明　細　書

発明の名称 ： 活性化幹細胞製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ドナーから採取した骨髄液を培養することから作られた単一種の幹細胞を所定期間保存した後の休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を活性化させて単一種の活性化幹細胞を作る活性化幹細胞製造方法に関する。

背景技術

[0002] 幹細胞を培養する培地と、幹細胞に対して照射エネルギーが０を超え１０ジュール／ｃｍ^{2}以下、レーザパワー密度が０．１Ｗ／ｃｍ^{2}以下、照射エネルギーを０．１以上２．５ジュール／ｃｍ^{2}以下の低出力の炭酸ガスレーザーの照射光をデフォーカスして培地全体に照射し、幹細胞を活性化させるレーザー照射手段とを備え、幹細胞に低出力のレーザーを照射して活性化させた後、幹細胞に所定の休止期間を設けて目標増殖数まで増殖させる幹細胞培養方法が開示されている。この幹細胞培養方法によれば、ヒト、非ヒト（動物）から採取した組織またはその細胞に存在する幹細胞を活性化させて飛躍的に増殖させることができる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１５－１８６４６５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 前記幹細胞培養方法や他の幹細胞培養方法によって増殖させた幹細胞は、冷蔵庫や冷凍庫に収容されて所定期間、所定温度で保存され、必要に応じて冷蔵庫や冷凍庫から取り出されて使用される。冷蔵庫や冷凍庫で保存された休眠状態の休眠幹細胞は活性が低く、休眠幹細胞を活性化させる必要があるが、活性化の過程において休眠幹細胞の一部のみが生存し、残余の休眠幹細胞は死滅してしまう。死滅した休眠幹細胞によって生存する休眠幹細胞の増

殖が阻まれるから、休眠幹細胞を効率よく増殖させることができず、解凍後の休眠幹細胞から十分に活性化した必要量の活性化幹細胞を製造することができない。

[0005] ドナーから採取した組織またはその細胞には多種雑多な幹細胞が存在するから、組織または細胞に存在する幹細胞を培養したとしても多種雑多な幹細胞が増殖し、特定種類の単一種の幹細胞のみを培養することができず、単一種の休眠幹細胞を増殖かつ活性化させた単一種の活性化幹細胞を製造することができない。活性化幹細胞は、各種の疾患（心血管疾患や中枢神経系疾患等）の治療や再生医療、非治療的用途に利用されるが、培養された多種雑多な活性化幹細胞は、特定種類の単一種の活性化幹細胞のみからなる場合と比較し、各種の疾患に対する治療の効果や再生医療における再生の効果が小さい。

[0006] 本発明の目的は、休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を効率よく増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を製造することができる活性化幹細胞製造方法を提供することにある。本発明の他の目的は、多種雑多な活性化幹細胞を含むことがなく、各種の疾患に対する治療の効果や再生医療における再生の効果が大きい単一種の活性化幹細胞を製造することができる活性化幹細胞製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 前記課題を解決するための本発明の前提は、ドナーから採取した骨髄液を培養することから作られた単一種の幹細胞を所定期間保存した後の休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を活性化させて単一種の活性化幹細胞を作る活性化幹細胞製造方法である。

[0008] 前記前提における本発明の特徴は、活性化幹細胞製造方法が、単一種の休眠幹細胞と所定の培養液と休眠幹細胞の保存前の単一種の幹細胞の培養過程において生成された培養生成液とを所定容量かつ所定面積の底面を有する第１培養容器に注入し、休眠幹細胞を第１培養容器の底面に定着させる休眠幹細胞定着工程と、休眠幹細胞定着工程によって第１培養容器の底面に定着さ

せた休眠幹細胞を培養し、第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達するまで休眠幹細胞を増殖かつ活性化させ、休眠幹細胞を単一種の活性化幹細胞に変質させる休眠幹細胞培養工程とを有することにある。

[0009] 本発明の一例として、休眠幹細胞培養工程では、休眠幹細胞定着工程によって休眠幹細胞を第１培養容器の底面に定着させた後、培養液と培養生成液との混合培養液を第１培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを第１培養容器に注入し、第１培養容器の底面に定着させた休眠幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する。

[0010] 本発明の他の一例として、休眠幹細胞定着工程では、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第１培養容器を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的に放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で第１培養容器内の休眠幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、休眠幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、休眠幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する。

[0011] 本発明の他の一例としては、休眠幹細胞の初期平面形状が略円形であり、休眠幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として休眠幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、休眠幹細胞定着工程では、休眠幹細胞が不定形の扁平形状に変形した場合に休眠幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する。

[0012] 本発明の他の一例としては、第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積の第１目標割合が７０～８０％であり、休眠幹細胞培養工程では、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第１培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第１培養容器の底面に定着した休眠幹細胞の第１培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する。

[0013] 本発明の他の一例として、活性化幹細胞製造方法は、第１培養容器の底面

面積に対する休眠幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達した時点で第１培養容器から活性化幹細胞を抽出し、抽出した活性化幹細胞とあらたな培養液とあらたな培養生成液とを所定容量かつ所定面積の底面を有して第１培養容器よりも大きい容量の第２培養容器に注入し、活性化幹細胞を第２培養容器の底面に定着させる活性化幹細胞定着工程と、活性化幹細胞定着工程によって第２培養容器の底面に定着させた活性化幹細胞を培養し、第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積が第２目標割合に達するまで増殖させる活性化幹細胞培養工程とを含む。

[0014] 本発明の他の一例として、活性化幹細胞培養工程では、活性化幹細胞定着工程によって活性化幹細胞を第２培養容器の底面に定着させた後、培養液と培養生成液との混合培養液を第２培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを第２培養容器に注入し、第２培養容器の底面に定着させた活性化幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する。

[0015] 本発明の他の一例として、活性化幹細胞定着工程では、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第２培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第２培養容器内の活性化幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、活性化幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、活性化幹細胞が第２培養容器の底面に定着したと判断する。

[0016] 本発明の他の一例としては、活性化幹細胞の初期平面形状が略円形であり、活性化幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として活性化幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、活性化幹細胞定着工程では、活性化幹細胞が不定形の扁平形状に変形した場合に活性化幹細胞が第２培養容器の底面に定着したと判断する。

[0017] 本発明の他の一例としては、第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積の第２目標割合が８８～９２％であり、活性化幹細胞培養工程では、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第２培養容器を体温と

略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第２培養容器の底面に定着した活性化幹細胞の第２培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する。

[0018] 本発明の他の一例としては、培養生成液が単一種の幹細胞の培養過程において単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む。

[0019] 本発明の他の一例として、単一種の幹細胞は、ドナーから採取した骨髄液を層状に分離し、層状に分離させた骨髄液のうちの中間層に位置する中間層骨髄液を抽出し、所定容量かつ所定面積の底面を有する第３培養容器に中間層骨髄液と所定の培養液とを注入して中間層骨髄液に含まれる第１幹細胞を第３培養容器の底面に定着させる幹細胞第１定着工程と、幹細胞第１定着工程によって第１幹細胞を第３培養容器の底面に定着させた後、第３培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を第３培養容器に注入して第１幹細胞を培養し、第３培養容器の底面面積に対する第１幹細胞の総平面面積が第３目標割合に達するまで第１幹細胞を増殖させる幹細胞第１培養工程と、幹細胞第１培養工程によって培養した第１幹細胞を層状に遠心分離し、層状に分離させた第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を抽出するとともに、所定容量かつ所定面積の底面を有して第３培養容器よりも大きい容量の第４培養容器に第２幹細胞とあらたな培養液とを注入して第２幹細胞を第４培養容器の底面に定着させる幹細胞第２定着工程と、幹細胞第２定着工程によって第２幹細胞を第４培養容器の底面に定着させた後、第４培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を第４培養容器に注入して第２幹細胞を培養し、第４培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積が第４目標割合に達するまで第２幹細胞を増殖させる幹細胞第２培養工程とから作られている。

[0020] 本発明の他の一例としては、培養生成液が第４培養容器から単一の第２幹細胞を抽出した後に残った培養液である。

[0021] 本発明の他の一例としては、それら幹細胞が間葉系の幹細胞である。

発明の効果

[0022] 本発明にかかる活性化幹細胞製造方法によれば、休眠幹細胞の保存前の単一種の幹細胞の培養過程において生成された培養生成液を注入することによって第１培養容器の底面に対する単一種の休眠幹細胞の定着やその休眠幹細胞の増殖が促進されるから、その培養生成液を利用して休眠幹細胞を第１培養容器の底面に速やかに定着させることができ、その培養生成液を利用して総平面面積が第１目標割合に達するまで休眠幹細胞を速やかに増殖させることができ、休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を効率よく確実に増殖させることができるとともに、休眠幹細胞から十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の活性化幹細胞を作ることができ、多種雑多な幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができる。

[0023] 休眠幹細胞を第１培養容器の底面に定着させた後、培養液と培養生成液との混合培養液を第１培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを第１培養容器に注入し、第１培養容器の底面に定着させた休眠幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する活性化幹細胞製造方法は、休眠幹細胞の保存前の単一種の幹細胞の培養過程において生成されたあらたな培養生成液によって休眠幹細胞の増殖が確実に促進されるから、あらたな培養生成液を利用して総平面面積が第１目標割合に達するまで休眠幹細胞を速やかに増殖させることができ、休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を効率よく確実に増殖させることができるとともに、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の活性化幹細胞を作ることができ、多種雑多な幹細

胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができる。

[0024] 第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第１培養容器を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的に放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で第１培養容器内の休眠幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、休眠幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、休眠幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する活性化幹細胞製造方法は、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で１２～２４時間静的に放置することで、第１培養容器の底面に休眠幹細胞を確実に定着させることができ、休眠幹細胞の増殖を確実に促進することができる。活性化幹細胞製造方法は、１２～２４時間の放置時間において約１～２時間の間隔で第１培養容器内の休眠幹細胞の初期平面形状からの変形を観察することで、休眠幹細胞の第１培養容器の底面に対する定着が適宜に確認されるから、休眠幹細胞の定着を確実に把握することができ、休眠幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を製造することができる。

[0025] 休眠幹細胞の初期平面形状が略円形であり、休眠幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として休眠幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、休眠幹細胞が不定形の扁平形状に変形した場合に休眠幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する活性化幹細胞製造方法は、第１培養容器の底面における休眠幹細胞の略円形から扁平形状への変形を観察することで、休眠幹細胞の第１培養容器の底面に対する定着が正確に判断されるから、第１培養容器における休眠幹細胞の定着を確実に把握することができ、休眠幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を製造することができる。

[0026] 第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積の第１目標割合

が７０～８０％であり、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第１培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第１培養容器の底面に定着した休眠幹細胞の第１培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する活性化幹細胞製造方法は、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で３６～４８時間静的に放置することで、第１培養容器の底面に定着した休眠幹細胞の増殖を確実に促進することができる。活性化幹細胞製造方法は、約１～２時間の間隔で総平面面積を観察することで、第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積が正確に確認されるから、第１培養容器における休眠幹細胞の増殖を確実に把握することができ、休眠幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積が８０％を超過して休眠幹細胞が増殖すると、休眠幹細胞の活性が次第に失われるが、第１培養容器の底面面積に対して休眠幹細胞の総平面面積が７０～８０％に増殖した時点で、活性化した休眠幹細胞を第１培養容器から抽出することで、活性化した休眠幹細胞の活性が保持されるから、休眠幹細胞を十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を製造することができる。

[0027] 第１培養容器の底面面積に対する休眠幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達した時点で第１培養容器から活性化幹細胞を抽出し、抽出した活性化幹細胞とあらたな培養液とあらたな培養生成液とを所定容量かつ所定面積の底面を有して第１培養容器よりも大きい容量の第２培養容器に注入し、活性化幹細胞を第２培養容器の底面に定着させるとともに、第２培養容器の底面に定着させた活性化幹細胞を培養し、第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積が第２目標割合に達するまで増殖させる活性化幹細胞製造方法は、活性化幹細胞（休眠幹細胞）の保存前の単一種の幹細胞の培養過程において生成された培養生成液によって第２培養容器の底面に対する活性化幹細胞の定着や活性化幹細胞の増殖が促進されるから、その培養生成液を利用して活性化幹細胞を第２培養容器の底面に速やかに定着させることがで

き、その培養生成液を利用して総平面面積が第２目標割合に達するまで活性化幹細胞を速やかに増殖させることができ、単一種の活性化幹細胞を効率よく確実に増殖させることができるとともに、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の活性化幹細胞を作ることができ、多種雑多な幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができる。

[0028] 活性化幹細胞を第２培養容器の底面に定着させた後、培養液と培養生成液との混合培養液を第２培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを第２培養容器に注入し、第２培養容器の底面に定着させた活性化幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する活性化幹細胞製造方法は、活性化幹細胞（休眠幹細胞）の保存前の単一種の幹細胞の培養過程において生成されたあらたな培養生成液によって活性化幹細胞の増殖が確実に促進されるから、あらたな培養生成液を利用して総平面面積が第２目標割合に達するまで活性化幹細胞を速やかに増殖させることができ、単一種の活性化幹細胞を効率よく確実に増殖させることができるとともに、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の活性化幹細胞を作ることができ、多種雑多な幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができる。

[0029] 第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第２培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第２培養容器内の活性化幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、活性化幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、活性化幹細胞が第２培養容器の底面に定着したと判断する活性化幹細胞製造方法は、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で３６～４８時間静的に放置することで、第２培養容器の底面に活性化幹細胞を確実に定着させることができ、活性化幹細胞の増殖を確実に促進することができる。活性化幹細胞製造方法は、３６～４８時間の放置時間において約１～２時間の間隔で第２培養容器内の活性化幹細胞の初期平面形状からの変形を観察することで、活性化幹細胞の第２培養容器の底面に対する定着が適宜に確認されるから、活性化幹細胞の定着を確実に把握することができ、活性化幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。

[0030] 活性化幹細胞の初期平面形状が略円形であり、活性化幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として活性化幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、活性化幹細胞が不定形の扁平形状に変形した場合に活性化幹細胞が第２培養容器の底面に定着したと判断する活性化幹細胞製造方法は、第２培養容器の底面における活性化幹細胞の略円形から扁平形状への変形を観察することで、活性化幹細胞の第２培養容器の底面に対する定着が正確に判断されるから、第２培養容器における活性化幹細胞の定着を確実に把握することができ、活性化幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。

[0031] 第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積の第２目標割合が８８～９２％であり、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で第２培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で第２培養容器の底面に定着した活性化幹細胞の第２培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する活性

化幹細胞製造方法は、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で３６～４８時間静的に放置することで、第２培養容器の底面に定着した活性化幹細胞の増殖を確実に促進することができる。活性化幹細胞製造方法は、約１～２時間の間隔で総平面面積を観察することで、第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積が正確に確認されるから、第２培養容器における活性化幹細胞の増殖を確実に把握することができ、活性化幹細胞を確実に増殖させて十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、第２培養容器の底面面積に対する活性化幹細胞の総平面面積が９２％を超過して活性化幹細胞が増殖すると、活性化幹細胞の活性が次第に失われるが、第２培養容器の底面面積に対して活性化幹細胞の総平面面積が８８～９２％に増殖した時点で、活性化幹細胞を第２培養容器から抽出することで、活性化幹細胞の活性が保持されるから、十分な活性を有する単一種の活性化幹細胞を製造することができる。

[0032] 培養生成液が単一種の幹細胞の培養過程においてその単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む活性化幹細胞製造方法は、単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質が含まれる培養生成液を利用することで、その幹細胞自体の代謝物質がトリガーとなり、休眠幹細胞や活性化幹細胞が速やかに活性を開始する。したがって、第１培養容器の底面に対する休眠幹細胞の定着や第２培養容器の底面に対する活性化幹細胞の定着が促進されるとともに、第１培養容器における休眠幹細胞の増殖や第２培養容器における活性化幹細胞の増殖が促進され、その培養生成液を利用して休眠幹細胞や活性化幹細胞を培養容器の底面に速やかに定着させることができ、その培養生成液を利用して総平面面積が目標割合に達するまで休眠幹細胞や活性化幹細胞を速やかに増殖させることができるとともに、休眠状態にある単一種の休眠幹細胞や活性化幹細胞を効率よく確実に増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。

[0033] 層状に分離させた骨髄液のうちの中間層に位置する中間層骨髄液を抽出し、中間層骨髄液に含まれる第１幹細胞を第３培養容器の底面に定着させ、第

１幹細胞を培養して第３培養容器の底面面積に対する第１幹細胞の総平面面積が第３目標割合に達するまで第１幹細胞を増殖させるとともに、層状に分離させた第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を抽出し、第２幹細胞を大きい容量の第４培養容器の底面に定着させ、第２幹細胞を培養して第４培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積が第４目標割合に達するまで第２幹細胞を増殖させることから単一種の幹細胞が作られている活性化幹細胞製造方法は、保存前の幹細胞に多種雑多な幹細胞が含まれることはなく、その結果、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の活性化幹細胞を作ることができ、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができ、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞を製造することができる。

[0034] 培養生成液が第４培養容器から単一の第２幹細胞を抽出した後に残った培養液である活性化幹細胞製造方法は、第２幹細胞を抽出した後に残った培養液に単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質が含まれ、その幹細胞自体の代謝物質がトリガーとなり、休眠幹細胞や活性化幹細胞が速やかに活性を開始する。したがって、第１培養容器の底面に対する休眠幹細胞の定着や第２培養容器の底面に対する活性化幹細胞の定着が促進されるとともに、第１培養容器における休眠幹細胞の増殖や第２培養容器における活性化幹細胞の増殖が促進され、その培養生成液を利用して休眠幹細胞や活性化幹細胞を培養容器の底面に速やかに定着させることができ、その培養生成液を利用して総平面面積が目標割合に達するまで休眠幹細胞や活性化幹細胞を速やかに増殖させることができるとともに、休眠状態にある単一種の休眠幹細胞や活性化幹細胞を効率よく確実に増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の活性化幹細胞を得ることができる。

[0035] それら幹細胞が間葉系の幹細胞である活性化幹細胞製造方法は、休眠状態にある単一種の間葉系の休眠幹細胞または間葉系の活性化幹細胞を効率よく

確実に増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の間葉系の活性化幹細胞を効率よく製造することができる。活性化幹細胞製造方法は、不要な幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の間葉系の活性化幹細胞を作ることができ、多種雑多な間葉系の幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い間葉系の活性化幹細胞を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な間葉系の活性化幹細胞を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な間葉系の活性化幹細胞を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0036] [図1]一例として示す活性化幹細胞培養システムの概略構成図。

[図2]休眠幹細胞定着工程の一例を説明する図。

[図3]第１扁平培養容器の側面図。

[図4]休眠幹細胞の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図5]休眠幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図6]休眠幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図7]活性化幹細胞定着工程の一例を説明する図。

[図8]第２扁平培養容器の側面図。

[図9]活性化幹細胞の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図10]活性化幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図11]活性化幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図12]幹細胞第１定着工程において使用するガラス試験管の斜視図。

[図13]図１０から続く幹細胞第１定着工程を説明する図。

[図14]図１１から続く幹細胞第１定着工程を説明する図。

[図15]幹細胞の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図16]幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図17]幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図18]幹細胞第２定着工程において使用するガラス試験管および遠心分離器

の斜視図。

[図19]遠心分離後のガラス試験管の斜視図。

[図20]幹細胞（第２幹細胞）の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図21]幹細胞（第２幹細胞）の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図22]幹細胞（第２幹細胞）の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図23]幹細胞（第２幹細胞）および培養生成液の保存の一例を示す図。

発明を実施するための形態

[0037] 一例として示す活性化幹細胞培養システム１０の概略構成図である図１等の添付の図面を参照し、本発明にかかる単一種（特定種類）の間葉系活性化幹細胞の製造方法の詳細を説明すると、以下のとおりである。なお、図２は、休眠幹細胞定着工程の一例を説明する図であり、図３は、第１扁平培養容器２１の側面図である。図４は、休眠幹細胞２２の平面形状の一例を示す部分拡大図であり、図５は、休眠幹細胞２２の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図４，５は、電子顕微鏡１３によって撮影された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を示す。

[0038] 単一種の間葉系活性化幹細胞２７は、ドナーから採取した骨髄液２９を培養することから作られた単一種（特定種類）の間葉系幹細胞３０を所定期間保存した後の休眠状態にある間葉系休眠幹細胞２２を活性化させたものである。活性化幹細胞２７は、休眠幹細胞２２の保存前であって休眠幹細胞２２の元となる幹細胞３０の培養過程において生成された培養生成液２４を利用し、休眠状態にある休眠幹細胞２２に休眠幹細胞定着工程と休眠幹細胞培養工程とを実施することから製造される。

[0039] また、活性化幹細胞は、休眠幹細胞２２の保存前であって休眠幹細胞２２の元となる幹細胞３０の培養過程において生成された培養生成液２４を利用し、休眠状態にある休眠幹細胞２２に休眠幹細胞定着工程と休眠幹細胞培養工程とを実施するとともに、活性化幹細胞に活性化幹細胞定着工程と活性化幹細胞培養工程とを実施することから作られる。なお、保存する前の幹細胞３０と保存された後の休眠幹細胞２２とは、同一の幹細胞である。

[0040] 培養生成液２４は、単一種の幹細胞３０の培養過程においてその単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含んでいる。単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質が含まれる培養生成液２４を利用することで、その幹細胞３０自体の代謝物質がトリガーとなり、休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７が速やかに活性を開始する。したがって、休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７の定着が促進されるとともに、休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７の増殖が促進され、その培養生成液２４を利用して休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７を速やかに定着させることができ、その培養生成液２４を利用して休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７を速やかに増殖させることができるとともに、休眠幹細胞２２や活性化幹細胞２７を効率よく確実に増殖させることができる。

[0041] 活性化幹細胞培養システム１０は、コンピュータ１１、ＩＣタグリーダ／ライタ１２、電子顕微鏡１３、冷蔵庫１４または冷凍庫１４から形成されている。コンピュータ１１は、中央処理装置（ＣＰＵや仮想ＣＰＵ）と記憶装置（メモリや仮想メモリ）と大容量記憶領域（ハードディスクや仮想ハードディスク等）とを備え、物理的なＯＳ（オペレーティングシステム）や仮想ＯＳ（仮想オペレーティングシステム）によって動作する。

[0042] コンピュータ１１には、キーボード１５やマウス１６等の入力装置、ディスプレイ１７やプリンタ（図示せず）等の出力装置がインターフェイス（無線または有線）を介して接続されている。ＩＣタグリーダ／ライタ１２や電子顕微鏡１３は、インターフェイス（無線または有線）を介してコンピュータ１１に接続されている。電子顕微鏡１３は、撮像素子によって被写体の拡大画像を撮影する画像撮影機能を有するとともに、その拡大画像をコンピュータ１１に送信する画像送信機能を有する。

[0043] 活性化幹細胞培養システム１０では、各種のドナーデータ（ドナー特定情報）がＩＣタグ１８を利用して管理され、幹細胞や休眠幹細胞２２、活性化幹細胞に関する幹細胞データがＩＣタグ１８を利用して管理される。ドナーデータには、ドナーの氏名、住所、電話番号、生年月日、性別、血液型、身

長、体重、メールアドレス等があり、ドナー識別子に関連付けた状態でＩＣタグに格納（記憶）されている。幹細胞データには、幹細胞特定情報、幹細胞製造年月日、培養生成液製造年月日、培養生成液特定情報等があり、ドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態でＩＣタグ１８に格納（記憶）されている。

[0044] 骨髄液２９を培養することから作られた単一種（特定種類）の幹細胞３０は、幹細胞収容容器１９に収容された状態で冷蔵庫１４または冷凍庫１４において所定期間、所定温度（３～５℃または冷凍保存）で保存されている。幹細胞３０を収容した幹細胞収容容器１９の外周面には、ドナーデータや幹細胞データが格納されたＩＣタグ１８が取り付けられている。

[0045] 活性化幹細胞２７（休眠幹細胞２２）の元となる幹細胞３０の培養過程において生成された培養生成液２４は、生成液収容容器２０に収容された状態で冷蔵庫１４または冷凍庫１４において所定期間、所定温度で保存されている。培養生成液２４を収容した生成液収容容器２０の外周面には、ドナーデータや幹細胞データが格納されたＩＣタグ１８が貼付されている。

[0046] コンピュータ１１においてシステム１０を起動すると、初期画面（図示せず）がディスプレイ１７に表示される。初期画面には、幹細胞培養ボタン、休眠幹細胞培養ボタン、活性化幹細胞培養ボタン、ログアウトボタンが表示される。医師や看護師、研究者等の担当者は、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞培養ボタンをクリックする。休眠幹細胞培養ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、データ比較ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0047] 休眠幹細胞定着工程において、担当者は、データ比較ボタンをクリックするとともに、冷蔵庫１４または冷凍庫１４から幹細胞収容容器１９や生成液収容容器２０を取り出し、幹細胞収容容器１９や生成液収容容器２０に取り付けられたＩＣタグ１８のデータをＩＣタグリーダ／ライタ１２に読み取らせる。コンピュータ１１は、幹細胞収容容器１９のＩＣタグ１８のドナー識別子や幹細胞識別子と生成液収容容器２０のＩＣタグ１８のドナー識別子や

幹細胞識別子とを比較し、それらＩＣタグ１８のドナー識別子および幹細胞識別子が一致した場合、マッチングＯＫメッセージ、データ格納ボタンをディスプレイ１７表示する。それらＩＣタグのドナー識別子および幹細胞識別子が不一致の場合、エラーメッセージをディスプレイ１７表示する。

[0048] 担当者は、マッチングＯＫメッセージによって生成液収容容器２０に収容された培養生成液２４が幹細胞収容容器１９に収容された休眠幹細胞２２（幹細胞）の培養過程で生成されたものであることを確認した後、幹細胞収容容器１９や生成液収容容器２０を恒温槽（図示せず）に収容し、幹細胞収容容器１９に収容された休眠幹細胞２２や生成液収容容器２０に収容された培養生成液２４を室温に戻す。または、幹細胞収容容器１９や生成液収容容器２０を室内に所定時間放置し、幹細胞収容容器１９に収容された休眠幹細胞２２や生成液収容容器２０に収容された培養生成液２４を室温に戻す。

[0049] 担当者は、第１扁平培養容器２１（第１培養容器）を用意し、培養容器２１の外周面にＩＣタグ１８を取り付けた後、データ格納ボタンをクリックするとともに、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用してそのＩＣタグ１８に幹細胞収容容器１９に取り付けられたＩＣタグ１８および生成液収容容器２０に取り付けられたＩＣタグ１８のデータを格納する。コンピュータ１１は、データ格納完了メッセージ、休眠幹細胞定着観察ボタン、休眠幹細胞定着完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0050] 担当者は、休眠幹細胞２２や培養生成液２４を室温に戻した後、注射器またはピペットを利用して休眠幹細胞２２を幹細胞収容容器１９から第１扁平培養容器２１（第１培養容器）に注入（収容）し、注射器またはピペットを利用して培養液２３を培養容器２１に注入（収容）するとともに、注射器またはピペットを利用して培養生成液２４を生成液収容容器２０から培養容器２１に注入（収容）する。なお、第１扁平培養容器２１に注入する培養生成液２４の注入割合は、培養容器２１に注入する培養液２３の総注入量を１００％としたときに５～１５％、好ましくは、８～１２％、より好ましくは、１０％である。

[0051] 次に、担当者は、休眠幹細胞２２、培養液２３、培養生成液２４を注入した第１扁平培養容器２１を体温と略同一の温度（約３７℃）に保持しつつ、１２～２４時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）し、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２１内の休眠幹細胞２２の初期平面形状からの変形を電子顕微鏡１３で観察し、休眠幹細胞２２が培養容器２１の底面２５に定着したか否かを判断する。

[0052] 培養液２３には、ペニシリン（約１００Ｕ／ｍｌ）、アムホテリシン（約１００ｎｇ／ｍｌ）、ストレプトマイシン（約１００ｍｋｇ／ｍｌ）、Ｌ－グルタミン（約２～４ｍｌ）、２０％ウシ胎児血清を添加したミネラル塩溶液およびアミノ酸が含まれる。第１扁平培養容器２１に注入された休眠幹細胞２２は、時間の経過とともに培養容器２１の底面２５に定着しつつ、培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６によって培養され、培養容器２１の底面２５において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0053] なお、培養液２３には、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）、Ｇｒａｓｇｏｗ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＧＭＥＭ）、ＲＰＭＩ６４０等を使用することもできる。培養液２３には、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレニウム、２－メルカプトエタノール、Ｌ－アラニル－Ｌ－グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、Ｌ－アラニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラチン酸、グリシン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン等を添加することもできる。

[0054] 第１扁平培養容器２１（第１培養容器）は、透明なガラスまたは透明なプラスチックから作られ、小容量かつ所定面積の底面を有する平面形状が略正四角形の扁平な容器である。第１扁平培養容器２１として小容量かつ所定面積の底面を有する平面形状が円形や楕円形の扁平な容器を使用することもできる。休眠幹細胞定着工程で使用される第１扁平培養容器２１は、その容量が約２０～３０ｃｃ（好ましくは、２５ｃｃ）であり、その底面面積が約２５～３６ｍｍ^{2}である。培養容器２１は、その一辺の長さが５～６ｍｍである

。

[0055] 担当者は、休眠幹細胞定着観察ボタンをクリックするとともに、第１扁平培養容器２１を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９に設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第１扁平培養容器２１の底部４１との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２１の底部４１をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２１の底部４１が上となり培養容器２１の頂部４３（注入口４４）が下となるように、培養容器２１を所定角度に傾斜させた状態に保持する。また、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第１扁平培養容器２１の頂部４３との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２１の頂部４３をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２１の頂部４３が上となり培養容器２１の底部４１が下となるように、培養容器２１を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第１扁平培養容器２１の傾斜角度α１は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0056] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第１扁平培養容器２１を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２１内において休眠幹細胞２２、培養液２３、培養生成液２４が培養容器２１の頂部４３の側（または底部４１の側）に偏り、培養容器２１の頂部４３の側（または底部４１の側）において休眠幹細胞２２、培養液２３、培養生成液２４との水圧が大きくなって休眠幹細胞２２が培養容器２１の頂部４３の側（または底部４１の側）に集中し、それによって休眠幹細胞２２どうしの活性が高まり、培養容器２１の底面２５において休眠幹細胞２２を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0057] ディスプレイ１７には、休眠幹細胞定着観察実施中メッセージ、休眠幹細胞定着完了ボタンが表示される。電子顕微鏡１３は、第１扁平培養容器２１に注入された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で

コンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。

[0058] コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。担当者は、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、休眠幹細胞２２の平面形状の変化を観察する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から休眠幹細胞２２の平面形状の変化を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で直接観察してもよい。

[0059] 休眠幹細胞２２の初期平面形状（定着前の平面形状）は略円形であり、休眠幹細胞２２の平面形状が略円形の場合、休眠幹細胞２２が第１扁平培養容器２１の底面２５（底壁内面）に定着しておらず、休眠幹細胞２２が増殖（分化）を開始していない。休眠幹細胞２２の変形後の平面形状（定着後の平面形状）は定着前の略円形を核として休眠幹細胞２２が一方向（所定方向）へ不定形に伸張（拡張）した扁平形状であり、休眠幹細胞２２が第１扁平培養容器２１の底面２５（底壁内面）に定着し、休眠幹細胞２２が増殖（活性化）を開始している。

[0060] 担当者は、休眠幹細胞定着工程における観察の結果、図４に示すように、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像が略円形のまま観察される場合、休眠幹細胞２２が第１扁平培養容器２１の底面２５（底壁内面）に定着していないと判断し、休眠幹細胞２２の平面形状の変化を約１～２時間の間隔で継続して観察する。担当者は、図５に示すように、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞１１の平面形状が略円形から略円形を核として不定形の扁平形状に変形した場合、休眠幹細胞１１が第１扁平培養容器２１の底面２５に定着したと判断する。

[0061] 休眠幹細胞２２の定着時に容量が３０ｃｃを超過するとともに底面面積が３６ｍｍ^{2}を超過する大きな培養容器を使用すると、休眠幹細胞２２が容器の底面に定着し難くなるとともに休眠幹細胞２２の増殖が遅くなるが、前記容量かつ前記底面面積の第１扁平培養容器２１を使用することで、休眠幹細胞２２を培養容器２１の底面２５に容易に定着させることができ、培養容器２１において休眠幹細胞２２を素早く増殖させることができる。第１扁平培養容器２１を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的に放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２１内の休眠幹細胞２２の初期平面形状からの変形を観察するから、休眠幹細胞２２の変形を見逃すことはなく、休眠幹細胞２２の培養容器２１の底面２５に対する定着を正確に確認することができる。

[0062] 図６は、休眠幹細胞２２の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図６は、電子顕微鏡１３によって撮影された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を示す。休眠幹細胞定着工程における観察の結果、図５に示すように、間葉系の休眠幹細胞２２が略円形（初期平面形状）から略円形を核として不定形の扁平形状に変形し、休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面２５への定着を確認した後、休眠幹細胞培養工程が行われる。

[0063] 医師や看護師、研究者等の担当者は、休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面２５に対する定着を確認した後、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞定着完了ボタンをクリックする。休眠幹細胞定着完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、休眠幹細胞定着完了メッセージ、休眠幹細胞培養観察ボタン、休眠幹細胞培養完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0064] 休眠幹細胞培養工程では、第１扁平培養容器２１に注入されている培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を培養容器２１から排出し、培養容器２１にあらたな培養液２３およびあらたな培養生成液２４（休眠幹細胞２２の保存前であって休眠幹細胞２２の元となる幹細胞３０の培養過程において生成された培養生成液２４）を注入（収容）する。なお、第１扁平培養

容器２１に注入するあらたな培養生成液２４の注入割合は、培養容器２１に注入するあらたな培養液２３の総注入量を１００％としたときに５～１５％、好ましくは、８～１２％、より好ましくは、１０％である。

[0065] 担当者は、第１扁平培養容器２１を電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９から取り外し、休眠幹細胞定着工程において培養容器２１に注入した培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を注射器またはピペットを利用して培養容器２１から排出し、注射器またはピペットを利用してあらたな培養液２３を培養容器２１に注入（収容）するとともに、注射器またはピペットを利用してあらたな培養生成液２４を生成液収容容器１２０から培養容器２１に注入（収容）する。あらたな培養液２３やあらたな培養生成液２４は、休眠幹細胞定着工程において第１扁平培養容器２１に注入されたそれらと同一である。

[0066] 担当者は、第１扁平培養容器２１を体温と略同一の温度（約３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２１の底面２５に定着した休眠幹細胞２２の培養容器２１の底面面積に対する総平面面積を電子顕微鏡１３で観察し、休眠幹細胞２２の総平面面積が培養容器２１の底面面積に対して目標割合（第１目標割合）に達したか否かを判断する。第１扁平培養容器２１の底面面積に対する休眠幹細胞２２の総平面面積の目標割合は、７０～８０％（７０～８０％コンフルエント）である。

[0067] 担当者は、あらたな培養液２３とあらたな培養生成液２４とを第１扁平培養容器２１に注入した後、休眠幹細胞培養観察ボタンをクリックするとともに、培養容器２１を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第１扁平培養容器２１の底部４１との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２１の底部４１をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２１の底部４１が上となり培養容器２１の頂部４３（注入口４４）が下となるように、培養容器２１を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図３参照）。また、電子顕

微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第１扁平培養容器２１の頂部４３との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２１の頂部４３をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２１の頂部４３が上となり培養容器２１の底部４１が下となるように、培養容器２１を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第１扁平培養容器２１の傾斜角度α１は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0068] 培養生成液製造方法は、休眠幹細胞２２の定着を確認した後、培養容器２１の混合培養液２６を排出しつつあらたな培養液２３とあらたな培養生成液２４とを培養容器２１に注入することで、休眠幹細胞２２の増殖を確実に促進することができる。培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第１扁平培養容器２１を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２１内において休眠幹細胞２２、培養液２３、培養生成液２４が培養容器２１の頂部４３の側（または底部４１の側）に偏り、培養容器２１の頂部４３の側（または底部４１の側）において休眠幹細胞２２、培養液２３、培養生成液２４の水圧が大きくなって休眠幹細胞２２が培養容器２１の底部４１の側（または頂部４３の側）に集中し、それによって休眠幹細胞２２どうしの活性が高まり、培養容器２１の底面２５において休眠幹細胞２２を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0069] ディスプレイ１７には、休眠幹細胞培養観察実施中メッセージ、休眠幹細胞培養完了ボタンが表示される。休眠幹細胞２２の定着を確認した後、第１扁平培養容器２１から培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を排出しつつ、あらたな培養液２３と単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質が含まれるあらたな培養生成液２４とを培養容器２１に注入することで、その幹細胞３０自体の代謝物質がトリガーとなり、休眠幹細胞２２が速やかに活性を開始し、休眠幹細胞２２の増殖を確実に促進することができる。

[0070] 電子顕微鏡１３は、第１扁平培養容器２１の休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した休眠幹細胞２２の平面形状

の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。

[0071] 担当者は、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞２２の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、第１扁平培養容器２１の底面２５に定着した休眠幹細胞２２の培養容器２１の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、休眠幹細胞２２の総平面面積が培養容器２１の底面面積に対して目標割合（第１目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達したか否かを判断する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面面積に対する総平面面積を３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で直接観察し、休眠幹細胞２２の総平面面積が培養容器２１の底面面積に対して目標割合（７０～８０％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0072] 担当者は、休眠幹細胞培養工程における観察の結果、図４に示すように、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第１目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達していない場合、休眠幹細胞２２の培養容器２１の底面面積に対する総平面面積を約１～２時間間隔で継続して観察する。なお、ディスプレイ１７に表示された拡大画像の全面積に対して休眠幹細胞２２の総平面面積が目標割合（第１目標割合）に達した場合に、休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達したものとする。

[0073] 休眠幹細胞培養工程における観察の結果、休眠幹細胞２２が第１扁平培養

容器２１の底面２５（底壁内面）において増殖して休眠幹細胞２２がコロニーを形成し、休眠幹細胞２２の平面形状が拡張することで、図５に示すように、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞２２の培養容器２１の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第１目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達した場合、休眠幹細胞２２が十分に増殖かつ活性化し、休眠幹細胞２２が活性化幹細胞２７に変質している。休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達した時点で、培養容器２１から活性化幹細胞２７を抽出し、抽出した活性化幹細胞２７を各種疾患の治療や再生医療に利用する。

[0074] 担当者は、第１扁平培養容器２１に注入されている混合培養液２６を注射器またはピペットを利用して培養容器２１から排出し、培養容器２１内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器２１に注入する。第１扁平培養容器２１にトリプシン液を注入すると、培養容器２１の底面２５に定着（増殖）した活性化幹細胞２７がトリプシン液によって底面２５から剥離し、トリプシン液の水面に浮上する。担当者は、ピペットを利用して活性化幹細胞２７を吸引し、活性化幹細胞２７をピペット内に収容する。なお、休眠幹細胞培養工程において培養した活性化幹細胞２７を幹細胞収容容器１９に収容し、活性化幹細胞２７を収容した幹細胞収容容器１９を冷蔵庫１４または冷凍庫１４に入れ、冷蔵庫１４または冷凍庫１４において活性化幹細胞２７を保存することができる。

[0075] 担当者は、休眠幹細胞２２の第１扁平培養容器２１の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第１目標割合）に達したことを確認した後、ディスプレイ１７に表示された休眠幹細胞培養完了ボタンをクリックする。休眠幹細胞培養完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、初期画面をディスプレイ１７に表示する。培養を終了する場合は、初期画面のログアウトボタンをクリックする。ログアウトボタンをクリックすると、コンピュータ１１がシステムからログアウトする。

[0076] 活性化幹細胞製造方法は、休眠幹細胞２２の保存前の単一種の間葉系幹細

胞３０の培養過程（増殖過程）において生成されてその幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質が含まれる培養生成液２４を利用することで、その幹細胞自体の代謝物質がトリガーとなり、休眠幹細胞２２が速やかに活性を開始し、第１扁平培養容器２１（第１培養容器）の底面２５に対する休眠幹細胞２２の定着や休眠幹細胞２２の増殖を促進することができ、休眠幹細胞２２の活性を保持しつつ休眠幹細胞２２を速やかに増殖させることができる。

[0077] 活性化幹細胞製造方法は、休眠幹細胞２２の保存前の単一種の間葉系幹細胞３０の培養過程（増殖過程）において生成された培養生成液２４を利用して休眠幹細胞２２を第１扁平培養容器２１（第１培養容器）の底面２５に定着させるとともに、その培養生成液２４を利用して総平面面積が第１目標割合に達するまで休眠幹細胞２２を増殖させることで、単一種の間葉系休眠幹細胞２２を効率よく確実に定着かつ増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の間葉系活性化幹細胞２７を効率よく製造することができる。

[0078] 活性化幹細胞製造方法は、間葉系休眠幹細胞２２に休眠幹細胞定着工程および休眠幹細胞培養工程を実施することによって不要な間葉系幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の間葉系活性化幹細胞２７を製造することができ、多種雑多な間葉系幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞２７を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞２７を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞２７を製造することができる。

[0079] 図７は、活性化幹細胞定着工程の一例を説明する図であり、図８は、第２扁平培養容器２８の側面図である。図９は、活性化幹細胞２７の平面形状の一例を示す部分拡大図であり、図１０は、活性化幹細胞２７の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図１１は、活性化幹細胞２７の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図９～１１は、電子顕微鏡１３によって

撮影された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を示す。

[0080] 休眠幹細胞培養工程によって休眠幹細胞２２（活性化幹細胞２７）を培養した後、継続して活性化幹細胞２７を培養するには、休眠幹細胞培養完了ボタンをクリックすることでディスプレイ１７に表示された初期画面の活性化幹細胞培養ボタンをクリックする。活性化幹細胞培養ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、データ格納ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0081] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第２扁平培養容器２８（第２培養容器）を用意し、培養容器２８の外周面にＩＣタグ１８を取り付けた後、データ格納ボタンをクリックするとともに、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用してそのＩＣタグ１８に第１扁平培養容器２１（第１培養容器）に取り付けられたＩＣタグ１８のデータを格納する。コンピュータ１１は、データ格納完了メッセージ、活性化幹細胞定着観察ボタン、活性化幹細胞定着完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0082] 担当者は、注射器またはピペットを利用して活性化幹細胞２７を第１扁平培養容器２１（第１培養容器）から第２扁平培養容器２８に注入（収容）し、注射器またはピペットを利用して培養液２３を第２扁平培養容器２８に注入（収容）するとともに、注射器またはピペットを利用して培養生成液２４を生成液収容容器２０から第２扁平培養容器２８に注入（収容）する。なお、第２扁平培養容器２８に注入する培養生成液２４の注入割合は、第２扁平培養容器２８に注入する培養液２３の総注入量を１００％としたときに５～１５％、好ましくは、８～１２％、より好ましくは、１０％である。培養液２３や培養生成液２４は、第１扁平培養容器２１に注入したそれらと同一である。

[0083] 次に、担当者は、活性化幹細胞２７、培養液２３、培養生成液２４を注入した第２扁平培養容器２８を体温と略同一の温度（約３７℃）に保持しつつ、３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）し、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２８内の活性化幹細胞２７

の初期平面形状からの変形を電子顕微鏡１３で観察し、活性化幹細胞２７が培養容器２８の底面２９に定着したか否かを判断する。

[0084] 第２扁平培養容器２８（第２培養容器）は、透明なガラスまたは透明なプラスチックから作られ、小容量かつ所定面積の底面を有する平面形状が略四角形の扁平な容器であり、底面２９の面積が第１扁平培養容器２１（第１培養容器）の約２倍である。第２扁平培養容器２８として小容量かつ所定面積の底面を有する平面形状が円形や楕円形の扁平な容器を使用することもできる。活性化幹細胞定着工程で使用される第２扁平培養容器２８は、その容量が約４０～６０ｃｃ（好ましくは、５０ｃｃ）であり、その底面面積が約５０～７２ｍｍ^{2}である。培養容器２８は、その一辺の長さが約７～８．５ｍｍである。

[0085] 担当者は、活性化幹細胞定着観察ボタンをクリックするとともに、第２扁平培養容器２８を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９に設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第２扁平培養容器２８の底部４５との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２８の底部４５をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２８の底部４５が上となり培養容器２８の頂部４６（注入口４７）が下となるように、培養容器２８を所定角度に傾斜させた状態に保持する。また、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第２扁平培養容器２８の頂部４６との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２８の頂部４６をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２８の頂部４６が上となり培養容器２８の底部４５が下となるように、培養容器２８を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第２扁平培養容器２８の傾斜角度α２は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0086] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第２扁平培養容器２８を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２８内において活性化幹細胞２７、培養液２３、培養生成液２４が培養容器２８の頂部４６の側

（または底部４５の側）に偏り、培養容器２８の頂部４６の側（または底部４５の側）において活性化幹細胞２７、培養液２３、培養生成液２４の水圧が大きくなって活性化幹細胞２７が培養容器２８の頂部４６の側（または底部４５の側）に集中し、それによって活性化幹細胞２７どうしの活性が高まり、培養容器２８の底面２９において活性化幹細胞２７を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0087] ディスプレイ１７には、活性化幹細胞定着観察実施中メッセージ、活性化幹細胞定着完了ボタンが表示される。電子顕微鏡１３は、第２扁平培養容器２８に注入された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。

[0088] コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。担当者は、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、活性化幹細胞２７の平面形状の変化を観察する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から活性化幹細胞２７の平面形状の変化を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で直接観察してもよい。

[0089] 活性化幹細胞２７の初期平面形状（定着前の平面形状）は略円形であり、活性化幹細胞２７の平面形状が略円形の場合、活性化幹細胞２７が第２扁平培養容器２８の底面２９（底壁内面）に定着しておらず、活性化幹細胞２７が増殖（分化）を開始していない。活性化幹細胞２７の変形後の平面形状（定着後の平面形状）は定着前の略円形を核として活性化幹細胞２７が一方向

（所定方向）へ不定形に伸張（拡張）した扁平形状であり、活性化幹細胞２７が第２扁平培養容器２８の底面２８（底壁内面）に定着し、活性化幹細胞２７が増殖（活性化）を開始している。

[0090] 担当者は、活性化幹細胞定着工程における観察の結果、図８に示すように、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像が略円形のまま観察される場合、活性化幹細胞２７が第２扁平培養容器２８の底面２９（底壁内面）に定着していないと判断し、活性化幹細胞２７の平面形状の変化を約１～２時間の間隔で継続して観察する。担当者は、図９に示すように、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の平面形状が略円形から略円形を核として不定形の扁平形状に変形した場合、活性化幹細胞２７が第２扁平培養容器２８の底面２９に定着したと判断する。

[0091] 活性化幹細胞２７の定着時に容量が６０ｃｃを超過するとともに底面面積が７２ｍｍ^{2}を超過する大きな培養容器を使用すると、活性化幹細胞２７が容器の底面に定着し難くなるとともに活性化幹細胞２７の増殖が遅くなるが、前記容量かつ前記底面面積の第２扁平培養容器２８を使用することで、活性化幹細胞２７を培養容器２８の底面２９に容易に定着させることができ、培養容器２８において活性化幹細胞２７を素早く増殖させることができる。第２扁平培養容器２８を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２８内の活性化幹細胞２７の初期平面形状からの変形を観察するから、活性化幹細胞２７の変形を見逃すことはなく、活性化幹細胞２７の培養容器２８の底面２９に対する定着を正確に確認することができる。

[0092] 活性化幹細胞定着工程における観察の結果、図９に示すように、間葉系活性化幹細胞２７が略円形（初期平面形状）から略円形を核として不定形の扁平形状に変形し、活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面２９への定着を確認した後、活性化幹細胞培養工程が行われる。医師や看護師、研究者等の担当者は、活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面２９に対する定着を確認した後、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞定着完

了ボタンをクリックする。活性化幹細胞定着完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、活性化幹細胞定着完了メッセージ、活性化幹細胞培養観察ボタン、活性化幹細胞培養完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0093] 活性化幹細胞培養工程では、第２扁平培養容器２８に注入されている培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を培養容器２８から排出し、培養容器２８にあらたな培養液２３およびあらたな培養生成液２４（休眠幹細胞２２の保存前（休眠幹細胞２２の元となる）幹細胞３０の培養過程において生成された培養生成液２４）を注入（収容）する。なお、第２扁平培養容器２８に注入するあらたな培養生成液２４の注入割合は、培養容器２８に注入するあらたな培養液２３の総注入量を１００％としたときに５～１５％、好ましくは、８～１２％、より好ましくは、１０％である。

[0094] 担当者は、第２扁平培養容器２８を電子顕微鏡１６の試料ホルダから取り外し、活性化幹細胞定着工程において培養容器２８に注入した培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を注射器またはピペットを利用して培養容器２８から排出し、注射器またはピペットを利用してあらたな培養液２３を培養容器２８に注入（収容）するとともに、注射器またはピペットを利用してあらたな培養生成液２４を生成液収容容器２０から培養容器２８に注入（収容）する。あらたな培養液２３やあらたな培養生成液２４は、活性化幹細胞定着工程において第２扁平培養容器２８に注入されたそれらと同一である。

[0095] 担当者は、第２扁平培養容器２８を体温と略同一の温度（約３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器２８の底面２９に定着した活性化幹細胞２７の培養容器２８の底面面積に対する総平面面積を電子顕微鏡１３で観察し、活性化幹細胞２７の総平面面積が培養容器２８の底面面積に対して目標割合（第２目標割合）に達したか否かを判断する。第２扁平培養容器２８の底面面積に対する活性化幹細胞２７の総平面面積の目標割合は、８８～９２％（８８～９２％コンフルエント）である。

[0096] 担当者は、あらたな培養液２３とあらたな培養生成液２４とを第２扁平培養容器２８に注入した後、活性化幹細胞培養観察ボタンをクリックするとともに、培養容器２８を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第２扁平培養容器２８の底部４５との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２８の底部４５をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２８の底部４５が上となり培養容器２８の頂部４６（注入口４７）が下となるように、培養容器２８を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図８参照）。また、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第２扁平培養容器２８の頂部４６との間にスペーサー４２を介在させ、培養容器２８の頂部４６をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２８の頂部４６が上となり培養容器２８の底部４５が下となるように、培養容器２８を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第２扁平培養容器２８の傾斜角度α２は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0097] 培養生成液製造方法は、活性化幹細胞２７の定着を確認した後、培養容器２８の混合培養液２６を排出しつつあらたな培養液２３とあらたな培養生成液２４とを培養容器２８に注入することで、活性化幹細胞２７の増殖を確実に促進することができる。培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第２扁平培養容器２８を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２８内において活性化幹細胞２７、培養液２３、培養生成液２４が培養容器２８の頂部４６の側（または底部４５の側）に偏り、培養容器２８の頂部４６の側（または底部４５の側）において活性化幹細胞２７、培養液２３、培養生成液２４の水圧が大きくなって活性化幹細胞２７が培養容器２８の底部４５の側（または頂部４６の側）に集中し、それによって活性化幹細胞２７どうしの活性が高まり、培養容器２７の底面２９において活性化幹細胞２７を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0098] ディスプレイ１７には、活性化幹細胞培養観察実施中メッセージ、活性化

幹細胞培養完了ボタンが表示される。活性化幹細胞２７の定着を確認した後、第２扁平培養容器２８から培養液２３と培養生成液２４との混合培養液２６を排出しつつ、あらたな培養液２３と単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質が含まれるあらたな培養生成液２４とを第２扁平培養容器２８に注入することで、その幹細胞３０自体の代謝物質がトリガーとなり、活性化幹細胞２７が速やかに活性を開始し、活性化幹細胞２７の増殖を確実に促進することができる。

[0099] 電子顕微鏡１３は、第２扁平培養容器２８の活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。

[0100] 担当者は、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、第２扁平培養容器２８の底面２９に定着した活性化幹細胞２７の培養容器２８の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、活性化幹細胞２７の総平面面積が培養容器２８の底面面積に対して目標割合（第２目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面面積に対する総平面面積を３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で直接観察し、活性化幹細胞２７の総平面面積が培養容器２８の底面面積に対して目標割合（８８～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0101] 担当者は、活性化幹細胞培養工程における観察の結果、図９に示すように、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第２目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達していない場合、活性化幹細胞２７の培養容器２８の底面面積に対する総平面面積を約１～２時間間隔で継続して観察する。なお、ディスプレイ１７に表示された拡大画像の全面積に対して活性化幹細胞２７の総平面面積が目標割合（第２目標割合）に達した場合に、活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達したものとする。

[0102] 活性化幹細胞培養工程における観察の結果、活性化幹細胞２７が第２扁平培養容器２８の底面２９（底壁内面）において増殖して活性化幹細胞２７がコロニーを形成し、活性化幹細胞２７の平面形状が拡張することで、図１０に示すように、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞２７の培養容器２８の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第２目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達した場合、活性化幹細胞２７がさらに活性化して増殖している。活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達した時点で、培養容器２８から活性化幹細胞２７を抽出し、抽出した活性化幹細胞２７を各種疾患の治療や再生医療に利用する。

[0103] 担当者は、第２扁平培養容器２８に注入されている混合培養液２６を注射器またはピペットを利用して培養容器２８から排出し、培養容器２８内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器２８に注入する。第２扁平培養容器２８にトリプシン液を注入すると、培養容器２８の底面２９に定着（増殖）した活性化幹細胞２７がトリプシン液によって底面２９から剥離し、トリプシン液の水面に浮上する。担当者は、ピペットを利用して活性化幹細胞２７を吸引し、活性化幹細胞２７をピペット内に収容する。なお、活性化幹細胞培養工程において培養した活性化幹細胞２７を幹細胞収容容器１９に収容し、活性化幹細胞２７を収容した幹細胞収容容器１９を冷蔵庫１４または

冷凍庫１４に入れ、冷蔵庫１４または冷凍庫１４において活性化幹細胞２７を保存することができる。

[0104] 担当者は、活性化幹細胞２７の第２扁平培養容器２８の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第２目標割合）に達したことを確認した後、ディスプレイ１７に表示された活性化幹細胞培養完了ボタンをクリックする。活性化幹細胞培養完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、初期画面をディスプレイ１７に表示する。培養を終了する場合は、初期画面のログアウトボタンをクリックする。ログアウトボタンをクリックすると、コンピュータ１１がシステム１０からログアウトする。

[0105] 活性化幹細胞製造方法は、活性化幹細胞２７（休眠幹細胞２２）の保存前の単一種の間葉系幹細胞３０の培養過程（増殖過程）において生成されてその幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質が含まれる培養生成液２４を利用することで、その幹細胞３０自体の代謝物質がトリガーとなり、活性化幹細胞２７が速やかに活性を開始し、第２扁平培養容器２８（第２培養容器）の底面２９に対する活性化幹細胞２７の定着や活性化幹細胞２７の増殖を促進することができ、活性化幹細胞２７の活性を保持しつつ活性化幹細胞２７を速やかに増殖させることができる。

[0106] 活性化幹細胞製造方法は、活性化幹細胞２７（休眠幹細胞２２）の保存前の単一種の間葉系の幹細胞３０の培養過程（増殖過程）において生成された培養生成液２４を利用して活性化幹細胞２７を第２扁平培養容器２８の底面２９に定着させるとともに、その培養生成液２４を利用して総平面面積が第２目標割合に達するまで活性化幹細胞２７を増殖させることで、単一種の間葉系活性化幹細胞２７を効率よく確実に定着かつ増殖させることができ、十分な活性を有する必要量の単一種の間葉系活性化幹細胞２７を効率よく製造することができる。

[0107] 活性化幹細胞製造方法は、活性化幹細胞２７に活性化幹細胞定着工程および活性化幹細胞培養工程を実施することによって不要な間葉系幹細胞を含まないピュア（純粋）な単一種の間葉系活性化幹細胞２７を作ることができ、

多種雑多な間葉系幹細胞が含まれることがないから、各種疾患の治療の効果や再生医療における再生の効果が高い活性化幹細胞２７を製造することができ、各種疾患の治療に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞２７を製造することができるとともに、各種組織や各種臓器を再生に好適かつタイムリーに使用することが可能な活性化幹細胞２７を製造することができる。

[0108] 図１２は、幹細胞第１定着工程において使用するガラス試験管３２の斜視図であり、図１３は、図１２から続く幹細胞第１定着工程を説明する図である。図１４は、図１３から続く幹細胞第１定着工程を説明する図である。図１２～図２２に基づいて休眠幹細胞２２の保存前であって休眠幹細胞２２の元となる単一種の間葉系幹細胞３０の製造方法を説明する。

[0109] 単一種の幹細胞３０は、複数のドナー（人）から採取した原料骨髄液３１を利用し、活性化幹細胞培養システム１０によって１回目の幹細胞第１定着工程、１回目の幹細胞第１培養工程、２回目の幹細胞第２定着工程、２回目の幹細胞第２培養工程を実施することから作られる。システム１０は、原料骨髄液３１に含まれる複数種類の間葉系幹細胞の中から特定種類の単一種の間葉系幹細胞３８（第１幹細胞）を培養する。

[0110] １回目の幹細胞第１定着工程では、最初にドナーから採取した原料骨髄液３１を層状に分離させる。骨髄液採取では、それらドナーの胸骨または腸骨（骨盤）から２～３ｃｃ（２～３ｍｌ）の原料骨髄液３１が採取される。原料骨髄液３１は、ドナーに局所麻酔をかけた後、骨髄を穿刺して骨髄液（骨髄血）を吸引する「骨髄穿刺」（マルク）によって採取される。医師や看護師、研究者等の担当者は、原料骨髄液３１の採取と同時に、コンピュータ１１においてシステム１０を起動し、初期画面の幹細胞培養ボタンをクリックする。ディスプレイ１７には、データ取得ボタン、ログアウトボタンが表示される。

[0111] 担当者は、データ取得ボタンをクリックした後、キーボード１４やマウス１５等の入力装置を利用してドナーデータおよび幹細胞データをコンピュー

タ１１に入力する。コンピュータ１１は、ドナーデータおよび幹細胞データが入力される度毎（ドナーから原料骨髄液を採取する度毎）に各ドナーを特定するユニークなドナー識別子および幹細胞識別子を生成し、ドナーデータおよび幹細胞データをドナー識別子および幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。ディスプレイ１７には、ドナーデータ取得メッセージ、データ格納ボタン、ログアウトボタンが表示される。

[0112] ドナーから採取された２～３ｃｃの原料骨髄液３１は、図１２に示すように、上下方向へ延びるガラス試験管３２（分離容器）内に注入（収容）される。なお、２～３ｃｃの原料骨髄液３１には、０．５～１ｍｌ（約5×10^7（ｃｅｌｌｓ／ｍｌ））の複数種類の間葉系幹細胞３８（間葉系第１幹細胞）が含まれる。

[0113] 原料骨髄液３１を注入するガラス試験管３２の外周面には、ＩＣタグ１８が取り付けられている。担当者は、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用してガラス試験管３２のＩＣタグ１８にドナーデータおよび幹細胞データを書き込む。ＩＣタグ１８にドナーデータや幹細胞データを書き込むと、コンピュータ１１は、データ格納終了メッセージ、骨髄液分離ボタン、ログアウトボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0114] 原料骨髄液３１を注入したガラス試験管３２は、図１３に示すように、試験管立て３３にセットされ、試験管立て３３とともに恒温槽３４内に収容される。担当者は、ディスプレイ１７に表示された骨髄液分離ボタンをクリックした後、注射器からガラス試験管３２に原料骨髄液３１を注入し、原料骨髄液３１を注入したガラス試験管３２を試験管立て３３に挿入（セット）する。ディスプレイ１７には、骨髄液分離中メッセージ、骨髄液分離終了ボタンが表示される。

[0115] 担当者は、試験管立て３３を恒温槽３４内に収容し、原料骨髄液３１を注入したガラス試験管３２を恒温槽３４において所定時間（約２時間）静的に放置（動かすことなく静かに放置）する。恒温槽３４内の温度は、体温と略同一の約３７℃に保持されている。ガラス試験管３２を恒温槽３４に所定時

間（約２時間）静的に放置することで、図１４に示すように、試験管３２に注入された原料骨髄液３１が試験管３２内において上下方向へ何層かの層状に分離する（図１４では３層に分離）。

[0116] 原料骨髄液３１を層状に分離させた後、骨髄液の抽出が行われる。骨髄液の抽出では、層状に分離した原料骨髄液３１から中間層骨髄液３５を抽出する。担当者は、恒温槽３４から試験管立て３３を取り出し、試験管立て３３からガラス試験管３２を引き抜き、原料骨髄液３１が層状に分離したことを確認した後、層状に分離した原料骨髄液３１の特定の層に存在する中間層骨髄液３５を抽出する。

[0117] 担当者は、注射器またはピペットを利用して層状に分離した原料骨髄液３１のうちの中間層に位置する３～４ｍｍの層厚みの中間層骨髄液３５を吸引する。多種雑多な間葉系幹細胞を含む原料骨髄液３１を上下方向へ層状に分離させた後、原料骨髄液３１から特定の中間層骨髄液３５を抽出することで、原料骨髄液３１に含まれる不要な間葉系幹細胞を除去することができる。

[0118] 中間層骨髄液３５を抽出した後、骨髄液分離終了ボタンをクリックする。ディスプレイ１７には、骨髄液分離終了メッセージ、データ格納ボタンが表示される。担当者は、第３扁平培養容器（第３培養容器）（図示せず）を用意し、培養容器の外周面にＩＣタグを取り付けた後、データ格納ボタンをクリックするとともに、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用してそのＩＣタグにガラス試験管３２に取り付けられたＩＣタグ１８のドナーデータおよび幹細胞データを格納する。コンピュータ１１は、データ格納完了メッセージ、幹細胞第１定着観察ボタン、幹細胞第１定着完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0119] 担当者は、原料骨髄液３１から中間層に位置する特定の中間層骨髄液３５を抽出した後、注射器またはピペットを利用して中間層骨髄液３５および培養液２３を第３扁平培養容器（第３培養容器）に注入（収容）し、培養容器を体温と略同一の温度（約３７℃）に保持しつつ、１２～２４時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）し、１２～２４時間の間において約１～２

時間の間隔で培養容器内の中間層骨髄液３５に含まれる間葉系幹細胞３８（第１幹細胞）の初期平面形状からの変形を電子顕微鏡で観察し、幹細胞３６が培養容器の底面に定着したか否かを判断する。

[0120] 幹細胞第１定着工程や幹細胞第１培養工程で使用される第３扁平培養容器は、休眠幹細胞定着工程や休眠幹細胞培養工程に使用された第１扁平培養容器２１（第１培養容器）と同一（同形同大）である（図２参照）。第３扁平培養容器は、その容量が約２０～３０ｃｃ（好ましくは、２５ｃｃ）であり、その底面面積が約２５～３６ｍｍ^{2}である。第３扁平培養容器は、その一辺の長さが５～６ｍｍである。

[0121] 図１５は、幹細胞３８の平面形状の一例を示す部分拡大図である。図１６は、幹細胞３８の平面形状の他の一例を示す部分拡大図であり、図１７は、幹細胞３８の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図１５～１７は、電子顕微鏡１３によって撮影された幹細胞３８の平面形状の拡大画像を示す。

[0122] 担当者は、第１定着観察ボタンをクリックするとともに、第３扁平培養容器を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９に設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第３扁平培養容器の底部との間にスペーサー４２を介在させ、第３扁平培養容器の底部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第３扁平培養容器の底部が上となり第３扁平培養容器の頂部（注入口）が下となるように、第３扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図３参照）。また、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第３扁平培養容器の頂部との間にスペーサー４２を介在させ、第３扁平培養容器の頂部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第３扁平培養容器の頂部が上となり第３扁平培養容器の底部が下となるように、第３扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第３扁平培養容器の傾斜角度α１は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0123] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第３扁平培養

容器を前記傾斜角度で傾斜させることで、第３扁平培養容器内において幹細胞３８、培養液２３が第３扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）に偏り、第３扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）において幹細胞３８、培養液２３の水圧が大きくなって幹細胞３８が第３扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）に集中し、それによって幹細胞３８どうしの活性が高まり、第３扁平培養容器の底面２５において幹細胞３８を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0124] ディスプレイ１７には、幹細胞第１定着観察実施中メッセージ、幹細胞第１定着完了ボタンが表示される。電子顕微鏡１３は、第３扁平培養容器に注入された中間層骨髄液３５に含まれる幹細胞３８の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した幹細胞３８の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。

[0125] 電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。第３扁平培養容器に注入された間葉系の幹細胞３８（第１幹細胞）は、時間の経過とともに培養容器の底面に定着しつつ、培養液によって培養され、培養容器の底面において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0126] コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された間葉系の幹細胞３８（第１幹細胞）の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３８の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。担当者は、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８の平面形状の拡大画像を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、幹細胞３８の平面形状の変化を観察する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から幹細胞３８の平面形状の変化を１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で直接観察してもよい。

[0127] 幹細胞３８（第１幹細胞）の初期平面形状は略円形であり、幹細胞３８の

平面形状が略円形の場合、幹細胞３８が第３扁平培養容器の底面（底壁内面）に定着しておらず、幹細胞３８が増殖（分化）を開始していない。幹細胞３８（第１幹細胞）の変形後の平面形状は定着前の略円形を核として幹細胞３８が一方向（所定方向）へ不定形に伸張（拡張）した扁平形状であり、幹細胞３８が培養容器の底面（底壁内面）に定着し、幹細胞３８が増殖を開始している。

[0128] 担当者は、幹細胞第１定着工程における観察の結果、図１５に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８（第１幹細胞）の平面形状の拡大画像が略円形のまま観察される場合、幹細胞３８が第３扁平培養容器の底面（底壁内面）に定着していないと判断し、幹細胞３８の平面形状の変化を約１～２時間の間隔で継続して観察する。担当者は、図１６に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８（第１幹細胞）の平面形状が略円形から略円形を核として不定形の扁平形状に変形した場合、幹細胞３８が培養容器の底面に定着したと判断する。

[0129] 幹細胞３８（第１幹細胞）の定着時に容量が３０ｃｃを超過するとともに底面面積が３６ｍｍ^{2}を超過する大きな培養容器を使用すると、幹細胞３８が容器の底面に定着し難くなるとともに幹細胞３８の増殖が遅くなるが、第１扁平培養容器２１と同様の容量および底面面積を有する第３扁平培養容器を使用することで、幹細胞３８を培養容器の底面に容易に定着させることができ、培養容器において幹細胞３８を素早く増殖させることができる。第３扁平培養容器を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的に放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器内の幹細胞３８（第１幹細胞）の初期平面形状からの変形を観察するから、幹細胞３８の変形を見逃すことはなく、幹細胞３８の第３扁平培養容器の底面に対する定着を正確に確認することができる。

[0130] 幹細胞第１定着工程における観察の結果、間葉系幹細胞３８（第１幹細胞）が略円形（初期平面形状）から略円形を核として不定形の扁平形状に変形し、幹細胞３８の第３扁平培養容器の底面への定着を確認した後、幹細胞第

１培養工程が行われる。医師や看護師、研究者等の担当者は、幹細胞３８の第３扁平培養容器の底面に対する定着を確認した後、ディスプレイ１７に表示された第１定着完了ボタンをクリックする。第１定着完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、幹細胞第１定着完了メッセージ、幹細胞第１培養観察ボタン、幹細胞第１培養完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0131] 幹細胞第１培養工程では、第３扁平培養容器に注入されている培養液２３を培養容器から排出し、培養容器にあらたな培養液２３を注入（収容）する。担当者は、第３扁平培養容器を電子顕微鏡１６の試料ホルダから取り外し、幹細胞第１定着工程において培養容器に注入した培養液２３を注射器またはピペットを利用して培養容器から排出し、注射器またはピペットを利用してあらたな培養液２３を培養容器に注入（収容）する。

[0132] 担当者は、第３扁平培養容器を体温と略同一の温度（約３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器の底面に定着した幹細胞３８（第１幹細胞）の第３扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積を電子顕微鏡１３で観察し、幹細胞３８の総平面面積が培養容器の底面面積に対して目標割合（第３目標割合）に達したか否かを判断する。培養容器の底面面積に対する幹細胞３８の総平面面積の第３目標割合は、７０～８０％（７０～８０％コンフルエント）である。

[0133] 担当者は、あらたな培養液２３を培養容器に注入した後、第１培養観察ボタンをクリックするとともに、培養容器を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９に設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第３扁平培養容器の底部との間にスペーサー４２を介在させ、第３扁平培養容器の底部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第３扁平培養容器の底部が上となり第３扁平培養容器の頂部（注入口）が下となるように、第３扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図３参照）。また、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第３扁平培養容器

の頂部との間にスペーサー４２を介在させ、第３扁平培養容器の頂部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第３扁平培養容器の頂部が上となり第３扁平培養容器の底部が下となるように、第３扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第３扁平培養容器の傾斜角度α１は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0134] 培養生成液製造方法は、幹細胞３８の定着を確認した後、第３扁平培養容器の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を第３扁平培養容器に注入することで、幹細胞３８の増殖を確実に促進することができる。培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第３扁平培養容器を前記傾斜角度で傾斜させることで、第３扁平培養容器内において幹細胞３８、培養液２３が第３扁平培養容器の頂部４３の側（または底部４１の側）に偏り、第３扁平培養容器の頂部４３の側（または底部４１の側）において幹細胞３８、培養液２３の水圧が大きくなって幹細胞３８が第３扁平培養容器の底部４１の側（または頂部４３の側）に集中し、それによって幹細胞３８どうしの活性が高まり、第３扁平培養容器の底面２５において幹細胞３８を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0135] ディスプレイ１７には、幹細胞第１培養観察実施中メッセージ、幹細胞第１培養完了ボタンが表示される。幹細胞の定着を確認した後、第３扁平培養容器の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を培養容器に注入することで、幹細胞３８の増殖を確実に促進することができる。

[0136] 電子顕微鏡１３は、第３扁平培養容器の幹細胞３８の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した幹細胞３８の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３８（第１幹細胞）の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記

憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３８の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。

[0137] 担当者は、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、第３扁平培養容器の底面に定着した幹細胞３８（第１幹細胞）の培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、幹細胞３８の総平面面積が培養容器の底面面積に対して目標割合（第３目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達したか否かを判断する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から幹細胞３８の培養容器の底面面積に対する総平面面積を３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で直接観察し、幹細胞３８の総平面面積が培養容器の底面面積に対して目標割合（７０～８０％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0138] 担当者は、幹細胞第１培養工程における観察の結果、図１６に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８（第１幹細胞）の第３扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第３目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達していない場合、幹細胞３８の培養容器の底面面積に対する総平面面積を約１～２時間間隔で継続して観察する。なお、ディスプレイ１７に表示された拡大画像の全面積に対して幹細胞３８の総平面面積が目標割合（第３目標割合）に達した場合に、幹細胞３８の第３扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達したものとする。

[0139] 幹細胞第１培養工程における観察の結果、図１７に示すように、幹細胞３８（第１幹細胞）が第３扁平培養容器の底面（底壁内面）において増殖して幹細胞がコロニーを形成し、幹細胞３８の平面形状が拡張することで、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３８の培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第３目標割合）（７０～８０％コンフルエント）に達した時点で、第３扁平培養容器から増殖（分化）した間葉系幹細胞３８を抽出する。

[0140] 間葉系幹細胞３８（間葉系第１幹細胞）の第３扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第３目標割合）に達したことを確認した後、幹細胞第２定着工程が行われる。担当者は、幹細胞３８の第３扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第３目標割合）に達したことを確認した後、ディスプレイ１７に表示された幹細胞第１培養完了ボタンをクリックする。幹細胞第１培養完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、幹細胞第１培養終了ボタン、幹細胞第１抽出終了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0141] 担当者は、第３扁平培養容器に注入されている培養液２３を培養容器から排出し、培養容器内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器内に注入する。第３扁平培養容器にトリプシン液を注入すると、培養容器の底面に定着した間葉系幹細胞３８（第１幹細胞）がトリプシン液によって底面から剥離し、トリプシン液の水面に浮上する。担当者は、ピペットを利用して幹細胞３８を吸引し、幹細胞３８をピペット内に収容する。

[0142] 図１８は、幹細胞第２定着工程において使用するガラス試験管３６および遠心分離器３７の斜視図であり、図１９は、遠心分離後のガラス試験管３６の斜視図である。第３扁平培養容器から幹細胞３８（第１幹細胞）を抽出した後、幹細胞第２定着工程が行われる。幹細胞第２定着工程では、抽出された幹細胞３８を遠心分離器３７によって層状に遠心分離する。医師や看護師、研究者等の担当者は、幹細胞３８を第３扁平培養容器からピペットに吸引した後、ディスプレイ１７に表示された幹細胞第１抽出終了ボタンをクリックする。ディスプレイ１７には、幹細胞分離中メッセージ、幹細胞分離終了ボタンが表示される。

[0143] 担当者は、ピペット内の幹細胞３８（第１幹細胞）をそのガラス試験管３６に注入（収容）し、ガラス試験管３６を遠心分離器３７に設置（セット）する。担当者は、幹細胞３８を遠心分離器３７によって所定時間遠心分離した後、ガラス試験管３６を遠心分離器３７から取り出す。ガラス試験管３６内の幹細胞３８は、遠心分離器３７によって上下方向へ何層かの層状に分離

する。

[0144] 幹細胞３８（第１幹細胞）を層状に分離させた後、層状に分離した幹細胞３８から下層（最下層）に位置する間葉系の幹細胞３０（第２幹細胞）を抽出する。不要な幹細胞を含む幹細胞３８（第１幹細胞）を遠心分離器３７で遠心分離して上下方向へ層状に分離させ、層状に遠心分離した幹細胞３８のうちの最下層に位置する幹細胞３０（第２幹細胞）を抽出することで、幹細胞３８から特定の幹細胞３０を確実に抽出することができ、幹細胞３８から不要な幹細胞を除去することができる。

[0145] 第３扁平培養容器（第３培養容器）の底面面積に対する幹細胞３８（第１幹細胞）の総平面面積が８０％を超過して幹細胞３８が増殖すると、幹細胞３８の活性が次第に失われるが、培養容器の底面面積に対して幹細胞３８（第１幹細胞）の総平面面積が７０～８０％に増殖したときに、幹細胞３８を培養容器から抽出するから、幹細胞３８の活性を保持することができ、活性を保持した状態で幹細胞３８を増殖させることができるとともに、幹細胞３８から活性を有する幹細胞３０（第２幹細胞）を抽出することができる。

[0146] 担当者は、遠心分離器３７によって幹細胞３８（第１幹細胞）を上下方向へ層状に分離させた後、ガラス試験管３６を遠心分離器３７から取り出し、ディスプレイ１７に表示された幹細胞分離終了ボタンをクリックする。ディスプレイ１７には、幹細胞分離終了メッセージ、データ格納ボタンが表示される。担当者は、第４扁平培養容器（第４培養容器）（図示せず）を用意し、第４扁平培養容器の外周面にＩＣタグ１８を取り付けた後、データ格納ボタンをクリックするとともに、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用してそのＩＣタグ１８に第３扁平培養容器に取り付けられたＩＣタグのドナーデータおよび幹細胞データを格納する。コンピュータ１１は、データ格納完了メッセージ、幹細胞第２定着観察ボタン、幹細胞第２定着完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0147] 幹細胞第２定着工程や幹細胞第２培養工程で使用される第４扁平培養容器は、活性化幹細胞定着工程や活性化幹細胞培養工程に使用された第２扁平培

養容器２８（第２培養容器）と同一（同形同大）である（図６参照）。第４扁平培養容器は、その容量が約４０～６０ｃｃ（好ましくは、５０ｃｃ）であり、その底面面積が約５０～７２ｍｍ^{2}である。培養容器２８は、その一辺の長さが約７～８．５ｍｍである。

[0148] 図２０は、幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の一例を示す部分拡大図であり、図２１は、幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図２２は、幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図２０～２２は、電子顕微鏡１３によって撮影された幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の拡大画像を示す。

[0149] 医師や看護師、研究者等の担当者は、ガラス試験管３６において層状に分離した幹細胞３８（第１幹細胞）のうちの下層（最下層）に存在する間葉系の幹細胞３０（第２幹細胞）を注射器またはピペットを利用して抽出した後、その幹細胞３０および培養液２３を第４扁平培養容器（第４培養容器）に注入（収容）し、培養容器を体温と略同一の温度（約３７℃）に保持しつつ、３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）し、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器内の幹細胞３０（第２幹細胞）の初期平面形状からの変形を電子顕微鏡１３で観察し、幹細胞３０が培養容器の底面に定着したか否かを判断する。

[0150] 担当者は、幹細胞第２定着観察ボタンをクリックするとともに、第４扁平培養容器を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第４扁平培養容器の底部との間にスペーサー４２を介在させ、第４扁平培養容器の底部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第４扁平培養容器の底部が上となり第４扁平培養容器の頂部（注入口）が下となるように、第４扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持する。また、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３９の上面４０と第４扁平培養容器の頂部との間にスペーサー４２を介在させ、第４扁平培養容器の頂部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第４扁平培養容器の頂部が上となり第４扁平培養容器の底部が下となるように

、第４扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第４扁平培養容器の傾斜角度α２は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0151] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第４扁平培養容器を前記傾斜角度で傾斜させることで、第４扁平培養容器内において幹細胞３０、培養液２３が第４扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）に偏り、第４扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）において幹細胞３０、培養液２３の水圧が大きくなって幹細胞３０が第４扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）に集中し、それによって幹細胞３０どうしの活性が高まり、第４扁平培養容器の底面において幹細胞３０を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0152] ディスプレイ１７には、幹細胞第２定着観察実施中メッセージ、幹細胞第２定着完了ボタンが表示される。電子顕微鏡１３は、第４扁平培養容器に注入された幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した幹細胞３０の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。第４扁平培養容器に注入された間葉系の幹細胞３０（第２幹細胞）は、時間の経過とともに培養容器の底面に定着しつつ、培養液２３によって培養され、培養容器の底面において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0153] コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された間葉系の幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。担当者は、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、幹細胞３０の平面形状の変化を観察する

。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から幹細胞３０の平面形状の変化を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で直接観察してもよい。

[0154] 幹細胞３０（第２幹細胞）の初期平面形状は略円形であり、幹細胞３０の平面形状が略円形の場合、幹細胞３０が第４扁平培養容器の底面（底壁内面）に定着しておらず、幹細胞３０が増殖（分化）を開始していない。幹細胞３０（第２幹細胞）の変形後の平面形状は定着前の略円形を核として幹細胞３０が一方向（所定方向）へ不定形に伸張（拡張）した扁平形状であり、幹細胞３０が第４扁平培養容器の底面（底壁内面）に定着し、幹細胞３０が増殖を開始している。

[0155] 担当者は、幹細胞第２定着工程における観察の結果、図２０に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の拡大画像が略円形のまま観察される場合、幹細胞３０が第４扁平培養容器の底面（底壁内面）に定着していないと判断し、幹細胞３０の平面形状の変化を約１～２時間の間隔で継続して観察する。担当者は、図２１に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状が略円形から略円形を核として不定形の扁平形状に変形した場合、幹細胞３０が培養容器の底面に定着したと判断する。

[0156] 幹細胞３０（第２幹細胞）の定着時に容量が６０ｃｃを超過するとともに底面面積が７２ｍｍ^{2}を超過する大きな培養容器を使用すると、幹細胞３０が容器の底面に定着し難くなるとともに幹細胞３０の増殖が遅くなるが、前記容量かつ前記底面面積の第４扁平培養容器を使用することで、幹細胞３０を培養容器の底面に容易に定着させることができ、培養容器において幹細胞３０を素早く増殖させることができる。第４扁平培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器内の幹細胞３０（第２幹細胞）の初期平面形状からの変形を観察するから、幹細胞３０の変形を見逃すことはなく、幹細胞３０の培養容器の底面に対する定着を正確に確認することができる。

[0157] 幹細胞第２定着工程における観察の結果、図２２に示すように、間葉系の

幹細胞３０（第２幹細胞）が略円形（初期平面形状）から略円形を核として不定形の扁平形状に変形し、幹細胞３０の第４扁平培養容器の底面への定着を確認した後、幹細胞第２培養工程が行われる。医師や看護師、研究者等の担当者は、幹細胞３０の第４扁平培養容器の底面に対する定着を確認した後、ディスプレイ１７に表示された幹細胞第２定着完了ボタンをクリックする。幹細胞第２定着完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、幹細胞第２定着完了メッセージ、幹細胞第２培養観察ボタン、幹細胞第２培養完了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0158] 幹細胞第２培養工程では、第４扁平培養容器に注入されている培養液２３を培養容器から排出し、培養容器にあらたな培養液２３を注入（収容）する。担当者は、第４扁平培養容器を電子顕微鏡１６の試料ホルダから取り外し、幹細胞第１定着工程において培養容器に注入した培養液２３を注射器またはピペットを利用して培養容器から排出し、注射器またはピペットを利用してあらたな培養液２３を培養容器に注入（収容）する。

[0159] 担当者は、第４扁扁平培養容器を体温と略同一の温度（約３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で培養容器の底面に定着した幹細胞３０（第２幹細胞）の培養容器の底面面積に対する総平面面積を電子顕微鏡１３で観察し、幹細胞の２８総平面面積が培養容器の底面面積に対して目標割合（第４目標割合）に達したか否かを判断する。培養容器の底面面積に対する幹細胞３０の総平面面積の第４目標割合は、８８～９２％（８８～９２％コンフルエント）である。

[0160] 担当者は、あらたな培養液２３を第４扁平培養容器に注入した後、第２培養観察ボタンをクリックするとともに、培養容器を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。なお、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第４扁平培養容器の底部との間にスペーサー４２を介在させ、第４扁平培養容器の底部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第４扁平培養容器の底部が上となり第４扁平培養容器の頂部（注入口）が下とな

るように、第４扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図８参照）。また、電子顕微鏡１６の試料ホルダ３９の上面４０と第４扁平培養容器の頂部との間にスペーサー４２を介在させ、第４扁平培養容器の頂部をスペーサー４２によって持ち上げた状態に保持し、第４扁平培養容器の頂部が上となり第４扁平培養容器の底部が下となるように、第４扁平培養容器を所定角度に傾斜させた状態に保持してもよい。試料ホルダ３９の上面４０に対する第４扁平培養容器の傾斜角度α２は、２～５°の範囲にあり、好ましくは、２～３°の範囲にある。

[0161] 培養生成液製造方法は、幹細胞３０の定着を確認した後、第４扁平培養容器の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を第４扁平培養容器に注入することで、幹細胞３０の増殖を確実に促進することができる。培養生成液製造方法は、試料ホルダ３９の上面４０に対して第４扁平培養容器を前記傾斜角度で傾斜させることで、第４扁平培養容器内において幹細胞３０、培養液２３が第４扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）に偏り、第４扁平培養容器の頂部の側（または底部の側）において幹細胞３０、培養液２３の水圧が大きくなって幹細胞３０が第４扁平培養容器の底部の側（または頂部の側）に集中し、それによって幹細胞３０どうしの活性が高まり、第４扁平培養容器の底面において幹細胞３０を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0162] ディスプレイ１７には、幹細胞第２培養観察実施中メッセージ、幹細胞第２培養完了ボタンが表示される。幹細胞３０の定着を確認した後、培養容器の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を培養容器に注入することで、幹細胞３０（第２幹細胞）の増殖を確実に促進することができる。

[0163] 電子顕微鏡１３は、第４扁平培養容器の幹細胞３０の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔で撮影し、撮影した幹細胞３０の平面形状の拡大画像を約１～２時間間隔でコンピュータ１１に送信する。電子顕微鏡１３における画像撮影間隔や画像送信間隔は、キーボード１４やマウス１５等の入力装置によって１～２時間の間で自由に設定することができる。コンピュータ１１

は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３０（第２幹細胞）の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子、幹細胞識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１７に表示する。

[0164] 担当者は、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で確認（視認）し、第４扁平培養容器の底面に定着した幹細胞３０（第２幹細胞）の培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、幹細胞３０の総平面面積が第４扁平培養容器の底面面積に対して目標割合（第４目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断する。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から幹細胞３０の培養容器の底面面積に対する総平面面積を３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で直接観察し、幹細胞３０の総平面面積が培養容器の底面面積に対して目標割合（８８～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0165] 担当者は、幹細胞第２培養工程における観察の結果、図２１に示すように、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０（第２幹細胞）の第４扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第４目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達していない場合、幹細胞３０の培養容器の底面面積に対する総平面面積を約１～２時間間隔で継続して観察する。なお、ディスプレイ１７に表示された拡大画像の全面積に対して幹細胞３０の総平面面積が目標割合（第４目標割合）に達した場合に、幹細胞３０の第４扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合に達したものとする。

[0166] 幹細胞第２培養工程における観察の結果、図２２に示すように、幹細胞３０（第２幹細胞）が第４扁平培養容器の底面（底壁内面）において増殖して幹細胞３０がコロニーを形成し、幹細胞３０の平面形状が拡張することで、ディスプレイ１７に表示された幹細胞３０の培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第４目標割合）（８８～９２％コンフルエント）に達

した時点で、第４扁平培養容器から増殖（分化）した単一種の間葉系幹細胞３０を抽出する。

[0167] なお、第４扁平培養容器に収容された（残存する）培養液２３には単一種の間葉系幹細胞３０（第２幹細胞）の培養過程（増殖過程）においてその幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質が含まれ、第４扁平培養容器に残存する培養液２３が培養生成液２４になっている。担当者は、幹細胞３０（第２幹細胞）の第４扁平培養容器の底面面積に対する総平面面積が目標割合（第４目標割合）に達したことを確認した後、ディスプレイ１７に表示された幹細胞第２培養完了ボタンをクリックする。幹細胞第２培養完了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、幹細胞第２培養終了ボタン、幹細胞第２抽出終了ボタンをディスプレイ１７に表示する。

[0168] 図２３は、幹細胞３０（第２幹細胞）および培養生成液２４の保存の一例を示す図である。担当者は、ピペットを利用して第４扁平培養容器に注入されている培養生成液２４（培養液２３）を培養容器から吸引し、培養生成液２４をピペット内に収容する。次に、第４扁平培養容器内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器内に注入する。第４扁平培養容器にトリプシン液を注入すると、培養容器の底面に定着した間葉系の幹細胞３０（第２幹細胞）がトリプシン液によって底面から剥離し、トリプシン液の水面に浮上する。担当者は、ピペットを利用して幹細胞３０を吸引し、幹細胞３０をピペット内に収容した後、幹細胞第２抽出終了ボタンをクリックする。幹細胞第２抽出終了ボタンをクリックすると、ディスプレイ１７には、幹細胞収容容器データ格納ボタン、生成液収容容器データ格納ボタンが表示される。

[0169] 担当者は、培養生成液２４と幹細胞３０（第２幹細胞）とを抽出した後、幹細胞収容容器１９と生成液収容容器２０とを用意し、その幹細胞収容容器１９の外周面にＩＣタグ１８を取り付けるとともに、その生成液収容容器２０の外周面にＩＣタグ１８を取り付ける。担当者は、幹細胞収容容器データ格納ボタンをクリックし、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用して幹細胞収容容器１９のＩＣタグ１８に第４扁平培養容器に取り付けられたＩＣタグ１

８のドナーデータおよび幹細胞データを格納する。さらに、生成液収容容器データ格納ボタンをクリックし、ＩＣタグリーダ／ライタ１２を利用して生成液収容容器２０のＩＣタグ１８に第４扁平培養容器に取り付けられたＩＣタグ１８のドナーデータおよび幹細胞データを格納する。それら各データが各容器１９，２０のＩＣタグ１８に格納された後、ディスプレイ１７には、初期画面が表示される。

[0170] 担当者は、幹細胞３０（第２幹細胞）をピペットから幹細胞収容容器１９に注入（収容）する。幹細胞収容容器１９に注入された単一種の間葉系の幹細胞３０は、不要な間葉系の幹細胞が除去された活性を有する培養対象の特定種類の単一種の間葉系幹細胞である。担当者は、幹細胞３０（単一種の間葉系幹細胞）をピペットから幹細胞収容容器１９に注入した後、その幹細胞収容容器１９を冷蔵庫１４または冷凍庫１４に収納する。単一種の間葉系幹細胞３０（第２幹細胞）は、幹細胞収容容器１９に収容された状態で冷蔵庫１４または冷凍庫１４において所定期間、所定温度（３～５℃または冷凍保存）で保存される。

[0171] 担当者は、培養生成液２４をピペットから生成液収容容器２０に注入（収容）する。生成液収容容器２０に注入された培養生成液２４は、不要な間葉系の幹細胞が除去された活性を有する培養対象の特定種類の単一種間葉系幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含んでいる。担当者は、培養生成液２４をピペットから生成液収容容器２０に注入した後、その生成液収容容器２０を冷蔵庫１４または冷凍庫１４に収納する。培養生成液２４は、生成液収容容器２０に収容された状態で冷蔵庫１４または冷凍庫１４において所定期間、所定温度（３～５℃または冷凍保存）で保存される。

符号の説明

[0172] １０ 活性化幹細胞培養システム

１１ コンピュータ

１２ ＩＣタグリーダ／ライタ

１３ 電子顕微鏡

１４　冷蔵庫または冷凍庫

１５　キーボード

１６　マウス

１７　ディスプレイ

１８　ＩＣタグ

１９　幹細胞収容容器原料骨髄液

２０　生成液収容容器

２１　第１扁平培養容器（第１培養容器）

２２　休眠幹細胞（間葉系休眠幹細胞）

２３　培養液

２４　培養生成液

２５　底面

２６　混合培養液

２７　活性化幹細胞（間葉系活性化幹細胞）

２８　第２扁平培養容器（第２培養容器）

２９　底面

３０　幹細胞（間葉系第２幹細胞）

３１　原料骨髄液

３２　ガラス試験管

３３　試験管立て

３４　恒温槽

３５　中間層骨髄液

３６　ガラス試験管

３７　遠心分離器

３８　幹細胞（間葉系第１幹細胞）

３９　試料ホルダ

４０　上面

４１　底部

４２　スペーサー

４３　頂部

４４　注入口

４５　底部

４６　頂部

４７　注入口

請求の範囲

[請求項1] ドナーから採取した骨髄液を培養することから作られた単一種の幹細胞を所定期間保存した後の休眠状態にある単一種の休眠幹細胞を活性化させて単一種の活性化幹細胞を作る活性化幹細胞製造方法において、

前記活性化幹細胞製造方法が、前記単一種の休眠幹細胞と所定の培養液と該休眠幹細胞の保存前の前記単一種の幹細胞の培養過程において生成された培養生成液とを所定容量かつ所定面積の底面を有する第１培養容器に注入し、前記休眠幹細胞を前記第１培養容器の底面に定着させる休眠幹細胞定着工程と、前記休眠幹細胞定着工程によって前記第１培養容器の底面に定着させた前記休眠幹細胞を培養し、前記第１培養容器の底面面積に対する前記休眠幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達するまで該休眠幹細胞を増殖かつ活性化させ、前記休眠幹細胞を前記単一種の活性化幹細胞に変質させる休眠幹細胞培養工程とを有することを特徴とする活性化幹細胞製造方法。

[請求項2] 前記休眠幹細胞培養工程では、前記休眠幹細胞定着工程によって前記休眠幹細胞を前記第１培養容器の底面に定着させた後、前記培養液と前記培養生成液との混合培養液を前記第１培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを該第１培養容器に注入し、前記第１培養容器の底面に定着させた前記休眠幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する請求項１に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項3] 前記休眠幹細胞定着工程では、前記第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で該第１培養容器を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的に放置しつつ、前記１２～２４時間の間において約１～２時間の間隔で前記第１培養容器内の休眠幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、前記休眠幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、該休眠幹細胞が前記第１培養容器の底面に定着したと判断す

る請求項１または請求項２に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項4] 前記休眠幹細胞の初期平面形状が、略円形であり、前記休眠幹細胞の変形後の平面形状が、前記略円形を核として該休眠幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、前記休眠幹細胞定着工程では、前記休眠幹細胞が前記不定形の扁平形状に変形した場合に該休眠幹細胞が前記第１培養容器の底面に定着したと判断する請求項３に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項5] 前記第１培養容器の底面面積に対する前記休眠幹細胞の総平面面積の第１目標割合が、７０～８０％であり、前記休眠幹細胞培養工程では、前記第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で該第１培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、前記３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で前記第１培養容器の底面に定着した前記休眠幹細胞の該第１培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する請求項１ないし請求項４いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項6] 前記活性化幹細胞製造方法が、前記第１培養容器の底面面積に対する前記休眠幹細胞の総平面面積が前記第１目標割合に達した時点で該第１培養容器から該活性化幹細胞を抽出し、抽出した前記活性化幹細胞とあらたな培養液とあらたな培養生成液とを所定容量かつ所定面積の底面を有して前記第１培養容器よりも大きい容量の第２培養容器に注入し、前記活性化幹細胞を前記第２培養容器の底面に定着させる活性化幹細胞定着工程と、前記活性化幹細胞定着工程によって前記第２培養容器の底面に定着させた前記活性化幹細胞を培養し、前記第２培養容器の底面面積に対する前記活性化幹細胞の総平面面積が第２目標割合に達するまで増殖させる活性化幹細胞培養工程とを含む請求項１ないし請求項５いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項7] 前記活性化幹細胞培養工程では、前記活性化幹細胞定着工程によって前記活性化幹細胞を前記第２培養容器の底面に定着させた後、前記

培養液と前記培養生成液との混合培養液を前記第２培養容器から排出しつつ、あらたな培養液とあらたな培養生成液とを該第２培養容器に注入し、前記第２培養容器の底面に定着させた前記活性化幹細胞をあらたな培養液とあらたな培養生成液とのあらたな混合培養液を利用して培養する請求項６に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項8] 前記活性化幹細胞定着工程では、前記第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で該第２培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、前記３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で前記第２培養容器内の活性化幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、前記活性化幹細胞が初期平面形状から所定の平面形状に変形した場合、該活性化幹細胞が前記第２培養容器の底面に定着したと判断する請求項６または請求項７に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項9] 前記活性化幹細胞の初期平面形状が、略円形であり、前記活性化幹細胞の変形後の平面形状が、前記略円形を核として該活性化幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、前記活性化幹細胞定着工程では、前記活性化幹細胞が前記不定形の扁平形状に変形した場合に該活性化幹細胞が前記第２培養容器の底面に定着したと判断する請求項８に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項10] 前記第２培養容器の底面面積に対する前記活性化幹細胞の総平面面積の第２目標割合が、８８～９２％であり、前記活性化幹細胞培養工程では、前記第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で該第２培養容器を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的に放置しつつ、前記３６～４８時間の間において約１～２時間の間隔で前記第２培養容器の底面に定着した前記活性化幹細胞の該第２培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する請求項６ないし請求項９いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項11] 前記培養生成液が、前記単一種の幹細胞の培養過程において該単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む請求項１ないし請求

項１０いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項12] 前記単一種の幹細胞が、前記ドナーから採取した骨髄液を層状に分離し、層状に分離させた前記骨髄液のうちの中間層に位置する中間層骨髄液を抽出し、所定容量かつ所定面積の底面を有する第３培養容器に前記中間層骨髄液と所定の培養液とを注入して該中間層骨髄液に含まれる第１幹細胞を前記第３培養容器の底面に定着させる幹細胞第１定着工程と、前記幹細胞第１定着工程によって前記第１幹細胞を前記第３培養容器の底面に定着させた後、前記第３培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を該第３培養容器に注入して前記第１幹細胞を培養し、前記第３培養容器の底面面積に対する前記第１幹細胞の総平面面積が第３目標割合に達するまで該第１幹細胞を増殖させる幹細胞第１培養工程と、前記幹細胞第１培養工程によって培養した前記第１幹細胞を層状に遠心分離し、層状に分離させた前記第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を抽出するとともに、所定容量かつ所定面積の底面を有して前記第３培養容器よりも大きい容量の第４培養容器に前記第２幹細胞とあらたな培養液とを注入して該第２幹細胞を前記第４培養容器の底面に定着させる幹細胞第２定着工程と、前記幹細胞第２定着工程によって前記第２幹細胞を前記第４培養容器の底面に定着させた後、前記第４培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を該第４培養容器に注入して前記第２幹細胞を培養し、前記第４培養容器の底面面積に対する前記第２幹細胞の総平面面積が第４目標割合に達するまで該第２幹細胞を増殖させる幹細胞第２培養工程とから作られている請求項１ないし請求項１１いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項13] 前記培養生成液が、前記第４培養容器から前記単一の第２幹細胞を抽出した後に残った培養液である請求項１２に記載の活性化幹細胞製造方法。

[請求項14] それら幹細胞が、間葉系の幹細胞である請求項１ないし請求項１３

いずれかに記載の活性化幹細胞製造方法。