: 2018年1月19日(19.01.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2017-008911 2017年1月20日(20.01.2017) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 高山 英俊 (TAKAYAMA, Hidetoshi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 後藤 俊 (GOTO, Shun); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人太陽国際特許事務所 (TAIYO, NAKAJIMA & KATO); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

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

(54) 発明の名称: 細胞培養装置及び細胞培養方法

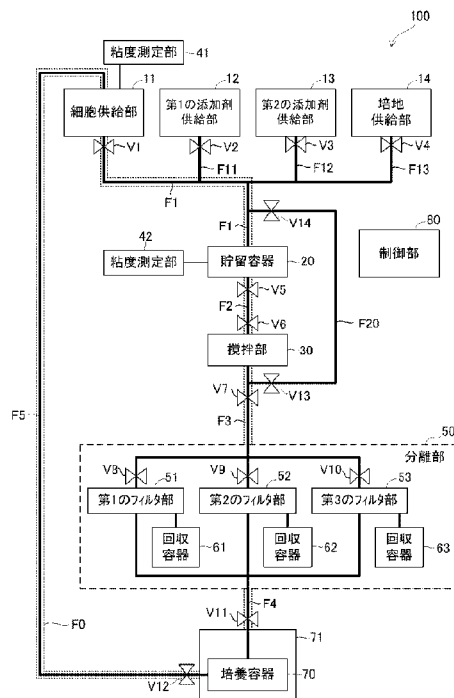


FIG. 1:  
 11 Cell supply unit  
 12 First additive supply unit  
 13 Second additive supply unit  
 14 Culture medium supply unit  
 20 Storage container  
 30 Stirring unit  
 41, 42 Viscosity measurement unit  
 50 Isolation unit  
 51 First filter unit  
 52 Second filter unit  
 53 Third filter unit  
 61, 62, 63 Recovery container  
 70 Culture container  
 80 Control unit

(57) Abstract: A cell culture apparatus comprises a cell supply unit that supplies cells, a culture medium supply unit that supplies a culture medium, an additive supply unit that supplies an additive for inducing differentiation of undifferentiated cells, a stirring unit that stirs an object to be treated, an isolation unit that isolates a component included in the object to be treated, and a culture vessel that cultures the cells, and includes: a first flow channel that forms a circulation route passing through the cell supply unit, the stirring unit, the isolation unit, and the culture vessel; a second flow channel that



WO 2018/135633 A1

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, 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))

---

connects the culture medium supply unit and the first flow channel; a third flow channel that connects the additive supply unit and the first flow channel; and a control unit that controls the feeding of liquid via the first flow channel, the second flow channel, and the third flow channel.

(57) 要約 : 細胞培養装置は、細胞を供給する細胞供給部と、培地を供給する培地供給部と、未分化細胞を分化誘導するための添加剤を供給する添加剤供給部と、処理対象物を攪拌する攪拌部と、処理対象物に含まれる成分を分離する分離部と、細胞を培養する培養容器と、を有するとともに、細胞供給部、攪拌部、分離部及び培養容器を経由する循環ルートを形成する第1の流路と、培地供給部と第1の流路とを接続する第2の流路と、添加剤供給部と第1の流路とを接続する第3の流路と、第1の流路、第2の流路及び第3の流路を介した送液を制御する制御部と、を含む。

## 明 細 書

**発明の名称**：細胞培養装置及び細胞培養方法

### 技術分野

[0001] 開示の技術は、細胞培養装置及び細胞培養方法に関する。

### 背景技術

[0002] 細胞培養に関する処理を実施する細胞培養装置に関する技術として、例えば以下の技術が知られている。

[0003] 例えば、特開2015-100309号公報には、細胞を自動で培養する自動培養装置と、培養された細胞の状態に関する情報を管理する細胞管理部と、を有する自動培養システムと、自動培養装置で培養された細胞の状態を記憶する記憶部と、発注者の元に設置された外部コンピュータと、を備える細胞管理システムが記載されている。

[0004] 国際公開第2013/187359号には、円筒形状の培養槽と、培養槽の底部の内面の中央から直立する支柱と、支柱の上部分に回転可能に取り付けられる取付部にその上部が固着され支柱を回転中心として回転する攪拌翼と、を備える細胞培養装置が記載されている。

[0005] 特表2016-529897号公報には、並進可能なベッド及び可動マルチチャンネルピペットを含むロボット液体処理システムを用いて幹細胞を培養するためのオートメーション化された方法が記載されている。

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0006] 胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell ; E S細胞)、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell ; i P S細胞) 等の多能性幹細胞を、再生医療用途または創薬支援用途に適用する場合、多能性幹細胞から所望の細胞を作製する分化誘導を行う必要がある。分化誘導の手法として多能性幹細胞に化学的刺激または物理的刺激を与える手法が挙げられる。また、生体内において分化細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉と呼ばれる三つの胚葉のいずれかから

発生する。これに倣い、多能性幹細胞から分化細胞を得る場合、第一段階として、胚葉への分化誘導を行う。

[0007] 上記のような分化誘導に必要とされる一連の処理を、閉鎖系において連続的に実施することにより大量の分化細胞を生産することを可能とした細胞培養装置についてこれまで提案された例はなく、分化細胞の培養スケールを大きくすることは困難とされていた。また、人手が介在する培養手法においては、生物学的な汚染のリスクが高まるとともに、培養によって得られる細胞の均質性が低下するおそれがある。

[0008] 開示の技術は、上記した点に鑑みてなされたものであり、多能性幹細胞の分化誘導に必要とされる一連の処理を、閉鎖系において連続的に実施可能とすることを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 開示の技術に係る細胞培養装置は、細胞を供給する細胞供給部と、培地を供給する培地供給部と、未分化細胞を分化誘導するための添加剤を供給する添加剤供給部と、処理対象物を攪拌する攪拌部と、処理対象物に含まれる成分を分離する分離部と、細胞を培養する培養容器と、を有するとともに、上記細胞供給部、上記攪拌部、上記分離部及び上記培養容器を経由する循環ルートを形成する第1の流路と、上記培地供給部と上記第1の流路とを接続する第2の流路と、上記添加剤供給部と上記第1の流路とを接続する第3の流路と、上記第1の流路、上記第2の流路及び上記第3の流路を介した送液を制御する制御部と、を含む。

[0010] 上記分離部は、上記未分化細胞と死細胞とを膜分離する第1のフィルタ膜、上記未分化細胞が分化細胞に分化される前の中間体と上記未分化細胞とを膜分離する第2のフィルタ膜、及び上記中間体と上記分化細胞とを膜分離する第3のフィルタ膜のうち少なくとも1つを有していてもよい。

[0011] 上記分離部は、上記第1のフィルタ膜、上記第2のフィルタ膜、及び上記第3のフィルタ膜のうち少なくとも2つを含む複数のフィルタ膜を有していてもよく、この場合、上記制御部は、上記複数のフィルタ膜のいずれかに

上記細胞を含む細胞懸濁液を選択的に通過させる制御を行ってもよい。

[0012] 上記第1のフィルタ膜、上記第2のフィルタ膜及び上記第3のフィルタ膜の各々の膜面に設けられた開口のサイズは、互いに異なっていてもよい。

[0013] 上記制御部は、上記添加剤と上記培地との混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、上記細胞を含む細胞懸濁液と上記混合物とを合流させて上記攪拌部に移送する制御を行うことが好ましい。

[0014] 細胞培養装置は、上記第1の流路の途中の、上記細胞供給部と上記攪拌部との間に設けられた貯留容器を更に含んでもよい。この場合、上記制御部は、上記貯留容器と上記攪拌部との間で上記混合物を循環させることにより上記混合物にせん断応力を加えた後に、上記細胞懸濁液と上記混合物とを上記貯留容器内において合流させて上記攪拌部に移送する制御を行ってもよい。また、上記制御部は、配管中に上記混合物を流すことにより上記混合物にせん断応力を加えた後に、上記細胞懸濁液と上記混合物とを上記貯留容器内において合流させて上記攪拌部に移送する制御を行ってもよい。

[0015] 上記制御部は、上記混合物の粘度が所定の粘度になるまで上記混合物にせん断応力を加えるための送液を連続的に行ってもよい。

[0016] 上記添加剤供給部は、Wntシグナル活性化剤を含む第1の添加剤を供給する第1の添加剤供給部と、Wntシグナル阻害剤を含む第2の添加剤を供給する第2の添加剤供給部と、を含んでもよい。

[0017] 細胞培養装置は、上記培養容器を収容し、上記培養容器の周囲温度を一定に保つインキュベータと、上記インキュベータの内部と外部との温度差によって上記第1の流路に沿って生じる温度勾配を緩和する温度勾配緩和機構と、を含んでもよい。

[0018] 開示の技術に係る細胞培養方法は、上記の細胞培養装置を用いて細胞を培養する細胞培養方法であって、上記制御部が、上記培地供給部から供給される上記細胞、上記添加剤供給部から供給される上記添加剤及び上記培地供給部から供給される上記培地を含む混合物を、上記攪拌部及び上記分離部を経由して上記培養容器に移送する制御を行う、というものである。

## 発明の効果

[0019] 開示の技術によれば、多能性幹細胞の分化誘導に必要とされる一連の処理を、閉鎖系において連続的に実施することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0020] [図1]開示の技術の実施形態に係る細胞培養装置の構成を示すブロック図である。

[図2]開示の技術の実施形態に係る細胞培養装置において実施される、多能性幹細胞の分化誘導のための処理の流れの一例を示すフローチャートである。

[図3]開示の技術の実施形態に係る第1の添加剤を添加する処理を行う場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図4]開示の技術の実施形態に係る培地交換処理を行う場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図5]開示の技術の実施形態に係る第1の添加剤を再添加する場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図6]開示の技術の実施形態に係る培地交換処理を行う場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図7]開示の技術の実施形態に係る第2の添加剤を添加する場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図8]開示の技術の実施形態に係る培地交換処理を行う場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図9]開示の技術の実施形態に係る第2の添加剤を再添加する場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図10]開示の技術の実施形態に係る培地交換処理を行う場合における細胞培養装置の動作を示す図である。

[図11]開示の技術の他の実施形態に係る細胞培養装置の構成を示すブロック図である。

[図12]開示の技術の他の実施形態に係る細胞培養装置の部分的な構成を示す図である。

[図13]開示の技術の他の実施形態に係る細胞培養装置の構成を示すブロック図である。

### 発明を実施するための形態

[0021] 以下、開示の技術の実施形態の一例を、図面を参照しつつ説明する。なお、各図面において同一または等価な構成要素および部分には同一の参照符号を付与している。

[0022] [第1の実施形態]

図1は、開示の技術の実施形態に係る細胞培養装置100の構成の一例を示すブロック図である。細胞培養装置100は、多能性幹細胞を分化細胞に分化誘導するために必要とされる複数の処理を自動で行い、所望の分化細胞を生産する細胞培養装置である。

[0023] 多能性幹細胞は、自己複製能と、外胚葉、中胚葉および内胚葉のいずれにも分化し得る多分化能とを有する細胞である。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性生殖細胞（Embryonic Germ cell；EG細胞）、胚性癌細胞（Embryonal Carcinoma cell；EC細胞）、多能性成体前駆細胞（Multipotent Adult Progenitor cell；MAP細胞）、成体多能性幹細胞（Adult Pluripotent Stem cell；APSC細胞）、Muse細胞（Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell）などが挙げられる。分化細胞は、多能性幹細胞が分化し、特定の形態及び機能を有する細胞である。本実施形態に係る細胞培養装置100を用いて生産される分化細胞としては、特に限定されないが、例えば、心筋細胞、神経細胞などが挙げられる。

[0024] 細胞培養装置100は、細胞供給部11、第1の添加剤供給部12、第2の添加剤供給部13及び培地供給部14を備える。また、細胞培養装置100は、貯留容器20、攪拌部30、粘度測定部41、42、分離部50、培養容器70及び制御部80を備える。

[0025] 細胞供給部11は、細胞培養装置100において培養される細胞を含む細胞懸濁液を、細胞培養装置100の流路内に供給する。細胞供給部11の流

出口の近傍には、開閉バルブV 1が設けられている。開閉バルブV 1は、細胞供給部1 1から細胞懸濁液を供給する場合に開状態に制御され、それ以外の場合は閉状態に制御される。

[0026] 第1の添加剤供給部1 2は、多能性幹細胞の分化誘導に必要な、W n tシグナル活性化剤を含む第1の添加剤を細胞培養装置1 0 0の流路内に供給する。第1の添加剤供給部1 2の流出口の近傍には、開閉バルブV 2が設けられている。開閉バルブV 2は、第1の添加剤供給部1 2から第1の添加剤を供給する場合に開状態に制御され、それ以外の場合は閉状態に制御される。

[0027] 第2の添加剤供給部1 3は、多能性幹細胞の分化誘導に必要な、W n tシグナル阻害剤を含む第2の添加剤を細胞培養装置1 0 0の流路内に供給する。第2の添加剤供給部1 3の流出口の近傍には、開閉バルブV 3が設けられている。開閉バルブV 3は、第2の添加剤供給部1 3から第2の添加剤を供給する場合に開状態に制御され、それ以外の場合は閉状態に制御される。

[0028] 培地供給部1 4は、細胞の培養に使用する新鮮な培地（培養液）を細胞培養装置1 0 0の流路内に供給する。培地供給部1 4の流出口の近傍には、開閉バルブV 4が設けられている。開閉バルブV 4は、培地供給部1 4から培地を供給する場合に開状態に制御され、それ以外の場合は閉状態に制御される。

[0029] 貯留容器2 0は、細胞供給部1 1から供給される細胞懸濁液、第1の添加剤供給部1 2から供給される第1の添加剤、第2の添加剤供給部1 3から供給される第2の添加剤及び培地供給部1 4から供給される培地を一次的に貯留しておくための容器である。貯留容器2 0の形態は、特に限定されず、例えば、ガラス製またはステンレス製の容器、プラスチック製のバッグの形態を有する容器を使用することが可能である。

[0030] 攪拌部3 0は、流路F 2を介して流入する処理対象物を攪拌及び混合する処理を行う処理部である。攪拌部3 0は、駆動部を有しないスタティックミキサとしての構成を有していることが好ましく、例えば、管状体と、管状体の内部に固定設置され、管状体の内部にらせん状の流路を形成する攪拌エレ



メントと、を含んで構成され得る。なお、攪拌部30は、攪拌翼を回転駆動することにより攪拌及び混合を行うものであってもよい。

[0031] 分離部50は、流路F3を介して流入する処理対象物（細胞懸濁液）に含まれる成分を分離する処理を行う処理部である。分離部50は、第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、第3のフィルタ部53を含んで構成されている。第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、第3のフィルタ部53は、それぞれ、細胞懸濁液が通過する膜面に形成された開口のサイズが互いに異なるフィルタ膜を備えている。すなわち、第1のフィルタ部51が備えるフィルタ膜の開口サイズが最も小さく、第3のフィルタ部53が備えるフィルタ膜の開口サイズが最も大きい。第2のフィルタ部52が備えるフィルタ膜の開口サイズは、第1のフィルタ部51が備えるフィルタ膜の開口サイズよりも大きく且つ第3のフィルタ部53が備えるフィルタ膜の開口サイズよりも小さい。第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53は、それぞれ、流路F3を介して流入する処理対象物（細胞懸濁液）に対してフィルタ膜による膜分離処理を行う。

[0032] 第1のフィルタ部51は、多能性幹細胞が分化を開始する前の培養の初期段階において使用される。第1のフィルタ部51は、生存している未分化細胞と死細胞とを膜分離するのに好適な開口サイズのフィルタ膜を有する。多能性幹細胞において、生存している未分化細胞は、複数の細胞の凝集体である細胞塊を形成し、死細胞は細胞塊から離脱して単一細胞となる。従って、膜分離処理によって生存している未分化細胞と死細胞とを分離することが可能である。第1のフィルタ部51は、生存している未分化細胞（細胞塊）と死細胞とを含む細胞懸濁液の中から死細胞を除去し、未分化細胞を残す目的で使用される。

[0033] 第2のフィルタ部52は、多能性幹細胞が心筋細胞等の分化細胞に分化する前の中間体（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に分化した段階で使用される。第2のフィルタ部52は、中間体に分化しない未分化細胞と中間体とを膜分離するのに好適な開口サイズのフィルタ膜を有する。中間体のサイズは、未分

化細胞のサイズよりも大きいので、膜分離処理によって未分化細胞と中間体とを分離することが可能である。第2のフィルタ部52は、未分化細胞と中間体とを含む細胞懸濁液の中から未分化細胞を除去し、中間体を残す目的で使用される。

[0034] 第3のフィルタ部53は、多能性幹細胞が心筋細胞等の分化細胞に分化した段階で使用される。第3のフィルタ部53は、分化細胞に移行しない中間体と、分化細胞とを膜分離するのに好適な開口サイズのフィルタ膜を有する。心筋細胞等の分化細胞のサイズは、外胚葉、中胚葉、内胚葉等の中間体のサイズよりも大きいので、膜分離処理によって分化細胞と中間体とを分離することが可能である。第3のフィルタ部53は、分化細胞と中間体とを含む細胞懸濁液の中から中間体を除去し、分化細胞を残す目的で使用される。

[0035] 第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53は、それぞれ、処理対象物（細胞懸濁液）がフィルタ膜の膜面に沿って流れるタンジェンシャルフローフィルタの構成を有してもよい。また、第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53は、それぞれ、処理対象物（細胞懸濁液）の流れ方向が、フィルタ膜の膜面に対して交差する方向となるデッドエンドフローフィルタの構成を有してもよい。

[0036] 第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53には、それぞれ回収容器61、62及び63が接続されている。第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53において、フィルタ膜を透過した濾液は、それぞれ、回収容器61、62及び63に回収される。

[0037] 本実施形態に係る細胞培養装置100において、第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53は、培養期間中における所定のタイミングで選択的に使用される。すなわち、流路F3を介して分離部50に流入する処理対象物（細胞懸濁液）は、第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53のいずれかのフィルタ膜を

通過する。

[0038] 第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53の流入口の近傍には、それぞれ、開閉バルブV8、V9及びV10が設けられている。開閉バルブV8は、第1のフィルタ部51による膜分離処理を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合は、閉状態に制御される。開閉バルブV9は、第2のフィルタ部52による膜分離処理を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合は、閉状態に制御される。開閉バルブV10は、第3のフィルタ部53による膜分離処理を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合は、閉状態に制御される。

[0039] ここで、分化誘導のための細胞培養において生じる、死細胞（シングルセル）（ $\sim 20 \mu m$ ）、未分化細胞の一例であるiPS細胞の凝集体（ $50 \sim 150 \mu m$ ）、中間体の一例である中胚葉の凝集体（ $500 \sim 600 \mu m$ ）及び分化細胞の一例である心筋細胞の凝集体（ $200 \sim 300 \mu m$ ）を、第1のフィルタ部51、第2のフィルタ部52、及び第3のフィルタ部53において膜分離する場合における、各フィルタ部のフィルタ膜の好ましい開口サイズ及び膜分離後の移送先を、下記の表1に例示する。

[表1]

| フィルタ膜の好ましい開口サイズdの範囲    |                      | 第1のフィルタ部              | 第2のフィルタ部                | 第3のフィルタ部                |                |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
|                        |                      | $20 < d < 50 [\mu m]$ | $150 < d < 200 [\mu m]$ | $300 < d < 500 [\mu m]$ |                |
| 死細胞                    | $\sim 20 \mu m$      | 回収容器へ<br>(透過側)        | 回収容器へ<br>(透過側)          | /                       |                |
| 未分化細胞<br>(未分化iPS細胞凝集体) | $50 \sim 150 \mu m$  | 培養容器へ<br>(遮断側)        |                         |                         |                |
| 中間体<br>(中胚葉の凝集体)       | $500 \sim 600 \mu m$ | /                     | 培養容器へ<br>(遮断側)          |                         | 回収容器へ<br>(透過側) |
| 分化細胞<br>(心筋細胞の凝集体)     | $200 \sim 300 \mu m$ |                       | 培養容器へ<br>(遮断側)          |                         |                |

なお、第1のフィルタ部51のフィルタ膜のより好ましい開口サイズは $30 \mu m$ であり、第2のフィルタ部52のフィルタ膜のより好ましい開口サイズは $170 \mu m$ であり、第3のフィルタ部53のフィルタ膜のより好ましい開口サイズは $400 \mu m$ である。

[0040] 培養容器70は、細胞を培養するための容器である。培養容器70の形態

は、特に限定されず、例えば、ガラス製またはステンレス製の容器やプラスチック製のバッグの形態を有する容器を使用することが可能である。培養容器 70 は、例えば、温度 30℃～40℃（好ましくは 37℃）且つ CO<sub>2</sub> 濃度 2%～10%（好ましくは 5%）に制御され且つ密閉されたインキュベータ 71 内に收容されている。

[0041] 粘度測定部 41 は、細胞供給部 11 に收容される細胞懸濁液の粘度を測定し、測定結果を制御部 80 に通知する。同様に、粘度測定部 42 は、貯留容器 20 に收容される液体の粘度を測定し、測定結果を制御部 80 に通知する。

[0042] 本実施形態に係る細胞培養装置 100 は、細胞供給部 11、貯留容器 20、攪拌部 30、分離部 50 及び培養容器 70 をこの順序で経由する循環ルートを形成する循環流路 F0 を有する。循環流路 F0 は、流路 F1、F2、F3、F4 及び F5 を含んで構成されている。流路 F1 は、細胞供給部 11 の流出口と貯留容器 20 の流入口とを接続する流路である。流路 F2 は、貯留容器 20 の流出口と攪拌部 30 の流入口とを接続する流路である。流路 F3 は、攪拌部 30 の流出口と分離部 50 の流入口とを接続する流路である。流路 F4 は、分離部 50 の流出口と培養容器 70 の流入口とを接続する流路である。流路 F5 は、培養容器 70 の流出口と細胞供給部 11 の流入口とを接続する流路である。なお、循環流路 F0 は、開示の技術における第 1 の流路の一例である。

[0043] 第 1 の添加剤供給部 12 は、流路 F11 を介して循環流路 F0（流路 F1）に接続され、第 2 の添加剤供給部 13 は、流路 F12 を介して循環流路 F0（流路 F1）に接続されている。培地供給部 14 は、流路 F13 を介して循環流路 F0（流路 F1）に接続されている。なお、流路 F13 は、開示の技術における第 2 の流路の一例である。流路 F11 及び F12 は、開示の技術における第 3 の流路の一例である。

[0044] 貯留容器 20 と攪拌部 30 との間に設けられた流路 F2 には開閉バルブ V5 及び V6 が設けられている。開閉バルブ V5 及び V6 は、それぞれ、貯留

容器 20 から攪拌部 30 に向けて送液を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合に閉状態に制御される。

[0045] また、攪拌部 30 と分離部 50 との間に設けられた流路 F 3 には開閉バルブ V 7 が設けられている。開閉バルブ V 7 は、攪拌部 30 から分離部 50 に向けて送液を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合に閉状態に制御される。

[0046] 細胞培養装置 100 は、攪拌部 30 の流出口と貯留容器 20 の流入口とを直結する流路 F 20 を有する。すなわち、流路 F 20 の一端は、流路 F 1 に接続され、流路 F 20 の他端は、流路 F 3 に接続されている。流路 F 20 には、開閉バルブ V 13 及び V 14 が設けられている。開閉バルブ V 13 及び V 14 は、攪拌部 30 から貯留容器 20 に向けて送液を行う場合に開状態に制御され、それ以外の場合に閉状態に制御される。

[0047] 細胞培養装置 100 は、流路 F 1 ~ F 5、F 11 ~ F 12 及び F 20 を介した送液を行う複数のポンプ（図示せず）を備えている。なお、細胞供給部 11、第 1 の添加剤供給部 12、第 2 の添加剤供給部 13、培地供給部 14、貯留容器 20、攪拌部 30、分離部 50、培養容器 70 の各々の内部の圧力を調整することによって、これらの各要素間における送液を行ってもよい。

[0048] 制御部 80 は、開閉バルブ V 1 ~ V 14 の開閉制御及びポンプ（図示せず）の駆動制御を行うことにより、流路 F 1 ~ F 5、F 11 ~ F 12 及び F 20 を介した送液の制御を行う。

[0049] 本実施形態に係る細胞培養装置 100 において実施される多能性幹細胞の分化誘導のための処理は、多能性幹細胞を Wnt シグナル活性剤を含む培地中で培養する第 1 の工程と、第 1 の工程で得られた細胞を Wnt シグナル阻害剤を含む培地中で培養する第 2 の工程と、を含む。なお、上記の第 1 の工程及び第 2 の工程を含む分化誘導の方法の詳細は、例えば、国際公開第 2013/111875 号に記載されている。

[0050] 図 2 は、細胞培養装置 100 において実施される、多能性幹細胞の分化誘

導のための処理の流れの一例を示すフローチャートである。

- [0051] ステップS 1において、Wntシグナル活性剤を含む第1の添加剤を添加した培地中で細胞を培養する。
- [0052] 第1の添加剤を添加した培地中での培養の開始から所定時間が経過した後、ステップS 2において培地交換を行う。なお、培養を開始してから最初に行われる培地交換処理を培地交換 [1] とする。培養開始から培地交換 [1] が完了するまでの期間は、例えば0.5日~2日程度である。
- [0053] ステップS 3において、Wntシグナル活性剤を含む第1の添加剤を培地中に再添加する。
- [0054] 第1の添加剤を再添加してから所定時間が経過した後、ステップS 4において培地交換を行う。なお、第1の添加剤を再添加した後に行われる培地交換処理を培地交換 [2] とする。
- [0055] ステップS 5において、第1の添加剤の再添加及び培地交換 [2] を含む一連の処理を1単位とする処理サイクルのサイクル数が、所定のサイクル数に達したか否かを判定する。処理サイクル数が、所定のサイクル数に達するまで、第1の添加剤の再添加及び培地交換 [2] を含む一連の処理が繰り返し行われる。第1の添加剤の再添加及び培地交換 [2] を含む一連の処理の1サイクル期間は、例えば1日~5日程度である。
- [0056] ステップS 6において、Wntシグナル阻害剤を含む第2の添加剤を添加した培地中で細胞を培養する。
- [0057] 第2の添加剤を添加してから所定時間が経過した後、ステップS 7において培地交換を行う。なお、第2の添加剤を添加してから最初に行われる培地交換処理を培地交換 [3] とする。第2の添加剤を添加してから培地交換 [2] が完了するまでの期間は、例えば0.5日~2日程度である。
- [0058] ステップS 8において、Wntシグナル阻害剤を含む第2の添加剤を培地中に再添加する。
- [0059] 第2の添加剤を再添加してから所定時間が経過した後、ステップS 9において培地交換を行う。なお、第2の添加剤を再添加した後に行われる培地交

換処理を培地交換〔４〕とする。

[0060] ステップS 10において、第2の添加剤の再添加及び培地交換〔４〕を含む一連の処理を1単位とする処理サイクルのサイクル数が、所定のサイクル数に達したか否かを判定する。処理サイクル数が、所定のサイクル数に達するまで、第2の添加剤の再添加及び培地交換〔４〕を含む一連の処理が繰り返し行われる。第2の添加剤の再添加及び培地交換〔４〕を含む一連の処理の1サイクル期間は、例えば1日～5日程度である。

[0061] 以下に、上記の各ステップに対応する細胞培養装置100の動作について説明する。なお、説明の煩雑さを回避する観点から、以下の説明では、開閉バルブV 1～V 14の開閉制御に関し、これらの開閉バルブV 1～V 14を開状態に制御する場合のみについて言及する。開閉バルブV 1～V 14を開状態に制御された後、適宜閉状態に制御されるものとする。

[0062] <第1の添加剤の添加>

図3は、図2に示すステップS 1において実施される処理、すなわち、第1の添加剤を添加する処理を行う場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図3において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。なお、細胞供給部11には、細胞培養装置100を用いて分化誘導を行う多能性幹細胞を含む細胞懸濁液が収容されているものとする。また、細胞供給部11に収容された細胞懸濁液の粘度が粘度測定部41によって測定され、測定結果が制御部80に通知されているものとする。

[0063] ステップA 1において、制御部80は、開閉バルブV 2及びV 4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、Wntシグナル活性化剤を含む第1の添加剤が、第1の添加剤供給部12から貯留容器20に供給されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。これにより、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20に収容される。貯留容器20に収容された第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果

が制御部 80 に通知される。

[0064] ここで、貯留容器 20 に収容されている第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、細胞供給部 11 に収容されている細胞懸濁液の粘度よりも高いことが想定される。第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物及び細胞懸濁液は、後に混合されることになるが、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と細胞懸濁液との粘度差が大きいと良好な混合状態が得られない場合がある。従って、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度を、細胞懸濁液の粘度と同等にした後、両者を混合することが好ましい。第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、チキソ性を有しており、せん断応力を加えることで粘度を低下させることが可能である。そこで、制御部 80 は、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、細胞懸濁液と上記混合物とを合流させて攪拌部 30 に移送する制御を行う。具体的には、制御部 80 は、貯留容器 20 と攪拌部 30 との間で第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を循環させることにより上記の混合物にせん断応力を加える。

[0065] すなわち、ステップ A 2 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 5 及び V 6 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、貯留容器 20 に収容されている第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が流路 F 2 を経由して攪拌部 30 に移送される。第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部 30 において攪拌されることで、せん断応力が加えられ、粘度が低下する。

[0066] 続いて、ステップ A 3 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 13 及び V 14 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、攪拌部 30 を通過した第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、流路 F 20 を経由して貯留容器 20 に戻される。貯留容器 20 に収容された第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部 42 によって測定され、測定結果が制御部 80 に通知される。制御部 80 は、粘度測定部 42 から通知される混合物の粘度と、粘度測定部 41 から通知される細胞懸濁液の



粘度との差分値が所定値以下になるまで、貯留容器 20 と攪拌部 30 との間で上記の混合物を循環させる送液を連続して行う。なお、制御部 80 は、粘度測定部 41 から通知される細胞懸濁液の粘度とは無関係に粘度測定部 42 から通知される混合物の粘度の値が所定値以下になるまで、貯留容器 20 と攪拌部 30 との間で上記の混合物を循環させる送液を連続して行ってもよい。また、貯留容器 20 と攪拌部 30 との間で上記の混合物を循環させる送液を、予め定められたサイクル数に達するまで連続して行ってもよい。

[0067] 第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液が完了すると、ステップ A 4 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 1 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞供給部 11 に收容されている細胞懸濁液が、流路 F 1 を経由して貯留容器 20 に移送され、粘度調整がなされた第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と合流する。

[0068] ステップ A 5 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 5 及び V 6 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器 20 から流路 F 2 を経由して攪拌部 30 に移送される。細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部 30 において攪拌、混合される。第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えて粘度調整を実施しておくことで、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物において良好な混合状態を得ることができる。

[0069] ステップ A 6 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 7 及び V 8 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、攪拌部 30 から流路 F 3 を経由して分離部 50 の第 1 のフィルタ部 51 に供給される。細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、第 1 のフィルタ部 51 において膜分離処理が施され、生存している細胞と死細胞とが分離される。第 1 のフィルタ部 51 のフィルタ膜を透過した死細胞を含む濾液は回収容器 61 に回収さ

れる。

[0070] ステップA7において、制御部80は、開閉バルブV11を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、死細胞が除去された細胞懸濁液、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、第1のフィルタ部51から流路F4を経由して培養容器70に供給される。多能性幹細胞がWntシグナル活性化剤を含む第1の添加剤が添加された培地とともに培養容器70に收容されることで、分化誘導のための培養が開始される。

[0071] <培地交換 [1]>

図4は、図2に示すステップS2において実施される処理、すなわち、培地交換 [1] を行う場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図4において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている

[0072] ステップB1において、制御部80は、開閉バルブV12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより使用済み培地を含む細胞懸濁液が、培養容器70から流路F5を経由して細胞供給部11に移送される。

[0073] ステップB2において、制御部80は、開閉バルブV1及びV4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、使用済み培地を含む細胞懸濁液が、細胞供給部11から流路F1を経由して貯留容器20に移送されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。

[0074] ステップB3において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、貯留容器20から流路F2を経由して攪拌部30に移送される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、攪拌部30において攪拌、混合される。

[0075] ステップB4において、制御部80は、開閉バルブV7及びV8を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追

加された細胞懸濁液が、攪拌部30から流路F3を経由して分離部50の第1のフィルタ部51に供給される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、第1のフィルタ部51において膜分離処理が施され、使用済み培地及び新鮮な培地を含む混合物の一部が、死細胞とともに除去される。第1のフィルタ部51のフィルタ膜を透過した死細胞を含む濾液は回収容器61に回収される。

[0076] ステップB5において、制御部80は、開閉バルブV11を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、膜分離処理済みの細胞懸濁液が、第1のフィルタ部51から流路F4を経由して培養容器70に供給され、培地交換処理が完了する。

[0077] <第1の添加剤の再添加>

図5は、図2に示すステップS3において実施される処理、すなわち、第1の添加剤を再添加する場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図5において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0078] ステップC1において、制御部80は、開閉バルブV2及びV4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、Wntシグナル活性化剤を含む第1の添加剤が、第1の添加剤供給部12から貯留容器20に供給されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。これにより、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20に収容される。貯留容器20に収容された第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。

[0079] ここで、貯留容器20に収容されている第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、培養容器70に収容されている細胞懸濁液の粘度よりも高いことが想定される。第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物及び細胞懸濁液は、後に混合されることになるが、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と細胞懸濁液との粘度差が大きいと良好な混合状態が得られない場

合がある。従って、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度を、細胞懸濁液の粘度と同等にした後、両者を混合することが好ましい。第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、チキソ性を有しており、せん断応力を加えることで粘度が低下させることが可能である。そこで、制御部80は、第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、細胞懸濁液と上記混合物とを合流させて攪拌部30に移送する制御を行う。具体的には、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を循環させることにより上記の混合物にせん断応力を加える。

[0080] すなわち、ステップC2において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、貯留容器20に收容されている第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が流路F2を経由して攪拌部30に移送される。第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部30において攪拌されることで、せん断応力が加えられ、粘度が低下する。

[0081] 続いて、ステップC3において、制御部80は、開閉バルブV13及びV14を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、攪拌部30を通過した第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、流路F20を経由して貯留容器20に戻される。貯留容器20に收容された第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。制御部80は、粘度測定部42から通知される混合物の粘度の値が所定値以下になるまで、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を連続して行う。なお、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を、予め定められたサイクル数に達するまで連続して行ってもよい。

[0082] 第1の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液が完了すると、ステップC4において、制御部80は、開閉バルブV12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより細胞懸濁

液が、培養容器 70 から流路 F 5 を経由して細胞供給部 11 に移送される。

[0083] ステップ C 5 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 1 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞供給部 11 に収容されている細胞懸濁液が、流路 F 1 を経由して貯留容器 20 に移送され、粘度調整がなされた第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と合流する。

[0084] ステップ C 6 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 5 及び V 6 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器 20 から流路 F 2 を経由して攪拌部 30 に移送される。細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部 30 において攪拌、混合される。第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えて粘度調整を実施しておくことで、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物において良好な混合状態を得ることができる。

[0085] ステップ C 7 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 7 及び V 9 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、攪拌部 30 から流路 F 3 を経由して分離部 50 の第 2 のフィルタ部 52 に供給される。細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、第 2 のフィルタ部 52 において膜分離処理が施され、中間体（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に分化しない未分化細胞及び死細胞と、中間体とが分離される。第 2 のフィルタ部 52 のフィルタ膜を透過した未分化細胞及び死細胞を含む濾液は回収容器 62 に回収される。

[0086] ステップ C 8 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 11 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、未分化細胞及び死細胞が除去され、中間体が残された細胞懸濁液、第 1 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、第 2 のフィルタ部 52 から流路 F 4 を経由して培養容器 70 に供給される。

[0087] <培地交換 [2]>

図6は、図2に示すステップS4において実施される処理、すなわち、培地交換[2]を行う場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図6において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0088] ステップD1において、制御部80は、開閉バルブV12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより使用済み培地を含む細胞懸濁液が、培養容器70から流路F5を経由して細胞供給部11に移送される。

[0089] ステップD2において、制御部80は、開閉バルブV1及びV4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、使用済み培地を含む細胞懸濁液が、細胞供給部11から流路F1を経由して貯留容器20に移送されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。

[0090] ステップD3において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、貯留容器20から流路F2を経由して攪拌部30に移送される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、攪拌部30において攪拌、混合される。

[0091] ステップD4において、制御部80は、開閉バルブV7及びV9を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、攪拌部30から流路F3を経由して分離部50の第2のフィルタ部52に供給される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、第2のフィルタ部52において膜分離処理が施され、使用済み培地及び新鮮な培地を含む混合物の一部が、死細胞及び未分化細胞とともに除去される。第2のフィルタ部52のフィルタ膜を透過した死細胞及び未分化細胞を含む濾液は回収容器62に回収される。

[0092] ステップD5において、制御部80は、開閉バルブV11を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、膜分離処理済みの細胞

懸濁液が、第2のフィルタ部52から流路F4を経由して培養容器70に供給され、培地交換処理が完了する。

[0093] <第2の添加剤の添加>

図7は、図2に示すステップS6において実施される処理、すなわち、第2の添加剤を添加する場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図7において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0094] ステップE1において、制御部80は、開閉バルブV3及びV4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、Wntシグナル阻害剤を含む第2の添加剤が、第2の添加剤供給部13から貯留容器20に供給されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。これにより、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20に收容される。貯留容器20に收容された第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。

[0095] ここで、貯留容器20に收容されている第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、培養容器70に收容されている細胞懸濁液の粘度よりも高いことが想定される。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物及び細胞懸濁液は、後に混合されることになるが、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と細胞懸濁液との粘度差が大きいと良好な混合状態が得られない場合がある。従って、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度を、細胞懸濁液の粘度と同等にした後、両者を混合することが好ましい。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、チキソ性を有しており、せん断応力を加えることで粘度を低下させることが可能である。そこで、制御部80は、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、細胞懸濁液と上記混合物とを合流させて攪拌部30に移送する制御を行う。具体的には、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を循環させることにより上記

の混合物にせん断応力を加える。

[0096] すなわち、ステップE 2において、制御部80は、開閉バルブV 5及びV 6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、貯留容器20に收容されている第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が流路F 2を経由して攪拌部30に移送される。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部30において攪拌されることで、せん断応力が加えられ、粘度が低下する。

[0097] 続いて、ステップE 3において、制御部80は、開閉バルブV 13及びV 14を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、攪拌部30を通過した第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、流路F 20を経由して貯留容器20に戻される。貯留容器20に收容された第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。制御部80は、粘度測定部42から通知される混合物の粘度の値が所定値以下になるまで、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を連続して行う。なお、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を、予め定められたサイクル数に達するまで連続して行ってもよい。

[0098] 第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液が完了すると、ステップE 4において、制御部80は、開閉バルブV 12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより細胞懸濁液が、培養容器70から流路F 5を経由して細胞供給部11に移送される。

[0099] ステップE 5において、制御部80は、開閉バルブV 1を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞供給部11に收容されている細胞懸濁液が、流路F 1を経由して貯留容器20に移送され、粘度調整がなされた第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と合流する。

[0100] ステップE 6において、制御部80は、開閉バルブV 5及びV 6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20から流路F 2を経



由して攪拌部 30 に移送される。細胞懸濁液、第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部 30 において攪拌、混合される。第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えて粘度調整を実施しておくことで、細胞懸濁液、第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物において良好な混合状態を得ることができる。

[0101] ステップ E 7 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 7 及び V 9 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、攪拌部 30 から流路 F 3 を経由して分離部 50 の第 2 のフィルタ部 52 に供給される。細胞懸濁液、第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、第 2 のフィルタ部 52 において膜分離処理が施され、中間体（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に分化しない未分化細胞及び死細胞と、中間体とが分離される。第 2 のフィルタ部 52 のフィルタ膜を透過した未分化細胞及び死細胞を含む濾液は回収容器 62 に回収される。

[0102] ステップ E 8 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 11 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、未分化細胞及び死細胞が除去され、中間体が残された細胞懸濁液、第 2 の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、第 2 のフィルタ部 52 から流路 F 4 を経由して培養容器 70 に供給される。

[0103] <培地交換 [3]>

図 8 は、図 2 に示すステップ S 7 において実施される処理、すなわち、培地交換 [3] を行う場合における細胞培養装置 100 の動作を示す図である。図 8 において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0104] ステップ G 1 において、制御部 80 は、開閉バルブ V 12 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより使用済み培地を含む細胞懸濁液が、培養容器 70 から流路 F 5 を経由して細胞供給部 11 に移送される。

[0105] ステップG 2において、制御部80は、開閉バルブV 1及びV 4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、使用済み培地を含む細胞懸濁液が、細胞供給部11から流路F 1を経由して貯留容器20に移送されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。

[0106] ステップG 3において、制御部80は、開閉バルブV 5及びV 6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、貯留容器20から流路F 2を経由して攪拌部30に移送される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、攪拌部30において攪拌、混合される。

[0107] ステップG 4において、制御部80は、開閉バルブV 7及びV 9を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、攪拌部30から流路F 3を経由して分離部50の第2のフィルタ部52に供給される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、第2のフィルタ部52において膜分離処理が施され、使用済み培地及び新鮮な培地を含む混合物の一部が、死細胞及び未分化細胞とともに除去される。第2のフィルタ部52のフィルタ膜を透過した死細胞及び未分化細胞を含む濾液は回収容器62に回収される。

[0108] ステップG 5において、制御部80は、開閉バルブV 11を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、膜分離処理済みの細胞懸濁液が、第2のフィルタ部52から流路F 4を経由して培養容器70に供給され、培地交換処理が完了する。

[0109] <第2の添加剤の再添加>

図9は、図2に示すステップS 8において実施される処理、すなわち、第2の添加剤を再添加する場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図9において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0110] ステップH 1において、制御部80は、開閉バルブV 3及びV 4を開状態

に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、Wntシグナル阻害剤を含む第2の添加剤が、第2の添加剤供給部13から貯留容器20に供給されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。これにより、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20に収容される。貯留容器20に収容された第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。

[0111] ここで、貯留容器20に収容されている第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、培養容器70に収容されている細胞懸濁液の粘度よりも高いことが想定される。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物及び細胞懸濁液は、後に混合されることになるが、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と細胞懸濁液との粘度差が大きいと良好な混合状態が得られない場合がある。従って、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度を、細胞懸濁液の粘度と同等にした後、両者を混合することが好ましい。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、チキソ性を有しており、せん断応力を加えることで粘度を低下させることが可能である。そこで、制御部80は、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、細胞懸濁液と上記混合物とを合流させて攪拌部30に移送する制御を行う。具体的には、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を循環させることにより上記の混合物にせん断応力を加える。

[0112] すなわち、ステップH2において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、貯留容器20に収容されている第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が流路F2を経由して攪拌部30に移送される。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部30において攪拌されることで、せん断応力が加えられ、粘度が低下する。

[0113] 続いて、ステップH3において、制御部80は、開閉バルブV13及びV

14を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、攪拌部30を通過した第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、流路F20を經由して貯留容器20に戻される。貯留容器20に収容された第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。制御部80は、粘度測定部42から通知される混合物の粘度の値が所定値以下になるまで、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を連続して行う。なお、制御部80は、貯留容器20と攪拌部30との間で上記の混合物を循環させる送液を、予め定められたサイクル数に達するまで連続して行ってもよい。

[0114] 第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液が完了すると、ステップH4において、制御部80は、開閉バルブV12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより細胞懸濁液が、培養容器70から流路F5を經由して細胞供給部11に移送される。

[0115] ステップH5において、制御部80は、開閉バルブV1を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞供給部11に収容されている細胞懸濁液が、流路F1を經由して貯留容器20に移送され、粘度調整がなされた第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と合流する。

[0116] ステップH6において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20から流路F2を經由して攪拌部30に移送される。細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部30において攪拌、混合される。第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えて粘度調整を実施しておくことで、細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物において良好な混合状態を得ることができる。

[0117] ステップH7において、制御部80は、開閉バルブV7及びV10を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、攪拌部30から流路F3を經由して

由して分離部50の第3のフィルタ部53に供給される。細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、第3のフィルタ部53において膜分離処理が施され、分化細胞に移行しない中間体（外胚葉、中胚葉、内胚葉）、中間体に分化しない未分化細胞及び死細胞と、分化細胞とが分離される。第3のフィルタ部53のフィルタ膜を透過した中間体、未分化細胞及び死細胞を含む濾液は回収容器63に回収される。

[0118] ステップH8において、制御部80は、開閉バルブV11を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、中間体、未分化細胞及び死細胞が除去され、分化細胞が残された細胞懸濁液、第2の添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、第3のフィルタ部53から流路F4を経由して培養容器70に供給される。

[0119] <培地交換 [4]>

図10は、図2に示すステップS9において実施される処理、すなわち、培地交換 [4] を行う場合における細胞培養装置100の動作を示す図である。図10において、処理対象物（細胞懸濁液、培地、添加剤及びこれらの混合物）の各処理部への供給順序が示されている。

[0120] ステップI1において、制御部80は、開閉バルブV12を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより使用済み培地を含む細胞懸濁液が、培養容器70から流路F5を経由して細胞供給部11に移送される。

[0121] ステップI2において、制御部80は、開閉バルブV1及びV4を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、使用済み培地を含む細胞懸濁液が、細胞供給部11から流路F1を経由して貯留容器20に移送されるとともに、新鮮な培地が、培地供給部14から貯留容器20に供給される。

[0122] ステップI3において、制御部80は、開閉バルブV5及びV6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、貯留容器20から流路F2を経由して攪拌部30に

移送される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、攪拌部 30 において攪拌、混合される。

[0123] ステップ 14 において、制御部 80 は、開閉バルブ V7 及び V10 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、新鮮な培地が追加された細胞懸濁液が、攪拌部 30 から流路 F3 を経由して分離部 50 の第 3 のフィルタ部 53 に供給される。新鮮な培地が追加された細胞懸濁液は、第 3 のフィルタ部 53 において膜分離処理が施され、使用済み培地及び新鮮な培地を含む混合物の一部が、中間体（外胚葉、中胚葉、内胚葉）、未分化細胞及び死細胞とともに除去される。第 3 のフィルタ部 53 のフィルタ膜を透過した中間体、未分化細胞、死細胞は回収容器 62 に回収される。

[0124] ステップ 15 において、制御部 80 は、開閉バルブ V11 を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、膜分離処理済みの細胞懸濁液が、第 3 のフィルタ部 53 から流路 F4 を経由して培養容器 70 に供給され、培地交換処理が完了する。

[0125] 以上のように、細胞培養装置 100 は、循環ルートを形成する環状流路 F0 の途中に設けられた処理部（攪拌部 30 及び分離部 50）、培養容器 70、細胞供給部 11 を有する。また、循環ルートを形成する環状流路 F0 には、分化誘導に必要な添加剤を供給する第 1 の添加剤供給部 12 及び第 2 の添加剤供給部 13 並びに新鮮な培地を供給する培地供給部 14 が接続されている。また、細胞培養装置 100 は、細胞培養装置 100 に設けられた各流路を介した送液を制御する制御部 80 を有する。上記の構成を有する細胞培養装置 100 によれば、多能性幹細胞の分化誘導に必要とされる一連の処理を、閉鎖系において連続的に実施することが可能となる。

[0126] また、本実施形態に係る細胞培養装置 100 によれば、分離部 50 が、第 1 のフィルタ部 51、第 2 のフィルタ部 52 及び第 3 のフィルタ部 53 を含んで構成され、これらのフィルタ部は、それぞれ、開口のサイズが互いに異なるフィルタ膜を備える。第 1 のフィルタ部 51、第 2 のフィルタ部 52 及び第 3 のフィルタ部 53 は、培養期間中における所定のタイミングで選択的

に使用される。これにより、培養期間中に生じる、死細胞、未分化細胞、中間体及び分化細胞を、適切に分離することが可能となる。

[0127] また、本実施形態に係る細胞培養装置 100 によれば、添加剤を添加または再添加する場合、制御部 80 は、添加剤と新鮮な培地との混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、細胞懸濁液と上記の混合物とを合流させて攪拌部 30 に移送する制御を行う。すなわち、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度を、細胞懸濁液の粘度に近づけた後に、上記の混合物と細胞懸濁液との混合を行う。これにより、細胞懸濁液、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を混合する場合に、良好な混合状態を得ることができる。

[0128] なお、本実施形態では、分離部 50 が、第 1 のフィルタ部 51、第 2 のフィルタ部 52 及び第 3 のフィルタ部 53 の 3 種類のフィルタ部を有する場合を例示したが、この態様に限定されるものではない。分離部 50 は、第 1 のフィルタ部 51、第 2 のフィルタ部 52 及び第 3 のフィルタ部 53 のうちの少なくとも 1 つを含んでいればよい。

[0129] また、本実施形態では、分離部 50 による分離手段として、膜分離処理を行うフィルタ部を例示したが、この態様に限定されるものではない。分離部 50 による分離手段として、膜分離手段に代えて、または膜分離手段と併用して、遠心分離手段、加振分離手段、電解分離手段及び磁気分離手段を用いることも可能である。

[0130] また、本実施形態では、細胞培養装置 100 が貯留容器 20 を備える場合を例示したが、貯留容器 20 を省略することも可能である。貯留容器 20 を省略する場合、流路を形成する配管に貯留容器としての機能を担わせるようにしてもよい。

[0131] [第 2 の実施形態]

図 11 は、開示の技術の第 2 の実施形態に係る細胞培養装置 100A の構成を示すブロック図である。上記の第 1 の実施形態に係る細胞培養装置 100 においては、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるために、上記の混合物を貯留容器 20 と攪拌部 30 との間で循環させる場合を

例示した。第2の実施形態に係る細胞培養装置100Aにおいては、添加剤と新鮮な培地との混合物にせん断応力を加えるための送液経路が、第1の実施形態に係る細胞培養装置100と異なる。

[0132] 第2の実施形態に係る細胞培養装置100Aは、添加剤と新鮮な培地との混合物にせん断応力を加えるための送液経路として、貯留容器20の流出口と流入口とを接続する流路F21を有する。制御部80は、流路F21を構成する配管中に添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を流すことにより上記の混合物にせん断応力を加えた後に、細胞懸濁液と上記の混合物とを貯留容器20内において合流させて攪拌部30に移送する。

[0133] 具体的には、制御部80は、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が貯留容器20に收容されている状態において、開閉バルブV5、V13及びV14を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、貯留容器20に收容されている添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が貯留容器20から流出し、流路F21を経由して貯留容器20に戻る。添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、流路F21に流れる間、流路F21を構成する配管内の壁面との摩擦によって、上記の混合物にせん断応力が加えられ、上記の混合物の粘度が低下する。

[0134] 貯留容器20に收容された添加剤及び新鮮な培地を含む混合物の粘度は、粘度測定部42によって測定され、測定結果が制御部80に通知される。制御部80は、粘度測定部42から通知される混合物の粘度と、粘度測定部41から通知される細胞懸濁液の粘度との差分値が所定値以下になるまで、上記の混合物を流路F21を介して循環させる送液を連続して行う。なお、制御部80は、粘度測定部42から通知される混合物の粘度の値が所定値以下になるまで、上記の混合物を流路F21を介して循環させる送液を連続して行ってもよい。また、上記の混合物を流路F21を介して循環させる送液を、予め定められたサイクル数に達するまで連続して行ってもよい。

[0135] 添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための送液が完了すると、制御部80は、開閉バルブV5、V13及びV14を閉状態に制



御し、開閉バルブV 1を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞供給部11に收容されている細胞懸濁液が、流路F 1を経由して貯留容器20に移送され、粘度調整がなされた添加剤及び新鮮な培地を含む混合物と合流する。

[0136] その後、制御部80は、開閉バルブV 5及びV 6を開状態に制御するとともに所定のポンプを駆動する。これにより、細胞懸濁液、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物が、貯留容器20から流路F 2を経由して攪拌部30に移送される。細胞懸濁液、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物は、攪拌部30において攪拌、混合される。添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えて粘度調整を実施しておくことで、細胞懸濁液、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物において良好な混合状態を得ることができる。

[0137] なお、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物にせん断応力を加えるための手法として、貯留容器20をプラスチックフィルム等の柔軟な材料で構成し、添加剤及び新鮮な培地を含む混合物を收容した貯留容器20に外部から力を加える方法を用いることも可能である。

[0138] [第3の実施形態]

開示の技術の実施形態に係る細胞培養装置において、インキュベータ71の内部の温度T 1は、例えば37℃一定に保たれており、インキュベータ71の外部の温度T 2は、室温（例えば25℃）である。従って、インキュベータ71の内部に收容された培養容器70に細胞懸濁液を流入させる場合、及びインキュベータ71の外部に細胞懸濁液を流出させる場合に、細胞は、12℃の温度差による熱衝撃を受ける。この熱衝撃により、細胞はダメージを受けるおそれがある。

[0139] 図12は、開示の技術の第3の実施形態に係る細胞培養装置の部分的な構成を示す図である。第3の実施形態に係る細胞培養装置は、培養容器70を收容するインキュベータ71の内部と外部との温度勾配を緩和する温度勾配緩和機構91及び92を備えている。

[0140] 温度勾配緩和機構91は、複数の加熱ユニット91a、91b、91c及

び91dを含んで構成されている。加熱ユニット91a、91b、91c及び91dは、インキュベータ71内に收容された培養容器70に流入する細胞懸濁液が通過する流路F4に設けられている。加熱ユニット91a、91b、91c及び91dは、それぞれ、独立に加熱温度の設定を行うことが可能であり、互いに異なる温度で流路F4を流れる細胞懸濁液を加熱する。加熱ユニット91a、91b、91c及び91dの設定温度をそれぞれ、T1a、T1b、T1c及びT1dとすると、 $T2(25^{\circ}\text{C}) < T1d < T1c < T1b < T1a < T1(37^{\circ}\text{C})$ となるように、各加熱ユニットの温度設定がなされる。これにより、流路F4を流れる細胞懸濁液の温度は、緩やかにインキュベータ71の内部の温度T1(37°C)に向けて上昇する。すなわち、温度勾配緩和機構91によってインキュベータ71の内外の温度差による細胞懸濁液の時間あたりの温度変化である温度勾配が緩和される。温度勾配は例えば0.1(°C/s)以下であることが好ましい。なお、本実施形態では、4つの加熱ユニット91a、91b、91c及び91dによって温度勾配緩和機構91を構成する場合を例示したが、所望の温度勾配を実現できるように、加熱ユニットの数は適宜増減することが可能である。

[0141] 一方、温度勾配緩和機構92は、複数の冷却ユニット92a、92b、92c及び92dを含んで構成されている。冷却ユニット92a、92b、92c及び92dは、インキュベータ71内に收容された培養容器70から流出する細胞懸濁液が通過する流路F5に設けられている。冷却ユニット92a、92b、92c及び92dは、互いに独立に冷却温度の設定を行うことが可能であり、互いに異なる温度で流路F5を流れる細胞懸濁液を冷却する。冷却ユニット92a、92b、92c及び92dの設定温度をそれぞれ、T2a、T2b、T2c及びT2dとすると、 $T2(25^{\circ}\text{C}) < T2d < T2c < T2b < T2a < T1(37^{\circ}\text{C})$ となるように、各冷却ユニットの温度設定がなされる。これにより、流路F5を流れる細胞懸濁液の温度は、緩やかにインキュベータ71の外部の温度T2(25°C)に向けて下降する。すなわち、温度勾配緩和機構92によってインキュベータ71の内外の温度

差による細胞懸濁液の時間あたりの温度変化である温度勾配が緩和される。温度勾配は、例えば $0.1$  ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ) 以下であることが好ましい。なお、本実施形態では、4つの冷却ユニット92a、92b、92c及び92dによって温度勾配緩和機構92を構成する場合を例示したが、所望の温度勾配を実現できるように、冷却ユニットの数は適宜増減することが可能である。

[0142] 以上のように、開示の技術の第3の実施形態に係る細胞培養装置によれば、温度勾配緩和機構91及び92によってインキュベータ71の内外の温度差による細胞懸濁液の温度変化の温度勾配が緩和される。これにより、インキュベータ71の内外の温度差によって細胞が受けるダメージを軽減または解消することが可能となる。

[0143] [第4の実施形態]

図13は、開示の技術の第4の実施形態に係る細胞培養装置100Bの構成を示す図である。第4の実施形態に係る細胞培養装置100Bは、細胞状態測定部90を更に有する。細胞状態測定部90は、培養容器70内に収容されている細胞を撮像するカメラを備え、撮像によって得られる画像を制御部80に供給する。

[0144] 制御部80は、細胞状態測定部90から供給される画像から培養容器70内に収容されている細胞の状態を検出する。制御部80は、画像から検出した細胞の状態に基づいて、図2に示す各処理ステップへの移行可否を判定する。

[0145] このように、培養容器70内に収容されている細胞の画像に基づいて各処理ステップへの移行可否を判定することで、分化誘導に必要とされる各処理を適切なタイミングで実施することができ、分化細胞の生産性を高めることができる。

[0146] なお、2017年1月20日に出願された日本国特許出願2017-008911の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。また、本明細書に記載された全ての文献、特許出願および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個

々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 細胞を供給する細胞供給部と、  
培地を供給する培地供給部と、  
未分化細胞を分化誘導するための添加剤を供給する添加剤供給部と、  
、  
処理対象物を攪拌する攪拌部と、  
処理対象物に含まれる成分を分離する分離部と、  
前記細胞を培養する培養容器と、を有するとともに、  
前記細胞供給部、前記攪拌部、前記分離部及び前記培養容器を經由する循環ルートを形成する第1の流路と、  
前記培地供給部と前記第1の流路とを接続する第2の流路と、  
前記添加剤供給部と前記第1の流路とを接続する第3の流路と、  
前記第1の流路、前記第2の流路及び前記第3の流路を介した送液を制御する制御部と、  
を含む細胞培養装置。
- [請求項2] 前記分離部は、  
前記未分化細胞と死細胞とを膜分離する第1のフィルタ膜、前記未分化細胞が分化細胞に分化される前の中間体と前記未分化細胞とを膜分離する第2のフィルタ膜、及び前記中間体と前記分化細胞とを膜分離する第3のフィルタ膜のうちの少なくとも1つを有する  
請求項1に記載の細胞培養装置。
- [請求項3] 前記分離部は、前記第1のフィルタ膜、前記第2のフィルタ膜、及び前記第3のフィルタ膜のうちの少なくとも2つを含む複数のフィルタ膜を有し、  
前記制御部は、前記複数のフィルタ膜のいずれかに前記細胞を含む細胞懸濁液を選択的に通過させる制御を行う  
請求項2に記載の細胞培養装置。
- [請求項4] 前記第1のフィルタ膜、前記第2のフィルタ膜及び前記第3のフィ

ルタ膜の各々の膜面に設けられた開口のサイズが互いに異なる、  
請求項2または請求項3に記載の細胞培養装置。

[請求項5] 前記制御部は、前記添加剤と前記培地との混合物にせん断応力を加えるための送液を行った後に、前記細胞を含む細胞懸濁液と前記混合物とを合流させて前記攪拌部に移送する制御を行う

請求項1から請求項4のいずれか1項に記載の細胞培養装置。

[請求項6] 前記第1の流路の途中の、前記細胞供給部と前記攪拌部との間に設けられた貯留容器を更に含み、

前記制御部は、前記貯留容器と前記攪拌部との間で前記混合物を循環させることにより前記混合物にせん断応力を加えた後に、前記細胞懸濁液と前記混合物とを前記貯留容器内において合流させて前記攪拌部に移送する制御を行う

請求項5に記載の細胞培養装置。

[請求項7] 前記第1の流路の途中の、前記細胞供給部と前記攪拌部との間に設けられた貯留容器を更に含み、

前記制御部は、配管中に前記混合物を流すことにより前記混合物にせん断応力を加えた後に、前記細胞懸濁液と前記混合物とを前記貯留容器内において合流させて前記攪拌部に移送する制御を行う

請求項5に記載の細胞培養装置。

[請求項8] 前記制御部は、前記混合物の粘度が所定の粘度になるまで前記混合物にせん断応力を加えるための送液を連続的に行う

請求項5から請求項7のいずれか1項に記載の細胞培養装置。

[請求項9] 前記添加剤供給部は、

W n t シグナル活性化剤を含む第1の添加剤を供給する第1の添加剤供給部と、

W n t シグナル阻害剤を含む第2の添加剤を供給する第2の添加剤供給部と、

を含む

請求項 1 から請求項 8 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

[請求項10]

前記培養容器を収容し、前記培養容器の周囲温度を一定に保つインキュベータと、

前記インキュベータの内部と外部との温度差によって前記第 1 の流路に沿って生じる温度勾配を緩和する温度勾配緩和機構と、

を更に含む請求項 1 から請求項 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置。

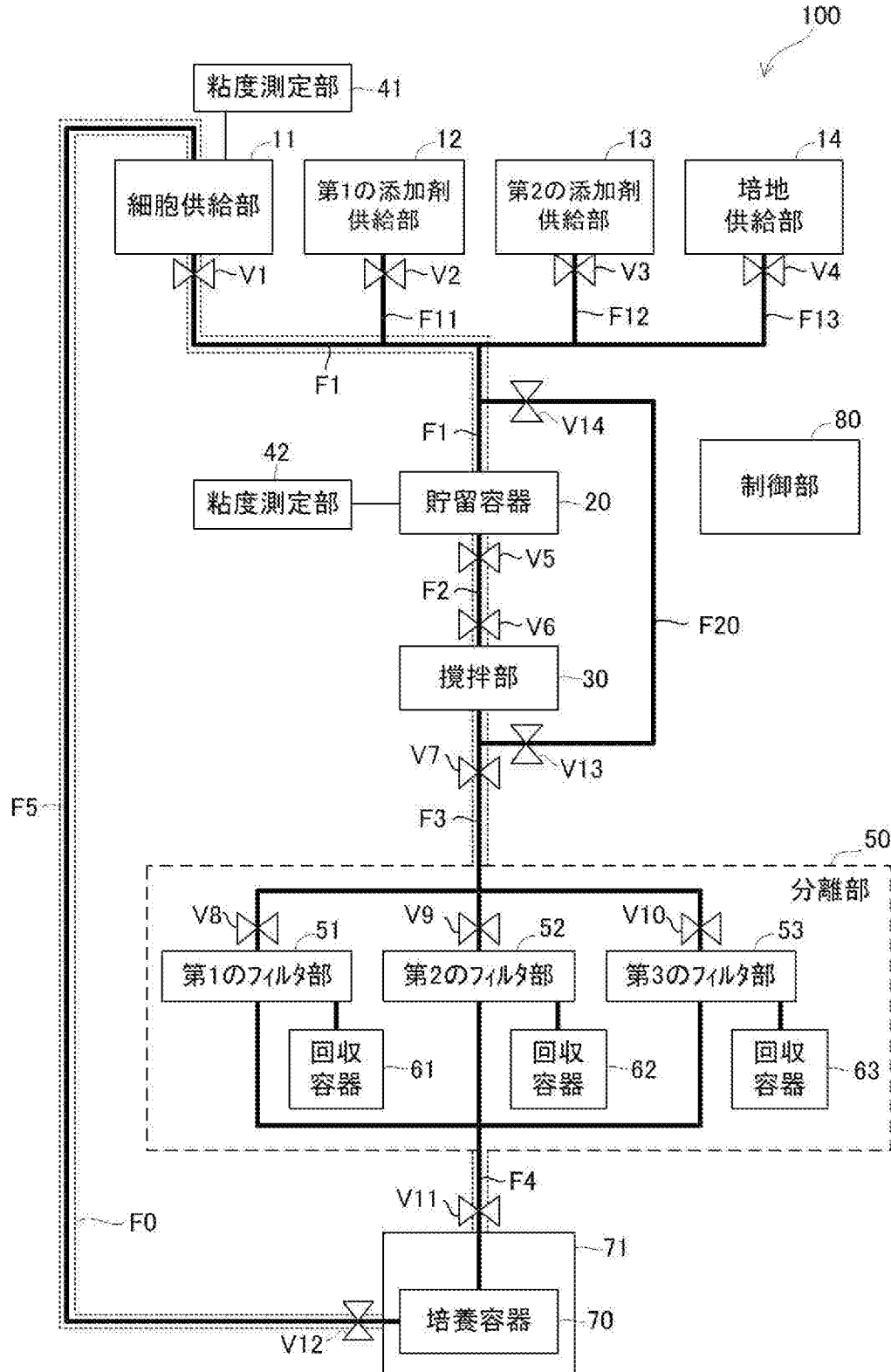
[請求項11]

請求項 1 から請求項 10 のいずれか 1 項に記載の細胞培養装置を用いて前記細胞を培養する細胞培養方法であって、

前記制御部が、前記培地供給部から供給される前記細胞、前記添加剤供給部から供給される前記添加剤及び前記培地供給部から供給される前記培地を含む混合物を、前記攪拌部及び前記分離部を経由して前記培養容器に移送する制御を行う

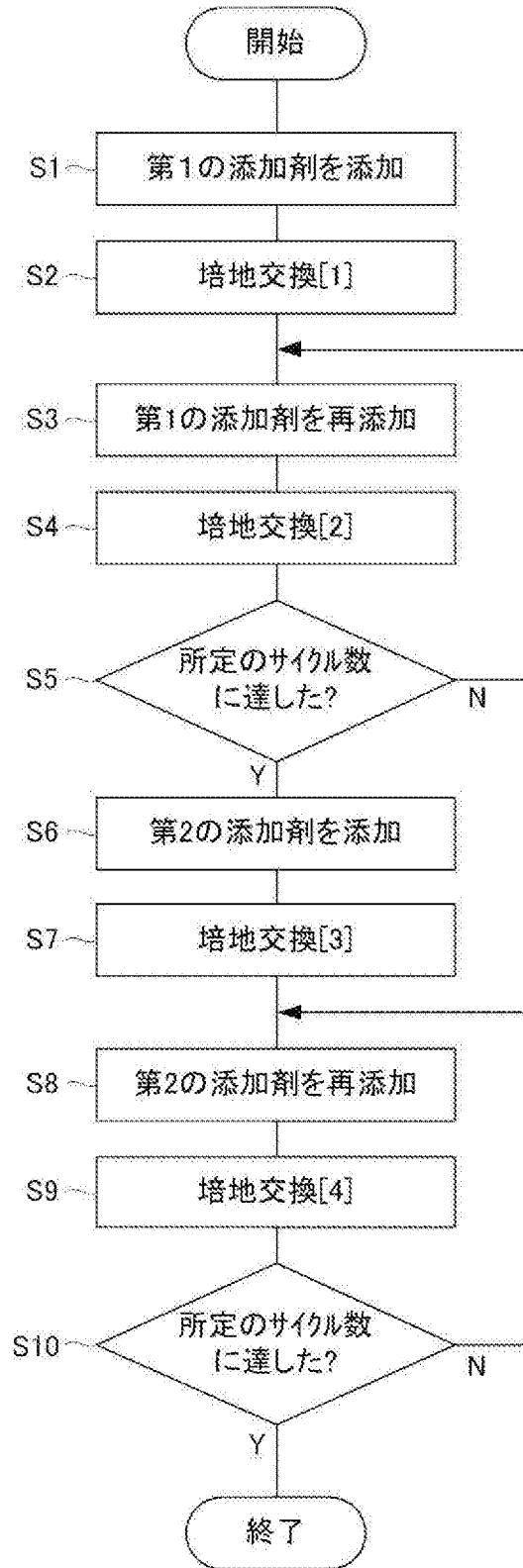
細胞培養方法。

[図1]



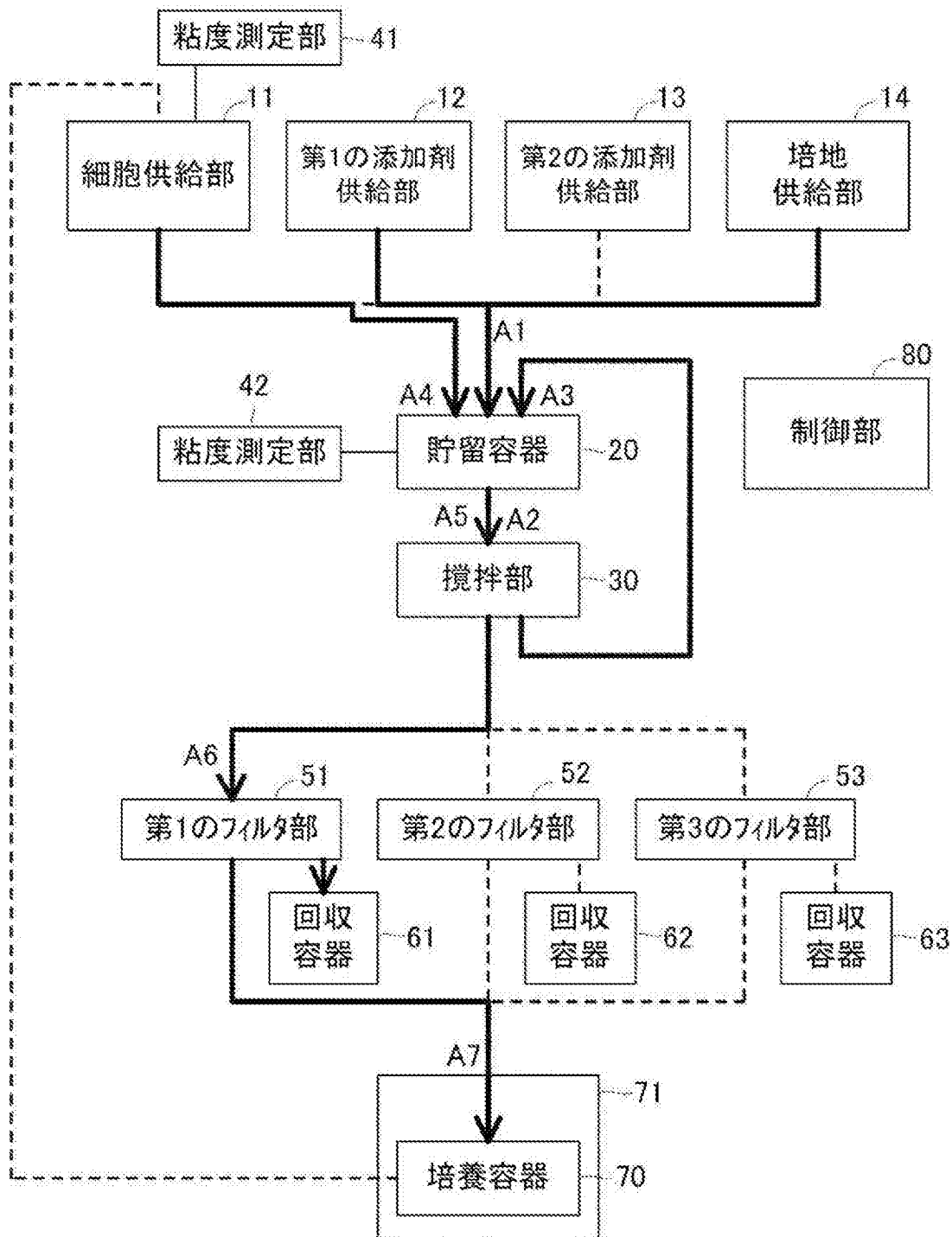


[図2]



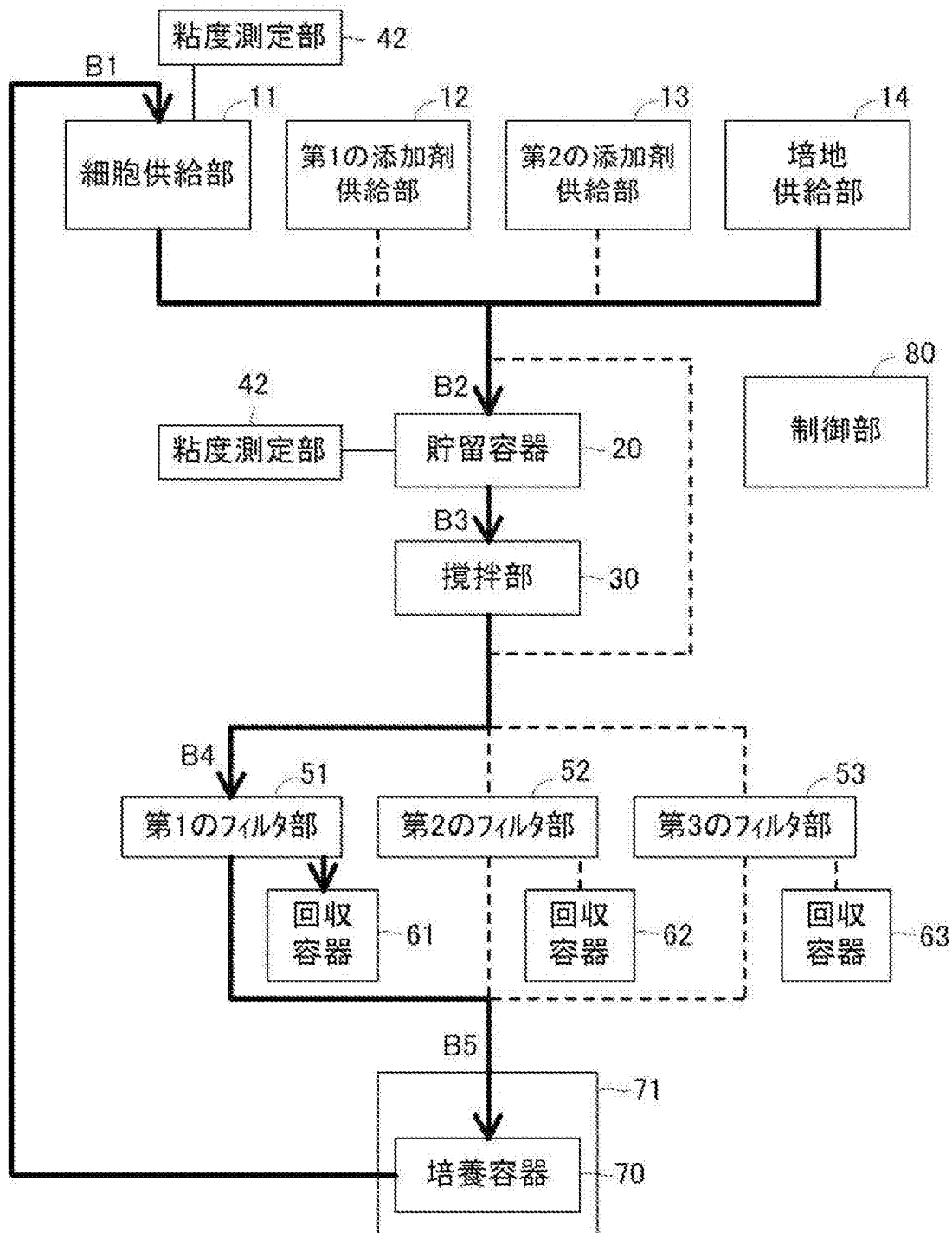
[図3]

## 第1の添加剤の添加



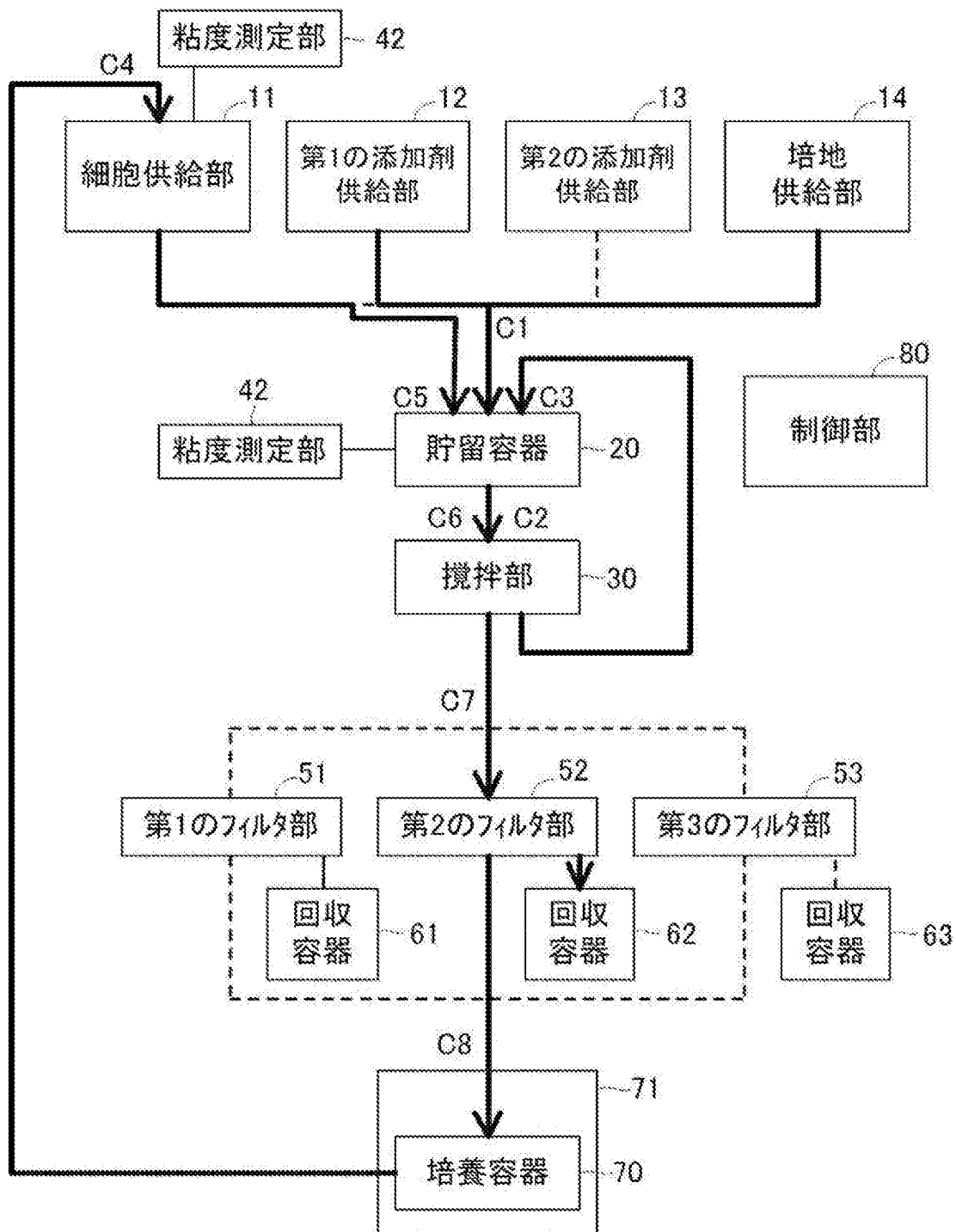
[図4]

## 培地交換[1]



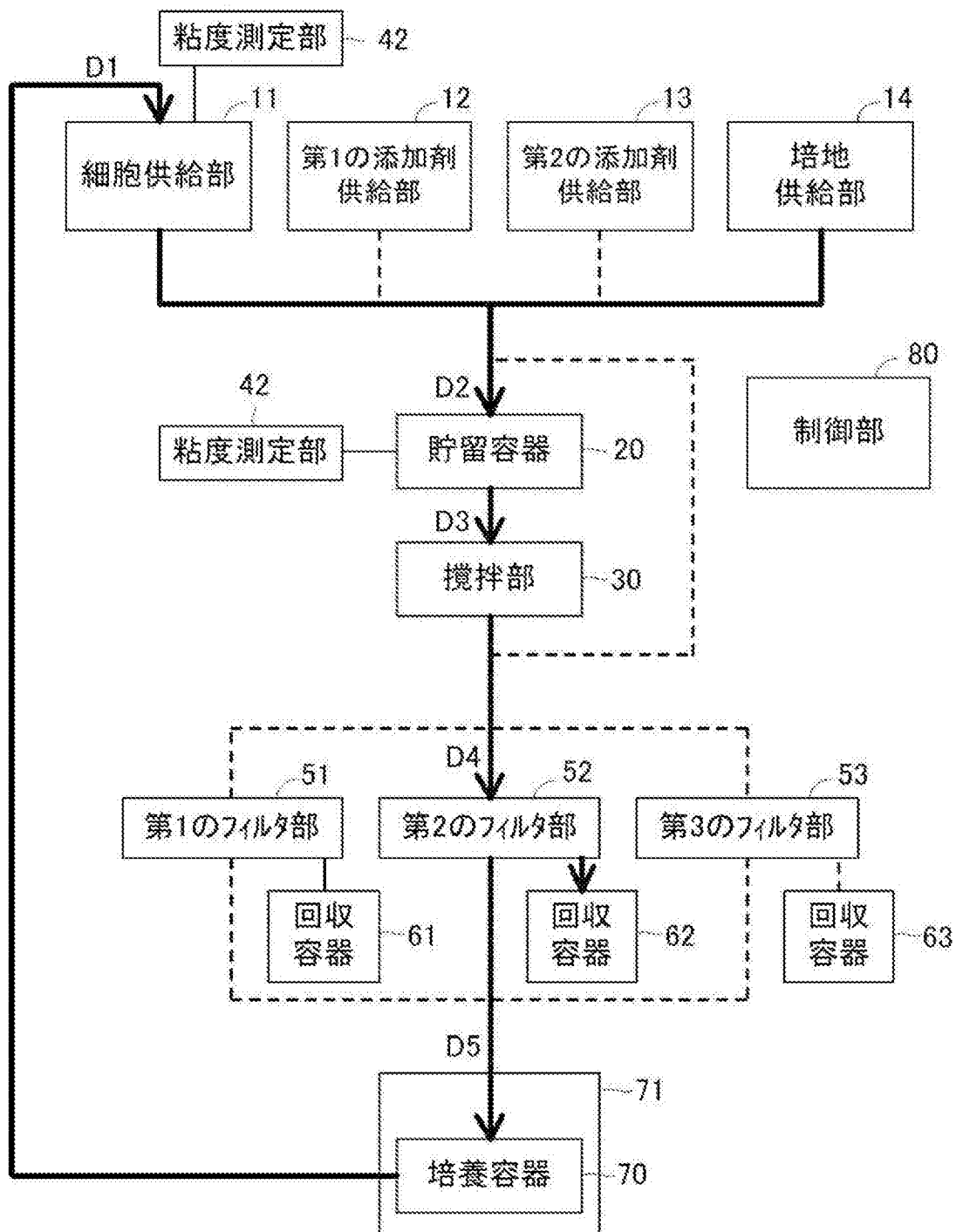
[図5]

## 第1の添加剤の再添加



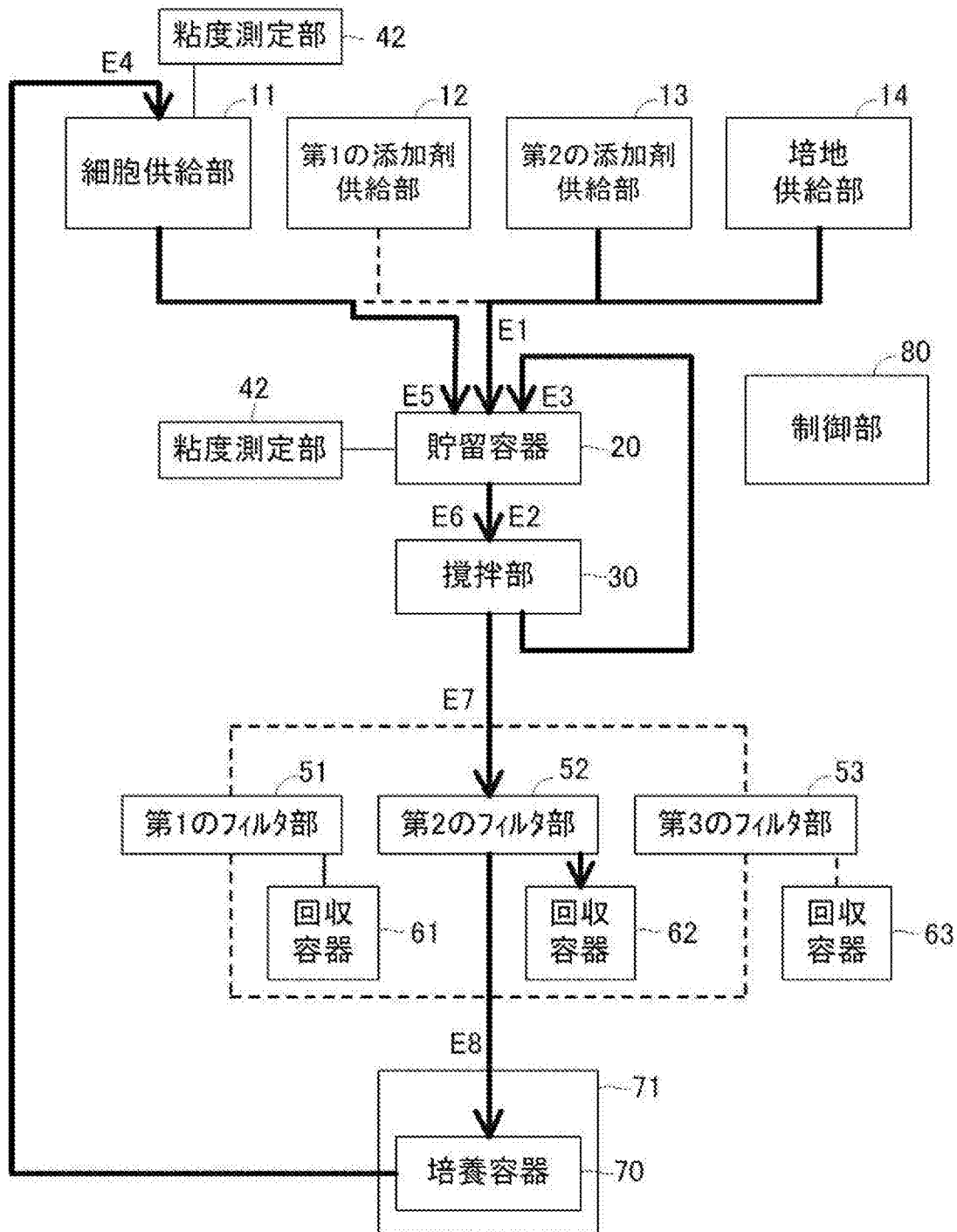
[図6]

## 培地交換[2]



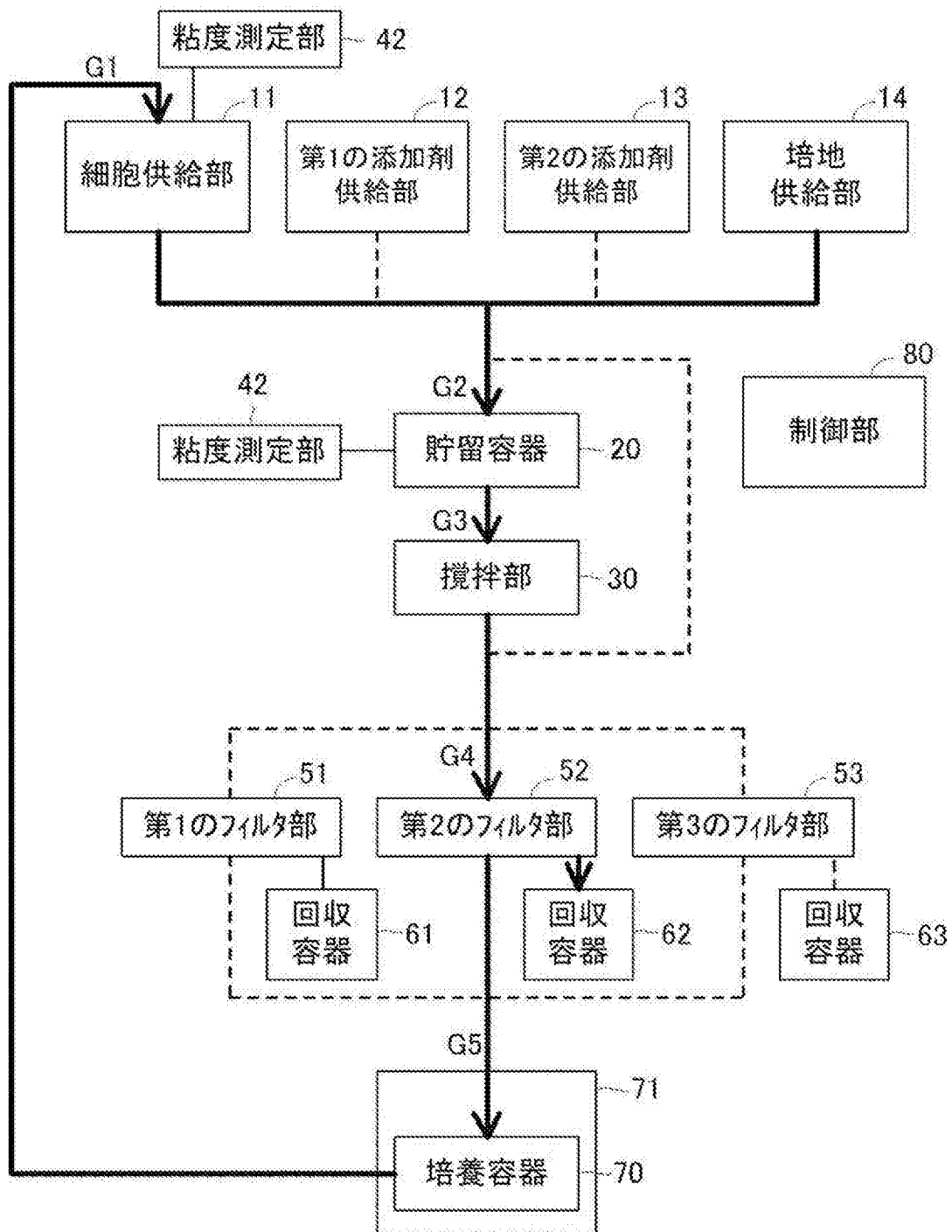
[図7]

## 第2の添加剤の添加



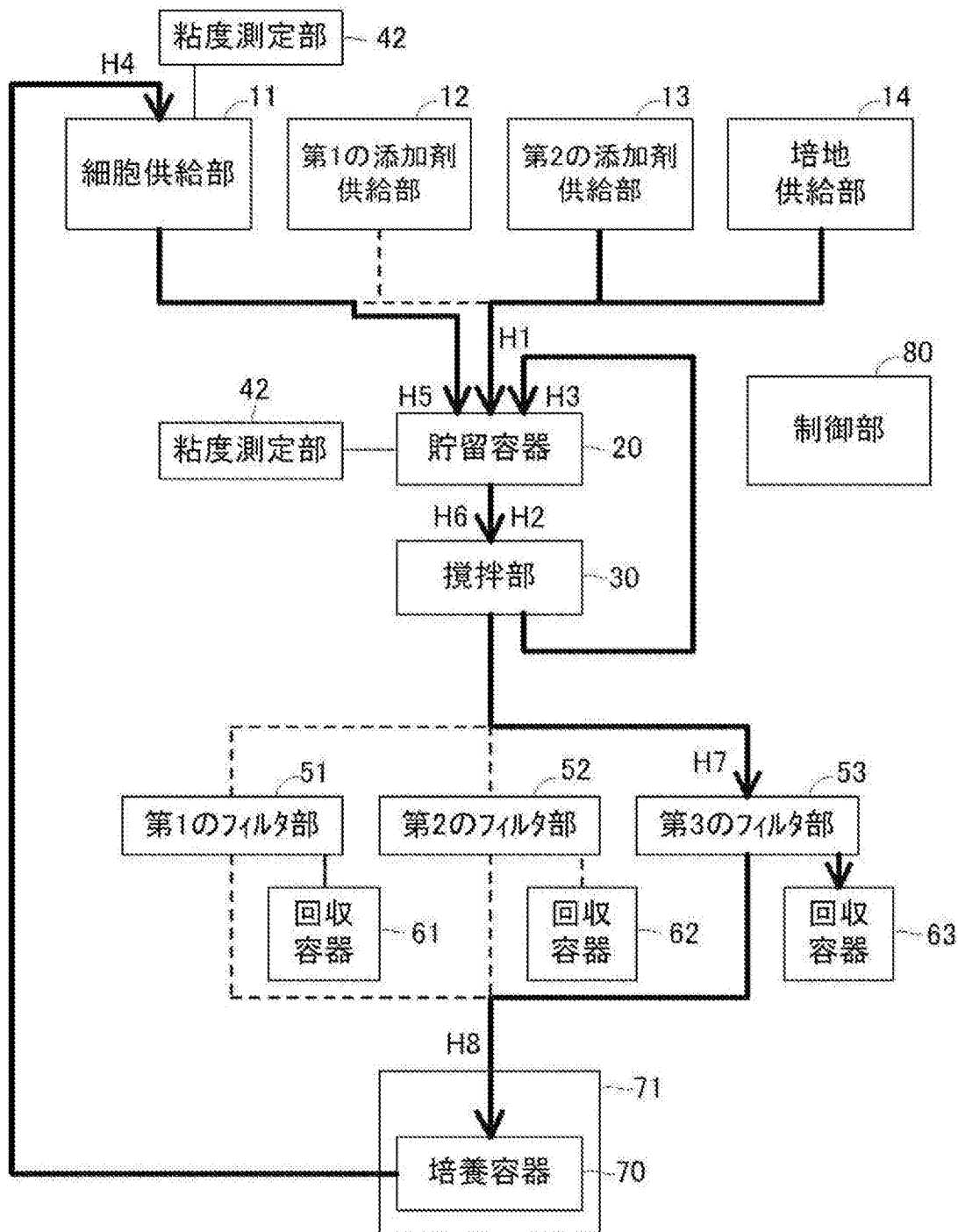
[図8]

## 培地交換[3]



[図9]

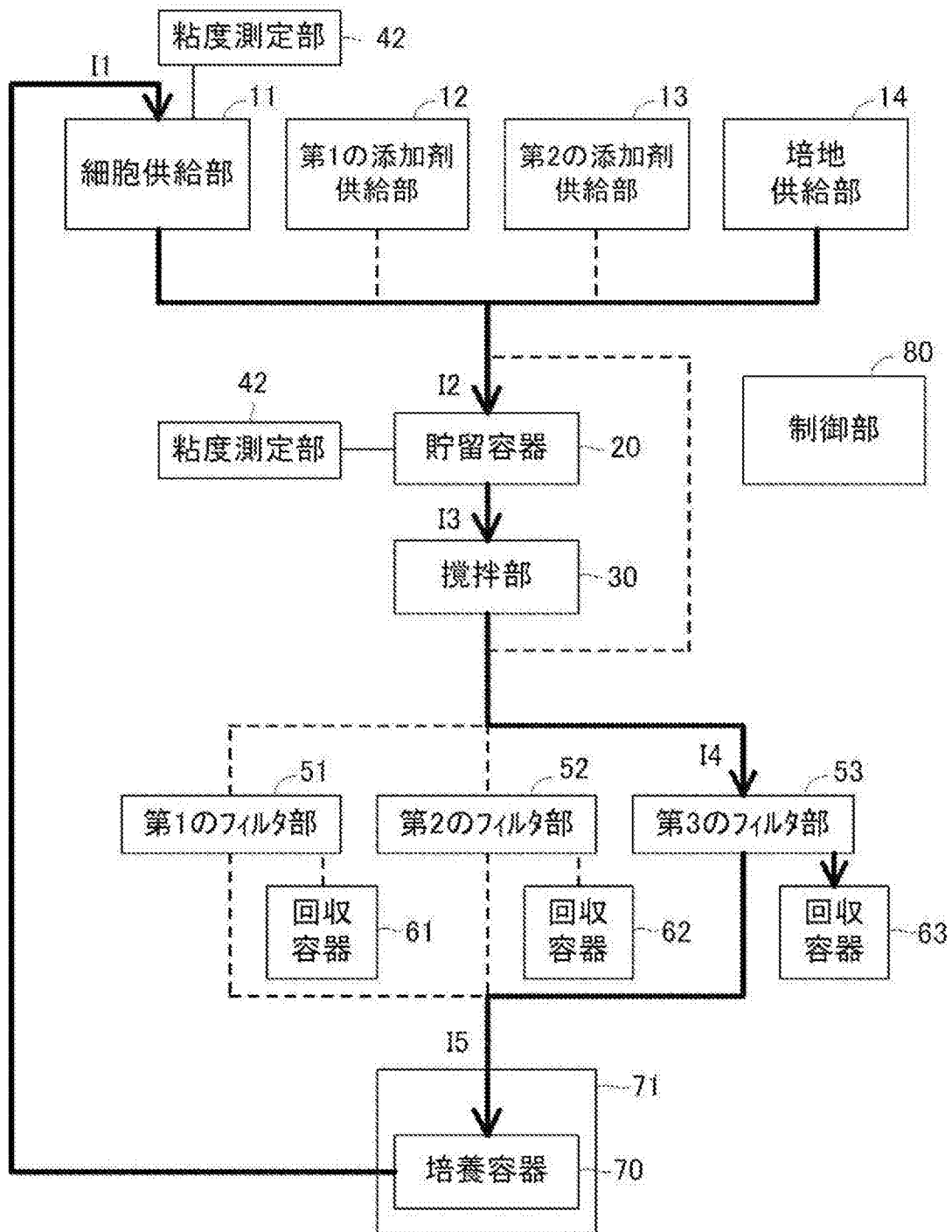
## 第2の添加剤の再添加



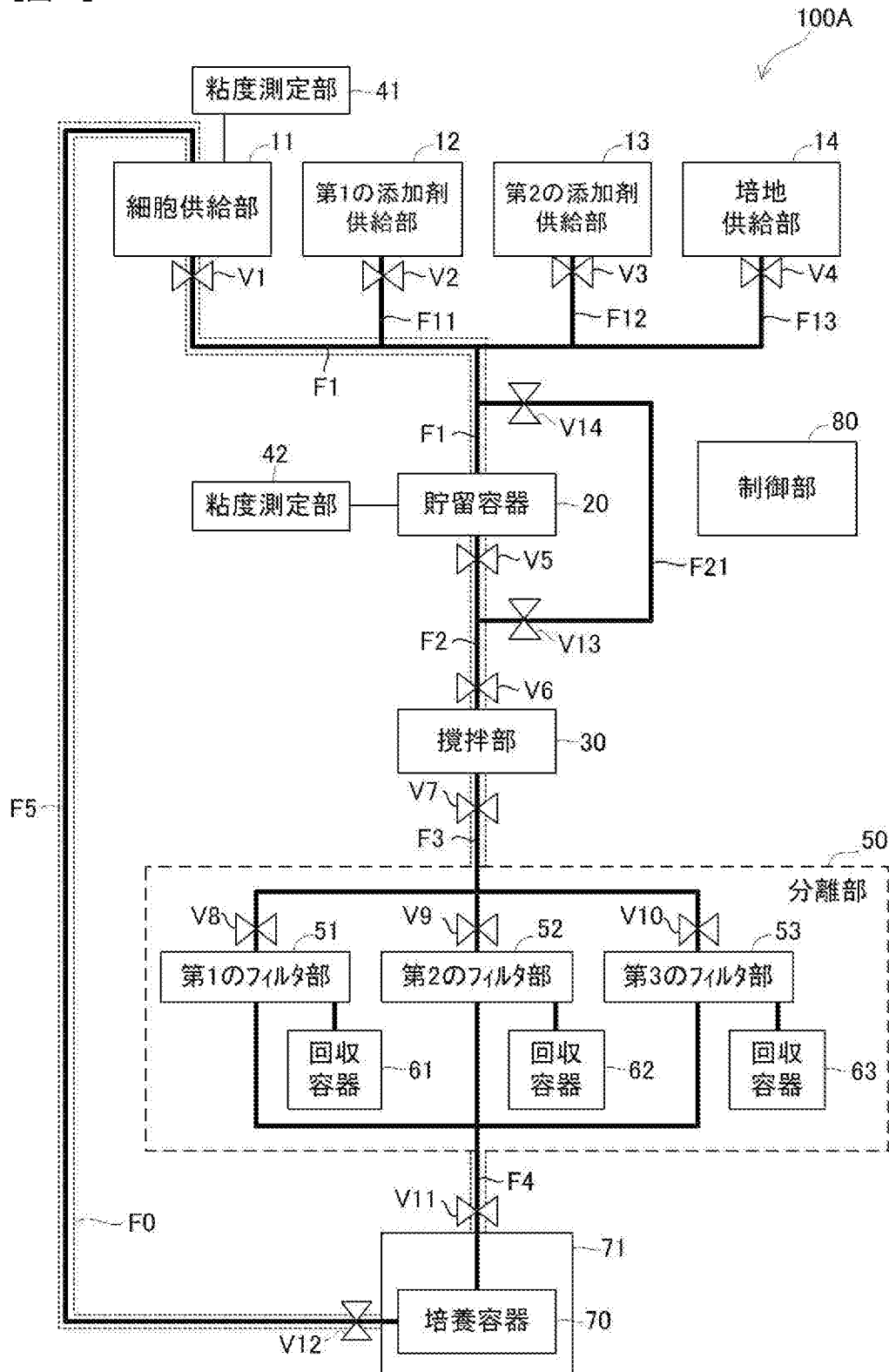


[図10]

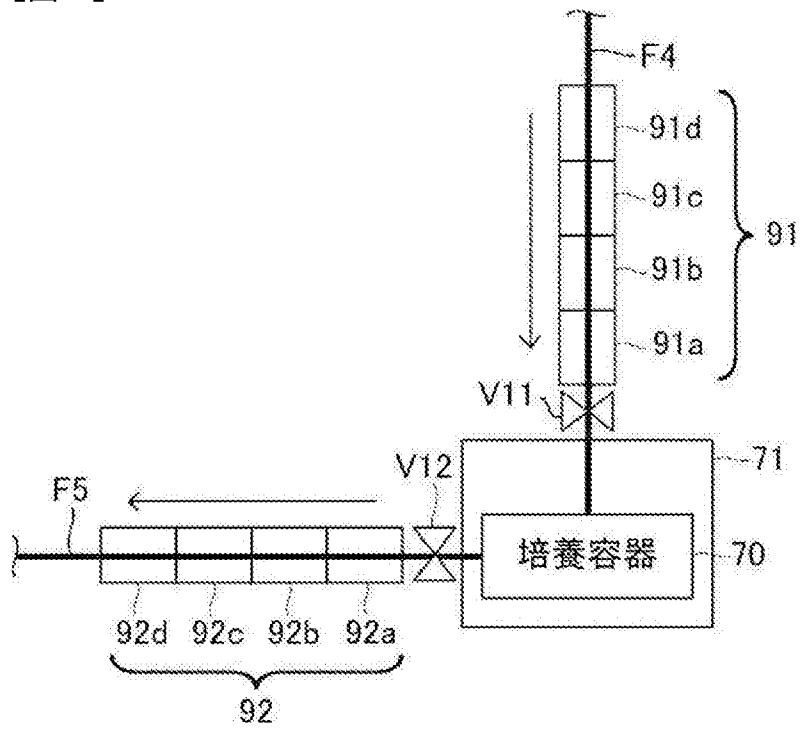
## 培地交換[4]



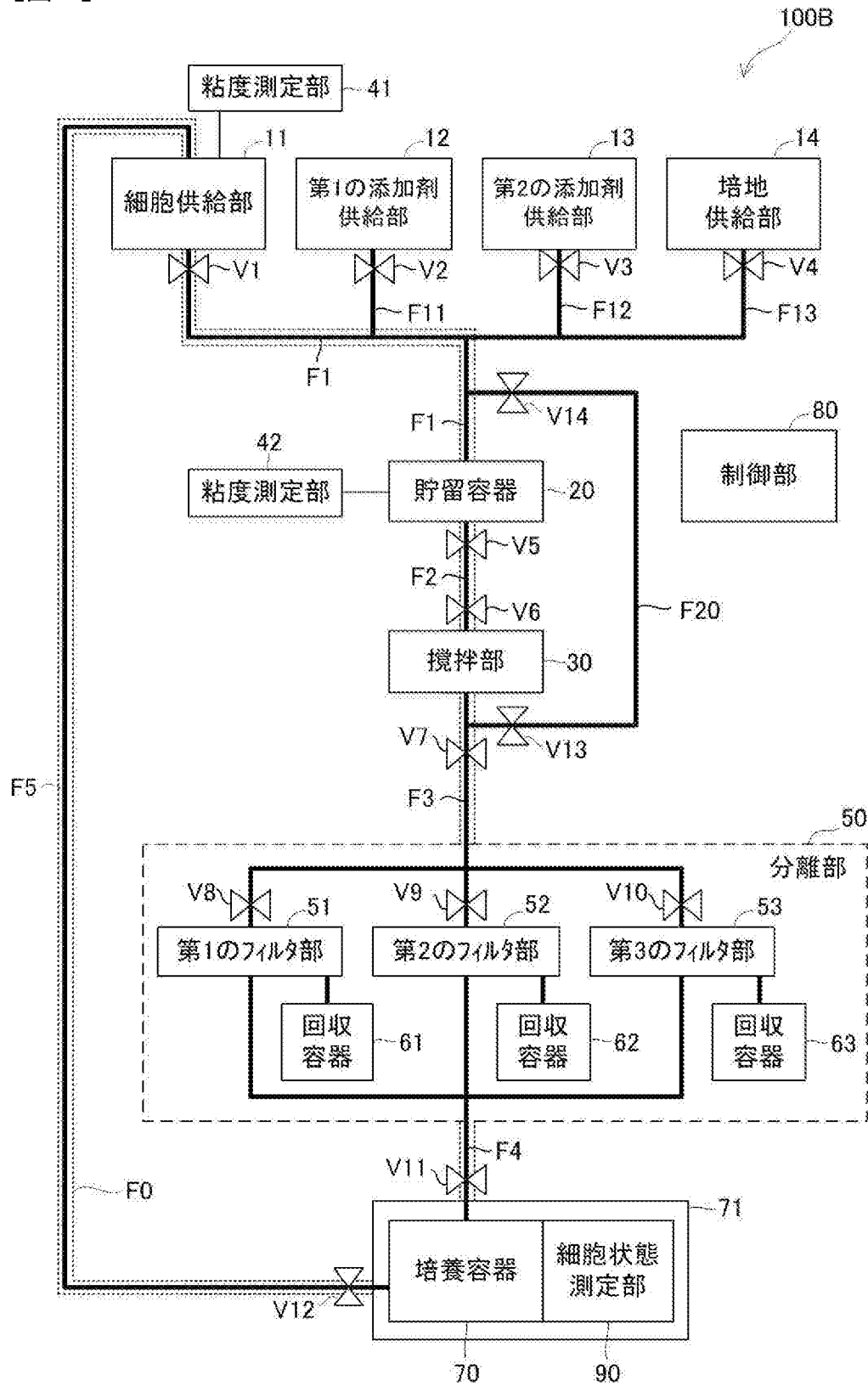
[図11]



[図12]



[図13]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/001631

| <p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br/>                 Int.Cl. C12M1/00(2006.01) i, C12M3/00(2006.01) i, C12N5/071(2010.01) i,<br/>                 C12N5/0735(2010.01) i, C12N5/074(2010.01) i, C12N5/0775(2010.01) i,<br/>                 C12N5/10(2006.01) i<br/>                 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>  |   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
|--|---|--|---|---|--|-----------|---|-----------|--|---|------|
| <p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br/>                 Int.Cl. C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0775,<br/>                 C12N5/10</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1971-2018</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Registered utility model specifications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1996-2018</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published registered utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1994-2018</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br/>                 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),<br/>                 Japio-GPG/FX</p>   |   |  | Published examined utility model applications of Japan  | 1922-1996   | Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2018 | Registered utility model specifications of Japan  | 1996-2018 | Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018   |      |
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| Published unexamined utility model applications of Japan   | 1971-2018   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| Registered utility model specifications of Japan   | 1996-2018   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| Published registered utility model applications of Japan   | 1994-2018   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| <p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">A</td> <td>JP 2007-312668 A (HITACHI MEDICAL CORPORATION) 06 December 2007, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 (Family: none)</td> <td align="center">1-11</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>WO2006/117925A1 (SATOMURA, Kazuhito) 09 November 2006, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 4 (Family: none)</td> <td align="center">1-11</td> </tr> </tbody> </table>  |   |  | Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                                    | A         | JP 2007-312668 A (HITACHI MEDICAL CORPORATION) 06 December 2007, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 (Family: none) | 1-11      | A  | WO2006/117925A1 (SATOMURA, Kazuhito) 09 November 2006, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 4 (Family: none) | 1-11 |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| A  | JP 2007-312668 A (HITACHI MEDICAL CORPORATION) 06 December 2007, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 (Family: none)   | 1-11   |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| A  | WO2006/117925A1 (SATOMURA, Kazuhito) 09 November 2006, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 4 (Family: none)   | 1-11   |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>   |   |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“T” 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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table> |   |  | <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>“T” 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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p> |  |           |   |           |  |   |      |
| <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>  | <p>“T” 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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p> |  |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| <p>Date of the actual completion of the international search<br/>12.04.2018</p>  |   | <p>Date of mailing of the international search report<br/>24.04.2018</p> |   |   |  |           |   |           |  |   |      |
| <p>Name and mailing address of the ISA/<br/>Japan Patent Office<br/>3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,<br/>Tokyo 100-8915, Japan</p>   |   | <p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>                           |   |   |  |           |   |           |  |   |      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/001631

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | WO 2016/117615 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 28 July 2016, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 & US 2017/0306279 A1, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 & JP 2016-131538 A & EP 3249040 A1                      | 1-11                  |
| A         | JP 2013-517771 A (LONZA WALKERSVILLE, INC.) 20 May 2013, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 & US 2012/0294836 A1, entire text, particularly, abstract, claims, fig. 1 & WO 2011/091248 A1 & EP 2525899 A1                   | 1-11                  |
| A         | JP 2015-502747 A (THE NEW YORK STEM CELL FOUNDATION) 29 January 2015, entire text, particularly, abstract, claims & WO 2013/082509 A1, entire text, particularly, abstract, claims & US 2013/0345094 A1 & US 2015/0166964 A1 & EP 2785829 A4 | 1-11                  |
| P A       | WO 2017/038887 A1 (TANABE, Koji) 09 March 2017 & WO 2017/040548 A1 & JP 2017-195905 A  | 1-11                  |

| <p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i</p>  |  |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
|---|--|---|--|------------------|-----------------------------------|----------------|------------|--|------------|----------------------|--|------|
| <p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12M1/00, C12M3/00, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0775, C12N5/10</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 style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td style="width:70%;">1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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    | 1971-2018年 | 日本国実用新案登録公報  | 1996-2018年 | 日本国登録実用新案公報          | 1994-2018年   |      |
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年   |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| 日本国公開実用新案公報   | 1971-2018年   |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| 日本国実用新案登録公報   | 1996-2018年   |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| 日本国登録実用新案公報   | 1994-2018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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、Japio-GPG/FX</p>   |  |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の<br/>カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">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 style="width:20%;">関連する<br/>請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">A</td> <td>JP 2007-312668 A (株式会社日立メディコ) 2007.12.06<br/>全文、特に、要約、請求項、図1<br/>(ファミリーなし)</td> <td style="text-align:center;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">A</td> <td>WO 2006/117925 A1 (里村 一人) 2006.11.09<br/>全文、特に、要約、請求項、図4<br/>(ファミリーなし)</td> <td style="text-align:center;">1-11</td> </tr> </tbody> </table> |  |   |  | 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 | A          | JP 2007-312668 A (株式会社日立メディコ) 2007.12.06<br>全文、特に、要約、請求項、図1<br>(ファミリーなし) | 1-11       | A                    | WO 2006/117925 A1 (里村 一人) 2006.11.09<br>全文、特に、要約、請求項、図4<br>(ファミリーなし) | 1-11 |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号  |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| A   | JP 2007-312668 A (株式会社日立メディコ) 2007.12.06<br>全文、特に、要約、請求項、図1<br>(ファミリーなし) | 1-11  |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| A   | WO 2006/117925 A1 (里村 一人) 2006.11.09<br>全文、特に、要約、請求項、図4<br>(ファミリーなし)     | 1-11  |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>   |  | <p><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> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「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>  |  | <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| <p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">12.04.2018</p>  |  | <p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">24.04.2018</p>  |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| <p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P)<br/>郵便番号100-8915<br/>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>   |  | <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:60%;">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4B</td> <td style="width:30%; text-align:center;">3960</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">伊達 利奈</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td colspan="2" style="text-align:center;">3448</td> </tr> </table> |  | 特許庁審査官 (権限のある職員) | 4B                                | 3960           | 伊達 利奈      |  |            | 電話番号 03-3581-1101 内線 | 3448   |      |
| 特許庁審査官 (権限のある職員)  | 4B   | 3960  |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| 伊達 利奈   |  |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |
| 電話番号 03-3581-1101 内線  | 3448   |   |  |                  |                                   |                |            |  |            |                      |  |      |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| A                     | WO 2016/117615 A1 (富士フイルム株式会社) 2016.07.28<br>全文、特に、要約、請求項、図1<br>& US 2017/0306279 A1 全文、特に、要約、請求項、図1<br>& JP 2016-131538 A & EP 3249040 A1                                   | 1-11           |
| A                     | JP 2013-517771 A (ロンザ ウォーカーズヴィル, インコーポレーテッド)<br>2013.05.20<br>全文、特に、要約、請求項、図1<br>& US 2012/0294836 A1 全文、特に、要約、請求項、図1<br>& WO 2011/091248 A1 & EP 2525899 A1                 | 1-11           |
| A                     | JP 2015-502747 A (ザ ニューヨーク システム セル ファウンデーション)<br>2015.01.29<br>全文、特に、要約、請求項<br>& WO 2013/082509 A1 全文、特に、要約、請求項<br>& US 2013/0345094 A1 & US 2015/0166964 A1 & EP 2785829 A4 | 1-11           |
| PA                    | WO 2017/038887 A1 (田邊 剛士) 2017.03.09<br>& WO 2017/040548 A 1 & JP 2017-195905 A  | 1-11           |